



HAL
open science

Biocompatible nanostructured multilayer systems

Angelica Yuliana Jara Olivares

► **To cite this version:**

Angelica Yuliana Jara Olivares. Biocompatible nanostructured multilayer systems. Material chemistry. Université Montpellier; Universidad central de Venezuela, 2016. Español. NNT: 2016MONTT222 . tel-01809024

HAL Id: tel-01809024

<https://theses.hal.science/tel-01809024>

Submitted on 6 Jun 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par l'Université de Montpellier

**Préparée au sein de l'école doctorale
Sciences Chimiques Balard**

**Et de l'unité de recherche
Institut Charles Gerhardt – UMR 5253**

Spécialité : Chimie des Matériaux

Présentée par Angelica Yuliana Jara Olivares

Biocompatible Nanostructured Multilayer Systems

Soutenue le 12 décembre 2016 devant le jury composé de

M. Christophe TROMAS, Maître de Conférence, Université de Poitiers, France	Rapporteur
M. Joaquin LIRA, Professeur, Universidad Simón Bolívar, Venezuela	Rapporteur
M. Carlos ROJAS, Professeur, Universidad Central de Venezuela, Venezuela	Président du Jury
Mme. Pascale GALL-BORRUT, Professeur, Université de Montpellier, France	Examineur
M. Eric PLAZA, Chargé de Recherche, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Venezuela	Examineur
Mme. Sonia CAMERO, Professeur, Universidad Central de Venezuela, Venezuela	Examineur
Mme. Nicole FRÉTY, Professeur, Université de Montpellier, France	Directeur de thèse
Mme. Gema GONZÁLEZ, Professeur, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Venezuela	CoDirecteur de thèse



A mis Padres, mi Siis,
mi Chiqui y a Dani.

Agradecimientos

A la Dra. Gema González, por aceptar ser mi tutora y guiarme en este largo camino, por ser mi gran apoyo académico y una gran amiga.

A la Dra Nicole Fréty por haberse embarcado en este trabajo y por su colaboración que fue fundamental para poder terminarlo.

A mis Padres por su apoyo incondicional y colaboración infinita, por aceptar sin dudar volver a ser padres con mi chiqui para así darme el espacio necesario para terminar este trabajo. Este logro también es de ustedes.

A mi hermana por su colaboración siempre oportuna, por animarme en los momentos que lo necesité y por sus largas jornadas como niñera.

A Daniel no hay palabras, eres el mejor esposo, amigo, compañero y colega, gracias por tanta colaboración, apoyo, paciencia y por las discusiones fructíferas para mejorar este trabajo. Por tener siempre las palabras precisas en cada uno de los momentos de este largo camino que recorrimos juntos.

A la Universidad Central de Venezuela por abrirme sus puertas y brindarme la oportunidad de recibir educación en la casa que vence las sombras.

Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas por permitirme ser parte de tan reconocida institución.

Al proyecto PCP y muy especialmente a sus responsables el Dr. Eric Anglaret y el Dr. Anwar Hasmi, por su excelente labor.

A la Universidad de Montpellier por la experiencia recibida en tan reconocida institución.

A todos los investigadores, estudiantes y personal del Centro de Ingeniería de Materiales y Nanotecnología del I.V.I.C., a las Licenciadas Damarys Soto y María Elena Gómes, grandes amigas; a la Dra. Amaya Sagarzazu, al Sr. Rafael Villalba, al MSc. Antonio Monsalve, y a la TSU Lisbeth Lozada por su invaluable apoyo, a Joseba Echevarrieta por su paciencia en el microscopio, muchas gracias por todos los conocimientos, apoyo, colaboración y ayuda.

A Elizabeth una amiga que me regalo Francia, por tu infinita colaboración y apoyo, gracias.

Résumé

Le domaine des couches minces fait l'objet d'un grand nombre d'études en raison du vaste champ d'applications. La modification de surfaces par des revêtements sous forme de couches minces a ainsi été étudiée dans le domaine biomédical afin d'améliorer les propriétés de bioactivité et biocompatibilité des matériaux. Des couches minces monocouches, Ta et TaN, ainsi que bi-couches, TaN/Ta, ont été déposées sur des substrats de verre, d'acier, SS316LVM, et de titane par pulvérisation cathodique. La caractérisation des couches par diffraction des rayons X (XRD and GIXRD) a montré que la nature du substrat a une forte influence sur la nature de la phase, Ta, formée. La formation de la phase ordonnée, Ta-a, est obtenue sur le substrat acier alors que la phase désordonnée métastable, Ta-b, se forme sur le substrat titane. Quant à la phase TaN, elle cristallise sous la forme cubique de type NaCl (Fm3m) sur les différents substrats mais présente une orientation préférentielle selon le plan (200) dans le cas du substrat verre. L'étude de la composition chimique par XPS a montré que les couches sont également constituées de phases oxydes, telles que Ta_xO_y et TaO_xN_y , en raison de la forte affinité du tantale avec l'oxygène. Les observations en microscopie électronique à balayage ont mis en évidence une croissance colonnaire des couches avec une microstructure de surface dite de type « chou-fleur ». Cette microstructure est caractéristique du procédé de pulvérisation cathodique et correspond à la microstructure dite de zone I prédite par le modèle de Thornton, dérivé du modèle de Movchan and Demchishin. Des méthodes biomimétiques ont été utilisées afin d'évaluer la bioactivité des couches minces étudiées. Dans ce but, les échantillons ont été immergés dans un fluide biologique (SBF, Simulated Body Fluid) afin de promouvoir le dépôt de phosphate de calcium. Après étude de fluides de compositions différentes, le fluide SBF 1.5, enrichi en ions Ca^{2+} and PO_4^{3-} , a été choisi. Les analyses par XRD, FTIR et XPS ont mis en évidence la formation en surface d'une couche cristalline d'hydroxyapatite quelle que soit la nature des sous-couches, Ta, TaN ou TaN/Ta, après immersion de trois semaines. Le mécanisme de dépôt d'hydroxyapatite implique la formation de liaisons Ta-OH par hydratation de la couche passive d'oxyde de tantale présente en surface. Pour étudier les propriétés de biocompatibilité, les échantillons ont été placés en milieux de culture contenant des ostéoblastes. Tous les matériaux observés présentent une adhésion des cellules en surface avec la formation de filipodia. L'un des principaux problèmes des implants osseux est la formation en surface d'un biofilm du à la colonisation de bactéries. Des essais en milieu bactériologique ont donc été réalisés avec des bactéries de type *Pseudomonas Aeruginosa*, agents pathogènes très fréquemment observés lors d'opérations chirurgicales. Ces essais expérimentaux ont permis de déterminer la réaction des différents matériaux étudiés au contact de ces bactéries. Il s'est avéré que l'adjonction de couches de tantale permet de réduire fortement la formation de biofilms en comparaison avec des couches de titane, qui présentent une croissance importante de bio-films à base de *P. aeruginosa*. Des films minces de silice ont également été étudiés en tant qu'agents bactéricides. Ces études ont montré l'absence de colonies microbiennes et l'absence de la formation de bio-films en surface.

Abstract

Thin films have been the subject of intense study in materials because they offer multiple applications of great interest. Various surfaces have been modified with thin films or coatings to study how to improve their bioactivity and biocompatibility properties to form a biomaterial. Thin films of Ta, TaN and Ta/TaN were deposited on glass substrates, metallic substrates, SS316LVM and Ti, by RF Sputtering technique. By High angle XRD and GIXRD it was found that the nature of the substrate has a strong influence on the Ta phase formed. Formation of ordered α -Ta phase was obtained on SS316LVM, but the disordered metastable β -Ta phase was formed on Ti and on TaN substrates. While TaN crystallizes in the cubic phase (Fm3m) NaCl type on metallic substrates but shows a preferential orientation in the (200) plane on the glass substrate. The chemical analysis of the surfaces by XPS reveals that in the surfaces of the deposited layers are several oxidized chemical species such as Ta_2O_5 , TaO_xN_y and Ta_xO_y due to Ta is a very reactive metal and is readily oxidized even at low partial pressures as for our synthesis conditions. Characterization by Scanning Electron Microscopy reveals that the microstructure of the films was homogeneous with small clusters size and a cauliflower type, also the films exhibit the typical columnar growth for films deposited by PVD techniques, following the growth of zone I described by the model developed by Movchan and Demchisin and Thornton. Biomimetic method was used to evaluate the bioactivity in all surfaces which involves immersing the thin films in simulated body fluid (SBF) to promote the deposition of calcium phosphates, two concentrations were used to assess qualitatively which could deposit the stoichiometric calcium phosphate hydroxyapatite and make it more efficiently. The SBF 1.5 enriched in Ca^{2+} and PO_4^{3-} ions was chosen. A new layer was deposited upon the surfaces and it was determined by XRD, FTIR and XPS that crystalline Hydroxyapatite phase was formed, so that all our surfaces have the ability to form apatite spontaneously after an immersion period of three weeks. The mechanism of deposition of HAp involves the formation of small amounts of Ta-OH groups by a hydration of the tantalum oxide passive layer on its surface. To study biocompatibility properties, films were placed in cell culture containing osteoblasts, all surfaces exhibit cell adhesion and formation of filipodia. Whereas one of the main problems of bone implants is biofilm formation caused by bacterial colonization, tests were made with the bacterium *Pseudomonas Aeruginosa*, which is a major human opportunistic pathogens in surgical procedures, causing infections in soft tissue, bones, among others. This assay allowed us to know how the different surfaces react when exposed to this bacteria, Titanium had greater growth of *P. aeruginosa* and biofilm formation in all periods of study, while Ta surfaces showed the lowest activity of biofilm formation. Mesoporous silica thin films were used as bactericidal agents, and it was found by MEB that no microbial colonization or biofilm formation occur on these surfaces.

Resumen

Las películas delgadas han sido objeto de intenso estudio en el área de los materiales debido a que ofrecen múltiples aplicaciones de gran interés. Diversas superficies han sido modificadas con películas delgadas para estudiar cómo mejorar sus propiedades de bioactividad y biocompatibilidad para formar un biomaterial. Películas delgadas de Ta, TaN y Ta/TaN fueron depositadas sobre sustratos metálicos de SS316LVM y Ti por la técnica de Pulverización Catódica RF. La influencia de la naturaleza del sustrato se evidenció al caracterizar por DRX de alto ángulo y rasante que las películas cristalizan en la fase ordenada α -Ta sobre SS316LVM y la fase metaestable desordenada β -Ta cuando los sustratos fueron Ti y TaN, mientras que el TaN cristaliza en la fase cúbica (Fm3m) tipo NaCl sobre los sustratos metálicos pero presenta una orientación preferencial en el plano (200) sobre el sustrato de vidrio. El análisis químico de las superficies por XPS revela que en las capas depositadas hay varias especies químicas oxidadas Ta_2O_5 , Ta_xO_y y TaO_xN_y , esto es debido a la naturaleza reactiva del Ta, incluso a bajas presiones parciales como las de las condiciones de síntesis. Por MEB se examinó la microestructura de las películas y se observó que las películas se depositaron de forma homogénea con un tamaño de grano pequeño y una microestructura tipo coliflor, además que siguen un crecimiento de tipo columnar típico de sistemas depositados por técnicas de PVD, específicamente siguiendo el crecimiento explicado en la zona tipo I del modelo de Movchan, Demchisin y Thornton. Para evaluar la bioactividad de las diversas superficies se utilizó el método biomimético, que consiste en la inmersión de las películas delgadas en fluido corporal simulado (FCS) para promover la deposición de fosfatos de calcio se utilizaron dos concentraciones para evaluar cualitativamente cuál lograba depositar el fosfato de calcio estequiométrico Hidroxiapatita y hacerlo más eficientemente, se escogió la concentración FCS 1.5 que está enriquecida en iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} , encontrándose que una nueva capa se depositó sobre las superficies y se determinó por DRX, FTIR y XPS que la fase cristalina de la capa depositada es Hidroxiapatita, por lo que todas las superficies poseen la habilidad de formar apatitas espontáneamente luego de un período de inmersión de tres semanas. El mecanismo por el cual ocurre esta deposición involucra la formación de pequeñas cantidades de grupos Ta-OH debido a la hidratación de la capa de pasivación de óxido de Tántalo que se forma en la superficie de las películas depositadas. Para estudiar la biocompatibilidad las películas fueron colocadas en cultivo celular con osteoblastos, exhibiendo adhesión celular y formación de filipodios. Considerando que uno de los principales problemas de los implantes óseos es la formación de biopelículas, producto de la colonización de las bacterias, se hicieron ensayos con la bacteria *Pseudomonas Aeruginosa* que es uno de los principales patógenos oportunistas de heridas quirúrgicas, causando infecciones en tejidos blandos, huesos, etc. Este ensayo permitió conocer cómo las distintas superficies reaccionan al ser expuestas a esta bacteria. El Titanio tuvo mayor crecimiento de *P. aeruginosa* y formación de biopelículas en todos los períodos de estudio, mientras que en las superficies de Ta se encontró la menor actividad de formación de biopelículas. Se evalúa el uso de películas delgadas mesoporosas de Sílice para ser usadas como agentes bactericidas y se evidencia por MEB que no hay colonización de microorganismos ni formación de biopelículas sobre estas superficies.

Índice general

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

Résumé

Abstract

Resumen

Índice General

Introducción.....	1
1. CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO.....	5
1.1 Generalidades de las Películas Delgadas.....	5
1.1.1 Aplicaciones de las Películas Delgadas.....	6
1.1.2 Interés de la síntesis de sistemas de películas delgadas.....	8
1.2 Síntesis de Películas Delgadas.....	8
1.3 Pulverización Catódica.....	9
1.3.1 Principio.....	9
1.3.2 Mecanismos de Nucleación y Crecimiento de Películas Delgadas por Técnicas de preparación en fase vapor.....	11
1.3.3 Influencia de los parámetros de deposición.....	13
1.4 Los sustratos	14
1.4.1 Acero Inoxidable Sandvik bioline (SS316LVM).....	14
1.4.2 Titanio (Ti).....	14
1.5 Los materiales depositados Tántalo y Nitruro de Tántalo	15
1.5.1 Tántalo.....	15
1.5.2 Nitruro de Tántalo.....	16
1.6 Biomateriales para Implantes Óseos.....	17
1.6.1 La Reacción Tisular.....	18
1.6.2 Formación de la Interfaz Implante – Hueso	19
1.6.3 Las células óseas.....	20
1.6.3.1 Cultivo Celular: Osteoblastos.....	21
1.6.4 Remodelado óseo.....	21
1.7 Biocerámicas	23
1.7.1 La Hidroxiapatita $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	24
1.7.1.1 Fases precursoras	25
1.7.1.2 Deposición de Hidroxiapatita.....	26

1.8 Fluido Corporal Simulado	26
1.9 Síntesis de Películas Delgadas Mesoporosas	27
1.9.1 Sol-Gel	28
1.9.2 Centrifugación (“spin coating”).....	29
1.10 Biopelículas	29
2. CAPÍTULO II: PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	32
2.1 Deposición de las Películas Delgadas	32
2.1.1 Deposición de las películas delgadas de Ta, TaN y Ta/TaN	32
2.2 Estudios de inmersión en fluido corporal simulado.....	34
2.2.1 Síntesis del Fluido Corporal Simulado.....	34
2.3 Cultivo Celular: Osteoblastos	35
2.3.1 Protocolo para la preparación de las muestras para Microscopía Electrónica de Barrido.....	35
2.4 Síntesis de Películas Delgadas Mesoporosas de Sílice	36
2.5 Ensayos de Biopelículas	37
2.5.1 Ensayo <i>in vitro</i> de formación de biopelículas	37
2.6 Técnicas de Caracterización.....	38
2.6.1 Difracción de Rayos X (DRX)	38
2.6.2 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	39
2.6.3 Microscopía de Fuerza Atómica (MFA).....	39
2.6.4 Espectroscopia Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)	39
2.6.5 Espectroscopía de Fotoelectrones de Rayos X (XPS).....	39
2.6.6 Nanoindentación.....	40
3. CAPÍTULO III: SINTESIS DE PELICULAS DELGADAS DE Ta, TaN y Ta/TaN	41
3.1 Los Sustratos.....	41
3.2 Deposición de las películas delgadas de Ta, TaN y Ta/TaN.....	42
3.2.1 Microestructura de las Películas Delgadas Depositadas.....	43
3.2.2 Estructura Cristalina de las Películas Delgadas Depositadas.....	46
3.2.3 Tamaño de grano y rugosidad de las Películas Delgadas Depositadas.....	55
3.2.4 Análisis químico de la superficie de las Películas Delgadas Depositadas.....	60
3.2.5 Propiedades Mecánicas de las Películas Ta/SS316LVM y TaN/SS316LVM	64

3.3 Deposition de las Películas Delgadas Mesoporosas de Sílice.....	66
3.3.1 Estructura Cristalina de las películas delgadas mesoporosas de Sílice.	66
3.3.2 Microestructura de las películas delgadas mesoporosas de Sílice.	67
 4. CAPÍTULO IV: SINTESIS DE RECUBRIMIENTOS DE HIDROXIAPATITA POR EL METODO BIOMIMETICO.....	69
4.1 Obtención de Recubrimientos de Hidroxiapatita por el Método Biomimético.....	69
4.1.1 Escogencia del Fluido Corporal Simulado a ser utilizado.....	69
4.1.2 Estructura Cristalina de los recubrimientos obtenidos.....	72
4.1.3 Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier.....	76
4.1.4 Análisis químico de la superficie de las Películas Delgadas Depositadas.....	78
4.1.5 Microestructura y rugosidad de la capa de Hidroxiapatita depositada usando el método biomimético.....	83
4.1.6 Propiedades Mecánicas de las Películas HAp/TaN/SS316LVM y HAp/Ta/Ti inmersas en FCS 1.5 durante tres semanas.....	88
 5. CAPÍTULO V: BIOCOMPATIBILIDAD Y PROPIEDADES ANTIBACTERIALES DE LAS DIFERENTES SUPERFICIES ESTUDIADAS...90	
5.1 Respuesta Celular.....	90
5.1.1 Observación mediante fluorescencia con Faloidin -FITC/DAPI (ensayo de adhesión)	90
5.1.2 Evaluación de la morfología celular.....	92
5.1.3 Observación mediante fluorescencia con Faloidin -FITC/DAPI (ensayo de adhesión) de las Películas Delgadas de Sílice Mesoporosa depositadas sobre Titanio	95
5.2 Formación de Biopelículas y Respuesta Antibacterial	97
5.2.1 Adhesión bacteriana y morfología de biopelículas de P. aeruginosa por MEB.....	97
5.2.2 Adhesión bacteriana y morfología de biopelículas de P. aeruginosa por MEB de las Películas Delgadas Mesoporosas de Sílice depositadas sobre Ti.	101
 6. CAPITULO VI: DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES.....	103
RECOMENDACIONES.....	111
REFERENCIAS	112
APÉNDICES.....	130
Apéndice A: Extracción de osteoblastos a partir de calvaria de rata neonata...130	

Apéndice B: Evaluación de la adhesión y biocompatibilidad de discos de SS316LVM y Ti con diferentes recubrimientos.....	130
Apéndice C: Protocolo para observación mediante fluorescencia con Faloidin- FITC/DAPI.....	131

Introducción

Un biomaterial debe ser mecánicamente satisfactorio y también biocompatible por lo que debe interactuar con el receptor de forma no tóxica, controlable y predecible. El SS316LVM y el Ti son ampliamente usados para implantes debido a sus novedades propiedades así como también por su costo razonable.

El SS316LVM es un acero con ~18% de porcentaje en peso de Cr, ~8% de porcentaje en peso de Ni, además tiene en su composición un mayor porcentaje de Mo y un menor porcentaje de C, lo cuál hace que presente excelentes propiedades mecánicas, buena resistencia a la corrosión en comparación con los aceros de bajo contenido de Mo y altas concentraciones de C y biocompatibilidad, pero su superficie muestra bajas propiedades osteoconductoras debido a la liberación de iones como el Ni, Mo y Cr [1]. La liberación de estos iones metálicos pueden contribuir a procesos inflamatorios y reacciones de hipersensibilidad, cambios en el remodelamiento óseo que pueden resultar en la pérdida del implante. El incremento en el cuerpo de las concentraciones de estos iones metálicos puede conllevar a cambios cromosómicos y daños en el ADN que potencialmente pueden resultar en diversas enfermedades como por ejemplo, el cáncer [2]–[4].

El Ti y sus aleaciones son unos de los materiales más comúnmente usados en cirugías ortopédicas para implantes debido a su excelente biocompatibilidad, que tiene en gran medida que ver con la capa de óxido que cubre su superficie de manera natural y que contribuye a las propiedades de osteointegración, sin embargo posee baja dureza, una pobre resistencia a la corrosión y es difícil de pulir [5]. La baja dureza mecánica del titanio puro fue superado, adicionando Aluminio y Vanadio resultando en aleaciones de Ti-6Al-4V que poseen propiedades mecánicas similares al Acero Inoxidable o las aleaciones de Co-Cr que también es utilizada para implantes óseos [6]. Esta aleación de Ti tiene suficiente dureza y resistencia a la corrosión pero pierde su biocompatibilidad si los iones de V o Al son introducidos en el tejido humano. Los iones de V son citotóxicos, mientras que los iones de Al pueden causar desórdenes neurológicos [7]–[9].

Sin embargo, estos materiales no poseen la propiedad de osteointegración requerida para la supervivencia de los implantes, por lo que se necesita más investigación para desarrollar nuevas superficies bioactivas capaces de mejorar el crecimiento óseo. El Tántalo es un material prometedor en este aspecto ya que al compararlo con el SS316LVM y el Ti, es más bioactivo y tiene una química superficial interesante, la cual promueve la osteointegración y su capa de óxido natural no desnaturaliza las proteínas, ya que es de naturaleza no conductora.

Los efectos tóxicos del Ti, Al, V, Ni, Co y Cr en aleaciones para implantes están relacionados con las formas solubles de estos elementos [6]. La liberación de éstos iones en los fluidos corporales puede ser reducida si se limita el contacto de la superficie del implante de estos metales con el fluido. Esto se puede alcanzar cubriendo la superficie del implante con elementos que son estables en el entorno corrosivo del cuerpo humano.

El Tántalo es uno de los elementos que satisface estas condiciones: es resistente a la corrosión y bioactivo mostrando la habilidad de formar apatita en fluido corporal simulado [10]–[12]. La formación de la apatita es una condición esencial para que los materiales artificiales provean contacto directo con el hueso vivo [13][14] mejorando el éxito clínico del implante, esta condición es lo que se conoce como biomineralización y los mecanismos que conllevan a este proceso son objeto de estudio [15] ya que es un proceso bastante complejo.

Al momento de haber una ruptura o daño, sea por diferentes mecanismos (trauma, infección, tumores, etc.) ocurre el fenómeno fisiológico de la reparación, que reemplaza el hueso dañado por hueso nuevo, renovando las propiedades mecánicas y biológicas previas al daño. Inmediatamente posterior al daño del hueso, ocurre un proceso inflamatorio y la secreción de citoquinas, que reclutan células tanto de las cercanías como sistémicamente; las células progenitoras participantes son las células mesenquimales, las cuales pueden diferenciarse en condrocitos u osteoblastos según el caso [16].

La matriz extracelular durante el proceso de reparación funciona como el soporte estructural y como andamio para la formación de hueso nuevo. Si la fractura o defecto óseo es mayor a un tamaño crítico, puede resultar en mal-unión o no-unión, debido a la falta de contacto entre las superficie de los fragmentos en estos casos es necesario un andamio para la regeneración del tejido como un sustituto óseo o injerto [17] .

Sustituto óseo es un término general para describir cualquier material, tanto sintético como de origen natural, que funcione como andamio para promover la regeneración ósea en reparación de fracturas, fusión espinal o reconstitución de defectos. El objetivo es estimular la consolidación ósea recuperando las necesidades biológicas y mecánicas; y para ello han surgido un amplio espectro de materiales utilizados en la actualidad para intentar responder a esta necesidad clínica, que abarca materiales cerámicos (hidroxiapatita, tricalcio fosfato, sulfato de calcio, etc.), poliméricos (quitosano, colágeno, ácido poli-láctico, etc.), metálicos (aleaciones de titanio, acero inoxidable 316L, cromo, cobalto, molibdeno, entre otros) y materiales compuestos que combinan diferentes tipos de materiales en búsqueda de la sinergia de los beneficios de los diferentes materiales combinados, procurando combinar dos de los tres siguientes elementos [17]: i) Osteogénesis: estimulación de las células y linaje óseo para la formación de hueso nuevo. ii) Osteoinducción: reclutamiento de células mesenquimales y estimulación de su diferenciación a linaje óseo y iii) Osteoconducción: Capacidad del andamio de permitir la infiltración y proliferación de células óseas.

Otra causa para el fallo de los implantes es la adhesión de bacterias a la superficie del implante [18], [19] formando biopelículas que causan numerosas afecciones que conllevan al fracaso del implante. Por lo tanto, a través de la modificación superficial se busca recubrir o adicionar propiedades antibacteriales a los implantes para reducir el número de bacterias y microbios que se adhieren, lo que pareciera ser una forma efectiva de incrementar el éxito clínico de los implantes.

En este trabajo se busca sintetizar y caracterizar películas delgadas, combinando distintos tipos de materiales y organizándolos como un sistema multicapa, con el fin de dar soluciones a la problemática de los implantes metálicos como biomateriales, discutiendo los resultados obtenidos para su desempeño y factibilidad en cada una de las etapas del proceso para finalmente evaluar los materiales estudiando su bioactividad, biocompatibilidad y comportamiento en presencia de la bacteria Gram negativa *Pseudomonas Aeruginosa*.

Objetivo General

Sintetizar y Caracterizar Películas Delgadas Biocompatibles.

Objetivos Específicos

1. Sintetizar recubrimientos de Ta, TaN y TaN/Ta sobre SS316LVM y Titanio por pulverización catódica RF.
2. Caracterizar estructural, química y morfológicamente las películas delgadas.
3. Estudiar la bioactividad de los diferentes sistemas mediante la inmersión de las muestras en Fluido Corporal Simulado.
4. Realizar Ensayos de Biocompatibilidad *in vitro* de las Películas Delgadas.
5. Sintetizar películas mesoporosas inorgánicas con fines antibacteriales.
6. Estudiar el comportamiento de los recubrimientos en presencia de la bacteria *Pseudomonas Aeruginosa* ATCC 10145.

El presente trabajo está constituido por 6 capítulos, estructurados de la siguiente manera:

El capítulo I corresponde al marco teórico y revisión bibliográfica, en él se exponen las generalidades de las películas delgadas, el fundamento de la pulverización catódica, sol-gel y "spin coating" como técnicas de síntesis de películas delgadas, modelos de nucleación y crecimiento. Las características de los materiales utilizados. Generalidades de los biomateriales y las biocerámicas como biomaterial tratando en detalle el caso de la Hidroxiapatita y su deposición usando el método biomimético y los aspectos que tienen que ver con la actividad celular y la formación de biopelículas en las superficies de los implantes.

En el capítulo II se presentan los materiales, métodos y técnicas de caracterización utilizadas a fin de alcanzar los objetivos propuestos.

En el capítulo III se muestran y analizan los resultados obtenidos de la síntesis

de las diferentes películas delgadas obtenidas por pulverización catódica, sol-gel y “spin coating” mediante la caracterización estructural, morfológica, química y mecánica.

En el capítulo IV se describen y analizan los resultados de la bioactividad de todas las películas obtenidas en el capítulo III, mediante la caracterización estructural, morfológica, química y mecánica de los recubrimientos de HAP obtenidos por el método biomimético.

En el capítulo V se muestran y discuten las propiedades biocompatibles y bactericidas de las superficies obtenidas en el desarrollo de este trabajo mediante cultivos *in vitro* de los sistemas con células osteoblásticas y la bacteria Gram negativa *Pseudomonas Aeruginosa*.

Finalmente en el capítulo VI se presentan la discusión general y las conclusiones de este trabajo.

Capítulo I

Marco Teórico

1. Películas Delgadas

1.1 Generalidades de las Películas Delgadas

Una capa delgada o película delgada es aquella en la cual los fenómenos de superficie predominan sobre los de volumen en las propiedades de un material.

Los materiales masivos a los que estamos acostumbrados tienen unas propiedades características que suelen referirse a la unidad de volumen, suponiendo de forma implícita que las propiedades estudiadas son independientes de la cantidad de volumen del material. Esta suposición es legítima siempre que las dimensiones estén dentro de límites macroscópicos. Sin embargo, esta hipótesis deja de ser válida en el momento en que una de las dimensiones se hace pequeña ya que al aumentar considerablemente la relación superficie/volumen del material las propiedades del material cambian respecto a las del material masivo. El origen de estos cambios está tanto en la naturaleza del enlace de las capas delgadas como en la microestructura y morfología de las capas, derivadas de la técnica de síntesis.

Por un lado, en el volumen de un material los átomos están sujetos a fuerzas de enlace en todas las direcciones, provenientes de los átomos próximos lo cual no ocurre en los átomos de la superficie porque existe una asimetría en la direccionalidad de las fuerzas de enlace [20], lo cual hace que la energía de los átomos en la superficie sea diferente a la de los átomos en el interior debido a ello muchas de las propiedades físico-químicas de los átomos de la superficie (distancia interatómica, reactividad química, etc.) son también diferentes.

Por otro lado está la propia microestructura y morfología del material que compone la película. Las condiciones impuestas en el crecimiento de una capa generalmente impiden que se alcance una situación de equilibrio en los átomos que alcanzan la superficie durante la etapa de formación, lo cual se debe a que el proceso de condensación de los átomos normalmente se realiza en condiciones de supersaturación, lo cual implica que los átomos se acomodan en la superficie antes de alcanzar las posiciones de mínima energía, de lo que puede resultar compuestos con composición y estructura de enlace que sea metaestable y por lo tanto que sea muy diferente a la que se obtiene por los métodos convencionales de síntesis del material masivo. De hecho, el número de defectos presentes en una capa delgada puede exceder hasta en cinco órdenes de magnitud a los del material obtenido por métodos convencionales [21].

El efecto de la superficie y la presencia de defectos permiten interpretar la diferencia de comportamiento de las capas delgadas cuando se compara con la de el material masivo como por ejemplo la resistividad eléctrica de los metales, conductividad, transparencia óptica de la luz, dureza, etc.

1.1.1 Aplicaciones de las Películas Delgadas

Uno de los mayores logros de la tecnología de las películas delgadas ha sido su contribución al desarrollo de los dispositivos y circuitos integrados de microelectrónica y óptica. De hecho, prácticamente todos los dispositivos de estado sólido están formados hoy día por un apilamiento de capas de diversos materiales sobre un sustrato, más aún, las exigencias de estos dispositivos cada vez se vuelven más estrictas en lo que se refiere a su funcionamiento por lo que se ha obligado a la síntesis de películas delgadas con mejores niveles de desempeño, lo cual ha sido posible gracias a los avances tanto en los métodos de síntesis de deposición como en los equipos de caracterización y análisis. Todo este avance se ha ido trasladando a otros sectores importantes como la industria automovilística, metal-mecánica, construcción, saneamiento, entre otros.

A continuación se presenta un listado de las múltiples aplicaciones industriales de los recubrimientos y películas delgadas.

Automotriz	<ul style="list-style-type: none"> • Recubrimientos embellecedores en componentes del automóvil. • Recubrimientos duros de piezas móviles del motor.
Mecánico	<ul style="list-style-type: none"> • Recubrimientos duros para herramientas de corte. • Recubrimientos tribológicos para piezas móviles.
Saneamiento y Útiles Domésticos	<ul style="list-style-type: none"> • Metalización de grifos, tuberías, pomos y tiradores de puertas, etc.
Construcción	<ul style="list-style-type: none"> • Recubrimientos térmicos, ópticos y autolimpiantes para grandes paneles de vidrio utilizados en la construcción de edificios.
Microelectrónica, Fotónica y Óptica	<ul style="list-style-type: none"> • Capas activas, pasivas y de protección en componentes. • Recubrimientos antirreflectantes, antihumedad para lentes, visores, espejos, ventanas, etc. • Capas activas y funcionales en discos ópticos.
Dispositivos Magnéticos	<ul style="list-style-type: none"> • Capas magnéticas para discos duros.
Juguetería y Bisutería	<ul style="list-style-type: none"> • Recubrimientos protectores y decorativos.
Alimentación	<ul style="list-style-type: none"> • Recubrimientos para empaquetamiento de alimentos y botellas de líquidos.
Otros	<ul style="list-style-type: none"> • Componentes cerámicos. • Sector de biomateriales e implantes. • Sensores.

Tabla 1.1. Sectores Tecnológicos usuarios de películas delgadas [20].

En vista de que las películas delgadas tienen innumerables aplicaciones, para su diseño es conveniente considerar el sistema recubrimiento/sustrato y analizar separadamente cada una de las regiones del conjunto para así cumplir con los requerimientos exigidos para la aplicación que queremos darle.

La siguiente tabla muestra cuales son los requerimientos para algunas de las aplicaciones tecnológicas que tienen las películas delgadas.

Aplicación	Requerimiento
Superficies reflectantes, p.e. para espejos de láseres	Baja rugosidad
Barreras térmicas para las hélices de turbina	Estabilidad química a T altas, Baja conductividad térmica.
Recubrimientos de válvulas y otros componentes en plantas de gasificación del carbón	Resistencia a la corrosión, Estabilidad química a T altas, Resistencia mecánica.
Capas duras para herramientas de corte (aumento tiempo de vida y eliminación de fluidos de refrigeración)	Estabilidad química a T altas, Resistencia mecánica, Dureza, Resistencia al desgaste.
'Pared primera' en vasijas de reactores nucleares.	Estabilidad química a T altas.
Materiales superconductores en capa delgada.	Estructura cristalográfica, Composición química.
Modificación de membranas para separación de gases	Tamaño de poro nanométrico, Estabilidad química a T altas, Resistencia mecánica.
Reactores catalíticos	Tamaño poro nanométrico, Superficie específica alta, Actividad química.
Dispositivos fotovoltaicos en capa delgada.	Crecimiento epitaxial, Propiedades semiconductoras.
Recubrimientos transparentes y foto-térmicos para paneles de vidrio arquitectónicos.	Espesor nanométrico, Absorción y reflexión óptica.
Implantes biomédicos, órganos artificiales, válvulas cardiacas, etc.	Bio-compatibilidad, Resistencia a la corrosión y desgaste.
Conservación de materiales del patrimonio artístico.	Estabilidad química, Resistencia erosión.
Dispositivos electrónicos submicrónicos	Espesor nanométrico.

Tabla 2.2 Requerimientos exigidos en algunas aplicaciones de las películas delgadas [20].

Muchos de estos requerimientos son incompatibles entre sí, lo que obliga al diseño de recubrimientos con estructura compleja, tales como capas gradiente, multicapas y capas de composición mixta que casi siempre están basadas en materiales nanoestructurados.

1.1.2 Interés de la síntesis de sistemas de películas delgadas.

En términos generales las películas delgadas se emplean para dos finalidades: la más simple, optimizar alguna o varias de las propiedades de los sustratos a los que recubren o incluso dotarlos de propiedades nuevas. En este caso, las películas delgadas suelen llamarse recubrimientos. La segunda aplicación general es la fabricación de dispositivos con propiedades fisicoquímicas específicas y singulares, que pueden guardar o no relación con las propiedades iniciales del sustrato, para este nuevo tipo de aplicación no se emplean capas sencillas sino sistemas multilaminares estratificados. Como se esquematiza a continuación:

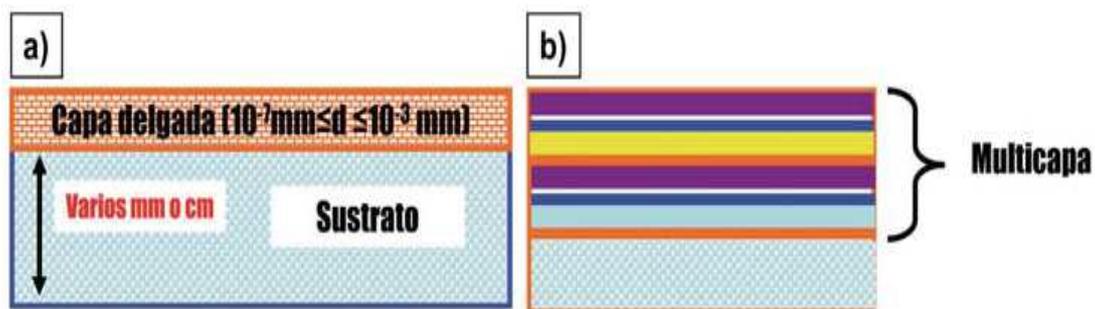


Figura 1.1 Esquemas de una capa delgada recubriendo un sustrato (a), y de un sistema multicapa estratificado (b) [22].

1.2 Síntesis de Películas Delgadas

La síntesis de películas delgadas ha tenido en los últimos años un inmenso desarrollo que ha estado asociado al crecimiento de las técnicas de deposición y las de caracterización que han permitido la preparación de películas con propiedades controladas.

Existen numerosas técnicas de síntesis de películas delgadas basadas en técnicas físico-químicas tales como: inmersión en caliente, soldaduras de esmaltes y cerámicas, deposición en fase de vapor de tipo físico (PVD) ó químico (CVD), métodos químicos o electroquímicos, tratamientos superficiales como implantación iónica, entre otros.

De todas estas técnicas, las que han tenido mayor auge en los últimos años son las técnicas en fase de vapor, estas técnicas se basan en la formación de un vapor del material a depositar con el objetivo de que el vapor se condense sobre la superficie de un sustrato formando un depósito sólido en forma de película delgada. Generalmente el proceso ha de realizarse en vacío o atmósfera controlada para evitar la adsorción sobre la superficie del sustrato de los componentes gaseosos presentes en el aire. Existen diversas técnicas que se ajustan a esta descripción general y se separan a su vez en dos grandes grupos:

- Técnicas Químicas (CVD): En este caso se parte directamente de los gases (a veces en forma de líquido que pasa a estado de vapor) que mediante una reacción forman un producto nuevo que se condensa en forma de película delgada sobre el sustrato.
- Técnicas Físicas (PVD): Se parte de un material sólido que se pretende depositar para convertirlo en vapor mediante calentamiento o bombardeo con partículas energéticas.

El continuo desarrollo de la tecnología de películas delgadas ha llevado a ser cada vez más especializado los diversos métodos, lo que origina numerosas variantes según la aplicación del material a sinterizar, por lo que la técnica de síntesis a utilizar dependerá de muchos factores, entre los cuales destacan: material que se va a depositar (composición y estructura), espesor, velocidad de deposición, limitaciones impuestas por la temperatura de deposición, adhesión del depósito al sustrato, homogeneidad de las capas y pureza de los materiales de partida, entre otros.

Generalmente cuando se quieren depositar metales, aleaciones y compuestos cerámicos como óxidos y nitruros se utilizan las técnicas de PVD. Uno de los procesos PVD más utilizado y que se ha alcanzado con gran éxito a escala industrial es la pulverización catódica o sputtering.

1.3 Pulverización Catódica

Hay diferentes tipos de pulverización catódica tales como pulverización catódica DC utilizada para la obtención de capas finas de materiales conductores, o de radio frecuencia, que permite la deposición de películas delgadas conductoras o aislantes, estos métodos pueden combinarse con la pulverización catódica de magnetron, donde mediante la aplicación de un campo magnético se producen un mayor número de electrones ionizantes cerca del blanco y se pueden obtener velocidades de deposición significativamente más altas en grandes superficies para hacer la deposición más eficiente y el bombardeo iónico reactivo donde se introduce en la cámara un gas reactivo para provocar una reacción química que ocurre antes de la deposición en el sustrato. Este último método en conjunto con el de radio frecuencia se eligió para la deposición de las películas delgadas de tantalio y nitruro de tantalio sintetizadas en este trabajo.

1.3.1 Principio

La pulverización catódica es un método por el cual los átomos a ser depositados son expulsados de una superficie mediante el bombardeo de iones energéticos que se encuentran en un plasma. Los átomos expulsados del blanco constituyen el cátodo y se depositan sobre el sustrato situado en el ánodo (Figura 1.1). Para producir el plasma, un alto vacío ($5 \times 10^{-4} Pa$) se crea dentro de la cámara, luego un gas tal como argón se introduce en la cámara y se aplica una alta tensión entre el cátodo y el ánodo produciéndose una descarga eléctrica, dando lugar a la ionización del gas formándose el plasma. Bajo el efecto de la tensión aplicada, los iones positivos del plasma, Ar^+ , son atraídos por el cátodo, una parte de los iones Ar^+ se reflejan pero la mayoría de

estos iones transfieren su energía al material a ser pulverizado (Figura 1.2). Esta energía es suficientemente alta (10 a 1000 eV) para poder así romper los enlaces químicos del blanco durante la colisión. Las múltiples colisiones hacen posible que algunos átomos del material adquieran la suficiente energía para abandonar la superficie, alcanzar el sustrato y adherirse a él.

El proceso ocurre en tres etapas:

- (A) La producción de las especies químicas.
- (B) El transporte de las especies producidas hasta el sustrato.
- (C) La condensación de las especies sobre el sustrato mediante una reacción química o electroquímica que hace que se forme el depósito sólido.

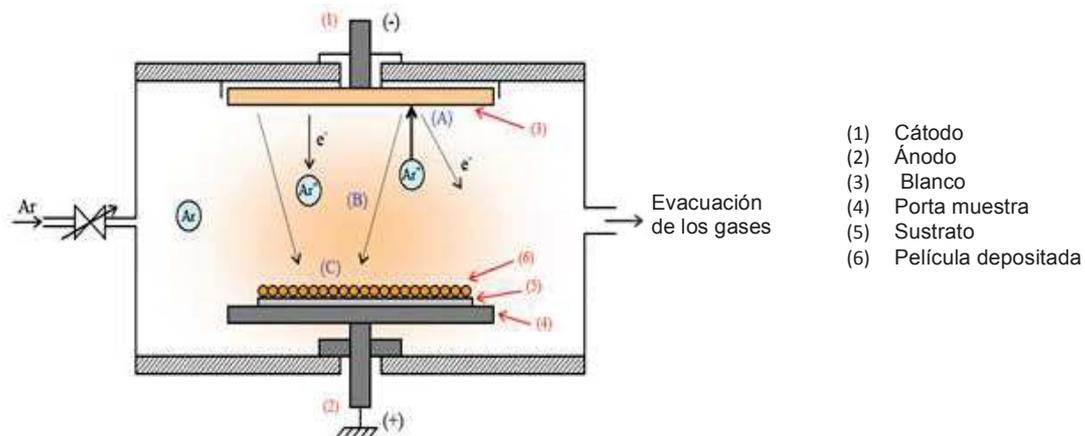


Figura 1.2. Representación esquemática del proceso de pulverización catódica. [23]

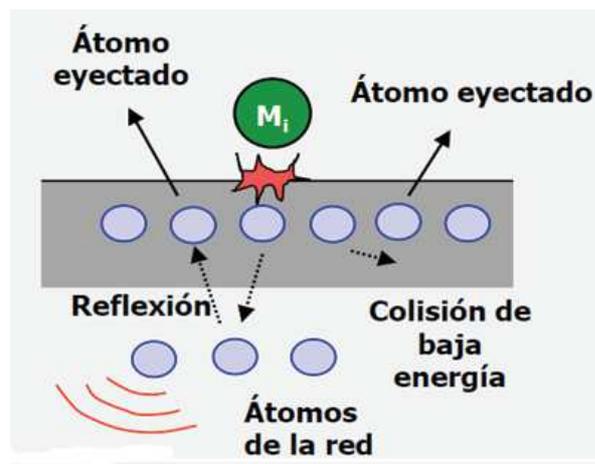


Figura 1.3. Proceso de transferencia de momento durante el bombardeo iónico. [24]

En este trabajo utilizamos un equipo de pulverización catódica de radiofrecuencia que es usado para la preparación de capas delgadas de

tántalo, nitruro de tántalo y bicapas Ta/TaN. Esta técnica permite el desarrollo de capas conductoras delgadas, aislantes o semiconductoras.

En la pulverización catódica de radiofrecuencia, en la frecuencia de funcionamiento (13,56 MHz), los iones, en lugar de electrones, no pueden seguir las variaciones de potencial debido a su masa por lo que el fenómeno que ocurre puede ser representado por una nube de electrones que se mueven desde un electrodo a otro en un ambiente de iones de baja movilidad. El electrodo de destino actúa como un condensador, que se carga negativamente si el blanco es un aislante debido a la corriente de electrones. Esta carga es el potencial de ionización del blanco.

La deposición de las películas delgadas de tántalo se realizó en un plasma de argón. En el caso de nitruro de tántalo, se utiliza la pulverización catódica reactiva, el gas de plasma consiste en una mezcla de argón y nitrógeno. Los átomos son entonces arrancados del blanco de tántalo y reaccionan con el nitrógeno, antes de ser depositados sobre el sustrato. Esta técnica permite obtener capas de materiales de nitruro [25]. Hay diversos parámetros que deben optimizarse para la deposición de los materiales deseados, tales como la distancia sustrato/blanco, la potencia del plasma, la presión parcial del gas reactivo y la presión total de gas en la cámara. En efecto, estos parámetros tienen una fuerte influencia en la energía de las partículas incidentes y por lo tanto en el rendimiento de la pulverización catódica además también puede provocar un cambio en las características cristalográficas, microestructurales, mecánicas, entre otras de las capas depositadas, ya que estos parámetros influyen el mecanismo de crecimiento, la nucleación y la composición química de las capas depositadas [26].

1.3.2 Mecanismos de Nucleación y Crecimiento de Películas Delgadas por Técnicas de preparación en fase vapor.

Movchan y Demchisin [27] y Thornton [28], [29], propusieron un modelo para técnicas de síntesis de películas delgadas por métodos de evaporación, donde se puede predecir el tipo de crecimiento de las capas basado en la relación entre T y T_m , donde T es la temperatura a la que se encuentra el sustrato durante la deposición y T_m es la temperatura de fusión del material a depositar.

Tres tipos de crecimiento se pueden diferenciar en función de dicha relación (figura 1.4 a):

a) Zona 1: $T/T_m < 0.3$

El crecimiento de las capas ocurre en columnas que tienen geometría cónica y existe una porosidad intergranular que induce una superficie rugosa debido al reducido número de columnas y a la baja difusión en la superficie del sustrato.

b) Zona 1: $0.3 < T/T_m < 0.5$

En esta región debido al aumento de la temperatura en el sustrato durante la deposición el crecimiento columnar es más denso por lo que hay una disminución en la rugosidad de la superficie, debido a que aumenta la movilidad superficial ya que el proceso de crecimiento está dominado por la difusión superficial de los átomos en la superficie del sustrato a una más alta temperatura.

c) Zona 3: $T/T_m > 0.5$

En esta zona las temperaturas de deposición son más elevadas, ya el crecimiento no se da en forma columnar sino que ocurre de manera mas densa compuesta de granos equiaxiales lo que da como resultado una muy baja rugosidad en la superficie, en esta zona ocurren fenómenos de difusión de masas y recristalización.

A partir de este trabajo Thornton [28], [29] desarrolló un modelo de crecimiento para el método de bombardeo iónico, dónde además de considerar la temperatura como una variable que afecta este proceso también lo será la presión del gas en la cámara (figura 1.4 b), que influye en la distribución de las especies que llegan a la superficie del sustrato y da lugar a cambios en los mecanismos de crecimiento, por lo que entre las zonas 1 y 2 hay una zona de transición adicional llamadas zona T, en donde las capas depositadas tienen un crecimiento en forma de fibra, esta zona generalmente se utiliza para describir la microestructura de películas depositadas por pulverización catódica.

Sin embargo estas transiciones entre las zonas descritas no ocurren de manera abrupta sino más bien de forma continua y las temperaturas de transición son temperaturas que se consideran dan una indicación de la transición.

Estas zonas expuestas anteriormente no necesariamente serán observadas experimentalmente, todo dependerá del método de síntesis, ajustes de las variables del método y la naturaleza del material a depositar. Por ejemplo la zona T no se observa en deposiciones de películas delgadas de metales puros pero es muy marcada en deposiciones de aleaciones complejas y cuando se trabaja a altas presiones en la cámara.

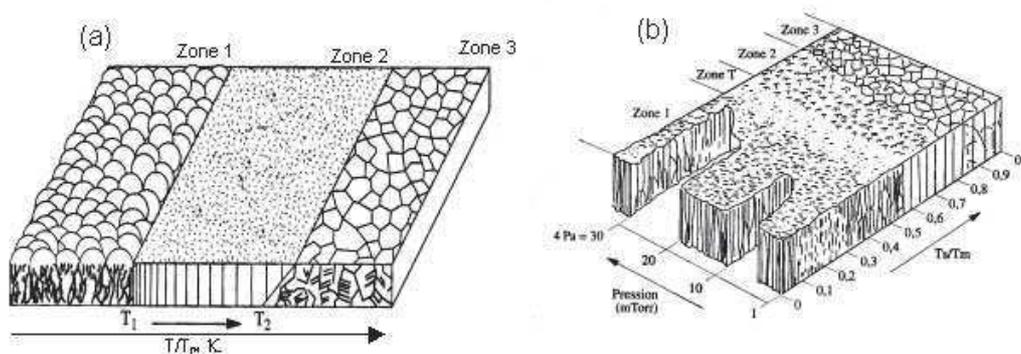


Figura 1.4. Microestructura de las Películas Delgadas depositadas: a) Movchan y Demchisin [27] b) Thornton [28], [29]

1.3.3 Influencia de los parámetros de deposición

La distancia entre el blanco y el sustrato, la presión del gas, la presión parcial de nitrógeno en el plasma, la temperatura del sustrato y el tiempo de pulverización catódica son parámetros importantes que influyen en la microestructura de las capas delgadas depositadas. Una optimización de estos parámetros es necesaria para obtener la composición deseada del material y un espesor controlado.

La presión del gas en el plasma tiene una gran influencia en el crecimiento de las capas delgadas variando de acuerdo con el ángulo medio y la energía media de las partículas incidentes, estos parámetros dependen del número de colisiones experimentado por las partículas eyectadas antes de la condensación de las mismas sobre el sustrato. Por lo tanto, el aumento de la presión de argón aumenta la probabilidad de colisión debido a una mayor concentración de partículas [30]. Así que mientras mayor sea el número de colisiones mayor será la energía de las partículas incidentes, lo que causa la obtención de un efecto de sombreado entre los islotes que se van formando con la primera llegada de los átomos, una disminución de la energía es responsable de una disminución de la movilidad de los átomos en la superficie del sustrato y en estas condiciones, las películas delgadas por lo tanto tienden a tener una estructura porosa. [31]

Con respecto a la potencia del plasma, se observa un aumento en la cristalinidad y en el tamaño de grano cuando la potencia aumenta [32]. La potencia del plasma, de hecho, influye en el número y la energía cinética de los átomos eyectados por el blanco. El aumento de la potencia de plasma conduce a un aumento de la tensión entre los electrodos como se describió anteriormente, esto provoca un aumento de la energía y la velocidad de los iones de plasma. En consecuencia, la movilidad y la difusión de los átomos en la superficie del sustrato se verá favorecida, debido al aumento de su energía cinética contribuyendo a la nucleación y crecimiento de la capa depositada.

La temperatura del sustrato tiene una gran influencia en la movilidad de los átomos en la superficie. Cuando aumenta la temperatura del sustrato, la

movilidad de las especies adsorbidas también aumentará, facilitando de esta manera la coalescencia y por lo tanto la formación de una capa más densa. Por último, hay que señalar que la naturaleza y la rugosidad de la superficie del sustrato pueden jugar un papel importante en la adhesión entre la capa depositada y el sustrato [33]. Esta rugosidad de la superficie se puede modificar, haciendo algún tratamiento al sustrato previo a la deposición como por ejemplo pulido o alguna deposición de otro material.

La presión parcial de nitrógeno en el plasma juega un papel importante para la obtención de nitruro de tántalo. De hecho, el aumento de la presión parcial de nitrógeno induce una variación en la composición estequiométrica del TaN [34]. La evolución de la composición se asocia con un cambio en el parámetro de red y también da lugar a cambios en las propiedades de la película depositada como por ejemplo a un aumento en la resistividad eléctrica con la presión parcial de nitrógeno.

Por lo tanto, la optimización de los diferentes parámetros que controlan la deposición es esencial con el fin de obtener la composición deseada del material, con un espesor controlado, en particular la optimización de estos parámetros para obtener capas de tántalo y de nitruro de tántalo estequiométricas fueron objeto de un estudio previo realizado en el trabajo de tesis doctoral de J. Nason [25] y sus condiciones experimentales fueron utilizados por nosotros para realizar las síntesis de las películas delgadas deseadas.

1.4 Los sustratos

1.4.1 Acero Inoxidable Sandvik bioline (SS316LVM)

Es un acero con bajo contenido de Carbono, es un material que posee propiedades como resistencia a la corrosión, resistencia a los esfuerzos de alto impacto, resistencia al desgaste y biocompatibilidad [35], es la opción más económica dentro de las aleaciones metálicas usadas en cirugías ortopédicas, sin embargo se han encontrado respuestas adversas en los tejidos circundantes al implante mostrando encapsulación y membranas fibrosas en el entorno de la prótesis además de numerosas fallas en la zona de la cabeza y cuello de las prótesis de acople cónico [36], es importante destacar que la composición de los óxidos protectores se relaciona con el comportamiento a la corrosión de las aleaciones ortopédicas por lo que se requiere una caracterización detallada de estas superficies para optimizar la biocompatibilidad de estas aleaciones para uso quirúrgico.

1.4.2 Titanio (Ti)

Es ampliamente usado en implantes, su integración en el hueso es en general muy buena sin generar interfaces fibrosas, sin embargo existen ciertas limitaciones como la liberación de iones los cuales han sido detectados en tejidos cercanos al lugar de los implantes, la liberación de estos iones aún en pequeñas cantidades puede causar irritación en el tejido circundante al implante [37]. De manera natural el Titanio forma una capa protectora de óxido

la cual es estable, esta capa aumenta la resistencia a la corrosión, y puede absorber proteínas e inducir la diferenciación de las células del tejido óseo [38]. Sin embargo siguen las preocupaciones en cuanto a los problemas de estos implantes por lo que alterando su superficie se pueden atacar estos problemas, entendiendo que los parámetros superficiales del implante juegan un papel esencial para obtener una interacción efectiva entre el implante y el tejido y conseguir la osteointegración, una forma común de obtener mayor osteointegración es recubrir la superficie del titanio con una pequeña capa de Dióxido de Titanio. La película de TiO_2 que se forma de manera natural sobre el titanio debido a su alta reactividad en presencia de Oxígeno [38] o que se puede obtener de manera sintética para darle propiedades específicas ya que actúa como una capa protectora de la superficie del implante. Se ha encontrado que esta capa es estable y se adhiere muy bien a la superficie, además la protege de la corrosión y en gran medida es la responsable de la excelente biocompatibilidad de los implantes de Titanio [39].

1.5 Los materiales depositados Tántalo y Nitruro de Tántalo

1.5.1 Tántalo

El Tántalo pertenece a la familia de los metales de transición, caracterizado por tener una capa 5d incompleta. Para el átomo de Tántalo en su estado fundamental la configuración electrónica es $[\text{Xe}] 4f^{14} 5d^3 6s^2$. Es un metal refractario que tiene una temperatura de fusión alta asociada con una dureza y con una alta conductividad térmica y eléctrica. Al igual que todos metales de la columna 5A de la tabla periódica (V, Nb), el Tántalo presenta dos fases cristalinas la fase cúbica α -Ta de grupo espacial $\text{Im}3\text{m}$ que contiene dos átomos por celda. Y la fase β -Ta, de estructura tetragonal [40]. Sin embargo, esta es una estructura metaestable que se transforma en la fase estable α -Ta por tratamientos térmicos [41], [42].

El Tántalo en forma de película delgada sintetizada por pulverización catódica puede presentar cualquiera de las dos fases cristalinas α -Ta resistente y dúctil o β -Ta dura y frágil [43]–[45]. Si no se consideran variables externas a la hora de la deposición como calentamiento adicional a altas temperaturas del sustrato o la naturaleza de un sustrato que favorezca el crecimiento de la fase α -Ta tal como Al (111) [44], β -Ta es la fase predominante al sinterizar películas delgadas por pulverización catódica, incluso se ha encontrado que depositar una capa de TaN también favorece la obtención de esta fase cristalina [43], [46]. El Tántalo es bien conocido por su excelente estabilidad térmica y buena conductividad y ha sido utilizado como biomaterial desde hace algún tiempo debido a que exhibe una excelente biocompatibilidad, resistencia a la corrosión y estabilidad [47]–[50], por lo que ha presentado una excelente alternativa a la hora de usarse como biomaterial por encima del Acero Inoxidable y el Titanio [51], [52], claro que representa un reto desde el punto de vista económico por su alto costo lo que nos lleva a plantear alternativas como la deposición de una película delgada que modifique la superficie del implante y mejore la

bioactividad, biocompatibilidad y osteoconductividad tal como lo hace el Tántalo [53].

1.5.2 Nitruro de Tántalo

El término Nitruro se utiliza para describir compuestos de Nitrógeno que se forman con otros elementos de igual o menor electronegatividad. La diferencia de electronegatividad entre el nitrógeno y el elemento que forma el nitruro es un factor importante ya que determina la naturaleza del compuesto, por lo tanto, los nitruros se pueden clasificar en cuatro grupos: los nitruros intersticiales, nitruros covalentes, nitruros intermedios y nitruros iónicos. Debido a la gran diferencia de electronegatividad entre el nitrógeno y el tántalo, el nitruro de tántalo es un nitruro intersticial [54]. Aunque el nitruro de tántalo tiene enlaces que tienen una naturaleza metálica posee un grado de unión covalente e iónica. La unión covalente principalmente describe la interacción entre el nitrógeno 2p y el tántalo 5d, la interacción iónica entre ambos viene dada por la transferencia de carga del tántalo al nitrógeno. Se dice que el nitruro de tántalo tiene una alta refractariedad debido a que su energía de enlace es de 15.33 eV. Las propiedades (dureza, alta conductividad térmica y eléctrica, estabilidad química) del nitruro están relacionados con la existencia de estos dos tipos de interacciones.

El nitruro de tántalo se obtiene por difusión de nitrógeno en el metal, a través de los sitios intersticiales octaédricos del enrejado cúbico de cuerpo centrado del tántalo α -Ta, la relación de radios atómicos N/Ta es de 0.508. Al aumentar la inserción de nitrógeno, la estructura cristalina cúbica α -Ta pasa a una solución sólida α -Ta (N) de estructura cúbica y luego a la fase Ta₂N de estructura hexagonal y finalmente, a la fase de TaN, estructura hexagonal a bajas temperaturas y a altas temperatura la fase cúbica de caras centradas con estructura tipo NaCl (figura 1.5), como la obtenida en este trabajo.

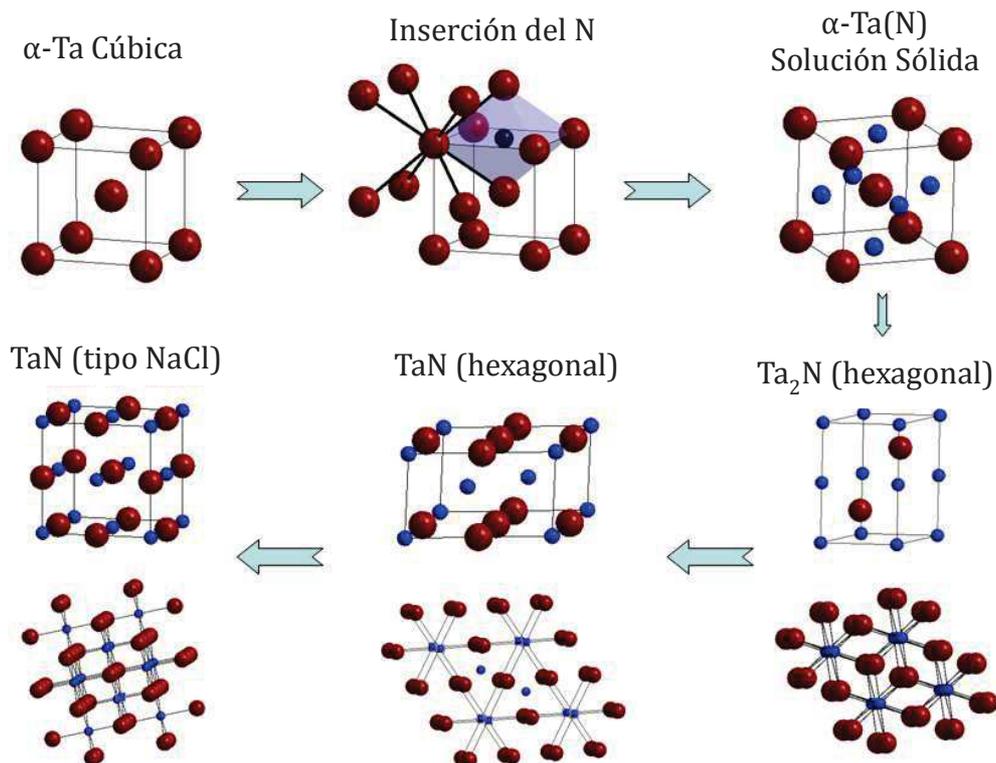


Figura 1.5. Evolución de la estructura del Tántalo con la inserción de Nitrógeno [55].

La fase de tipo de NaCl cúbica centrada en las caras perteneciente al grupo espacial $Fm\bar{3}m$ es conocida como la fase δ -TaN y puede tener varias composiciones, que van desde $TaN_{0.6}$ a $TaN_{1.13}$ [56]–[58] y se forma fácilmente cuando se depositan películas delgadas por pulverización catódica [58].

Por otro lado el nitruro de tántalo es muy conocido por su alta resistencia al desgaste, dureza y resistencia a la corrosión [59]–[61], lo que son excelentes características para utilizarlo como un biomaterial por lo que sus propiedades biomédicas han sido investigadas [18], [62] y excelentes resultados fueron obtenidos haciéndolo un posible biomaterial.

1.6 Biomateriales para Implantes Óseos

El aumento de la esperanza de vida de las personas, está acompañada por el deterioro progresivo del sistema esquelético, como las articulaciones de cadera y rodilla, gracias a la evolución de los conocimientos médicos y aumento de la riqueza, cada año más de un millón de procedimientos de reemplazo de articulaciones se realizan en todo el mundo mejorando la calidad de vida de las personas [63].

A los efectos de las prótesis articulares, materiales sintéticos tienen que ser utilizados, que posean adecuadas propiedades mecánicas y resistencia al desgaste, y deben mostrar una respuesta tisular óptima. Sustitutos óseos

artificiales se han construido a partir de muchos tipos de metales, cerámicas, y polímeros [64]. Las propiedades que va a requerir el material dependen de la función del implante. Por ejemplo, en una prótesis de cadera el eje de un vástago femoral debe tener buenas propiedades de unión de huesos, en contraste a los pines temporales utilizados para la fijación de las fracturas. Nos centramos en los materiales destinados para formar un contacto con el hueso fuerte y estable, como un implante dental o el eje del vástago femoral en una prótesis de cadera que se ha mencionado anteriormente. Para estos implantes a largo plazo, una interfaz fuerte y fiable es esencial para prevenir el aflojamiento del implante y pérdida de funcionalidad.

Los fosfatos de calcio (CaP) son cerámicas que forma el constituyente inorgánico principal del hueso, y por lo tanto son candidatos obvios para ser utilizados como un biomaterial hueso-unión. En efecto, son conocidos por formar una interfaz fuerte y continua con el hueso. El inconveniente principal de esta cerámica es su limitada resistencia a la fractura lo que los hace frágiles, aunque depositar una película delgada de esta cerámica nos ofrece la ventaja de una buena respuesta tisular además de ser un excelente material para proliferar el crecimiento de hueso nuevo que se puede combinar en un sistema multicapa donde el otro material (metal, cerámica, etc) ofrezca adecuadas propiedades mecánicas y tenga también propiedades biocompatibles.

La formación de la interfaz del material - hueso implica numerosos y complejos procesos, uno conducido por proteínas y células y otro en parte controlada por las interacciones inorgánicas de las soluciones superficiales. Esta tesis describe los procesos fisicoquímicos que intervienen en la formación de una interfaz estable entre películas delgadas y un entorno de formación de hueso. Estos procesos incluyen la deposición del material de revestimiento en forma de película delgada, la adsorción y la formación de cristales de hidroxiapatita y la estructuración de la interfaz.

1.6.1 La Reacción Tisular

Además de las propiedades mecánicas y de estabilidad, una propiedad importante de un biomaterial es la respuesta del tejido después de la implantación. Dependiendo de la función del implante, esto determina la biocompatibilidad de un material. Para un material óseo de sustitución de soporte de carga, es esencial tener un contacto sólido con el hueso.

Varios sistemas han sido adoptados para clasificar las reacciones material no tóxico - tejido, por ejemplo, las realizadas por Hench [65] y Black [66] y el propuesto por Osborn y Newesely [67], que se presenta en la tabla 1.1. Esta clasificación fue diseñada para agrupar materiales de sustitución de hueso de acuerdo con su respuesta con el tejido óseo. Estas clasificaciones se refieren a reacciones de los tejidos *in vivo*. Mucho esfuerzo se ha hecho en traducir las clasificaciones anteriores a las medidas *in vitro*. En este contexto, es más apropiado para referirse a los diversos tipos de comportamiento de la célula como la citocompatibilidad.

Grado de Compatibilidad	Características del Tejido
Biotolerante	Los implantes separados de hueso adyacente por una capa de tejido blando a lo largo de la mayor parte de la interfaz: la osteogénesis a distancia.
Bioinerte	Contacto directo con el tejido óseo: osteogénesis de contacto.
Bioactivo	Unión con el tejido óseo: osteogénesis de unión.

Tabla 1.3. Clasificación de la Biocompatibilidad propuesta por Osborn y Newesely, también se indica la reacción del tejido.

Por lo tanto, vemos que un requisito esencial para la biocompatibilidad es la habilidad del material de tener una unión con el hueso. Esta unión con el hueso se da por procesos fisicoquímicos que establecen la continuidad entre el implante y la matriz ósea.

Se ha observado que muchos materiales exhiben una fuerte interfaz entre el material y el hueso luego de la implantación, se ha encontrado que una apatita carbonatada está presente y se le conoce como *apatita biológica*. Esta capa se une con el implante y con la matriz ósea. Algunos ejemplos de estos materiales son los fosfatos de calcio, algunas vidrios cerámicos y algunas superficies activadas de sílice y titania. La propiedad de un material de permitir la formación *in vitro* de una capa de fosfato de calcio fuertemente unida es usada para identificar prometedores materiales bioactivos.

Se observó que los materiales biotolerantes (por ejemplo, la mayoría de los metales), que muestran osteogénesis distante, es decir, la formación de hueso hacia el material, a menudo muestran la formación de una capa fibrosa de tejido blando entre el hueso y el implante. Esta capa puede ser de hasta cientos de micras de espesor. Es esta capa la que se piensa que es responsable de una adherencia deficiente del implante óseo sobre superficies metálicas. La formación de tejidos blandos también se ve reforzada por la fricción mecánica entre el implante y el tejido.

1.6.2 Formación de la Interfaz Implante – Hueso

Antes de explorar los detalles de los procesos que conducen a la formación de la interfaz implante - hueso primero damos una breve introducción sobre la estructura y composición de los huesos [68].

El hueso es una variedad de tejido conjuntivo que junto al cartílago forma el sistema esquelético de los vertebrados. Se caracteriza por su rigidez y su gran resistencia tanto a la tracción como a la compresión. Los huesos son el soporte de tejidos blandos y músculos, la protección de posibles traumatismos de los

órganos internos y de la médula ósea, el movimiento del aparato locomotor, entre otras fisiologías del llamado sistema óseo.

El hueso es un tejido de soporte y se compone de un carbonato que contiene apatita de calcio (~43 por ciento en peso) y colágeno tipo I (~36 por ciento en peso). Además contiene aproximadamente 14 por ciento de agua. Dos tipos de hueso se pueden distinguir, hueso cortical, que se constituye de ~ 90 por ciento tejido óseo sólido que es el principal responsable de la integridad mecánica, y el hueso trabecular, que es esponjoso y contiene 80 por ciento de médula y es el que delimita las cavidades. El hueso es un tejido dinámico sujeto a la remodelación constante, es decir, la deposición por la actividad de los osteoblastos precursores de los osteocitos que se encargan de la síntesis y deposición de la matriz ósea y su posterior mineralización y la resorción subsiguiente por los osteoclastos encargados de la destrucción de las superficies óseas para la posterior reposición de matriz nueva.

El tejido óseo es un material natural que, en su conjunto, mantiene una rigidez y resistencia elevadas con un peso mínimo. Se podría considerar que la fase mineral del hueso le confiere su resistencia a la compresión, mientras que el colágeno le proporciona su resistencia a la tracción.

Este tejido se comporta completamente diferente a cualquier otro tratado por la mecánica clásica. Estructuralmente los huesos son heterogéneos y presentan una fuerte anisotropía según los niveles requeridos por las funciones mecánicas. En el caso de la resistencia mecánica del hueso, ésta depende también de la dirección de la carga. El hueso esponjoso trabaja principalmente a compresión, en cambio, el hueso cortical debe soportar fuerzas de compresión, tracción y cizalladura.

Aunque en general el comportamiento del hueso es viscoelástico, no lineal, para no complicar excesivamente el problema la mayoría de los estudios de biomecánica consideran al hueso como un material elástico, lineal, lo que se aproxima razonablemente a la realidad salvo en caso de cargas de impacto.

A pesar de su complejidad, el conocimiento del comportamiento mecánico del material óseo es fundamental a la hora de abordar el estudio de las prótesis actuales, ya que la clave para que éstas no presenten problemas en su funcionamiento consiste en que el comportamiento mecánico del conjunto sea similar considerando la estructura con y sin prótesis

1.6.3 Las células óseas

En el hueso existen principalmente dos tipos celulares, los osteoblastos y los osteoclastos. Además existen dos tipos celulares que deriva de la diferenciación terminal de los osteoblastos, los llamados osteocitos y las células de revestimiento. Las células óseas aunque constituyen menos del 2% del volumen total del hueso, son responsables del desarrollo y remodelado del esqueleto a través de la actividad que llevan a cabo [69].

1.6.3.1 Cultivo Celular: Osteoblastos

Los osteoblastos son las células esqueléticas responsables de sintetizar el componente orgánico de la matriz ósea (colágeno tipo I, proteoglicanos, proteínas implicadas en la adhesión celular, osteocalcina y factores de crecimiento), controlar el depósito de las sales minerales, así como de regular la diferenciación y actividad de los osteoblastos. De esta manera, los osteoblastos, juntamente con los osteoclastos, juegan un papel importante en la remodelación ósea y en la homeostasis del calcio.

Los osteoblastos nunca se encuentran ni actúan de manera aislada, siempre se encuentran agrupados a lo largo de la superficie del periostio y endostio formando un monocapa adherente [70]. Son células cuboidales muy activas desde el punto de vista metabólico, lo cual se traduce morfológicamente en la presencia de un retículo endoplásmico rugoso muy extenso, y de un aparato de Golgi bien desarrollado encargado de la secreción de proteínas. Durante el proceso de formación ósea, los osteoblastos pueden quedar embebidos en la matriz ósea donde se diferencian hacia un estado maduro dando lugar a los osteocitos.

1.6.4 Remodelado óseo

Varios estímulos, mecánicos o fisiológicos, activan el proceso por el cual el hueso entrega calcio. Este proceso se conoce como remodelación ósea.

Cuando una superficie se introduce en el tejido óseo, una secuencia de interacciones complejas tienen lugar [65], [68], [71], [72]. Algunas de estas interacciones fueron esbozadas esquemáticamente en la figura 1.1. En los segundos iniciales, se adsorben en la superficie iones y proteínas del fluido circundante [73], [74]. Varias propiedades de la superficie gobiernan el proceso de adsorción, como la morfología, la composición, la energía, y la carga. Estas propiedades determinan no sólo la concentración de las proteínas adsorbidas sino también su funcionalidad. Dado que las proteínas actúan como contactos para la unión de las células, la adsorción selectiva de ciertas proteínas puede alterar significativamente el comportamiento celular. Además, al mismo tiempo, la superficie puede también ser alterada simplemente por la interacción fisicoquímica entre la superficie (iónica) y la solución adyacente. La superficie puede (en parte) disolverse o reestructurarse, o cristales pueden formarse a partir de la solución. Ambos procesos compiten por los sitios de unión disponibles en la superficie.

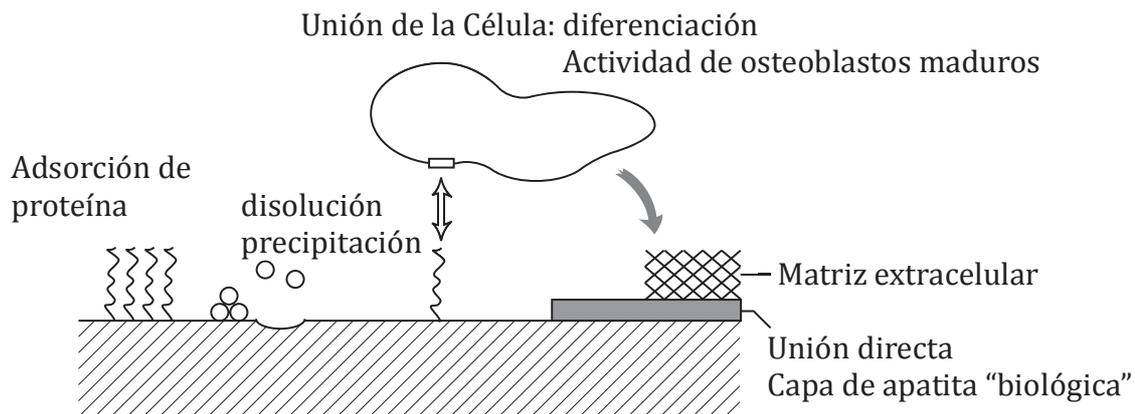


Figura 1.6. Algunos de los procesos de la superficie relevantes para la formación de la interfaz de material óseo. La superficie interactúa con la solución iónica, las proteínas se adhieren a la superficie, y las células interactúan con las proteínas adsorbidas. Después de la diferenciación, los osteoblastos maduros producen la matriz extracelular (MEC). Adaptado de [71][75].

Después de la adsorción de proteínas, una cascada de reacciones reclutan los osteoblastos para el implante. La comunicación de la célula con la superficie adyacente procede a través de receptores en la membrana celular, las denominadas integrinas. Las integrinas se unen a las proteínas adhesivas en la superficie y por lo tanto conectan a la célula con la superficie.

Las células unidas a la superficie se diseminan en pocas horas. Son importantes para una buena propagación de células la topología de la superficie y la carga superficial. Las células pueden proliferar o migrar. Teniendo en cuenta los estímulos adecuados, los osteoblastos pueden diferenciarse o activarse a la matriz extracelular (MEC) que forma los osteoblastos maduros. La matriz extracelular es una red de fibrillas de colágeno, proteínas, y polisacáridos que pueden ser calcificados, para formar el marco conjuntivo del tejido óseo. Una típica escala de tiempo para que este proceso pueda iniciarse puede variar de días a semanas. La MEC proporciona anclaje celular y apoya la aposición de los fosfatos de calcio, dando fuerza al tejido óseo recién formado.

Es importante darse cuenta de que las condiciones interfaciales, especialmente en las proximidades de las células unidas, pueden diferir considerablemente de las condiciones del fluido general. Las concentraciones de iones, pH, y propiedades de difusión pueden desviarse sustancialmente.

Este proceso incluye una interacción entre las células osteoblásticas y osteoclasticas que se divide en cuatro etapas:

Etapa I: inicial o de activación, en esta fase se produce la interacción entre los osteoblastos y los precursores de los osteoclastos y, posteriormente, empieza la diferenciación hacia sus formas más maduras. También incluye la unión de

los osteoclastos maduros a las superficies óseas donde se llevará a cabo la resorción. Las células de revestimiento dejan las superficies óseas al descubierto contrayéndose y liberando enzimas para que los osteoclastos puedan producir el anclaje. Este proceso permite que la superficie ósea se transforme en activa.

Etapa II: de resorción, los osteoclastos inician el proceso de resorción secretando iones de hidrógeno y enzimas lisosomales que a pH ácidos son capaces de degradar los componentes de la matriz ósea. Durante esta fase se genera un defecto en forma de túnel en el hueso cortical y en forma de laguna (de Howship) en el hueso trabecular.

Etapa III: intermedia de reposo o de inversión, cuando los osteoclastos terminan su actividad resorptiva desaparecen de la zona mediante un proceso de apoptosis. En ese momento la laguna de resorción queda libre y es colonizada por macrófagos que acaban de degradar el colágeno, depositan proteoglicanos para formar la línea de cemento (sustancia que actúa de cohesión entre el hueso viejo y el nuevo), y liberan factores de crecimiento para que empiece la fase de formación. Las lagunas de resorción son ocupadas por los preosteoblastos [76].

Etapa IV: de formación, es llevada a cabo por los osteoblastos que se encargan de sintetizar el componente orgánico de la matriz ósea y controlar el depósito de minerales de la matriz ósea [77].

1.7 Biocerámicas

Una clase importante de biomateriales óseos de sustitución son las biocerámicas, como Al_2O_3 , ZrO_2 , los fosfatos de calcio y las cerámicas de vidrio. Como se mencionó anteriormente, la ventaja de estos materiales sobre, por ejemplo, la mayoría de los metales es su resistencia a la corrosión. Además, una amplia investigación ha demostrado de manera inequívoca que algunos de estos materiales biocerámicos, al igual que algunas de las fases de los fosfatos de calcio son bioactivos. También algunas cerámicas de vidrio (mezclas de SiO_2 , CaO , y P_5O_5) pueden ser bioactivas.

La aplicación de fosfatos de calcio es sencillo, ya que el principal constituyente inorgánico del hueso es una mezcla de Na^+ , Mg^{2+} , y CO_3^{2-} que contiene apatita de calcio pobremente cristalizada. En la tabla 1.2 se listan algunas de las fases de fosfatos de calcio correspondientes para la biomineralización junto con los acrónimos, fórmulas y proporciones de Ca y P. Una breve descripción de algunas de estas fases se da a continuación, los detalles se pueden encontrar en [78]–[80].

Nombre	Acronimo	Formula	Ca/P
Pirofosfato de Calcio	pyro	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.00
Fosfato tricalcico	TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.50
Hidroxiapatita	HAP	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67
Fosfato tetracalcico	TTCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2.00

Tabla 1.4. Lista de fases de fosfatos de calcio más relevantes para los biomateriales y biomineralización.

HAP es la fase más estable de los fosfatos de calcio, producto final de las reacciones de precipitación bajo composición fisiológica, pH, y temperatura.

TCP no se puede obtener directamente a partir de soluciones acuosas. Es algo más soluble que HAP, y está siendo utilizado como una biocerámica, puro o mezclado con HAP. Tanto α -TCP y β -TCP son fases de alta temperatura, sólo se forman por encima de 800°C.

Pyro y TTCP No pueden precipitarse a partir de soluciones de (orto) fosfato de calcio. fases puras solo tienen biocompatibilidad limitada.

Además de la formación de una capa de apatita biológica fuertemente unida, es necesario que exhiba propiedades osteoconductoras (capacidad de guiar a los huesos a lo largo de la superficie). Algunas superficies de fosfatos de calcio en combinación con factores de crecimiento o células, también han demostrado ser osteoinductivas, es decir, que inducen la formación de hueso en la superficie incluso cuando se implanta en lugares fuera del tejido óseo.

1.7.1 La Hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

La HAP es el principal componente mineral del hueso es un material bioactivo, osteoconductor, no reabsorbible que puede formar hueso real cuando es implantada en una zona donde se requiere regeneración del tejido óseo debido a que provoca una interacción e intercambio químico entre el implante y el tejido vivo dando lugar a una perfecta osteointegración. La hidroxiapatita tiene una estructura hexagonal donde $a = 9,432 \text{ \AA}$ y $c = 6,881 \text{ \AA}$, la presencia de este compuesto es la clave para promover la osteointegración en la interface hueso – implante, la osteointegración esta descrita como el contacto directo entre hueso vivo y el implante. Basándonos en histología, se define como el anclaje directo sobre el implante de tejido óseo sin la formación de tejido fibroso en la interface hueso – implante. Generalmente no ocurre un contacto 100% de hueso – implante, para lograr una osteointegración efectiva se requiere un material bioinerte o bioactivo y una configuración superficial que sea atractiva para la deposición del hueso. Las propiedades superficiales del implante influyen y determinan como se va a regenerar el hueso sobre él, por lo que recubrir las piezas metálicas con capas adecuadas para que mejoren el contacto hueso – implante ayuda mejorar el éxito del mismo, es lo que se ha conseguido hasta ahora con capas de Dióxido de Titanio e Hidroxiapatita cuyo principal problema es su fragilidad por lo que se podría pensar en diseñar y

synthetizar un sistema multicapa donde cada capa tenga una característica particular que mejore las propiedades del implante para que cumpla su función en el cuerpo humano [38].

1.7.1.1 Fases precursoras

Como se indica en la sección 1.7, la fase más estable termodinámicamente de los fosfatos de calcio es la HAP. Se espera de que después de la precipitación de un fosfato de Calcio CaP a partir de las soluciones sobresaturadas finalmente se forme HAP (relación Ca/P de ~ 1.6) (a pH 7 y temperaturas entre 20-40°C). Sin embargo, en numerosos estudios se encontró que se formaron fases intermedias [81]. *Kemenade et al.* mostraron de manera convincente que la formación de HAP es siempre precedida por la formación de al menos una fase precursora [82], [83]. El orden en el que se observaron las fases precursoras está de acuerdo con la regla de las fases de Ostwald. ACP (amorphous calcium phosphate), DCPD (dicalcium phosphate dihydrate), OCP (octacalcium phosphate), y CDHA (calcium deficient hydroxyapatite) se han propuesto como fases precursoras en la formación de HAP. El número de fases precursoras, y la ruta de reacción exacta depende de la temperatura, el pH, la sobresaturación, la presencia de inhibidores o aceleradores de la reacción, y la hidrodinámica. Caminos de reacción observados se representan gráficamente en la figura 1.6.

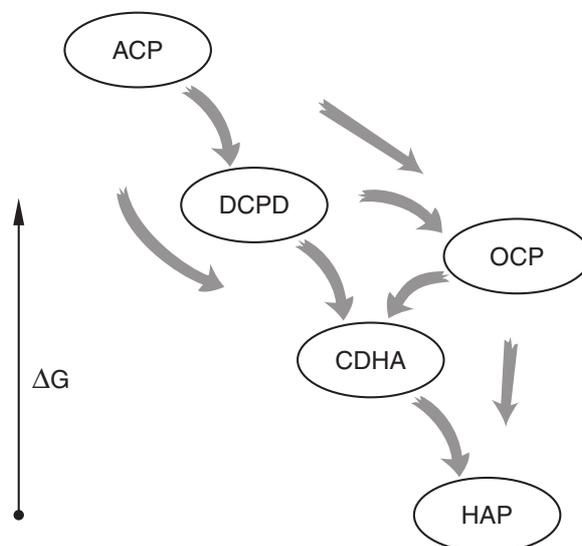


Figura 1.5. Caminos de reacción observados en la precipitación de HAP a partir de soluciones de CaP sobresaturadas [84].

1.7.1.2 Deposición de Hidroxiapatita

Los avances en el campo de la ortopedia vienen precedidos por avances en el campo de los implantes dentales, existen diversos estudios sobre el uso de recubrimientos de hidroxiapatita en el campo de los implantes dentales donde se demuestra que después de cinco años de implantación, el éxito de estos implantes es de 90% pero disminuye hasta un 82% después de diez años [85]. A pesar del éxito clínico de los implantes de titanio recubiertos con hidroxiapatita existen efectos perjudiciales sobre el efecto del recubrimiento tal como la colonización bacteriana que puede dañar los fosfatos de calcio [86].

Las cerámicas de fosfato de calcio incluyendo a la hidroxiapatita a menudo no son muy adecuadas en aplicaciones de soporte de carga debido a su fragilidad. El recubrir una aleación metálica con hidroxiapatita combina la ventaja de la fuerza y la fractura-tenacidad del metal con la bioactividad y biocompatibilidad de la hidroxiapatita.

En las últimas décadas diversas técnicas de deposición se han aplicado para depositar recubrimientos de fosfatos de calcio por ejemplo la deposición por pulverización de plasma [87]–[89], la deposición sol-gel [90], [91], y la deposición por el método biomimético [92]–[94]. Por supuesto, todas las técnicas tienen sus ventajas y limitaciones. Películas delgadas de hidroxiapatita se han depositado en materiales que han sido sugeridos como biomaterial, especialmente en Ti y sus aleaciones [95]–[98]. En este trabajo se ha utilizado el método biomimético para producir capas delgadas de hidroxiapatita.

En algunas de estas publicaciones se compararon implantes de características similares recubiertos con hidroxiapatita con otros sin recubrir y se comprobó que la velocidad y la eficacia de la unión entre el hueso y el implante se mejoraron considerablemente cuando existía un recubrimiento bioactivo. Concretamente en el estudio de Cook *et al.* [99] se compararon implantes de titanio poroso frente a otros recubiertos de hidroxiapatita, y se demostró histológicamente que, en los primeros, a pesar de que existía un crecimiento óseo hacia el interior de los poros, se formaba una fina capa fibrosa entre el metal y el hueso mientras que en los que estaban cubiertos con hidroxiapatita existía una capa de hueso en contacto directo con el recubrimiento, abriendo paso a la utilización de prótesis recubiertas obteniéndose resultados muy satisfactorios, pero poco a poco aparecieron dudas sobre la posible delaminación del recubrimiento que pudiera provocar un aflojamiento aséptico de la prótesis y desgaste por las superficies de cargas por partículas de hidroxiapatita desprendidas del recubrimiento.

1.8 Fluido Corporal Simulado

Para probar biomateriales y estudiar su potencial bioactivo, *Kokubo et al.* estudiaron el comportamiento de la calcificación de los materiales inorgánicos en soluciones que imitan las condiciones fisiológicas [100], [101]. Ducheyne formuló una hipótesis [102] donde la formación de una apatita biológica directamente unida podría indicar una posible bioactividad. Para este propósito,

Kokubo et al. introdujeron una solución con concentraciones de iones similares a la del plasma de la sangre humana, designado como fluido corporal simulado (FCS). Las concentraciones de iones se pueden encontrar en las tablas 2.2 y 2.3 en la sección 2.2.1.

Para recubrimientos de fosfatos de calcio depositados por diversas técnicas, tanto, propiedades de disolución [103]–[106] y las propiedades de precipitación [88], [89], [107], [108] fueron investigados en el FCS.

Hoy en día, los fluidos corporales simulados basados en la formulación de Kokubo se utilizan habitualmente para probar el potencial bioactivo de los materiales [88], [89], [97], [98], [103], [105], [106], [109], [110]. El tiempo necesario para cubrir la superficie y la abundancia de cristales se cree que son indicativos de las propiedades de unión del hueso *in vivo*.

1.9 Síntesis de Películas Delgadas Mesoporosas

Estos materiales tienen una compleja y perfecta organización en la mesoescala que implica esencialmente una combinación entre la química del sol-gel de precursores inorgánicos y el autoensamblaje característico de una plantilla de poros orgánicos que típicamente se encuentra a partir de surfactantes [111]. El proceso de sol-gel está basado en una polimerización controlada de los precursores inorgánicos moleculares en condiciones de temperatura que varíen levemente. Solventes orgánicos y cantidades controladas de agua son cruciales para el desarrollo de la ruta de síntesis para la construcción de los bloques nanoestructurados inorgánicos.

El control químico en las reacciones de activación/polimerización permite controlar el tamaño, forma y superficie de los polímeros inorgánicos, sintonizar sus características hidrofóbica/hidrofílica, y también es posible sintonizar las interacciones con la plantilla orgánica. Estos sistemas nanoestructurados forman primero una red que puede ser puramente inorgánica o híbrida orgánica-inorgánica. En este último caso la síntesis de las PDHM implica que deben ser modificados los precursores moleculares usados en la reacción de sol-gel. Esta modificación ofrece la posibilidad de sintetizar materiales mesoestructurados cuyos grupos orgánicos se ubiquen en las paredes del poro, usando este enfoque se pueden obtener que las paredes de los poros sean híbridas y tengan además una naturaleza cristalina [111].

En resumen, para sintetizar estos materiales mesoporosos organizados, la red de bloques nanoestructurados que se obtiene por sol-gel debe coensamblarse con la plantilla de manera adecuada para así obtener la mesofase deseada con la composición deseada.

Las técnicas para depositar las películas son variadas, entre las más usadas se encuentra el “dip coating” o “spin coating”. El ambiente de la deposición y el proceso de evaporación y el espesor son importantes no solo para la formación de la porosidad sino también para la simetría del arreglo de poro. El complejo proceso que tiene lugar durante la evaporación del solvente y subsecuente

formación de la plantilla inorgánica es diferente para todo el conjunto de técnicas de síntesis que nos permiten obtener películas delgadas híbridas mesoporosas con distintos espesores, con una gran variedad de composición en las paredes, tamaños de poro variados y sistemas de poros con diferentes simetrías [111].

1.9.1 Sol-Gel

Preparación de Recubrimientos por sol-gel.

El proceso sol-gel ha supuesto un gran avance en el campo de los nuevos materiales ya que permite la síntesis de nuevos materiales a temperatura ambiente. El proceso parte de componentes líquidos que, mediante unas reacciones químicas, adoptan una estructura sólida y todo tipo de formas según la necesidad, incluyendo capas delgadas.

La preparación de capas delgadas por el método de sol-gel es bastante utilizada en la síntesis de recubrimientos ya que permite su obtención a temperatura ambiente, esta cualidad le permite adaptarse a los distintos sustratos como también la introducción de material sensible a la temperatura en la composición de la película. Estos materiales le confieren a las películas propiedades específicas que pueden ser tanto estructurales como activas.

El proceso de sol-gel parte de una mezcla de alcóxidos, agua y disolvente a la que se agrega un catalizador. Es entonces cuando se desencadenan las reacciones de hidrólisis, y condensación que resulta en la formación de una dispersión o suspensión de partículas coloidales discretas en una fase líquida llamada sol. A medida que continúan produciéndose estas reacciones, aumenta la viscosidad de la solución hasta la formación de una matriz rígida y porosa llamada gel. El estado gel se considera esencialmente como una dispersión en la cual las interacciones atractivas entre los elementos que componen la fase dispersa son lo suficientemente fuertes para que la totalidad del sistema se transforme en una estructura rígida, formando un sólido polimérico o coloidal, como función de la fase dispersa. Después de un proceso de secado a temperatura ambiente se obtiene un gel con un mayor grado de secado, en el que la fracción líquida (disolvente) se ha eliminado en condiciones normales de presión y temperatura (xerogel). Este xerogel está formado por una red rígida de cadenas poliméricas y que están interconectadas a través de los poros [112], [113].

Ventajas fundamentales del proceso sol-gel:

- Versatilidad.
- Ocurre a temperatura ambiente.
- Permite la distribución homogénea de los precursores.
- Permite la adición de aditivos orgánicos (dando lugar a la preparación de una gran variedad de materiales híbridos orgánico-inorgánico.).
- Diseño de las propiedades finales a partir del control de algunos parámetros específicos de la reacción de síntesis.

- Los materiales sol-gel son la estabilidad mecánica, inactividad química, transparencia óptica y flexibilidad en la configuración de la estructura física del material.
- Cuando el producto es una película delgada puede algunas de sus características modificarse y ajustarse (espesor, porosidad, etc).

El método sol-gel presenta una gran versatilidad a la hora de preparar materiales a temperatura ambiente, ya que abre un abanico de opciones de procesado que permiten la obtención del material en diversas formas:

- Partículas.
- Fibras.
- Películas delgadas.
- Monolitos con porosidad controlada.

1.9.2 Centrifugación (“spin coating”)

La microestructura y propiedades de un recubrimiento van a depender del tamaño y estructura de las especies (partículas primarias) contenidas en la primera etapa del proceso del sol-gel o sol, de la capilaridad del líquido durante el secado y de las velocidades relativas de condensación y secado.

Los distintos métodos de deposición de recubrimientos vía sol-gel están basados principalmente en los dos métodos más convencionales para líquidos: inmersión (“dip coating”) y centrifugación (“spin coating”). En todos los casos estos dos métodos son válidos sólo para recubrimientos muy finos y para espesores de capas de gran precisión y muy buena calidad superficial.

El “spin coating” consiste en un proceso de cuatro etapas: vertir la solución o sol en el centro de sustrato, “spin-up”, “spin off” y la evaporación. Después de entregar el líquido al sustrato, las fuerzas centrífugas conducen el líquido a través del sustrato (spin - up). El exceso de líquido sale del sustrato durante el spin off y durante la evaporación se reduce aún más el espesor de la película [114].

1.10 Biopelículas

Las biopelículas son organizaciones microbianas compuestas por microorganismos que se adhieren a las superficies gracias a la secreción de un exopolímero. Estas conformaciones microbianas presentan características como heterogeneidad, diversidad de microambientes, resistencia a antimicrobianos y capacidad de comunicación intercelular que las convierten en complejos difíciles de erradicar de los ambientes donde se establecen. En el humano las biopelículas se asocian con un gran número de procesos infecciosos que por lo general son de transcurso lento, ocasionando que su control sea dispendioso.

El impacto médico de las biopelículas bacterianas se ha incrementado con el reconocimiento de las biopelículas como un agente importante de infección en tejidos blandos. El patógeno oportunista *P. aeruginosa* es ampliamente conocido como formador de biopelículas [115] y considerado modelo *in vitro* en sistemas estáticos, dinámicos y microcosmos [116].

Estudios previos han demostrado la formación *in vitro* de biopelículas sobre superficies comúnmente utilizadas en cirugías de reemplazo óseo (SS316LVM y Ti), así como en aleaciones de Ti y recubrimientos como la Hidroxiapatita que pretenden promover la integración ósea y disminuir el éxito de colonización por microorganismos [18], [117]–[123].

P. aeruginosa es un patógeno importante en ambientes hospitalarios a nivel mundial y considerado modelo de estudio de biopelículas. Sin embargo, un gran número de trabajos se han centrado en la formación de biopelículas por *Staphylococcus* sobre materiales para prótesis óseas debido a la prevalencia de este microorganismo en infecciones nosocomiales de países desarrollados.

Hasta la fecha los reportes de biopelículas de *P. aeruginosa* en superficies para prótesis no incluyen investigaciones en superficies recubiertas con TaN. Del mismo modo, en Venezuela no se disponen de estudios previos de la prevalencia de *P. aeruginosa* en infecciones de prótesis óseas y biopelículas sobre materiales dispuestos para ese fin.

Investigaciones de todo el mundo relacionadas al estudio de superficies de prótesis óseas colonizadas por biopelículas de *P. aeruginosa* incluyen la detección de genes de virulencia y QS mediante PCR, lo que ha permitido caracterizar cepas de origen clínico y ambiental. Entre las técnicas principalmente utilizadas para la evaluación de biopelículas en superficies para prótesis óseas se encuentran Microscopía Electrónica de Barrido para determinar la morfología y distribución de las biopelículas y Microscopía Confocal de Barrido Laser que además permite estudiar elementos específicos a través de tinciones o anticuerpos marcados. Adicionalmente, las características de viabilidad celular, cuantificación de biomasa y composición de las biopelículas también son objeto de estudio de los investigadores.

Las infecciones de *P. aeruginosa* están asociadas con significativa morbilidad y mortalidad debido a la capacidad del microorganismo de adaptarse fácilmente a cambios en el ambiente y a mecanismos de patogenicidad como la producción de biopelículas y factores de virulencia. Entre los factores de virulencia más importantes se encuentran los asociados a la célula (lectinas, exopolisacáridos o EPS, flagelo, Pili) y factores extracelulares (proteasas, fosfolipasa, citotoxina, exotoxina A, exoenzimas S y U y plicianina), los cuales actúan en la adhesión y formación de biopelículas, patogenicidad, evasión de respuesta inmune y/o resistencia a antibióticos [124].

En Latinoamérica y el Caribe, las bacterias Gram-negativas representan los aislamientos nosocomiales más comunes. Las infecciones bacterianas más prevalentes son causadas por *Acinetobacter* spp. (26%), seguido por *Pseudomonas* spp. (18%) y *Klebsiella* spp. (9%). En otros países como Estados Unidos, las infecciones nosocomiales son la sexta causa principal de

muerte. Aproximadamente 99.000 muertes se producen anualmente en este país como resultado de infecciones adquiridas en hospitales. *P. aeruginosa* representa el 11-13,8 % de estas infecciones y es la cuarta causa de infección quirúrgica (9,5 %) de acuerdo con lo reportado por el Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales de Estados Unidos [125]. Datos similares se han registrado en Europa [126].

Las infecciones quirúrgicas asociadas a implantes por biopelículas son causadas por la adhesión de bacterias a las superficies. Los sitios más comúnmente afectados en las prótesis óseas son el fémur (26%), la tibia (16%), bimaléolar (maléolo peroneo y maléolo tibial) (16%) y el húmero (8%), seguido por el radio, el cúbito y los huesos del tarso [127]. Tradicionalmente, las biopelículas se han investigado por los microbiólogos ambientales. Más recientemente, las biopelículas de interés médico han sido reconocidas por los microbiólogos clínicos y su investigación se ha convertido en uno de los campos de más rápido crecimiento microbiológico [128], considerándose una nueva ciencia llamada "Biofilmology" [129].

Capítulo II

Procedimiento Experimental

2.1 Deposición de las películas delgadas

En el presente trabajo realizamos la síntesis y caracterización de Ta, TaN y la bicapa Ta/TaN sobre sustratos de Titanio (Ti) y Acero Inoxidable Sandvik Bioline 316L (SS316LVM) utilizando la pulverización catódica RF con el propósito de utilizarlos como películas delgadas que tienen potenciales aplicaciones como implantes óseos.

2.1.1 Deposición de las películas delgadas de Ta, TaN y Ta/TaN

Un equipo de Pulverización Catódica RF (13.56 MHz - 90 W) ALCATEL DION 300, se usó para la deposición de las películas delgadas. Un vacío inicial de (5×10^{-4} Pa) se alcanzó utilizando una bomba turbomolecular y durante todo el proceso hay constante circulación de agua para asegurar la refrigeración del cátodo y el ánodo. En la cámara fueron introducidos gases de alta pureza de Argón (99.999%) y Nitrógeno (99.995%), Dos manómetros (Gefran 2400) con una precisión de 1.33×10^{-2} Pa se usaron para medir la presión parcial de N_2 y la presión total de los gases ($Ar+N_2$). Para la deposición se utilizó un cátodo de Tántalo Johnson Matthey de (99.96% de pureza) de 50 mm de diámetro y 3 mm de espesor. La distancia entre el cátodo y el ánodo es de 60 mm.

Dos tipos de sustratos fueron utilizados para realizar un estudio detallado: titanio (99.9% de pureza) y acero inoxidable sandvik bioline 316LVM. Ambos sustratos fueron preparados devastando (láminas de carburo de silicio de 120, 240 y 600) y puliendo las superficies hasta un acabado especular (paños con soluciones de alúmina con tamaño de grano de 3, 1 y 0.05 micras) y luego fueron introducidas en un baño ultrasónico durante 5 minutos a una frecuencia de 20 MHz con acetona, etanol y agua desionizada y fueron secados usando aire comprimido. Adicionalmente se realizaron deposiciones sobre láminas de vidrio portaobjetos de microscopio y Silicio orientado Si (111).

Antes de la deposición el cátodo fue limpiado con un bombardeo de Argón durante 20 minutos usando una presión de gas de 30 Pa, con el propósito de descontaminar la superficie del blanco ya que el Tántalo es un metal ávido por el oxígeno y puede sufrir procesos de oxidación o nitruración debido a anteriores deposiciones realizadas con este mismo blanco, durante esta parte del proceso el sustrato está protegido por una cubierta. Luego de fijar los parámetros previamente determinados [25], se inició el proceso de deposición de las películas delgadas, los parámetros utilizados se presentan en la tabla 2.1. Las películas de Ta se depositaron durante 30 minutos bajo una atmósfera de Ar a una presión de 6.5 Pa. Las películas delgadas de TaN se depositaron bajo el régimen de pulverización catódica reactiva con una mezcla de gases Ar/N_2 ajustando que la presión parcial de N_2 , $P_{N_2}/(P_{Ar}+P_{N_2})$ fuera del 2%. La

bicapa Ta/TaN fue depositada en dos pasos: primero se depositó la capa de TaN según las condiciones expuestas más arriba y un flujo de nitrógeno constante mientras que la presión en la cámara fue controlada durante todo el proceso. Luego sin romper el vacío se depositó la capa de Ta siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. El espesor de las capas de Ta y TaN fue de 300 nm cada una y 600 nm para la bicapa. Sobre el sustrato de vidrio se realizó una deposición de 1 μm de espesor obtenida en un tiempo de 100 minutos y deposiciones de 300 nm de espesor de Ta, TaN, y Ta/TaN sobre el silicio orientado (111).

Capa Depositada	Parámetros de Deposición				
	Presión Ar (mTorr)	$P_{\text{N}_2}/(P_{\text{N}_2}+P_{\text{Ar}})$ (%)	P_{Plasma} (W)	Espesor (nm)	Tiempo (min)
Ta/Vidrio	50		90	1000	100
TaN/Vidrio	50	2%	90	1000	100
Ta	50		90	300	30
TaN	50	2%	90	300	30

Tabla 2.1. Parámetros de deposición de las capas depositadas.

A continuación se esquematizan en la figura 2.1, las películas delgadas depositadas de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente.

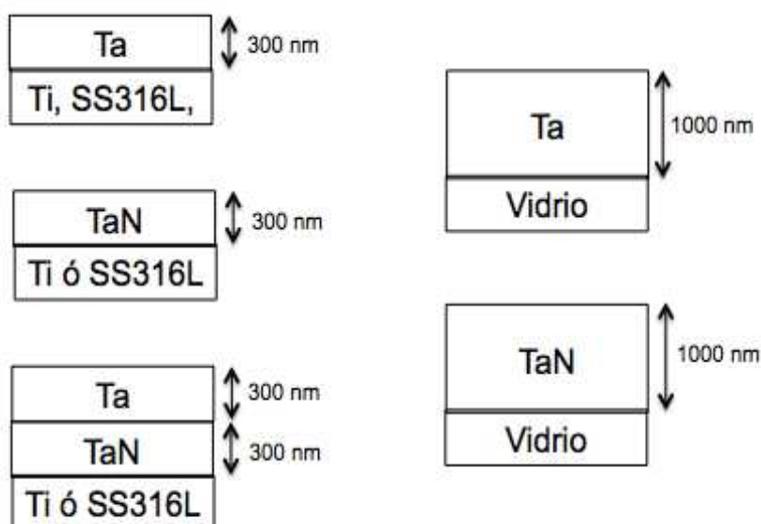


Figura 2.1. Representación esquemática de las películas delgadas depositadas.

2.2 Estudios de inmersión en fluido corporal simulado

2.2.1 Síntesis del Fluido Corporal Simulado

Para evaluar la capacidad de los recubrimientos obtenidos para formar una capa de fosfato de calcio sobre su superficie se realizaron estudios de inmersión en fluido corporal simulado (FCS). El FCS es una solución salina con una concentración similar al plasma humano. Los ensayos se realizaron a una temperatura de 37 °C, utilizando el FCS descrito por Kokubo *et al* [100], el cual tiene una composición similar al plasma humano como se muestra en la tabla 2.2.

Ión	Concentración plasma sanguíneo (mM)	Concentración Kokubo SBF (mM)
Na ⁺	142.0	142.0
K ⁺	5.0	5.0
Mg ⁺²	1.5	1.5
Ca ⁺²	2.5	2.5
Cl ⁻	103.3	148.8
HCO ₃ ⁻	27.0	4.2
HPO ₄ ⁻²	1.0	1.0
SO ₄ ⁻²	0.5	0.5

Tabla 2.2. Comparación de la concentración de iones en el plasma sanguíneo humano y en el FCS de Kokubo [100].

Para la preparación del FCS descrito por Kokubo se mezclaron en 500 ml de agua destilada los reactivos mostrados en la tabla 2.3. Los reactivos se añadieron uno por uno siguiendo el orden que aparece en la tabla 2.3 y esperando a que se disolvieran completamente antes de añadir el siguiente. La solución obtenida se llevó a un pH de 7.25 a 37 °C mediante la adición de trishidroximetilaminometano (CH₂OH)₃CNH₂ y finalmente se le añadió agua destilada hasta completar 1L de disolución.

Orden	Reactivo	Cantidad (gr/l)
1	NaCl	8.035
2	NaHCO ₃	0.355
3	KCl	0.225
4	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0.231
5	MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.311
6	HCl (1M)	39 ml
7	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.292
8	NaSO ₄	0.072
9	CNH ₂ (HOCH ₂) ₃	6.118

Tabla 2.3. Reactivos y orden de adición para la preparación del FCS de Kokubo [130].

Se realizó una evaluación cualitativa con dos tipos de FCS, el primero siguiendo la receta de la tabla 2.3 y otro adicional donde se adicionó 1.5 de K₂HPO₄ · 3H₂O (0.347 gr/l) y 1.5 de CaCl₂ · 2H₂O (0.438 gr/l) para evaluar cuál de los dos prolifera mejor la deposición de fosfato de calcio.

Se seleccionó el FCS enriquecido en 1.5 de K₂HPO₄ · 3H₂O (0.347 gr/l) y 1.5 de CaCl₂ · 2H₂O (0.438 gr/l) y las muestras fueron inmersas en vasos de precipitado con 30 ml de fluido durante tres semanas. Para evitar la formación de bacterias se cambió el fluido cada tres días y se mantuvo a 37°C en fluido estático, luego las muestras fueron lavadas delicadamente con suficiente agua desionizada para eliminar los posibles restos de sales minerales que pueden precipitar durante el período de inmersión y fueron secadas al aire a temperatura ambiente.

2.3 Cultivo Celular: Osteoblastos

Para estudiar la biocompatibilidad de las películas delgadas depositadas se trabajó conjuntamente con el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos de la Universidad Simón Bolívar para realizar el cultivo celular con osteoblastos mediante la colaboración de la Msc. Dayana de Menezes quien en su trabajo de grado de maestría realizó la extracción de osteoblastos a partir de calvaria de rata neonata (apéndice A), la evaluación de la adhesión y biocompatibilidad de discos de SS316LVM y Ti con diferentes recubrimientos (apéndice B) y se llevó a cabo el protocolo para observación mediante fluorescencia con Faloidin-FITC/DAPI (apéndice C)

2.3.1 Protocolo para la preparación de las muestras para Microscopía Electrónica de Barrido

Para poder observar las películas delgadas por microscopía electrónica de barrido para evaluar la biocompatibilidad de las mismas con los osteoblastos las muestras deben prepararse utilizando un protocolo biológico que consiste en la fijación y deshidratación de las células, como se detalla a continuación:

Fijación

- Sumergir las muestras en 2,5 Glutaraldehído en 0.1 M Buffer fosfato (Tampón Buffer Fosfato Salino PBS) pH 7,4 por 5 minutos.
- Lavar con Buffer Fosfato 0,1 M. Tres cambios de 5 minutos cada uno.
- Lavar tres veces con agua destilada. Dos cambios de 5 minutos y el último de 15 minutos.

Deshidratación

- Etanoles: Series crecientes de 50, 70, 80, 90%. Sumergir las muestras en la serie de etanoles siguiendo la escala anterior y dejar 10 minutos por una sola vez.
- Sumergir en etanol al 100% una sola vez por 30 min.
- Sumergir en el reactivo Hexamethyldisilazane (HMDS) durante 5 minutos.
- Almacenar en vacío hasta recubrir con Carbono para la posterior observación en el microscopio.

2.4 Síntesis de Películas Delgadas Mesoporosas de Sílice

Se hizo una preparación típica del sol a utilizar para depositar el recubrimiento con composición molar de 1TEOS:40EtOH:7.2x10⁻³F127:9.2H₂O:0.21HCl, para ello se siguió el siguiente procedimiento descrito por Naik *et al* [131]:

En un matraz de teflón se agregan 3.5 g de TEOS, 15.3 g de etanol, 2.45 g de agua destilada y 0.35 g de 1M de HCl en agitación constante durante 1 hora a 65 °C para formar el sol de silicato. En otro matraz de teflón se disuelven 1.6 g de F127 en 15.3 g de etanol bajo agitación a temperatura ambiente para formar la solución del co-polímero tri-bloque. La solución que se utilizó para realizar la deposición se sintetizó mezclando el sol de silicato en la solución del co-polímero tri-bloque bajo agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. El sol final fue utilizado para depositar películas de sílice mesoporosa sobre sustratos de Titanio utilizando un “spin coating” casero. Se utilizaron varias condiciones de centrifugación para evaluar el efecto de esta condición en la homogeneidad y porosidad de la película depositada, en la tabla 2.4 se detallan las condiciones utilizadas.

Película	r.p.m	ml
1	3000	1
2	3000	2
3	4000	1
4	4000	2
5	5000	1
6	5000	2

Tabla 2.4. Condiciones de Síntesis por “spin coating” de las películas de Sílice mesoporosa depositadas sobre sustratos de Ti.

2.5 Ensayos de Biopelículas

La metodología para la evaluación de la formación de biopelículas sobre los dos sustratos y las diferentes películas delgadas depositadas se realizó en el laboratorio de fisiología gastrointestinal del Centro de Biofísica y Bioquímica del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas cuyo desarrollo detallado se encuentra en [132], trabajo realizado por la MSc Ana Gutiérrez. Se inició con el cultivo bacteriano de la cepa de referencia *P. aeruginosa* ATCC 10145 que fue utilizada en este estudio y seleccionada del listado disponible de cepas del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM, nro. 625, Caracas) de acuerdo con las características típicas de esta especie. Se evaluó la cinética de crecimiento de la cepa *P. aeruginosa* ATCC 10145 determinada por densidad óptica (DO) y conteo de células viables utilizando el colorante fluorescente cloruro de 5-ciano-2,3-ditolil tetrazolio (CTC; Polysciences, Inc.). A partir de colonias de las cepas *P. aeruginosa* ATCC 10145, CVCM 937 y LG Roraima incubadas a 37 °C por 12 h en agar cetrimide, se realizó la extracción de ADN cromosómico utilizando el kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para comprobar la presencia de ADN bacteriano se amplificó el gen 16S ARNr de eubacterias por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los cebadores 8F y 1525R. La presencia de genes de virulencia, biopelículas y QS se determinó mediante PCR de una ronda utilizando ADN molde de *P. aeruginosa* ATCC 10145 y juegos de cebadores específicos para cada gen. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis (100 V por 40 min) en gel de agarosa al 2 % p/v en tampón tris-borato 0,5 X (TBE), observándose por transiluminación a través de una lámpara de UV. Las superficies de SS, Ti, SS/Ha y Ti/Ha fueron sintetizadas para tres períodos de estudio (24 h, 96 h y 7 d), a diferencia de las superficies Ti-Ta y Ti-TaN que por razones de disponibilidad de los materiales sólo fueron preparadas para dos tiempos (24 y 96 h). Las superficies fueron esterilizadas mediante irradiación en una fuente de Cobalto- 60 emisora de rayos gamma a una dosis mínima de 18 KGy en un irradiador JS-9500 (MDS Nordion, Canadá) ubicado en la Planta PEGAMMA del IVIC.

2.5.1 Ensayo *in vitro* de formación de biopelículas

El inóculo se preparó a partir de *P. aeruginosa* ATCC 10145 crecida en agar LB por 12 h. Se tomaron varias colonias con un hisopo y se resuspendieron en caldo LB, ajustando la turbidez del cultivo espectrofotométricamente a $DO_{600}=0,035$. Se colocaron 3 mL de este inóculo en pozos de placas de microtitulación (placas de 24 pozos) que contenían las superficies individuales. Se incubó a 37°C por 24-96 h para las superficies de Ta y TaN y por 24 h, 96 h y 7 d para las superficies de SS, Ti, SS/Ha y Ti/Ha.

Los controles de las superficies se sumergieron en caldo LB sin inóculo bacteriano y se incubaron por 24 h, 96 h y/o 7 d. Adicionalmente, se sirvió en una placa de 12 pozos caldo LB sin inóculo ni superficie como control de esterilidad del medio de cultivo.

Se utilizaron un total de 304 superficies, 128 para controles y 176 para la

formación de biopelículas. Fueron empleadas 3 réplicas de cada superficie para la cuantificación de biomasa, 3 réplicas para la cuantificación de polisacáridos, 3 réplicas para los ensayos de viabilidad y 2 réplicas para la observación por Microscopía Electrónica de Barrido.

Se determinó la viabilidad directamente en las biopelículas formadas sobre las superficies utilizando la tinción CTC. Al finalizar cada tiempo de incubación, 2 réplicas de cada superficie fueron retiradas de los cultivos y 2 réplicas de los controles fueron retiradas del medio LB, lavadas tres veces con PBS e inmersas en glutaraldehído al 2,5 % a 4°C hasta la preparación de estas muestras para MEB. Imágenes representativas fueron tomadas a partir de 10 posiciones aleatorias en cada superficie. También se realizó la cuantificación de biomasa en las biopelículas y Producción de polisacáridos, proteínas y ADN en las biopelículas. En la observación por microscopía de fluorescencia se evidenciaron dos patrones en la distribución de los marcadores de polisacáridos, proteínas y ADN total. Las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia para los ensayos de viabilidad y producción de polisacáridos fueron analizadas utilizando el software ImageJ (versión 1.48v). Se estudió la viabilidad celular para lo cual las microfotografías tomadas con filtro triple (RGB, por sus siglas en inglés RED-GREEN-BLUE) fueron divididas en tres canales (rojo, verde y azul); imágenes en rojo fueron utilizadas para el análisis de células viables. Además se evaluó la producción de polisacáridos, proteínas y ADN y la producción de piocianina y se realizó el análisis estadístico para los datos de viabilidad celular, producción de biomasa, polisacáridos, proteínas y ADN, así como piocianina,

El análisis de las micrografías obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido de las los dos sustratos y las diferentes películas delgadas depositadas se realizó en el Laboratorio de Materiales del Centro de Ingeniería de Materiales y Nanotecnología del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas y es el principal objeto de estudio en este trabajo.

2.6 Técnicas de Caracterización

Las diferentes películas delgadas depositadas fueron caracterizadas desde el punto de vista estructural, morfológico, químico y mecánico por diferentes técnicas de caracterización tales como Difracción de Rayos X, Microscopía Electrónica de Barrido, Microscopía de Fuerza Atómica, Espectroscopía IR, Espectroscopía de fotoelectrones de Rayos X y Nanoindentación.

2.6.1 Difracción de Rayos X (DRX)

La caracterización estructural de las fases cristalinas obtenidas se realizó utilizando radiación de Cu K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) mediante un equipo PANalytical X-Pert Pro MPD operando a 45 kV y 30 mA. Adicionalmente las películas delgadas sintetizadas fueron caracterizadas por Difracción de Rayos X de incidencia rasante con un difractor PANalytical X-Pert MRD θ -2 θ , operando a 45 kV y 20 mA con un ángulo de 7° y una penetración estimada de

250 nm. Para el procesamiento de los datos de los difractogramas, se utilizó el programa PANalytical X-Pert HighScore Plus®. Este programa permitió reducir el ruido de fondo de la intensidad, suavizar, localizar e identificar los picos de intensidad en su respectivo ángulo de difracción 2θ . La identificación de las fases cristalinas se realizó utilizando la base de datos PDF del ICDD.

2.6.2 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

La observación de la microestructura de los materiales se ha realizado mediante dos microscopios electrónicos de emisión de campo de alta resolución un HITACHI S4800 y un FEI Inspec F50. Estas observaciones se combinaron con los análisis de EDS (Espectrometría de Rayos X por dispersión en la energía). Se tomaron micrografías de electrones secundarios para observar microestructura y electrones retrodispersados para distinguir diferencias cualitativas en composición de la superficie de las películas delgadas depositadas.

2.6.3 Microscopía de Fuerza Atómica (MFA)

La evaluación de la microestructura de la superficie de las películas depositadas se realizó utilizando un microscopio de fuerza atómica Agilent 5500 en modo: contacto intermitente (tapping mode) haciendo diferentes barridos sobre la superficie tomando la imagen topográfica y obteniendo a partir de las mismas los valores de rugosidad de las películas delgadas sintetizadas.

2.6.4 Espectroscopia Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

Utilizando la espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier se caracterizó estructuralmente la Hidroxiapatita depositada sobre las películas delgadas sintetizadas, para ello se raspó este deposito de la superficie de las películas anteriormente inmersas en el fluido corporal simulado y el polvo obtenido se mezcló con bromuro de potasio y se colocó en una prensa a fin de obtener un disco fino transparente para ser colocado en el portamuestra de un equipo marca Perkin Elmer modelo FTIR SPECTRUM 100 para obtener los espectros de infrarrojo.

2.6.5 Espectroscopía de Fotoelectrones de Rayos X (XPS)

La composición de las especies químicas en la superficie fue evaluada utilizando un equipo ESCALAB 250 (Thermo Electron). La fuente de Rayos X utilizada fue un haz monocromático de Al $K\alpha$ (1486.6 eV) y la superficie analizada fue de 400 μm de diámetro. La señal de fondo fue eliminada usando el método de Shirley [133]. Las concentraciones atómicas de las especies químicas presentes en la superficie analizada fueron determinadas a partir del

área de los picos usando factores atómicos de sensibilidad reportados por Scofield [134]. Las energías de enlace de todos los niveles están referidas al enlace C-C del carbón C1s con una energía de 284.8 eV.

2.6.6 Nanoindentación

Mediciones de nanoindentación se realizaron en algunas de las películas depositadas utilizando un equipo BRUKER NANO CETR - APEX. Se utilizó un indentador piramidal de diamante tipo Berkovich con un radio de curvatura de aproximadamente 250 nm. La caracterización se llevo a cabo con una carga controlada, en donde se aplica la carga cuadráticamente con el tiempo para alcanzar el pico de carga dentro de los 5 segundos, seguido de la descarga de 10 % de la carga. Los ciclos de descarga parcial múltiple (LMPU) se repitieron 9 veces con el aumento progresivamente los picos de carga de 0,1 mN a 5 mN. El método de la pendiente de descarga se ha aplicado a cada ciclo de descarga parcial para determinar el módulo de elasticidad y la dureza.

Capítulo III

Síntesis de Películas Delgadas de Ta, TaN y Ta/TaN

En este capítulo presentaremos y discutiremos los resultados obtenidos en la síntesis y caracterización de las películas delgadas depositadas de Ta, TaN y Ta/TaN sobre los sustratos de SS316LVM y Ti.

Estas películas han sido depositadas sobre sustratos metálicos de SS316LVM y Ti para desarrollar una superficie más bioactiva y biocompatible comparados con los sustratos de SS316LVM y Ti, metales usados comúnmente en los implantes óseos. El Ta y TaN se presentan como materiales prometedores por sus características bioactivas y sus propiedades químicas interesantes que promueven la osteointegración, pero el Ta presenta un inconveniente que es su alto costo, sin embargo las propiedades de un biomaterial están determinadas por sus propiedades superficiales por lo que al depositar una película delgada sobre los metales ya utilizados presenta un desarrollo en la deposición de superficies bioactivas a través de la modificación superficial usando la técnica de pulverización catódica RF donde se estudia la influencia del sustrato sobre la estructura, morfología y topografía de la capa depositada para analizar posteriormente su bioactividad, biocompatibilidad y actividad antibacterial.

3.1 Los sustratos

Las películas delgadas de Ta, TaN y Ta/TaN fueron depositadas sobre sustratos de Acero Inoxidable Bioline Sandvik 316LVM (SS316LVM de 10 mm de diámetro) y Titanio (Ti de 12 mm de diámetro y 99.9% de pureza) y Los sustratos fueron preparados hasta un acabado especular y lavados en baño ultrasónico con agua desionizada, acetona y etanol y secadas bajo aire comprimido, como ya fue descrito en el capítulo 2 sección 2.1.1.

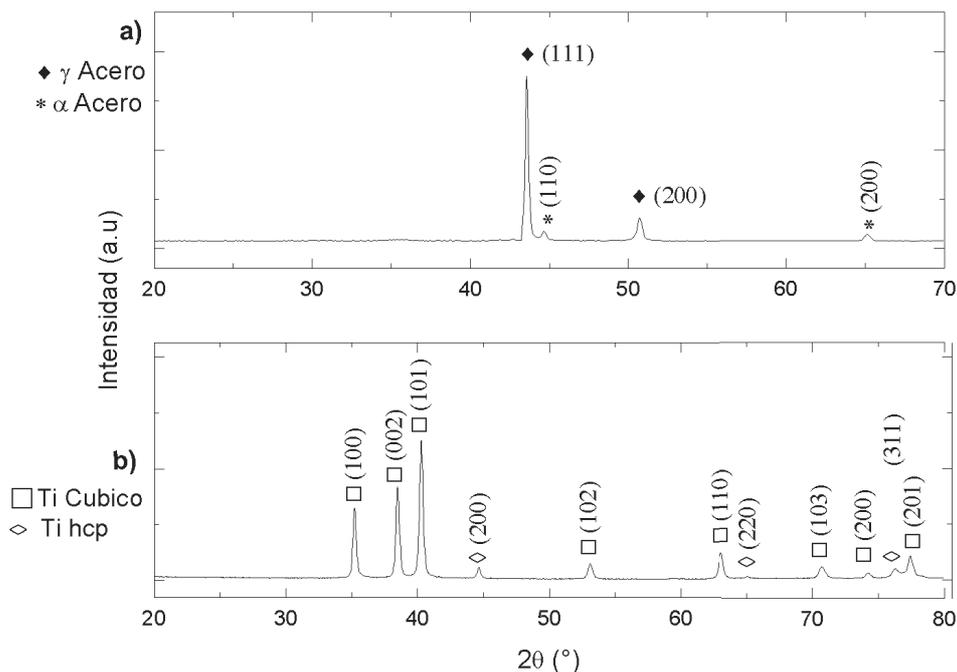


Figura 3.1. Difractograma de los sustratos a) SS316LVM b) Ti.

En la figura 3.1, se muestran los difractogramas correspondientes a los dos sustratos utilizados. Para el SS316LVM se encuentra una mezcla de la fase γ -Fm3m y α -Im3m, identificados con las fichas cristalográficas [JCPDS 33-0945] y [JCPDS 35-1375] respectivamente. En el Ti fueron identificadas una mezcla de las fases hexagonal (P6₃/mmc) [JCPDS 44-1294] y cúbica (Fm3m) [JCPDS 88-2321].

3.2 Deposición de las Películas Delgadas de Ta, TaN y Ta/TaN

Las películas delgadas de Ta, TaN y Ta/TaN fueron depositadas siguiendo las condiciones experimentales detalladas en el capítulo 2 en la tabla 2.1. Las diferentes películas estudiadas se detallan en la tabla 3.1.

Películas Delgadas	Estructura	
	Ta	Ta (300 nm)/SS316LVM
TaN	TaN (300 nm)/SS316LVM	TaN (300 nm)/Ti
Ta/TaN	Ta (300 nm)/TaN (300 nm)/SS316LVM	Ta (300 nm)/TaN (300 nm)/Ti

Tabla 3.1. Diferentes Películas Delgadas Depositadas.

3.2.1 Microestructura de las Películas Delgadas Depositadas

La observación de las diferentes secciones transversales se pueden ver en la figura 3.2, las películas depositadas presentan un crecimiento tipo columnar y en algunos casos se observan grietas que pueden ser atribuidas a tensiones residuales de las capas depositadas [135], [136].

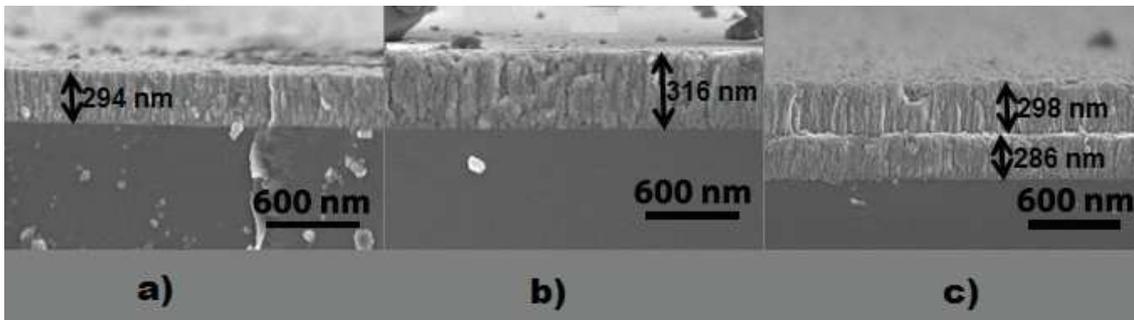


Figura 3.2. Micrografías de las secciones transversales de las Películas Delgadas depositadas sobre Si: a) Ta/Si b) TaN/Si y c) Ta/TaN/Si.

En las micrografías de la figura 3.2 además se observa que el crecimiento columnar ocurre en dos etapas compuestas primero por finas columnas, paso que es seguido por la formación de columnas de sección más grande, la primera etapa ocurre próxima a la superficie del sustrato donde los átomos depositados forman enlaces más fuertes con el sustrato que los enlaces que forman entre sí, pero cuando esta primera capa es sometida al esfuerzo elástico debido a por ejemplo un desajuste entre la red del sustrato y la red de la capa depositada, particularmente encontramos que la película de α -Ta depositada sobre el sustrato de SS316LVM presenta una orientación preferencial en el plano (110) esto implica un desajuste con el plano (111) del SS316LVM de alrededor de 14%, lo que podría explicar la delaminación observada en algunas películas de Ta depositadas sobre S316LVM ya que se genera una tensión, a medida que se van depositando nuevas capas a partir de la llegada de nuevos átomos, dicha tensión aumenta entre ellas y estos granos coalescen y se da lo que es similar al crecimiento tipo isla [114].

El mecanismo de crecimiento tipo columnar que siguen estas películas está en concordancia con el modelo propuesto por Movchan y Demchisin [27] y Thornton [28], [29], el cuál se discute de manera general en la sección 1.3.2. Considerando la presión y la temperatura escogidos para sintetizar las películas delgadas bajo estudio en este trabajo ($T = 298 \text{ K}$, $P = 6.5 \text{ Pa}$), las capas depositadas de Ta, TaN y Ta/TaN siguen el crecimiento descrito en la zona 1 (figura 1.4), con una estructura columnar y se observa porosidad entre dichas columnas (ver figura 3.2). Un esquema de cómo crecen las películas se muestra en la figura 3.3 y se discute etapa a etapa el proceso.

Durante la primera etapa de la formación de películas delgadas sintetizadas por pulverización catódica los átomos llegan a la superficie con una baja

energía, de unos pocos eV. Ocurren dos procesos competitivos uno donde hay una fuerte interacción con la superficie donde los átomos pierden energía hasta alcanzar el equilibrio térmico con la superficie y quedan adsorbidos y un proceso donde la interacción es débil donde los átomos ceden una parte de su energía a la red y no se adsorben sino que ocurre un proceso de colisión inelástica [137]. Luego, los átomos adsorbidos vibran con la red a una misma frecuencia lo que puede llevar a la difusión de los átomos y eventualmente también pueden ser desorbidos. En todo este proceso el átomo que está siendo depositado cede energía al sustrato, la energía necesaria para que se active el proceso de desorción o difusión en la superficie.

El proceso de adsorción es muy frecuente cuando la superficie se encuentra en presencia de un gas a cierta presión, las moléculas de dicho gas chocan contra la superficie interactuando con ella. Lo que ocurre a continuación es que dependiendo de la naturaleza del gas existirán dos interacciones [114], una débil gobernada por las interacciones de Van der Waals donde lo que ocurre es una adsorción física o fisisorción, se da en gases inertes y moléculas con momento dipolar cero. La otra interacción está gobernada por la existencia de cierta afinidad química entre las moléculas del gas y los átomos de la superficie, dando origen a una interacción más fuerte de tipo electrónico, esta recibe el nombre de adsorción química o quimisorción pero se debe entender que no se está hablando de formaciones de compuestos sino de un pequeño enlace energéticamente más fuerte que el que ocurre en la fisisorción. Ambos procesos ocurren a medida que los átomos o moléculas se acercan a la superficie primero experimentando la atracción debida a la fuerza de Van der Waals que es de mayor alcance y luego a las de tipo químico con formación de los enlaces.

Cuando los átomos son incorporados a la superficie el proceso de difusión coexiste y compite con el proceso de adsorción/desorción en estos procesos el parámetro más importante es la temperatura. A altas temperaturas se favorece la difusión y la desorción por lo que se querrá controlar la temperatura del sustrato, en nuestro caso no se realiza calentamiento adicional del sustrato. El cátodo y el ánodo se mantienen bajo constante refrigeración durante el proceso de síntesis para favorecer la incorporación y esto puede lograrse manteniendo controlada y baja la temperatura. Si se quiere formar una capa continua esto se verá favorecido por una alta energía de llegada de los átomos donde se favorezca el proceso de adsorción y una temperatura suficientemente baja del sustrato llevarán a que el número de átomos incorporados a la superficie sea igual al número de átomos incidentes en la superficie, a altas temperaturas del sustrato no se favorecerá la formación de una capa continua ya que el número de átomos incidentes es mayor que el número de átomos incorporados pero este problema es posible de solucionar en procesos de pulverización ya que los átomos pueden alcanzar posiciones en la superficie no expuestas al flujo directo de los gases. En estos casos, la velocidad con que ocurre la pulverización permite obtener películas con un espesor más homogéneo e incluso con gran grado de cristalinidad.

Los efectos de la temperatura del sustrato en las propiedades de la película delgada sintetizada han sido ampliamente estudiados en la literatura Liu *et al*

[138] encontraron que las propiedades mecánicas de las películas de TaN se veían fuertemente influenciadas por la cristalinidad de la capa depositada lo que a su vez está afectado por la temperatura del sustrato al llevar a cabo la deposición, encontrando que la dureza disminuye al aumentar la temperatura del sustrato. A altas temperaturas la movilidad de los átomos y las interacciones ion-sólido que tienen lugar cerca de la superficie de crecimiento activo son intensificadas. Durante el proceso de deposición, una mayor temperatura del sustrato aumenta la movilidad de átomos, y promueve el crecimiento de estructuras empaquetadas cerca de las condiciones de equilibrio termodinámico. En este caso lleva a la mejora de la unión entre Ta y N, y la disminución de los defectos tales como dislocaciones o apilamientos. Mientras tanto la nucleación de granos aumenta, el crecimiento del grano es más ordenado en ciertas direcciones. El aumento de la temperatura conduce a un crecimiento de grano, movilidad de las dislocaciones, y una mayor difusión entre las películas y los sustratos.

La cristalinidad también se ve afectada por el parámetro temperatura, en numerosos estudios se ha reportado que bajo condiciones experimentales que no incluyen calentamiento adicional del sustrato en películas de Ta sintetizadas por pulverización catódica la fase β -Ta crece preferiblemente [44], [45], [47], [139], [140]. Gladczuk *et al* [47] reportan que al depositar películas de Ta a temperatura ambiente obtienen la fase β -Ta mientras que si calientan el sustrato comienzan a obtener una mezcla de fases $\beta + \alpha$ y por encima de 400°C solo obtienen la fase α -Ta. Esto debido al aumento de la movilidad de los átomos que van llegando en la superficie ya que la condensación de los átomos en sustratos fríos resultará en la deposición de fases metaestables desordenadas, cuando se aumenta la temperatura se favorece la deposición de la fase más ordenada α -Ta. También otro parámetro a considerar es el espesor, a mayores espesores se favorece la deposición de α -Ta debido a que ocurrirá la nucleación y se formaran grandes islas que coalesceran para luego expandirse y crecer formando una película delgada policristalina.

Particularmente en nuestro trabajo no se realiza calentamiento adicional del sustrato y tal como lo reporta la literatura nuestras películas cristalizan en la fase β -Ta, además el espesor estudiado (300 nm) también contribuye a obtener esta fase cristalina. De acuerdo con las propiedades mecánicas nuestros resultados están en concordancia con lo reportado por Liu *et al* [138] ya que nuestros valores de dureza están por debajo de los reportado para el Ta y el TaN, una posible explicación para ello puede atribuirse al alto porcentaje de Oxígeno presente en la composición de nuestras películas tal y como ha sido reportado.

Durante la segunda etapa una vez que se forma la primera capa, los nuevos átomos que van llegando se incorporan a la microestructura mediante procesos de difusión superficial y de adsorción, igual que ocurre en las etapas iniciales, pero también se pueden presentar nuevos procesos como la difusión a lo largo de los bordes de grano o bien hacia el interior para llenar poros y vías que se han podido formar [114], por la colisión con otras especies adsorbidas, crecen como islas, se forman los granos de coalescencia y se forma la estructura que conocemos como columnar. En la segunda etapa de formación de la película,

los granos más grandes se unen a expensas de granos más pequeños creciendo perpendicular al sustrato, lo que lleva a la formación de la estructura columnar [34], [141].

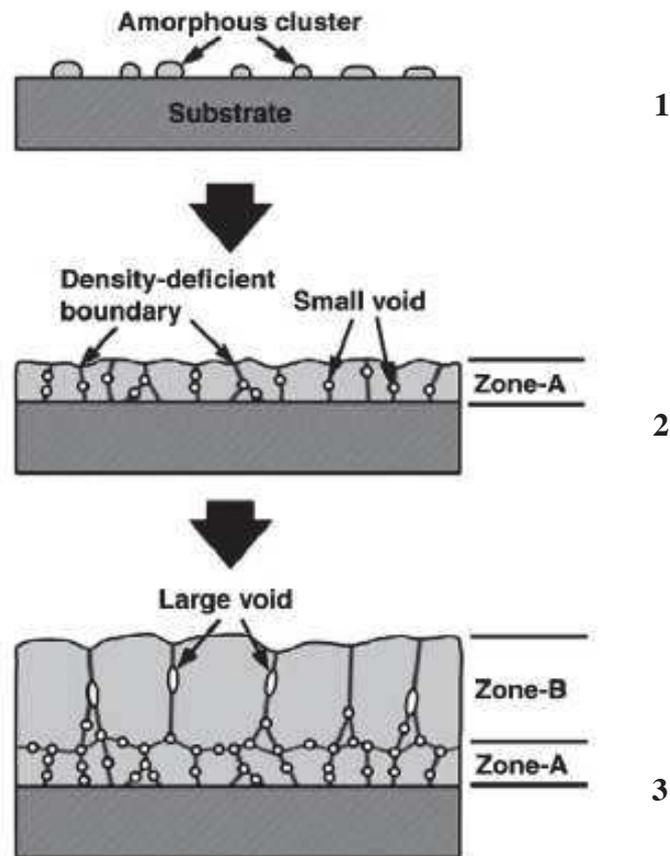


Figura 3.3. Microestructura de las Películas Delgadas depositadas:
1. Nucleación 2. Crecimiento y Coalescencia 3. Crecimiento Columnar. [141]

3.2.2 Estructura Cristalina de las Películas Delgadas Depositadas

Con el propósito de comprender que estructura cristalina poseen las películas delgadas depositadas se hizo una comparación de los difractogramas obtenidos para cada una de las capas depositadas sobre diferentes sustratos usando alto ángulo (DRX convencional) e incidencia rasante. Se estudiarán las películas de Ta y TaN depositadas en sustratos de láminas de vidrio (portaobjetos de microscopia óptica) considerando que debido a la naturaleza amorfa del sustrato obtendremos información importante acerca de las cristalinidad de las capas depositadas.

En la figura 3.5a) se puede observar que en la película de Ta depositada en el

sustrato de vidrio (Ta/Vidrio con 1 μm de espesor) sólo hay dos reflexiones presentes en 37.13 y 66.58 2θ , estas reflexiones están asociadas a una fase de β -Ta tetragonal identificando los planos (330) y (720) de la ficha cristalográfica (JCPDS 25-1280). Para el Ta/SS316LVM (300 nm de espesor) se pueden distinguir claramente las reflexiones del sustrato policristalino y una única reflexión correspondiente al Ta asignada al plano (110) de la fase α -Ta cúbica (figura 3.5b). Para la película depositada sobre Ti (Ta/Ti 300 nm de espesor) que se encuentra en la figura 3.5c), las reflexiones características del sustrato de Ti están presentes. Adicionalmente se pueden distinguir dos reflexiones de baja intensidad que fueron identificadas como TiO teniendo en cuenta que es natural que se forme una capa de óxido sobre la superficie del Ti ya que este metal es conocido por ser ávido por el Oxígeno y se puede ver una región entre 35.10 - 38.20 2θ donde hay un pico muy ancho donde se encuentran varias reflexiones correspondientes a la fase β -Ta identificada anteriormente y por las características de la reflexión decimos que es una fase nanocrystalina. Se realizaron observaciones con MET (figura 3.4) y se observó la naturaleza nanocrystalina de esta fase embebida en una matriz amorfa. Por lo tanto como ha sido reportado en numerosos trabajos [40], [43], [44], [140] la orientación cristalográfica de las películas delgadas de Ta depende fuertemente del sustrato y el espesor de las capas depositadas, se obtuvo β -Ta en los sustratos de vidrio y Ti y sobre el SS316LVM se formó la fase α -Ta.

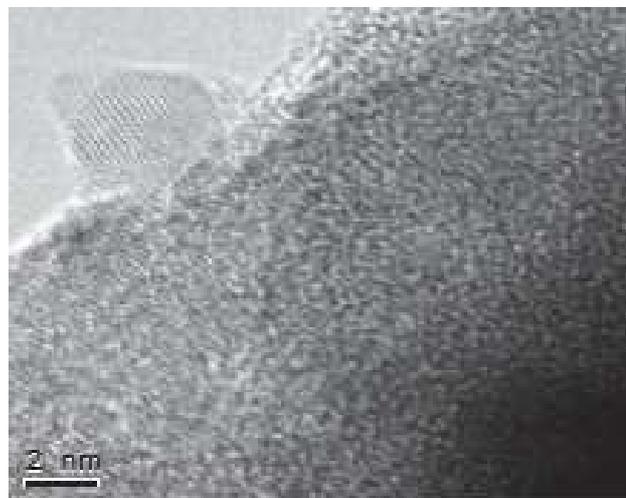


Figura 3.4. Micrografía TEM de la película de Ta depositada sobre SS316LVM.

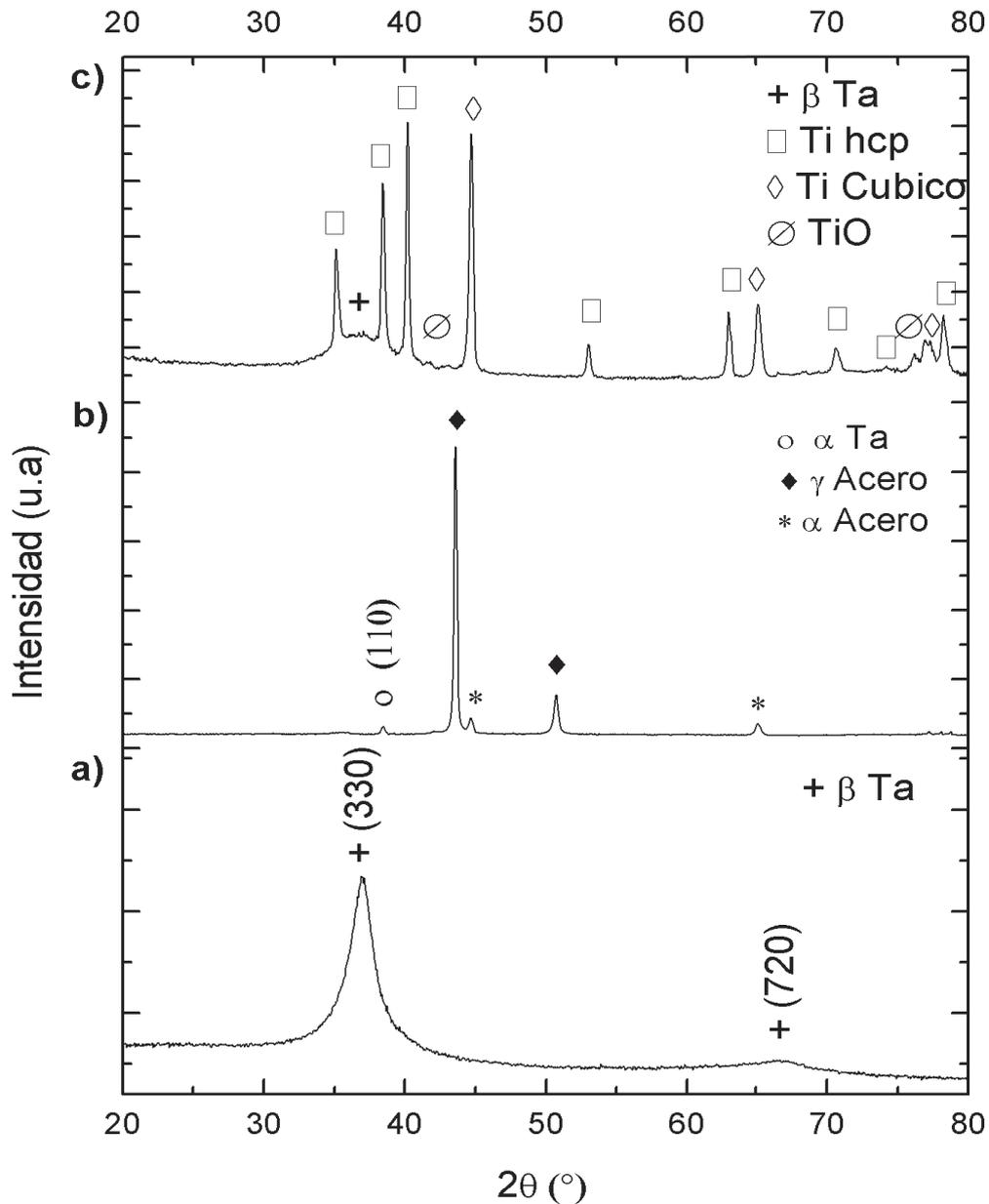


Figura 3.5. Difractograma de alto ángulo de la película de Ta depositada sobre diferentes sustratos a) Vidrio b) SS316LVM c) Ti.

En la figura 3.6 observamos la película de TaN depositada en los diferentes sustratos Vidrio, SS316LVM y Ti en todos los casos se formó la fase cúbica de este compuesto (Fm3m) identificada con la ficha [JCPDS 049-1283]. En la figura 3.6a), se encuentra el difractograma correspondiente a TaN/Vidrio donde se observa que presenta una orientación preferencial en el plano (200). El parámetro de red de esta película sobre los tres sustratos fue calculado usando el programa celref y se obtuvieron los siguientes resultados para TaN/SS316LVM 4.30 Å, 4.32 Å para TaN/Ti y sobre vidrio 4.33 Å.

Al depositarse el TaN sobre los diferentes sustratos se identificó mediante el análisis de los patrones de difracción de rayos x que la fase cristalina correspondiente es la cúbica identificada con la tarjeta [JCPDS 049-1283], pero al calcular el parámetro de red se observa que hay una variación en los valores sobre cada sustrato. Esta variación en el parámetro de red podría ser debido a la tensión de compresión residual. En métodos de síntesis de bombardeo iónico como lo es la pulverización catódica se puede generar la presencia de tensiones residuales en la deposición de películas delgadas de metales de transición [142]–[144], la variación de la tensión residual se atribuye a una disminución de la energía de los átomos expulsados desde la superficie objetivo (“target”), lo cual está directamente relacionado con la presión parcial de gas en la cámara en este caso la presión parcial de Nitrógeno. De hecho, cuando el contenido de nitrógeno en el plasma aumenta, el número de colisiones entre el material bombardeado y el gas se vuelve importante y los iones llegan a la superficie del sustrato con bajo consumo de energía, por lo que la variación en el parámetro de red puede explicarse por el efecto de los esfuerzos de compresión que pueden inducir una deformación de la malla, es decir, una reducción de las distancias interplanares y por lo tanto del parámetro de red debido a la diferencia entre el sustrato y la película depositada.

La película de TaN depositada sobre vidrio presenta orientación preferencial en el plano (200) (figura 3.6a). Que una película delgada presente orientación preferencial depende de muchos factores, por ejemplo la concentración de nitrógeno como ha sido reportado anteriormente [34], [40], [47], [145]. Sin embargo se ha encontrado que no hay una tendencia clara en los resultados. Por ejemplo Bernoulli *et al* [40], reportan que obtienen la formación de un TaN amorfo para bajos porcentajes de flujo de nitrógeno (10%) y TaN cristalino para valores mayores de dicho flujo. Para valores entre el 20-40% encuentran una orientación preferencial en el plano (200) y para valores (<45%) una orientación preferencial en el plano (220). Nie [145] y Gladczuk [47] reportan orientación preferencial en el plano (200) para bajos porcentajes de flujo de nitrógeno (<8%) y en el plano (111) para concentraciones mayores de N₂. Por otro lado Fréty *et al* [34] reportan fluctuaciones en la orientación preferencial con la concentración de nitrógeno. Para concentraciones del 2% se obtuvo orientación preferencial en el plano (111) cambiando al (200) para concentraciones entre 3.8 y 5.7%, para un 7.3 % la orientación preferencial se encontraba en el plano (111) y (200) para concentraciones mayores. Estas discrepancias pueden ser atribuidas al complejo proceso de síntesis por pulverización catódica considerando la presión real de nitrógeno en la cámara y las diferentes condiciones experimentales.

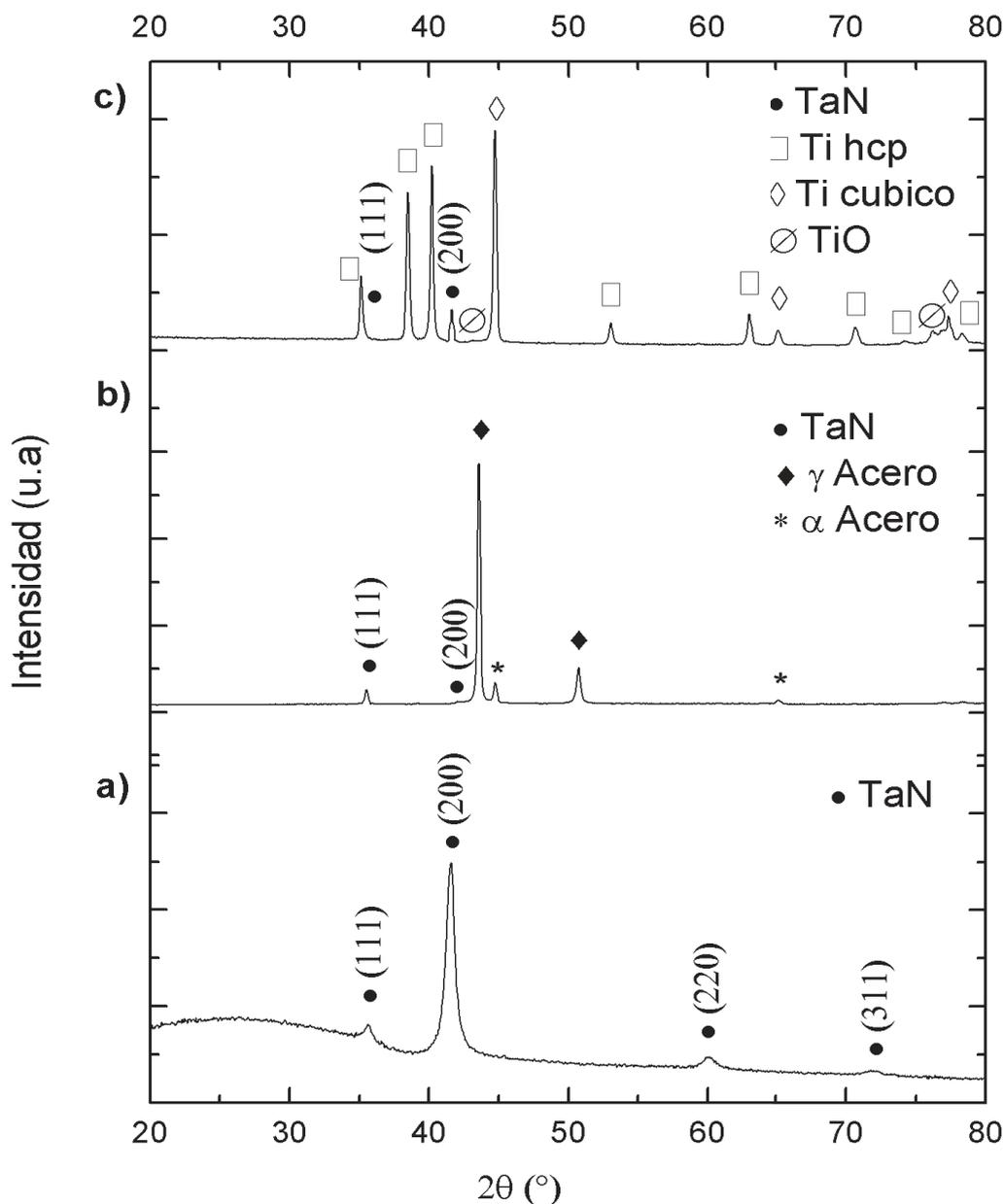


Figura 3.6. Difractograma de alto ángulo de la película de TaN depositada sobre diferentes sustratos a) Vidrio b) SS316LVM c) Ti.

Los difractogramas de las bicapas depositadas se muestran en la figura 3.7. Para Ta/TaN/SS316LVM mostrado en la figura 3.7a), se observan las reflexiones correspondientes al sustrato y dos reflexiones correspondientes al TaN cúbico (Fm3m) correspondientes a los planos (111) y (200) y la presencia de una mezcla de las fases α y β Ta con reflexiones en las siguientes posiciones 2θ 36.28 (410), 37.39 (330), y 39.24 (212) para la fase β -Ta y 38.50 (110) para la fase α -Ta. En la figura 3.7b), la película depositada sobre Ti, Ta/TaN/Ti presenta las reflexiones del sustrato de Ti y los planos (111) y (200) del TaN cúbico, una región que abarca desde 33.50 - 39.50 2θ con una

reflexión muy ancha asociada a la fase β -Ta ($P4_2/mnm$) nanocristalina. Varios autores han reportado la formación de la fase α -Ta, β -Ta o una mezcla de ambas cuando se deposita Ta sobre una capa de TaN [46], [47] dependiendo de la concentración de nitrógeno o la naturaleza del sustrato [33]. En nuestro estudio estamos usando una concentración de nitrógeno del 2%, de acuerdo con lo reportado en la literatura para bajas concentraciones de N_2 se obtiene una película delgada de β -Ta nanocristalina.

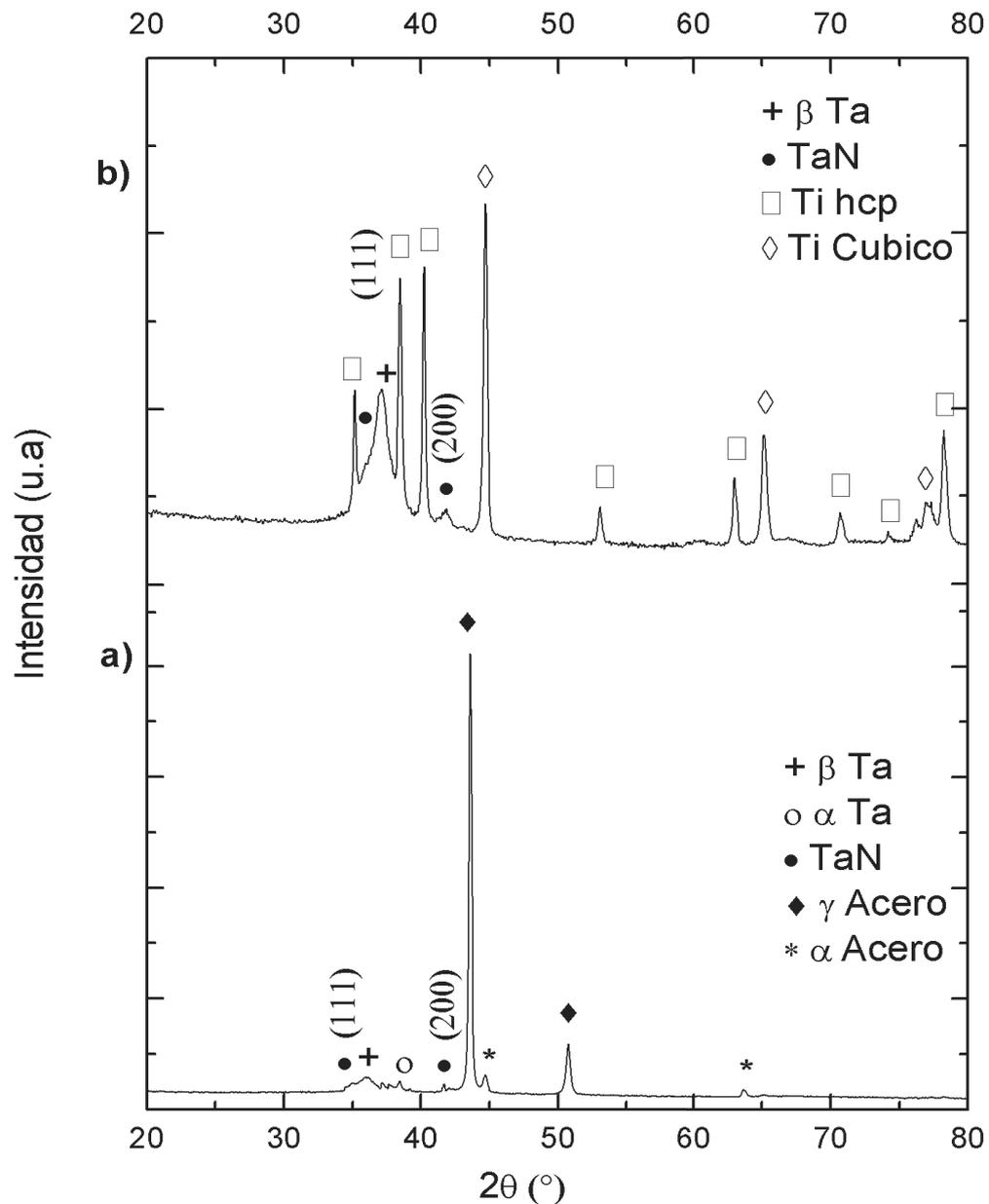


Figura 3.7. Difractograma de alto ángulo de la bicapa Ta/TaN depositada sobre diferentes sustratos a) SS316LVM b) Ti.

Para poder analizar con más detalle la cristalinidad de las películas delgadas depositadas se analizaron las muestras utilizando Difracción de Rayos X con incidencia rasante para tratar de atenuar la contribución del sustrato en la intensidad de las reflexiones obtenidas en los difractogramas.

Los difractogramas de las diferentes películas depositadas sobre SS316LVM se muestran en la figura 3.8. En la figura 3.8a), se observa una ancha reflexión en la región de $30.50 - 42.30 2\theta$ que se atribuye a la fase tetragonal β -Ta. es importante señalar que cuando se analizó esta misma película con DRX de alto ángulo la fase identificada fue la cúbica α -Ta ya que la reflexión fue identificada con el plano (110) de esta fase ubicado en la posición $38.50 2\theta$, este resultado se puede interpretar considerando que la fase α -Ta se forma en las primeras columnas de la capa depositada con una orientación preferencial en el plano (110) pero debido al desajuste entre el sustrato y la capa depositada (aproximadamente 14%), ésta no es coherente, a medida que aumenta el espesor se forma sobre la fase α -Ta, la fase β -Ta tetragonal que no está influenciada por el esfuerzo generado por la red cristalina del sustrato, considerando que la penetración aproximada del haz de rayos X rasante es de 250 nm.

De estas observaciones podemos concluir que la fase α -Ta ($Im3m$) se forma primero con gran tensión, y a medida que aumenta el espesor se forma sobre esta la fase β -Ta tetragonal. La adherencia de esta película al sustrato es muy pobre y se observó en algunos casos delaminación como consecuencia del gran esfuerzo residual. Esto ha sido observado por Gladczuk *et al* [47] quienes reportan que la integridad de la película puede verse afectada por la presencia de una mezcla de fases α y β (figuras 3.5b), 3.7a) y 3.8a) y solucionan el problema calentando el sustrato a 400°C . Además también se ha reportado que la deposición de una capa α -Ta se consigue depositando previamente una delgada capa de TaN [40], [46], [146].

Los difractogramas correspondientes a las películas TaN/SS316LVM y Ta/TaN/SS316LVM se presentan en la figura 3.8b) y 3.8c) respectivamente. Para TaN/SS316LVM se observan las reflexiones (111) y (200) identificadas para la fase TaN cúbica y en el caso de la bicapa Ta/TaN/SS316LVM también se observan estas reflexiones y una reflexión ancha en la región entre $31.00 - 40.00 2\theta$ correspondiente a la fase β -Ta tetragonal nanocristalina.

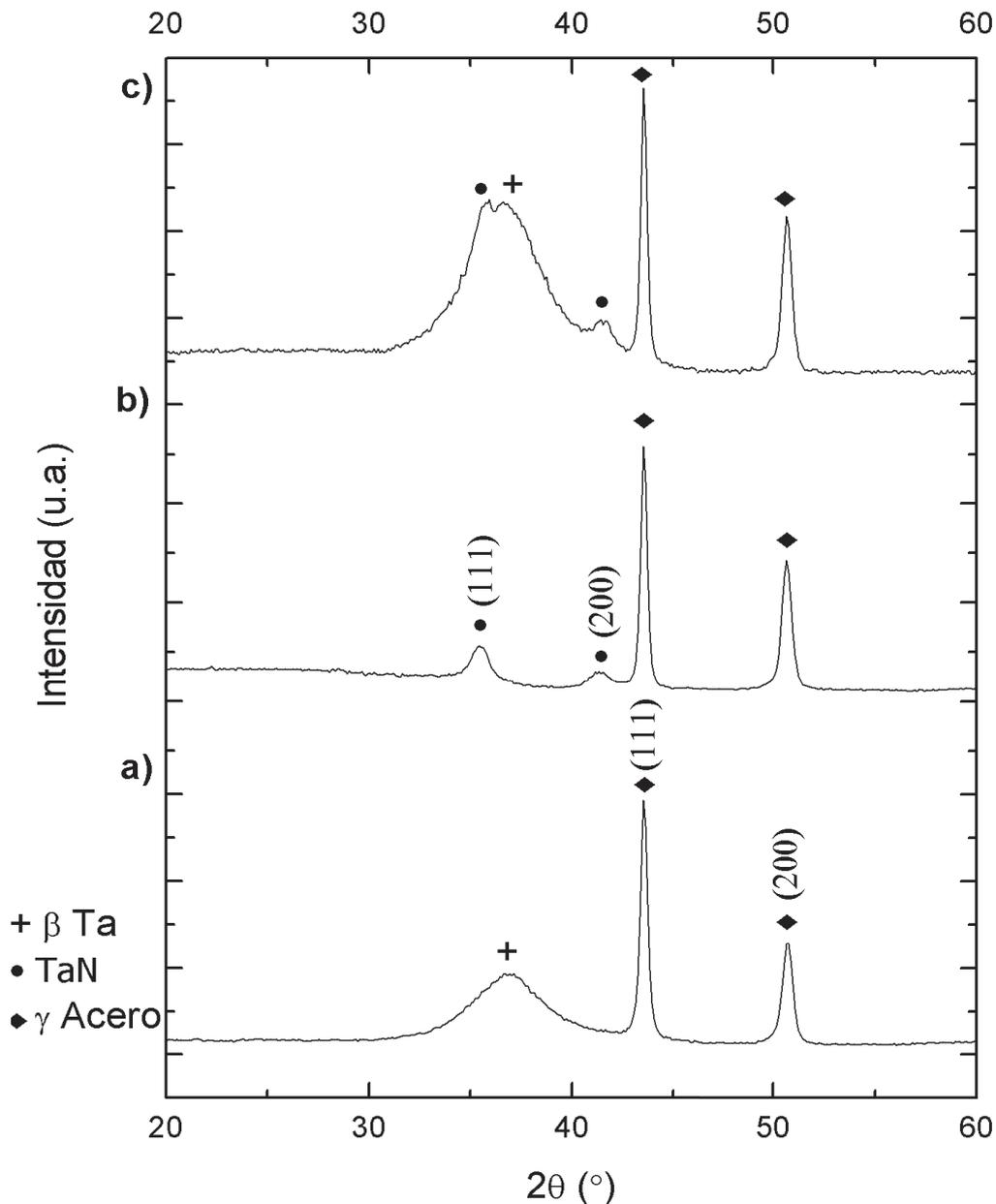


Figura 3.8. Difractograma de incidencia rasante de las diferentes películas delgadas depositadas sobre SS316LVM a) Ta/SS316LVM b) TaN/SS316LVM c) Ta/TaN/SS316LVM.

Los difractogramas de incidencia rasante para Ta, TaN y Ta/TaN depositadas sobre Ti se presentan en la figura 3.9. El difractograma de la película delgada de Ta depositada sobre Ti se puede observar en la figura 3.9a), y se muestra una reflexión muy ancha ubicada en la región 33.50 - 41.50 2θ correspondiente a la fase β -Ta tetragonal nanocrystalina, en esta región también están incluidos las principales reflexiones del sustrato de Ti. Para la película TaN/Ti en la figura 3.9b), se observan las reflexiones características de la fase cúbica del TaN (111) y (200). La bicapa depositada sobre Ti (figura 3.9c) muestra una reflexión ancha identificada como la fase β -Ta tetragonal y las reflexiones del TaN.

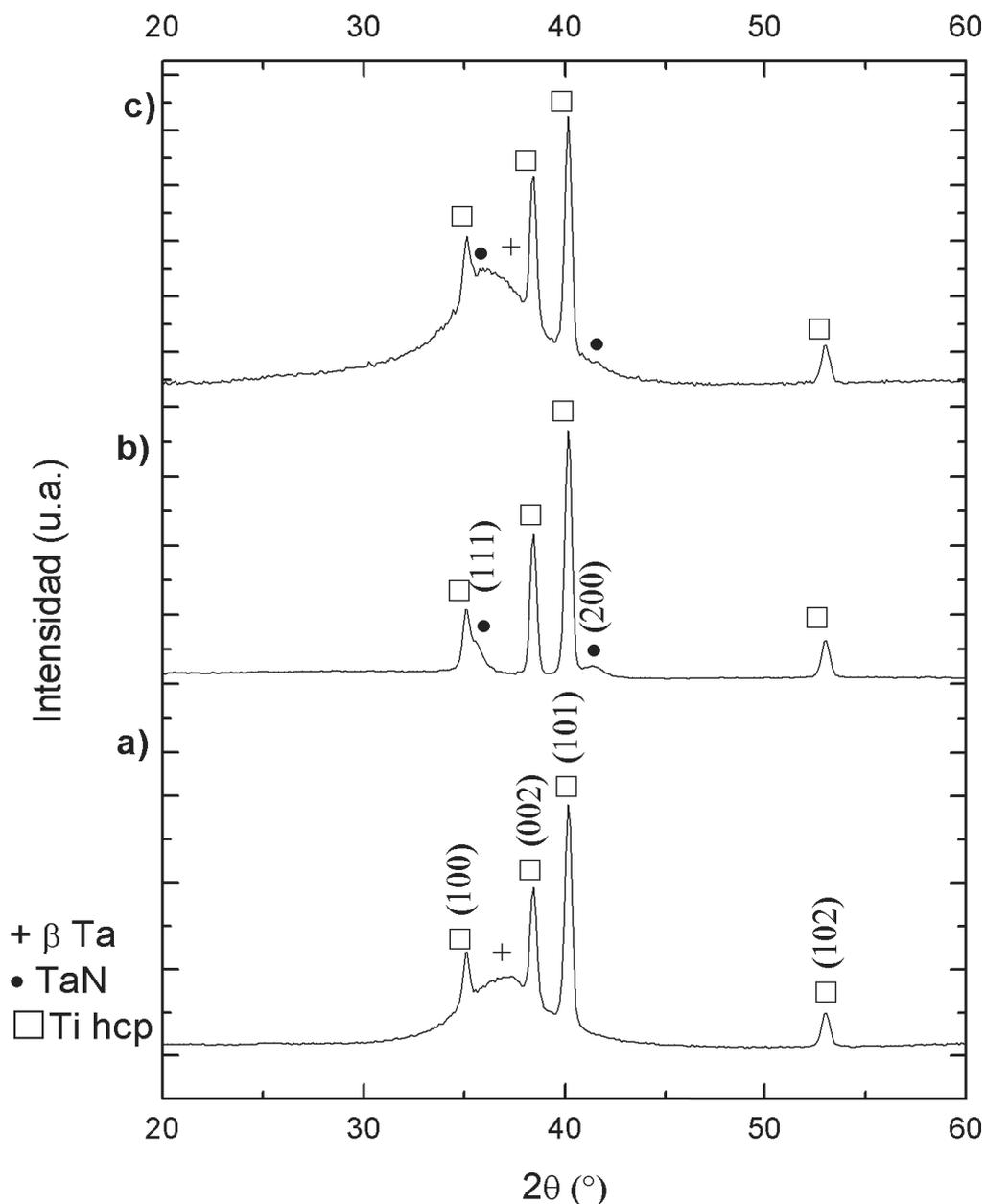


Figura 3.9. Difractograma de incidencia rasante de las diferentes películas delgadas depositadas sobre Ti a) Ta/Ti b) TaN/Ti c) Ta/TaN/Ti.

Grosser y Schmid [43] reportaron la dependencia con el espesor de la cristalinidad de películas de Ta depositadas en sustratos de vidrio. Para películas delgadas (<300 nm) obtuvieron la fase β -Ta tetragonal identificando los siguientes planos cristalinos (002), (212) y (413). Para espesores de $\approx 1 \mu\text{m}$ solo los planos (410) y (413) se lograron identificar correspondientes a lo que llamaron una fase β -Ta (tipo A) y para espesores $>1 \mu\text{m}$ se encontró que la película depositada cristalizaba en la fase α . Adicionalmente estos autores reportaron una fase β -Ta (tipo C), caracterizada por una fuerte reflexión en la región $30.0 - 45.0 2\theta$ atribuida a la fase nanocristalina β -Ta con una alta densidad de defectos muy similar a la obtenida en este trabajo.

Por lo tanto la naturaleza del sustrato influye la fase cristalina obtenida para películas delgadas de Ta depositadas sobre SS316LVM y Ti. Se obtuvo una fase cúbica α -Ta ($Im3m$) sobre SS316LVM con pobre adhesión para la capa de Ta y una buena adhesión de esta capa cuando fue depositada sobre el TaN para la síntesis de la bicapa Ta/TaN, una capa β -Ta nanocristalina se formó sobre el Ti.

Cualquiera que sea el sustrato utilizado, los patrones de difracción de rayos X muestran la formación de un Nitruro de Tántalo con estructura tipo NaCl (JCPDS 49-1283). Esta estructura consiste de dos subredes cúbicas centradas en las caras, una que contiene los átomos de Tántalo y los átomos de Nitrógeno que ocupan los sitios octaédricos de la otra subred (figura 3.10)

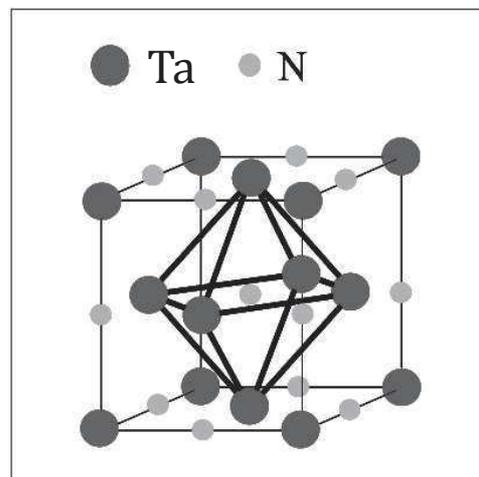


Figura 3.10. Estructura Cristalina del TaN con estructura tipo NaCl.

3.2.3 Tamaño de grano y rugosidad de las Películas Delgadas Depositadas

Las películas delgadas depositadas exhiben un crecimiento tipo columnar (figura 3.2), además presentan una microestructura nanocristalina, con un tamaño de grano aproximado de entre 50 y 60 nm dependiendo del sustrato. El tamaño de los granos no es uniforme por lo que no se realizó ningún ajuste utilizando alguna función de distribución, simplemente se midieron los tamaños a partir de las micrografías en el software del microscopio y se tomó el tamaño más representativo en el área seleccionada.

Al observar la microestructura de las capas depositadas en la figura 3.11, se observa la típica microestructura llamada de tipo “coliflor” asociada a su vez con el crecimiento columnar observado (figura 3.2) y discutido en la sección 3.2.1 además se puede ver que el tamaño de grano de las películas de Ta depositadas sobre Ti es ligeramente mayor (aproximadamente 60 nm) a los de la película de Ta/SS316LVM (aproximadamente 50 nm). Sin embargo ocurre lo contrario para la película de TaN, siendo este tamaño para TaN/Ti menor (aproximadamente 15 nm) comparado con TaN/SS316LVM (aproximadamente 36 nm), recordemos que existe una capa de óxido de titanio (figura 3.6) que se

deposita de forma natural sobre el Ti debido a la pasivación del mismo que de alguna manera puede afectar el crecimiento de la capa depositada. La microestructura de la bicapa Ta/TaN es diferente en ambos sustratos, la capa luce más densa sobre Ti. Hay que tener en cuenta que primero se deposita la película delgada de TaN sobre cada uno de los sustratos metálicos y luego sobre esta capa sin romper el vacío en la cámara se deposita la película delgada de Ta, por lo tanto la microestructura de esta película está influenciada por la capa depositada debajo de ella. Es evidente que el TaN sobre Ti tiene menor tamaño de grano que el TaN sobre SS316LVM resultando en un película de Ta más densa cuando la bicapa es depositada sobre el sustrato de Titanio y por lo tanto un tamaño de grano más pequeño.

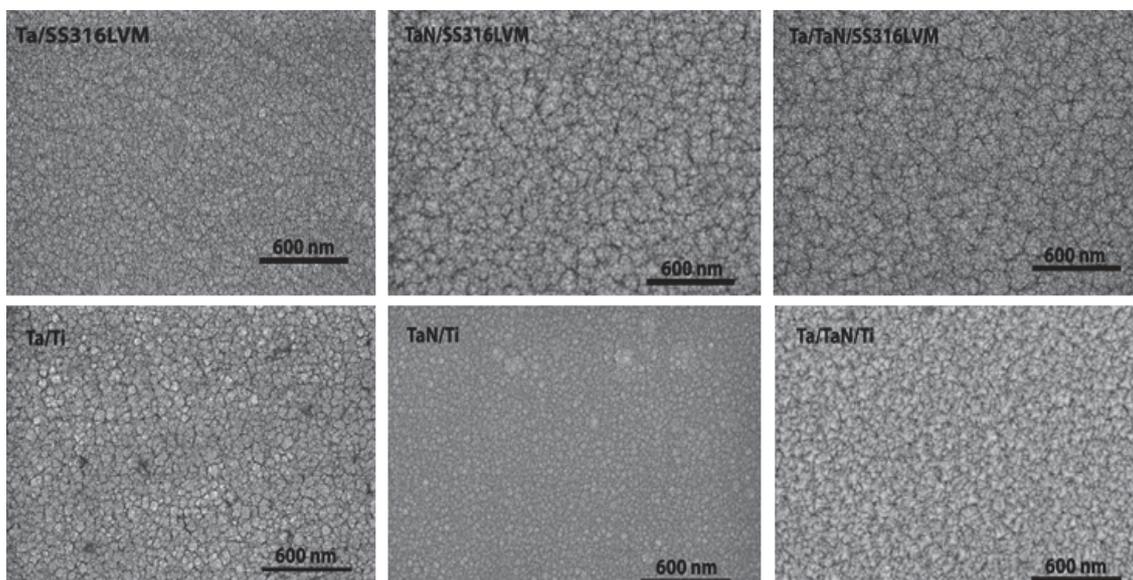


Figura 3.11. Microestructura de la superficie de las diferentes Películas Delgadas depositadas sobre SS316LVM y Ti.

Los análisis realizados por EDX en todas las películas delgadas depositadas (figuras 3.12 – 3.17) revelan la presencia de oxígeno dentro de las capas, de una concentración de aproximadamente 30%. Estos resultados muestran la presencia de oxígeno en grandes cantidades. La presencia de oxígeno en estos materiales puede tener varios orígenes: presencia de Oxígeno remanente en la cámara al hacer vacío, alta reactividad del Tántalo con el Oxígeno, entre otros, aún hoy en día como reducir la concentración de Oxígeno en películas delgadas de metales de transición depositadas por pulverización catódica sigue siendo un problema difícil de resolver.

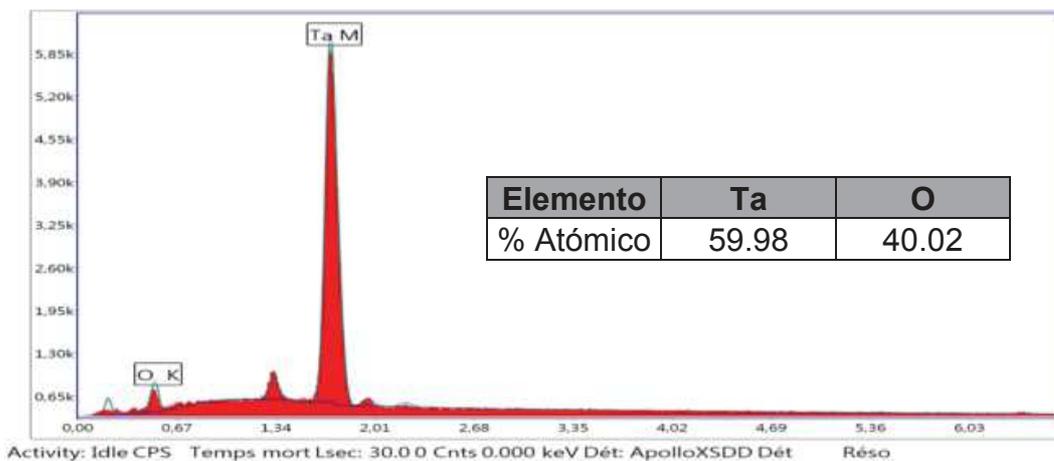


Figura 3.12. Espectro EDX para la película de Ta/SS316LVM.

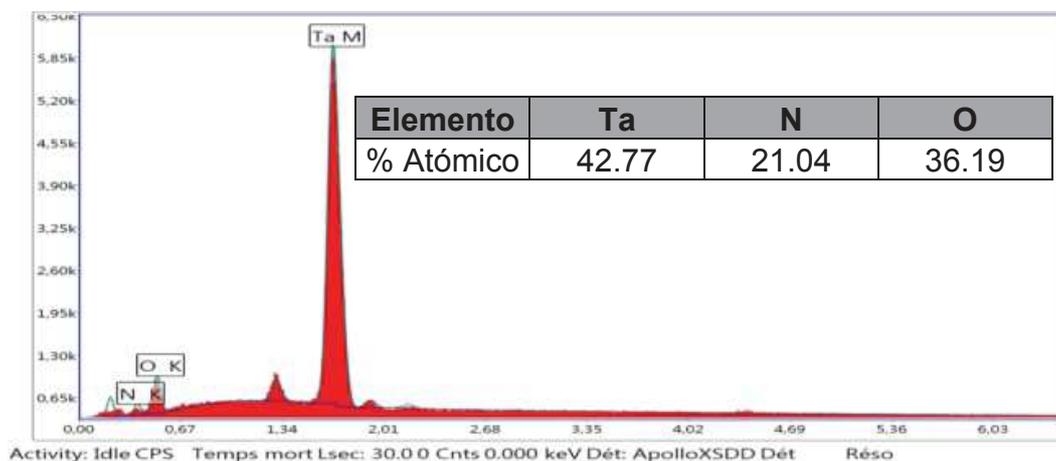


Figura 3.13. Espectro EDX para la película de TaN/SS316LVM.

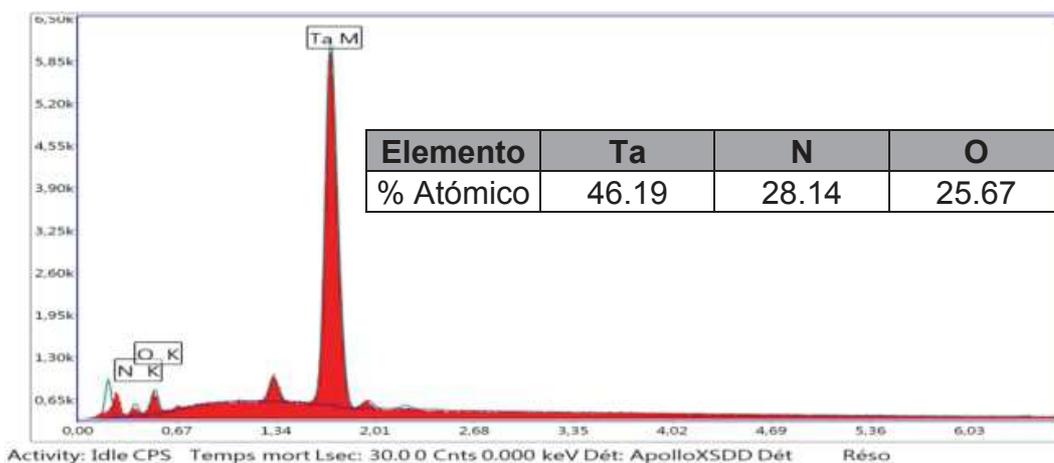


Figura 3.14. Espectro EDX para la película de Ta/TaN/SS316LVM.

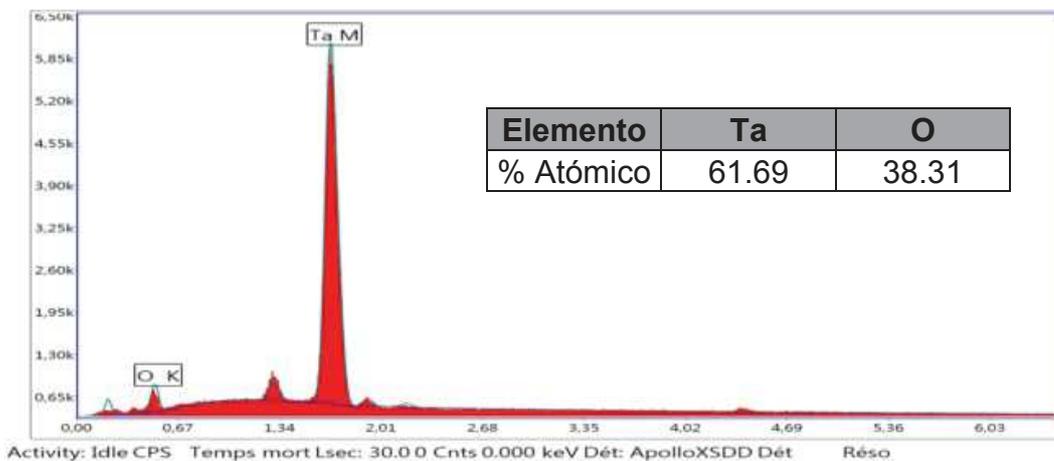


Figura 3.15. Espectro EDX para la película de Ta/Ti.

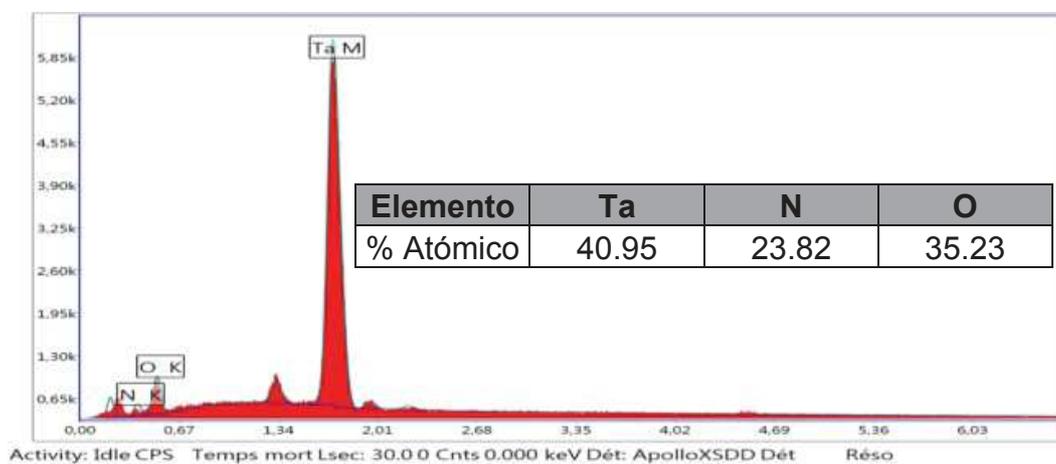


Figura 3.16. Espectro EDX para la película de TaN/Ti.

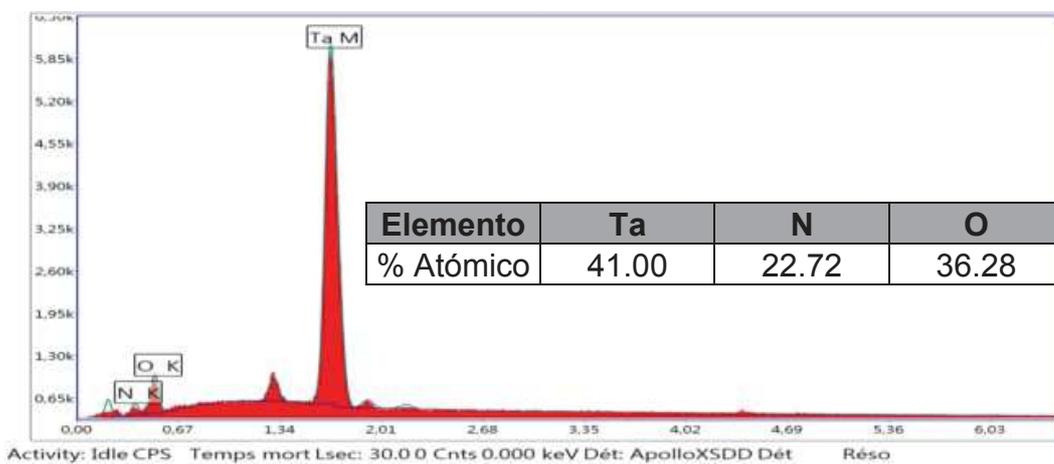


Figura 3,17. Espectro EDX para la película de Ta/TaN/Ti.

Las imágenes tomadas por microscopía de fuerza atómica para las diferentes películas delgadas depositadas se muestran en la figura 3.18, se observa que la capa depositada tiene una microestructura homogénea y que la capa consiste esencialmente de una estructura granular que cubre toda la superficie. Se puede ver que existen diferencias en la topografía de las diferentes películas depositadas indicando que esta característica es sensible a la naturaleza del sustrato sobre el cual se está depositando la película delgada ya que las mismas fueron sintetizadas bajo similares condiciones experimentales discutidas en el capítulo 2.

La rugosidad fue calculada a partir de las desviaciones en altura de los perfiles obtenidos y se listan en la tabla 3.2. Los valores de rugosidad de los sustratos antes de la deposición fueron de (7.82 ± 0.78) nm para el SS316LVM y (1.50 ± 0.15) nm para el Ti. La superficie de la bicapa exhibe una topografía homogénea sobre ambos sustratos con una rugosidad media de (2.0 ± 0.2) nm. Para la película de Ta sobre SS316LVM fue de (10.0 ± 1.0) nm y sobre Ti fue de (4.0 ± 0.4) nm. Además la microestructura de ambas películas luce bastante homogénea. La topografía de la película de TaN sobre Ti es muy inhomogénea a pesar de que su valor medio de rugosidad fue de (10.0 ± 1.0) nm similar a Ta/SS316LVM. Sin embargo las microestructuras son muy diferentes. Por el contrario TaN sobre SS316LVM muestra una microestructura uniforme con una rugosidad media de (4.0 ± 0.4) nm.

N°	Película	Técnica de Síntesis	Espesor (nm)	Rugosidad (nm)
1	SS316LVM	---	---	7.82 ± 0.78
2	Ta/SS316LVM	RF Sputtering	300	10.0 ± 1.0
3	TaN/SS316LVM	RF Sputtering	300	4.0 ± 0.4
4	Ta/TaN/SS316LVM	RF Sputtering	600	2.0 ± 0.2
5	Ti	---	---	1.50 ± 0.15
6	Ta/Ti	RF Sputtering	300	4.0 ± 0.4
7	TaN/Ti	RF Sputtering	300	10.0 ± 1.0
8	Ta/TaN/Ti	RF Sputtering	600	2.0 ± 0.2

Tabla 3.2 . Valores de Rugosidad medidos a partir de las imágenes de MFA.

La rugosidad de las películas delgadas está influenciada por diversos factores, se ha reportado en la literatura que la presión parcial de nitrógeno no afecta la rugosidad de la capa depositada manteniéndose constante tal y como lo reportan Nie *et al* [145] y Nazon [25]. La rugosidad se ve afectada por el espesor de la película depositada aunque hay discrepancias en las tendencias de los resultados tal y como lo reportan Riekkinen *et al* [135] y Stavrev *et al* [45]

con un aumento de la rugosidad de 0.41 a 1.77 nm, asociado con un aumento del tamaño de grano de 24 a 36 nm cuando la presión parcial de nitrógeno aumenta en un 5 a 15%. También Stavrev *et al* [45] reportan un aumento de la rugosidad de las capas de nitruro de tántalo con un espesor de 1.5 μm , de 0.62 a 1.78 nm cuando el flujo de nitrógeno aumenta de 15 a 40%. Por lo que no existe una idea clara de qué factores influyen o no la rugosidad. En nuestro trabajo no variamos la presión parcial de Argón o Nitrógeno ni el espesor pero la dispersión de los valores obtenidos puede estar relacionada con la naturaleza del sustrato (SS316LVM (7.82 \pm 0.78) nm, Ti (1.50 \pm 0.15) nm y en el caso de la bicapa TaN (10.0 \pm 1.0) nm sobre SS316LVM y (4.0 \pm 0.4) nm sobre Ti), así como el estado de la superficie de los mismos antes de la deposición ya que cada uno tiene una rugosidad diferente previa a la deposición de la capa, que generan un cambio en los mecanismos de crecimiento y por lo tanto la microestructura de capas delgadas depositadas [147].

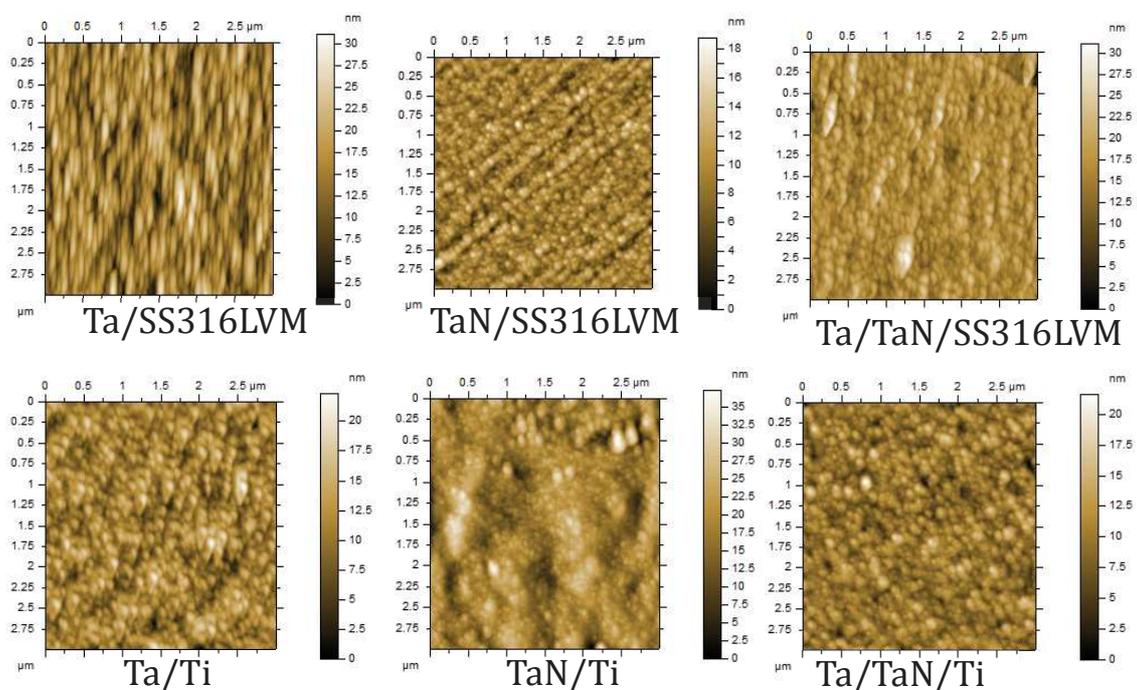


Figura 3.18. Imágenes de Microscopía de Fuerza Atómica de las diferentes Películas Delgadas depositadas sobre SS316LVM y Ti.

3.2.4 Análisis químico de la superficie de las Películas Delgadas depositadas

La Espectroscopía de Fotoelectrones de Rayos X (XPS) fue utilizada para analizar la composición química de las especies en la superficie y se presentan en las figuras 3.19 – 3.22

Como ya se discutió en los espectros EDX (figuras 3.12-3.17) el Oxígeno se encontró en todas las películas delgadas depositadas. En la figura 3.19, se

muestra el espectro O (1s) para las capas depositadas sobre SS316LVM y Ti. Una envolvente con dos señales se observa para las películas de Ta y Ta/TaN en ambos sustratos. Un pico alrededor de 530.45 eV se atribuye a la formación de un óxido de Tántalo [148], [149] y el pico en 531.95 eV está relacionado con el enlace O-C [150] debido a la oxidación de la superficie y a la contaminación con carbón de la capa depositada durante la transferencia y almacenamiento de la muestra. Se puede notar que la intensidad de la señal de la especie química O-C es mayor en Ta/Ti y Ta/TaN/SS316LVM denotando un mayor grado de contaminación en la superficie.

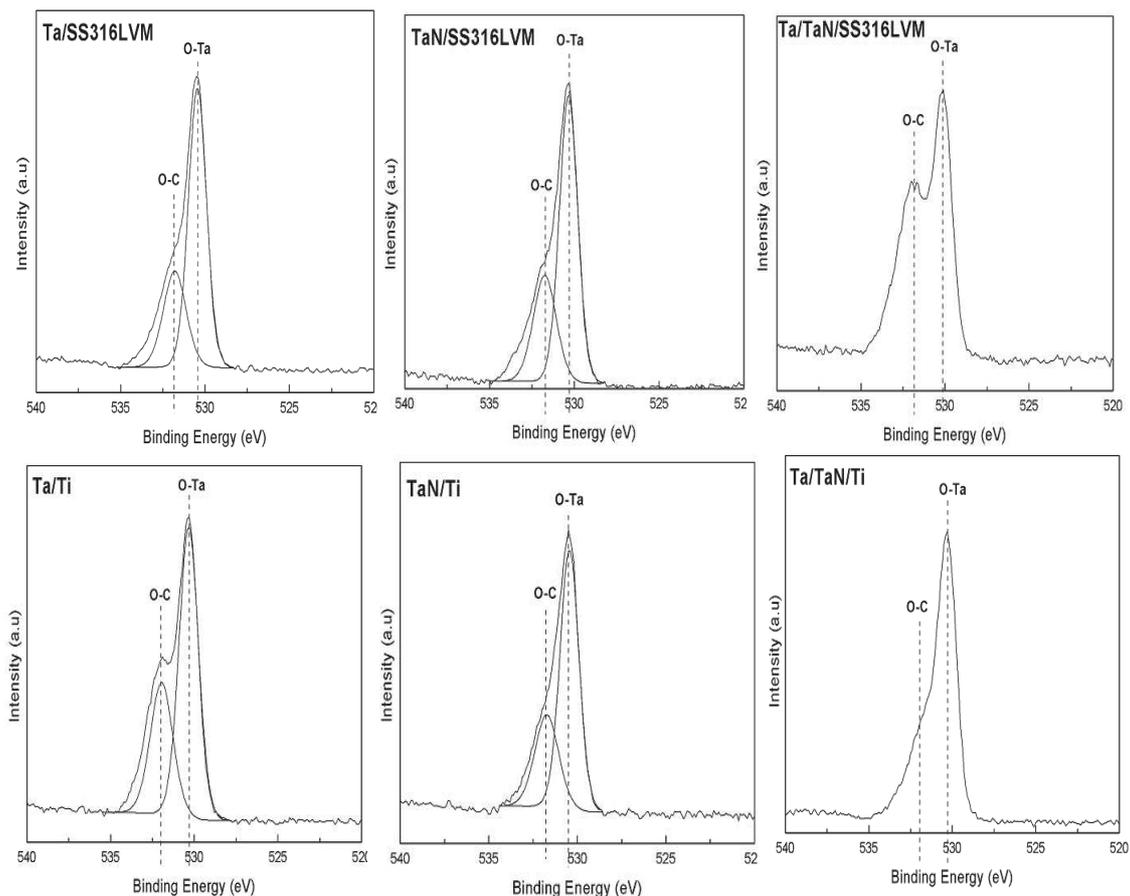


Figura 3.19. Espectros XPS del O 1s para las diferentes Películas Delgadas depositadas sobre SS316LVM y Ti.

El espectro de Ta (4f) para Ta/SS316LVM y Ta/Ti se muestra en la figura 3.20, los resultados para ambas capas depositadas son similares. El espectro incluye las líneas Ta (4f_{7/2}) y Ta (4f_{5/2}), a partir de la deconvolución se observan cinco señales en diferentes valores de energía entre 20 – 30 eV. Las señales de Ta⁺⁵ (Tántalo en su forma de óxido estable Ta₂O₅) en las energías 26.02 eV [149] y 27.91 eV [151]. Un pico en 24.66 eV atribuido a TaO_x [149], [152]. Una señal en 23.58 eV asignada al enlace Ta-C [149] debido a la contaminación de la superficie de la capa depositada y también se observó una señal correspondiente al Ta⁰ (Tántalo en su forma metálica) con una energía de enlace de 21.57 eV [152]. Como vemos en el espectro de XPS correspondiente

al Ta muestra varios estados de oxidación, lo cuál es de esperarse debido a la naturaleza del Ta de ser un metal de transición con una alta afinidad por el Oxígeno. Este Oxígeno se pudo haber incorporado a la capa depositada durante la síntesis o mientras se llevaba la película de un lugar a otro o mientras estuvo almacenada, formándose una capa de óxido que cubre la capa de Ta metálica depositada [149], [151], [153].

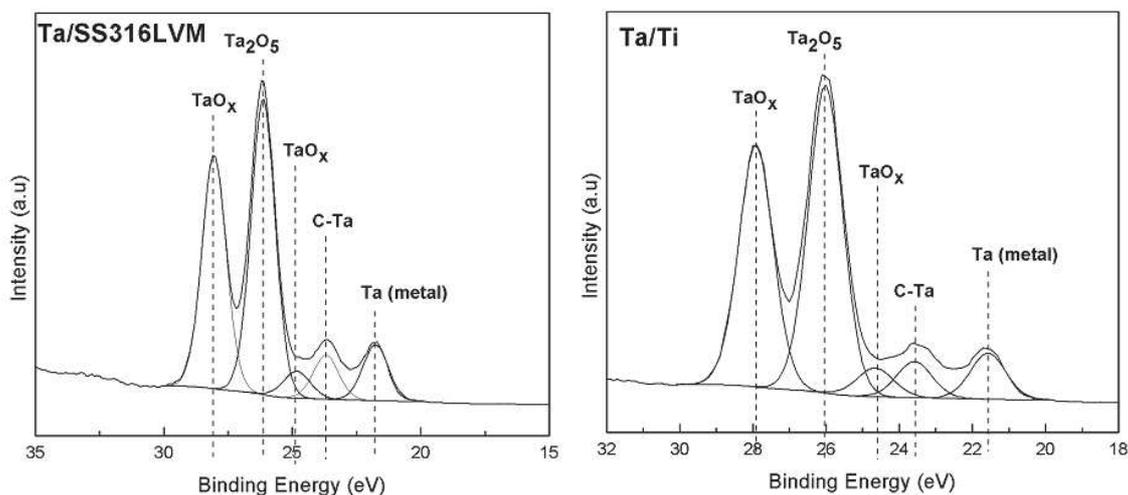


Figura 3.20. Espectros XPS del Ta 4f para Ta/SS316LVM y Ta/Ti.

En las bicapas Ta/TaN/SS316LVM y Ta/TaN/Ti se observa un comportamiento diferente al obtenido para el Ta depositado directamente sobre los sustratos metálicos. El espectro de Ta en la bicapa (depositado sobre TaN) muestra un doblete correspondiente a la línea Ta (4d) en 230.50 eV y 242.20 eV (figura 3.21) atribuido al óxido estequiométrico Ta_2O_5 [154], [155], el pico de baja energía del Ta^{+5} no se detecta en la bicapa sugiriendo que la capa de Ta_2O_5 que se forma es de un espesor mayor por lo que el haz no penetra y no se puede detectar la otra señal observada en la película de Ta depositada sobre los sustratos metálicos.

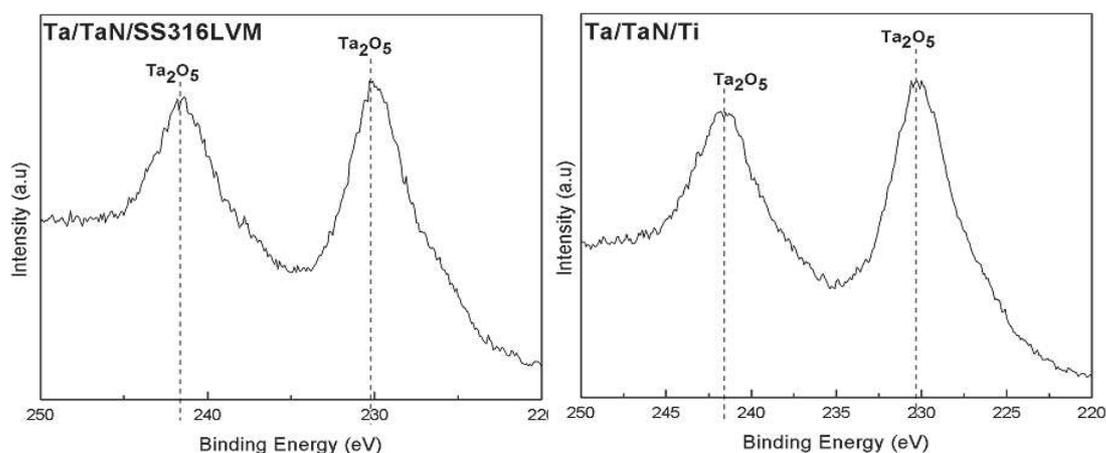


Figura 3.21. Espectros XPS del Ta 4d para Ta/TaN/SS316LVM y Ta/TaN/Ti.

Los espectros correspondientes para TaN/SS316LVM y TaN/Ti se muestran en la figura 3.22, con las líneas Ta (4f) y Ta (4p_{3/2}) / N (1s), en ambas se encuentran los mismos tres estados químicos para Ta (4f_{7/2}) en las energías 24.67eV and 26.11eV asignados al Nitruro de Tántalo de acuerdo con lo reportado por Valletti *et al* [156] para películas de TaN sintetizadas por pulverización catódica. El pico Ta (4f_{5/2}) en 28.01eV se puede identificar como TaO_xN_y [150]. En la parte de alta energía del espectro correspondiente a Ta (4p_{3/2}) / N (1s) tenemos tres señales N (1s), Ta(4p_{3/2}) y Ta (4p_{3/2}) observadas en los valores de energía 396.48, 401.60 y 404.30 eV respectivamente, estos estados químicos corresponden a TaN [157], [158], TaN_x [149] y TaO_xN_y [150], indicando la formación de Nitruro de Tántalo con diferentes estados de oxidación sobre los sustratos de SS316LVM y Ti.

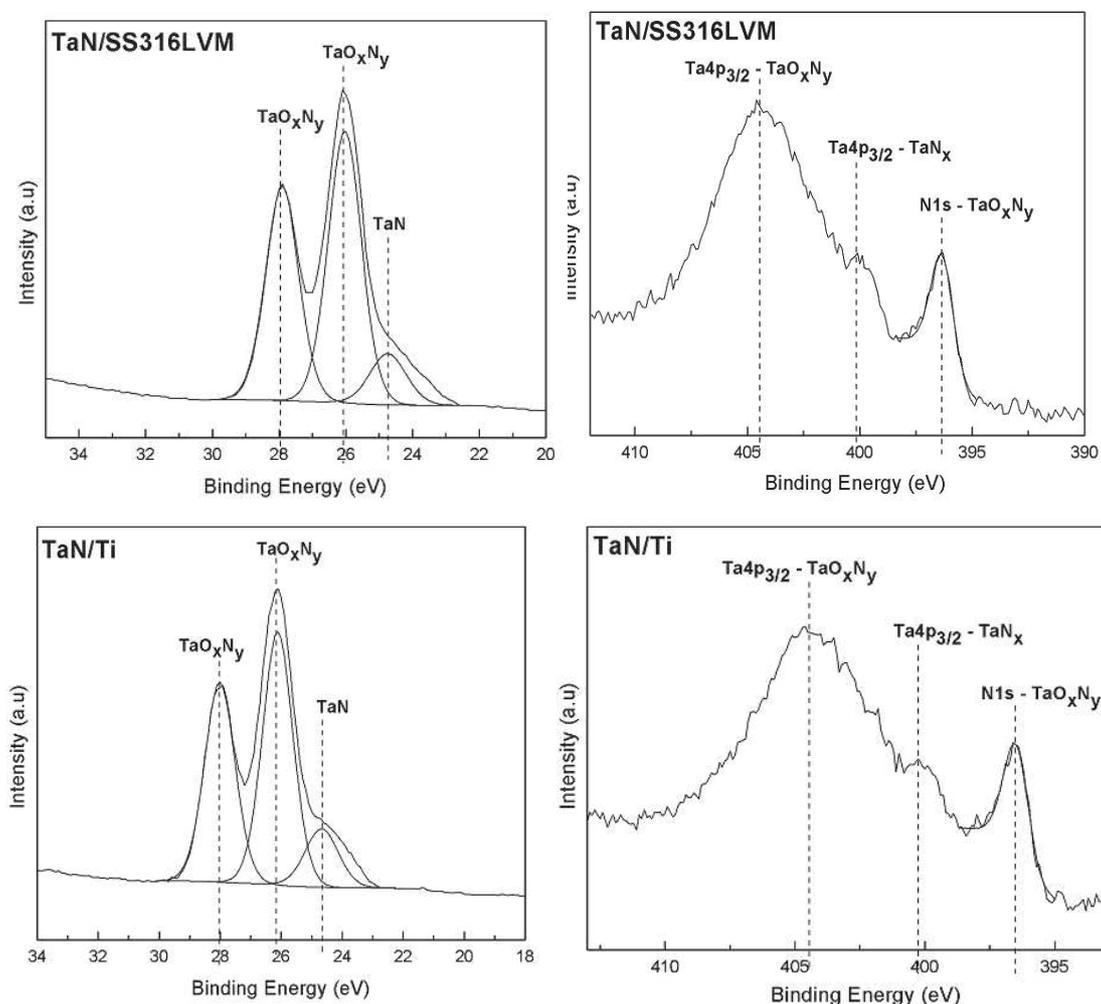


Figura 3.22. Espectros XPS del Ta 4f y Ta 4p_{3/2}/N 1s para TaN/SS316LVM y TaN/Ti.

3.2.5 Propiedades Mecánicas de las Películas Ta/SS316LVM y TaN/SS316LVM

Medidas de nanoindentación se realizaron sobre el sustrato de SS316LVM para las capas de Ta y TaN. La evolución de la carga vs la profundidad se muestran en las figuras 3.23 y 3.24 respectivamente. Los cálculos de las propiedades mecánicas muestran una clara tendencia al incremento del Módulo de Young con la profundidad de contacto mientras que la dureza permanece uniforme a lo largo del mismo rango de profundidad. El cambio en el módulo puede ser explicado debido al incremento en la contribución del módulo elástico del SS316LVM que es mucho más alto en comparación con el módulo de elasticidad medido en la superficie a altas cargas, el módulo a la mayor profundidad es de aproximadamente 180 GPa, mientras que el efecto del sustrato decrece rápidamente hacia la superficie.

La dureza (H), el Módulo de Young (E), y la relación H/E de Ta/SS316LVM y TaN/SS316LVM se muestran en la tabla 3.3

N°	Muestra	Técnica de Síntesis	Espesor (nm)	H* (GPa)	E* (GPa)	H/E
1	Ta/SS316LVM	RF Sputtering	300	6.8 ± 0.3	138.0 ± 8.7	0.04
2	TaN/SS316LVM	RF Sputtering	300	6.8 ± 0.2	166.0 ± 5.3	0.04

*promedio de 7 diferente posiciones a 30nm de profundidad de contacto y 20 puntos.

Tabla 3.3. Dureza y Módulo de Young calculados para las películas Ta/SS316LVM y TaN/SS316LVM.

Los valores de H y E reportados en la tabla 3.3, son los promedios de los valores tomados a 30 nm de profundidad, considerando que el espesor de la película es de 300 nm. El valor de dureza para ambas películas es de 6.8 GPa, mientras que el módulo de elasticidad es mayor para la película de TaN (166 GPa) este valor es más bajo del reportado en la literatura pero puede ser atribuido a la cantidad de oxígeno presente en las películas delgadas depositadas tal y como lo evidencia el XPS (figuras 3.19 - 3.22) [138]. Es bien sabido que las propiedades mecánicas de las películas delgadas están estrictamente correlacionadas con las características propias de la película tales como microestructura, fase cristalina, tamaño de grano, defectos, límite de grano, textura, entre otros. Sin embargo, los valores reportados en este trabajo están de acuerdo con lo reportado en la literatura [40], [60], [146].

Se calculó la relación H/E , ya que da información de un valor de deformación elástica y esto puede correlacionarse a la resistencia al desgaste [159]. Las muestras exhiben una larga resistencia a la deformación elástica de 0.04, más alta que para el SS316LVM (0.01), y que para metales, cerámicas y aleaciones usadas en implantes para regeneración ósea [160], lo que hace pensar que mecánicamente ofrece una mejor alternativa para ser usado como biomaterial para implantes óseos.

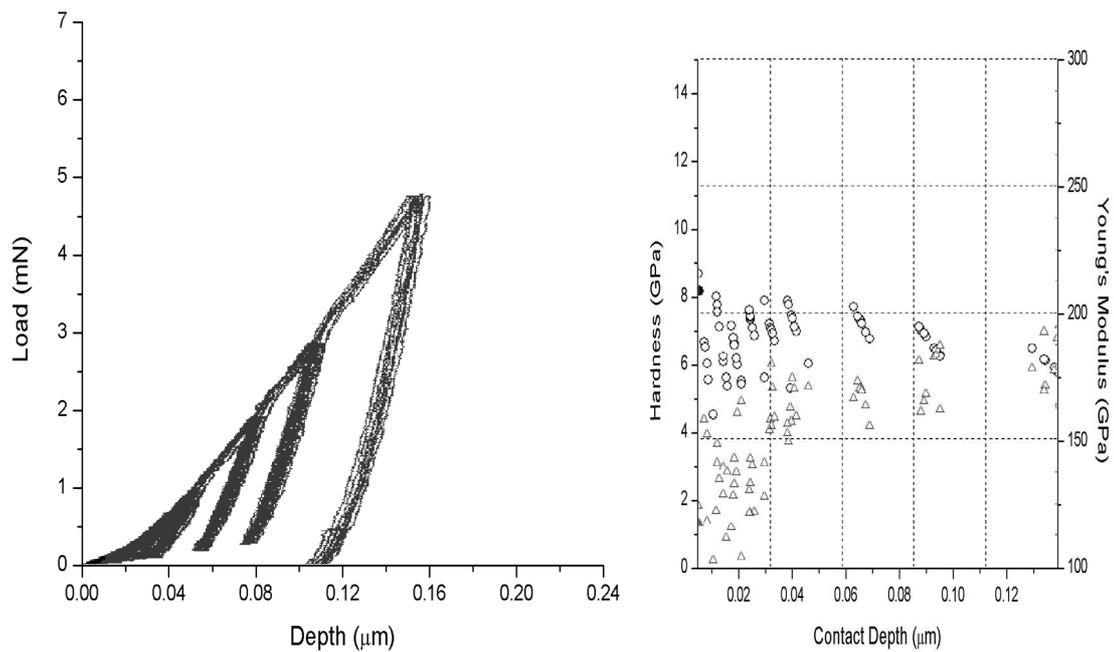


Figura 3.23. Curva de carga - desplazamiento producida durante el contacto (izquierda) y Dureza calculada \circ y resultados del Módulo de Young Δ vs. Profundidad de contacto (derecha) para la película Ta/SS316LVM.

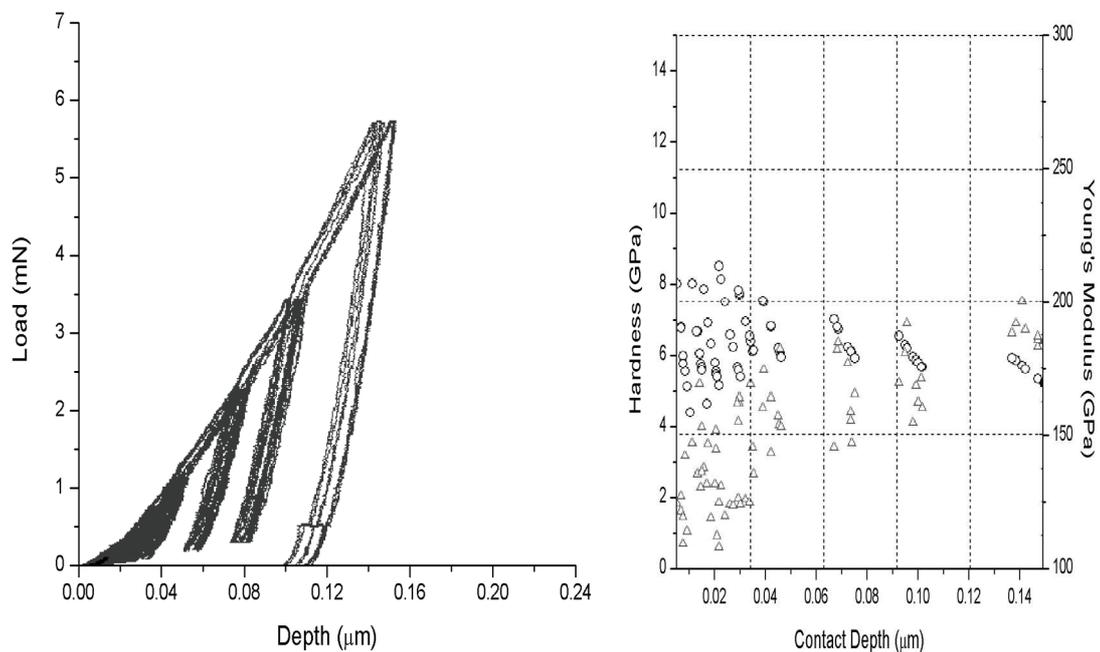


Figura 3.24. Curva de carga - desplazamiento producida durante el contacto (izquierda) y Dureza calculada \circ y resultados del Módulo de Young Δ vs. Profundidad de contacto (derecha) para la película TaN/SS316LVM.

3.3 Deposición de las Películas Delgadas Mesoporosas de Sílice.

Películas delgadas de Sílice mesoporosa fueron sintetizadas sobre sustratos de Titanio usando el método químico de Sol-Gel para la creación de la estructura mesoporosa bien ordenada y luego por la técnica de spin-coating se depositó la película delgada usando el co-polimero tribloque F127 como agente director de la estructura. Fueron sintetizadas con el fin de proponer este sistema como solución a la formación de biopelículas en los implantes óseos tal y como se discutió en la sección 1.10 del capítulo 1 actuando como agente antibacterial. Las diferentes condiciones de síntesis se detallan en el capítulo 2, sección 2.4.

Las películas fueron caracterizadas estructuralmente usando Difracción de Rayos X de bajo ángulo y su microestructura fue evaluada mediante observaciones con Microscopia Electrónica de Barrido. Los resultados se presentan a continuación.

3.3.1 Estructura Cristalina de las películas delgadas mesoporosas de Sílice.

En la figura 3.25 se muestra el difractograma para la película delgadas de Sílice mesoporosa, este difractograma es típico para este tipo de estructuras ordenadas, se observa una reflexión principal en la posición 2θ 0.8-1.0°, sugiriendo un tipo de estructura de Sílice ordenada tal y como ha sido reportado [131], [161].

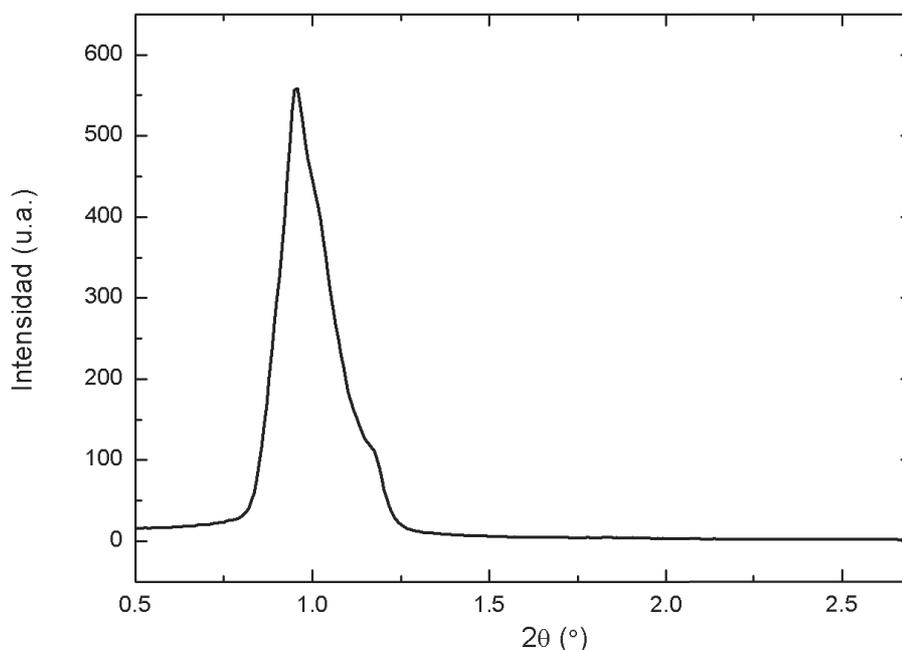


Figura 3.25. Difractograma de la Película Delgada de Sílice Mesoporosa.

3.3.2 Microestructura de las películas delgadas mesoporosas de Sílice.

En la figura 3.26 se puede observar la microestructura de las películas delgadas de Sílice mesoporosa depositadas sobre Ti. Diferentes condiciones de síntesis fueron utilizadas al momento de hacer el "spin-coating" se tomaron 1 y 2 ml del sol previamente sintetizado la diferencia se puede observar en la figura 3.26a) (1ml) y 3.26b) (2ml) cuando el sistema se hizo girar a 5000 rpm, claramente se observa como la imagen 3.26a) muestra una película más fina y uniformemente depositada sobre el sustrato de Ti mientras que en la figura 3.26b) se observa una capa no uniforme con aglomerados y superposición del material.

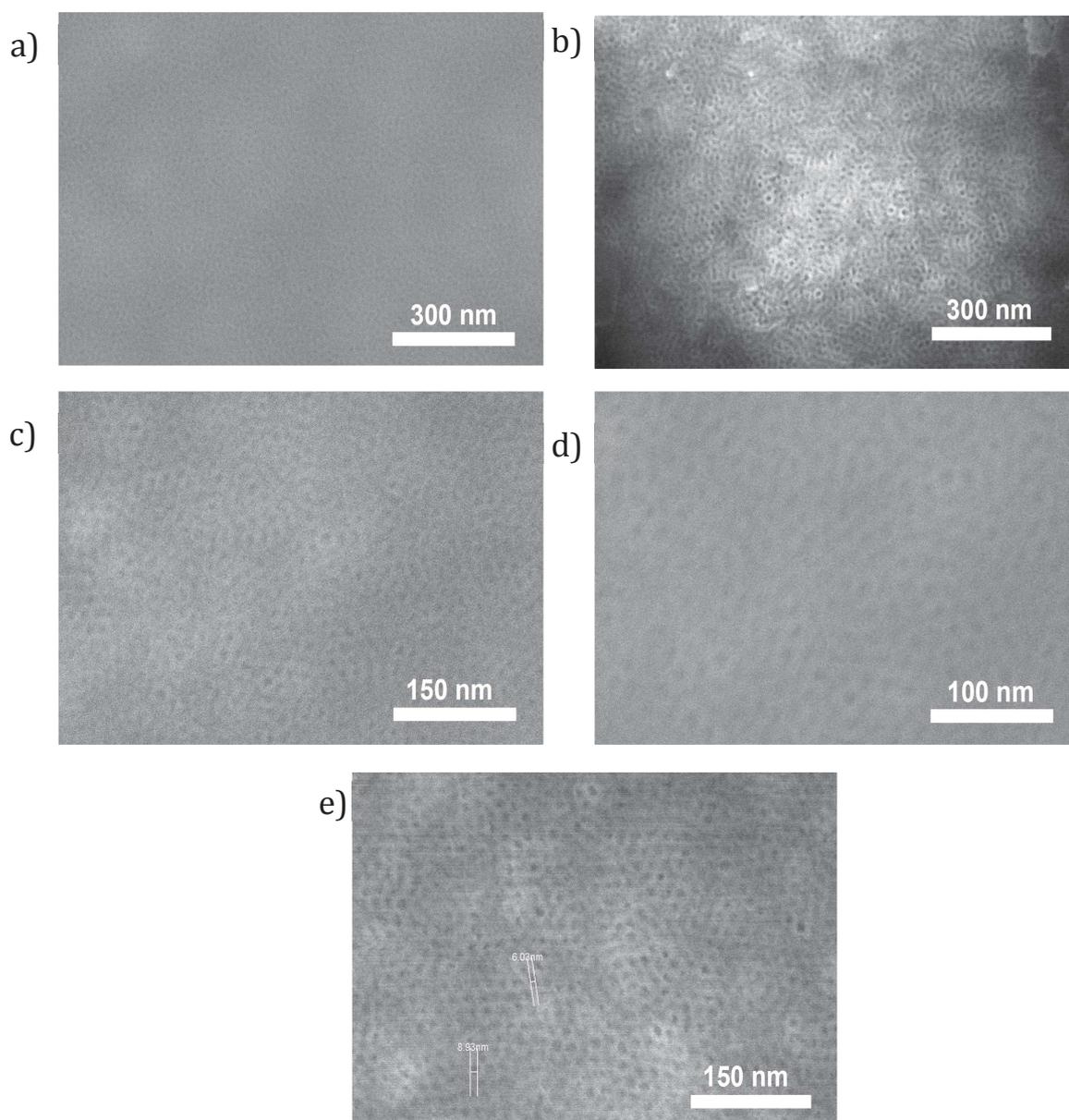


Figura 3.26. Micrografías de MEB de las películas delgadas de Sílice mesoporosa depositadas sobre Ti. a) c) d) y e) 5000 rpm 1 ml, b) 5000 rpm 2 ml.

La morfología de todas las películas muestra la presencia de los mesoporos claramente separados por paredes rígidas de Sílice, sin embargo el arreglo en la distribución y tamaño (figura 3.26e) de los mesoporos no es uniforme. La accesibilidad de los poros en la superficie es muy alta ya que puede observarse claramente su posición sobre la superficie.

El tamaño de los mesoporos es nanométrico y varía entre 5 y 10 nm como puede verse en la figura 3.26e).

El mecanismo de formación de estas películas a partir de los reactantes TEOS y F127 envuelve la formación de micelas cilíndricas las cuales se organizan en dominios hexagonales bidimensionales [162]. Estos arreglos 2D tienden a alinearse en la superficie de la película en forma de capas que crecen paralelamente al sustrato, tras la condensación de la Sílice y la remoción del surfactante mesoporos de varias formas y tamaños se formarán en la superficie de la película (figura 3.26). Mesoporos más ordenados y uniformes se observan cuando se utiliza la cantidad de material adecuada para cubrir la superficie que se desea recubrir y que funcionará como el sustrato (figuras 3.26a) y 3.26b) debido a que el espesor de la película será menor y ayudará a mantener un orden de largo alcance sobre toda la superficie de la película.

Esta alineación de los dominios y por lo tanto la estructura final formada depende de varios factores tales como la velocidad de giro, la naturaleza (relaciones molares entre los reactantes) y cantidad depositada del Sol de Sílice, la humedad, el tratamiento térmico para evaporar el surfactante, entre otros factores. En nuestro caso sólo variamos la cantidad de Sol depositada y la velocidad de giro y se puede observar en las 3.25a) (1ml) y 3.25b) (2ml) cómo la microestructura la película depositada es sensible a pequeños cambios en estos factores.

Capítulo IV

Síntesis de Recubrimientos de Hidroxiapatita por el método biomimético

En este capítulo se mostrarán y discutirán los resultados de la obtención de recubrimientos de Hidroxiapatita sobre las películas delgadas de Ta, TaN y Ta/TaN mediante el método biomimético.

Los materiales basados en Tántalo presentan una excelente alternativa para mejorar las propiedades relevantes para constituir un biomaterial ya que presentan una alternativa de recubrimientos biomédicos con mejores características. Para estos recubrimientos poder sustituir a los anteriores tendrán que tener entre sus características principales: no ser tóxicos ni reabsorbibles por el cuerpo humano, tener un excelente funcionamiento mecánico y tener una buena interacción con las células osteoblásticas. La Hidroxiapatita presenta una mejor biocompatibilidad que los otros recubrimientos estudiados, esta mejor biocompatibilidad se refiere a una reproducción celular más elevada y a una mejor adherencia de las células sobre la superficie de estos materiales [163]. Al depositar una capa de Hidroxiapatita sobre las películas delgadas basadas en Tántalo depositadas previamente buscamos evaluar la bioactividad [102] y mejorar la biocompatibilidad de estos sistemas.

4.1 Obtención de recubrimientos de Hidroxiapatita por el método biomimético

El método biomimético tiene cuatro ventajas principales: es un proceso a baja temperatura aplicable a cualquier sustrato, forma cristales de apatita parecidos al hueso teniendo alta bioactividad y buenas características de resorción, es igualmente depositado sobre o dentro de geometrías complejas y porosas y pueden incorporarse factores que estimulen el crecimiento del hueso, por lo que se utilizó este método para obtener recubrimientos de Hidroxiapatita siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo 2, sección 2.2.

4.1.1 Escogencia del Fluido Corporal Simulado a ser utilizado

Se sintetizaron dos concentraciones de Fluido Corporal Simulado el convencional siguiendo la receta de la tabla 2.3 y otro adicional usualmente utilizado para acelerar el proceso de obtención del recubrimiento biomimético donde se adicionó 1.5 de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (0.347 gr/l) y 1.5 de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0.438 gr/l) [164]–[167], para ver cuál de los dos estimula mejor la deposición de fosfato de calcio y si logramos que este fosfato sea la hidroxiapatita estequiométrica.

En las figuras 4.1 y 4.2 se muestran las imágenes tomadas por microscopía óptica de las películas de Ta depositadas sobre ambos sustratos.

En la figura 4.1 se presenta una serie de tres imágenes donde se observa la microestructura de la película de Ta/SS316LVM. Esta muestra también fue inmersa en fluido corporal simulado con las dos concentraciones bajo estudio (convencional y 1.5) para evaluar cualitativamente luego de 3 días cuál fluido corporal simulado aceleraba el proceso de deposición de la capa de apatita deseada para luego tomar esta concentración y llevar a cabo el estudio de inmersión durante un mayor período de tiempo.

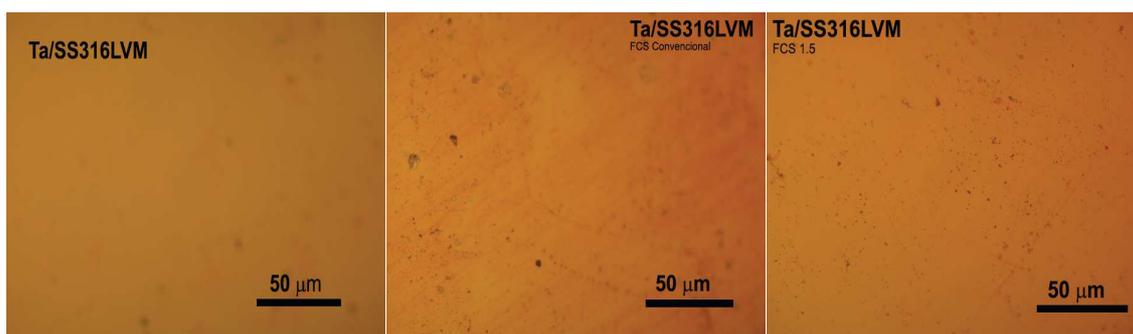


Figura 4.1. Microestructura de las películas de Ta depositadas sobre SS316LVM.

En la figura 4.2 se presenta una serie de tres imágenes donde se observa la microestructura de la película de Ta/Ti, así como también se pueden observar las imágenes para la película HAp/Ta/Ti que fueron sumergidas en fluido corporal simulado convencional y 1.5 para evaluar cualitativamente luego de 3 días cuál fluido corporal simulado aceleraba el proceso de deposición de la capa de apatita deseada y a partir de esta observación tomar dicha concentración y llevar a cabo el ensayo de inmersión durante un período de tiempo más largo.

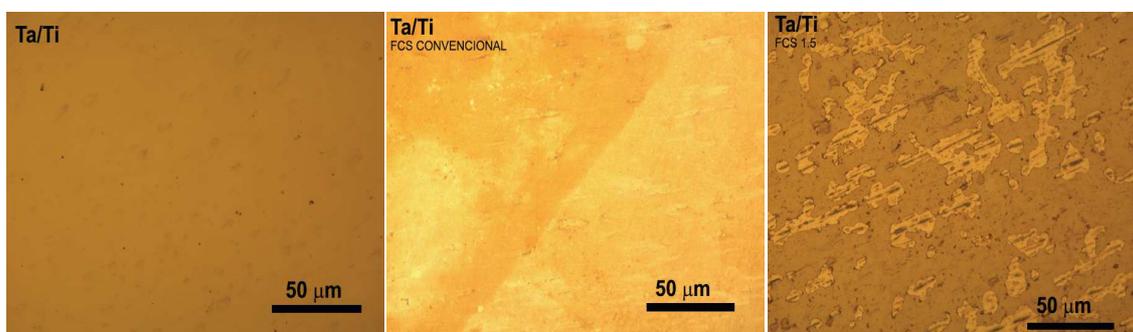


Figura 4.2. Microestructura de las películas de Ta depositadas sobre Ti.

En ambas figuras se observa que la microestructura de la película de Ta depositada sobre ambos sustratos es uniforme, suave y continua. Luego de sumergidas tres días en las dos concentraciones seleccionadas de fluido corporal simulado se puede ver cómo cambia la microestructura de la superficie tal y como ha sido reportado en la literatura [168]. En la imagen correspondiente al FCS convencional se muestra claramente cómo aparecen pequeños grupos separados de fosfatos de calcio que empiezan a depositarse sobre la superficie y en la imagen correspondiente al fluido corporal simulado 1.5 estos pequeños depósitos se repiten un mayor número de veces en el área bajo estudio. Basándonos en esta observación que tomamos como una evaluación cualitativa de la capacidad del fluido de depositar la capa de apatita decidimos escoger el FCS 1.5 para realizar los ensayos de bioactividad por un período de tres semanas sin hacer ningún tipo de tratamiento a las superficies bajo estudio.

El proceso de formación de estos fosfatos de calcio que se depositarán sobre las superficies estudiadas es importante de estudiar para nuestro entendimiento de cómo estas superficies exhiben propiedades bioactivas que permiten la proliferación de la deposición de apatitas de calcio más específicamente de la Hidroxiapatita.

En el hueso se encuentra que la formación de cristales de apatita es precedida por una fase precursora de fosfato de calcio amorfo [169][170]. La nucleación puede ser homogénea, en ausencia de partículas extrañas o cristales en la solución, o heterogénea, en presencia de grupos o complejos en la solución. Ambos tipos de nucleación se conocen colectivamente como la nucleación primaria. La nucleación secundaria tiene lugar cuando la nucleación es inducida por la presencia de cristales de la misma naturaleza [171]. La nucleación homogénea es difícil de alcanzar debido a que difícilmente se logra eliminar totalmente las partículas sólidas en la solución. Mas aún, la nucleación heterogénea es energéticamente favorable en comparación con la nucleación homogénea [114], incluso bajo condiciones de baja supersaturación por lo que los mecanismos de nucleación secundaria serán más favorables. En la literatura se pueden encontrar diversos estudios acerca de modelos *in vitro* de crecimiento de HAp [172]–[174] que sugieren que la precipitación se inicia por una nucleación heterogénea.

Se cree que tres tipos de fuerzas están presentes durante el proceso de nucleación de los sistemas sólidos - disolución acuosa, la interacción electrostática, interacciones de Van der Waals e interacciones de hidratación. La interacción electrostática se considera como el factor principal en la inducción de nucleación de fosfatos de calcio. Yamashita *et al.* [174] demostraron que la nucleación heterogénea de fosfatos de calcio ocurre en una superficie cargada negativamente. Una superficie cargada negativamente atrae a los iones positivos de calcio aumentando la velocidad de nucleación local de la apatita de la solución. También se puede esperar que la superficie cargada negativamente expulse a los aniones fosfato. Es bien sabido que el FCS está sobresaturado con HAp, fases amorfas de fosfatos de calcio y Octa fosfato de calcio. Este tipo de solución es metaestable y la nucleación puede

tener lugar si se producen pequeños cambios en la solución. La nucleación ocurre cuando se supera una barrera de energía de activación. Esta energía de activación se puede reducir aumentando el grado de supersaturación o por la disminución de la energía interfacial. La nucleación y el crecimiento de la fase termodinámicamente menos estable de fosfato de calcio ocurre en la superficie, seguido, de la nucleación y crecimiento de las fases más estables.

La nucleación de las fases amorfas de fosfatos de calcio y Octa fosfato de calcio son energéticamente favorables ya que la energía superficial de la HAp es mucho mayor en comparación con las anteriores [172]. Se cree que la formación de las fases amorfas de los fosfatos de calcio ocurre a partir de pequeños aglomerados que están presentes antes de la nucleación lo que se ha denominado como una pre-nucleación. Sin embargo, el papel de estas agrupaciones de tamaño nanométrico como bloques de construcción para la formación de los fosfatos de calcio amorfos ha sido objeto de debate desde hace muchos años [175], y una serie de diferencias entre las predicciones teóricas y los resultados experimentales sugieren que la nucleación de los sólidos a partir de soluciones acuosas no se desarrolla a través de la vía clásica sino que sigue rutas más complejas.

De manera general se puede esquematizar el proceso como una primera fase de la implantación, donde la disolución rápida de los recubrimientos solubles aumenta la formación de hueso, mientras que los fosfatos de calcio no solubles conducen a una mejor fijación entre el implante y el hueso.

Con el fin de determinar qué fase de apatita se deposita sobre las superficies bajo estudio luego de tres semanas sumergidas en fluido corporal simulado 1.5, se presentan a continuación los resultados obtenidos por las diferentes técnicas de caracterización y se discutirá cual es el mecanismo de formación de la apatita en la superficie y sus características (estructura cristalina, energías de enlace de las especies químicas presentes, morfología, topografía, rugosidad, dureza y módulo de Young)

4.1.2 Estructura Cristalina de los recubrimientos obtenidos

En la figura 4.3 se muestra el difractograma obtenido para la hidroxiapatita depositada sobre las distintas películas delgadas depositadas sobre SS316LVM. En la Figura 4.3a, se muestra el difractograma para HAp/Ta/SS316LVM luego de tres semanas en inmersión en el fluido corporal simulado 1.5, donde se observan los máximos de difracción correspondientes al sustrato de SS316LVM, la fase β -Ta de la película delgada depositada y en las posiciones 2θ (25.9° , 31.8° y 49.5°) correspondientes a los planos (002), (211) y (213) respectivamente, de la hidroxiapatita según la ficha cristalográfica (JCPDS 09-0432), además en la región de $32.0 - 43.0 2\theta$ se observa una ancha reflexión que se atribuye a la fase tetragonal β -Ta y donde también se encuentran reflexiones correspondientes a la HAp (32.2 , 32.9 , 34.1 , 35.5 , 39.2 , 39.8 , 40.5 , 42.0 y $42.3 2\theta$). Para la figura 4.3b, el difractograma de la película HAp/TaN/SS316LVM también se observan los máximos de difracción correspondientes al sustrato y al TaN según las fichas cristalográficas (JCPDS

33-0945 y 49-1283 respectivamente) y los planos (002), (211) y (213) correspondientes a las HAp. El difractograma de la bicapa (HAp/Ta/TaN/SS316LVM) se muestra en la figura 4.3c, donde claramente se observan las tres reflexiones indicadas anteriormente para la HAp y las reflexiones atribuidas al sustrato, la fase β -Ta y el TaN, lo que corrobora la presencia de la fase de Hidroxiapatita en todos los casos luego de tres semanas de inmersión de las muestras en el fluido corporal simulado 1.5.

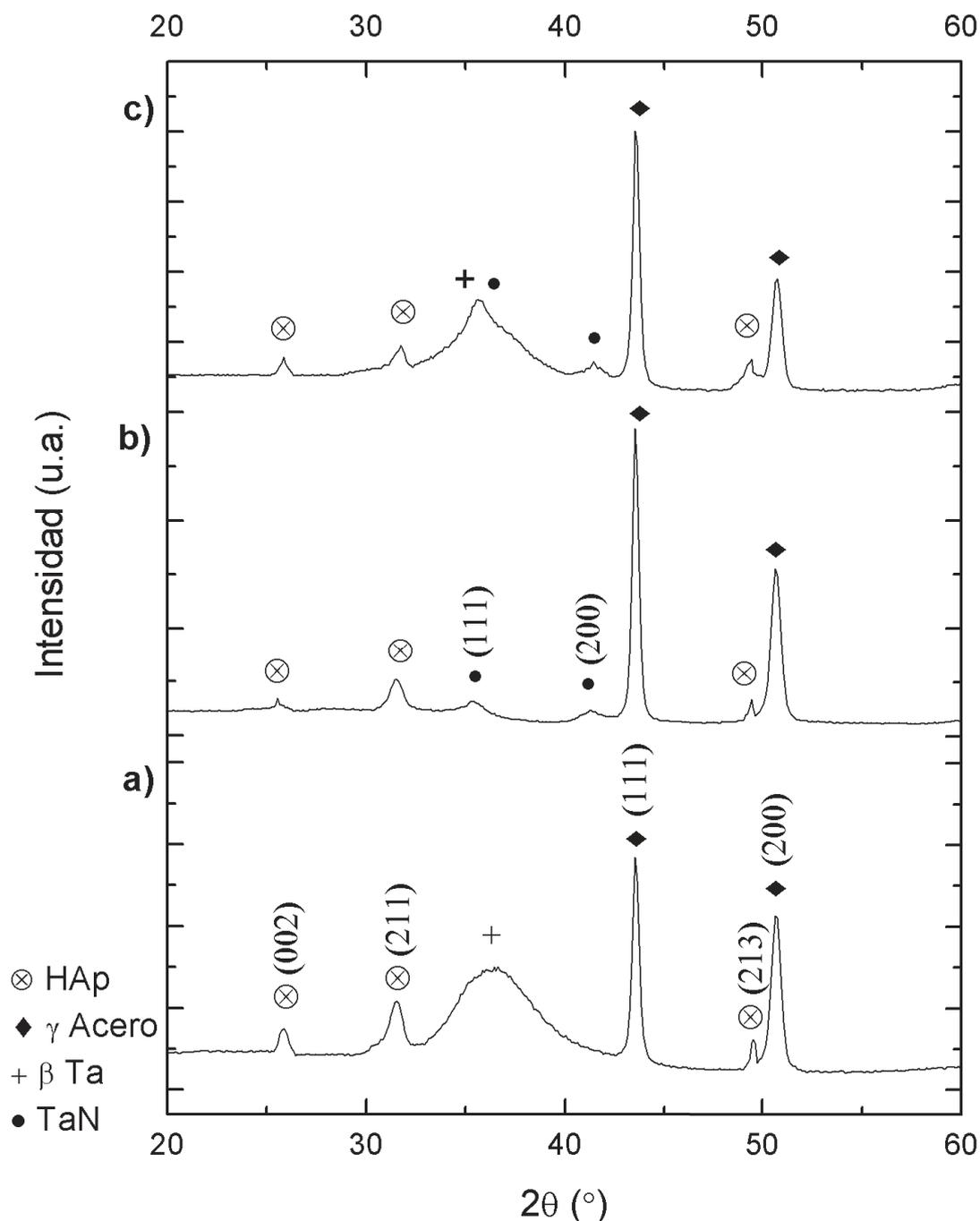


Figura 4.3. Difractograma de incidencia rasante de las películas delgadas de HAp depositadas sobre a) Ta/SS316LVM b) TaN/SS316LVM c) Ta/TaN/SS316LVM.

En la figura 4.4 se muestra el difractograma obtenido para la hidroxiapatita depositada sobre las distintas películas delgadas depositadas sobre Ti. En la Figura 4.4a, se muestra el difractograma para HAp/Ta/Ti, donde se observan los máximos de difracción correspondientes al sustrato de Ti, la fase β -Ta de la película delgada depositada y en las posiciones 2θ (25.9° , 31.8° , 32.2° , 32.9° y 49.5°) correspondientes a los planos (002), (211), (112), (300) y (213) respectivamente, de la hidroxiapatita según la ficha cristalográfica (JCPDS 09-0432). Para la figura 4.4b, el difractograma de la película HAp/TaN/Ti también se observan los máximos de difracción correspondientes al sustrato y al TaN según las fichas cristalográficas (JCPDS 44-1294 y 49-1283 respectivamente) y los planos (002), (211), (112), (300) y (213) correspondientes a las HAp. El difractograma de la bicapa (HAp/Ta/TaN/Ti) se muestra en la figura 4.4c, donde claramente se observan las cinco reflexiones indicadas anteriormente para la HAp y las reflexiones atribuidas al sustrato, la fase β -Ta y el TaN, lo que corrobora la presencia de la fase de Hidroxiapatita en todos los casos luego de tres semanas de inmersión de las muestras en el fluido corporal simulado 1.5.

A partir de los difractogramas observados en las figuras 4.3 y 4.4 se corrobora que mediante el método biomimético se puede obtener que se deposite Hidroxiapatita directamente sobre la superficie, sin necesidad de aplicar ningún otro tratamiento superficial, en el difractograma de las películas sobre Ti se observan cinco reflexiones mientras que en el difractograma de las películas sobre SS316LVM sólo se observan tres, sugiriendo que el mecanismo de deposición de la HAp sobre las películas basadas en Ta cuyo sustrato es el Ti favorece la cristalinidad de la HAp por la naturaleza del Ti de ser un material más bioactivo que el SS316LVM tal y como se ha reportado en la literatura [176]–[179].

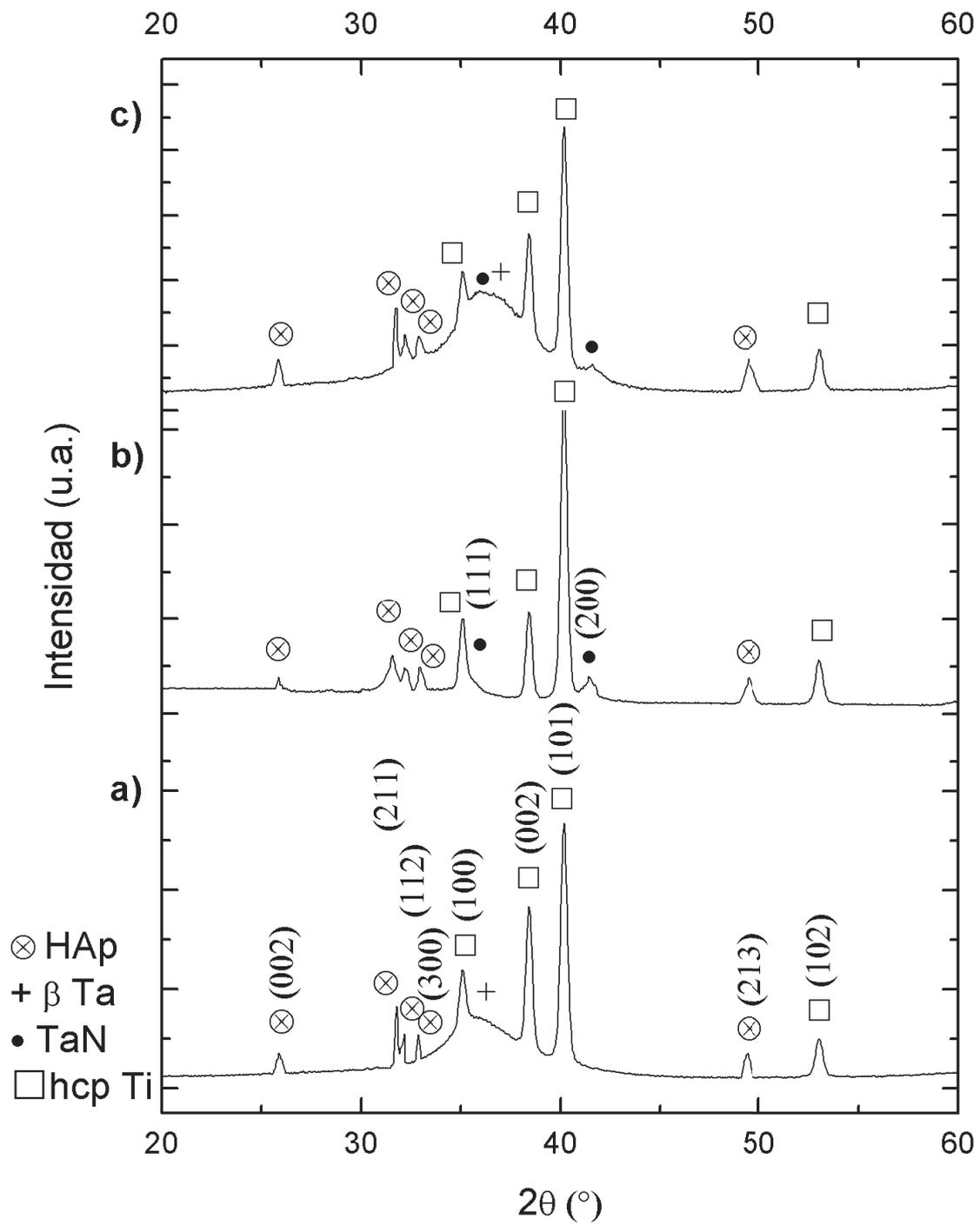


Figura 4.4. Difractograma de incidencia rasante de las películas delgadas de HAp depositadas sobre a) Ta/Ti b) TaN/Ti c) Ta-TaN/Ti.

4.1.3 Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier

Las figuras 4.5 y 4.6 se muestran los espectros de FTIR para las muestras HAp/Ta/TaN/SS316LVM y HAp/TaN/Ti respectivamente.

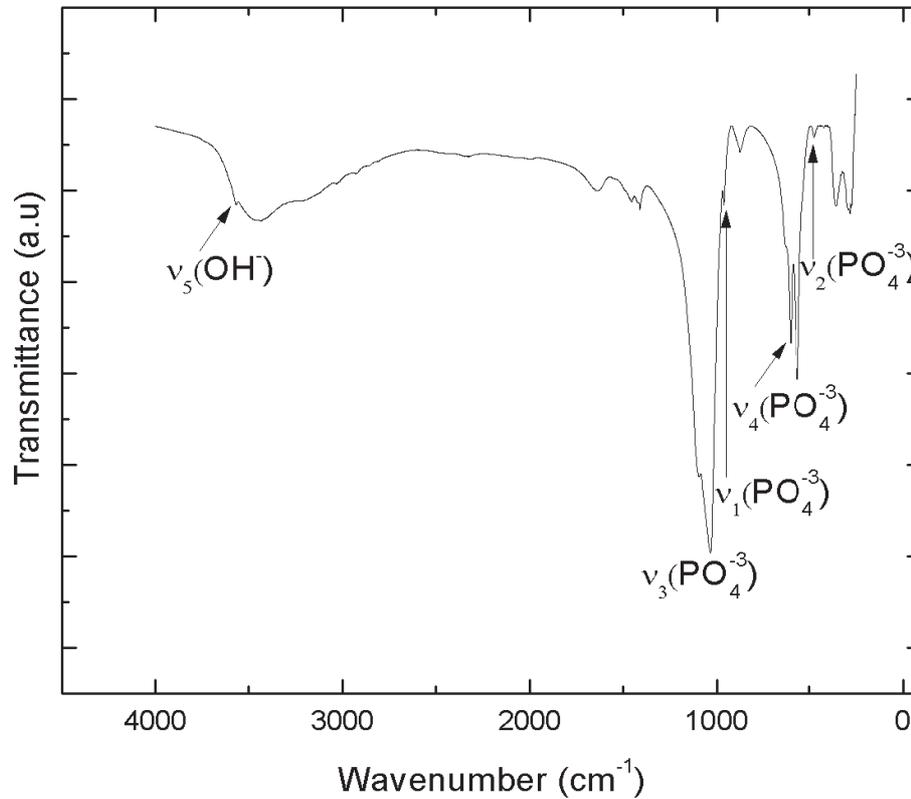


Figura 4.5. Espectro FTIR de la película HAp/Ta/TaN/SS316LVM inmersa en Fluido Corporal Simulado por tres semanas.

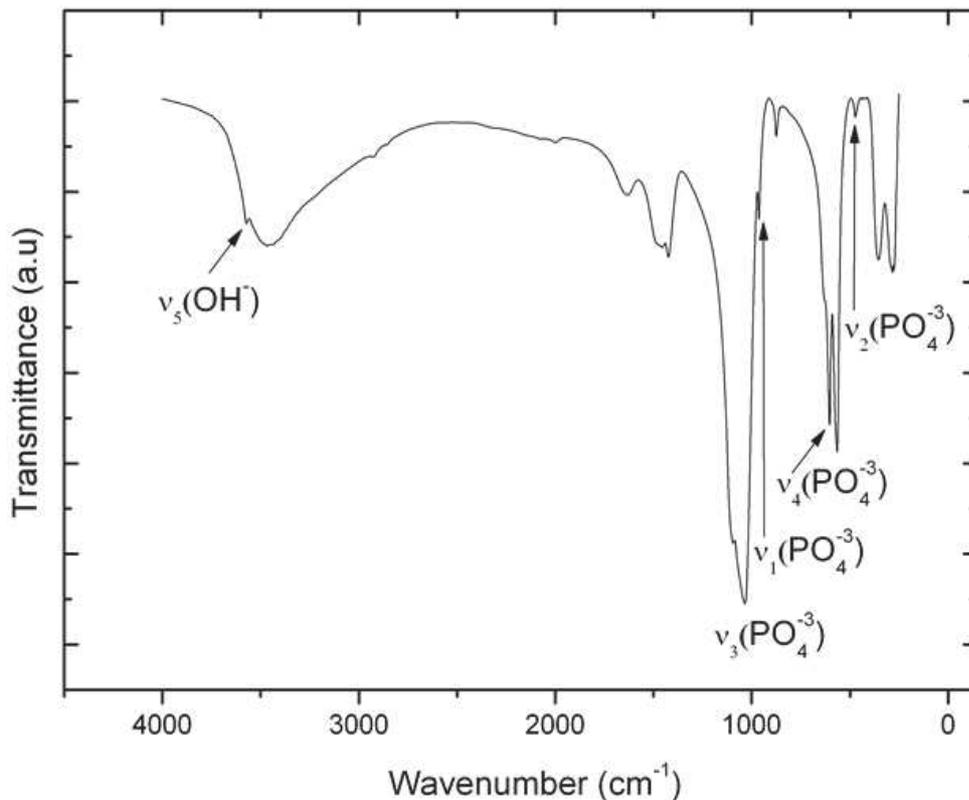


Figura 4.6. Espectro FTIR de la película HAp/TaN/Ti inmersa en Fluido Corporal Simulado por tres semanas.

En ambas muestras se observan los picos de FTIR presentes en el espectro y son los típicamente reportados para la formación de Hidroxiapatita debido a la presencia de las bandas características de los grupos fosfatos e hidroxilos. Los cuatro modos vibracionales del PO_4^{3-} : en 963 cm^{-1} la banda característica de la tensión “stretching” simétrica no degenerada del anión fosfato (PO_4^{3-} modo ν_1), en 470 cm^{-1} (PO_4^{3-} modo ν_2), en 1029 y $\sim 1095\text{ cm}^{-1}$ la tensión asimétrica del modo de vibración del grupo O-P-O (PO_4^{3-} modo ν_3), y en $601\text{-}561\text{ cm}^{-1}$ la flexión asimétrica triplemente degenerada del grupo O-P-O (PO_4^{3-} modo ν_4) [176], [180], [181]; así como también se puede observar la presencia de la banda de tensión del grupo OH^- en 3572 cm^{-1} [180], [182], [183].

Las características de los espectros son similares a aquellos de la fase mineral del hueso [184], [185], además la presencia del doblete de modo de flexión alrededor de $601\text{-}561\text{ cm}^{-1}$ indica que la fase de HAp obtenida es una fase cristalina [186] y se corrobora la deposición de HAp sobre las superficies estudiadas y que además está de acuerdo con los resultados obtenidos por Difracción de Rayos X de incidencia rasante.

4.1.4 Análisis químico de la superficie de las Películas Delgadas depositadas

La Espectroscopía de Fotoelectrones de Rayos X (XPS) fue utilizada para analizar la composición química de las especies en la superficie y se presentan en las figuras 4.7 – 4.10

En la figura 4.7, se muestra el espectro O (1s) para las capas depositadas sobre SS316LVM y Ti luego de una inmersión de tres semanas en fluido corporal simulado. Una envolvente con tres señales se observa para las películas de Ta en ambos sustratos. Un pico alrededor de 530.45 eV se atribuye a la formación de un óxido de Tántalo [148], [149] y el pico en 531.95 eV está relacionado con el enlace O-C [150] debido a la oxidación de la superficie y a la contaminación con carbón de la capa depositada durante la transferencia y almacenamiento de la muestra y un pico en 534.70 eV correspondiente al enlace O-P característico del compuesto HAp para la región externa [187], [188]. Se puede notar que para las películas de HAp/TaN/SS316LVM y HAp/TaN/Ti se observa en la deconvolución de las señales dos picos asignados al enlace O-P del compuesto HAp.

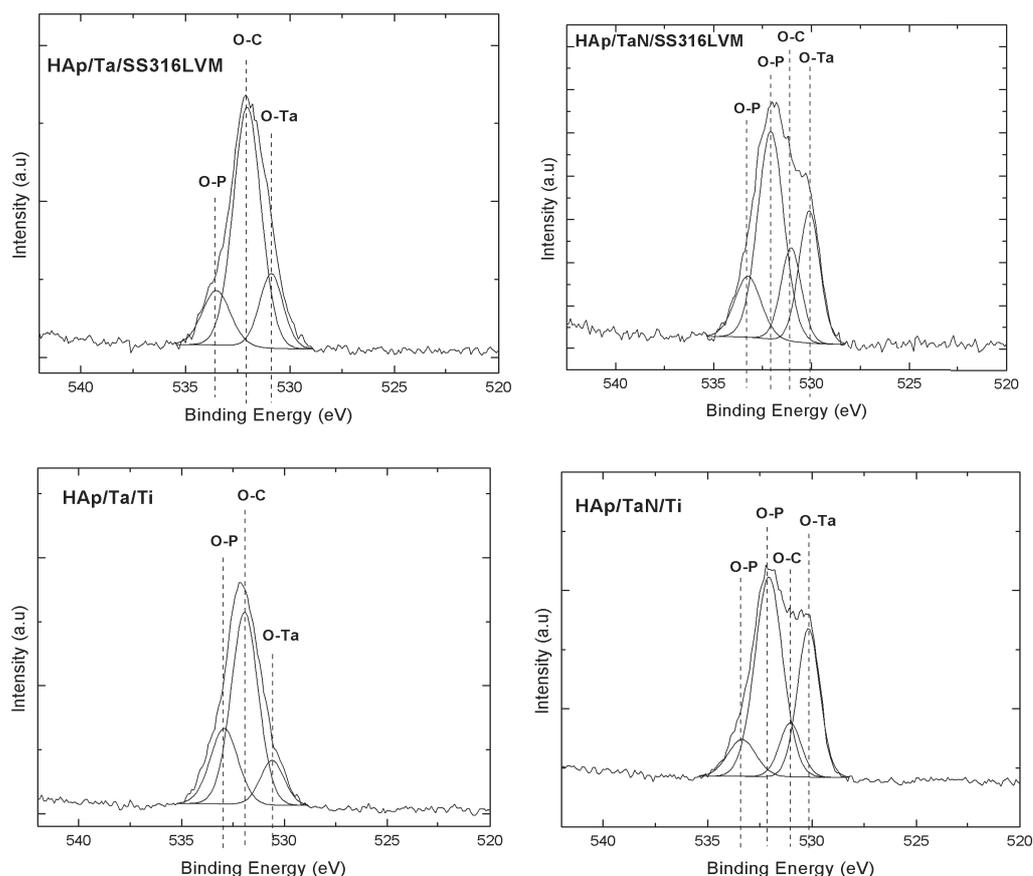


Figura 4.7. Espectros XPS del O 1s para las Películas Delgadas HAp/Ta y HAp/TaN depositadas sobre SS316LVM y Ti.

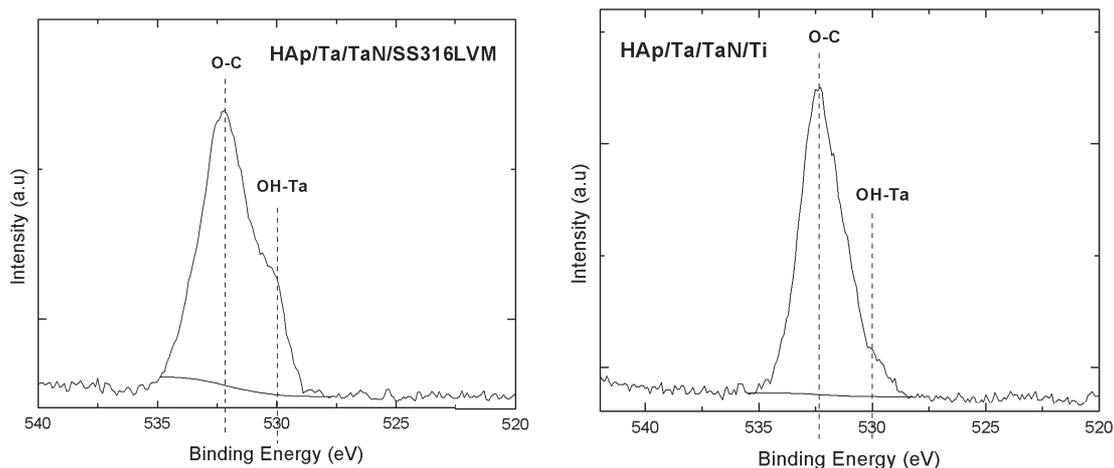


Figura 4.8. Espectros XPS del O 1s para las Películas Delgadas HAp/Ta/TaN depositadas sobre SS316LVM y Ti.

En los espectros de la bicapa (figura 4.8) para la señal O 1s, sólo se observan dos picos, un pico en 531.95 eV que está relacionado con el enlace O-C [150] debido a la contaminación con carbón de la capa depositada durante la transferencia y almacenamiento de la muestra y en la envoltura podemos ver cómo en 530.00 eV aparece un hombro que no se observa en la figura 4.7, este hombro fue identificado con la energía característica para el enlace OH-Ta [11]. Esta señal nos da una indicación del mecanismo de nucleación y crecimiento de la HAp en las superficies basadas en Tántalo estudiadas, el cual será explicado detalladamente más abajo en este capítulo luego de presentar todos los resultados de XPS, describiendo las fases del proceso para la formación de Hidroxiapatita sobre las muestras estudiadas al ser sumergidas en el fluido corporal simulado 1.5.

Los espectros de Ta (4f) para HAp/Ta/SS316LVM y HAp/Ta/Ti son similares a los mostrados en el capítulo 3, figura 3.20, al igual que en las bicapas HAp/Ta/TaN/SS316LVM y HAp/Ta/TaN/Ti se observa el mismo comportamiento. Un doblete correspondiente a la línea Ta (4d) en 230.50 eV y 242.20 eV, similar al mostrado en la figura 3.21.

Los espectros correspondientes a HAp/TaN/SS316LVM y HAp/TaN/Ti son análogos a los que se muestran en la figura 3.22, con las líneas Ta (4f) y Ta (4p_{3/2}) / N (1s). En ambas se encuentran los mismos tres estados químicos para Ta (4f_{7/2}) asignados al Nitruro de Tántalo y la presencia de un TaO_xN_y. En la parte de alta energía del espectro correspondiente a Ta (4p_{3/2}) / N (1s) tenemos tres señales N (1s), Ta(4p_{3/2}) y Ta (4p_{3/2}), cuyos estados químicos corresponden al TaN, TaN_x y TaO_xN_y, indicando la formación de Nitruro de Tántalo con diferentes estados de oxidación sobre los sustratos de SS316LVM y Ti que permanece sin modificarse luego de la inmersión de los mismos en el fluido corporal simulado durante tres semanas.

En las figuras 4.9 y 4.10 se muestran los espectros de las señales de Calcio y Fósforo detectadas en las muestras luego de tres semanas de inmersión el

fluido corporal simulado.

Encontramos dos picos en la señal de Ca2p (figura 4.9) el primer pico atribuido a Ca2p_{3/2} en 347.20 eV y el pico Ca2p_{1/2} en 350.70 eV, ambos están asociados a la hidroxiapatita [11], [187]–[189]. Cada pico mostrado en la señal Ca2p exhibe un doblete, lo cuál es típico para los óxidos de calcio [190].

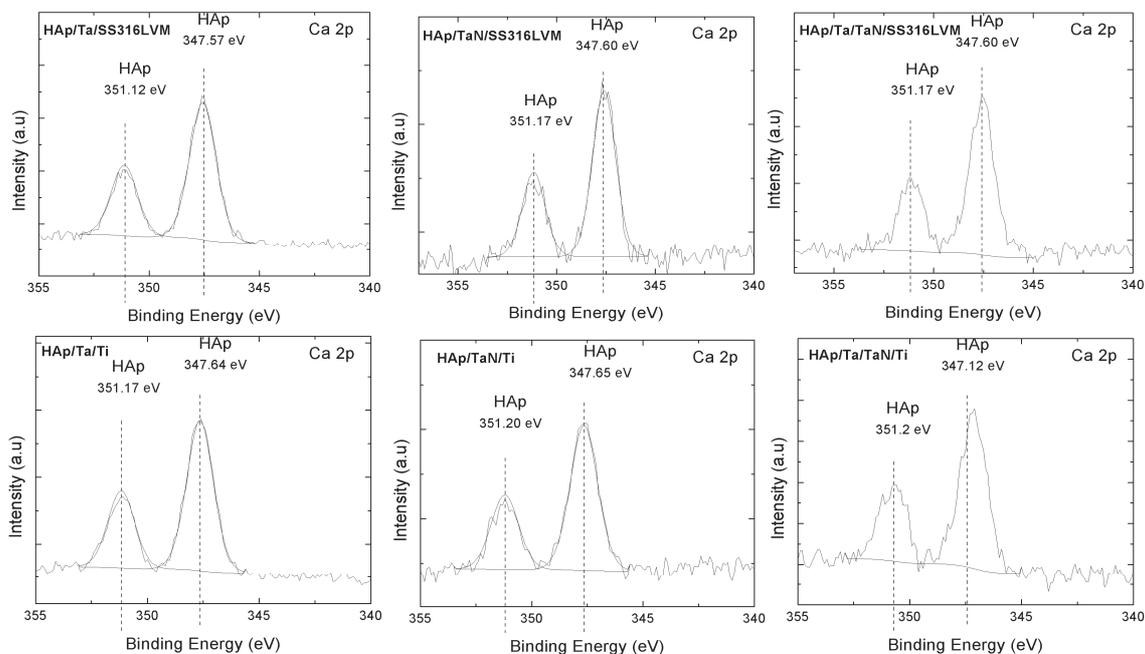


Figura 4.9. Espectros XPS del Ca 2p para las Películas Delgadas Películas Delgadas HAp/Ta, HAp/TaN y HAp/Ta/TaN depositadas sobre SS316LVM y Ti.

El espectro mostrado en la figura 4.10 revela la formación de HAp, la señal P2p muestra una envolvente que abarca la región entre 132 – 135 eV, región donde se encuentra un pico en 133.2 eV asociado con el Calcio y Oxígeno correspondientes con la formación de HAp [11], [187]–[189], [191], [192].

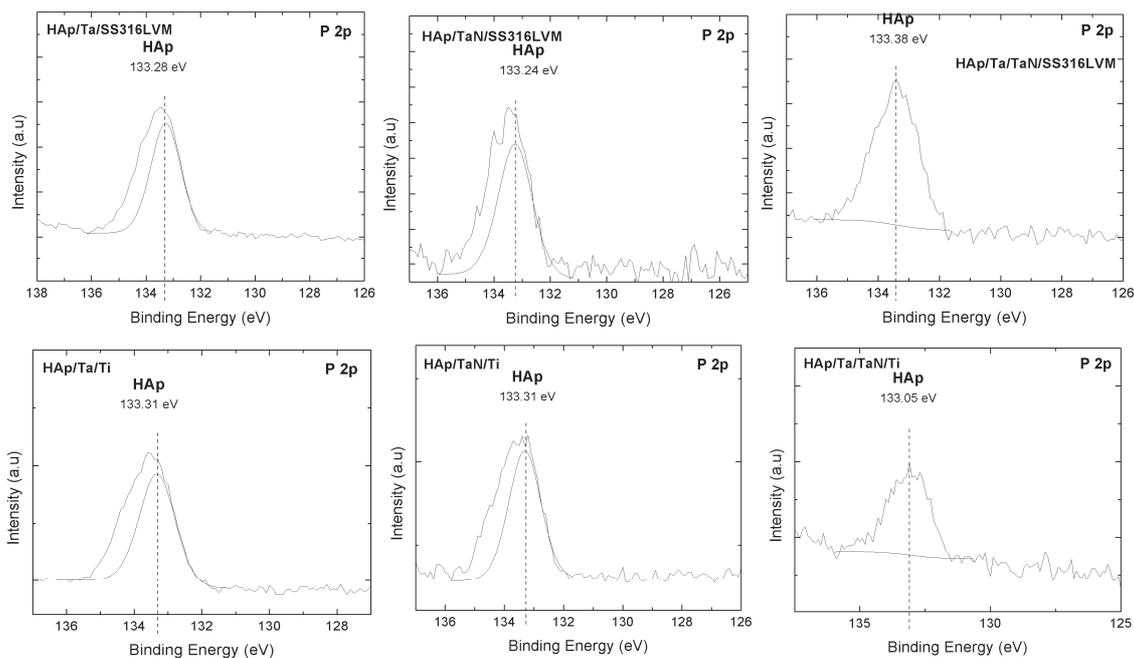


Figura 4.10. Espectros XPS del P 2p para las Películas Delgadas HAp/Ta, HAp/TaN y HAp/Ta/TaN depositadas sobre SS316LVM y Ti.

De acuerdo con los resultados presentados hasta ahora en este capítulo las superficies basadas en Ta bajo estudio presentan la propiedad de precipitar HAp sin necesidad de realizar tratamientos superficiales en un período de tres semanas inmersas en el FCS. Como ya se discutió más arriba en la sección 4.1.1, estas superficies tienen entonces la habilidad de inducir una nucleación heterogénea. Esta nucleación puede ser inducida por la existencia de ciertos grupos funcionales. Basándonos en los presentes resultados nuestras superficies poseen la habilidad de llevar a cabo el proceso de nucleación heterogénea. Sin embargo, como ha sido reportado en la literatura [11], [180], el aplicar el tratamiento superficial adecuado incidirá en la modificación de la tasa de formación de la HAp sobre la superficie acelerando el proceso.

Comúnmente el proceso de formación de la HAp sobre las superficies de Ta se muestra en la figura 4.11. Es un proceso análogo a como se deposita la HAp en las superficies de Ti y Si, siguiendo el método biomimético [176], [177], [193].

Grupos de Ta-OH se forman en la superficie del Tántalo metálico debido a la hidratación de Sluggish [11] de la capa de pasivación del Óxido de Tántalo en la superficie en el FCS 1.5 (figuras 4.7 y 4.8), estos grupos luego se van a unir con pequeñas cantidades de iones Ca^{2+} para formar una especie de Tántalato de Calcio no estequiométrico, en la siguiente fase esta especie química se combinará con los iones fosfatos para empezar la nucleación heterogénea con la formación de la fase amorfa de fosfato de calcio [194], luego el exceso de iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} serán adsorbidos en la superficie para formar la HAp, nuestro FCS tiene exceso de iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} lo cual contribuirá a que este

proceso ocurra más rápidamente ya que hay mayor cantidad de iones disponibles en el fluido adyacente para ser adsorbidos y aumentar la tasa de adsorción que prolifere más rápidamente la deposición.

Si observamos el esquema de la figura 4.11 en el FCS están presentes otros iones que también participan en el proceso de nucleación y crecimiento de la HAp, los iones H_3O^+ en el fluido van a ser consumidos por el intercambio de los iones Na^+ , lo que aumentará la concentración de iones OH^- en el fluido circundante [11], esto también incrementará la actividad iónica producto de la apatita en el fluido y por lo tanto la tasa de nucleación se verá incrementada.

No sólo los grupos Ta-OH siguen este mecanismo también lo hacen los grupos Ti-OH y Si-OH, ha sido reportado que estos grupos están cargados negativamente en ambientes fisiológicos como el FCS [195]–[197], esta carga negativa pudiera hacer más eficiente el enlace entre estos grupos y los iones Ca^{2+} y la subsecuente nucleación y crecimiento de la Hidroxiapatita en el cuerpo humano.

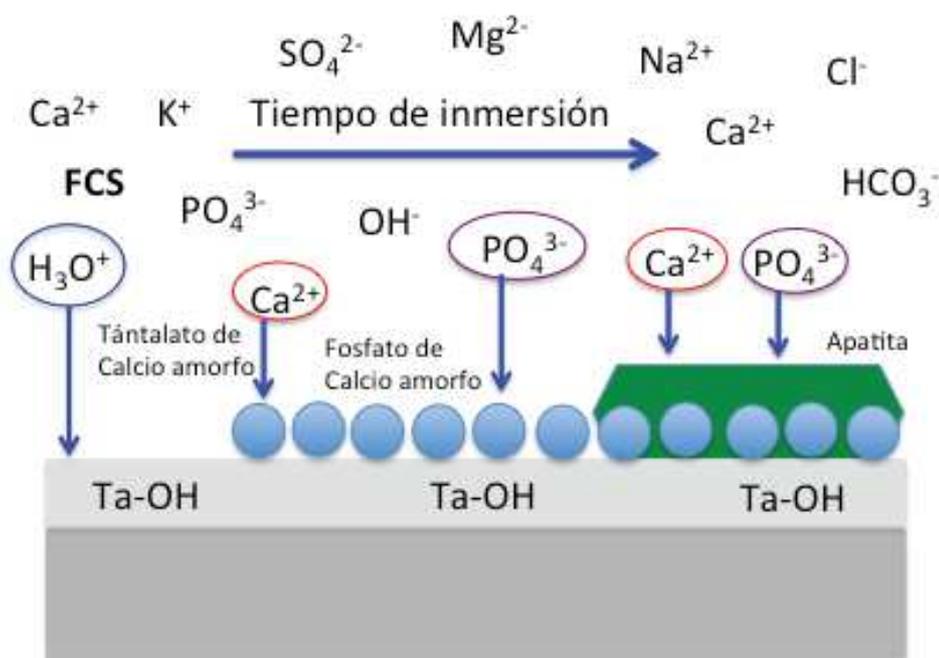


Figura 4.11. Proceso de nucleación y crecimiento de Hidroxiapatita en el tiempo sobre una superficie de Tántalo inmersa en una solución de Fluido Corporal Simulado.

4.1.5 Microestructura y rugosidad de la capa de Hidroxiapatita depositada usando el método biomimético

En la figura 4.12 se muestran las imágenes de microscopía Electrónica de Barrido de Alta Resolución para las películas delgadas basadas en Tántalo sobre sustratos de SS316LVM y Ti luego de tres semanas sumergidas en Fluido Corporal Simulado 1.5

Las películas delgadas de Ta, TaN y Ta/TaN depositadas sobre los sustratos de SS316LVM y Ti, tienen una microestructura homogénea tipo coliflor (figura 3.11), ahora en la figura 4.12 podemos observar cómo hay una capa que cubre dicha microestructura.

En la figura mostramos las imágenes con dos micromarcas una de 50 μm que nos permite explorar cómo se deposita sobre la película delgada la nueva capa y una a mayor aumento con un valor de micromarca de 3 μm que nos muestra la microestructura de la nueva capa depositada.

Luego de tres semanas de inmersión en FCS 1.5, se observa que se deposita una capa que va cubriendo la superficie. En las figuras correspondientes al sustrato de SS316LVM (figuras 4.12a), 4.12c) y 4.12e) se observan zonas donde no hay depósitos y otras zonas con aglomerados que son bastante gruesos y que parecieran no anclarse fuertemente a las superficies de Ta sino más bien dan la sensación de estar un poco sueltos.

Las figuras 4.12g), 4.12i) y 4.12k) corresponden al sustrato de Ti, en estas imágenes se observa que la capa depositada de HAp cubre de manera más uniforme las superficies de Ta y en comparación con la capa depositada en las muestras con el sustrato de SS316LVM. Cualitativamente podemos decir que es un recubrimiento más fino y no se observan aglomerados gruesos sino más bien aglomerados finos uniformemente distribuidos.

De estas observaciones podemos decir que la naturaleza del sustrato influye en la calidad del depósito de HAp. Ya que buscamos un recubrimiento más fino y uniforme en lugar de aglomerados gruesos que son sensibles a desprenderse y fracturarse se podría elegir a HAp/Ta/TaN/Ti como el más idóneo donde se observa que luego de tres semanas el depósito es más uniforme y va cubriendo la superficie más homogéneamente.

Las imágenes 4.12b), 4.12d), 4.12f), 4.12h), 4.12j) y 4.12l) nos muestran la microestructura de la capa de HAp depositada y exhiben la típica estructura tipo coral que ha sido previamente reportada en la literatura [180] para los depósitos de HAp por el método biomimético.

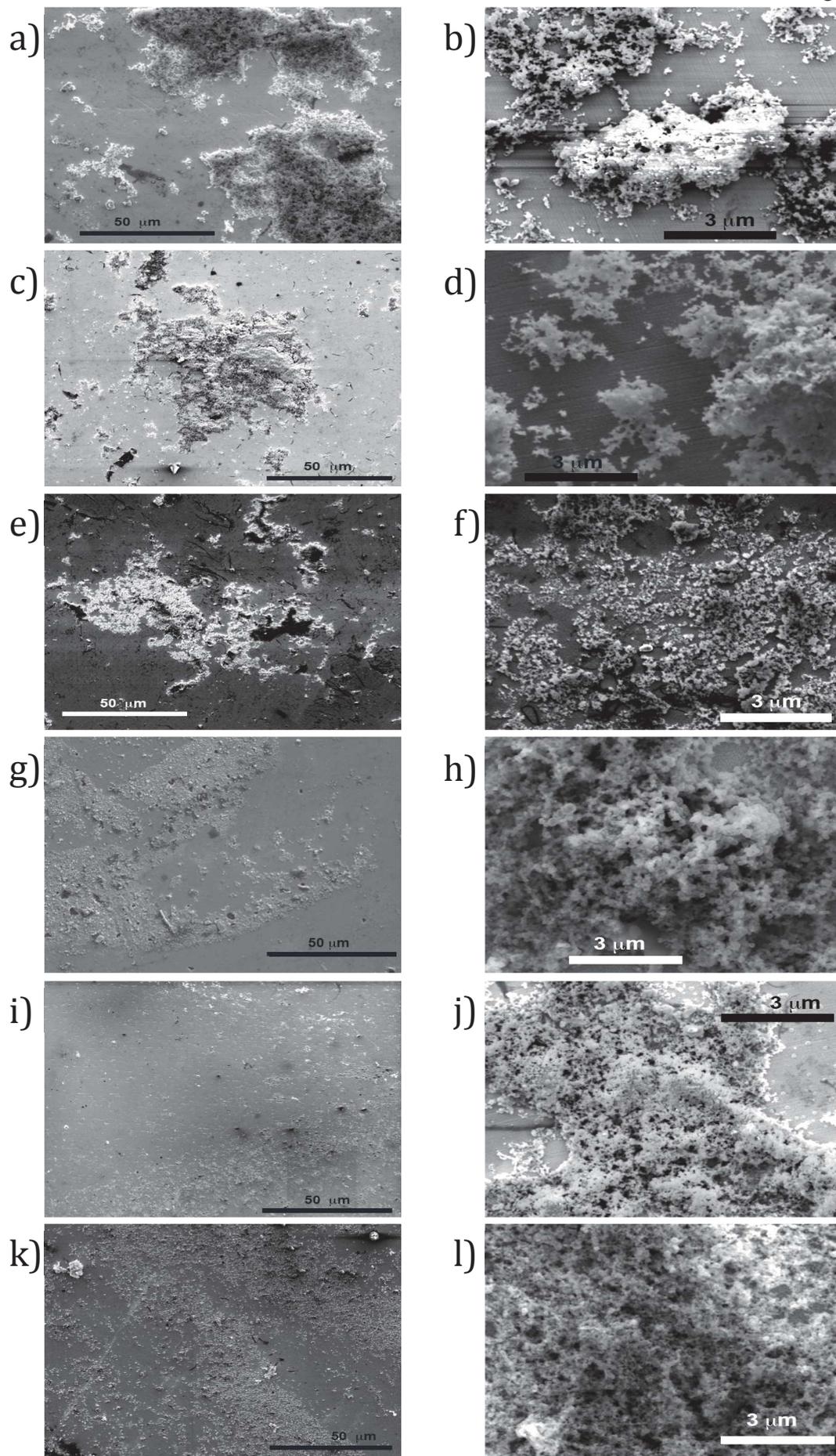


Figura 4.12. Micrografías de MEB. a) y b) HAp/Ta/SS316LVM, c) y d) HAp/TaN/SS316LVM, e) y f) HAp/Ta/TaN/SS316LVM, g) y h) HAp/Ta/Ti, i) y j) HAp/TaN/Ti, k) y l) HAp/Ta/TaN/Ti.

En la figura 4.13 se muestra el espectro EDX para la película HAp/Ta/TaN/SS316LVM luego de estar sumergida tres semanas en el FCS 1.5 y se observan las señales de Ca y P presentes en el espectro, para obtener la relación Ca/P presentadas en la tabla 4.1 se tomaron un promedio de 10 zonas donde se evaluó esta relación y son los resultados que se muestran a continuación. Se obtuvo un valor de 1.72 ligeramente más alto al 1.66 correspondiente a la relación Ca/P de la HAp estequiométrica.

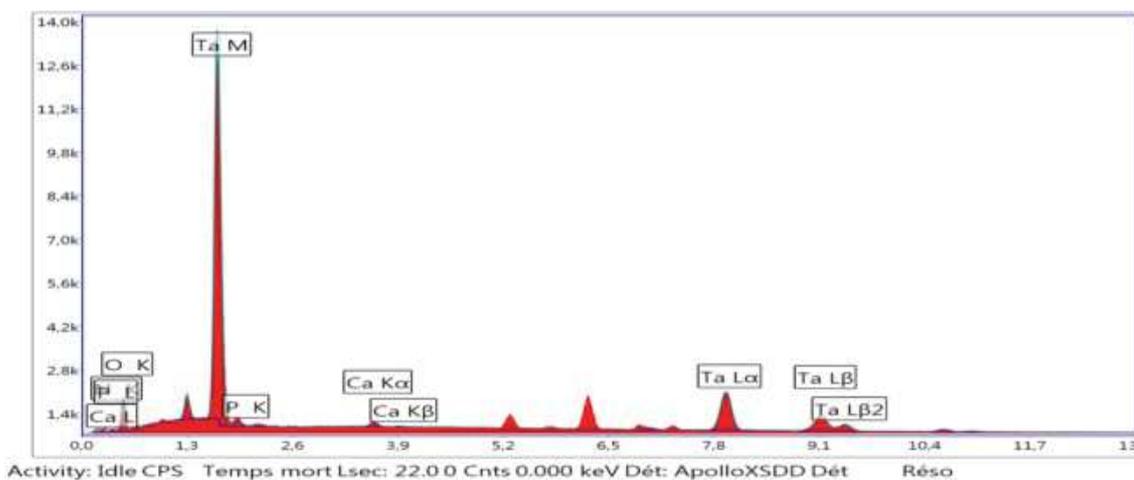


Figura 4.13. Espectro EDX de la película delgada HAp/Ta/TaN/SS316LVM luego de la inmersión en FCS 1.5 durante tres semanas.

Elemento	Ta	N	O	Ca	P
% Atómico	29.24	11.75	55.69	2.10	1.22

Tabla 4.1. Tabla de cuantificación de elementos para la película delgada HAp/Ta/TaN/SS316LVM luego de la inmersión en FCS 1.5 durante tres semanas.

En la figura 4.14 se muestra el espectro de EDX para la película HAp/Ta/Ti luego de estar sumergida tres semanas en el FCS 1.5 y se observan las señales de Ca y P presentes en el espectro. Para obtener la relación Ca/P presentada en la tabla 4.2 se tomaron un promedio de 10 zonas donde se evaluó esta relación y son los resultados que se muestran a continuación. Se obtuvo un valor de 1.66, reportado como la relación Ca/P de la HAp estequiométrica.

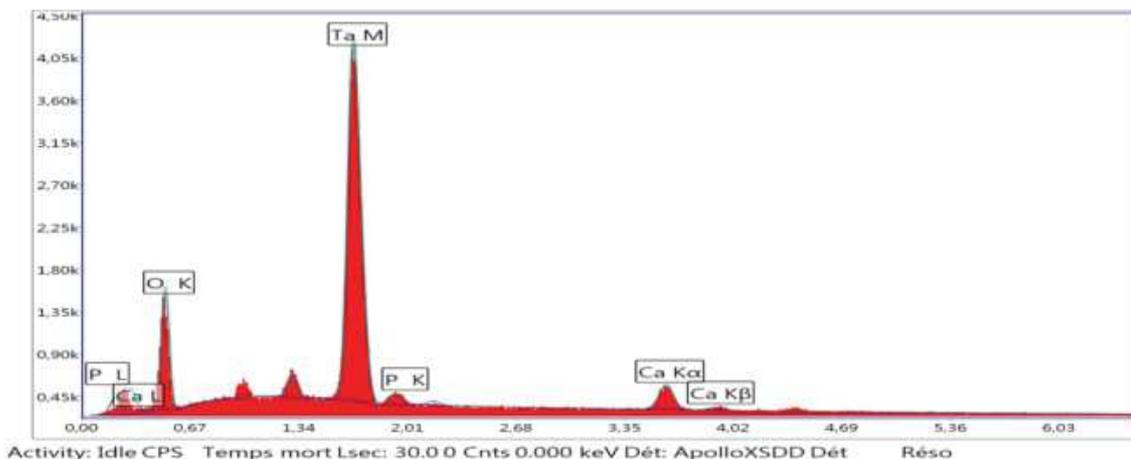


Figura 4.14. Espectro EDX de la película delgada HAp/Ta/Ti luego de la inmersión en FCS 1.5 durante tres semanas.

Elemento	Ta	O	Ca	P
% Atómico	10.30	87.97	1.08	0.65

Tabla 4.2. Tabla de cuantificación de elementos para la película delgada HAp/Ta/Ti luego de la inmersión en FCS 1.5 durante tres semanas.

Esta técnica de carácter semicuantitativo nos permite encontrar las relaciones esperadas para la relación Ca/P lo que esta en concordancia con los resultados obtenidos por las diferentes técnicas de caracterización estructurales y químicas.

La rugosidad fue calculada a partir de las desviaciones en la altura de los perfiles obtenidos y se listan en la tabla 4.3.

N°	Película	Rugosidad (nm) 0 semanas FCS	Rugosidad (nm) 3 semanas FCS
1	Ta/SS316LVM	10.0 ± 1.0	12.5 ± 1.3
2	TaN/SS316LVM	4.0 ± 0.4	8.0 ± 0.8
3	Ta/TaN/SS316LVM	2.0 ± 0.2	10.0 ± 1.0
4	Ta/Ti	4.0 ± 0.4	10.0 ± 1.0
5	TaN/Ti	10.0 ± 1.0	12.5 ± 1.3
6	Ta/TaN/Ti	2.0 ± 0.2	6.0 ± 0.6

Tabla 4.3. Valores de rugosidad obtenidos a partir de las micrografías de MFA para las diferentes superficies basadas en Ta luego de la inmersión en FCS 1.5 durante tres semanas.

Luego de tres semanas en inmersión en FCS 1.5, rugosidad de la superficie de las películas basadas en Ta aumentó tal y como se observa en la tabla 4.3, y como ha sido reportado por otros autores [198], [199]. Esto debido a que empieza a depositarse la capa de HAp sobre la superficie por lo que ocurre el proceso de nucleación y el aumento registrado en la rugosidad ya que el núcleo Ca-P va creciendo consumiendo los iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} del fluido corporal simulado. Estos núcleos van creciendo y empiezan a coalescer dando como resultado que la capa de HAp se vuelva más densa y uniforme como puede verse en la figura 4.15.

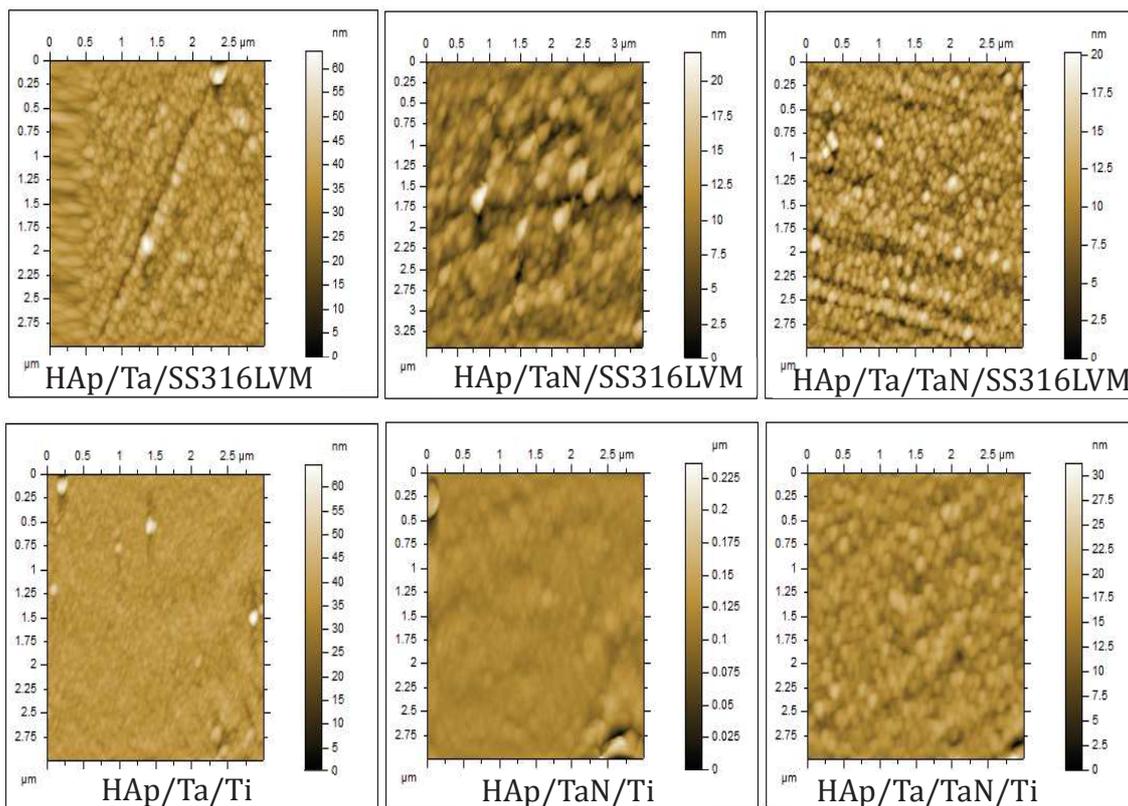


Figura 4.15. Imágenes de Microscopía de Fuerza Atómica de las diferentes Películas Delgadas depositadas sobre SS316LVM y Ti e inmersas en FCS 1.5 durante tres semanas.

En la figura 4.15 se observa la imagen topográfica obtenida mediante microscopía de fuerza atómica de las diferentes superficies basadas en Ta luego, de tres semanas sumergidas en FCS 1.5. Se observa que la capa de Hidroxiapatita depositada luego de tres semanas sobre todas las superficies tiene una apariencia granular, es relativamente densa y tiene predominantemente una forma esférica y están integradas dentro o en la parte superior de las superficies previamente sintetizadas formando una capa uniforme.

4.1.6 Propiedades Mecánicas de las Películas HAp/TaN/SS316LVM y HAp/Ta/Ti inmersas en FCS 1.5 durante tres semanas

Medidas de nanoindentación se realizaron sobre el sustrato las películas delgadas de HAp/TaN/SS316LVM y HAp/Ta/Ti luego de ser inmersas en FCS 1.5 durante tres semanas. La evolución de la carga vs la profundidad se muestran en las figuras 4.16 y 4.17 respectivamente.

Los cálculos de las propiedades mecánicas muestran en ambos casos un aumento del módulo de elasticidad y la dureza a los valores reportados en la literatura para distintos tipos de hueso [200]–[203]; Así como están en concordancia con los valores reportados para la HAp [204], [205]. Las gráficas exhiben una clara tendencia al incremento del Módulo de Young con la profundidad de contacto mientras que la dureza permanece uniforme a lo largo del mismo rango de profundidad. El cambio en el módulo para ambos sustratos puede ser explicado debido al incremento en la contribución del módulo elástico del SS316LVM que es más alto en comparación con el módulo de elasticidad del Ti efecto, que decrece rápidamente hacia la superficie.

La dureza (H), el Módulo de Young (E) de las películas delgadas de HAp/TaN/SS316LVM y HAp/Ta/Ti luego de ser inmersas en FCS 1.5 durante tres semanas se muestran en la tabla 4.4

N°	Muestra	H* (GPa)	E* (GPa)
1	HAp/TaN/SS316LVM	5.5 ± 0.2	153.1 ± 10.5
2	HAp/Ta/Ti	5.6 ± 0.4	122.9 ± 4.8

*promedio de 7 diferente posiciones a 30nm de profundidad de contacto y 20 puntos.

Tabla 4.4. Dureza y Módulo de Young calculados para las películas HAp/TaN/SS316LVM y HAp/Ta/Ti.

Los resultados obtenidos para el módulo de elasticidad y la dureza aunque no son concluyentes y habría que hacer otros estudios, comparados con los valores reportados para el hueso, se han visto significativamente mejorados debido a la deposición de la capa de Hidroxiapatita. La presencia de esta capa fortalecerá entonces la calidad del hueso nuevo que crecerá, por lo tanto la superficie de implantes metálicos recubiertos con HAp no solo mejorará y acelerará la osteointegración como ya lo hemos visto mediante los resultados anteriores de este capítulo sino que también proporcionará una mejora en las propiedades mecánicas.

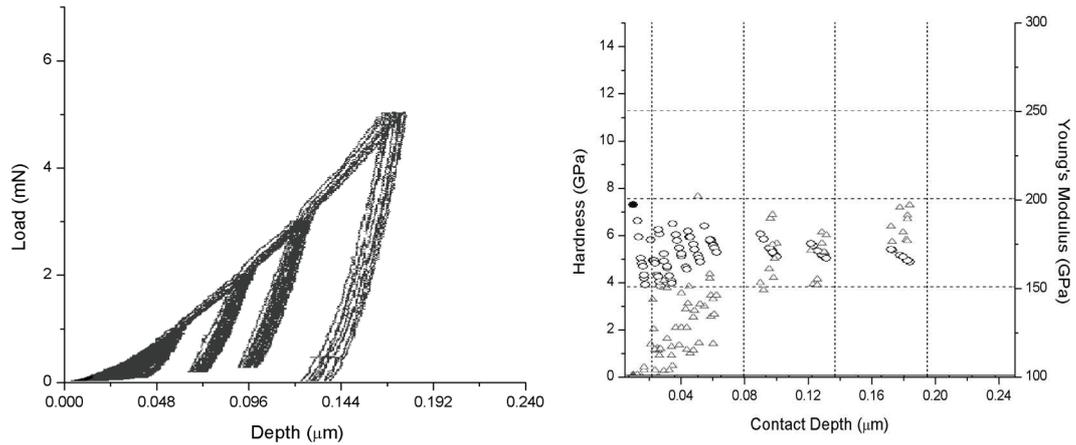


Figura 4.16. Curva de carga - desplazamiento producida durante el contacto (izquierda) y Dureza calculada \circ y resultados del Módulo de Young Δ vs. Profundidad de contacto (derecha) para la película HAp/TaN/SS316LVM.

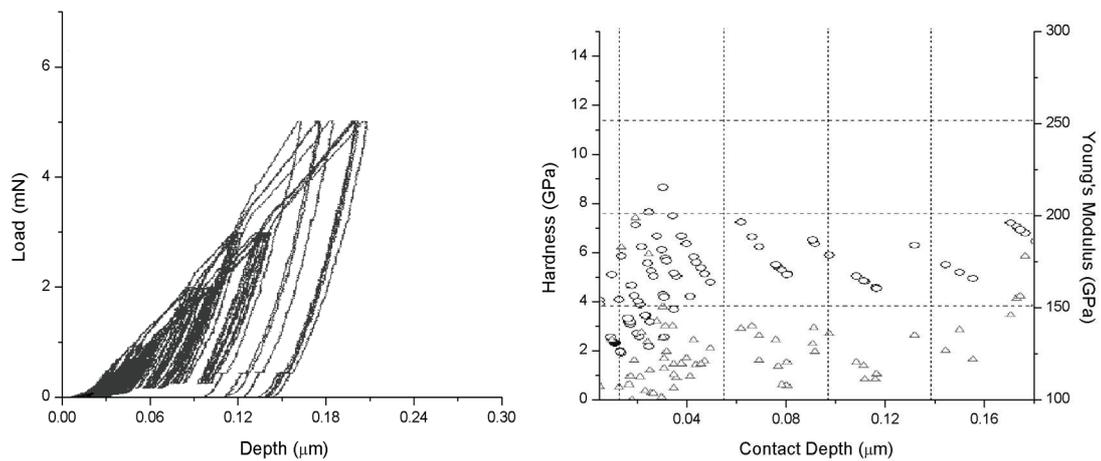


Figura 4.17. Curva de carga - desplazamiento producida durante el contacto (izquierda) y Dureza calculada \circ y resultados del Módulo de Young Δ vs. Profundidad de contacto (derecha) para la película HAp/Ta/Ti.

Capítulo V

Biocompatibilidad y Propiedades Antibacteriales de las diferentes superficies estudiadas.

En los capítulos 3 y 4 se obtuvieron las películas delgadas basadas en Tántalo y la deposición sobre los mismos de recubrimientos de Hidroxiapatita y se realizó la caracterización en cuanto a sus propiedades físico-químicas. Para completar su evaluación en este capítulo se estudiaron algunos indicadores de la respuesta celular y actividad bacteriana de las superficies lo cual es indispensable para en análisis integral de un biomaterial.

5.1 Respuesta Celular

La efecto de los materiales basados en Ta y de la HAp sobre la respuesta en un tejido adyacente aún no ha sido plenamente descrito, a pesar de que varios autores han demostrado que la respuesta celular depende de las características físico- químicas de la superficie que estará en contacto con la célula, como composición química [206], [207], la cristalinidad [208] y la rugosidad [209]. Las características superficiales necesarias para una óptima osteointegración no han sido totalmente comprendidas.

los estudios *in vitro* son el primer paso para la comprensión de la interacción material-célula dado que estos sistemas no presentan la complejidad de los sistemas *in vivo*. Los cultivos celulares son un procedimiento para el estudio de células vivas en un medio artificial que permite reproducir de forma bastante fiable las condiciones biológicas que las células tienen en su lugar de origen. Como nuestro interés es sintetizar y caracterizar películas delgadas que se utilicen como implantes óseos es necesario que exhiban propiedades de reparación y regeneración ósea por lo que el cultivo celular utilizado fue el proveniente de las células óseas concretamente osteoblastos que son células formadoras de la matriz ósea y se encuentran en el hueso que crece o se desarrolla.

5.1.1 Observación mediante fluorescencia con Faloidin - FITC/DAPI (ensayo de adhesión)

La tinción mediante Faloidin-FITC y DAPI permite la visualización mediante fluorescencia de la célula. El faloidin se une a los filamentos de actina mientras que el FITC es un fluoróforo que se excita a 492 nm y emite en 518 nm (verde) permitiendo la visualización del citoesqueleto; y DAPI es un intercalador fluorescente de DNA que se excita a 358 nm y emite en 461nm (azul) y permite la visualización del núcleo [210].

Se obtuvo en todas las muestras evaluadas una excelente biocompatibilidad. Esto se evidencia por una morfología adecuada de la célula la cual posee su

citoesqueleto extendido y maximizando el área de contacto y adhesión a la superficie del material (figura 5.1). Las muestras control sin recubrimiento de SS316LVM y Ti no se diferencian significativamente de las muestras con las películas delgadas basadas en Ta y el recubrimiento de Hidroxiapatita.

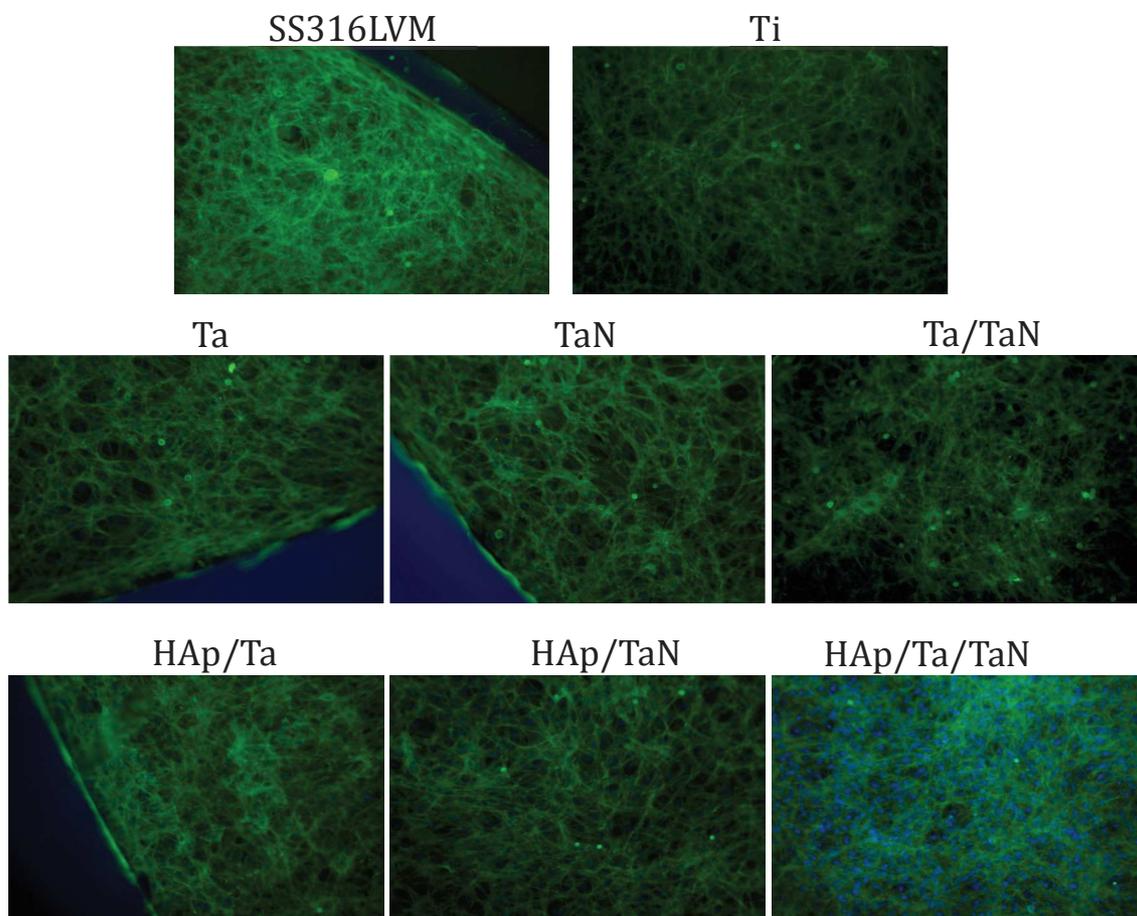


Figura 5.1: Resultados obtenidos mediante faloidin-FITC/DAPI en cultivos de osteoblastos por 24 horas sobre las diferentes superficies.

La adhesión es un paso esencial y tiene gran impacto en muchos procesos fisiológicos esenciales como por ejemplo respuesta inflamatoria, proliferación y diferenciación cuando el biomaterial es implantado en el cuerpo; asimismo, a través de una mejor adhesión se puede conseguir una mejor osteointegración de los implantes [211]. La topografía, composición, carga y estados químicos de la superficie de un biomaterial influyen la adhesión de los osteoblastos [212].

El SS316LVM y el Ti han sido estudiados desde el punto de vista biocompatible y han exhibido buenas propiedades de adhesión celular tal y como observamos en la figura 5.1. Por otro lado, el Tántalo y superficies basadas en él, es un biomaterial de interés reciente para aplicaciones ortopédicas, por su alta resistencia a la corrosión y por ser bioactivo, estimulando la formación de una capa de apatita en presencia de fluido corporal simulado como lo evidencian los resultados mostrados en el capítulo 4 de este trabajo, así como también

tiene carácter osteoconductor, sin embargo el alto costo asociado a este material dificulta utilizarlo como componente principal, por lo que se ha propuesto su uso como recubrimiento [213]. Frandsen *et al*, realizaron pruebas de adhesión y proliferación en un período de 3 semanas con nanotubos de titanio recubiertos con TiO_2 y Ta, obtuvo que el Ta era más atractivo para las células que el recubrimiento de TiO_2 , en el resultado obtenido en este ensayo se obtuvo un comportamiento similar entre ambos recubrimientos, esto aunado a la alta concentración celular y al breve tiempo para el estudio de la adhesión, por lo que pareciera haber una respuesta inicial similar pero serían necesarios cultivos prolongados en el tiempo para determinar diferencias a nivel de proliferación y osteogénesis.

Dado que tanto el SS316LVM como el Titanio son conocidos por una excelente biocompatibilidad, se puede asumir que todas las superficies evaluadas en este ensayo evidenciaron una biocompatibilidad equiparable a la de estos dos conocidos materiales concerniente a la estimulación de la adhesión, siendo acorde estos resultados a la bibliografía previamente mencionada. Los resultados obtenidos son significativos ya que se puede distinguir la morfología en respuesta al sustrato.

5.1.2 Evaluación de la morfología celular

Para llevar a cabo la observación de las células en las superficies estudiadas primero se necesita hacer una preparación especial de la muestra que consta de la deshidratación y fijación de las células sobre la superficie, dicho procedimiento se expone en detalle en el capítulo 2 sección 2.3.1. Las micrografías observadas a continuación en las figuras 5.2 y 5.2 corresponden a un único tiempo de incubación de 24h.

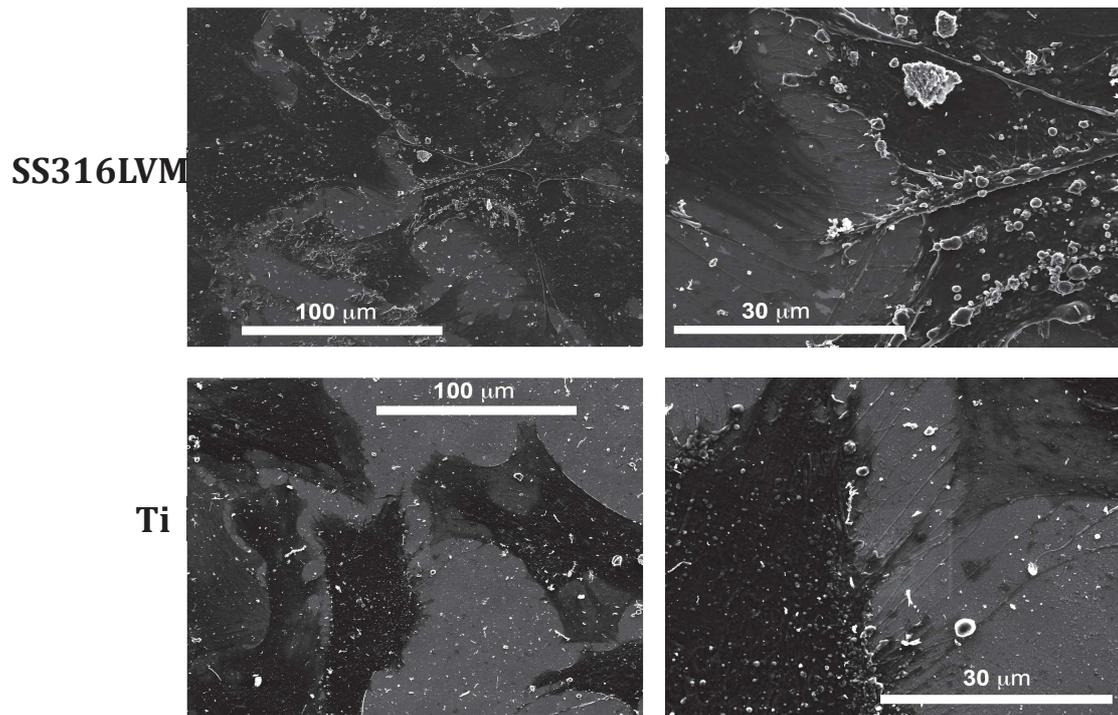


Figure 5.2 Micrografías de Microscopía Electrónica de Barrido de las células sobre los sustratos SS316LVM y Ti para un período de incubación de 24h.

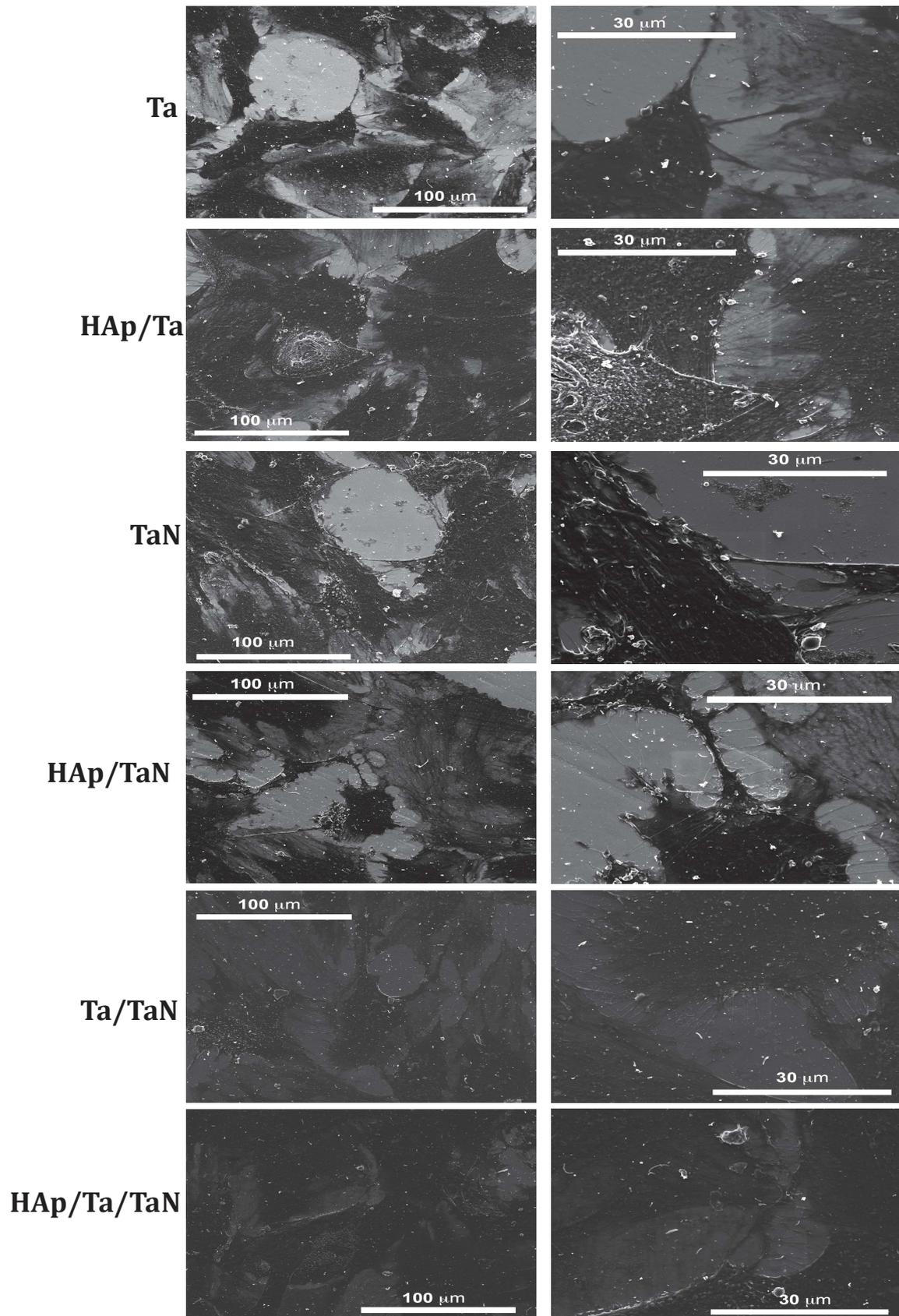


Figure 5.3 Micrografías de Microscopía Electrónica de Barrido de las células sobre los sustratos de las distintas superficies estudiadas para un período de incubación de 24h.

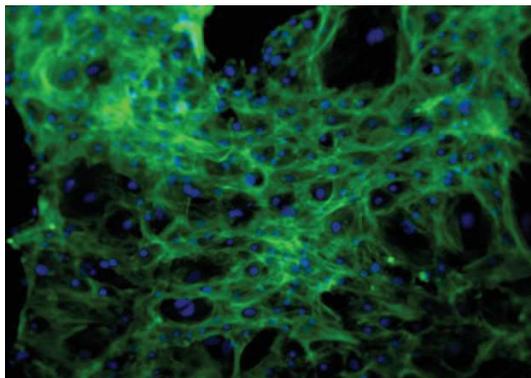
Morfológicamente las células cultivadas sobre las diferentes superficies no presentan diferencias significativas. En todas las superficies se observó cómo las células osteoblásticas se adhieren adaptándose a las irregularidades de los recubrimientos con extensiones citoplasmáticas, por lo que los recubrimientos obtenidos presentan una rugosidad óptima para la adherencia de los osteoblastos y se puede decir que el anclaje de las células no depende de las fases presentes en los recubrimientos, ya que al comparar las figuras 5.2 y 5.3 se puede ver que en todos los casos hay adherencia y proliferación de la célula a pesar del corto tiempo de cultivo (24h) lo que hace comparable las propiedades biocompatibles de los controles (SS316LVM y Ti) con las películas delgadas basadas en Ta y los recubrimientos de HAp. En las imágenes también se puede ver claramente cómo la célula cubre la superficie se adhiere y busca interconectarse con otra célula vecina a través de la prolongación de sus filipodios para comenzar la migración de la célula y su proliferación.

Se observa que las células son planas, están bien adheridas a la superficie y exhiben la extensión completa de la matriz extracelular, mostrando un carácter osteoconductor.

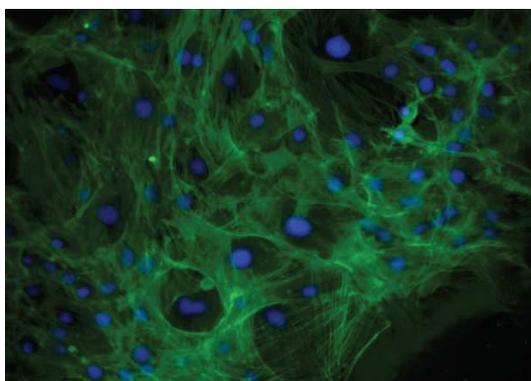
5.1.3 Observación mediante fluorescencia con Faloidin - FITC/DAPI (ensayo de adhesión) de las Películas Delgadas de Sílice Mesoporosa depositadas sobre Titanio.

Siguiendo la misma metodología de la sección 5.1.1 se evaluó la adhesión de los osteoblastos en estas superficies y se obtuvo que las muestras fueron superficies afines para la adhesión celular, dado que se observó fenotipos celulares extendidos para maximizar el área de contacto con el material. No hubo diferencia perceptible entre la variable de la cantidad de material depositado que determina el espesor de la película delgada (1 ml ó 2 ml). Y las muestras con 5000 rpm presentaron una adhesión mucho mayor de células que las muestras de 3000 rpm, esto debido a que la velocidad de giro en el "spin coating", está relacionado con la propagación del Sol sobre la superficie y la morfología del recubrimiento, arreglos más ordenados y uniformes se observaron cuando se depositaron las películas con 5000 rpm (figura 3.25) favoreciendo la adhesión celular sobre estas superficies .

5000 rpm 1 ml



5000 rpm 2 ml



3000 rpm 1 ml

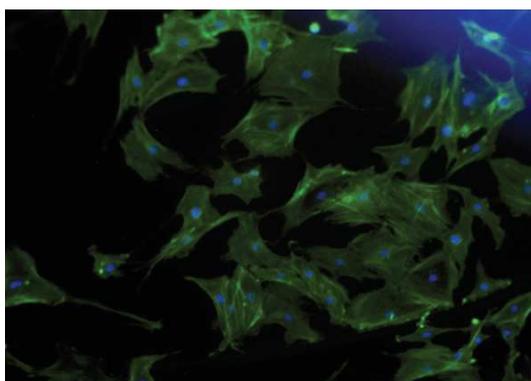


Figura 5.4: Resultados obtenidos mediante faloidin-FITC/DAPI en cultivos de osteoblastos por 24 horas sobre las películas delgadas mesoporosas de Sílice depositadas sobre los sustratos de Ti.

5.2 Formación de Biopelículas y Respuesta Antibacterial

Existen diversos sistemas para estudiar la adhesión bacteriana en superficies. Para ello, una superficie previamente preparada se superpone con una suspensión de bacterias durante un período de tiempo determinado. Las bacterias no adherentes se eliminan a través de lavados y las bacterias adheridas o biopelículas sobre la superficie se evalúan a través de diferentes métodos.

Estudios previos han demostrado la formación *in vitro* de biopelículas sobre superficies comúnmente utilizadas en cirugías de reemplazo óseo SS316LVM y Ti, así como en aleaciones de Ti y recubrimientos como la HAp que pretenden promover la integración ósea y disminuir el éxito de colonización por microorganismos [18], [118], [120], [121]. *P. aeruginosa* es un patógeno importante en ambientes hospitalarios a nivel mundial y considerado modelo de estudio de biopelículas. Hasta la fecha y en lo que concierne a nuestra documentación los reportes de biopelículas de *P. aeruginosa* en superficies para prótesis no incluyen investigaciones en superficies recubiertas con TaN. Del mismo modo, en Venezuela no se disponen de estudios previos de la prevalencia de *P. aeruginosa* en infecciones de prótesis óseas y biopelículas sobre materiales dispuestos para ese fin.

A continuación presentaremos los resultados obtenidos por Microscopía Electrónica de Barrido para determinar la morfología y distribución de las biopelículas sobre las diferentes superficies estudiadas.

5.2.1 Adhesión bacteriana y morfología de biopelículas de *P. aeruginosa* por MEB

La metodología para la preparación de las muestras se explica con detalle en la sección 2.5 del capítulo 2.

La evaluación por MEB de las superficies controles incubadas sin inóculo bacteriano descartó la presencia de contaminantes. Se observaron surcos producidos por efecto del pulido en todas las superficies y rasgos característicos de las películas delgadas depositadas (figuras 5.5A, E, I, L, y O).

Los materiales expuestos a los cultivos de *P. aeruginosa* ATCC 10145 presentaron bacterias adheridas y/o formación de biopelículas con características diferenciales para cada uno de los materiales y tiempos de incubación. Imágenes representativas de SS316LVM (Figura 5.5B-D) y Ti (Figura 5.5F-H) mostraron entre 24 – 96 h microcolonias y formación de biopelículas tridimensionales con cuantiosa producción de matriz y aparente desprendimiento de la biopelícula a los 7 d, encontrándose mayor extensión y abundancia de estas biopelículas en el Ti. Por el contrario, las imágenes de Ta a 24 y 96 h mostraron escasos grupos de bacterias (Figura 5.5J y K), a diferencia del TaN que presentó exuberante crecimiento y formación de biopelículas con producción de matriz a las 24 h y su posible desprendimiento a

las 96 h (Figura 5.5M y N). Por otra parte, *P. aeruginosa* produjo en las superficies de HAp (Figura 5.5P-R) a las 24 h biopelículas cubiertas de matriz, seguido por una disminución de la agregación bacteriana a las 96 h y desprendimiento de las biopelículas a los 7 d, con notable deterioro de estas superficies debido a la adhesión bacteriana.

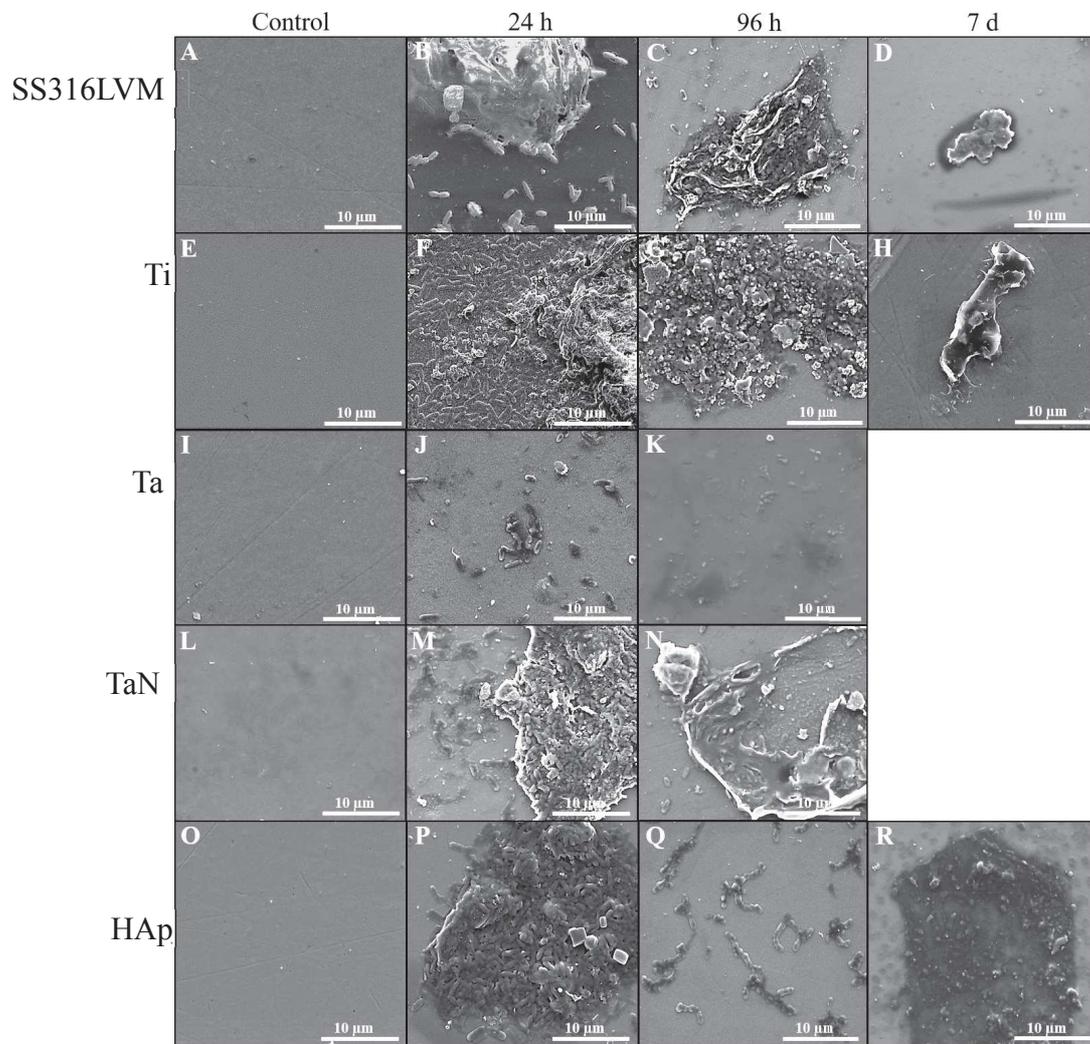


Figura 5.5. Micrografías MEB que muestran la evolución de biopelículas de P. aeruginosa formadas in vitro sobre las diferentes superficies estudiadas.

La presencia de matriz fue notoria en todos los casos de interacciones bacterianas en las biopelículas. En el Ti a 24 h se evidenció en alta magnificación (80.000X) la interacción de una bacteria con otra e inclusive con varias bacterias simultáneamente (Figura 5.6A, flecha blanca). Para este mismo tiempo, en la HAp se observó la interacción de una bacteria con la superficie y la extensión de matriz hacia una estructura de mayor tamaño (Figura 5.6B). Así mismo, en el SS316LVM a 96 h se apreció el vínculo que se produce entre la bacteria con la superficie y la biopelícula (Figura 5.6C).

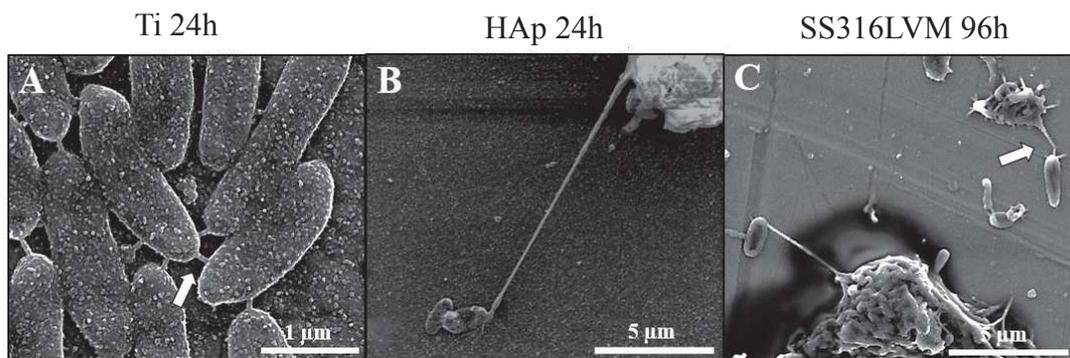


Figura 5.6. Micrografías MEB que presentan con detalle la interacción entre bacteria-bacteria (A), bacteria-superficie (B) y bacteria-biopelícula (C).

En todas las superficies fue evidente en los tiempos iniciales de formación de la biopelícula una distribución celular característica de forma concéntrica, ramificada y con extensiones desde un punto focal (Figura 5.7A-C).

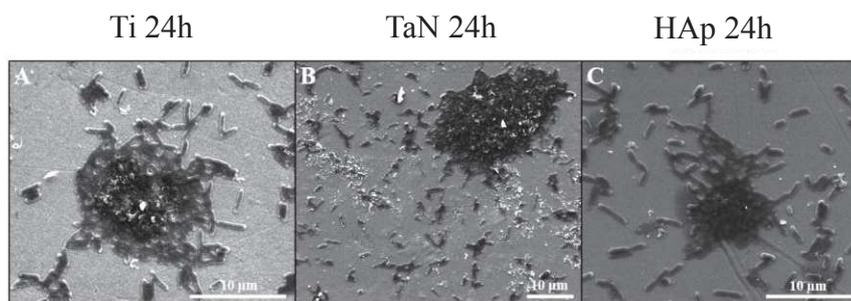


Figura 5.7. Distribución de bacterias en biopelículas de *P. Aeruginosa*.

Esta caracterización nos permitió evaluar la adhesión, crecimiento, morfología y evolución de las biopelículas de *P. aeruginosa* ATCC 10145 en materiales nuevos y comúnmente empleados para reemplazos óseos. Entre las superficies evaluadas, el Ti fue observado con mayor crecimiento de *P. aeruginosa* ATCC 10145 y formación de biopelículas tridimensionales altamente organizadas en relación al SS316LVM, Ta, TaN e HAp para todos los períodos de estudio (Figura 5.5). Otros estudios han encontrado por MEB mayor adhesión de *P. aeruginosa* y otras bacterias en el Ti con respecto al SS316LVM [18], [121].

Particularmente, en la película delgada de Ta/Ti fue observado por MEB un menor crecimiento de *P. aeruginosa* ATCC 10145 con respecto a las otras superficies evaluadas entre 24-96 h, tal como ha sido reportado para este microorganismo y esta superficie en 18 h en comparación con Ti [121].

Un estudio realizado con *S. aureus* y *S. epidermidis* encontró menor adhesión en Ta puro comparado con la película delgada de Ta/SS316LVM, Ti cp, aleaciones de Ti (Ti-6Al-4V) y SS316LVM rugoso y pulido en 1 h [117]. Por otra

parte, no existen, hasta donde concierne a nuestra documentación, estudios de adhesión de *P. aeruginosa* sobre TaN, reportándose por primera vez su crecimiento y formación de biopelículas con esta superficie.

En el presente estudio también fue evaluada la HAp por su mayor biocompatibilidad y similitud a la composición ósea, observándose una evolución rápida en la formación de biopelículas con estructuras tridimensionales en 24 h y el inicio de su desprendimiento a las 96 h. Un trabajo previo realizado por [118] mostró crecimiento bacteriano y formación de biopelículas de *P. aeruginosa* con esta superficie únicamente en 2 d; sin embargo, no consideró tiempos anteriores y posteriores a 2 d para evaluar la formación y desprendimiento de las biopelículas. Por lo general, los trabajos que se han realizado en esta área no han considerado evaluar la biopelícula en diferentes estadios que permitan establecer tiempos estimados de adhesión, maduración y desprendimiento de las biopelículas; es por ello que los resultados reportados en esta tesis representan un aporte al escaso conocimiento de la formación de biopelículas con este material de gran aplicabilidad en la actualidad.

Los polisacáridos en las biopelículas formadas en las superficies de SS316LVM, Ti e HAp fueron observados por MEB como un soporte entre bacteria - superficie, interaccionando entre bacterias individuales y entre bacterias - biopelícula. La función de estas interacciones han sido descritas para la adhesión celular a la superficie, agrupación inicial y posterior desarrollo a microcolonias [214]. Así mismo, se ha descrito que las lectinas o proteínas que se unen a azúcares permiten la agregación bacteria-bacteria con alta especificidad. Algunas de las células bacterianas actúan como puentes entre diferentes grupos bacterianos, permitiendo el reclutamiento selectivo de nuevas bacterias a las zonas periféricas de la matriz [215]. Adicionalmente, fue observada en las biopelículas de *P. aeruginosa* ATCC 10145 con las superficies de Ti, TaN, e HAp una distribución bacteriana característica de forma concéntrica y semejante a estrellas, ramificada y con extensiones desde un punto central. Resultados similares fueron reportados por un estudio que utilizó modelado matemático de los patrones encontrados en biopelículas de *P. aeruginosa*. Los investigadores señalaron que la población se extiende sólo en regiones en las que concentraciones de nutrientes sean suficientes para superar los requisitos del mantenimiento bacteriano [216]. El modelo postulado indica que las señales en ausencia de nutrientes en el centro de los agregados bacterianos pueden desencadenar la migración bacteriana direccional entre el sustrato y la biopelícula.

5.2.2 Adhesión bacteriana y morfología de biopelículas de *P. aeruginosa* por MEB de las Películas Delgadas Mesoporosas de Sílice depositadas sobre Ti.

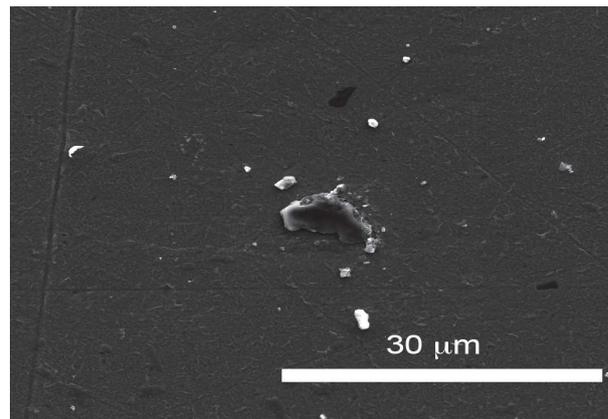
Múltiples factores pueden afectar el éxito clínico de los implantes, incluyendo la osteointegración del hueso al implante y el grado de colonización bacteriana alrededor del implante, mediante la modificación superficial se plantea una alternativa para evitar la colonización bacteriana como por ejemplo depositar una capa delgada bactericida, la Sílice exhibe ese carácter antibacterial tal y como ha sido reportado [217], [218], por eso se sinterizaron películas delgadas mesoporosas de Sílice sobre sustratos de Titanio ya que como se reportó en la sección 5.2.1 es la superficie más propensa a promover la colonización bacteriana, la formación de biopelículas y perpetuación de infecciones. Se evaluó la respuesta de estas películas en cultivos de *P. Aeruginosa* durante 24 horas, 3 y 5 días, el resultado de estos ensayos se muestran en la figura 5.8, la evaluación mediante Microscopía Electrónica de Barrido muestra que la película de Sílice exhibe propiedades antibacteriales ya que no se encontró deposición de la *P. Aeruginosa* durante ninguno de los períodos de incubación, no hubo colonización de microorganismos ni formación de biopelículas, por lo que esta película representa una alternativa eficaz para este fin.

Massa *et al* [217], encontraron que la actividad bacteriana en superficies de Ti-6Al-4V se vieron reducidas luego de modificar la superficie con recubrimientos mesoporosos de Titania pero siguen habiendo un número importante de microorganismos, por lo que luego modifica esta superficie con Sílice y nanopartículas de plata, este sistema es fuertemente antibacterial y actúa aniquilando las bacterias adheridas e inhibiendo la formación de biopelículas. Los resultados obtenidos de los ensayos antibacteriales demuestran que la superficie modificada con Sílice ofrece una actividad antibacterial a largo plazo por lo que este material y este tipo de modificación es una estrategia prometedora para controlar infecciones asociadas con la rehabilitación de implantes dentales.

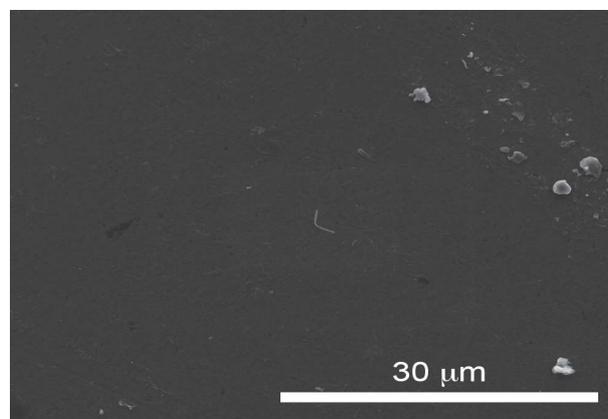
Películas mesoporosas de SiO₂ también fueron evaluadas por Roldán *et al* [218] y las películas exhiben propiedades bactericidas que se ven mejoradas con la adición de nanopartículas de plata, este incremento en el poder antibacterial viene dado por la liberación de iones de plata en el medio. También la arquitectura particular de estos sistemas ofrece la posibilidad de sintonizar el desempeño de las películas delgadas mesoporosas en las propiedades bactericidas.

Nuestros resultados están en concordancia con lo reportado por ambos autores pues no hay evidencia desde el punto de vista morfológico de deposición, adherencia y proliferación de bacterias en nuestro sistema. Esto nos permite pensar en utilizar este material para ser depositado sobre nuestras películas delgadas aprovechando la naturaleza antibacterial de la Sílice y su carácter biocompatible [219], [220].

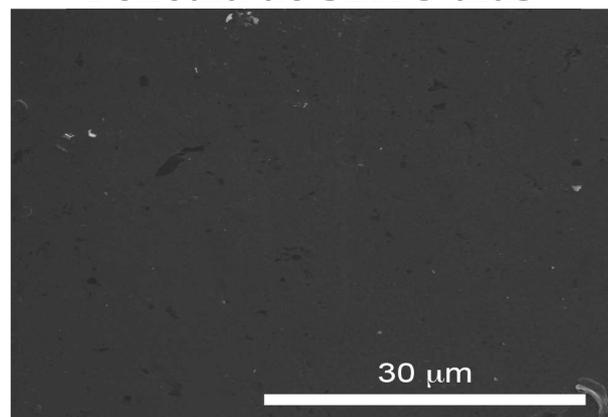
Película de SBA 24h



Película de SBA 3 días



Película de SBA 5 días



*Figura 5.8. Micrografías MEB que muestran la evolución de biopelículas de *P. aeruginosa* formadas in vitro sobre Delgadas Mesoporosas de Sílice depositadas sobre Ti.*

Capítulo VI

Discusión General y Conclusiones

En este trabajo describimos las características estructurales, morfológicas y químicas de distintas películas delgadas y recubrimientos que han sido usados para modificar la superficie de metales (SS316LVM y Ti) que son comúnmente utilizados como biomateriales para implantes óseos así como el impacto en sus funciones mejorando las propiedades mecánicas, bioactividad, biocompatibilidad y poder bactericida.

El desarrollo de dispositivos biomédicos con óptimo desempeño y funcionalidad requiere la consideración cuidadosa de muchos parámetros. Por ejemplo, los materiales utilizados para la fabricación de implantes de carga deben ser mecánicamente fuertes y deben poseer una alta resistencia a la corrosión y al desgaste para prevenir la liberación de iones metálicos potencialmente peligrosos en el cuerpo humano. Los materiales para implantes óseos deben presentar biocompatibilidad para reducir al mínimo las reacciones inmunes alérgicas, que con el tiempo podrían comprometer la fijación del implante y reducir su capacidad de soporte de carga resultando en el fracaso del biomaterial. Por lo que el objetivo de este trabajo fue proponer un sistema que responda a la mayoría de las necesidades que tiene que poseer un material usado en implantes óseos.

En la primera parte del trabajo se trata la síntesis y caracterización de películas delgadas basadas en Ta, considerando que este metal ofrece una buena alternativa a los problemas presentados por el SS316LVM y Ti, pero debido a su alto costo no se piensa en un implante completamente de Ta sino ya que la bioactividad y biocompatibilidad son fenómenos de superficie a través de la modificación de las superficies metálicas conferirle las propiedades del Tántalo a estos sistemas. Se encontró que las películas de Ta por pulverización catódica cristalizan en la fase tetragonal β -Ta cuando el sustrato no es calentado tal y como lo muestran los resultados obtenidos por otros autores. En el caso del sustrato de SS316LVM vemos como la DRX de alto ángulo y la DRX de incidencia rasante revelan que primero se forma una fase α -Ta en las primeras capas atómicas y luego a medida que aumenta el espesor de la película se deposita encima una capa β -Ta. La capa α -Ta en contacto directo con el SS316LVM tiene un desajuste entre el plano (100) de la película y el plano (111) del sustrato de alrededor del 14% lo que ha resultado en la delaminación de algunas de las películas delgadas.

Cuando se depositaron las películas de 300 nm de TaN sobre los sustratos metálicos se obtuvo la fase δ -TaN, con una estructura de tipo NaCl con orientación en el plano (111) mientras que la película depositada sobre vidrio con un espesor de 1 μ m presentó una orientación preferencial en el plano (200). Esta diferencia esta, relacionada con la influencia del sustrato y el espesor de la película depositada que tiene que ver con cómo se van acomodando los átomos al llegar a la superficie. En cuanto a los mecanismos de crecimiento, se

observó un crecimiento columnar, con presencia de porosidades entre columnas, explicado por el modelo propuesto por Movchan y Demchisin y Thornton. Considerando la presión y la temperatura escogidos para sintetizar las películas delgadas bajo estudio en este trabajo ($T = 298 \text{ K}$, $P = 6.5 \text{ Pa}$), las capas depositadas de Ta, TaN y Ta/TaN siguen el crecimiento descrito en la zona 1 de este modelo, donde $T/T_m < 0.3$, por ejemplo para el TaN, T es aproximadamente 298 K y T_m es el punto de fusión 3360 K cumpliendo con las condiciones del modelo. En las etapas iniciales de la formación de la película, los átomos llegan con baja movilidad y se aglomeran formando grupos, posteriormente, los grupos crecen tridimensionalmente (crecimiento tipo isla) y se van uniendo, coalesciendo y creciendo en dirección perpendicular al sustrato.

Uno de los principales problemas al que nos enfrentamos fue evaluar la resistencia al desgaste y la corrosión de este sistema multicapa debido a no disponer de las técnicas experimentales para lograrlo, lo cual significó obviar estas dos propiedades fundamentales que están íntimamente relacionadas ya que juntas, ellas pueden determinar la interacción entre el material y el cuerpo humano desde el punto de vista electroquímico y mecánico, normalmente se ha encontrado que para el SS316LVM y el Ti la respuesta a estos fenómenos está mediada por la capa de Cr_2O_3 (para el SS316LVM) y TiO_2 (para el Ti), en el caso de las superficies basadas en Ta depositadas en este trabajo mediante XPS obtuvimos que en la superficie de las capas existen varias especies química oxidadas que podrían ser responsables en estas superficies de aislar y proteger las superficies del ambiente externo pero su única función no es proteger sino también añadir más beneficios orientados hacia las propiedades biomédicas (bioactividad y biocompatibilidad) ya que estos óxidos proveen una superficie con una especie de carga negativa en medios con pH fisiológicos como el Fluido Corporal Simulado, siendo la primera etapa para que se de la nucleación y crecimiento de la HAp sobre las superficies. Estos atributos garantizan que las proteínas no se desnaturalizan cuando su capa exterior de naturaleza hidrofílica interactúa con la superficies de Ta_2O_5 , Ta_xO_y y TaO_xN_y . Además, también se espera que esa carga negativa atraiga los iones de Ca^{2+} a la superficie cuando se expone al FCS. Siendo este fenómeno ventajoso para los implantes favoreciendo su osteointegración.

La capacidad de formar hueso de un material usualmente se evalúa examinando la formación de apatita sobre el mismo en un Fluido Corporal Simulado que contiene una concentración de iones casi igual al del plasma sanguíneo humano, hay varios factores a estudiar al usar este método, primero si se logra depositar el fosfato de calcio más cercano en composición al hueso que es la Hidroxiapatita, luego con qué velocidad se deposita, es decir cuanto tiempo se requiere y si todos los materiales tienen esta habilidad. Para ello trabajamos con dos concentraciones de FCS la convencional y una enriquecida 1.5 veces en iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} , tras un corto período de inmersión se determinó que se depositó más material al usar la concentración FCS 1.5, luego el ensayo se llevó a cabo durante un período de tres semanas y se estudiaron todas las superficies. Se encontró que todas las superficies basadas en Ta exhiben una excelente bioactividad además de no necesitar tratamientos superficiales para proliferar esta deposición ya que el material lo hace

espontáneamente en un período razonable de tres semanas, la caracterización de la capa depositada por las diferentes técnicas DRX de incidencia rasante, FTIR y XPS evidencia que la capa depositada es la Hidroxiapatita estequiométrica y morfológicamente tiene la microestructura típica tipo coral. La Hidroxiapatita sigue un proceso de nucleación y crecimiento que involucra varias etapas y este proceso se verá acelerado o favorecido dependiendo de las características de la superficie donde será depositado. Las superficies bajo estudio son superficies oxidadas tal y como se evidenció previamente. Ahora este ambiente pareciera favorecer la deposición de HAp. La nucleación y crecimiento de la HAp ocurre por un proceso de nucleación heterogénea que empieza con la formación de una fase precursora de fosfato de calcio amorfo. La interacción electrostática se considera como el factor principal en la inducción de nucleación de fosfatos de calcio por lo que la superficie donde se quiere depositar la HAp favorecerá la deposición si está cargada negativamente lo cual se cree que es la interacción que ocurre en las superficies de Ta ya que aparece la formación de grupos Ta-OH en la superficie que atraen a los iones Ca^{2+} con carga positiva, además al estar estos iones en exceso hay más probabilidades de unión de las especies químicas para formar el compuesto intermedio Tántalato de Calcio que empezará a combinarse con los iones fosfatos de carga negativa y seguidamente formar apatitas amorfas que con el paso del tiempo de inmersión seguirán combinándose formando los bloques de construcción para la formación de la capa de Hidroxiapatita.

Se ha indicado que la modificación de la superficie es una estrategia valiosa para mejorar los implantes metálicos nuevas funcionalidades químicas, estructurales, mecánicas y biológicas se consiguen mediante esta vía para estas aplicaciones. La caracterización mecánica fue uno de los principales problemas al que nos enfrentamos en el desarrollo de nuestro trabajo, apenas pudimos realizar algunas evaluaciones que nos dan luces de buenos resultados pero no son concluyentes ni nos permiten caracterizar completamente los sistemas multicapas mecánicamente ya que hay ciertas incongruencias en los valores de dureza de las películas de Ta y TaN, los valores obtenidos son más bajos a los reportados en la literatura, creemos que esto es debido al alto porcentaje de Oxígeno presente en la superficie. Por otro lado la dureza y el módulo de elasticidad de estas mismas películas con la capa de Hidroxiapatita presentan mejores valores a los del hueso humano indicando que podrían exhibir mejores propiedades mecánicas aunque habría que investigar mucho más en este sentido.

La respuesta celular en un implante es resultado de una combinación de señales bioquímicas y señales físico/químicas. Aprender cómo integrar mejor estas dos contribuciones es esencial para optimizar la reparación de tejidos e incluso conseguir la regeneración. Queremos un biomaterial que exhiba propiedades de biocompatibilidad por lo que se realizaron ensayos *in vitro* con osteoblastos, con la finalidad de comparar si nuestras superficies presentan mejores propiedades de biocompatibilidad. Los resultados de adhesión celular y morfología de las células siempre estarán comparados a nuestros controles los sustratos metálicos SS316LVM y Ti, los resultados obtenidos sobre todas las superficies de las capas depositadas por pulverización catódica RF y los

recubrimientos de HAp obtenidos por el método biomimético exhiben buena adhesión celular, esto se evidencia por una morfología adecuada de la célula la cual posee su citoesqueleto extendido y maximizando el área de contacto y adhesión a la superficie del material, la evaluación de la morfología de las células muestran la forma plana característica y las formaciones de filipodios que luego de su formación y fijación buscan comunicarse con otras células vecinas para iniciar la proliferación y migración celular.

Claramente, se necesitan investigaciones más extensas del comportamiento de las superficies *in vitro* e *in vivo* donde se realicen ensayos para evaluar la relevancia de este tipo de superficies en el entorno biológico complejo del cuerpo, donde los implantes están expuestos a múltiples tipos de células que pueden no responder de la misma manera a una señal de la superficie dada. Por lo tanto, es probable que la optimización de superficies de los implantes requieran diferentes niveles de topografía y otras modificaciones tales como tratamientos químicos oxidativos para mejorar las condiciones de la superficie y lograr potenciar el material para el fin deseado.

Otro problema que afecta a los implantes son las infecciones relacionadas con bacterias, que todavía representan una de las complicaciones más graves y devastadoras para dispositivos protésicos. Superficies de biomateriales nanoestructurados pueden ayudar a resolver este problema ofreciendo inherentes propiedades antimicrobianas y antiadherentes. Para este propósito se evaluaron las superficies *in vitro* con la bacteria *P. aeruginosa* ATCC 10145 que es una bacteria que se ha reportado está presente en los quirófanos y responsable de infecciones crónicas luego de cirugías, el Ti exhibió la mayor deposición de bacterias y formación de biopelículas lo cual llama poderosamente la atención ya que es uno de los metales más comúnmente usado para implantes óseos por otro lado la superficie de Ta depositada por pulverización catódica RF mostró la menor actividad en la deposición y formación de biopelículas presentando un aporte interesante en esta área de investigación, luego de determinar que la superficie que presentó más actividad bacteriana fue el Titanio se depositaron películas mesoporosas de Sílice que son materiales que se han estudiado por su biocompatibilidad y poder bactericida, sobre estas superficies durante todos los períodos de estudio 24 horas, 3 y 5 días no se observó deposición ni formación de biopelículas por lo que se plantea esta superficie como una alternativa para prevenir las infecciones al implantarse un material.

En nuestro trabajo todos los métodos utilizados buscaban crear una nueva generación de biomateriales que i) confieran una mayor biocompatibilidad directamente sobre las superficies, ii) creen efectos sinérgicos, iii) influyan de forma selectiva sobre las células guiando la diferenciación celular, iv) dando lugar a superficies que sean multifuncionales que tengan más de una aplicación médica, en la ortopedia, prevención de infecciones, v) que sean fabricados por procesos reescalables, entre otros. Enfoques de funcionalización eficientes, son resultados importantes de los avances de la nanotecnología y las ciencias como multidisciplinas, ayudando sin duda a cumplir una de las misiones más difíciles en la ciencia: la sustitución de tejidos perdidos y restaurar las funciones corporales para mejorar la salud humana.

A continuación se presentan algunas conclusiones puntuales a las que llegamos con la finalización de nuestro trabajo:

1. Películas delgadas de 300 nm basadas en Ta pueden ser depositadas por Pulverización Catódica RF directamente en sustratos metálicos de SS316LVM y Ti.
2. La fase β -Ta se deposita preferencialmente en procesos por Pulverización Catódica RF cuando el sustrato no se calienta y las películas delgadas son de espesores menores a las micras (300 nm), esto debido a que los átomos del material al condensarse sobre la superficie bajo estas condiciones la movilidad se ve reducida y es probable que se favorezca el crecimiento de fases metaestables desordenadas, aunque la naturaleza del sustrato también influye en la fase cristalina que se depositará. Se obtuvo la formación de la fase ordenada α -Ta orientada en la dirección (110) en la interfaz sobre el sustrato de SS316LVM y para espesores mayores se forma la fase β -Ta sobre la fase alfa. Para los sustratos de Ti y TaN (bicapa Ta/TaN) se depositó la fase β -Ta nanocristalina, sin calentamiento del sustrato y espesores de 300 nm.
3. En la película Ta/SS316LVM los resultados de Difracción de Rayos X revelan que coexisten en esta película delgada la fase α -Ta y cuando aumenta el espesor se deposita sobre la fase α -Ta, la fase β -Ta. La formación de la fase α -Ta en la interfaz con el acero afecta la adhesión de la película al sustrato debido a los esfuerzos residuales de la capa depositada con la naturaleza del sustrato, la capa α -Ta depositada sobre el sustrato de SS316LVM presenta una orientación preferencial en el plano (110) esto implica un desajuste con el plano (111) del SS316LVM de alrededor de 14%, que podría explicar la delaminación observada en algunas películas de Ta depositadas sobre SS316LVM.
4. Se depositaron películas de TaN sobre los sustratos de SS316LVM y Ti con una estructura cristalina tipo NaCl conocida como δ -TaN, pero en este caso la naturaleza del sustrato también influye en la cristalinidad de la fase depositada, cuando la película fue depositada sobre vidrio (sustrato amorfo) la orientación (200) se convierte en la orientación preferencial, mientras que la orientación preferencial para el SS316LVM y el Ti, es la del plano (111). Ya que las deposiciones fueron realizadas bajo las mismas condiciones experimentales esta evolución parece estar relacionada con la movilidad de átomos en la superficie del sustrato. También se observa un cambio en el parámetro de red, que se atribuye a la formación de lagunas de Tántalo en condiciones ricas en nitrógeno y que es diferente para cada sustrato.

5. En cuanto al mecanismo crecimiento de las películas Ta, TaN y Ta/TaN sobre los distintos sustratos, se observó un crecimiento de tipo columnar correspondiente a la zona I del modelo de Movchan y Demchisin y Thornton, se observan columnas que crecen perpendiculares al sustrato con porosidad entre ellas. Las observaciones de la superficie muestran una capa densa, con distintos tamaños de grano y distintos valores de rugosidad comprobando que la microestructura también está influenciada por la naturaleza del sustrato.
6. El análisis químico de las películas delgadas revela que en todas ellas hay presencia de Oxígeno en diferentes composiciones Ta_2O_5 , Ta_xO_y y TaO_xN_y lo cual está relacionado con la naturaleza ávida por este elemento del Ta como metal de transición estos contenidos elevados de Oxígeno tienen influencia en las diferentes propiedades de las películas particularmente en las propiedades mecánicas que sólo se midieron para la película de Ta/SS316LVM y TaN/SS316LVM reportando valores que concuerdan con altos niveles de oxidación en la capa depositada y la influencia de la naturaleza del sustrato y el pequeño espesor de la película.
7. Se depositaron películas delgadas mesoporosas de Sílice sobre sustratos metálicos de Titanio utilizando el método de Sol-Gel y "spin coating". Las películas presentan una superficie con mesoporos separados por paredes rígidas de Sílice y con cierto orden de largo alcance, con alta accesibilidad de los poros que pueden usarse para diferentes aplicaciones como ordenamiento de nanopartículas con fines fotocatalíticos o bactericidas.
8. Las películas delgadas depositadas permitieron la deposición de Hidroxiapatita sobre la superficie utilizando el método biomimético. Se usó una concentración de fluido corporal simulado 1.5 para lograr acelerar la formación de hueso durante las etapas iniciales de la osteointegración, el recubrimiento que se formó sobre las superficies luego de 3 semanas de inmersión es fisiológicamente estable e interfacialmente adherente.
9. La nucleación y crecimiento de la Hidroxiapatita sobre las superficies ocurre a través de mecanismos de nucleación heterogénea en varias etapas desde la formación de fosfatos de calcio amorfos hasta finalmente la nucleación y el crecimiento de la Hidroxiapatita. La fase de apatita termodinámicamente menos estable nuclea y crece, seguida por fases más estables. La nucleación se cree que se lleva a cabo a través de "clusters" previamente presentes en el FCS y estos "clusters", de tamaño nanométrico sirven como bloques de construcción para el proceso.

10. Se encontró que la nucleación y el crecimiento de HAp en las superficies basadas en Tántalo ocurre mediante un mecanismo que consiste en la formación de grupos OH en la superficie del metal para formar Ta-OH que luego se combinan con pequeñas cantidades de Ca^{2+} que seguidamente se unen con los iones fosfatos que luego se adsorben en la superficie del metal para formar la apatita y más adelante la Hidroxiapatita.
11. El análisis químico de las superficies mostró que es posible tener una buena interacción entre materiales basado en Tántalo (Ta y TaN) con la Hidroxiapatita sin necesidad de aplicar tratamientos superficiales, con la microestructura característica tipo coral y relación estequiométrica entre el Ca/P cercana al 1.66.
12. Este sistema donde se tiene el metal recubierto por capas que promueven la osteointegración mejora las propiedades mecánicas de la Hidroxiapatita lo cual se evidencia por las medidas de dureza y módulo de elasticidad del sistema donde se obtienen valores que son mejores a los del hueso.
13. En los sistemas para implantes óseos se busca mejorar propiedades mecánicas y de osteointegración lo cual se ha demostrado haber conseguido eficazmente en los sistemas HAp/Ta, HAp/TaN y HAp/Ta/TaN sobre los sustratos de SS316LVM y Ti, el recubrimiento de HAp ha resultado ser eficaz para facilitar la adhesión y proliferación celular de la célula osteoblástica responsable de la formación y regeneración de hueso nuevo.
14. Las observaciones de las células por Microscopía Electrónica de Barrido nos muestran la interacción dinámica entre la célula, el sustrato y el citoesqueleto. Las células se observan con su forma plana característica y se ven las formaciones de filipodios que luego de su formación y fijación buscan comunicarse con otras células vecinas para iniciar la proliferación y migración celular. Por lo cual todas las superficies resultaron ser citocompatibles.
15. Nuestras superficies presentaron topografías, y características químicas superficiales adecuadas para promover la adhesión celular y la interacción célula/material porque lo que estos sistemas modificados superficialmente al ser comparados con los metales desnudos (SS316LVM y Ti) presentan una alternativa pudiendo ser utilizados como implantes para regeneración ósea.

16. De las observaciones por Microscopía Electrónica de Barrido, el sustrato de Titanio tuvo mayor crecimiento de *P. aeruginosa* ATCC 10145 y formación de biopelículas tridimensionales en todos los períodos de estudio. El Ta presentó la menor formación de biopelículas en los períodos de estudio. Por lo que el Ti pudiera representar mayor riesgo de colonización, formación de biopelículas y perpetuación de la infección causada por *P. aeruginosa* en prótesis óseas mientras que el Ta es el material que pudiera representar menor riesgo por lo que al recubrir el Titanio con este material tal y como es nuestra propuesta estaríamos disminuyendo el riesgo al fracaso del implante por una infección bacteriana.

17. Para prevenir reacciones adversas de los implantes con el tejido tales como infecciones, procesos inflamatorios, etc. Se sintetizaron Películas Delgadas Mesoporosas de Sílice sobre los sustratos de Ti, esto debido a que el Titanio representó la superficie más propensa a colonizar, formar y perpetuar infecciones. Tras la evaluación de estas películas con la *P. Aeruginosa* se observó por Microscopía Electrónica de Barrido que no hubo colonización ni formación de biopelículas sobre esta superficie suministrando una solución para evitar la pérdida de los implantes debido a infecciones.

18. Todas las películas depositadas resultaron ser biocompatibles, osteogénicas y osteoconductoras por lo que reúnen las condiciones necesarias para ser usadas como biomateriales para implantes óseos. Además la superficie de Sílice mesoporosa exhibe propiedades bactericidas eficaces.

Recomendaciones

1. Realizar el análisis mecánico completo y detallados de todas las superficies utilizando nanoindentación para obtener los valores de dureza y módulos de elasticidad para cada uno de los sistemas y estudiar los valores obtenidos para compararlos con los valores mecánicos del hueso.
2. Realizar ensayos de corrosión y adherencia sobre todas las superficies.
3. Realizar ensayos para determinar la naturaleza hidrofílica ó hidrofóbica de las superficies, ya que es determinante para entender completamente los mecanismos que ocurren entre la superficie y los fluidos biológicos células, tejidos, hueso, bacterias.
4. Estudiar la viabilidad, proliferación y diferenciación de los osteoblastos y las bacterias *in vitro* e *in vivo*.
5. Estudiar la deposición de Hidroxiapatita por el método biomimético sobre las películas delgadas mesoporosas de Sílice.
6. Sintetizar el sistema completo que incluya la película delgada mesoporosa de Sílice conjuntamente con los sistemas HAp/Ta, HAp/TaN y HAp/Ta/TaN y evaluar su bioactividad, biocompatibilidad y poder bactericida, estudiando el orden del sistema multicapa que potencie las características deseadas.

Referencias

- [1] T. Santonen and H. Stockmann, *Review on toxicity of stainless steel*. 2010.
- [2] R. A. Antunes and M. C. L. De Oliveira, "Corrosion fatigue of biomedical metallic alloys: Mechanisms and mitigation", *Acta Biomaterialia*, vol. 8, no. 3. pp. 937–962, 2012.
- [3] L. Savarino, M. Cadossi, E. Chiarello, N. Baldini, and S. Giannini, "Do ion levels in metal-on-metal hip resurfacing differ from those in metal-on-metal THA at long-term followup?", *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 471, no. 9, pp. 2964–2971, 2013.
- [4] C. Fleury, A. Petit, F. Mwale, J. Antoniou, D. J. Zukor, M. Tabrizian, and O. L. Huk, "Effect of cobalt and chromium ions on human MG-63 osteoblasts in vitro: Morphology, cytotoxicity, and oxidative stress", *Biomaterials*, vol. 27, no. 18, pp. 3351–3360, 2006.
- [5] D. Iijima, T. Yoneyama, H. Doi, H. Hamanaka, and N. Kurosaki, "Wear properties of Ti and Ti-6Al-7Nb castings for dental prostheses", *Biomaterials*, vol. 24, no. 8, pp. 1519–1524, 2003.
- [6] L. A. Joseph, O. K. Israel, and E. J. Edet, "Comparative Evaluation of Metal Ions Release from Titanium and Ti-6Al-7Nb into Bio-Fluids.", *Dent. Res. J. (Isfahan)*., vol. 6, no. 1, pp. 7–11, 2009.
- [7] R. S. Bedi, D. E. Beving, L. P. Zanello, and Y. Yan, "Biocompatibility of corrosion-resistant zeolite coatings for titanium alloy biomedical implants", *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 8, pp. 3265–3271, 2009.
- [8] S. Seneff, R. M. Davidson, and J. Liu, "Empirical data confirm autism symptoms related to aluminum and acetaminophen exposure", *Entropy*, vol. 14, no. 11. pp. 2227–2253, 2012.
- [9] C. J. Boehlert, C. J. Cowen, J. P. Quast, T. Akahori, and M. Niinomi, "Fatigue and wear evaluation of Ti-Al-Nb alloys for biomedical applications", *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 28, no. 3, pp. 323–330, 2008.
- [10] M. D. Bermúdez, F. J. Carrión, G. Martínez-Nicolás, and R. López, "Erosion-corrosion of stainless steels, titanium, tantalum and zirconium", in *Wear*, 2005, vol. 258, no. 1–4 SPEC. ISS., pp. 693–700.
- [11] T. Miyazaki, H. M. Kim, T. Kokubo, C. Ohtsuki, H. Kato, and T. Nakamura, "Mechanism of bonelike apatite formation on bioactive tantalum metal in a simulated body fluid", *Biomaterials*, vol. 23, no. 3, pp. 827–832, 2002.
- [12] H. Kato, T. Nakamura, S. Nishiguchi, Y. Matsusue, M. Kobayashi, T. Miyazaki, H. M. Kim, and T. Kokubo, "Bonding of alkali- and heat-treated tantalum implants to bone", *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 53, no. 1, pp. 28–

- 35, 2000.
- [13] T. Kokubo, H. M. Kim, and M. Kawashita, "Novel bioactive materials with different mechanical properties", *Biomaterials*, vol. 24, no. 13, pp. 2161–2175, 2003.
- [14] J. Black, "Biologic performance of tantalum", *Clinical Materials*, vol. 16, no. 3. pp. 167–173, 1994.
- [15] H. Colfen, "Biom mineralization: A crystal-clear view", *Nat Mater*, vol. 9, no. 12, pp. 960–961, Dec. 2010.
- [16] V. Sathyendra and M. Darowish, "Basic science of bone healing", *Hand Clinics*, vol. 29, no. 4. pp. 473–481, 2013.
- [17] C. and J. T. Laurencin, *Bone graft substitutes and bone regenerative engineering*, 2nd ed. ASTM International, 2015.
- [18] H.-L. Huang, Y.-Y. Chang, M.-C. Lai, C.-R. Lin, C.-H. Lai, and T.-M. Shieh, "Antibacterial TaN-Ag coatings on titanium dental implants", *Surf. Coatings Technol.*, vol. 205, no. 5, pp. 1636–1641, Nov. 2010.
- [19] K. Heydenrijk, H. J. Meijer, W. A. van der Reijden, G. M. Raghoobar, A. Vissink, and B. Stegenga, "Microbiota around root-form endosseous implants: a review of the literature", *Int J Oral Maxillofac Implant.*, vol. 17, no. 6, pp. 829–838, 2002.
- [20] W. Kern and K. K. Schuegraf, "Handbook of Thin Film Deposition Processes and Techniques", *Handbook of Thin Film Deposition Processes and Techniques*. pp. 11–43, 2001.
- [21] J. L. Vossen, *Thin Film Processes*, vol. 127. 1980.
- [22] J. Espinós, "Aplicaciones Tecnológicas de las Películas Delgadas."
- [23] G. Savelli and G. Savelli, "Etude et développement de composants thermoélectriques à base de couches minces", *Univ. Joseph-Fourier - Grenoble I*, 2007.
- [24] R. Escobar and J. M. Albella, "Preparación Y Caracterización De Recubrimientos Y Laminas Delgadas Tema 5: Técnicas De Deposición Física (PVD). Deposición Mediante Bombardeo Catódico 'Sputtering,'" *Inst. Cienc. Mater. Madrid, CSIC*, 2005.
- [25] J. Nazon, "Couches minces à base de nitrure de tantale multicouche pour barrières de diffusion", *Univ. Montpellier II*, 2008.
- [26] J. M. Albella, "Mecanismos de nucleación y crecimiento de capas delgadas", *Inst. Cienc. Mater. Madrid, CSIC*, pp. 101–123, 2003.
- [27] B. A. Movchan and A. V. Demshishin, "Study of the structure and properties of thick vacuum condensates of nickel, titanium, tungsten,

- aluminium oxide and zirconium dioxide”, *Phys. Met. Met. (Engl. Trans.)*, vol. 28, no. 4, pp. 83–90, 1969.
- [28] J. a Thornton, “High Rate Thick Film Growth”, *Annu. Rev. Mater. Sci.*, vol. 7, no. 1, pp. 239–260, 1977.
- [29] J. a. Thornton, “The microstructure of sputter-deposited coatings”, *J. Vac. Sci. Technol. A Vacuum, Surfaces, Film.*, vol. 4, no. 6, p. 3059, 1986.
- [30] E. G. Sheikin, “The pressure dependence of the deposition rate in a magnetron sputtering system”, *Thin Solid Films*, vol. 574, pp. 52–59, 2015.
- [31] F. Oudrhiri-Hassani, L. Presmanes, A. Barnabé, and P. Tailhades, “Microstructure, porosity and roughness of RF sputtered oxide thin films: Characterization and modelization”, *Appl. Surf. Sci.*, vol. 254, no. 18, pp. 5796–5802, 2008.
- [32] A. Chaoumead, Y. M. Sung, and D. J. Kwak, “The effects of RF sputtering power and gas pressure on structural and electrical properties of ITiO thin film”, *Adv. Condens. Matter Phys.*, vol. 2012, 2012.
- [33] J.-C. Tsao, C.-P. Liu, Y.-L. Wang, Y.-S. Wang, and K.-W. Chen, “Controlling Ta phase in Ta/TaN bilayer by surface pre-treatment on TaN”, *J. Phys. Chem. Solids*, vol. 69, no. 2–3, pp. 501–504, Feb. 2008.
- [34] N. Fréty, F. Bernard, J. Nazon, J. Sarradin, and J. C. Tedenac, “Copper diffusion into silicon substrates through TaN and Ta/TaN multilayer barriers”, *J. Phase Equilibria Diffus.*, vol. 27, no. 6, pp. 590–597, 2006.
- [35] EuroInox, “Manual de Diseño para Acero Inoxidable Estructural.pdf”, 2002.
- [36] D. López, A. Durán, and S. Ceré, “Caracterización superficial de acero inoxidable AISI 316 L en contacto con solución fisiológica simulada”, *Congr. CONAMET*, no. 1, pp. 2–5, 2004.
- [37] N. Fujii, H. Kusakari, and T. Maeda, “A histological study on tissue responses to titanium implantation in rat maxilla: the process of epithelial regeneration and bone reaction.”, *J. Periodontol.*, vol. 69, no. 4, pp. 485–495, 1998.
- [38] T. R. Rautray, R. Narayanan, and K. H. Kim, “Ion implantation of titanium based biomaterials”, *Prog. Mater. Sci.*, vol. 56, no. 8, pp. 1137–1177, 2011.
- [39] C. Cui, H. Liu, Y. Li, J. Sun, R. Wang, S. Liu, and A. L. Greer, “Fabrication and biocompatibility of nano-TiO₂/titanium alloys biomaterials”, *Mater. Lett.*, vol. 59, no. 24–25, pp. 3144–3148, 2005.
- [40] D. Bernoulli, U. Müller, M. Schwarzenberger, R. Hauert, and R. Spolenak, “Magnetron sputter deposited tantalum and tantalum nitride thin films: An

- analysis of phase, hardness and composition”, *Thin Solid Films*, vol. 548, pp. 157–161, Dec. 2013.
- [41] L. Liu, Y. Wang, and H. Gong, “Annealing effects of tantalum films on Si and SiO₂/Si substrates in various vacuums”, *J. Appl. Phys.*, vol. 90, no. 1, pp. 416–420, 2001.
- [42] R. Hübner, M. Hecker, N. Mattern, V. Hoffmann, K. Wetzig, C. Wenger, H. J. Engelmann, C. Wenzel, E. Zschech, and J. W. Bartha, “Structure and thermal stability of graded Ta-TaN diffusion barriers between Cu and SiO₂”, *Thin Solid Films*, vol. 437, no. 1–2, pp. 248–256, 2003.
- [43] M. Grosser and U. Schmid, “The impact of sputter conditions on the microstructure and on the resistivity of tantalum thin films”, *Thin Solid Films*, vol. 517, no. 16, pp. 4493–4496, Jun. 2009.
- [44] R. Hoogeveen, M. Moske, H. Geisler, and K. Samwer, “Texture and phase transformation of sputter-deposited metastable Ta films and Ta/Cu multilayers”, *Thin Solid Films*, vol. 275, no. 1–2, pp. 203–206, 1996.
- [45] M. Stavrev, D. Fischer, C. Wenzel, K. Drescher, and N. Mattern, “Crystallographic and morphological characterization of reactively sputtered Ta, TaN and TaNO thin films”, *Thin Solid Films*, vol. 307, no. 1–2, pp. 79–88, Oct. 1997.
- [46] L. Gladczuk, A. Patel, J. D. Demaree, and M. Sosnowski, “Sputter deposition of bcc tantalum films with TaN underlayers for protection of steel”, *Thin Solid Films*, vol. 476, no. 2, pp. 295–302, 2005.
- [47] L. Gladczuk, A. Patel, C. S. Paur, and M. Sosnowski, “Tantalum films for protective coatings of steel”, *Thin Solid Films*, vol. 467, no. 1–2, pp. 150–157, 2004.
- [48] M. Zhang, Y. F. Zhang, P. D. Rack, M. K. Miller, and T. G. Nieh, “Nanocrystalline tetragonal tantalum thin films”, *Scr. Mater.*, vol. 57, no. 11, pp. 1032–1035, Dec. 2007.
- [49] L. A. Clevenger, A. Mutscheller, J. M. E. Harper, C. Cabral, and K. Barmak, “The relationship between deposition conditions, the beta to alpha phase transformation, and stress relaxation in tantalum thin films”, *J. Appl. Phys.*, vol. 72, no. 10, p. 4918, 1992.
- [50] H. Matsuno, A. Yokoyama, F. Watari, M. Uo, and T. Kawasaki, “Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium”, *Biomaterials*, vol. 22, no. 11, pp. 1253–1262, 2001.
- [51] C. Wang, F. Wang, and Y. Han, “The structure, bond strength and apatite-inducing ability of micro-arc oxidized tantalum and their response to annealing”, *Appl. Surf. Sci.*, vol. 361, pp. 190–198, 2016.
- [52] C. F. Almeida Alves, A. Cavaleiro, and S. Carvalho, “Bioactivity response

- of Ta_{1-x}O_x coatings deposited by reactive DC magnetron sputtering”, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 58, pp. 110–118, 2016.
- [53] X. Li, L. Wang, X. Yu, Y. Feng, C. Wang, K. Yang, and D. Su, “Tantalum coating on porous Ti6Al4V scaffold using chemical vapor deposition and preliminary biological evaluation”, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 5, pp. 2987–2994, 2013.
- [54] H. O. Pierson, “Handbook of Refractory Carbides and Nitrides”, *Handb. Refract. Carbides Nitrides*, pp. 8–16, 1996.
- [55] Boulat Laetitia, “Etude de la stabilité thermique d’un matériau skutterudite et développement de barrières de diffusion pour applications thermoélectrique”, UNIVERSITE MONTPELLIER 2, 2014.
- [56] J.-C. Lin and C. Lee, “Growth of Tantalum Nitride Films on Si by Radio Frequency Reactive Sputtering of Ta in N₂/Ar Gas Mixtures: Effect of Bias”, *J. Electrochem. Soc.*, vol. 147, no. 2, p. 713, 2000.
- [57] T. Mashimo, S. Tashiro, T. Toya, M. Nishida, H. Yamazaki, S. Yamaya, K. Oh-Ishi, and Y. Syono, “Synthesis of the B1-type tantalum nitride by shock compression”, *J. Mater. Sci.*, vol. 28, no. 13, pp. 3439–3443, 1993.
- [58] C. S. Shin, D. Gall, Y. W. Kim, P. Desjardins, I. Petrov, J. E. Greene, M. Odén, and L. Hultman, “Epitaxial NaCl structure δ-TaN_x(001): Electronic transport properties, elastic modulus, and hardness versus N/Ta ratio”, *J. Appl. Phys.*, vol. 90, no. 6, pp. 2879–2885, 2001.
- [59] S. K. Kim and B. C. Cha, “Deposition of tantalum nitride thin films by D.C. magnetron sputtering”, *Thin Solid Films*, vol. 475, no. 1–2, pp. 202–207, Mar. 2005.
- [60] X. Liu, G. J. Ma, G. Sun, Y. P. Duan, and S. H. Liu, “Effect of deposition and annealing temperature on mechanical properties of TaN film”, *Appl. Surf. Sci.*, vol. 258, no. 3, pp. 1033–1037, Nov. 2011.
- [61] M. Grosser, M. Münch, H. Seidel, C. Bienert, A. Roosen, and U. Schmid, “The impact of substrate properties and thermal annealing on tantalum nitride thin films”, *Appl. Surf. Sci.*, vol. 258, no. 7, pp. 2894–2900, 2012.
- [62] Y. . Leng, H. Sun, P. Yang, J. . Chen, J. Wang, G. . Wan, N. Huang, X. . Tian, L. . Wang, and P. . Chu, “Biomedical properties of tantalum nitride films synthesized by reactive magnetron sputtering”, *Thin Solid Films*, vol. 398–399, pp. 471–475, Nov. 2001.
- [63] A. S. Greenwald, S. D. Boden, V. M. Goldberg, Y. Khan, C. T. Laurencin, and R. N. Rosier, “Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications.”, *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 83-A Suppl, pp. 98–103, 2001.
- [64] E. C. E. L. L. Hench, *Biomaterials: an interfacial approach. Volume 4 of Biophysics and bioengineering series*. London: Academic Press, 1982.

- [65] L. L. Hench, "Bioceramics", *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 81, no. 7, pp. 1705–1728, 1998.
- [66] J. Black, *Biological Performance of Materials: Fundamentals of Biocompatibility*. New York: Marcel Dekker, 1999.
- [67] J.F. Osborn and H. Newesely, "Dental Implants", Munich: C. Hansen Verlag, 1980.
- [68] R. B. Martin, *Biomaterials*. Oxford University Press, 1996.
- [69] R. Baron, "Anatomy and Biology of Bone Matrix and Cellular Elements", Fifth., Washington DC: American Society for bone and mineral research, 2003.
- [70] P. R. Marks, S. C and Odgren, "Principles of Bone Biology", Second Edition, Academic Press.
- [71] S. F. and L. J. Ratner Buddy, Hoffman Allan, *Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine*. Academic Press, 1996.
- [72] K. Anselme, "Osteoblast adhesion on biomaterials", *Biomaterials*, vol. 21, no. 7. pp. 667–681, 2000.
- [73] L. Vroman and a L. Adams, "Identification of rapid changes at plasma-solid interfaces.", *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 3, pp. 43–67, 1969.
- [74] K. K. Chittur, "FTIR/ATR for protein adsorption to biomaterial surfaces", *Biomaterials*, vol. 19, no. 4–5. pp. 357–369, 1998.
- [75] C. A. Van, B. P. Ducheyne, T. Kokubo, *Bone-bonding Biomaterials*. Leiderdorp, The Netherlands: Reed Healthcare Communications, 1992.
- [76] L. G. Raisz, "Physiology and pathophysiology of bone remodeling.", *Clin. Chem.*, vol. 45, pp. 1353–1358, 1999.
- [77] M. O. Agerbaek, E. F. Eriksen, J. Kragstrup, L. Mosekilde, and F. Melsen, "A reconstruction of the remodelling cycle in normal human cortical iliac bone", *Bone Miner.*, vol. 12, no. 2, pp. 101–112, 1991.
- [78] R. Z. LeGeros, *Calcium phosphates in oral biology and medicine*, vol. 15. 1991.
- [79] J. C. Elliott, *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*, vol. 18. 1994.
- [80] S. V. Dorozhkin, "A review on the dissolution models of calcium apatites", *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.*, vol. 44, no. 1, pp. 45–61, 2002.
- [81] F. Abbona, H. E. L. Madsen, and R. Boistelle, "The initial phases of calcium and magnesium phosphates precipitated from solutions of high to medium concentrations", *J. Cryst. Growth*, vol. 74, no. 3, pp. 581–590,

1986.

- [82] T. Feenstra, "Formation of calcium phosphates in moderately supersaturated solutions", *J. Phys. Chem.*, vol. 83, no. 4, pp. 0–4, 1979.
- [83] M. J. J. M. van Kemenade and P. L. de Bruyn, "A kinetic study of precipitation from supersaturated calcium phosphate solutions", *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 118, no. 2, pp. 564–585, 1987.
- [84] K. de Groot, *Bioceramics of Calcium Phosphate*. Boca Raton FL: CRC Press Inc, 1983.
- [85] J. J. Lee, L. Rouhfar, and O. R. Beirne, "Survival of hydroxyapatite-coated implants: A meta-analytic review", *J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 58, no. 12, pp. 1372–1379, 2000.
- [86] A. Jokstad, U. Braegger, J. B. Brunski, A. B. Carr, I. Naert, and A. Wennerberg, "Quality of dental implants", *Int. Dent. J.*, vol. 53, no. 6 Suppl 2, pp. 409–443, 2003.
- [87] L. G. Ellies, D. G. A. Nelson, and J. D. B. Featherstone, "Crystallographic changes in calcium phosphates during plasma-spraying", *Biomaterials*, vol. 13, no. 5, pp. 313–316, 1992.
- [88] J. Weng, Q. Liu, J. G. C. Wolke, D. Zhang, and K. De Groot, "The role of amorphous phase in nucleating bone-like apatite on plasma-sprayed hydroxyapatite coatings in simulated body fluid", *J. Mater. Sci. Lett.*, vol. 16, no. 4, pp. 335–337, 1997.
- [89] S.-W. Ha, R. Reber, K.-L. Eckert, M. Petitmermet, J. Mayer, E. Wintermantel, C. Baerlocher, and H. Gruner, "Chemical and Morphological Changes of Vacuum-Plasma-Sprayed Hydroxyapatite Coatings during Immersion in Simulated Physiological Solutions", *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 81, no. 1, pp. 81–88, 2005.
- [90] C. M. Lopatin, V. B. Pizziconi, and T. L. Alford, "Crystallization kinetics of sol-gel derived hydroxyapatite thin films", *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 12, no. 9, pp. 767–773, 2001.
- [91] R. Viitala, M. Jokinen, T. Peltola, K. Gunnelius, and J. B. Rosenholm, "Surface properties of in vitro bioactive and non-bioactive sol-gel derived materials", *Biomaterials*, vol. 23, no. 15, pp. 3073–3086, 2002.
- [92] H. M. Kim, Y. Kim, S. J. Park, C. Rey, Hyunmi Lee, M. J. Glimcher, and J. Seung Ko, "Thin film of low-crystalline calcium phosphate apatite formed at low temperature", *Biomaterials*, vol. 21, no. 11, pp. 1129–1134, 2000.
- [93] F. Li, Q. L. Feng, F. Z. Cui, H. D. Li, and H. Schubert, "A simple biomimetic method for calcium phosphate coating", *Surf. Coatings Technol.*, vol. 154, no. 1, pp. 88–93, 2002.
- [94] T. P. Niesen and M. R. De Guire, "Deposition of Ceramic Thin Films at

- Low Temperatures from Aqueous Solutions”, *J. Electroceramics*, vol. 6, no. 3, pp. 169–207, 2001.
- [95] W. Q. Yan, T. Nakamura, K. Kawanabe, S. Nishigochi, M. Oka, and T. Kokubo, “Apatite layer-coated titanium for use as bone bonding implants”, *Biomaterials*, vol. 18, no. 17, pp. 1185–1190, 1997.
- [96] H. B. Wen, J. G. C. Wolke, J. R. De Wijn, W. Q. Liu, F. Z. Cui, and K. De Groot, “Fast precipitation of calcium phosphate layers on titanium induced by simple chemical treatments”, *Biomaterials*, vol. 18, no. 22, pp. 1471–1478, 1997.
- [97] M. T. Pham, M. F. Maitz, W. Matz, H. Reuther, E. Richter, and G. Steiner, “Promoted hydroxyapatite nucleation on titanium ion-implanted with sodium”, *Thin Solid Films*, vol. 379, no. 1–2, pp. 50–56, 2000.
- [98] P. Li, I. Kangasniemi, K. de Groot, and T. Kokubo, “Bonelike Hydroxyapatite Induction by a Gel-Derived Titania on a Titanium Substrate”, *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 77, pp. 1307–1312, 1994.
- [99] S. D. Cook, K. a Thomas, J. F. Kay, and M. Jarcho, “Hydroxyapatite-Coated Titanium for Orthopedic Implant Applications”, *Clin Orthop Relat Res*, vol. 232, pp. 225–243, 1988.
- [100] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, and T. Yamamuro, “Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W”, *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 24, no. 6, pp. 721–734, 1990.
- [101] T. Kokubo, S. Ito, Z. T. Huang, T. Hayashi, S. Sakka, T. Kitsugi, and T. Yamamuro, “Ca,P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W.”, *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 24, no. 3, pp. 331–43, Mar. 1990.
- [102] P. Ducheyne and Q. Qiu, “Bioactive ceramics: The effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function”, *Biomaterials*, vol. 20, no. 23–24. pp. 2287–2303, 1999.
- [103] J. G. C. Wolke, K. De Groot, and J. A. Jansen, “Dissolution and adhesion behaviour of radio-frequency magnetron-sputtered Ca-P coatings”, *J. Mater. Sci.*, vol. 33, no. 13, pp. 3371–3376, 1998.
- [104] P. A. Campbell, “Vacuum plasma sprayed hydroxyapatite coatings on titanium alloy substrates: Surface characterization and observation of dissolution processes using atomic force microscopy”, *J. Vac. Sci. Technol. B Microelectron. Nanom. Struct.*, vol. 14, no. 2, p. 1167, Mar. 1996.
- [105] E. Chang, W. J. Chang, B. C. Wang, and C. Y. Yang, “Plasma spraying of zirconia-reinforced hydroxyapatite composite coatings on titanium: part II: dissolution behaviour in simulated body fluid and bonding degradation”, *J Mater Sci Mater Med*, vol. 8, no. 4, pp. 201–211, 1997.

- [106] J. G. C. Wolke, J. P. C. M. Van Der Waerden, K. De Groot, and J. A. Jansen, "Stability of radiofrequency magnetron sputtered calcium phosphate coatings under cyclically loaded conditions", *Biomaterials*, vol. 18, no. 6, pp. 483–488, 1997.
- [107] F. Barrere, P. Layrolle, C. A. van Blitterswijk, and K. de Groot, "Biomimetic calcium phosphate coatings on Ti6Al4V: a crystal growth study of octacalcium phosphate and inhibition by Mg²⁺ and HCO₃⁻", *Bone*, vol. 25, no. 2 Suppl, p. 107S–111S, 1999.
- [108] E. Y. Kawachi, C. a Bertran, and L. T. Kubota, "Interface potential of calcium phosphate in simulated body fluid.", *Biomaterials*, vol. 19, no. 24, pp. 2329–33, 1998.
- [109] J. L. Ong, G. N. Raikar, and T. M. Smoot, "Properties of calcium phosphate coatings before and after exposure to simulated biological fluid", *Biomaterials*, vol. 18, no. 19, pp. 1271–1275, 1997.
- [110] K. Hata, T. Kokubo, T. Nakamura, and T. Yamamuro, "Growth of a Bonelike Apatite Layer on a Substrate by a Biomimetic Process", *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 78, no. 4. pp. 1049–1053, 1995.
- [111] G. J. A. A. Soler-Illia and P. Innocenzi, "Mesoporous hybrid thin films: The physics and chemistry beneath", *Chem. - A Eur. J.*, vol. 12, no. 17, pp. 4478–4494, 2006.
- [112] C. Brinker and G. Scherer, "Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing", *Advanced Materials*, vol. 3, no. 10. p. 912, 1990.
- [113] L. L. Hench and J. K. West, "The sol-gel process", *Chem. Rev.*, vol. 90, no. 1, pp. 33–72, 1990.
- [114] G. Cao, *Nanostructures and Nanomaterials - Synthesis, Properties and Applications*, vol. 2. 2004.
- [115] M. C. B. Ammons, L. S. Ward, S. T. Fisher, R. D. Wolcott, and G. A. James, "In vitro susceptibility of established biofilms composed of a clinical wound isolate of *Pseudomonas aeruginosa* treated with lactoferrin and xylitol", *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 33, no. 3, pp. 230–236, Oct. 2016.
- [116] D. Lebeaux, A. Chauhan, O. Rendueles, and C. Beloin, "From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections.", *Pathog. (Basel, Switzerland)*, vol. 2, no. 2, pp. 288–356, Jan. 2013.
- [117] T. A. Schildhauer, B. Robie, G. Muhr, and M. Ko, "Bacterial Adherence to Tantalum Versus Commonly Used Orthopedic Metallic Implant Materials", vol. 20, no. 7, pp. 476–484, 2006.
- [118] E. M. Jaryszak, E. M. Sampson, and P. J. Antonelli, "Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on ossicular reconstruction prostheses.", *Am. J. Otolaryngol.*, vol. 30, no. 6, pp. 367–70, 2009.

- [119] V. K. Truong, S. Rundell, R. Lapovok, Y. Estrin, J. Y. Wang, C. C. Berndt, D. G. Barnes, C. J. Fluke, R. J. Crawford, and E. P. Ivanova, "Effect of ultrafine-grained titanium surfaces on adhesion of bacteria", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 83, no. 5, pp. 925–937, 2009.
- [120] E. Fadeeva, V. K. Truong, M. Stiesch, B. N. Chichkov, R. J. Crawford, J. Wang, and E. P. Ivanova, "Bacterial retention on superhydrophobic titanium surfaces fabricated by femtosecond laser ablation", *Langmuir*, vol. 27, no. 6, pp. 3012–3019, 2011.
- [121] K. Mediaswanti, V. K. Truong, J. Hasan, E. P. Ivanova, F. Malherbe, C. C. Berndt, C. Wen, and J. Wang, "Influence of Titanium Alloying Element Substrata on Bacterial Adhesion", *Adv. Mater. Res.*, vol. 535–537, pp. 992–995, Jun. 2012.
- [122] H. Koseki, A. Yonekura, T. Shida, I. Yoda, H. Horiuchi, Y. Morinaga, K. Yanagihara, H. Sakoda, M. Osaki, and M. Tomita, "Early staphylococcal biofilm formation on solid orthopaedic implant materials: In vitro study", *PLoS One*, vol. 9, no. 10, 2014.
- [123] Y. Zhang, Y. Zheng, Y. Li, L. Wang, Y. Bai, Q. Zhao, X. Xiong, Y. Cheng, Z. Tang, Y. Deng, and S. Wei, "Tantalum nitride-decorated titanium with enhanced resistance to microbiologically induced corrosion and mechanical property for dental application", *PLoS One*, vol. 10, no. 6, 2015.
- [124] T. Strateva and I. Mitov, "Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections", *Annals of Microbiology*, vol. 61, no. 4. pp. 717–732, 2011.
- [125] R. A. Weinstein, R. Gaynes, J. R. Edwards, and N. N. I. S. System, "Overview of Nosocomial Infections Caused by Gram-Negative Bacilli", *Clin. Infect. Dis.*, vol. 41, no. 6, pp. 848–854, 2005.
- [126] A. Y. Peleg and D. C. Hooper, "Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria.", *N. Engl. J. Med.*, vol. 362, no. 19, pp. 1804–13, 2010.
- [127] A. Fernandes and M. Dias, "The microbiological profiles of infected prosthetic implants with an emphasis on the organisms which form biofilms", *J. Clin. Diagnostic Res.*, vol. 7, no. 2, pp. 219–223, 2013.
- [128] W. Zimmerli and C. Moser, "Pathogenesis and treatment concepts of orthopaedic biofilm infections", *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, vol. 65, no. 2. pp. 158–168, 2012.
- [129] E. Karunakaran, J. Mukherjee, B. Ramalingam, and C. A. Biggs, "Biofilmology": A multidisciplinary review of the study of microbial biofilms", *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 90, no. 6. pp. 1869–1881, 2011.
- [130] T. Kokubo and H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?", *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–2915, 2006.

- [131] S. P. Naik, S. Yamakita, M. Ogura, and T. Okubo, "Studies on mesoporous silica films synthesized using F127, a triblock co-polymer", *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 75, no. 1–2, pp. 51–59, 2004.
- [132] A. Gutiérrez, "Formación de Biopelículas sobre superficies usadas en implantes óseos", Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, 2016.
- [133] D. A. Shirley, "High-resolution x-ray photoemission spectrum of the valence bands of gold", *Phys. Rev. B*, vol. 5, no. 12, pp. 4709–4714, 1972.
- [134] J. H. Scofield, "Hartree-Slater subshell photoionization cross-sections at 1254 and 1487 eV", *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena*, vol. 8, no. 2, pp. 129–137, 1976.
- [135] T. Riekkinen, J. Molarius, T. Laurila, A. Nurmela, I. Suni, and J. . Kivilahti, "Reactive sputter deposition and properties of TaN thin films", *Microelectron. Eng.*, vol. 64, no. 1–4, pp. 289–297, Oct. 2002.
- [136] H. Oettel and R. Wiedemann, "Residual stresses in PVD hard coatings", *Surf. Coatings Technol.*, vol. 76–77, pp. 265–273, Nov. 1995.
- [137] P. B. Barna and M. Adamik, "Fundamental structure forming phenomena of polycrystalline films and the structure zone models", *Thin Solid Films*, vol. 317, pp. 27–33, 1998.
- [138] X. Liu, G. J. Ma, G. Sun, Y. P. Duan, and S. H. Liu, "Effect of deposition and annealing temperature on mechanical properties of TaN film", *Appl. Surf. Sci.*, vol. 258, pp. 1033–1037, 2011.
- [139] T. Laurila, K. Zeng, J. K. Kivilahti, J. Molarius, and I. Suni, "Chemical stability of Ta diffusion barrier between Cu and Si", *Thin Solid Films*, vol. 373, no. 1–2, pp. 64–67, 2000.
- [140] S. Myers, J. Lin, R. M. Souza, W. D. Sproul, and J. J. Moore, "The β to α phase transition of tantalum coatings deposited by modulated pulsed power magnetron sputtering", *Surf. Coatings Technol.*, vol. 214, pp. 38–45, Jan. 2013.
- [141] S. Tsukimoto, M. Moriyama, and M. Murakami, "Microstructure of amorphous tantalum nitride thin films", *Thin Solid Films*, vol. 460, no. 1–2, pp. 222–226, 2004.
- [142] C.-S. Shin, Y.-W. Kim, N. Hellgren, D. Gall, I. Petrov, and J. E. Greene, "Epitaxial growth of metastable δ -TaN layers on MgO(001) using low-energy, high-flux ion irradiation during ultrahigh vacuum reactive magnetron sputtering", *J. Vac. Sci. Technol. A Vacuum, Surfaces, Film.*, vol. 20, no. 6, p. 2007, 2002.
- [143] M. Benegra, D. G. Lamas, M. E. Fernández de Rapp, N. Mingolo, a. O. Kunrath, and R. M. Souza, "Residual stresses in titanium nitride thin films

- deposited by direct current and pulsed direct current unbalanced magnetron sputtering”, *Thin Solid Films*, vol. 494, pp. 146–150, 2006.
- [144] J.-H. Huang, C.-H. Ho, and G.-P. Yu, “Effect of nitrogen flow rate on the structure and mechanical properties of ZrN thin films on Si(100) and stainless steel substrates”, *Mater. Chem. Phys.*, vol. 102, no. 1, pp. 31–38, 2007.
- [145] H. B. Nie, S. Y. Xu, S. J. Wang, L. P. You, Z. Yang, C. K. Ong, J. Li, and T. Y. F. Liew, “Structural and electrical properties of tantalum nitride thin films fabricated by using reactive radio-frequency magnetron sputtering”, *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.*, vol. 73, no. 2, pp. 229–236, 2001.
- [146] G. Ma, G. Lin, S. Gong, X. Liu, G. Sun, and H. Wu, “Mechanical and corrosive characteristics of Ta/TaN multilayer coatings”, *Vacuum*, vol. 89, no. 1, pp. 244–248, Mar. 2013.
- [147] R. Behrisch, *Sputtering by Particle Bombardment*, Vol III. Springer Verlag, 1991.
- [148] W. Chun, A. Ishikawa, H. Fujisawa, T. Takata, J. N. Kondo, M. Hara, M. Kawai, Y. Matsumoto, and K. Domen, “Conduction and Valence Band Positions of Ta₂O₅, TaON, and Ta₃N₅ by UPS and Electrochemical Methods”, *J. Phys. Chem. B*, vol. 107, no. 8, pp. 1798–1803, 2003.
- [149] M. Zier, S. Oswald, R. Reiche, and K. Wetzig, “XPS and ARXPS investigations of ultra thin TaN films deposited on SiO₂ and Si”, *Appl. Surf. Sci.*, vol. 252, no. 1, pp. 234–239, Sep. 2005.
- [150] P. Lamour, P. Fioux, A. Ponche, M. Nardin, M. F. Vallat, P. Dugay, J. P. Brun, N. Moreaud, and J. M. Pinvidic, “Direct measurement of the nitrogen content by XPS in self-passivated TaN_x thin films”, *Surf. Interface Anal.*, vol. 40, no. 11, pp. 1430–1437, 2008.
- [151] T.-C. Li, B.-J. Lwo, N.-W. Pu, S.-P. Yu, and C.-H. Kao, “The effects of nitrogen partial pressure on the properties of the TaN_x films deposited by reactive magnetron sputtering”, *Surf. Coatings Technol.*, vol. 201, no. 3–4, pp. 1031–1036, Oct. 2006.
- [152] M. Zier, S. Oswald, R. Reiche, M. Kozłowska, and K. Wetzig, “Interface formation and reactions at Ta-Si and Ta-SiO₂ interfaces studied by XPS and ARXPS”, in *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 2004, vol. 137–140, no. SPEC. ISS., pp. 229–233.
- [153] K. M. Latt, Y. . Lee, S. Li, T. Osipowicz, and H. . Seng, “The impact of layer thickness of IMP-deposited tantalum nitride films on integrity of Cu/TaN/SiO₂/Si multilayer structure”, *Mater. Sci. Eng. B*, vol. 84, no. 3, pp. 217–223, Jul. 2001.
- [154] H. Demiryont, J. R. Sites, and K. Geib, “Effects of oxygen content on the optical properties of tantalum oxide films deposited by ion-beam sputtering”, *Appl. Opt.*, vol. 24, no. 4, p. 490, 1985.

- [155] D. M. Gordin, D. Busardo, A. Cimpean, C. Vasilescu, D. Höche, S. I. Drob, V. Mitran, M. Cornen, and T. Gloriant, "Design of a nitrogen-implanted titanium-based superelastic alloy with optimized properties for biomedical applications", *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 7, pp. 4173–4182, Oct. 2013.
- [156] K. Valleti, A. Subrahmanyam, S. V Joshi, a R. Phani, M. Passacantando, and S. Santucci, "Studies on phase dependent mechanical properties of dc magnetron sputtered TaN thin films: evaluation of super hardness in orthorhombic Ta₄N phase", *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 41, no. 4, p. 045409, 2008.
- [157] X. Zhao, N. P. Magtoto, and J. . Kelber, "Chemical vapor deposition of tantalum nitride with tert-butylimino tris(diethylamino) tantalum and atomic hydrogen", *Thin Solid Films*, vol. 478, no. 1–2, pp. 188–195, May 2005.
- [158] S. Badrinarayanan and S. Sinha, "X-ray photoelectron spectroscopy studies of the reaction of N⁺² -ion beams with niobium and tantalum metals", *J. Appl. Phys.*, vol. 69, no. 3, p. 1141, 1991.
- [159] A. Leyland and A. Matthews, "On the significance of the H/E ratio in wear control: A nanocomposite coating approach to optimised tribological behaviour", *Wear*, vol. 246, no. 1–2, pp. 1–11, 2000.
- [160] D. V. Shtansky, N. A. Gloushankova, I. A. Bashkova, M. A. Kharitonova, T. G. Moizhess, A. N. Sheveiko, P. V. Kiryukhantsev-Korneev, A. Osaka, B. N. Mavrin, and E. A. Levashov, "Ta-doped multifunctional bioactive nanostructured films", *Surf. Coatings Technol.*, vol. 202, no. 15, pp. 3615–3624, Apr. 2008.
- [161] S. Tanaka, N. Nishiyama, Y. Oku, Y. Egashira, and K. Ueyama, "Nano-Architectural Silica Thin Films with Two-Dimensionally Connected Cagelike Pores Synthesis from Vapor Phase", *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 15, pp. 4854–4858, 2004.
- [162] D. Grosso, A. R. R. Balkenende, P. A. A. Albouy, A. Ayral, H. Amenitsch, and F. Babonneau, "Two-dimensional hexagonal mesoporous silica thin films prepared from block copolymers: Detailed characterization and formation mechanism", *Chem. Mater.*, vol. 13, no. 5, pp. 1848–1856, 2001.
- [163] T. J. Webster, C. Ergun, R. H. Doremus, R. W. Siegel, and R. Bizios, "Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics", *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 51, no. 3, pp. 475–483, 2000.
- [164] Y. E. Greish and P. W. Brown, "Characterization of bioactive glass-reinforced HAP-polymer composites", *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 52, no. 4, pp. 687–694, 2000.
- [165] S.-H. Rhee and J. Tanaka, "Effect of citric acid on the nucleation of hydroxyapatite in a simulated body fluid", *Biomaterials*, vol. 20, no. 22, pp.

2155–2160, Nov. 1999.

- [166] P. Habibovic, F. Barrere, C. A. Blitterswijk, K. Groot, and P. Layrolle, “Biomimetic hydroxyapatite coating on metal implants”, *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 85, no. 3, pp. 517–522, 2002.
- [167] A. C. Tas and S. B. Bhaduri, “Rapid coating of Ti6Al4V at room temperature with a calcium phosphate solution similar to 10× simulated body fluid”, *J. Mater. Res.*, vol. 19, no. 9, pp. 2742–2749, 2004.
- [168] S. P. Vinodhini, R. Manonmani, B. Venkatachalapathy, and T. M. Sridhar, “Interlayer TiO₂–HAP composite layer for biomedical applications”, *RSC Adv.*, vol. 6, no. 67, pp. 62344–62355, 2016.
- [169] J. Mahamid, B. Aichmayer, E. Shimoni, R. Ziblat, C. Li, S. Siegel, O. Paris, P. Fratzl, S. Weiner, and L. Addadi, “Mapping amorphous calcium phosphate transformation into crystalline mineral from the cell to the bone in zebrafish fin rays.”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 14, pp. 6316–21, 2010.
- [170] E. Beniash, R. A. Metzler, R. S. K. Lam, and P. U. P. A. Gilbert, “Transient amorphous calcium phosphate in forming enamel”, *J. Struct. Biol.*, vol. 166, no. 2, pp. 133–143, 2009.
- [171] F. Barrère, C. A. Van Blitterswijk, K. De Groot, and P. Layrolle, “Nucleation of biomimetic Ca-P coatings on Ti6Al4V from a SBF × 5 solution: Influence of magnesium”, *Biomaterials*, vol. 23, no. 10, pp. 2211–2220, 2002.
- [172] Y. Xie, X. Liu, P. K. Chu, and C. Ding, “Nucleation and growth of calcium-phosphate on Ca-implanted titanium surface”, *Surf. Sci.*, vol. 600, no. 3, pp. 651–656, 2006.
- [173] Y. Liu, J. P. Li, E. B. Hunziker, and K. de Groot, “Incorporation of growth factors into medical devices via biomimetic coatings.”, *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 364, no. 1838, pp. 233–48, 2006.
- [174] K. Yamashita, N. Oikawa, and T. Umegaki, “Acceleration and deceleration of bone-like crystal growth on ceramic hydroxyapatite by electric poling”, *Chem. Mater.*, vol. 8, no. 12, pp. 2697–2700, 1996.
- [175] A. Dey, P. H. H. Bomans, F. A. Müller, J. Will, P. M. Frederik, G. de With, and N. A. J. M. Sommerdijk, “The role of prenucleation clusters in surface-induced calcium phosphate crystallization”, *Nat Mater*, vol. 9, no. 12, pp. 1010–1014, Dec. 2010.
- [176] X. ZHAO, L. YANG, Y. ZUO, and J. XIONG, “Hydroxyapatite Coatings on Titanium Prepared by Electrodeposition in a Modified Simulated Body Fluid”, *Chinese J. Chem. Eng.*, vol. 17, no. 4, pp. 667–671, 2009.
- [177] M. H. Chi, H. K. Tsou, C. J. Chung, and J. L. He, “Biomimetic hydroxyapatite grown on biomedical polymer coated with titanium dioxide

- interlayer to assist osteocompatible performance”, in *Thin Solid Films*, 2013, vol. 549, pp. 98–102.
- [178] D. Gopi, J. Indira, and L. Kavitha, “A comparative study on the direct and pulsed current electrodeposition of hydroxyapatite coatings on surgical grade stainless steel”, *Surf. Coatings Technol.*, vol. 206, no. 11–12, pp. 2859–2869, Feb. 2012.
- [179] C. R. C. Braga, F. M. A. de Melo, I. F. Vitorino, M. V. L. Fook, and S. M. L. Silva, “19^o Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais – CBECiMat, 21 a 25 de novembro de 2010, Campos do Jordão, SP, Brasil”, *Ceramics*, no. 1, pp. 1748–1755, 2010.
- [180] X. Liu, R. K. Y. Fu, R. W. Y. Poon, P. Chen, P. K. Chu, and C. Ding, “Biomimetic growth of apatite on hydrogen-implanted silicon”, *Biomaterials*, vol. 25, no. 25, pp. 5575–5581, 2004.
- [181] M. Palard, E. Champion, and S. Foucaud, “Synthesis of silicated hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6-x(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$ ”, *J. Solid State Chem.*, vol. 181, no. 8, pp. 1950–1960, 2008.
- [182] A. Bigi, E. Boanini, C. Capuccini, and M. Gazzano, “Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals”, *Inorganica Chim. Acta*, vol. 360, no. 3, pp. 1009–1016, Feb. 2007.
- [183] I. Mobasherpour, M. S. Heshajin, A. Kazemzadeh, and M. Zakeri, “Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by using precipitation method”, *J. Alloys Compd.*, vol. 430, no. 1–2, pp. 330–333, Mar. 2007.
- [184] G. R. Sauer and R. E. Wuthier, “Fourier transform infrared characterization of mineral phases formed during induction of mineralization by collagenase-released matrix vesicles in vitro”, *J. Biol. Chem.*, vol. 263, no. 27, pp. 13718–13724, 1988.
- [185] S. B. and S. Maruno, “Deposition of Calcium Phosphate on Titanium by Electrochemical Process in Simulated Body Fluid”, *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 32, no. 10B, p. L1577, 1993.
- [186] L. T. Canham and C. L. Reeves, “Apatite Nucleation on Low Porosity Silicon in Acellular Simulated Body Fluids”, *MRS Proc.*, vol. 414, 1995.
- [187] F. Gao and P. M. A. Sherwood, “Photoelectron spectroscopic studies of the formation of hydroxyapatite films on titanium pretreated with etidronic acid”, *Surf. Interface Anal.*, vol. 45, no. 3, pp. 742–750, 2013.
- [188] C. Battistoni, M. P. Casaletto, G. M. Ingo, S. Kaciulis, G. Mattogno, and L. Pandolfi, “Surface characterization of biocompatible hydroxyapatite coatings”, *Surf. Interface Anal.*, vol. 29, no. 11, pp. 773–781, 2000.
- [189] B. H. Lee, Y. Do Kim, and K. H. Lee, “XPS study of bioactive graded layer in Ti-In-Nb-Ta alloy prepared by alkali and heat treatments”, *Biomaterials*, vol. 24, no. 13, pp. 2257–2266, 2003.

- [190] R. J. Chung, M. F. Hsieh, R. N. Panda, and T. S. Chin, "Hydroxyapatite layers deposited from aqueous solutions on hydrophilic silicon substrate", *Surf. Coatings Technol.*, vol. 165, no. 2, pp. 194–200, 2003.
- [191] H. Takadama, H.-M. Kim, T. Kokubo, and T. Nakamura, "XPS study of the process of apatite formation on bioactive Ti–6Al–4V alloy in simulated body fluid", *Sci. Technol. Adv. Mater.*, vol. 2, no. 2, pp. 389–396, 2001.
- [192] C. C. Chusuei, D. W. Goodman, M. J. Van Stipdonk, D. R. Justes, and E. A. Schweikert, "Calcium Phosphate Phase Identification Using XPS and Time-of-Flight Cluster SIMS", *Anal. Chem.*, vol. 71, no. 1, pp. 149–153, Jan. 1999.
- [193] M. Uchida, H.-M. Kim, T. Kokubo, S. Fujibayashi, and T. Nakamura, "Structural dependence of apatite formation on titania gels in a simulated body fluid.", *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 64, no. 1, pp. 164–170, 2003.
- [194] H. M. Kim, T. Himeno, T. Kokubo, and T. Nakamura, "Process and kinetics of bonelike apatite formation on sintered hydroxyapatite in a simulated body fluid", *Biomaterials*, vol. 26, no. 21, pp. 4366–4373, 2005.
- [195] G. A. Parks, "The isoelectric points of solid oxides, solid hydroxides, and aqueous hydroxo complex systems", *Chem. Rev.*, vol. 65, no. 2, pp. 177–198, 1965.
- [196] P. Li, C. Ohtsuki, T. Kokubo, K. Nakanishi, N. Soga, and K. De Groot, "The role of hydrated silica, titania, and alumina in inducing apatite on implants", *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 28, no. 1, pp. 7–15, 1994.
- [197] M. Kosmulski, "Attempt To Determine Pristine Points of Zero Charge of Nb₂O₅, Ta₂O₅, and HfO₂", *Langmuir*, vol. 13, no. 10, pp. 6315–6320, 1997.
- [198] I. B. Leonor, A. Ito, K. Onuma, N. Kanzaki, and R. L. Reis, "Atomic force microscopy as a tool to study in-situ the in-vitro bioactivity of starch thermoplastic/hydroxylapatite biomaterials", in *Bioceramics 14*, vol. 218–2, 2002, pp. 55–59.
- [199] M. Manso, C. Jiménez, C. Morant, P. Herrero, and J. M. Martínez-Duart, "Apatite films produced by electrodeposition: characterization by TEM and AFM", *Surf. Interface Anal.*, vol. 31, no. 12, pp. 1104–1109, Dec. 2001.
- [200] B. Assenza and A. Piattelli, "Nanomechanical properties of bone around cement-retained abutment implants . A minipig study", *J. Osseointegration*, vol. 7, no. June, pp. 33–39, 2015.
- [201] R. Hodgkinson, J. D. Currey, and G. P. Evans, "Hardness, an indicator of the mechanical competence of cancellous bone.", *J. Orthop. Res.*, vol. 7, pp. 754–758, 1989.
- [202] P. K. Zysset, X. Edward Guo, C. Edward Hoffler, K. E. Moore, and S. A. Goldstein, "Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bone

- lamellae measured by nanoindentation in the human femur”, *J. Biomech.*, vol. 32, no. 10, pp. 1005–1012, 1999.
- [203] G. P. Evans, J. C. Behiri, J. D. Currey, and W. Bonfield, “Microhardness and Young Modulus in Cortical Bone Exhibiting a Wide-Range of Mineral Volume Fractions, and in a Bone Analog”, *J. Mater. Sci.-Mater. Med.*, vol. 1, no. 1, pp. 38–43, 1990.
- [204] K. A. Gross and S. Saber-Samandari, “Nano-mechanical properties of hydroxyapatite coatings with a focus on the single solidified droplet”, *J. Aust. Ceram. Soc.*, vol. 43, no. 2, pp. 98–101, 2007.
- [205] R. Jimbo, P. G. Coelho, M. Bryington, M. Baldassarri, N. Tovar, F. Currie, M. Hayashi, M. Andersson, D. Ono, S. Vandeweghe, and a. Wennerberg, “Nano Hydroxyapatite-coated Implants Improve Bone Nanomechanical Properties”, *J. Dent. Res.*, pp. 1172–1177, 2012.
- [206] S. Best, B. Sim, M. Kayser, and S. Downes, “The dependence of osteoblastic response on variations in the chemical composition and physical properties of hydroxyapatite”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 8, no. 2, pp. 97–103, 1997.
- [207] S. R. Radin and P. Ducheyne, “The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vitro behavior. II. Precipitation”, *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 27, no. 1, pp. 35–45, 1993.
- [208] S. H. Maxian, T. Di Stefano, M. C. Melican, M. L. Tiku, and J. P. Zawadsky, “Bone cell behavior on Matrigel-coated Ca/P coatings of varying crystallinities.”, *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 40, pp. 171–179, 1998.
- [209] Y. Shin and M. Akao, “Tissue reactions to various percutaneous materials with different surface properties and structures”, *Artif. Organs*, vol. 21, no. 9, pp. 995–1001, 1997.
- [210] L. E. Smith, R. Smallwood, and S. Macneil, “A comparison of imaging methodologies for 3D tissue engineering”, *Microsc. Res. Tech.*, vol. 73, no. 12, pp. 1123–1133, 2010.
- [211] R. Kornu, W. J. Maloney, M. A. Kelly, and R. L. Smith, “Osteoblast adhesion to orthopaedic implant alloys: Effects of cell adhesion molecules and diamond-like carbon coating”, *J. Orthop. Res.*, vol. 14, no. 6, pp. 871–877, 1996.
- [212] B. Feng, J. Weng, B. C. Yang, S. X. Qu, and X. D. Zhang, “Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblast”, *Biomaterials*, vol. 24, no. 25, pp. 4663–4670, 2003.
- [213] C. J. Frandsen, K. S. Brammer, K. Noh, G. Johnston, and S. Jin, “Tantalum coating on TiO₂ nanotubes induces superior rate of matrix mineralization and osteofunctionality in human osteoblasts”, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 37, no. 1, pp. 332–341, 2014.

- [214] H. Koo, J. Xiao, and M. I. Klein, "Extracellular polysaccharides matrix--an often forgotten virulence factor in oral biofilm research", *Int J Oral Sci*, vol. 1, no. 4, pp. 229–234, 2009.
- [215] I. W. Sutherland, "Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework", *Microbiology*, vol. 147, no. 1. pp. 3–9, 2001.
- [216] B. Xavier, E. Martinez-garcia, and K. R. Foster, "Social Evolution of Spatial Patterns in Bacterial Biofilms :", *Am. Nat.*, vol. 174, no. 1, pp. 1–12, 2009.
- [217] M. A. Massa, C. Covarrubias, M. Bittner, I. A. Fuentevilla, P. Capetillo, A. Von Marttens, and J. C. Carvajal, "Synthesis of new antibacterial composite coating for titanium based on highly ordered nanoporous silica and silver nanoparticles", *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 45, pp. 146–153, 2014.
- [218] M. V. Roldán, P. De Oña, Y. Castro, A. Durán, P. Faccendini, C. Lagier, R. Grau, and N. S. Pellegrini, "Photocatalytic and biocidal activities of novel coating systems of mesoporous and dense TiO₂-anatase containing silver nanoparticles", *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 43, pp. 630–640, 2014.
- [219] T. Asefa and Z. Tao, "Biocompatibility of mesoporous silica nanoparticles", *Chemical Research in Toxicology*, vol. 25, no. 11. pp. 2265–2284, 2012.
- [220] F. Tang, L. Li, and D. Chen, "Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, biocompatibility and drug delivery", *Adv. Mater.*, vol. 24, no. 12, pp. 1504–1534, 2012.

Apéndices

Apéndice A

Extracción de osteoblastos a partir de calvaria de rata neonata

Se utilizó una camada de ratas Sprague Dawley de 2 o 3 días de nacida. Se extrajo las células a partir de las calvarias previas a la mineralización, de manera que mediante el uso de colagenasa, se deshacen las fibras de colágeno que secuestran los osteoblastos y de esta manera extraerlos para fines de cultivo. El procedimiento fue el siguiente:

Se decapitaron los animales y se utilizó alcohol isopropílico para desinfectar las cabezas, se disectó la calvaria del animal apartando el tejido externo (piel) y masa cefálica y se haló la calvaria con firmeza para desprenderla. Se colocó las calvarias extraídas en buffer fosfato salino y se eliminó restos de otros tejidos limpiando mediante raspado superficial. Se repitió este proceso de limpieza 2 veces para remover cualquier tejido conectivo o sangre que pueda contaminar el proceso.

Se cortó las calvarias en fragmentos pequeños de alrededor de 5 mm de arista. Se transfirió los fragmentos a un tubo con tapa y se colocó en 3 mL de medio de digestión (medio DMEM con 0.1% colagenasa, 0.25 % de tripsina y 0.5% de EDTA) y se incubó a 37 °C por 20 minutos en agitación constante. Se retiró el medio de digestión y se descartó. Se agregó nuevamente 3 mL de solución de digestión y se incubó por 10 min a 37°C en agitación. Se descartó ese segundo medio. Se repitió agregarle 3 mL de medio de digestión una tercera vez e incubarlo por 10 minutos en las mismas condiciones. Ese tercer medio se retira en otro tubo y se centrifuga a 6 mil RPM por 5 minutos. Se debe obtener un sedimento blanco correspondiente a las células extraídas y precipitadas. El sobrenadante se descarta.

Se resuspendió el sedimento en 3 mL de PBS 1X, se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 2 mL de medio DMEM complementado y se sembró en placa de cultivo para incubar en ambiente de 37 °C, 5% CO₂ y 95% humedad.

Apéndice B

Evaluación de la adhesión y biocompatibilidad de discos de SS316LVM y Ti con diferentes recubrimientos

Para ello se extrajeron osteoblastos a partir de calvaria de rata neonata y 3 consecutivos pasajes según metodología descrita en el anexo A. Se contabilizó el número de células por mL utilizando una cámara de Neubauer, colorante TrypanBlue y un microscopio óptico convencional. Se colocó los discos en placas de cultivo celular de 24 pozos y se esterilizó mediante 15 minutos de irradiación UV por cada cara.

A cada pozo se agregó medio DMEM complementado con 10% de suero fetal

bovino y se adicionaron 800 mil osteoblastos a cada pozo. Posteriormente se incubó en condiciones estándar (37°C, 5% CO₂) por un lapso de 24 horas.

Una vez completado el lapso de incubación se realizó el procedimiento de preparación y tinción con Faloidin-FITC y DAPI.

Apéndice C

Protocolo para observación mediante fluorescencia con Faloidin-FITC/DAPI

La tinción mediante Faloidin-FITC y DAPI permite la visualización mediante fluorescencia de la célula. El faloidin se une a los filamentos de actina mientras que el FITC es un fluoróforo que se excita a 492 nm y emite en 518 nm (verde) permitiendo la visualización del citoesqueleto; y DAPI es un intercalador fluorescente de DNA que se excita a 358 nm y emite en 461nm (azul) y permite la visualización del núcleo (Smith et al. 2010).

Para llevar a cabo la tinción se fijó las muestras en paraformaldehído 4% (en PBS) frío por 10 minutos a temperatura ambiente, posterior se realizó 3 lavados rápidos con PBS. Se agregó buffer permeabilizador (10.3 g sacarosa, 0.292g NaCl, 0.06 g MgCl₂, 0.476 g HEPES, 0.5 mL tritón X-100, ajustar a pH 7.2 y completar a 100 mL) durante 1 minuto y medio, se retiró y lavó una vez con PBS. Se agregó albúmina sérica humana 1% (en PBS) y se incubó a 37 °C por 5 minutos. Se retiró y se lavó una vez con PBS.

Se agregó Faloidin-FITC 50 µg/mL y se incubó por 1 hora en oscuridad a 37 °C. Se retiró y lavó 3 veces con Tween20 0,5% en PBS por 5 minutos cada lavado. Se retiró el Tween y se agregó una gota de solución DAPI con gotero, dejándolo a 4 °C en oscuridad durante toda una noche. Una vez transcurrido el tiempo, se retiró el excedente de líquido en el pozo y se observó mediante un microscopio invertido con módulo de fluorescencia y se tomó imágenes correspondientes a cada muestra. Por último se utilizó el software Microsoft Office Image Editor para reducir brillo y aumentar contraste de imágenes con tinción DAPI y el Software Adobe Photoshop CS6 para realizar el overlay de las dos imágenes.