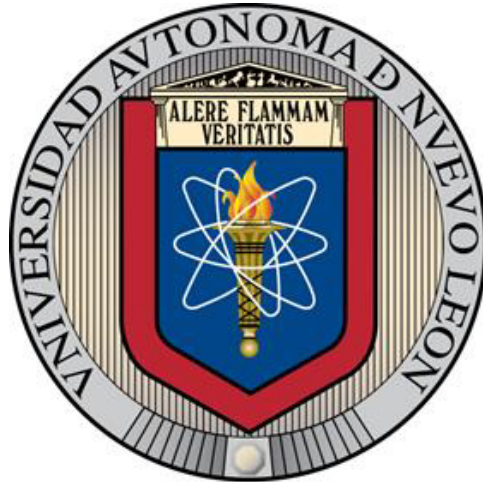


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA



**“BIOCOMPATIBILIDAD Y BIOACTIVIDAD DE LA ALEACIÓN CON
MEMORIA DE FORMA $TiZrNbSn$ MODIFICADA SUPERFICIALMENTE
PARA EL DESARROLLO DE DISPOSITIVOS BIOMÉDICOS”**

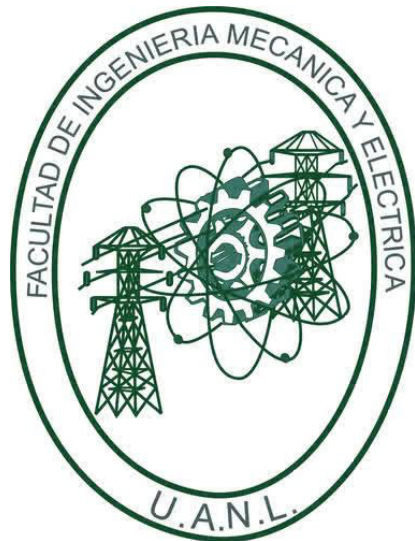
POR

DANIEL DAGNINO ACOSTA

**EN OPCIÓN AL GRADO DE:
DOCTOR EN INGENIERÍA DE MATERIALES**

OCTUBRE, 2017

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**“BIOCOMPATIBILIDAD Y BIOACTIVIDAD DE LA ALEACIÓN CON
MEMORIA DE FORMA $TiZrNbSn$ MODIFICADA SUPERFICIALMENTE
PARA EL DESARROLLO DE DISPOSITIVOS BIOMÉDICOS”**

POR

DANIEL DAGNINO ACOSTA

**EN OPCIÓN AL GRADO DE:
DOCTOR EN INGENIERÍA DE MATERIALES**

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN, MÉXICO

OCTUBRE, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Los miembros del Comité de Tesis recomendamos que la Tesis "BIOCOMPATIBILIDAD Y BIOACTIVIDAD DE LA ALEACIÓN CON MEMORIA DE FORMA TiZrNbSn MODIFICADA SUPERFICIALMENTE PARA EL DESARROLLO DE DISPOSITIVOS BIOMÉDICOS" realizada por el alumno "DANIEL DAGNINO ACOSTA", con número de matrícula 1694254, sea aceptada para su defensa como opción al grado de "DOCTOR EN INGENIERÍA DE MATERIALES"

El Comité de Tesis



Dr. Enrique Manuel López Cuéllar
Director



Dr. Luis Alberto López Pavón
Revisor



Dr. Iván Eleazar Moreno Cortez
Revisor



Dra. Diana Guadalupe Zárate Triviño
Revisor



Dr. Moisés Armides Franco Molina
Revisor

Vp. Bo.


Dr. Simón Martínez Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado



TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
RESUMEN.....	1
CAPÍTULO 1	3
INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Biomateriales metálicos en aplicaciones médicas.	4
1.2 Características de los Biomateriales metálicos en Ingeniería biomédica.	7
1.2.1 Biocompatibilidad de los elementos aleantes.	8
1.2.2 Corrosión de los materiales de implante.	9
1.2.3 Propiedades Mecánicas adecuadas.	10
1.2.4 Resistencia al desgaste.....	11
1.2.5 Oseointegración de los materiales metálicos.....	12
1.3 Bioactividad y mecanismos de enlace al hueso.	13
1.3.1 Bioactividad.....	13
1.3.2 Mecanismos de enlace al hueso.....	17
1.4 Tratamientos superficiales de aleaciones de Titanio.	19
1.4.1 Tratamientos alcalinos y formación de apatitas superficiales.	20
1.4.2 Anodización electroquímica.	25
1.5 Aleaciones de Titanio con aplicaciones biomédicas.....	28
1.5.1 Propiedades microestructurales del Titanio.....	28

1.6	Aleaciones con memoria de forma (AMF) y sus aplicaciones en la medicina.....	32
1.6.1	Memoria de forma y superelasticidad.	33
1.7	Dispositivos biomédicos.	35
1.7	Hipótesis	40
1.8	Objetivos.....	40
1.8.1	Objetivo General	40
1.8.2	Objetivos específicos.....	40
CAPÍTULO 2		42
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....		42
2.1	Materiales.....	44
2.2	Preparación mecánica de las muestras de Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn.....	44
2.3	Pruebas de Biocompatibilidad <i>in-vitro</i> de la aleación Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn.....	46
2.4	Prueba de biocompatibilidad <i>in-vivo</i> de Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn.....	50
2.5	Tratamientos alcalinos de las muestras de Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn	52
2.6	Preparación del fluido fisiológico simulado (SBF)	54
2.7	Evaluación de las propiedades bioactivas del material.....	57
2.7	Capacidad de Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn para generar nano estructuras por anodizado como ruta para la construcción de biodispositivos inteligentes.....	58
2.8	Capacidad de carga y liberación local de fármaco de nano estructuras tubulares en Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn.	60
2.9	Técnicas de caracterización	61
2.9.1	Difracción de rayos-X (DRX).....	61
2.9.2	Microscopía electrónica de Barrido (SEM)	62
2.9.3	Microscopía electrónica de Fluorescencia	63
2.9.4	Espectrometría UV-Vis.....	64
CAPÍTULO 3		66

RESULTADOS	66
3.1 Pruebas de Biocompatibilidad <i>in-vitro</i> e <i>in-vivo</i>	67
3.1.1 Prueba <i>in-vitro</i> de la aleación Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn en macrófagos (PBMC).	68
3.1.2 Prueba <i>in-vivo</i> . Observación sobre la aceptación de las muestras de Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn y TiNi en ratones BALB/c	71
3.1.4 Histopatología de pruebas <i>in-vivo</i> de Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn.....	80
3.2 Pruebas de Bioactividad <i>in-vitro</i> de la aleación Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn	82
3.2.1 Difracción de rayos-X (DRX).	83
3.2.2 Microscopía de Barrido de Electrones (SEM).....	92
3.2.3 Espectroscopia de rayos-X de energía dispersiva (EDAX).....	96
3.3 Capacidad de la aleación Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn para producir nano estructuras: Anodización como ruta para mejorar la biocompatibilidad y bioactividad.	103
CAPÍTULO 4	127
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	127
BIBLIOGRAFÍA	133
ANEXOS	146

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
I. Propiedades mecánicas de materiales de implante metálico y del hueso cortical.....	11
II. Concentraciones iónicas en (mM) de SBF comparado con el plasma sanguíneo humano.....	14
III. Descripción de algunos ortofosfatos de Calcio.	15
IV. Principales líneas de vibración en infrarrojo de algunos fosfatos de calcio relevantes.	16
V. Aleaciones de base Titanio para aplicaciones biomédicas.	32
VI. Razón promedio de Ca/P obtenido mediante EDAX en cada uno de los tratamientos después de inmersión en 1.5SBF por 30 días.	101
VII. Características superficiales de los precipitados obtenidos en las muestras después de algún tratamiento alcalino y posterior inmersión en SBF por 30 días.	102
VIII. Datos de la densidad y el volumen encerrado por las nanoestructuras generadas a diferentes potenciales.....	118

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1.1. Articulación de rodilla con daño por artritis antes y después del implante metálico.	4
1.2. Categorías de los biomateriales metálicos en base a su mayor componente.....	5
1.3. Enlace biológico, fibras de colágeno delineadas por flechas insertadas dentro de una capa de la superficie de HA después de tres meses de haber sido implantada.....	19
1.4. Una ilustración esquemática de la formación de apatita sobre aleaciones de titanio porosas tratadas alcalinamente e inmersas en SBF.	21
1.5. En la imagen vemos los picos característicos de una apatita después de tratamientos hidrotérmicos seguido de inmersión en SBF de una aleación de TiZrNbSn.HTC después de 15 días de inmersión.	24
1.6. Esquema del proceso de anodización electroquímica, la fuente de potencia está conectada al ánodo de Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn y el cátodo al electrodo de Pt.....	27
1.7. Picos de difracción estándar de las fases martensita α (α' , α'') y austenita β	29
1.8. Diagrama de fases de una aleación de titanio a) utilizando elementos α estabilizadores y en b) β estabilizadores.	30
1.9. Efecto de memoria de forma. En la figura se muestran los cambios de fase y de estructura cristalina de las AMF cuando se aplica una carga, las flechas indican cambio en la temperatura el color rojo indica mayor temperatura que el azul.	34
1.10. Curva característica de un ensayo de tensión con aleaciones superelásticas, la fase martensita se induce por esfuerzo después de aplicar una carga, cuando se retira la carga la fase martensita se transforma en austenita.....	35
1.11. Alambres ortodónticos en fase austenítica utilizados para aplicar esfuerzos constantes.	36
1.12. En la imagen (a) se observa una Placa de NiTi utilizada en fractura mandibular y en (b) grapas antes y después del tratamiento.....	37

1.13. En (a) se muestra un espaciador de la columna vertebral en estado martensítico y austenítico.	38
1.14. Fijación de fragmentos óseos mediante placas y tornillos metálicos.....	39
2.1. Diagrama de flujo de la metodología que se siguió para el desarrollo de las pruebas experimentales.....	43
2.2. Se muestra el proceso de preparación mecánica de la muestra a) corte por hiloeroción b) desbaste mecánico y c) zonificación.....	45
2.3. Extracción de sangre por venopunción.	46
2.4. Separación de células de PBMC por centrifugado a) antes de centrifugar la sangre se mezcla con Ficoll y b) después de centrifugar se obtiene el pellet de células PBMC.....	47
2.5. En esta imagen se muestra las células de PBMC sembradas sobre la aleación de TiNi y Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn y como control se sembraron en el recipiente.....	49
2.6. Ratones BALB/c después de la cirugía subcutánea.	51
2.7. Tejido circundante, hígado y bazo en recipientes con formaldehído.	52
2.8. Tratamientos utilizados para activar la superficie de Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn, a) hidróxido de potasio, b) hidróxido de sodio c) hidróxido de calcio y agua.	54
2.9. Preparación de SBF utilizando un baño térmico y una plancha con agitación magnética para controlar la temperatura.	56
2.10. Diagrama esquemático de las muestras inmersas en SBF, con temperatura controlada.	57
2.11. a) Construcción de los electrodos de 1cm ² de la aleación Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn y b) Anodización de la aleación Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn con un contra electrodo de Pt en sulfato y fluoruro de amonio como electrolito.....	59
2.12. Equipo de difracción de rayos-x Difractómetro Bruker Advanced Solutions D8.	62
2.13. Equipo de Microscopía Electrónica de Barrido Nova NanoSEM 200 del CIIDIT de la UANL.	63
2.14. Equipo de Microscopía Confocal OLYMPUS laser Scanning Biological Microscope FV1200 que se encuentra en la facultad de ciencias biológicas de la UANL.	64
2.15. Equipo de espectrometría UV-Vis Thermo scientific NanoDrop 2000 que se encuentra en la facultad de ciencias biológicas de la UANL.	65
3.1: Microscopía confocal de células PBMC marcadas con DAPI que fluorescen en color Azul, expuestas a las superficies de a) TiNi y b) Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn durante tres días.....	70
3.2: Liberación de óxido nítrico por células PBMC expuestas a las placas de TiNi, Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn por un periodo de tres días.	70

Figura 3.3: Grupo de ratones el día en que se realizó el implante subcutáneo de las muestras en a) de Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn en b) de TiNi y en c) es el control.....	72
3.4: Grupo de ratones el 4 día después de la operación con implante subcutáneo de las muestras de Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn.	73
3.5: Grupo de ratones el 4 día después de la operación con implante subcutáneo de las muestras de TiNi.	74
3.6: Grupo de ratones control (solo se realizó incisión y sutura) el día de la operación.	75
3.7: Grupo de ratones después de 60 días en que se realizó el implante subcutáneo en (a) con muestras de Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn en (b) muestras de TiNi y en (c) grupo control (solo se realizó incisión y sutura).	76
3.8: Extracción de implante subcutáneo marcado con una flecha en a) muestras de Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn y en b) TiNi después de 60 días de la operación, el círculo marca el tejido integrado a las muestras.	78
3.9: Ratón con implante subcutáneo de Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn después de 60 días de la operación.	79
3.10: ratón con implante subcutáneo de TiNi después de 60 días de la operación.	79
3.11: Micrografías representativas del tejido periférico alrededor de los implantes. a) Fibroso (*) y amarillo adiposo (AY) y tejido adiposo fetal o marrón (AB) alrededor del implante de control. b) El hueso trabecular (flecha) con médula ósea (*) formado cerca del implante de control. c) La sección hepática del ratón con implante de control muestra granuloma lobular pequeño (flecha). d) El bazo del mismo animal muestra hiperplasia de pulpa blanca. e) trabéculas óseas con médula ósea formadas alrededor del implante de aleación TiZrNbSn. f) Inflamación portal en la sección hepática de ratón con implante de aleación TiZrNbSn.....	81
3.12: Difracción de rayos-X de la aleación rolada Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn, presenta máximos de intensidad característicos de las fases α' y β	84
3.13: En color negro se presenta la DRX de la aleación Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn rolada y en color rojo los tratamientos en a) 1M de KOH y en b) 1 M de NaOH ambos después de inmersión en 1.5SBF por 30 días y en azul los principales picos de difracción de la hidroxiapatita.....	85
3.14: DRX de Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn en color negro y de los tratamientos en color rojo a) 5M de KOH y b) 5M de NaOH ambos después de inmersión en 1.5SBF por 30 días, en azul los principales picos de difracción de la hidroxiapatita.....	87
3.15: Difracción de rayos-x de la muestra Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn en color negro y del tratamiento Ca(OH) ₂ después de inmersión en 1.5SBF por 30 días en color rojo, en azul los principales picos de difracción de la hidroxiapatita.	88
3.16: Difracción de rayos-X de la muestra Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn en color negro y de los tratamientos NaOH, KOH, Ca(OH) ₂ después de inmersión en 1.5SBF por 30 días.....	89

3.17: Difracción de rayos-X de la muestra Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn después de diferentes tratamientos NaOH, KOH y Ca(OH) ₂ , seguido de inmersión en 1SBF por 30 días.	91
3.18: Imágenes SEM de la superficie los tratamientos en a) 1M de NaOH y en b) 5M KOH seguidos de inmersión en 1.5SBF por 30 días, la línea negra marca grietas superficiales de los precipitados.93	93
3.19: Imágenes SEM de la muestra Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn en a) después del tratamiento 1M de KOH y seguido de inmersión en 1.5SBF por 30 días y en b) es la superficie aumentada en el área que marcada con el círculo.	94
3.20: Imágenes SEM de la muestra de Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn en a) después del tratamiento 5M de NaOH, seguido de inmersión en 1.5SBF por 30 días ,las imágenes b) y c) es la superficie aumentada en el área que marca el círculo negro.....	95
3.21: Imágenes SEM de la muestra de Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn en (a) después del tratamiento Ca(OH) ₂ , seguido de inmersión en 1.5SBF por 30 días y (b) es la superficie aumentada en el área que marca el círculo negro.....	96
3.22: Análisis elemental EDAX de los tratamientos en a) 1M de KOH y en b) 1M de NaOH después 30 días de inmersión en 1.5SBF.....	98
3.23: Análisis elemental EDAX de los tratamientos en a) 5M de NaOH y en b) 5M de KOH ambos después de 30 días de inmersión en 1.5SBF.	99
3.24: Análisis elemental EDAX del tratamiento Ca(OH) ₂ seguido de inmersión en 1.5 SBF por 30 días.	100
3.25. Implante en hueso de Titanio con nanoestructuras tubulares (TNT/Ti) cargado con droga. .	104
3.26. Imágenes SEM superficiales y transversales de las muestras anodizadas a 15, 20, 25 y 30 V y su composición elemental.	106
3.27. Variación en el diámetro en a) y longitud b) de los nanotubos formados sobre Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn como función del potencial de anodización.	108
3.28. Densidad de nanotubos por unidad de área de los nanotubos formados sobre Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn como función del potencial de anodización.	109
3.29. Microscopía SEM en a) se muestra la cara lateral de la muestra anodizada a 30V, la imagen b) es un aumento del área marcada con un círculo negro, la línea amarilla apunta a la arista de la muestra.	110
3.30. Densidad de corriente contra el tiempo de las muestras anodizadas con potenciales constante de 15, 20, 25 and 30V.	111
Figure 3.31 Diagrama que relaciona la densidad de corriente con la evolución superficial durante el proceso de anodización a) formación de una capa de óxido, b) Formación de poros sobre la capa de óxido, c) crecimiento de los poros en nanotubos.	112

3.32. Capacidad de liberación de fármacos de las nanoestructuras anodizadas a diferentes voltajes 15, 20 y 25V y sin anodizar.....	115
3.33. Imágenes SEM de las muestras anodizadas a 30 V antes de recubrirlas con quitosano en (a) y (b) son vistas de la sección transversal de la superficie, en (c) es la vista superior de la superficie y (d) es la densidad de corriente contra el tiempo registrada durante el proceso.	120
3.34. En la imagen a) se observan las muestras anodizadas a 30V recubiertas con quitosano y en b) las membranas de quitosano obtenidas después de que se despegan del sustrato metálico.	121
3.35. Imágenes SEM del compuesto TNTM/quitosano en (a), (b) y (d) se presentan las vistas transversales de la membrana después de ser despegada del sustrato metálico en (c) se presenta la composición elemental del área marcada con un círculo negro en d).	122
3.36. Imagen SEM de la nanoestructura TNTM/Quitosano anodizada a 30V y su composición elemental.	123
3.37. Imágenes de SEM de las muestras de Ti ₂₄ Zr ₁₀ Nb ₂ Sn anodizadas a 30V por 30 minutos e inmersas en 10xSBF por cuatro horas.	125

RESUMEN

La fijación de fracturas óseas mediante la implantación de prótesis metálicas provoca la liberación de productos de corrosión al torrente sanguíneo, adicionalmente algunas enfermedades como la artritis causan degeneración ósea en articulaciones esto provoca inmovilidad parcial o total en pacientes. Una propuesta tecnológica para abordar esta problemática es la fijación o el reemplazo óseo con materiales metálicos a base titanio con excelente biocompatibilidad y bioactividad cuando están presentes en fluidos fisiológicos.

En el presente trabajo de investigación se evaluó la biocompatibilidad y bioactividad de diferentes modificaciones superficiales de la aleación TiZrNbSn cuando está presente en fluidos corporales, además se valoró el alcance de los métodos electroquímicos para mejorar estas propiedades. Para este propósito la primera parte de este trabajo consistió en la evaluación de la biocompatibilidad *in-vitro* con células sanguíneas del sistema inmune (PBMC) e *in-vivo* con un grupo de 12 ratones albinos BALB/C durante un periodo de tiempo de 60 días.

En la segunda parte del trabajo se realizaron modificaciones superficiales con tratamientos alcalinos para medir su bioactividad en fluido corporal simulado, lo cual es un requerimiento esencial para mejorar la fijación ósea de la interface metal-hueso.

En la tercera parte de este trabajo se estudió la capacidad de generar nanoestructuras superficiales mediante la técnica de oxidación anódica a potencial constante y se analizó la capacidad de carga y liberación local de droga de las nanoestructuras generadas. Por último, se desarrolló una metodología para crear un compósito de nanotubos de óxido de la aleación TiZrNbSn-Quitano.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÒN

El titanio y algunas de sus aleaciones han sido empleadas de forma convencional en prótesis médicas debido a que por sus propiedades mecánicas pueden tratar una deficiencia o lesión ósea. Las bio-aleaciones superelásticas cuaternarias base Ti pueden ser una alternativa en la medicina moderna debido a que por su bajo módulo elástico presentan mayor similitud con el hueso. Además, sus propiedades superelásticas (SE) y de memoria de forma (SME) las cuales permiten recuperar su forma original después de quitar la carga aplicada (SE) o aplicando calor (SME) después de haber sido deformado las hacen excelentes candidatos en la construcción de dispositivos biomédicos. Adicionalmente, pueden generar recubrimientos biomiméticos y bioactivos que permitan un efecto de regeneración local, sin embargo, la adición y composición porcentual de los elementos aleantes, modifica drásticamente las propiedades mecánicas, químicas y físicas del material, siendo la liberación de iones y óxidos un parámetro crucial en la aplicación de aleaciones cuaternarias en modelos

biológicos. En las últimas décadas se ha encontrado que la modificación superficial de prótesis metálicas de titanio juega un rol importante cuando son expuestas a tejidos vivos.

1.1 Biomateriales metálicos en aplicaciones médicas.

El desarrollo de implantes metálicos fue primariamente dirigido por la demanda en la reparación de hueso. La artritis es una enfermedad que produce un dolor intenso en las articulaciones y algunas veces inmovilidad, debido a la pérdida del cartílago articular lo que reduce el espacio entre los huesos, esto causa discapacidad en la mayoría de la población mayor de 65 años y se considera rara en población menores a 45 años [1], [2]. El cambio total de la articulación puede reducir el dolor y la movilidad de la articulación como se muestra en la figura 1.1.

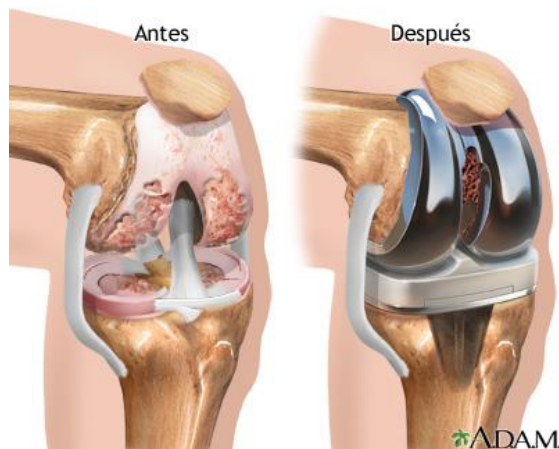


Figura 1.1. Articulación de rodilla con daño por artritis antes y después del implante metálico [3].

Además en personas jóvenes y dinámicas como los deportistas a menudo se necesitan reemplazos debido a la fractura y la tensión excesiva. Actualmente los metales han encontrado aplicaciones en la práctica ortodóntica y dental, entre las que se incluyen: alambres ortodónticos, grapas mandibulares, espaciadores de vertebras, válvulas aórticas o prótesis femorales [4], [5]. Los materiales metálicos los podemos resumir en cuatro tipos categorizados por la mayor cantidad de sus elementos aleantes: aceros inoxidables, aleaciones base cobalto, magnesio, talio y titanio como se muestra en la figura 1.2.

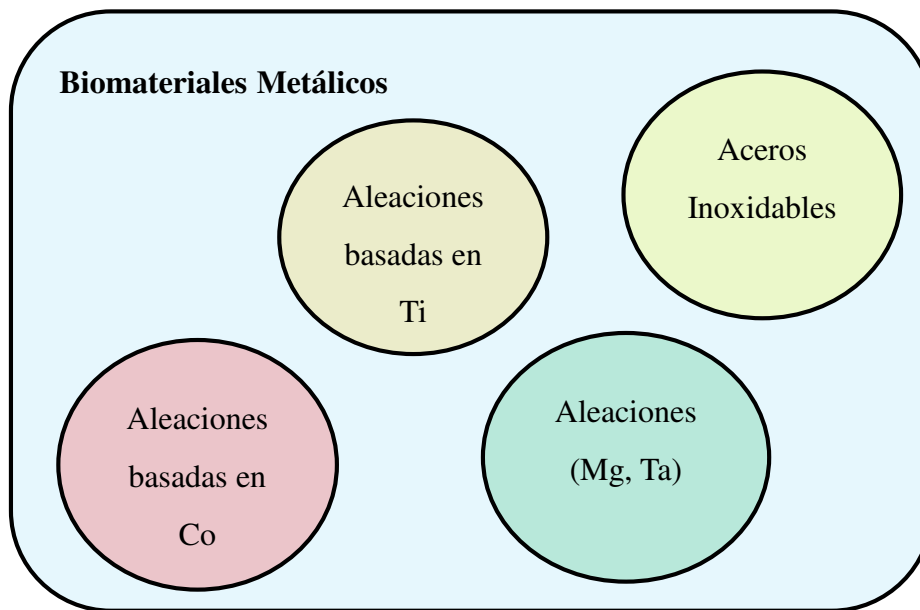


Figura 1.2. Categorías de los biomateriales metálicos en base a su mayor componente.

En los últimos 60 años los biomateriales metálicos han tenido un gran desarrollo los cuales pueden ser organizados en tres generaciones. Materiales bioinertes, debido a que las

aleaciones de cobalto son biológicamente inertes y no dañan los tejidos se consideran de primera generación. Materiales bioactivos y biodegradables, las aleaciones de titanio tienen la propiedad de enlazarse con el tejido vivo por lo que se consideran de segunda generación y en la tercera generación materiales que estimulan una respuesta celular específica, en este grupo se encuentran las aleaciones metálicas de magnesio [6]. Existe un gran interés en el desarrollo de materiales con propiedades únicas como efecto de memoria de forma de TiNi o degradabilidad de las aleaciones de Mg que podrían ser especializadas para requerimientos específicos de algunos tejidos.

Una de las características comunes de los biomateriales es que están en contacto íntimo con el cuerpo vivo. En ciencia de los materiales *Biocompatibilidad* es la propiedad de un material de no ser tóxico o tener efectos perjudiciales cuando interactúa con sistemas biológicos [7]. un *biomaterial* es una sustancia natural o sintética que puede usarse como un sistema o parte de un sistema para tratar aumentar o reemplazar un tejido órgano o función del cuerpo [8]. sin embargo la *biocompatibilidad* de los materiales considera muchos aspectos que deben ser considerados como su habilidad de inducir muerte celular o del tejido (citotoxicidad), formación de cáncer (cancerogenicidad), daño genético (mutagenicidad), respuesta inmune (pirogenicidad y alergenidad) o coagulación sanguínea (trombogenicidad). La FDA (Food and Drug Administration) de acuerdo a la norma ISO 10993-1, ha dado una definición prevalente de biocompatibilidad, como el efecto que el material induce sin causar daño en el huésped. De una forma más general, la biocompatibilidad de un biomaterial de implante metálico está directamente relacionado por

su resistencia a la corrosión y por los efectos biológicos de los iones metálicos liberados [9], [10].

1.2 Características de los Biomateriales metálicos en Ingeniería biomédica.

Los primeros registros del uso de materiales metálicos que se encuentra en la literatura son del 1930 cuando empezó a utilizarse el acero inoxidable como prótesis óseas fue reemplazado en 1940 por una aleación de base cobalto con el propósito de reducir infecciones después de ser implantado [11], fue hasta 1952 cuando el Dr. Branemark en sus estudios con médula ósea observó que el titanio podía unirse fuertemente al hueso a lo que llamo oseointegración [12]–[14]. En los últimos años el titanio y sus aleaciones atraído mucho la atención debido a su excelente biocompatibilidad y superior resistencia a la corrosión. En aplicaciones biomédicas el tipo de material utilizado depende de su función y ambiente biológico, por ejemplo en la figura 1, las superficies de las prótesis de rodilla se encuentran en contacto íntimo por lo que están sujetas a desgastes lo que genera partículas alrededor del implante, la acumulación de estos desechos causa dolor e inflamación en pacientes además cuando se encuentra en fluidos corporales se genera un ambiente corrosivo por lo que su superficie puede cambiar y liberar productos en el medio donde se encuentra.

Debido a esto los biomateriales metálicos que serán utilizados en aplicaciones médicas deberán cumplir con los siguientes puntos:

1. Excelente biocompatibilidad (no tóxico).

2. Alta resistencia a la corrosión.
3. Propiedades mecánicas adecuadas.
4. Alta resistencia al desgaste.
5. Oseointegración (prótesis de hueso) [15].

Los requerimientos anteriores son necesarios en el diseño de implantes metálicos, por lo que son discutidos en los siguientes párrafos.

1.2.1 Biocompatibilidad de los elementos aleantes.

Uno de los parámetros más importantes en el diseño de biomateriales metálicos es su biocompatibilidad, lo cual, está en función de la selección y composición de los elementos aleantes. En las aleaciones de Titanio se debe tener en cuenta que un cambio en la composición del elemento aleante cambia la temperatura de transformación como se explica en la sección 5. Debido a que ningún material es completamente inerte en el cuerpo humano por un periodo de tiempo razonable [16], un pensamiento inmediato en la selección de elementos aleantes podrían ser aquellos que están presentes en el cuerpo humano. En el desarrollo de aleaciones de base titanio con aplicaciones biomédicas como implantes oseos la investigación se centra en seleccionar elementos aleantes no tóxicos los más comunes son el Zr, Nb, Ta, Hf, Sn [17]–[20], además la selección de estos elementos aleantes deben mejorar la resistencia a la corrosión y sus propiedades mecánicas .

1.2.2 Corrosión de los materiales de implante.

La corrosión de un biomaterial de implante ocasiona su degradación gradual debido a ataques electroquímicos lo que lleva a la pérdida de su función estructural y superficial para el cual fue diseñado además de liberación de iones metálicos al torrente sanguíneo [16], [21]. Las características físicas que determinan la corrosión del implante son fuerzas termodinámicas que ocasionan reacciones de oxidación o reducción que generan capas de óxido superficiales. Debido a la longevidad de los pacientes con implantes es necesario que los biomateriales de implante mantengan su resistencia a la corrosión por largos periodos de tiempo. Uno de los aspectos a considerar es que el PH en el cuerpo humano es normalmente mantenido alrededor de 7.4 pero este puede variar desde 3-8 debido a condiciones biológicas como infecciones. Con el propósito de conocer la corrosión que pueden producir los fluidos corporales en implantes metálicos en 2008 se evaluó la aleación Ti13Nb13Zr en diferentes fluidos corporales simulados (saliva y plasma sanguíneo), se encontró que los electrolitos provocaron ambientes corrosivos diferentes debido a su composición iónica [22]. Con el propósito de mejorar la resistencia a la corrosión en 2010 se agregó el 1% de Zr a la aleación Ti6Al4V la cual fue probada en saliva artificial a diferente PH los resultados muestran que el Ti6Al4V1Zr tiene mejor resistencia a la corrosión que el Ti6Al4V [23] aleaciones como NiTi con memoria de forma los cuales son utilizados como stents o alambres ortodónticos presentan resistencia similar al Ti6Al4V [24]. El uso de Recubrimientos como Ta y Zr sobre Ti mejora su resistencia a la corrosión además estudios in-vivo del nitinol, CoCr y TiAlV se han realizado para analizar la corrosión por fricción [25]–[27]. En conclusión los dispositivos biomédicos diseñados con aleaciones de titanio como implantes orales, stents,

clavos, tornillos presentan corrosión después de ser implantados, debido a esto es necesario el diseño de biomateriales con mejor resistencia a la corrosión [28].

1.2.3 Propiedades Mecánicas adecuadas.

En el caso específico de remplazo óseo un requisito esencial de los biomateriales es igualar su resistencia a la carga durante las actividades diarias del paciente. Las propiedades mecánicas de general importancia en el desarrollo de biomateriales incluyen módulo de Young y resistencia a la tensión [4]. Un resumen de estas propiedades mecánicas se muestra en la tabla 1, los aceros inoxidable, las aleaciones base cobalto y las aleaciones base titanio como Ti6Al4V son las que tienen el módulo de Young más alto (más de 100 GPa). Ya que el Titanio es un elemento alotrópico y puede presentar la fase austenita o martensita dependiendo de la temperatura, algunos elementos aleantes promueven una u otra fase, en la sección 5.1 se dará una explicación más detallada de este proceso. En los últimos años, novedosas aleaciones de titanio austeníticas han sido desarrolladas con elementos aleantes como Zr, Nb, Ta, Sn las cuales presentan un módulo elástico alrededor de 50-100 GPa. Aunque las aleaciones de titanio presentan una rigidez mucho menor que la de otros metales, sigue siendo muy superior a la de los tejidos óseos que oscila entre 10-30 GPa. Esta marcada diferencia provoca reabsorción ósea alrededor del implante, fenómeno conocido como apantallamiento de las tensiones (*stress-shielding*) [29], lo que por ejemplo se puede dar al unir un hueso largo con una placa protésica. Cuando el conjunto experimenta cargas de flexión, la placa de refuerzo rigidiza el conjunto de modo que el hueso no se tensa como lo haría sin la placa, por lo que los niveles de deformación de hueso se vuelven demasiado bajos

lo que causa pérdida de masa, por lo que la densidad del hueso adyacente disminuye, debilitándolo e incrementando así la probabilidad de fractura [30]-[34].

Tabla I. Propiedades mecánicas de materiales de implante metálico y del hueso cortical [4].

Materiales	Módulo de Young/GPa	Resistencia a la Tensión MPa
Aleaciones de CoCrMo	240	900-1540
Aceros inoxidables 316L	200	540-1000
Aleaciones de Ti	50-125	900
Aleaciones de Mg	40-45	100-250
Aleaciones de NiTi	30-50	1355
Hueso cortical	10-30	130-150

1.2.4 Resistencia al desgaste.

El propósito de la investigación en tribología, es la minimización y eliminación de residuos resultantes de la fricción y el desgaste donde el roce de las superficies está involucrado. Durante el proceso de desgaste, el material en contacto entre las dos superficies es desgastado en forma de residuos. En aplicaciones biomédicas estos productos pueden causar reacciones adversas al tejido y llevar a una pérdida ósea masiva alrededor del implante, y en consecuencia aflojamiento de la fijación [35]-[37].

El desgaste rápido de los componentes de reemplazo total como rodilla, tobillo o cabezas femorales normalmente está relacionado a pacientes jóvenes y activos. Debido a esto la investigación de nuevos biomateriales metálicos de base Ti está dirigida a resolver problemas de desgaste en prótesis que se encuentran en contacto con superficies móviles, con este propósito se ha encontrado que agregando elementos aleantes como el tungsteno en Ni_{43.5}Ti_{45.5}W₁₁ (at.%) se puede mejorar la dureza en un 26% sin perder las propiedades de memoria de forma, además de excelente resistencia a la corrosión y viabilidad celular [38].

1.2.5 Oseointegración de los materiales metálicos.

La *oseointegración* de un biomaterial es definida como el proceso de anclaje directo de un implante mediante la formación de tejido óseo alrededor de él sin crecimiento de tejido fibroso en la interfase hueso-implante [8]. En este sentido la incapacidad del biomaterial de enlazar al hueso con el tejido circundante resulta en la falla del implante [39]. Debido a esto la investigación está dirigida a generar superficies de materiales metálicos que tengan la capacidad de nuclear fosfatos de calcio en su superficie los cuales tienen la capacidad de enlazar al hueso y tejido circundante. En la literatura se ha reportado que los tratamientos electroquímicos en soluciones alcalinas mejoran la oseointegración de Ti₂₅Nb₂₅Zr comparados con Ti puro [40]. Se ha encontrado que implantes cilíndricos de la aleación Ti-24Nb-4Zr-7.9Sn tratada con soluciones alcalinas mejora la proliferación y oseointegración

después de un periodo de 12 semanas [41]. Además con anodización electroquímica se pueden generar nanoestructuras en la superficie la aleación Ti-24Nb-4Zr-7.9Sn, las cuales mostraron mejor biocompatibilidad in-vitro y mejor oseointegración in-vivo [20].

1.3 Bioactividad y mecanismos de enlace al hueso.

En esta sección se presenta el concepto de bioactividad de las aleaciones de titanio el cual es un requerimiento esencial para aplicaciones en prótesis oseas además de los mecanismos que están presentes para enlazar al hueso.

1.3.1 Bioactividad.

La bioactividad es una propiedad de los materiales metálicos y es una medida de la capacidad de inducir nucleación de fosfatos de calcio en la superficie los cuales son similares o equivalentes a la fase mineral del tejido óseo tanto cristalográficamente como químicamente. Para analizar la bioactividad de distintos materiales la muestra se introduce en un fluido corporal simulado (SBF por sus siglas en inglés) durante un determinado tiempo. En la tabla II se encuentran las concentraciones iónicas del SBF comparado con el plasma sanguíneo humano, lo que hace constatar que contiene los minerales y la concentración que existe en el plasma sanguíneo. Esto permite a la solución ser un buen candidato para utilizarla en pruebas *in-vitro* para predecir la bioactividad de distintos biomateriales. Soluciones de

SBF con concentraciones mayores como 1.5, 5 ó 10 son utilizadas para aumentar la tasa de nucleación superficial y así generar recubrimientos rápidos en la prótesis ósea. [42]–[45]

Tabla II. Concentraciones iónicas en (mM) de SBF comparado con el plasma sanguíneo humano.

	Na ⁺	K ⁺	Mg ⁺	Ca ⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ⁻	SO ₄ ⁻
Plasma Sanguíneo	142	5	1.5	2.5	103	27	1	0.5
SBF	142	5	1.5	2.5	147.8	4.2	1	0.5

Los fosfatos de calcio formados en la superficie metálica durante la inmersión en SBF contienen varias moléculas biológicas que puede ser colonizada por células osteoblásticas, produciendo la matriz extracelular ósea. Como resultado de la bioactividad, sustitutos de hueso de CAP (fosfato de calcio) apoyan el proceso de curación, guiando al tejido óseo sobre su superficie mediante el proceso de *osteoconducción*, permitiendo que el tejido óseo recién formado crezca en cualquier irregularidad superficial.

Por otro lado, los biocerámicos de fosfatos de calcio tienen pobres propiedades mecánicas. Por esta razón se utilizan como baños sobre prótesis metálicas como en platos y tornillos. Los ortofosfatos de calcio forman parte de una familia de componentes, teniendo varias composiciones químicas, estructuras cristalográficas y solubilidad en agua (Tabla III

y Tabla IV). Es generalmente aceptado que los cerámicos de fosfatos de calcio son bioactivos y osteoconductivos. Cuando son implantados en hueso, materiales de fosfatos de calcio tales como HA y β -fosfato tricalcio (β -TCP), interactúan con fluidos corporales, células y tejidos.

Tabla III. Descripción de algunos ortofosfatos de Calcio[46].

Nombre	Abreviación	Fórmula química	Relación Ca/P
Fosfato monocalcio monihidratado	MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.5
Fosfato monocalcio anhidro	MCPA	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0.5
Fosfato dicalcio dihidratado	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1
Fosfato octacalcio	OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33
Apatita deficiente de calcio	CDA	$\text{Ca}_{10-x}[\]_x(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x} \cdot (\text{OH})_{2-x}[\]_x$	1.33-1.66
Fosfato de calcio amorfo	ACP	$\text{Ca}_x(\text{HPO}_4)_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$ n=3.0-4.5 15-20 %wt H ₂ O	1.2-2.2
Fosfato tricalcio	TCP	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5
Fosfato de calcio bifásico	BCP	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.5-1.66
Hidroxiapatita	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67
Fluoroapatita	FA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	1.67
Fosfato tetracalcio	TTCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}_2$	2.0

Tabla IV. Principales líneas de vibración en infrarrojo de algunos fosfatos de calcio relevantes [46].

Componente	Fórmula Química	Picos IR		Líneas DRX	
		$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	Nombre	2 θ (°)	Intensidad (%)
OCP	Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ ·5H ₂ O	1105	HPO ₄ , PO ₄	4.722	100
				9.441	15
		1070		25.872	17
		1031		26.002	20
		954		31.555	33
		603		31.704	32
		530			
β -TCP	β -Ca ₃ (PO ₄) ₂	1120	PO ₄	17.005	20
		1043		25.803	25
		970		27.769	55
		943		31.027	100
		606		34.372	65
		551		52.946	25
HA	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	3562	OH	25.879	40
		1081	PO ₄	31.774	100
		1030	OH	32.197	60
		954	PO ₄	32.902	60
		631		34.049	25
		601		46.713	30
		570		49.469	40

1.3.2 Mecanismos de enlace al hueso.

La familia de biomateriales basadas en titanio son preferidos en áreas clínicas, en el diseño de dispositivos biomédicos, debido a su resistencia a la corrosión y excelente biocompatibilidad. Además las aleaciones de titanio son el único biomaterial con la capacidad de enlazarse al hueso a diferencia de los aceros inoxidables y las aleaciones de cobalto, las cuales el cuerpo puede reconocer como elementos extraños y formar naturalmente una capsula de tejido fibroso alrededor del implante. Hasta ahora esto es un mecanismo de defensa natural pero la formación de una capsula de tejido también contribuye a la pérdida del implante permanente. Una sorpresa en el área médica es que los implantes de titanio a diferencia de las aleaciones de cobalto, demuestran una integración íntima con el tejido óseo del paciente [47], esto es asociado a la capa de óxido en su superficie [48].

Los mecanismos de enlace al hueso de los biomateriales metálicos como las aleaciones de titanio han sido intensamente estudiados. Para entender este mecanismo primero es necesario entender la composición química de la matriz ósea donde aproximadamente dos terceras partes del peso del hueso está formado por hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HA). Este componente inorgánico le da al hueso resistencia a la compresión y la otra tercera parte está formada por fibras de colágeno, las cuales le brindan flexibilidad al tejido óseo. Una vez que una capa de HA carbonatada es formada sobre la superficie de un implante, fibras de colágeno del tejido se infiltran formando un enlace biológico entre el implante y el tejido. Para elucidar este proceso en la figura 1.3 se muestra una imagen de TEM de hidroxiapatita después de tres meses de haber sido implantada *in-*

vivo [4], las flechas marcan las fibras de colágeno que están insertadas dentro del material, por lo que el mecanismo de enlace al hueso más aceptado se puede describir en dos etapas:

1. Formación de hidroxiapatita carbonatada sobre la superficie del implante por intercambio iónico.
2. Fibras de colágeno del hueso son insertadas dentro de las capas de apatita carbonatada.

En las aleaciones de titanio, la pregunta clave es cómo, la hidroxiapatita carbonatada puede formarse sobre estos materiales metálicos, y cuál es la naturaleza de su interacción. Hasta ahora el mecanismo más aceptado ha sido propuesto por Kokubo y colaboradores [49], en donde una capa de titanato se forma sobre la superficie del titanio por intercambio iónico mediante tratamientos químicos alcalinos, cuando es expuesta a fluidos fisiológicos la capa nuclea fosfatos de calcio hasta resultar en la formación de apatita carbonatada.

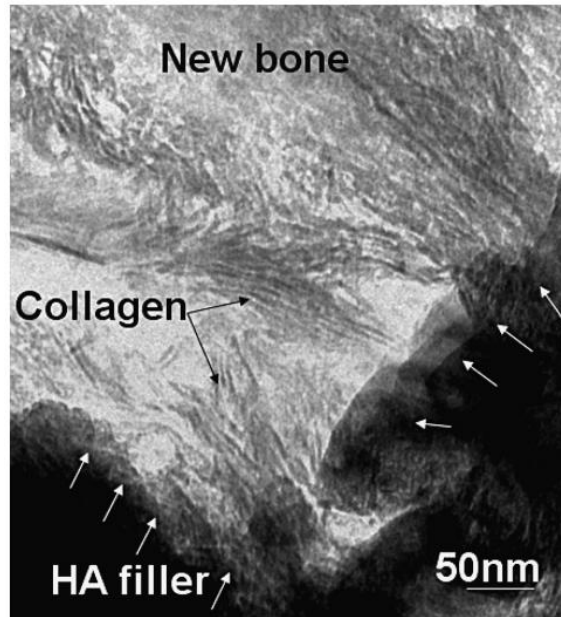


Figura 1.3. Enlace biológico, fibras de colágeno delineadas por flechas insertadas dentro de una capa de la superficie de HA después de tres meses de haber sido implantada [4].

1.4 Tratamientos superficiales de aleaciones de Titanio.

Las características superficiales tales como topografía, rugosidad y composición química de las aleaciones de titanio tienen un gran impacto en la respuesta biológica como oseintegración o propiedades antimicrobiales, en esta sección discutimos sobre tratamientos alcalinos y anodización electroquímica los cuales se utilizaron en el desarrollo de este trabajo.

1.4.1 Tratamientos alcalinos y formación de apatitas superficiales.

Los tratamientos alcalinos son una técnica simple para modificación de superficies de titanio. Este método fue introducido por Kim y Kokubo para mejorar la bioactividad del titanio y sus aleaciones [49]–[54]. Encontraron que después de simples tratamientos químicos la superficie tratada en Ti puro, Ti-6Al-4V, Ti-6Al-2Nb-Ta y Ti-15Mo-5Zr-3Al, en estos materiales se forma una capa delgada de titanato de sodio sobre su superficie. Esta capa densa es de apatita y similar al hueso, y puede nuclear y crecer sobre la superficie tratada cuando son inmersos en SBF. El SBF es una solución de electrolitos, la cual reproduce la parte inorgánica del plasma sanguíneo humano. Usar SBF para la formación de apatita sobre la superficie del titanio ofrece una alternativa prometedora al plasma spraying y otros métodos de baños. Por ejemplo, el tratamiento del Ti en 5-10 M de NaOH a 60°C por 24 horas produce una capa superficial consistente de gel de titanato de sodio. La capa superficial es del orden de 1 μm de grosor, con una topografía irregular y un grado alto de porosidad abierta a escala submicrométrica [46].

El mecanismo de formación de apatitas en SBF sobre la superficie tratada con tratamientos alcalinos y térmicos en Ti poroso y durante inmersión en una solución de SBF es esquemáticamente ilustrado en la figura 1.4.

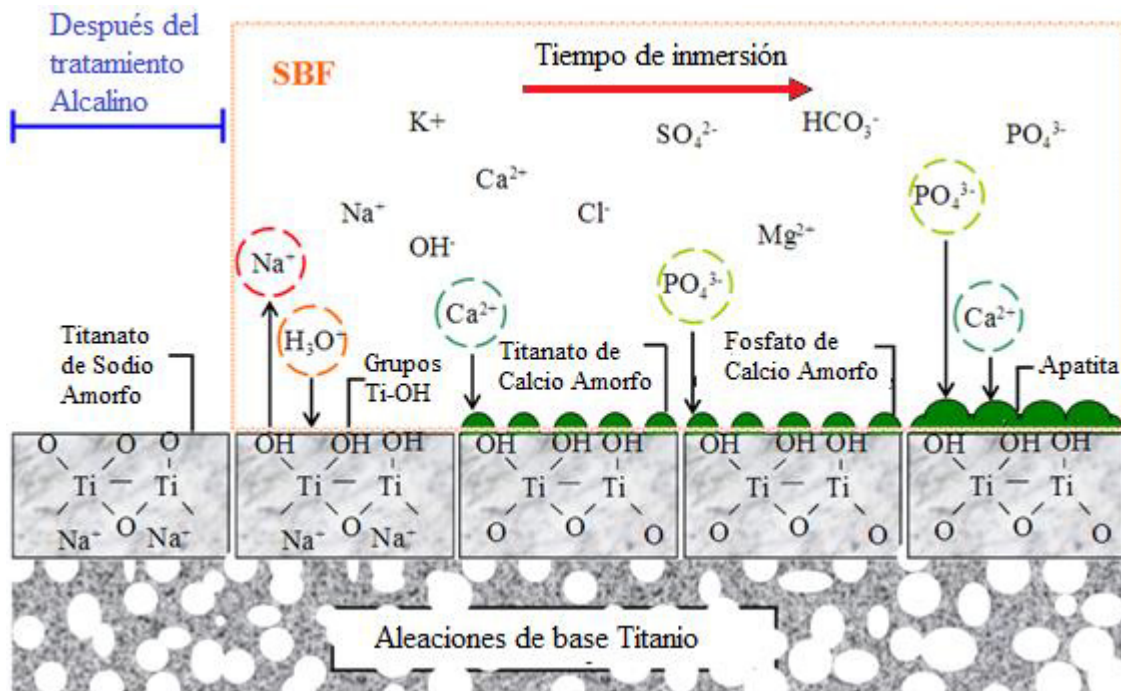
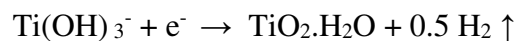
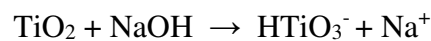


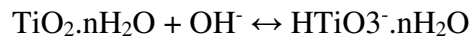
Figura 1.4. Una ilustración esquemática de la formación de apatita sobre aleaciones de titanio porosas tratadas alcalinamente e inmersas en SBF [55], [56].

Este proceso es basado en la inducción de grupos hidroxilos sobre la superficie del titanio, que implica la nucleación heterogénea y crecimiento de una capa de apatita similar al hueso sobre la superficie del material poroso a temperaturas y condiciones de PH fisiológicas. El cambio de la morfología superficial durante el tratamiento alcalino es descrito como sigue. El primer paso es la disolución parcial de la capa de TiO_2 en una solución alcalina por grupos hidroxilo.





Procediendo al tratamiento alcalino, más grupos hidroxilo reaccionan con el TiO_2 hidratado, permitiendo hidratos cargados negativamente sobre la superficie de las muestras como sigue:



Estas especies cargadas negativamente son parcialmente disueltas dentro de la solución alcalina para formar una capa de hidrogel de titanato de sodio. Kokubo y Takadama en 2006 mostraron que si una capa de titanato de sodio puede ser formado sobre la superficie del titanio y sus aleaciones después de tratamientos alcalinos, la inmersión en SBF puede inducir la formación de apatitas sobre su superficie. Como un resultado, la formación de apatita puede proporcionar un fuerte enlace entre la superficie recubierta y el hueso vivo [46].

Durante la inmersión en SBF, los iones de sodio (Na^+) liberados desde la muestra vía intercambio con los iones H_3O^+ , resulta en la formación de capas de Ti-OH. La tasa de liberación de iones Na^+ desde la muestra, van en decremento remarcablemente debido al intercambio iónico. La capa de Ti-OH está cargada negativamente y puede selectivamente combinarse con los iones Ca^{2+} cargado positivamente a través de fuerzas electrostáticas y formar titanato de calcio. Consecuentemente, la superficie cargada positivamente se combina con los iones fosfato (PO_4^{3-}) cargados negativamente para formar fosfato de calcio amorfo.

Después de la formación de núcleos de apatita, estos crecen espontáneamente sobre la superficie por el consumo de iones fosfato y calcio que se encuentran en la solución de SBF.

La formación de hidroxiapatita sigue el siguiente equilibrio:



Además de los grupos hidroxilo, la presencia de óxidos de titanio como anatasa brookita y rutilo, también permiten la formación de apatitas sobre la superficie. La fase anatasa es la que posee mayor actividad ya que su arreglo atómico en estructura cristalina favorece la precipitación de apatitas. Sin embargo, las actividades pueden ser afectadas por otros factores tales como cristalinidad, impurezas, defectos de red y condiciones de reacción [46].

Hay pocos estudios sobre bioactividad en SBF de aleaciones cuaternarias de base titanio con elementos aleantes Zr, Nb y Sn. En 2009 se encontró que la aleación Ti–24Nb–4Zr–7.9Sn presenta excelente bioactividad con tratamientos de hidróxido de calcio supersaturado a 100°C (HTC) [57]. Como se observa en la DRX de la figura 1.5, en donde se marcó con rojo este tratamiento, el cual presenta picos característicos de la apatita alrededor de 26° y 32° después de 15 días de inmersión en el suero, lo que significa que la muestra es bioactiva con este tratamiento. De la misma forma, la imagen SEM corrobora la morfología de esta fase

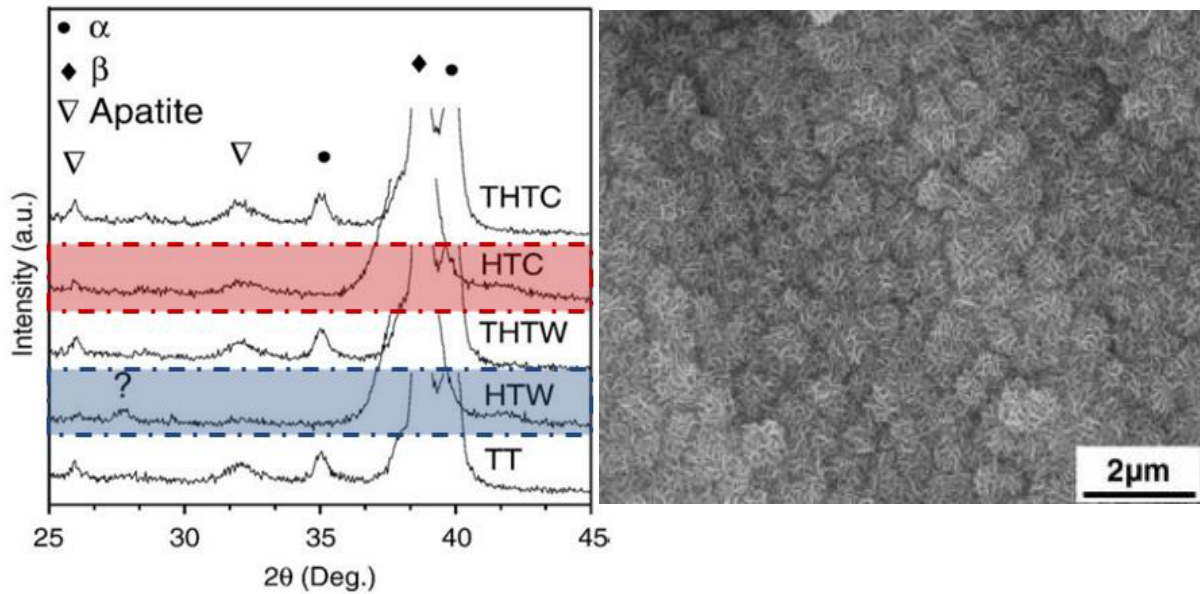


Figura 1.5. En la imagen vemos los picos característicos de una apatita después de tratamientos hidrotérmicos seguido de inmersión en SBF de una aleación de TiZrNbSn.HTC después de 15 días de inmersión [57].

. El tratamiento con agua a 100°C no resultó favorable para activar la superficie, ya que como se muestra en la figura marcada con un cuadro azul, no se observan los picos característicos de la apatita. Por otra parte, también se reportaron que los tratamientos térmicos de 600°C favorecen la tasa de nucleación de fosfatos de calcio, sugiriendo que los óxidos de titanio formados en la superficie metálica forman una capa delgada la cual es capaz de activar la superficie metálica cuando es inmersa en el fluido.

Este mismo grupo reportó que es posible crear recubrimientos biomiméticos superficiales de fosfatos de calcio sobre la misma aleación en un tiempo de 4 horas utilizando un

tratamiento alcalino de 1M KOH y aumentando la concentración del SBF en una proporción de cinco [58].

1.4.2 Anodización electroquímica.

La anodización es un proceso electrolítico que crea una película de óxido sobre la superficie metálica, este método se utiliza para incrementar la capa de óxido superficial de los metales lo cual mejora su resistencia a la corrosión. Para lograrlo, la muestra metálica es conectada a la terminal positiva de la fuente de potencia y después es inmerso en un baño electrolítico. Como cátodo se utiliza un alambre o placa de platino. Cuando la fuente de potencia es encendida los electrones son forzados a moverse desde el electrolito al ánodo positivo. El proceso deja a los átomos metálicos superficiales expuestos a los iones oxígeno del electrolito. Los átomos reaccionan y se convierten en una parte integral de la capa de óxido. Los electrones viajan a través de la fuente de potencia y regresan al cátodo donde, si un electrolito con PH apropiado está presente, reaccionan con iones hidrógeno y la combinación se presenta como burbujas de gas hidrógeno [59].

Dado que el óxido metálico se disuelve parcialmente en cualquier electrolito, es necesario utilizar sólo aquellos electrolitos en los que el óxido se forma más rápidamente que en los que se disuelve. La composición del electrolito es también el determinante primario para que la película de óxido sea porosa o si forma una capa barrera. Las capas barrera de óxido crecen en aquellas soluciones neutras o ligeramente alcalinas en las que el dióxido de

titanio es en gran parte insoluble. Las capas de óxido poroso crecen en electrolitos ácidos con iones fluoruro o cloruro en los que se forman óxido y luego se disuelve rápidamente [60]. En la Figura 1.6 se muestra una representación de una celda de anodización electroquímica, con un ánodo de titanio y un cátodo de platino sumergido en un electrolito acuoso de ácido diluido al que se aplica una pequeña tensión DC, la capa superficial es suficientemente resistiva para impedir el flujo de corriente. El aumento de la tensión aplicada no produce flujo de corriente adicional hasta que se alcanza un nivel de umbral en el que la intensidad de campo eléctrico dentro de la barrera es suficiente para forzar la difusión de iones de oxígeno a través de ella, produciendo una corriente iónica. Estos iones de oxígeno reaccionan con el metal y aumentan el espesor y / o la densidad de la barrera de óxido. Este proceso de conducción iónica de alto campo es fundamental para la anodización. Por supuesto, el mismo procedimiento libera gas hidrógeno en el cátodo. La uniformidad de la capa de óxido es debido a que la resistencia eléctrica es proporcional a su espesor y su velocidad de crecimiento es proporcional a la densidad de corriente entonces las porciones delgadas de la capa transportarán más corriente que las partes gruesas por lo tanto crecerán más rápido hasta que la tasa de crecimiento sea uniforme [61].

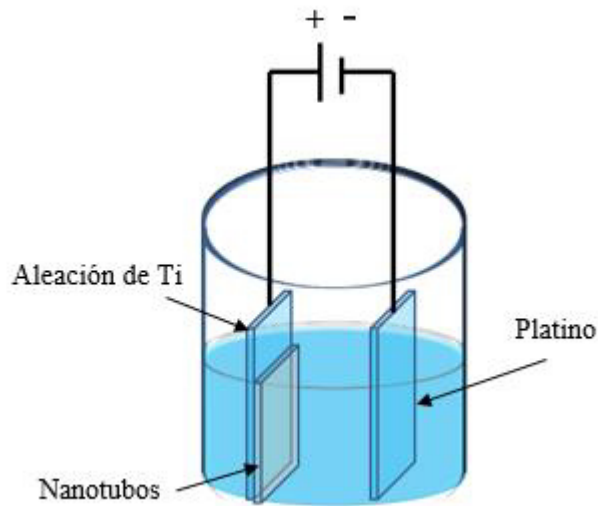


Figura 1.6. Esquema del proceso de anodización electroquímica, la fuente de potencia está conectada al ánodo de $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$ y el cátodo al electrodo de Pt.

El proceso continúa hasta que se alcanza, para cada composición de baño y temperatura, una tensión máxima aplicada por encima de la cual se manifiestan otras reacciones no deseadas, por ejemplo: evolución del oxígeno, oxidación del soluto o chispas debido a la avalancha de electrones a través del óxido. La fabricación de arreglo de nanotubos de TiO_2 vía oxidación anódica del Ti metálico se informó por primera vez en 1999 [62], [63]. Estudios posteriores se centraron en el control preciso y la extensión de la morfología de los nanotubos, longitud y tamaño de poro, y el espesor de la pared de la capa barrera [64]–[67]. El uso de diferentes disolventes electrolíticos permite el control de la arquitectura desde nanotubos independientes y separados hasta conjuntos densamente empaquetados. Un espesor de pared típico de un nanotubo oscila entre 5 y 30 nm, el diámetro del poro de 20 a 350 nm y la longitud de 0,2 a 1000 nm [67].

Una vez mencionados algunos procesos de modificación superficial de materiales para mejorar su biocompatibilidad, se mencionaran algunas de las propiedades de las aleaciones con memoria de forma y sus aplicaciones en el campo de la medicina.

1.5 Aleaciones de Titanio con aplicaciones biomédicas.

1.5.1 Propiedades microestructurales del Titanio.

El titanio es un elemento de baja densidad (aproximadamente el 60% de la densidad del hierro y cerca de la mitad de la densidad del cobalto) que puede ser endurecido considerablemente agregando elementos aleantes o por procesos de deformación. El titanio puro experimenta una transformación alotrópica alrededor de los 882°C, cambiando su estructura cristalina de hexagonal compacta (HCP) nombrada fase α o martensita a la fase β o austenita con estructura centrada en el cuerpo (BCC) también puede presentar fases de martensita metaestable α' con estructura hexagonal u ortorrómbica α'' [68]. Los principales picos de difracción se presentan en la figura 1.7.

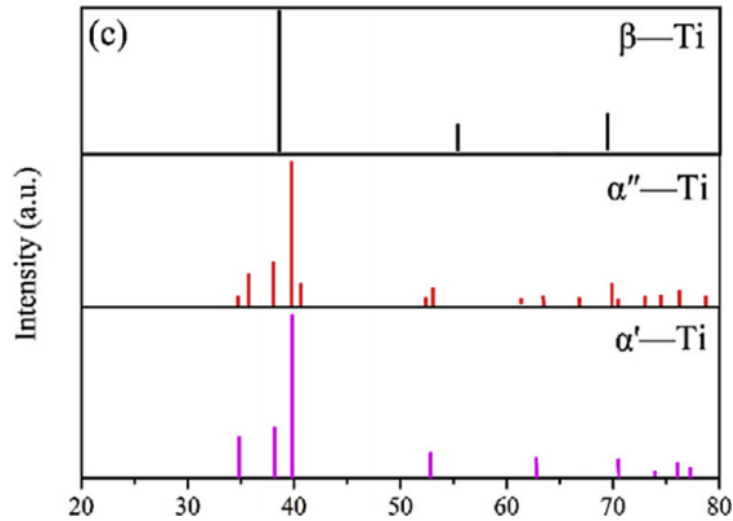


Figura 1.7. Picos de difracción estándar de las fases martensita α (α' , α'') y austenita β [69].

Las aleaciones base Titanio, se pueden dividir en tres tipos: aleaciones en las que solo se encuentra una fase, aleaciones tipo α o β y aleaciones en el que coexisten las dos fases tipo α - β . La temperatura de transformación entre las fases α -HCP y β -BCC puede ser cambiada agregando elementos aleantes, estos elementos pueden ser clasificados como α estabilizadores como B, Ga, Ge, Al o elementos β estabilizadores como Ni, Nb, Mo, V, Cr, Fe y Si [70]–[72]. En la figura 1.8 se representa la temperatura de cambio de fase la cual está en función de la concentración del elemento aleante.

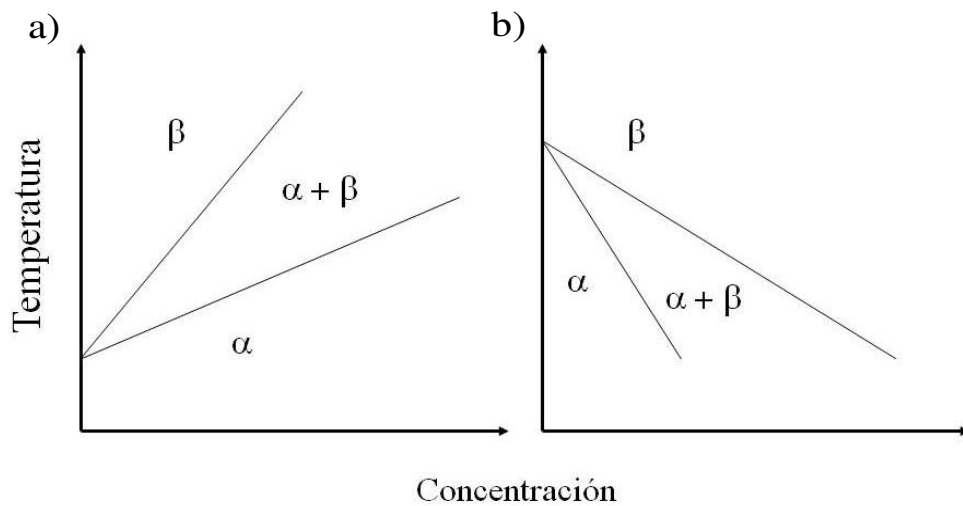


Figura 1.8. Diagrama de fases de una aleación de titanio a) utilizando elementos α estabilizadores y en b) β estabilizadores.

Estas propiedades del Ti y de sus aleaciones como Ti-Al-V, así como las aleaciones β metaestables como Ti-Zr-Nb-Sn potencian su uso como biomaterial de reemplazo de hueso o como soporte celular en dispositivos de uso biomédico [4].

Comparado con los aceros inoxidables y las aleaciones de cobalto, las aleaciones de titanio han demostrado ser superiores en términos de biocompatibilidad debido a su excelente resistencia a la corrosión. La mutagenicidad no es significativa, lo que ha sido determinado por ensayos de mutación in-vitro, indicando que este tipo de aleaciones son seguras para humanos y animales, sin embargo la primer generación de aleaciones de titanio representado por Ti-6Al-4V, ha sido reportada por causar reacciones alérgicas en el cuerpo humano debido a los iones de aluminio y vanadio, que se pueden liberar en el plasma humano. La segunda generación de aleaciones de titanio (aleaciones tipo β) han sido desarrolladas e investigadas

con mayor interés como $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$ el cual presenta excelente superelasticidad [34]. Algunos elementos β estabilizadores tales como Nb, Zr, Mo y Ta han sido usados como elementos aleantes ya que estos son considerados por ser relativamente seguros comparados con el Vanadio y el Aluminio.

En aplicaciones biomédicas las aleaciones de titanio han surgido debido a la necesidad de mejorar las propiedades físicas y químicas del titanio comercialmente puro cuando es implantado. Debido al efecto de resorción ósea conocido como stress-shielding el desarrollo de nuevas aleaciones de Titanio se a basado en reducir el módulo elástico similar al hueso cortical humano el cual se encuentra alrededor de 30 Gpa. En la tabla V se muestran las aleaciones de base Ti que pueden ser usadas en aplicaciones biomédicas.

Aunque las aleaciones tipo β presentan un módulo elástico más bajo y presentan mejor biocompatibilidad que el titanio puro es necesario mas experimentación *in-vivo* para consolidar su uso como sustituto del titanio en la manufactura de implantes [68].

Tabla V. Aleaciones de base Titanio para aplicaciones biomédicas [73].

Composición	Estructura	Módulo elástico (Gpa)
Ti puro	α	103
Ti-6Al-4V	$\alpha+\beta$	110
Ti-6Al-7Nb	$\alpha+\beta$	114
Ti-5Al-2.5Fe	$\alpha+\beta$	112
Ti-13Nb-13Zr	β	82
Ti-12Mo-6Zr-2Fe	β	80
Ti-15Mo	β	78
Ti-16Nb-10Hf	β	81
Ti-24Nb-4Zr-7.9Sn	β	46
Ti-35Nb-7Zr-5Ta	β	55
Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr	β	80

1.6 Aleaciones con memoria de forma (AMF) y sus aplicaciones en la medicina.

Hoy en día, las aleaciones con memoria de forma (AMF), y en particular las Aleaciones de NiTi, se usan comúnmente en aplicaciones biomédicas. Las principales Características atractivas de esta clase de materiales son la capacidad de: (1) recuperar la forma original después de grandes deformaciones inducida por la carga mecánica una vez que esta es retirada (pseudoeelasticidad) y (2) mantener una forma deformada hasta su recuperación la cual es inducida aplicando calor (efecto memoria de forma).

1.6.1 Memoria de forma y superelasticidad.

Prácticamente, todas las AMF pueden existir en dos fases diferentes con tres estructuras cristalinas diferentes (martensita maclada, martensita desmaclada y austenita). La estructura austenita es estable a altas temperaturas y la estructura martensita es estable a bajas temperaturas. Cuando una AMF es calentada inicia una transformación desde la fase martensita a la fase austenita. El efecto memoria de forma se refiere a la capacidad de los materiales para regresar a su dimensión predefinida después de ser calentado como se observa en la figura 1.9. Es decir después de aplicar una carga al material a temperatura martensítica, la martensita maclada se convertirá en martensita deformada, cuando la carga se retira, el efecto macroscópico se aprecia como una deformación “*plástica aparente*” del material. A diferencia de los demás sistemas de aleaciones, en este punto, si se cambia la energía interna del material aplicando una fuente de calor, el sistema buscará reconfigurarse en su estado de mínima energía y cambiará a la fase austenítica entonces recuperará su forma inicial, si se retira la fuente de calor el sistema regresará a su fase original con la misma forma.

Las aleaciones con memoria de forma pueden experimentar una deformación reversible por un mecanismo de transformación de fase, también referido como *superelasticidad*. Como se observa en la figura 1.10, si se aplica una carga a temperatura austenítica del material, la fase austenita experimentara una deformación elástica, después el trabajo efectuado por una fuerza externa reconfigurara el ordenamiento atómico a su mínimo local

induciendo la fase de martensita maclada, y si la carga es suficiente, cambiara a martensita deformada obteniéndose una deformación importante en el material, en dirección de la carga aplicada. Si en este punto se retira la carga el sistema recuperará su fase austenita original, recuperando su forma inicial. Esto no sucede en el resto de las aleaciones, en donde la deformación inducida es plástica y no se recupera. La característica especial que permite a las aleaciones con memoria de forma revertir su forma original después de un cambio de temperatura o de esfuerzo es que hay una transformación cristalina o un cambio de fase, y decimos que es termodinámicamente reversible, ya que la fase es exactamente la misma después de cada ciclo.

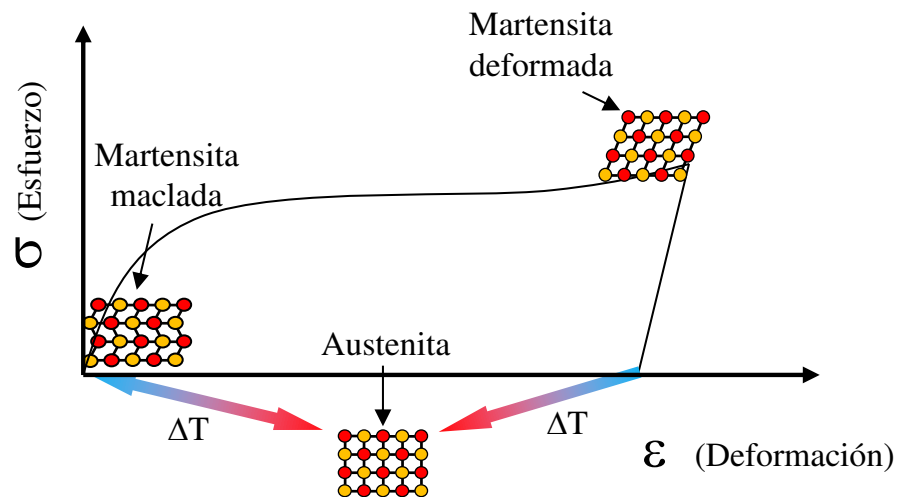


Figura 1.9. Efecto de memoria de forma. En la figura se muestran los cambios de fase y de estructura cristalina de las AMF cuando se aplica una carga, las flechas indican cambio en la temperatura el color rojo indica mayor temperatura que el azul.

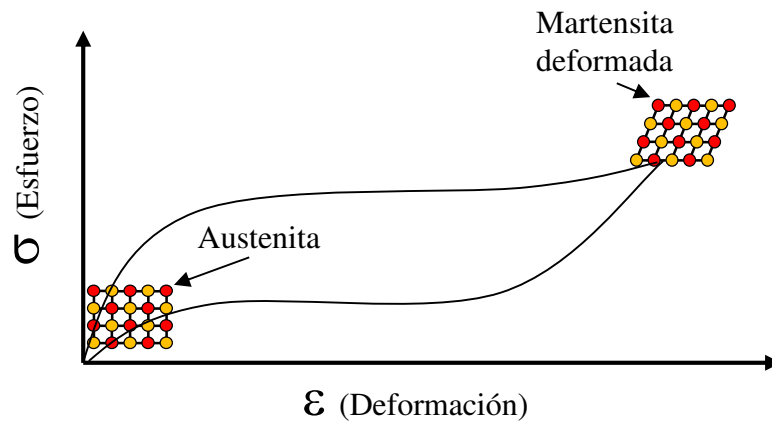


Figura 1.10. Curva característica de un ensayo de tensión con aleaciones superelásticas, la fase martensita se induce por esfuerzo después de aplicar una carga, cuando se retira la carga la fase martensita se transforma en austenita.

1.7 Dispositivos biomédicos.

Alambres de NiTi, estos alambres que se encuentran en fase austenítica a la temperatura de la cavidad bucal, se han utilizado con éxito durante años en el tratamiento ortodóntico fijo con brackets [74], como se observa en la figura 1.11. Estos dispositivos pueden generar esfuerzos constantes debido a sus propiedades superelásticas. Durante la fase de inserción, el médico deforma el hilo induciendo de este modo una fase de transformación austenítica a martensita (Figura 1.10); Una vez posicionado, el material intenta regresar a la fase de austenita (estable a la temperatura de la cavidad bucal) y por lo tanto intenta recuperar la forma original siguiendo la trayectoria descendente de la curva fuerza-desplazamiento en fase austenítica.

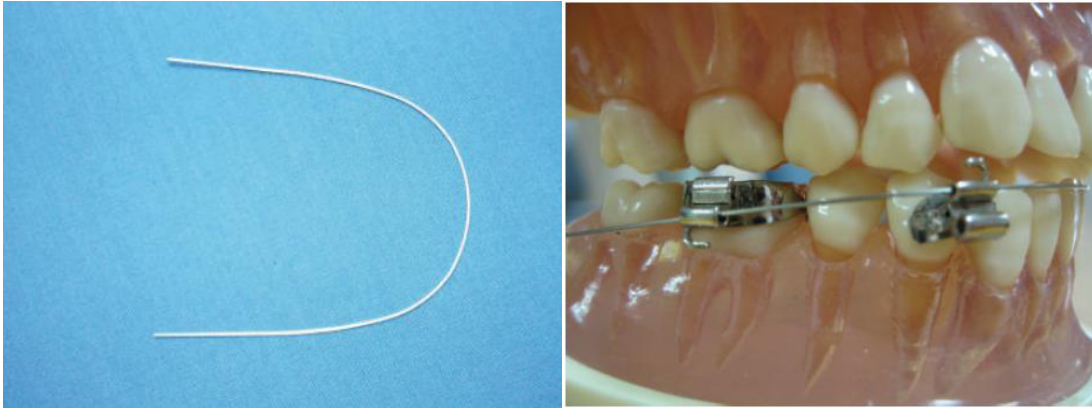


Figura 1.11. Alambres ortodónticos en fase austenítica utilizados para aplicar esfuerzos constantes [5].

Grapas de fijación, se utilizan para juntar partes de huesos fracturados como se observa en la figura 1.12. Estas se fabrican en su forma original (estado austenítico). En frío, es decir en estado martensítico, la grapa está deformada, está abierta, y se inserta en ambos lados de la fractura sin aplicar fuerza. Por el calor del cuerpo, la grapa vuelve a tener su forma inicial austenítica, de modo que se cierra y junta así las dos partes del hueso fracturado. Las propiedades superelásticas de la grapa permiten una fuerza constante en las superficies del hueso en contacto.

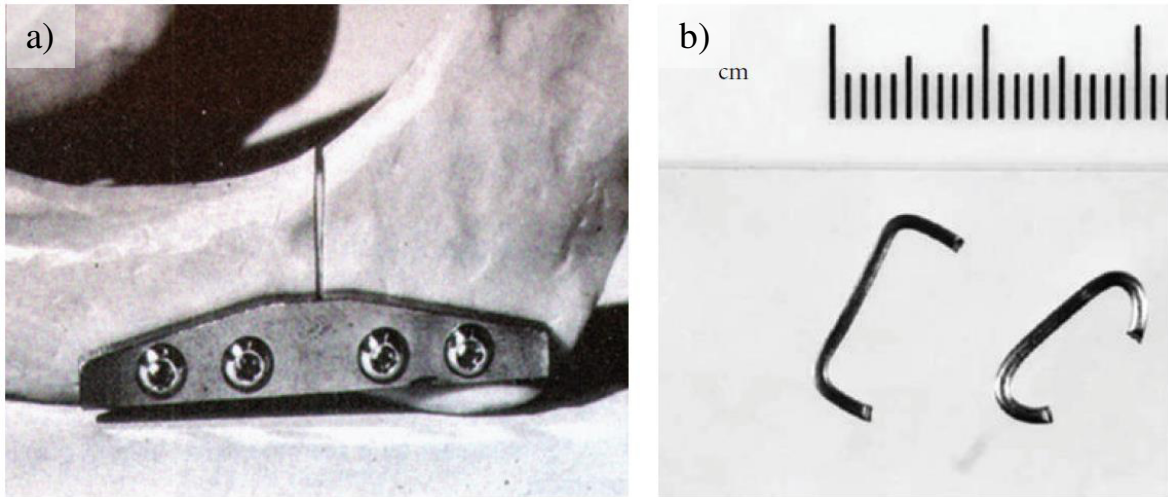


Figura 1.12. En la imagen (a) se observa una Placa de NiTi utilizada en fractura mandibular [75] y en (b) grapas antes y después del tratamiento [76].

Espaciadores para cirugía de columna vertebral. Estos se utilizan para abrazar las vértebras. El disco se inserta deformado por compresión como en la figura 1.13, en donde una vez en el interior del cuerpo, cambia de forma por efecto del calor y se vuelve más circular.



Figura 1.13. En (a) se muestra un espaciador de la columna vertebral en estado martensítico y austenítico [75].

Placas de osteosíntesis y clavos de fijación intramedular. Éstas se fijan con tornillos al hueso en ambos lados de la fractura, ver figura 1.14. El hueso se repara más rápidamente cuando las caras de fractura están sometidas a tensiones de compresión continuas. Utilizando un material con memoria de forma, una compresión de este tipo está asegurada por el retorno del material a su forma. Los clavos de fijación se colocan en la cavidad medular a fin de fijar huesos fracturados. Si la fijación del clavo en la cavidad medular está demasiado ajustada, es posible que el clavo no se pueda sacar sin dañar la estructura del hueso. Este problema se soluciona con el efecto de memoria de forma reversible. Primero, los clavos tienen que ser deformados en un diámetro más grande que el de la cavidad medular. En seguida el clavo se enfría, de manera que su diámetro disminuye. En el sitio deseado, se inserta el clavo, que calentado por el cuerpo, recupera su diámetro original y se fija así el hueso. Una vez curado el hueso, se puede sacar el clavo al enfriarlo de nuevo para disminuir su diámetro.

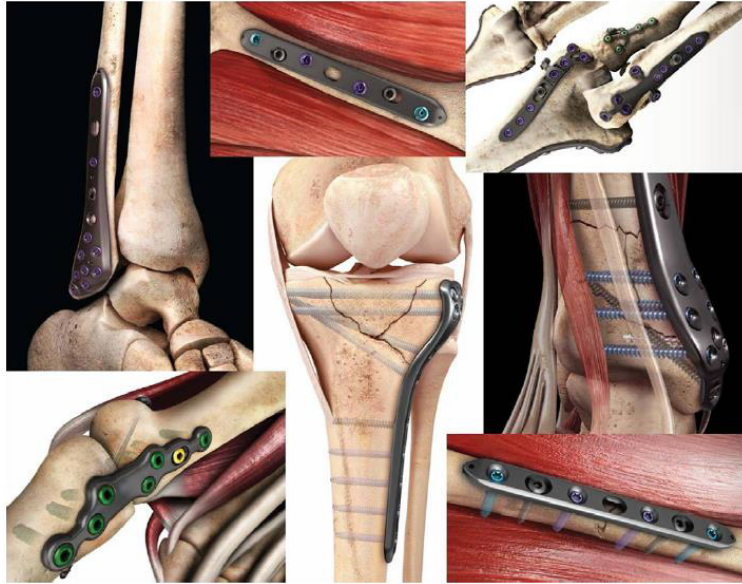


Figura 1.14. Fijación de fragmentos óseos mediante placas y tornillos metálicos [77].

En este trabajo, se estudiará la biocompatibilidad y bioactividad *in-vitro* e *in-vivo* de una aleación superelástica $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$ considerada de tercera generación, mediante los métodos de modificación superficial con tratamientos alcalinos y anodización electroquímica, con el fin de probar su efectividad como posible material para la construcción de dispositivos biomédicos.

1.7 Hipótesis

La aleación con memoria de forma $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$ al ser modificada superficialmente presentará biocompatibilidad y bioactividad para el posible desarrollo de dispositivos biomédicos.

1.8 Objetivos

1.8.1 Objetivo General

Modificar superficialmente la aleación $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$ con la finalidad de potenciar su biocompatibilidad y biocompatibilidad

1.8.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar la morfología, fases y composición de la aleación.
2. Modificar superficialmente la aleación con tratamientos alcalinos y con pulidos mecánicos.

3. Realizar ensayos *in-vitro* con células sanguíneas PBMC para demostrar la biocompatibilidad de la aleación.
4. Realizar ensayos *in-vivo* en ratones BALB/C para demostrar la biocompatibilidad de la aleación.
5. Realizar ensayos *in-vitro* en fluidos fisiológicos para demostrar la bioactividad de la aleación.
6. Realizar el método de anodización electroquímica para generar nanoestructuras tubulares.
7. Determinar la capacidad de almacenamiento y dosificación de medicamentos de las estructuras nanotubulares.
8. Elaborar un material compuesto base Quitosano/Nanoestructuras tubulares.

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En esta sección se presentan los detalles de la metodología experimental efectuados para el cumplimiento de los objetivos planteados. En la figura 2.1 se presenta un diagrama en forma de bloques de los pasos que se siguieron para desarrollar este trabajo, primero se obtuvieron muestras de la aleación $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$ con las cuales se desarrollaron los experimentos. La prueba *in-vivo* de biocompatibilidad se realizó en ratones BALB/C e *in-vitro* en células PBMC, seguido a esto se desarrollaron pruebas de bioactividad en fluido corporal simulado y para finalizar se evaluó el método de anodización electroquímica a potencial constante. Para la caracterización de los resultados se realizó microscopía óptica (MO), Microscopía confocal (MC), mediciones de Óxido Nítrico (ON), Microscopía electrónica de barrido (SEM), Análisis elemental por dispersión de energías de rayos X (SEM-EDX) y Difracción de rayos X (DRX).

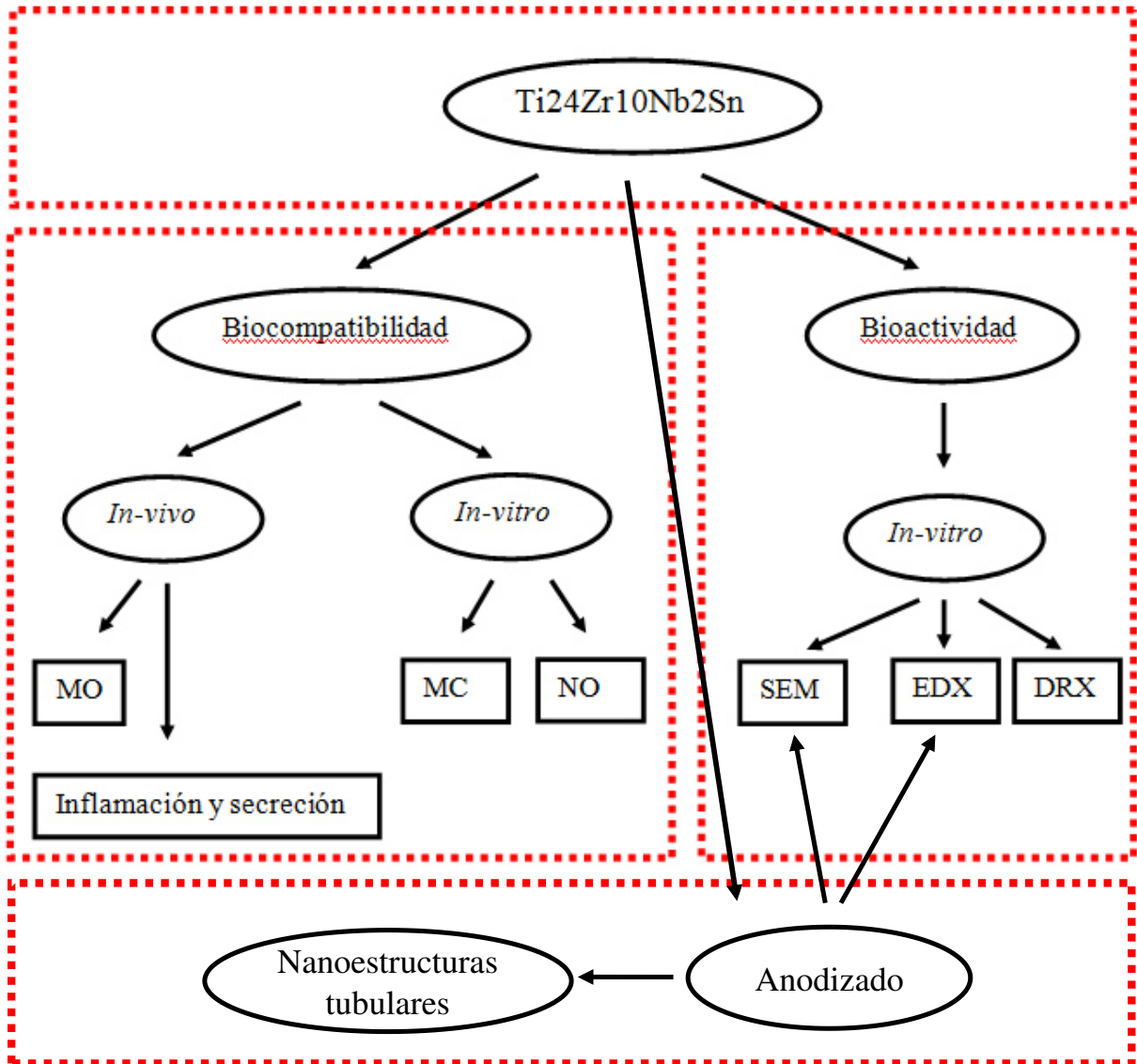


Figura 2.1. Diagrama de flujo de la metodología que se siguió para el desarrollo de las pruebas experimentales.

2.1 Materiales

En este trabajo se utilizó la aleación $\text{Ti}_{24}\text{Zr}_{10}\text{Nb}_2\text{Sn}$, la cual presenta excelente recuperación elastoplástica a temperatura ambiente. Este efecto se ve favorecido con el aumento de energía del tratamiento térmico, en donde se observa una fuerte orientación de crecimiento de la fase β . La aleación utilizada en este trabajo, fue elaborada en la escuela de graduados de ciencias puras y aplicadas de la universidad de Tsukuba Japón, dentro del grupo de investigación de los profesores Shuichi Miyazaki y Hee Young Kim. La aleación fue fabricada en forma de botones con elementos de alta pureza por el método de fundición por arco eléctrico en atmosfera de Ar. Los botones fueron fundidos seis veces para evitar alguna segregación, después se encapsularon en tubos de cuarzo al vacío y homogeneizados a 1000°C por 2 horas y enfriados al aire sin romper la capsula. Posteriormente, los lingotes fueron encapsulados otra vez en tubos de cuarzo, pero ahora en una atmosfera de argón para un posterior tratamiento térmico de solución a 1000°C por 1 hora. Después fueron templados en agua rompiendo el tubo de cuarzo con el fin de prevenir la formación de las fases secundarias α y ω . Finalmente los botones fueron rolados en frio en forma de láminas hasta llegar a una reducción del 98.5% de espesor, quedando con un espesor de 0.14mm.

2.2 Preparación mecánica de las muestras de $\text{Ti}_{24}\text{Zr}_{10}\text{Nb}_2\text{Sn}$

Con el fin de aumentar el área superficial y mejorar el perfil de rugosidad de las muestras de $\text{Ti}_{24}\text{Zr}_{10}\text{Nb}_2\text{Sn}$ y de las muestras de TiNi que se utilizaron de control, se realizó

una preparación mecánica superficial. Para esto, primeramente las muestras estudiadas fueron cortadas por hiloerosión (EDM) con dimensiones de 5 mm de largo por 5 mm de ancho y 0.14mm de grosor aproximadamente. Posteriormente se les realizó un desbaste con papel de carburo de silicio (SiC) usando las granulometrías de #150 y #400. La operación se repitió 5 minutos hasta observar una superficie con un rayado homogéneo en el microscopio óptico. Finalmente, las placas pulidas se limpiaron en un baño ultrasónico con disolventes orgánicos en 100 ml de acetona por 10 minutos y posteriormente se repitió el proceso en agua destilada. Todo este proceso de mejoramiento superficial se puede observar en la figura 2.2. Las placas se secaron a temperatura ambiente y fueron almacenadas en un desecador. Estas placas serán usadas en el futuro como sustratos para los fines de crecimiento de fosfatos de calcio después de ser sumergidos en SBF por diferentes periodos de tiempo, también para pruebas de biocompatibilidad *in-vivo* e *in-vitro* en células PBMC del sistema inmune de humano.

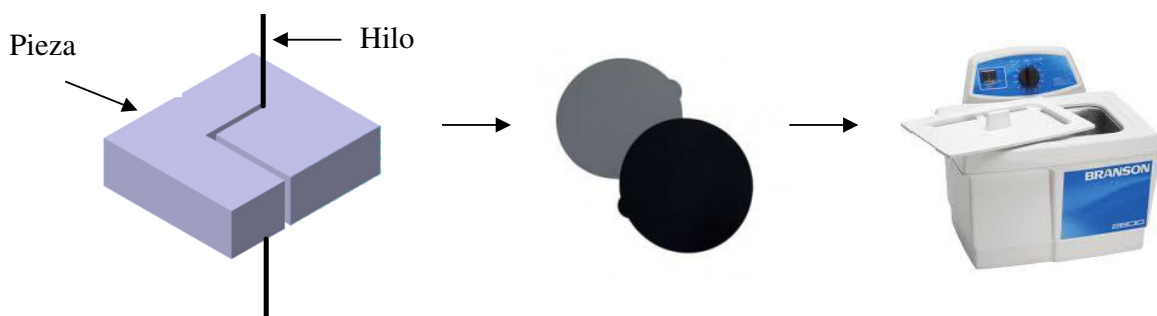


Figura 2.2. Se muestra el proceso de preparación mecánica de la muestra a) corte por hiloerosión b) desbaste mecánico y c) zonificación.

2.3 Pruebas de Biocompatibilidad *in-vitro* de la aleación Ti24Zr10Nb2Sn

Las pruebas de biocompatibilidad se realizaron *in-vitro* con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) del sistema inmune con el fin de estudiar como respondían cuando eran expuestas a la superficie de las placas de Ti24Zr10Nb2Sn. La sangre se extrae de sujetos sanos por punción venosa (venopunción) como se muestra en la figura 2.3.

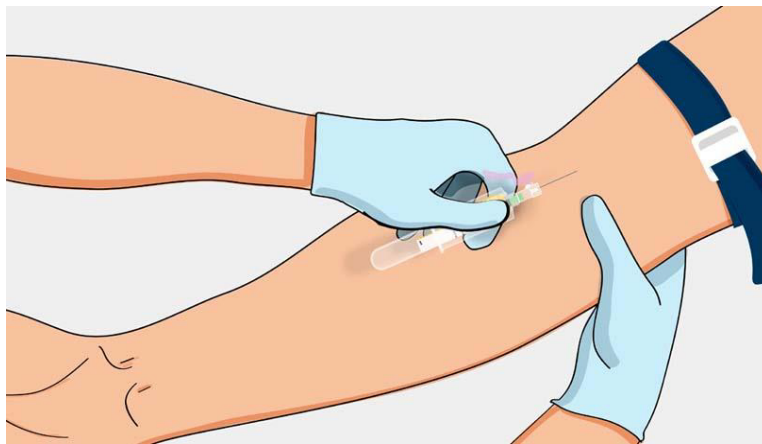


Figura 2.3. Extracción de sangre por venopunción.

La sangre extraída fue depositada en un tubo con capacidad de 50 ml, se preparó una dilución 1:1 con PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X. Posteriormente, 20 ml de la sangre diluida fue puesta sobre Ficoll Histopaque (20 ml) como se muestra en la figura 2.4 a). Seguido a esto el tubo fue centrifugado a 1600 rpm por media hora a temperatura ambiente. Después de centrifugar la sangre, las células se separaron por bandas como se muestra en la figura 2.4 b).

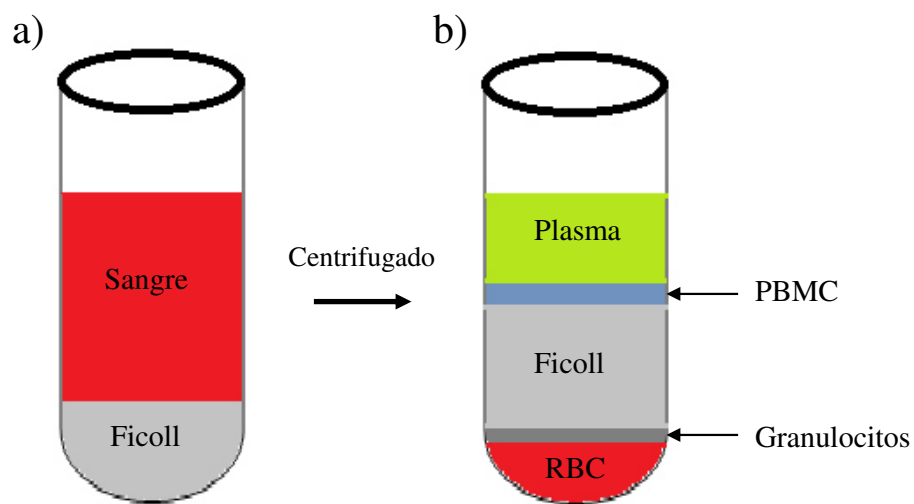


Figura 2.4. Separación de células de PBMC por centrifugado a) antes de centrifugar la sangre se mezcla con Ficoll y b) después de centrifugar se obtiene el pellet de células PBMC.

Las PBMC fueron cuidadosamente tomadas usando una micro-pipeta. Los leucocitos recolectados fueron sujetos a los siguientes lavados con 10 ml de 1X PBS:

- 1) 1600 rpm por 15 minutos a 25°C
- 2) 1300 rpm por 15 minutos a 25°C
- 3) 800 rpm por 15 minutos a 25°C
- 4) 800 rpm por 15 minutos a 25°C
- 5) 800 rpm por 15 minutos a 25°C.

El pellet obtenido fue lavado usando una solución de lisis de eritrocitos, la cual destruye la membrana celular de estas células a (1600 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente). Las células fueron lavadas y contadas, 400µl de RPMI-1640 suplementado con 10 por ciento de suero fetal bovino, 50µl de colorante de azul trypan y 50µl de concentrado celular. 10 µl de la solución anterior fue mezclada en una cámara de Neubauer y se determinó el número de células por mililitro.

Y para estudiar la biocompatibilidad, las células de PBMC fueron sembradas directamente sobre las placas que fueron preparadas mecánicamente, la muestra de control TiNi y Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn (97000 células por superficie) durante cuatro días a 37°C en una atmósfera con 5 por ciento de CO₂. Además se sembraron células en un grupo de control, ver figura 2.5.

Después de este periodo de incubación, se realizaron mediciones de óxido nítrico y de microscopia confocal. Debido a que la inflamación está asociada con la liberación de químicos como el óxido nítrico en el plasma celular, se tomó el sobrenadante celular donde estuvieron suspendidas las células en contacto con la placa metálica de cada uno de los tratamientos. Después se midió la concentración de nitritos y nitratos en el medio de cultivo, esto se realizó con el Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit (Cayman, USA). El procedimiento para medir la concentración total de nitrato/nitrito en la muestra, consiste en hacer reaccionar los nitritos y nitratos para convertirlos en un compuesto de color púrpura,

después la medición fotométrica de la absorbancia da como resultado la determinación precisa de este compuesto cromóforo, determinando así la concentración de nitrito.

En el cuarto día de cultivo, el medio de cultivo fue retirado y las células fueron lavadas con PBS 1X. El núcleo de las células fue marcado usando una solución de DAPI de SIGMA ALDRICH e incubado a 25°C en un cuarto oscuro, esto fue fijado con formaldehído al 4 % y la superficie de cada una de las muestras fue observada en un microscopio confocal vertical OLYMPUS laser Scanning Biological Microscope FV1200 BX61WI.



Figura 2.5. En esta imagen se muestra las células de PBMC sembradas sobre la aleación de TiNi y $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$ y como control se sembraron en el recipiente.

2.4 Prueba de biocompatibilidad in-vivo de Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn

Para corroborar los resultados obtenidos de las pruebas *in-vitro*, se introdujeron muestras en ratones, ya que con estos resultados es posible explorar diferentes aplicaciones en la construcción de dispositivos biomédicos.

Para este estudio se planteó utilizar 3 grupos de 4 ratones BALB/c de 8 semanas de edad y 22g de peso corporal aproximadamente. Al primer grupo se le introdujo subcutáneamente las placas preparadas mecánicamente de Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn, al segundo grupo las placas de TiNi y al tercer grupo de control, solo se le realizó la incisión en la espalda. La cirugía se llevó a cabo de la siguiente manera: los ratones fueron anestesiados con ketamine hydrochloride (100mg/kg)/xylazine (5 mg/kg), una vez que ya no presentaban movimiento, se procedió a cortarles el pelo de la parte dorsal con una máquina de corte de pelo y se limpió el área con alcohol etílico. Antes de realizar la cirugía se encendió un mechero para eliminar bacterias en el aire que pudieran estar cerca de los ratones. Después se realizó una incisión subcutánea de aproximadamente 10mm. Las muestras de la aleación de Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn que anteriormente fueron tratadas mecánicamente como esta descrito en la sección 2.2, se colocaron en alcohol etílico al 70% durante 2 minutos y luego fueron tomadas con una pinza e introducidas subcutáneamente en la parte dorsal. Seguido a esto se suturó el área con hilo de nylon. Por otra parte, como un método de control en el segundo grupo se introdujo la placa de TiNi como referencia. El tercer grupo de ratones solo se le realizó la incisión en la espalda, los grupos fueron anestesiados y suturados de la misma manera. Los tres grupos fueron mantenidos en un bioterio y fueron sacrificados 60 días

después de la operación en el laboratorio L18 de Nanotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León de acuerdo a la norma NOM-062-ZOO-1999. En la figura 2.6 se muestra un grupo de ratones después de la cirugía donde se introdujeron las muestras.



Figura 2.6. Ratones BALB/c después de la cirugía subcutánea.

Después de sacrificar a los ratones se retiró el tejido circundante a la aleación, el hígado y el bazo de cada ratón en el grupo. Posteriormente, para preservar los órganos, se almacenaron en recipientes con formaldehído como en la figura 2.7. El tejido se llevó al Hospital de Medicina de la Facultad de Medicina de la UANL, donde se retiró el formaldehído y se fijó cada uno de los tejidos en casetes con cera. Luego se realizaron cortes de cada tejido y se enviaron a analizar al departamento de patología especializado en tejidos de ratón proporcionado por la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

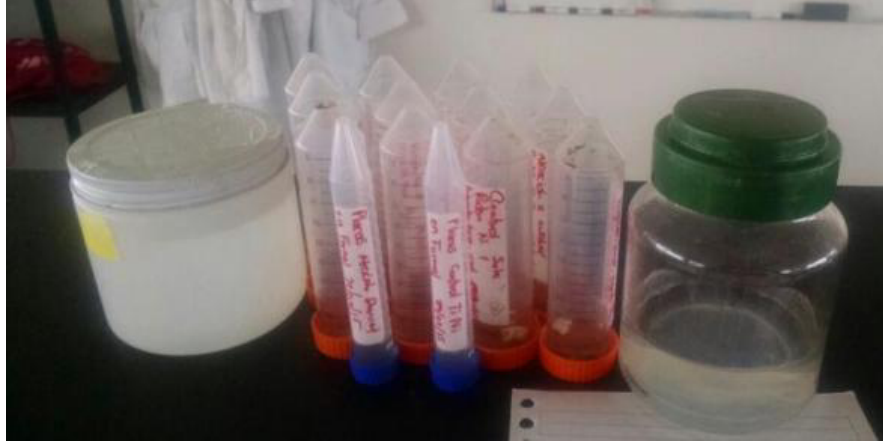


Figura 2.7. Tejido circundante, hígado y bazo en recipientes con formaldehído.

2.5 Tratamientos alcalinos de las muestras de $\text{Ti}_{24}\text{Zr}_{10}\text{Nb}_2\text{Sn}$

Como se esquematiza en la figura 2.1, otra prueba que se realizó sobre la aleación fue el estudio de su capacidad para generar una superficie bioactiva. Para esto, después de realizar la preparación mecánica de las muestras de $\text{Ti}_{24}\text{Zr}_{10}\text{Nb}_2\text{Sn}$ como se mostró en la sección 2.2, se realizaron los siguientes tratamientos alcalinos e hidrotérmicos para generar superficies más activas, de tal manera que promuevan la tasa de nucleación de los fosfatos de calcio en la superficie. En el primer tratamiento las muestras rectangulares fueron sumergidas en un vaso de precipitado con 100 ml de agua destilada, después se colocó en una plancha térmica con agitador magnético y con ayuda de un termómetro se ajustó la temperatura a 100°C por un periodo de tiempo de 1 hora. En el segundo tratamiento las muestras fueron sumergidas en 100 ml de una solución supersaturada de hidróxido de calcio

Ca(OH)₂. De la misma manera que en el tratamiento anterior, se colocó en una plancha térmica con agitador magnético y se ajustó la temperatura a 100°C con ayuda de un termómetro por un tiempo de media hora. En el tercer tratamiento las muestras fueron sumergidas en un vaso de precipitado con 100ml de una solución de 1 ó 5M de NaOH. Para este tratamiento se ajustó la temperatura a 60°C con ayuda de un horno por un periodo de tiempo de 24 horas. En el cuarto tratamiento las muestras fueron sumergidas en un vaso de precipitado con 100 ml de una solución 1 y 5M de KOH. De la misma manera se ajustó la temperatura a 60°C con la ayuda de un horno por un tiempo de 24 horas.

Después de cada uno de estos tratamientos, las muestras fueron retiradas del recipiente que contenía la solución, lavadas en agua destilada a una temperatura de 27 °C y secadas en un horno a una temperatura de 40°C por un periodo de 15 minutos. Finalmente las muestras con tratamientos alcalinos fueron calentadas a 120°C por 1 hora con una tasas de calentamiento de 4.6 K/s y entonces enfriadas en el horno para después ser almacenadas en un desecador. En la figura 2.8, se muestran las distintas concentraciones empleadas en los tratamientos respectivos.

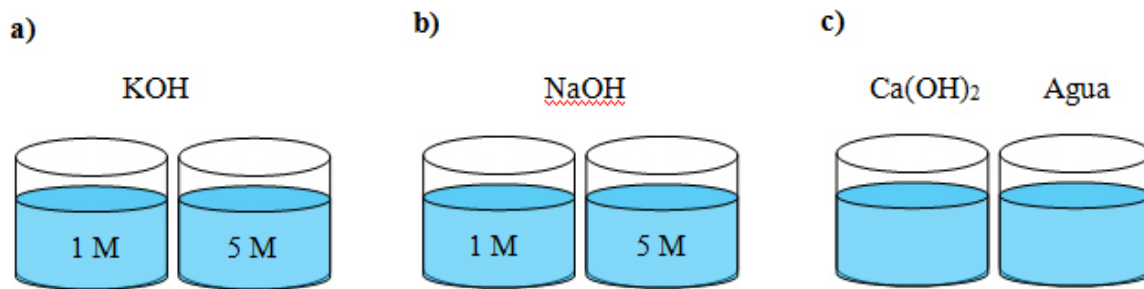


Figura 2.8. Tratamientos utilizados para activar la superficie de $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$, a) hidróxido de potasio, b) hidróxido de sodio c) hidróxido de calcio y agua.

2.6 Preparación del fluido fisiológico simulado (SBF)

El SBF utilizado sin especies orgánicas fue el propuesto por Kokubo et al. [3]. Durante la preparación del SBF se deben evitar los recipientes de vidrio ya que algunos fosfatos de calcio podrían adherirse a la superficie del vaso, esto puede inducir nucleación de hidroxiapatita en la solución, en su lugar se pueden utilizar recipientes de polietileno.

La solución se formuló a partir de los reactivos y de las cantidades que se listan a continuación:

1. Cloruro de Sodio ($NaCl$, 99%, Jaltek, NL,México), 8.035g/L
2. Bicarbonato de Sodio ($NaHCO_3$ 99.7%, Jaltek, NL,México), 0.355g/L
3. Cloruro de Potasio (KCl , 99%, Jaltek, NL,México), 0.255g/L

4. Fosfato de Potasio Dibásico ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 99%, Jalmek, NL, México), 0.231 g/L.
5. Cloruro de magnesio Hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$ %, Jalmek, NL, México), 0.311g/L.
6. Cloruro de Calcio ($CaCl_2$ %, Jalmek, NL, México), 0.292g/L.
7. Sulfato de Sodio (Na_2SO_4 %, Jalmek, NL, México), 0.072g/L.
8. Tris-(Hidroximetil)-aminometano ($((CH_2OH)_3CNH_2)$ 99.8 %, Jalmek, NL, México), 6.118g/L.
9. Ácido Clorhídrico (HCl, falta distribuidor, NL, México), 1M.

Todos los recipientes que se utilizaron para preparar el SBF previamente fueron lavados con 1M de ácido clorhídrico y después con agua destilada. Para preparar 500 mL de SBF, se agregaron los reactivos listados anteriormente en 375ml de agua desionizada, la solución se colocó en baño maría para hacer más estable la temperatura del suero, la cual se ajusta a $37.5^\circ C$ con ayuda de una placa con agitación magnética para permitir que se disuelvan los reactivos como se muestra en la figura 2.9. Antes de agregar el cloruro de calcio se agrega el 90% del ácido clorhídrico para bajar el PH de la solución. Se introdujo el electrodo para medir el PH de la solución, ya que en este momento su PH debería medir aproximadamente 1.5 ± 0.5 . Después se agregó el TRIS (Hidroximetil-aminometano) poco a poco en cantidades de 1 gr esperando a que se disolviera completamente hasta que el PH alcanzó un valor de 7.3. Seguido a esto se ajustó la temperatura a $37^\circ C$ y posteriormente se agregó más TRIS, hasta alcanzar un valor de 7.45. Posterior a esto se empezaron a añadir gotas de 1M de HCl hasta alcanzar un valor de PH de 7.42, después se agregó TRIS hasta

alcanzar un valor de 7.45, este proceso se repitió hasta disolver todo el tris en la solución y ajustando finalmente el PH a 7.4.

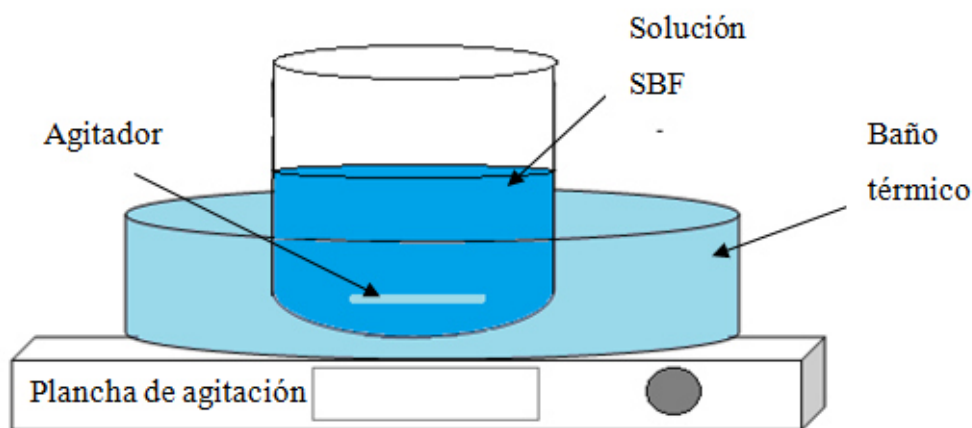


Figura 2.9. Preparación de SBF utilizando un baño térmico y una plancha con agitación magnética para controlar la temperatura.

Finalmente se retiró el electrodo de la solución y se lavó con agua destilada y esta se colocó en la solución. La solución se colocó en un vaso graduado para ajustar el volumen a 500mL, el recipiente de plástico se lavó y esta se colocó en la solución. El fluido corporal simulado se mantuvo en un refrigerador a una temperatura de 5°C durante 4 días. Después de este periodo el fluido se construía nuevamente.

Es importante remarcar que un mal diseño de la solución puede provocar precipitados en el recipiente que pueden afectar las mediciones, por lo que después de preparar el SBF se

comprueba la estabilidad de la solución, tomando 15 ml del suero e incubando a 37 °C por 4 días, después de este periodo no se deben observar precipitados.

2.7 Evaluación de las propiedades bioactivas del material.

El proceso para evaluar la capacidad de las placas de Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn para nuclear fosfatos de calcio en su superficie fue el siguiente: se preparó la solución SBF como se muestra en la sección 2.6 el suero se atemperó a 37°C en una plancha con agitador magnético, después con una pipeta Pasteur se tomaron 15 ml de la solución y se colocaron en un tubo de centrifuga. Las muestras que se trataron con NaOH, KOH y Ca(OH)₂ como se explica en la sección 2.5 se sumergieron en el tubo con el suero como se muestra en la figura 2.10. Las muestras inmersas en el SBF se mantuvieron en un horno a 37°C y PH 7.4 por un periodo de 30 días. Para preservar las concentraciones iónicas, el SBF en el que estaban sumergidas las muestras fue renovado cada 2 días.

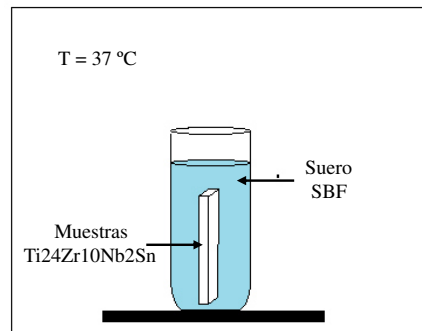


Figura 2.10. Diagrama esquemático de las muestras inmersas en SBF, con temperatura controlada.

Después de que las muestras fueron sumergidas por 30 días, se retiraron y se lavaron en agua destilada. Seguido a esto se secaron en un desecador, las muestras fueron analizadas por SEM, DRX, FT-IR y espectroscopia de rayos x de energía dispersiva (EDS).

2.7 Capacidad de Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn para generar nano estructuras por anodizado como ruta para la construcción de biodispositivos inteligentes.

En este trabajo se llevó a cabo un proceso de modificación superficial por anodización electroquímica para medir la capacidad de la aleación a generar nano estructuras tubulares o porosas, con el propósito de mejorar la biocompatibilidad además el aumento en el área superficial mejora su bioactividad y se consigue un carácter antimicrobiano debido a trazas de fluor en la superficie que se agregan después del proceso, estas características son de mucho interés en ingeniería biomédica para la construcción de futuras biodispositivos.

Para esto, la aleación fue cortada en forma rectangular con medidas de 10 x 10 x 0.14 mm utilizando la técnica de corte llamada hiloerosión para evitar introducir esfuerzos mecánicos o térmicos en las muestras. Posterior al corte, las muestras fueron preparadas como se explica en la sección 2.3 y después fueron pulidas con paño y pasta de diamante de 3 μ m hasta obtener un acabado espejo. Posteriormente se limpiaron en un ultrasonido (Branson 2800 model: CPX2800M) utilizando 100 ml de acetona por 10 minutos y en agua destilada por 10 minutos más. Un esquema de los electrodos puede consultarse en la figura 2.11 a). Como contra electrodo se utilizó titanio recubierto de Pt. Cada una de las muestras

fue anodizada en 100 ml del electrolito utilizando una fuente de poder de CD. La celda electroquímica fue cubierta con PVC. Después del proceso de anodización las muestras fueron lavadas inmediatamente con agua destilada por 1 minuto y almacenadas a temperatura ambiente. El electrolito que se utilizó fue una solución de 1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (99 por ciento, jalmeq) con adición de 0.25 M NH_4F (98 por ciento, jalmeq.) a temperatura ambiente. En La figura 2.11 b) se muestra un esquema del método experimental que se realizó para anodizar las muestras de $\text{Ti}_{24}\text{Zr}_{10}\text{Nb}_2\text{Sn}$ previamente mencionado.

Con el propósito de observar la morfología de los óxidos formados en las placas, las muestras fueron analizadas horizontal y transversalmente por microscopía de barrido de electrones, asimismo se realizó difracción de rayos-X para analizar cambios en la fase de los óxidos formados.

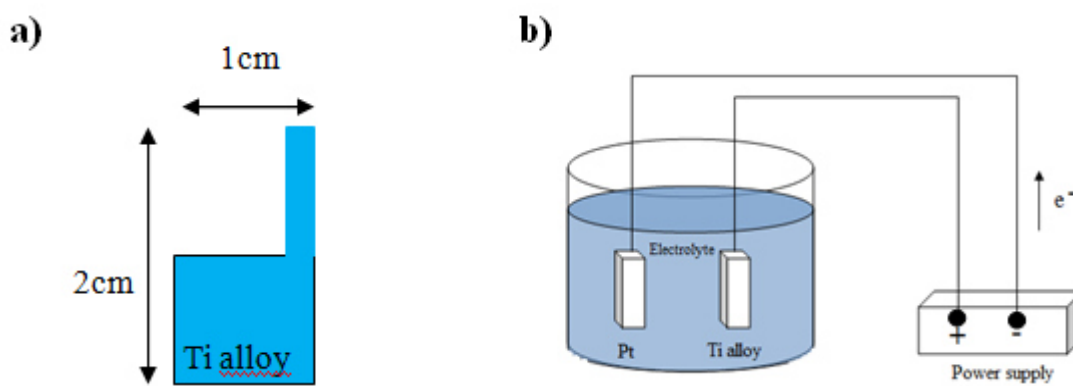


Figura 2.11. a) Construcción de los electrodos de 1cm^2 de la aleación $\text{Ti}_{24}\text{Zr}_{10}\text{Nb}_2\text{Sn}$ y b) Anodización de la aleación $\text{Ti}_{24}\text{Zr}_{10}\text{Nb}_2\text{Sn}$ con un contra electrodo de Pt en sulfato y fluoruro de amonio como electrolito.

2.8 Capacidad de carga y liberación local de fármaco de nano estructuras tubulares en $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$.

Ya que la inserción de una prótesis de hueso en algunos casos puede traer infecciones locales, después del día del implante entonces el paciente deberá consumir fármacos para reducir el riesgo de infección. En esta sección se plantea una metodología para carga y liberación de droga que podría ser efectiva para mantener una dosis local el sitio del implante. Para esto, las muestras anodizadas a un potencial constante de 15, 20, 25 y 30V fueron cargadas con gentamicina, la cual es una droga comúnmente utilizada para reducir el riesgo de infección en implantes de hueso. La liberación se cuantificó introduciendo las muestras cargadas en PBS y midiendo las absorbancias del suero a diferentes periodos de tiempo. Los pasos que se siguieron fueron los siguientes:

- Se preparó una solución de sulfato de gentamicina en agua al 1%(P/V)
- Se limpiaron las muestras usando agua desionizada y se almacenaron a temperatura ambiente.
- 100 μ l de la solución de la droga se pipetearon sobre las muestras anodizadas y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta que se secaron, después de que las muestras se secaron se limpiaron con un servilleta de tela suave, esto para remover el exceso de droga acumulada en la superficie
- Después de que las muestras se cargaron con la droga, estas se sumergieron en 1.5 mL de PBS (solución salina) durante un tiempo determinado.

- Para cuantificar la liberación, con una micropipeta se tomaron 4 μL del PBS de donde se encontraban las muestras y se renovaron los 4 μL de PBS que se retiraron.
- Se repitió el paso anterior en los siguientes tiempos: 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 40 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días y 7 días.
- La absorbancia de las muestras fue medida en el equipo nanodrop 2000 a una longitud de onda de 296 nm

Durante el experimento se tapó con papel cera el vaso donde se encuentran inmersas las muestras para evitar la evaporación del PBS del experimento.

2.9 Técnicas de caracterización

Después de realizar la metodología experimental antes mencionada, se caracterizó la morfología, composición y estructura de la superficie de cada una de las muestras, mediante Microscopía de barrido de electrones, Difracción de rayos-X y Análisis elemental.

2.9.1 Difracción de rayos-X (DRX)

Para la caracterización de las fases de los precipitados en la superficie de las placas de $\text{Ti}_{24}\text{Zr}_{10}\text{Nb}_2\text{Sn}$ se utilizó un difractómetro Bruker Advanced Solutions D8 como se

muestra en la figura 2.12, el cual utiliza radiación $K\alpha$ con filtro de cobre. Este equipo se encuentra en la Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica (FIME) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). La caracterización fue realizada a temperatura ambiente, en un rango de 2θ entre $20 - 70^\circ$, a una razón de $5^\circ/\text{min}$, las muestras se montaron en el porta-muestras del difractor y fueron fijados a la base con plastilina.



Figura 2.12. Equipo de difracción de rayos-x Difractómetro Bruker Advanced Solutions D8.

2.9.2 Microscopía electrónica de Barrido (SEM)

Para la caracterización de la morfología y composición química de los fosfatos de calcio nucleados en la superficie de las placas de $\text{Ti}_{24}\text{Zr}_{10}\text{Nb}_2\text{Sn}$ se utilizó el equipo Nova NanoSEM 200 de emisión de campo de la marca FEI que se encuentra en el Centro de

Innovación Investigación y Desarrollo en Ingeniería y tecnología (CIIDIT) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), en la figura 2.13 se muestra el microscopio utilizado. Este equipo tiene una resolución al alto vacío de 1 nm y un rango de tensión de 10-30 kV, cuenta con un accesorio de dispersión de energía de rayos-X característicos, que obtiene un espectro donde se observa la energía de transición de los elementos que se están analizando. La detección de los elementos se realiza en base a su peso atómico. El microscopio cuenta con tres diferentes modos de análisis: campo libre, inmersión y EDS, este último solo para análisis químico del material.



Figura 2.13. Equipo de Microscopía Electrónica de Barrido Nova NanoSEM 200 del CIIDIT de la UANL.

2.9.3 Microscopía electrónica de Fluorescencia

Para la caracterización de las células vivas en la superficie de cada una de las muestras, se utilizó un microscopio confocal vertical OLYMPUS laser Scanning Biological

Microscope FV1200 BX61WI, como el de la figura 2.14. Este se encuentra en la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.



Figura 2.14. Equipo de Microscopía Confocal OLYMPUS laser Scanning Biological Microscope FV1200 que se encuentra en la facultad de ciencias biológicas de la UANL.

2.9.4 Espectrometría UV-Vis

Después de introducir las muestras cargadas con la droga en una solución salina, Se cuantificó la concentración de Gentamicina que se liberó en el suero con el apoyo de un equipo de espectrometría UV-Vis (Figura 2.15) que se encuentra en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.



Figura 2.15. Equipo de espectrometría UV-Vis Thermo scientific NanoDrop 2000 que se encuentra en la facultad de ciencias biológicas de la UANL.

Los resultados así como la discusión de cada una de las metodologías propuestas en este capítulo se presentan en la siguiente sección.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

Los materiales muestran superficies en la que los átomos y moléculas residentes tienen reactividad especial y una respuesta biológica directa. Sin embargo, un aspecto importante de los biomateriales, es como éste influye en la respuesta celular de organismos o moléculas cuando está presente en fluidos corporales. Por esta razón debemos entender la reacción de la estructura superficial del biomaterial con un sistema vivo. En esta sección se presentan los resultados obtenidos de la experimentación que se llevó a cabo con la aleación Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn, la cual fue elaborada por Luí́s Ĺpez Pav́n et al [19]. En la primera parte se presentan los resultados de las pruebas de biocompatibilidad *in-vitro* e *in-vivo*. En este caso las pruebas *in-vitro* se desarrollaron con ćlulas mononucleares de sangre perif́rica (PBMC) del sistema inmune humano, y las pruebas *in-vivo* se desarrollaron en un grupo de ratones BALB/c de 8 semanas de edad. La segunda parte contiene los resultados de las pruebas de bioactividad *in-vitro*, las cuales se desarrollaron por inmersíon de las placas de Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn en fluido corporal simulado por un periodo de 30 d́as. La caracterizacíon

se realizó utilizando microscopía de barrido de electrones (SEM), análisis elemental (EDX), difracción de rayos-X (XRD) y microscopía confocal (CLSM). Además, buscando la posibilidad de generar una modificación superficial de la aleación Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn que mejore el comportamiento en las posibles aplicaciones en el área biomédica, se estudió la capacidad de generar nanoestructuras por el método de anodización electroquímica a potencial constante. En esta tercera parte se exponen los resultados de los parámetros de corriente y tensión necesarios para generar y controlar el crecimiento de nanoestructuras tubulares en la superficie de la aleación, y los resultados obtenidos del estudio de la liberación de drogas en soluciones salinas y la construcción de una membrana compósito utilizando estas novedosas estructuras.

3.1 Pruebas de Biocompatibilidad *in-vitro* e *in-vivo*.

Es importante mencionar que las pruebas de biocompatibilidad se realizaron en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la supervisión del Dr. Moisés Armides Franco Molina y de la Dra. Diana Ginette Zarate Triviño, bajo la norma NOM-062-ZOO-1999 el cual fue aprobado por el comité de bioética.

3.1.1 Prueba *in-vitro* de la aleación Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn en macrófagos (PBMC).

La inflamación es usualmente una respuesta altamente coordinada que involucra células del sistema inmune como los macrófagos. Estos están generalmente en reposo, sin embargo el proceso de interacción con el biomaterial puede activarlos y en respuesta liberan moléculas, las cuales estimulan el proceso de inflamación, fibrosis o necrosis del tejido circundante al implante, estas células son la primera línea de defensa del sistema inmune [78]. En las pruebas *in-vitro* la cantidad de moléculas inflamatorias liberadas en el medio de cultivo es proporcional a la toxicidad que podría presentar el material evaluado.

Es por esto que para evaluar la biocompatibilidad de la aleación Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn en este trabajo, se utilizaron macrófagos PBMC, las cuales estuvieron expuestas a la superficie del material por un periodo de tres días. Los macrófagos fueron marcados con DAPI, un marcador fluorescente que tiene la capacidad de unirse fuertemente al núcleo (ADN) de células vivas, y cuando es observado con microscopía confocal puede absorber a 358 nm (Ultravioleta) y emitir a 461 nm (Azul) como se muestra en la figura 3.1 en a) TiNi y b) Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn. La población de células PBMC en color azul en la superficie de las placas de Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn es mayor que en la superficie de las muestras de TiNi, ya que las propiedades químicas superficiales del material pueden controlar la apoptosis (muerte celular programada) de macrófagos adherentes. Esto podría indicar que no hay efectos citotóxicos considerables que produzcan muerte celular en la superficie de las muestras de Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn, ya que muchas células derivadas del tejido requieren enlazarse a la superficie del sólido para viabilidad, crecimiento, migración y diferenciación, por lo que

podemos concluir que las características superficiales podrían ser mejores comparadas con las muestras de TiNi. Al comparar el área fluorescente entre el TiNi y la aleación Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn, encontramos que el diámetro promedio es de 4 μm y que está de acuerdo al diámetro celular reportado en la literatura. Es evidente que es mayor el área de color azul en la placa de Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn, lo que indica que tiene un mejor potencial como material biocompatible que la aleación TiNi, siendo que esta última ya ha sido reportada en uso en dispositivos con aplicaciones médicas [5].

Debido a que la inflamación está asociada con la liberación de químicos como el óxido nítrico en el plasma celular, para complementar los resultados anteriores se tomó el sobrenadante celular donde estuvieron suspendidas las células en contacto con la placa metálica de cada uno de los tratamientos (ver figura 2.5). Después se midió la concentración de nitritos y nitratos en el medio de cultivo mediante la metodología del Kit Nitrate Nitrite Assay (Cayman), la cual consiste en varios pasos; el primero es la conversión de nitrato a nitrito utilizando la nitrato reductasa, el segundo paso es la adición de los reactivos de Griess los cuales convierten el nitrito en un compuesto color púrpura, después la medición fotométrica de la absorbancia dio como resultado la determinación precisa de este compuesto cromóforo, determinando así la concentración de nitrito. Como se muestra en la figura 3.2, se encontró una cantidad poco significativa de nitritos y nitratos en el medio de cultivo de las células que estuvieron expuestas a las placas de Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn comparadas con las placas de TiNi y el control (placa de cultivo), esto indica que la producción de óxido nítrico debido a la respuesta de la interacción de las células con la superficie de la placa de Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn,

es menor que con la superficie de la placa de TiNi y por tanto se generaría menos inflamación si son expuestas a un sistema vivo en futuras aplicaciones médicas como prótesis de hueso.

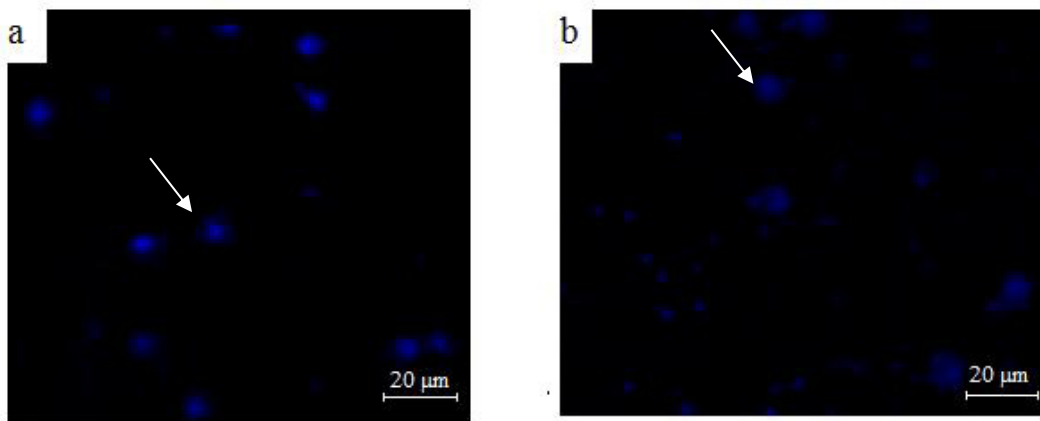


Figura 3.1: Microscopía confocal de células PBMC marcadas con DAPI que fluorescen en color Azul, expuestas a las superficies de a) TiNi y b) Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn durante tres días.

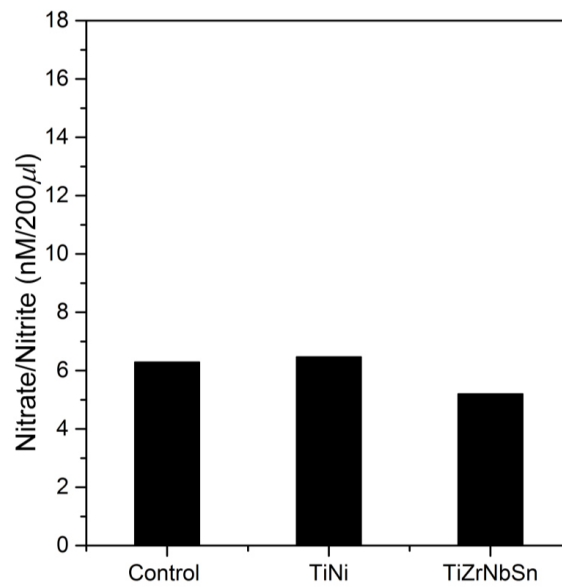


Figura 3.2: Liberación de óxido nítrico por células PBMC expuestas a las placas de TiNi, Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn por un periodo de tres días.

3.1.2 Prueba *in-vivo*. Observación sobre la aceptación de las muestras de Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn y TiNi en ratones BALB/c

En muchas aplicaciones los biomateriales están en contacto a menudo por periodos prolongados con células y tejido tales como hueso, tejido cardiovascular o sangre, en donde la respuesta local del tejido podría ser de la siguiente manera:

1. Biointegración completa (mínima o sin toxicidad o inflamación),
2. Encapsulación del biomaterial (respuesta inmune),
3. Expulsar al exterior el cuerpo extraño (respuesta inmune),
4. Necrosis (efecto tóxico seguido por muerte del tejido),
5. Carcinogenicidad (cáncer causado por efectos del biomaterial).

Por lo que el diseño de dispositivos médicos con biomateriales requiere el conocimiento de la respuesta física y química de la interface entre células que estarán interactuando con superficies no fisiológicas.

En este sentido placas de Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn se introdujeron en la parte dorsal de cada uno de los 4 ratones BALB/c de 8 semanas de edad y se etiquetó como grupo 1 con una marca en la cola de color rojo. Para realizar una comparación con la aleación TiNi, la cual ya ha sido empleada en aplicaciones biomédicas, placas de TiNi fueron igualmente introducidas en la parte dorsal de un grupo de 4 ratones de la misma especie; este se etiquetó como grupo 2 con una marca en la cola de color negro. Aunado a eso, otro grupo de 4 ratones de la misma

especie a los que se les realizó la cirugía pero sin introducirle ningún material fue usado como control y se etiquetó como grupo 3 con una marca de color azul en la cola, esto con el fin de llevar un control efectivo sobre la evolución de la recuperación de los ratones bajo el mismo medio ambiente. En la figura 3.3 se observa el grupo 1, el grupo 2 y el grupo 3 de ratones. Finalmente, después de introducir el implante se realizó sutura con hilo de nylon y se limpió con alcohol la superficie,

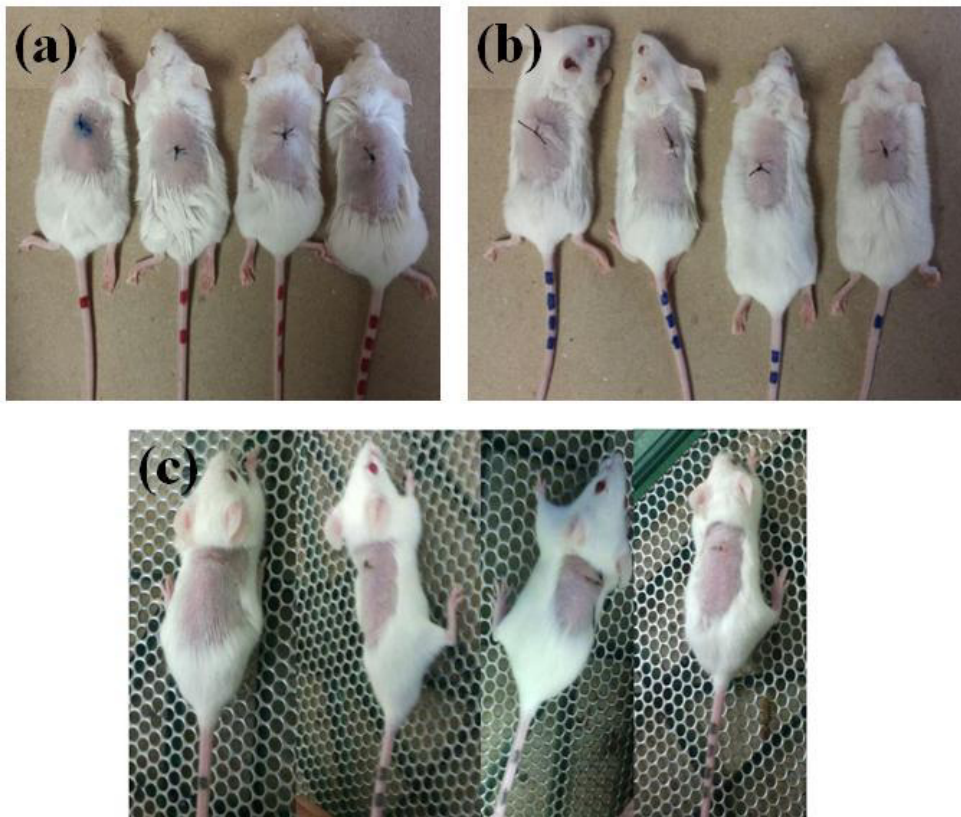


Figura 3.3: Grupo de ratones el día en que se realizó el implante subcutáneo de las muestras en a) de $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$ en b) de $TiNi$ y en c) es el control.

Cabe señalar que durante el periodo de recuperación de los ratones, tanto en el grupo con las placas de $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$, como en el grupo con las placas de $TiNi$, no hubo secreción de pus, por lo que podemos concluir que en ambos grupos, no se presentó tejido necrótico alrededor del implante. Ciertos niveles de inflamación, se presentaron por un periodo de dos días posteriores al día de la cirugía, lo cual indica que solo se presentó inflamación aguda como una consecuencia de la respuesta del sistema inmune durante la aceptación del material de implante. En el cuarto día posterior a la cirugía se observó que en el grupo 1, con las muestras implantadas de $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$, se presentó cicatrización sin inflamación en la parte dorsal donde se realizó la cirugía. Además se observó que un ratón en el grupo presentó crecimiento de pelo en la parte local al área de implante como se observa en la figura 3.4:



Figura 3.4: Grupo de ratones el 4 día después de la operación con implante subcutáneo de las muestras de $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$.

En la figura 3.5 se observa el grupo 2 después del cuarto día de que fue implantado con $TiNi$. Los cuatro ratones en el grupo presentaron cicatrización y no se detectó

inflamación en el área local del implante, además, aunque menor que en el caso anterior, se encontró crecimiento de pelo en la parte dorsal.



Figura 3.5: Grupo de ratones el 4 día después de la operación con implante subcutáneo de las muestras de TiNi.

En la figura 3.6 se observa el grupo 3 (grupo control) después del cuarto día de la incisión y sutura en la parte dorsal. Los cuatro ratones en el grupo presentaron cicatrización y no se detectó inflamación en el área local del implante, de la misma manera que los grupos anteriores se encontró crecimiento de pelo en la parte dorsal.

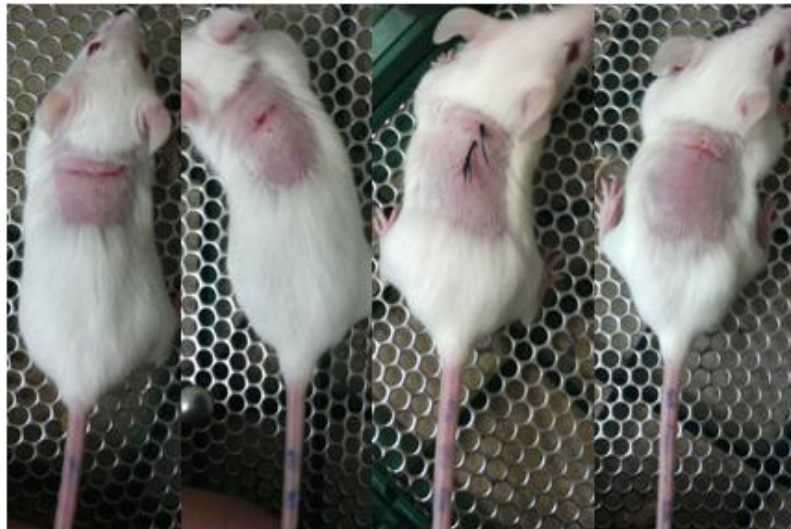


Figura 3.6: Grupo de ratones control (solo se realizó incisión y sutura) el día de la operación.

En la figura 3.7 se observan los 3 grupos 60 días después de la operación. La figura 3.9a) corresponde al grupo 1 implantado con TiZrNb_2Sn , en b) corresponde al grupo 2 el cual fue implantado con TiNi y en c) se observa el grupo control. En estas imágenes se puede apreciar que los ratones gozan de perfecta salud y que el pelo de la zona de la cirugía se ha recuperado totalmente. Cabe señalar que; después de la primera semana, comenzó el crecimiento de pelo en el área de implante y no se observó secreción de pus en el lugar del implante en ninguno de los grupos en ningún momento. Lo anterior indica que ambos materiales fueron al menos en apariencia, bien aceptados por los ratones.

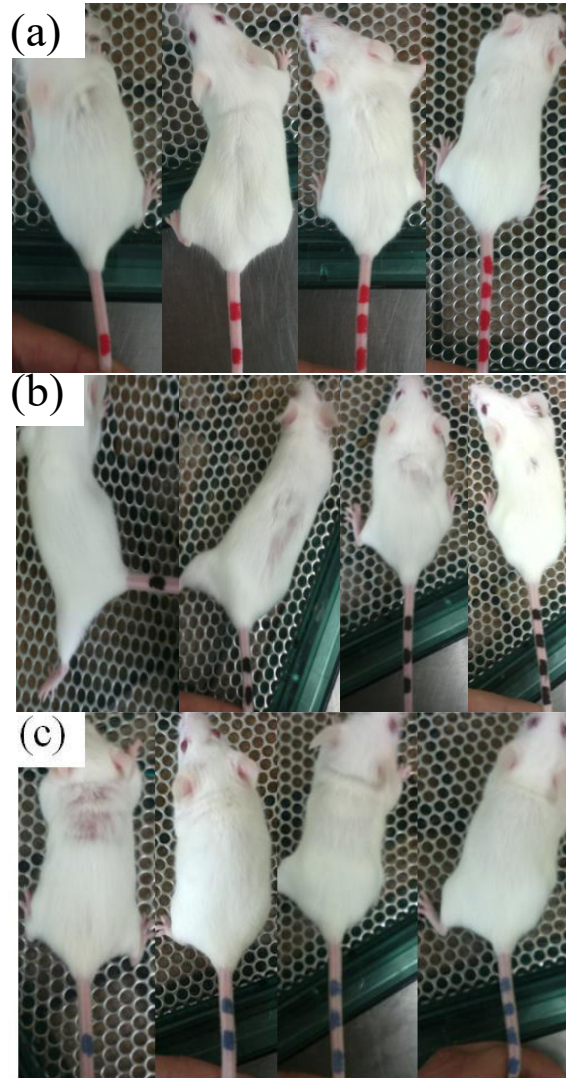


Figura 3.7: Grupo de ratones después de 60 días en que se realizó el implante subcutáneo en (a) con muestras de $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$ en (b) muestras de $TiNi$ y en (c) grupo control (solo se realizó incisión y sutura).

3.1.3 Análisis de la necropsia para conocer el grado de aceptación de las aleaciones $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$ y $TiNi$ en ratones BALB/c

Ya que la respuesta del tejido como inflamación, encapsulación o necrosis está asociada con la presencia de células características alrededor del implante, para complementar estos resultados, los grupos de ratones fueron sacrificados a los 60 días después de colocar los implantes y se analizó el tejido circundante al biomaterial, el bazo por ser parte del sistema inmunológico encargado de filtrar elementos extraños de la sangre, y el hígado ya que se ha demostrado que en este órgano se forman depósitos de iones metálicos que producen daño en el tejido [9], [10] los resultados del análisis de histopatología se presentan en la siguiente sección.

Los hallazgos en la necropsia de ratones en los cuales fue implantado el material de $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$ o $TiNi$ en el tejido subcutáneo del dorso del animal, fueron comparados con el grupo control a los que solo se les realizó la incisión y sutura. Los resultados arrojaron que se observó una integración del material al tejido, ya que se pudo constatar que el material fue recubierto con tejido subcutáneo que no presentó la presencia de tejido granulomatoso como se observa en la figura 3.8 en el área marcada con un círculo negro, la flecha marca los implantes que se utilizaron. Esta reportado que las partículas generadas desde la superficie del biomaterial se empiezan a acumular en el fluido sinovial, esto estimula una respuesta celular y en consecuencia se pueden formar granulomas (nódulos que consisten de células inflamatorias que fagocitan los cuerpos extraños) con necrosis central o tejido cicatricial, lo que resulta en osteólisis local progresiva y posterior pérdida del implante [79], [80], por lo que podemos decir que las muestras presentan excelente biocompatibilidad.

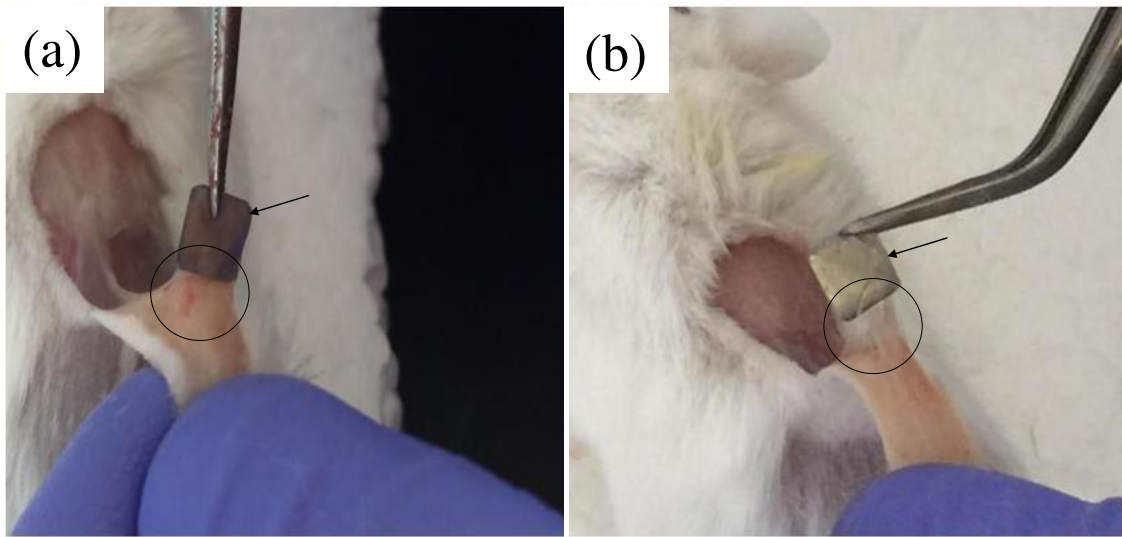


Figura 3.8: Extracción de implante subcutáneo marcado con una flecha en a) muestras de $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$ y en b) $TiNi$ después de 60 días de la operación, el círculo marca el tejido integrado a las muestras.

Cabe aclarar que solo en un ratón de los 4 del grupo implantados con las muestras de $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$, se observó la presencia de tejido inflamatorio como se observa en la figura 3.9 y la presencia de angiogénesis compuesta de 6 arterias irrigando el material, pero sin la presencia de tejido granulomatoso, lo cual indica una biointegración del material y ausencia de tejido necrótico (muerto). Esta inflamación fue analizada después de la necropsia y se concluyó que fue ocasionada durante la metodología seguida cuando se suturo la herida del ratón y no por el implante, por lo que se puede concluir que tanto la aleación $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$, como la $TiNi$, tienen excelente biocompatibilidad *in-vivo*.



Figura 3.9: Ratón con implante subcutáneo de $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$ después de 60 días de la operación.

En la figura 3.10 se observa un ratón del grupo 2 implantado con las muestras de TiNi, en el que se observó que el material fue parcialmente rechazado al exterior de la piel presuntamente también por una mala práctica quirúrgica debido a que la herida se abrió sobre la línea de sutura, este fenómeno se presentó en tres ocasiones durante el periodo que estuvo el mismo ratón bajo observación.



Figura 3.10: ratón con implante subcutáneo de TiNi después de 60 días de la operación.

Por otro lado, en hallazgos macroscópicos de la necropsia, no se encontraron cambios patológicos en bazo, hígado, pulmón e intestinos, lo que significa que las aleaciones no causaron daños en los órganos de los ratones, esto sugiere que los productos de corrosión liberados en el sistema circulatorio no producen un efecto nocivo en los tejidos expuestos por un periodo de tiempo de dos meses lo que sugiere también una buena biocompatibilidad de la aleación.

3.1.4 Histopatología de pruebas *in-vivo* de Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn

Las pruebas de histopatologías se desarrollaron en colaboración con el Dr. Moisés Armides Franco Molina de la Facultad de Ciencias Biológicas. De acuerdo a los resultados mostrados en la figura 3.11, el tejido alrededor del implante control fue esencialmente tejido adiposo (AD) y fibroso (*) (figura 3.11a)). El tejido adiposo tuvo una coloración marrón multilocular (AB) y amarillo maduro, rodeado por fibras de colágeno entremezcladas con fibroblastos y grupos de numerosos mastocitos con algunos conglomerados de células inflamatorias. Curiosamente, se observaron cilindros de hueso trabecular bien formado marcado con una flecha y con médula ósea en el centro marcado con un asterisco en la Figura 3.11b). Las secciones hepáticas mostraron algunos pequeños granulomas lobulares y escaso infiltrado inflamatorio en las áreas portales marcado con una flecha en la Figura 3.11c). El bazo mostró hiperplasia leve de pulpa blanca marcado con una flecha negra, manifestada por ganglios linfáticos grandes e irregulares como se muestra en la Figura 3.11d). Se observó una constitución similar del tejido alrededor del implante Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn (figura 3.11e)), pero

se observó más inflamación en las áreas portales con cambios regenerativos de los hepatocitos activos marcado con una flecha en la figura 3.11f), así como alguna atrofia de la pulpa blanca en el bazo, por lo que no se presentan efectos citotóxicos en los órganos debido al material implantado.

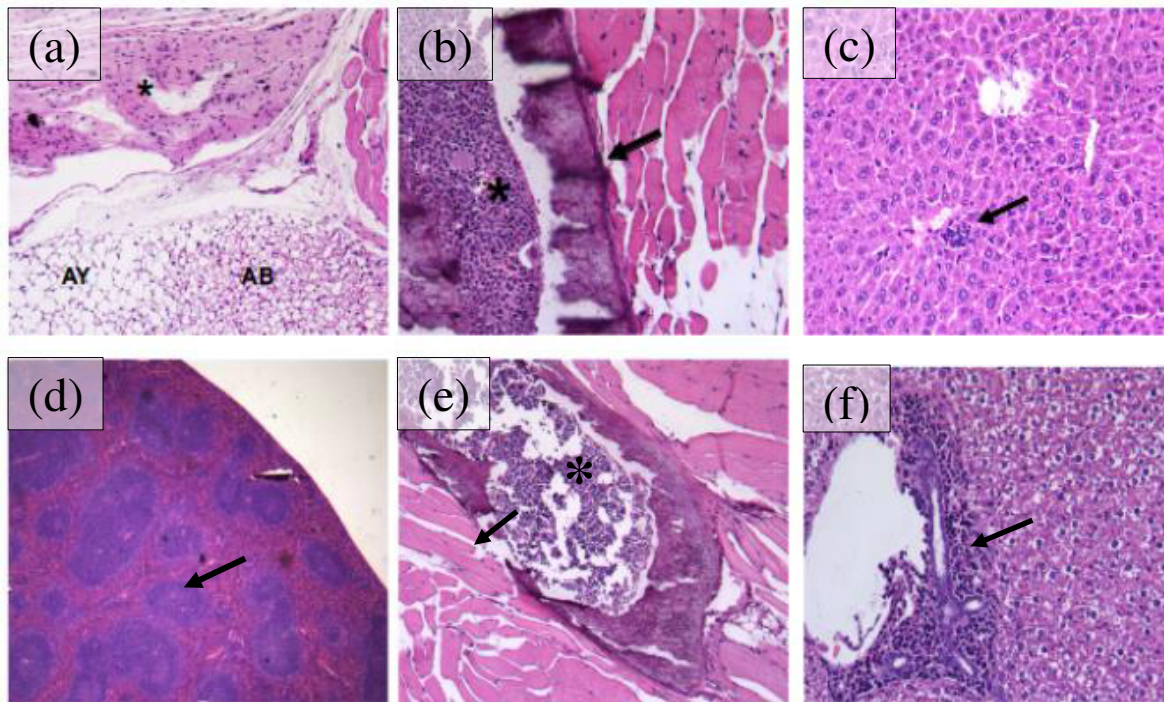


Figura 3.11: Micrografías representativas del tejido periférico alrededor de los implantes. a) Fibroso (*) y amarillo adiposo (AY) y tejido adiposo fetal o marrón (AB) alrededor del implante de control. b) El hueso trabecular (flecha) con médula ósea (*) formado cerca del implante de control. c) La sección hepática del ratón con implante de control muestra granuloma lobular pequeño (flecha). d) El bazo del mismo animal muestra hiperplasia de pulpa blanca. e) trabéculas óseas con médula ósea formadas alrededor del implante de aleación TiZrNbSn. f) Inflamación portal en la sección hepática de ratón con implante de aleación TiZrNbSn.

3.2 Pruebas de Bioactividad *in-vitro* de la aleación Ti24Zr10Nb2Sn

La familia de biomateriales basados en titanio y sus aleaciones, a diferencia de otros biomateriales metálicos, es la única familia de materiales que es capaz de enlazarse con el hueso como lo demostró el Dr. P. Brånemark accidentalmente en 1952, el Dr. Brånemark encontró que el Ti se fijaba firmemente al hueso en un periodo de seis meses, por lo que con su implante trajo el concepto de oseointegración del titanio [12]–[14], [47]. Otras aleaciones, como las de cobalto, forman una cápsula de tejido fibroso que contribuye a la pérdida permanente del implante. En las aleaciones de titanio el proceso de integración al hueso se puede resumir en dos pasos:

1. Formación de fosfatos de calcio en la superficie del material.
2. Interdigitación de fibras de colágeno en los fosfatos de calcio de la superficie del material.

Así, para poder considerar que un biomaterial puede ser empleado para implante de hueso, éste debe tener la capacidad de nuclear fosfatos de calcio cuando es inmerso en fluido corporal simulado SBF [81], ya que este proceso favorece la adhesión al hueso cuando está en contacto íntimo con fluidos fisiológicos.

Es por esto que para evaluar la bioactividad o la capacidad de nuclear fosfatos de calcio del biomaterial Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn, como ya se mencionó en la sección 2.5 del capítulo de la metodología de esta tesis, se realizaron modificaciones físicas (pulido mecánico) seguido de tratamientos químicos superficiales con hidróxido de potasio (KOH), hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de calcio (Ca(OH)₂) o tratamiento en agua a 100°C con el propósito de activar la superficie del material. Posteriormente se sumergieron en fluido corporal simulado por un periodo de 30 días. La caracterización superficial de las muestras se llevó a cabo por difracción de rayos-X, microscopia de barrido de electrones y análisis elemental. Los resultados se presentan a continuación.

3.2.1 Difracción de rayos-X (DRX).

Con el propósito de conocer la estructura física de los fosfatos nucleados, en esta sección se presentan los resultados de DRX de las muestras que se modificaron superficialmente con los tratamientos 1 y 5M de NaOH, KOH y el tratamiento con Ca(OH)₂ supersaturado seguidas de inmersión en SBF.

En la figura 3.12 se presenta la difracción de rayos-X típica de la aleación Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn. En ésta se pueden observar picos característicos de la fase α' y β . Estos resultados concuerdan con los reportados recientemente en la literatura [19]. De tal manera que los resultados indican que en la muestra rolada se encuentran coexistiendo la fase austenítica con martensita inducida por esfuerzos a temperatura ambiente.

La caracterización por difracción de rayos X se realizó también en las superficies de las muestras en donde se realizó un crecimiento de hidroxiapatita. Los resultados, como se verá a continuación, indican que la superficie tiene la capacidad de nuclear fosfatos de calcio, lo cual sirve de base para la integración de fibras de colágeno una vez que el material está en contacto directo con fluidos corporales.

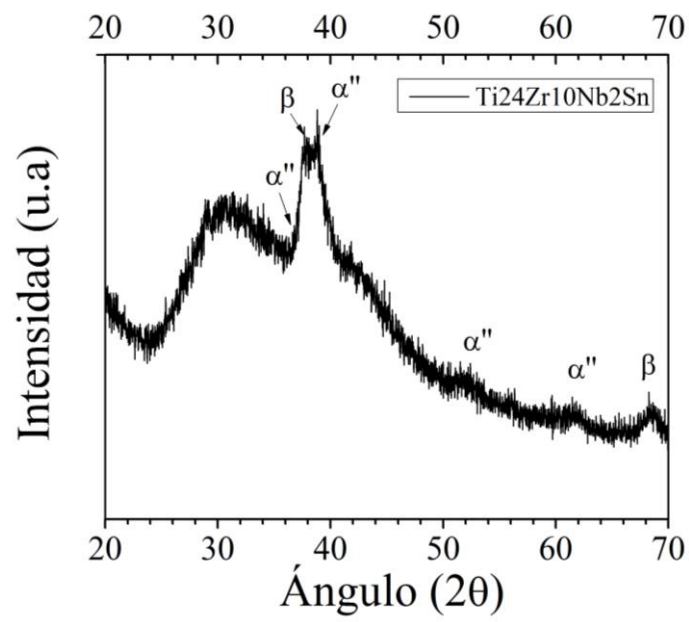


Figura 3.12: Difracción de rayos-X de la aleación rolada Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn, presenta máximos de intensidad característicos de las fases α'' y β.

Como se comentó anteriormente, debido a que los fosfatos de calcio nucleados sirven como interface de integración del hueso a la aleación de titanio, como un método comparativo de los resultados de DRX de la aleación Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn, en las figuras siguientes, se agregó las posiciones de los picos de rayos-X en azul de una apatita con la finalidad de conocer si los picos de difracción de los precipitados en las muestras corresponden a la hidroxiapatita.

Los picos principales de difracción de la hidroxiapatita se encuentran en 25.879, 31.774, 32.197, 32.902, 34.049, 46.713, 49.469 grados y el más intenso se presenta en 31.774 [46].

Los resultados de difracción de rayos-x de los tratamientos con concentraciones de uno molar de hidróxido de potasio e hidróxido de sodio se muestran en las siguientes figuras. En la figura 3.13 se muestra la DRX, en color negro los picos de la aleación Ti24Zr10Nb2Sn. En la figura 3.13 a) se presenta en color rojo los picos de la aleación después del tratamiento alcalino con 1M de KOH seguido de inmersión por 30 días en SBF y en b) en color rojo los picos de la aleación después del tratamiento con 1M de NaOH seguido de inmersión en SBF por 30 días, las barras de color azul son los picos característicos de la hidroxiapatita.

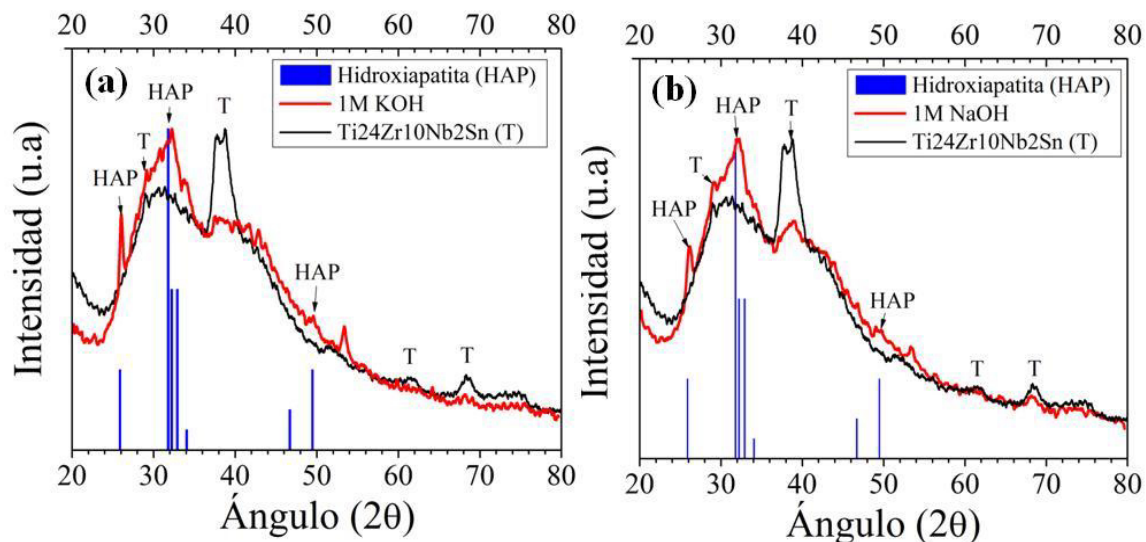


Figura 3.13: En color negro se presenta la DRX de la aleación Ti24Zr10Nb2Sn rolada y en color rojo los tratamientos en a) 1M de KOH y en b) 1 M de NaOH ambos después de inmersión en 1.5SBF por 30 días y en azul los principales picos de difracción de la hidroxiapatita.

En ambos tratamientos KOH y NaOH con concentraciones de 1M, después de la inmersión en SBF aparecieron dos picos intensos en 26° y 32° que corresponden a los picos principales de difracción de la hidroxiapatita, y siguen presentándose los picos alrededor de 39° que son característicos de las fases α'' y β de la aleación $\text{Ti}_{24}\text{Zr}_{10}\text{Nb}_2\text{Sn}$, aunque estos fueron detectados con menor intensidad que los presentados antes del tratamiento de inmersión para hacer crecer la hidroxiapatita, tal y como se puede observar en la figura 3.12. Esta atenuación de los picos de las fases α'' y β , se deben al crecimiento de la hidroxiapatita ya que la fluencia de rayos-X no tienen suficiente energía para atravesar la capa de apatita y difractar en la superficie de la aleación. Estos picos característicos obtenidos después de la inmersión están en concordancia con resultados obtenidos en aleaciones base Ti [57], [82]–[84].

En la figura 3.14 se muestran los resultados de difracción de rayos-x de la aleación $\text{Ti}_{24}\text{Zr}_{10}\text{Nb}_2\text{Sn}$ sin tratamiento superficial de crecimiento en color negro y en color rojo después de los tratamientos alcalinos a) 5M de KOH y b) 5M de NaOH, ambos seguidos de inmersión en 1.5SBF por un período de 30 días. En estos resultados, al igual que los resultados de la figura 3.13, se presentaron picos intensos alrededor de 26° y 32° , que son los picos característicos de apatitas nucleadas en la superficie durante la inmersión en SBF [85]. Comparando con la figura 3.13, encontramos que los picos de la estructura correspondiente a la apatita se presentan más intensos en concentraciones de 5M, lo que indica que la concentración del tratamiento alcalino juega un rol importante en la nucleación de apatitas. Y que a mayor concentración, se favorece el crecimiento de esta fase.

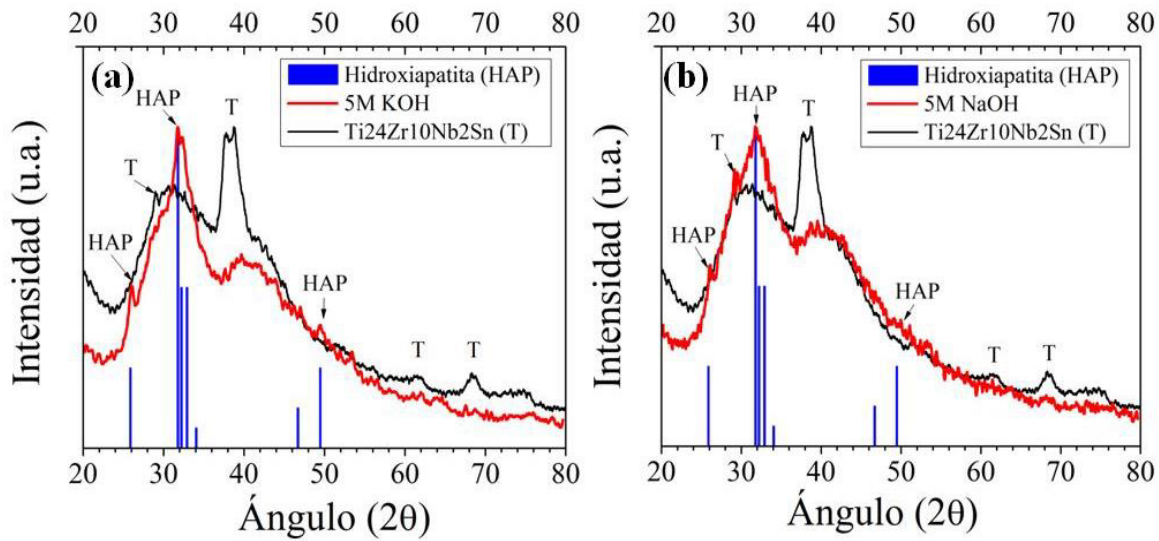


Figura 3.14: DRX de Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn en color negro y de los tratamientos en color rojo a) 5M de KOH y b) 5M de NaOH ambos después de inmersión en 1.5SBF por 30 días, en azul los principales picos de difracción de la hidroxiapatita.

De la misma manera, en estos tratamientos se detectó de forma muy débil los picos correspondientes a la superficie de la aleación rolada sin tratamiento térmico reportados en la figura 3.12, sugiriendo que la capa de apatita cubre la superficie de la aleación y esto va debilitando la aparición de los picos de las fases α'' y β .

En la figura 3.15 se presenta en color negro la difracción de rayos-x de la muestra Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn rolada y en color rojo tratada con una solución supersaturada de hidróxido de calcio (Ca(OH)₂) y seguido de inmersión por 30 días en 1.5SBF, las barras azules corresponden a los picos de difracción de la hidroxiapatita. Aquí se puede observar el mismo fenómeno reportado para los otros tratamientos, es decir se presentan los picos intensos

alrededor de 26° y 32° , característicos de precipitados de apatitas en la superficie. Y los picos correspondientes a la superficie de la aleación también fueron detectados débilmente.

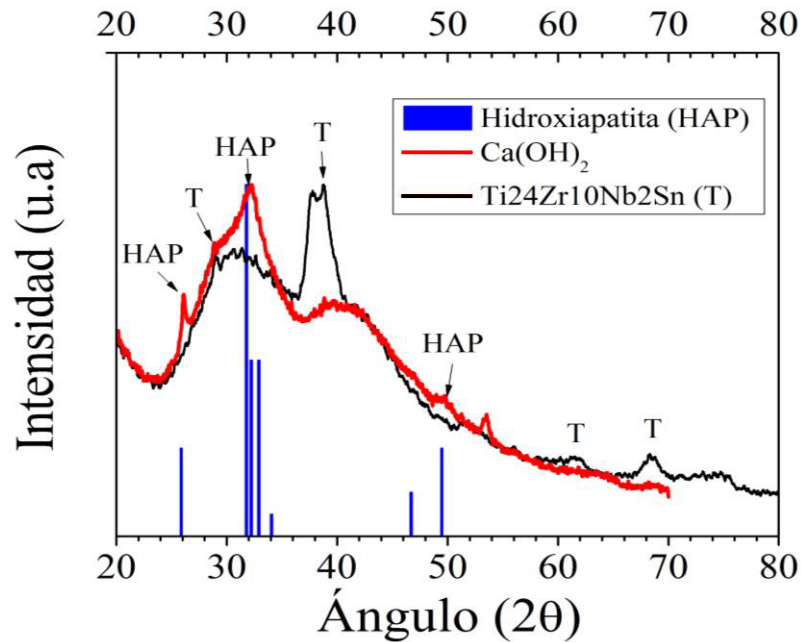


Figura 3.15: Difracción de rayos-x de la muestra $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$ en color negro y del tratamiento $Ca(OH)_2$ después de inmersión en 1.5SBF por 30 días en color rojo, en azul los principales picos de difracción de la hidroxiapatita.

En resumen, en la figura 3.16 se presenta la difracción de rayos-X de todos los tratamientos realizados (alcalinos e hidrotérmicos), seguidos de inmersión por 30 días en 1.5SBF, la referencia $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$ en color negro. Como se puede observar, todos los tratamientos presentan picos característicos de difracción de la hidroxiapatita, es decir, todos favorecen el proceso de deposición o crecimiento de la hidroxiapatita. Pero es claro que al aumentar la concentración tanto de NaOH y de KOH, la intensidad de los picos a 32° difractados por la superficie de fosfatos de calcio en la aleación crece, la intensidad del pico

a 26° disminuye sugiriendo esto un mayor crecimiento de la capa formada, y el que presenta un mayor crecimiento es el tratamiento de 5M de KOH.

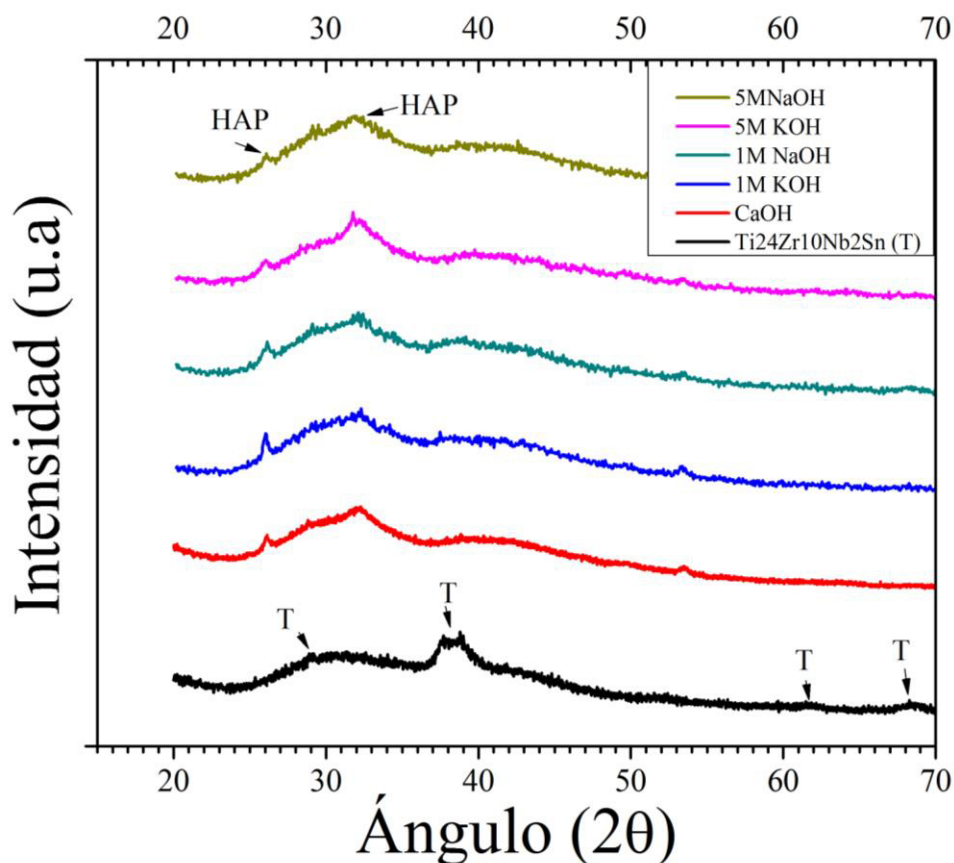


Figura 3.16: Difracción de rayos-X de la muestra $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$ en color negro y de los tratamientos NaOH, KOH, $Ca(OH)_2$ después de inmersión en 1.5SBF por 30 días.

Después de estos resultados *in-vitro* podemos concluir que la modificación superficial con tratamientos alcalinos es favorable para nuclear apatita en la superficie del implante. Por lo que la aleación $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$ al realizarle tratamientos alcalinos, es bioactiva y puede generar uniones directas y fuertes con el tejido óseo [86]. En los resultados anteriores se utilizó una concentración 1.5SBF y se pudo demostrar que es factible formar una capa de

apatita sobre la superficie de $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$. Este resultado permite elucidar que es posible producir una capa de fosfatos de calcio en el material, antes de ser implantado como prótesis de hueso, lo que mejora y también reduce el periodo de convalecencia del paciente tal y como ha sido reportado [46], [49].

Con el fin de estimar la fuerza iónica del SBF, se redujo la concentración a 1SBF y se realizó el experimento con los mismos tratamientos por un periodo de 30 días. De tal manera, tal y como se esperaba, la tasa de nucleación disminuyó, debido a la concentración iónica del suero y por consecuencia los resultados de este experimento deben además de arrojar una idea del periodo de convalecencia del paciente en un implante de hueso, si es implantado posterior a los tratamientos alcalinos.

En la imagen 3.17 se presenta la difracción de rayos-X de las muestras con los tratamientos alcalinos de NaOH, KOH y $Ca(OH)_2$ descritos en la sección 2.5 del capítulo de Metodología de esta tesis, seguidos de inmersión en 1SBF durante 30 días, en color negro la aleación $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$ rodada sin tratamientos alcalinos. Las barras de color azul son las posiciones de los principales picos de DRX que produce la hidroxiapatita [46]. En la figura, la difracción del tratamiento superficial con hidróxido de calcio se marcó con un círculo alrededor de 32° , este pico es característico de apatitas nucleadas en la superficie y en todos los tratamientos se encuentra presente, lo que quiere decir que todos los tratamientos permiten su crecimiento. Pero en la misma figura también es claro que el pico más intenso es el del tratamiento de $Ca(OH)_2$, sugiriendo entonces que éste presenta una tasa de

nucleación mayor con respecto a los demás tratamientos cuando es sumergido en 1SBF. De tal manera que este es un resultado muy importante si se considera que el tiempo de convalecencia debe disminuirse en aplicaciones biomédicas con implantes de hueso, lo que sugiere que el tratamiento con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ lo lograría en un tiempo menor. En los tratamientos de 1M de KOH y NaOH se presentó un pico a los 22° el cual no se encuentra reportado en la literatura posiblemente fue inducido por esfuerzos durante el proceso de rolado.

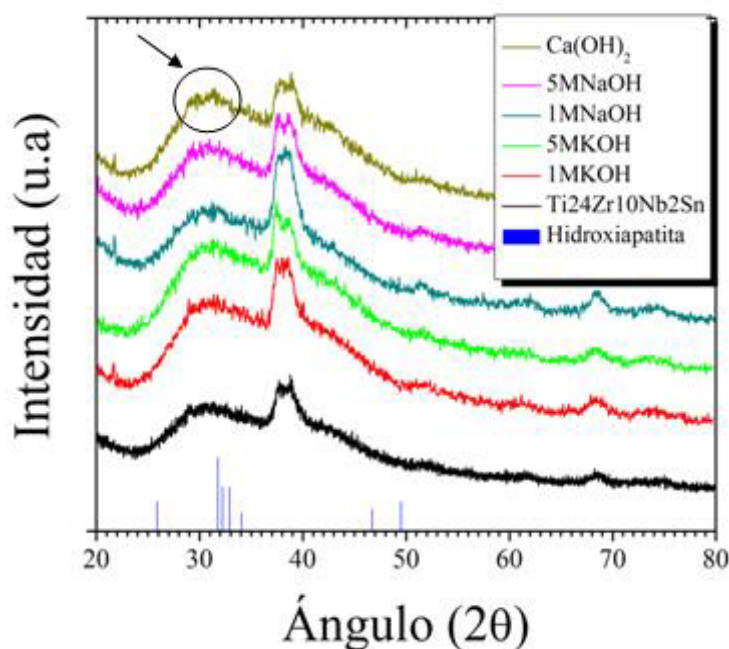


Figura 3.17: Difracción de rayos-x de la muestra $\text{Ti}_{24}\text{Zr}_{10}\text{Nb}_2\text{Sn}$ después de diferentes tratamientos NaOH, KOH y $\text{Ca}(\text{OH})_2$, seguido de inmersión en 1SBF por 30 días.

A partir de estos resultados se puede entonces elucidar que la aleación $\text{Ti}_{24}\text{Zr}_{10}\text{Nb}_2\text{Sn}$ es bioactiva *in-vitro* con 1SBF y que se pueden generar recubrimientos de

apatita en tiempos menores a 30 días utilizando el método propuesto por Kokubo para predecir su bioactividad *in-vivo*.

3.2.2 Microscopía de Barrido de Electrones (SEM).

El análisis de SEM es una de las principales técnicas para estudiar el comportamiento superficial cuando se desarrollan pruebas *in-vitro* de bioactividad como en procesos biomiméticos. En esta sección se presentan los resultados de microscopía SEM de las muestras que se modificaron superficialmente con los tratamientos 1 y 5M de NaOH, KOH y el tratamiento con Ca(OH)_2 supersaturado seguidas de inmersión en SBF con el propósito de conocer la morfología de los fosfatos nucleados.

En la figura 3.18 se presentan imágenes de SEM de los tratamientos alcalinos en a) 1M de NaOH y en b) 5M de KOH después de inmersión en 1.5 SBF por 30 días. Como se puede apreciar, el tamaño de los precipitados de apatita es alrededor de 10 μm y su morfología es muy homogénea, teniendo formas esferoidales parecidas a piedras de río, que es la morfología característica de la hidroxiapatita (HAP). Por otra parte, el tratamiento alcalino con 1M de NaOH mostró grietas superficiales, las cuales fueron marcadas con una flecha de color negro como se observa en la figura 3.18 a). La presencia de estas grietas puede resultar en la degradación y delaminación de la capa de fosfatos de calcio [87]. En ambos tratamientos se observa la superficie de la aleación totalmente cubierta con una capa

homogénea de estos precipitados. Esto se corrobora con los resultados obtenidos con la técnica de DRX mostrados anteriormente.

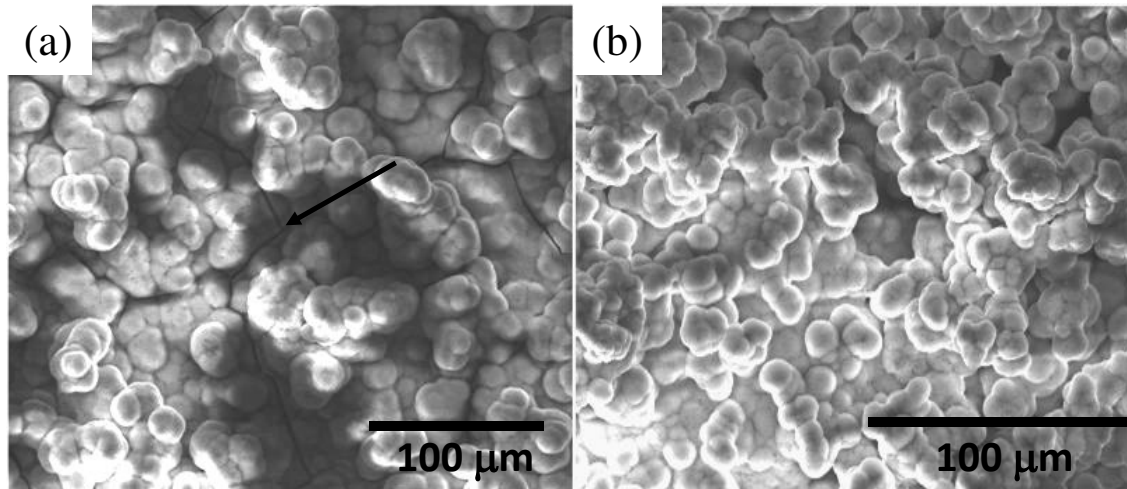


Figura 3.18: Imágenes SEM de la superficie los tratamientos en a) 1M de NaOH y en b) 5M KOH seguidos de inmersión en 1.5SBF por 30 días, la línea negra marca grietas superficiales de los precipitados.

En la figura 3.19 se muestran imágenes de SEM del tratamiento con 1M de KOH después de ser sumergidas en 1.5SBF por 30 días. Aquí se observa la superficie de la aleación cubierta con una capa de fosfatos de calcio. En este caso los precipitados encontrados midieron en promedio 4 μm y su morfología es distinta a la mostrada anteriormente, ya que los precipitados parecen adquirir forma de esferulita polimérica como se puede observar en la figura 3.19 b) la cual representa un aumento de la superficie marcada con un círculo negro en a). En este tratamiento se encontraron grietas en la superficie, las que pueden haber aparecido durante el proceso de secado posterior al tratamiento alcalino, lo cual está de acuerdo a lo reportado en la literatura [58].

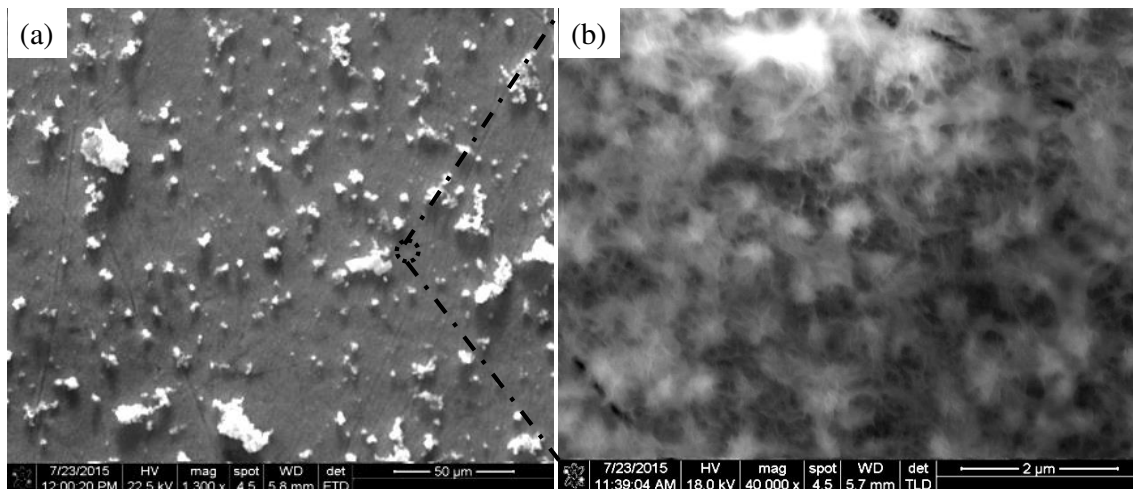


Figura 3.19: Imágenes SEM de la muestra $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$ en a) después del tratamiento 1M de KOH y seguido de inmersión en 1.5SBF por 30 días y en b) es la superficie aumentada en el área que marcada con el círculo.

En la figura 3.20 se muestran imágenes de SEM del tratamiento con 5M de NaOH después de ser sumergidas en 1.5SBF por 30 días. La figura 3.20 b) es un aumento de la superficie marcada con un círculo negro en a). Claramente se observa una capa homogénea de apatita sobre la superficie de la muestra en donde los precipitados son en promedio de $2\mu m$. La morfología de la capa de los fosfatos de calcio corresponde a la reportada en la literatura para la hidroxiapatita como se observa en c) en la esquina superior derecha de la figura 3.20, la cual es un aumento de la superficie marcada con un círculo en la imagen b). Y al igual que las anteriores parecen esferulitas formadas por brazos o barras más pequeñas, además se encontraron grietas superficiales. Estos resultados corroboran los resultados obtenidos por DRX. Al realizar un acercamiento a los precipitados, se observa que estos se

forman de pequeñas barras o nanobarras entre cruzadas, que de espesor miden alrededor de los 10 nm y de largo pueden medir hasta los 200 nm.

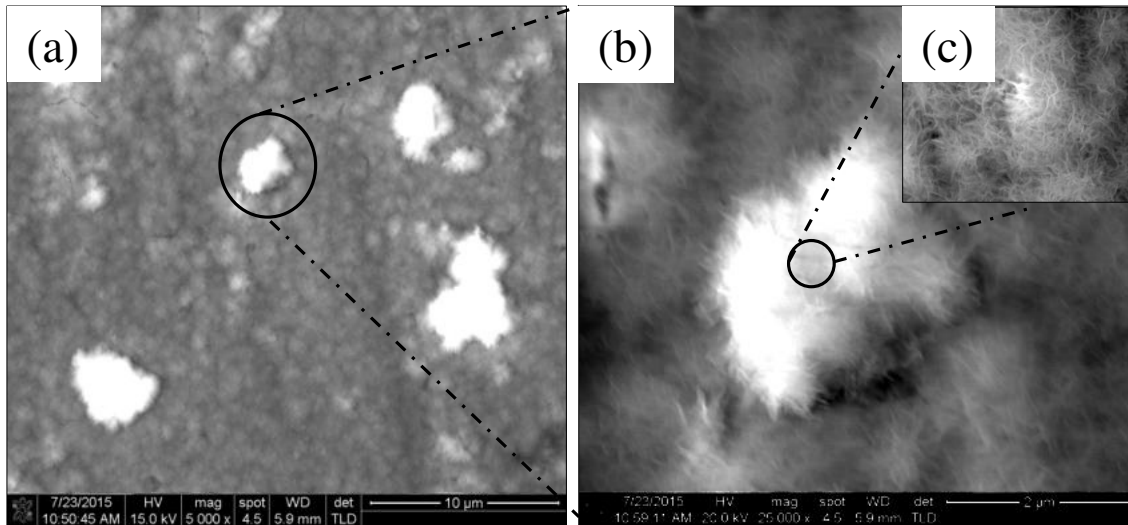


Figura 3.20: Imágenes SEM de la muestra de Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn en a) después del tratamiento 5M de NaOH, seguido de inmersión en 1.5SBF por 30 días ,las imágenes b) y c) es la superficie aumentada en el área que marca el círculo negro.

En la figura 3.21 se muestran imágenes de SEM del tratamiento con Ca(OH)₂ después de ser sumergidas en 1.5SBF por 30 días. En este tratamiento se encontró una capa homogénea de fosfatos de calcio en la superficie, la figura b) es la superficie aumentada en el área que marca el círculo negro, los precipitados miden en promedio 2 µm. También en este tratamiento se encontraron grietas en la superficie marcadas en la figura 3.21 a) con flechas negras, las cuales causan una unión débil del recubrimiento de fosfato de calcio con la superficie de la aleación [87]. La morfología de este fosfato de calcio corresponde a la morfología reportada para la hidroxiapatita, y está formada de núcleos parecidos a las

esferulitas de los polímeros. Al igual que en las anteriores imágenes, éstas se conforman de nanobarras entrecruzadas.

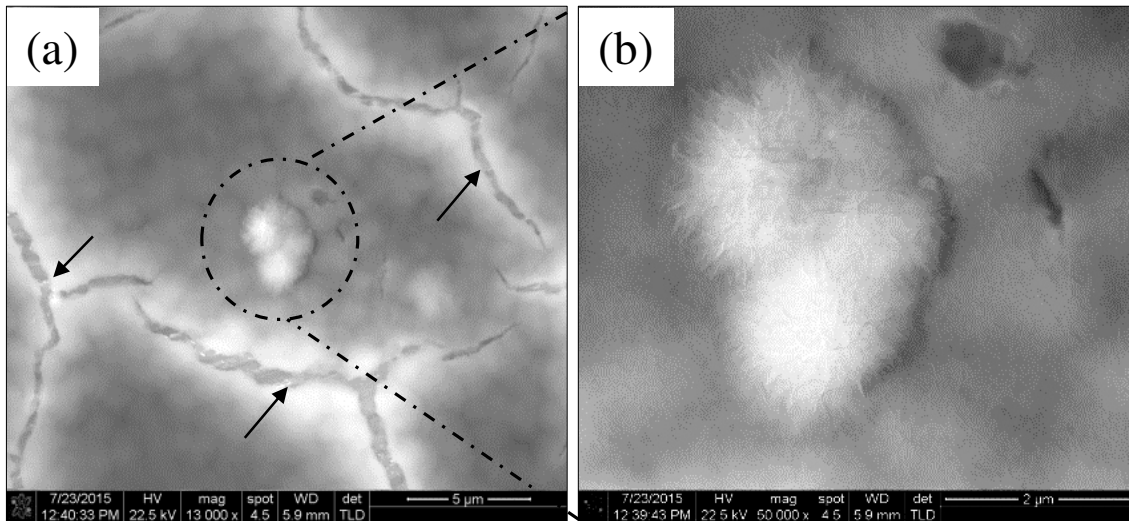


Figura 3.21: Imágenes SEM de la muestra de Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn en (a) después del tratamiento Ca(OH)₂, seguido de inmersión en 1.5SBF por 30 días y (b) es la superficie aumentada en el área que marca el círculo negro.

3.2.3 Espectroscopia de rayos-X de energía dispersiva (EDAX).

Con el fin de conocer la composición elemental de los fosfatos de calcio nucleados en la superficie después de los tratamientos alcalinos con NaOH, KOH ó Ca(OH)₂ seguido de inmersión en 1.5SBF por 30 días, se realizó análisis elemental semi-cuantitativo

superficial mediante espectroscopia de rayos-X de energía dispersiva (EDAX) en un microscopio electrónico de barrido.

La Figura 3.22 presenta los resultados EDAX de los tratamientos en a) 1M de KOH y en b) 1M de NaOH. En este análisis elemental se encontró que la composición de la superficie analizada consta principalmente de elementos como el Ca, P y O, y en menor cantidad se encontraron elementos como el Na, Mg y Cl correspondientes a los minerales que componen el hueso humano [88]. En ambos tratamientos no se detectaron las componentes superficiales de la composición elemental de la aleación como Ti, Zr, Nb ó Sn, esto quiere decir que la superficie se encuentra totalmente recubierta de minerales como fósforo y calcio en mayor cantidad, y que es lo suficientemente gruesa para impedir la interacción del haz de electrones con la aleación. Lo que corrobora los resultados de DRX de la figura 3.13, en la que no se detectaron los picos de la fase α'' y β característicos de la aleación Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn mostrados en la figura 3.12. Es decir, la capa de material que creció, es también de un espesor que impide que los rayos x penetren hasta la aleación, lo que sugiere la formación entonces de una capa homogénea de apatitas en la superficie.

Por otro lado es importante resaltar que la composición química así como la estructura cristalográfica de los fosfatos de calcio nucleados en la superficie puede variar, por lo que se calculó la relación de Ca/P, tomando en consideración que los fosfatos de calcio (CaP's) son fácilmente distinguibles en EDAX así como en DRX, este cálculo da una idea de su composición química. En el tratamiento de 1M de KOH se encontró una relación promedio

de Ca/P de 1.62 y en el tratamiento de 1M de NaOH la relación fue de 1.61, y dichos valores son muy aproximados a la relación que conserva la hidroxiapatita de 1.65 [89].

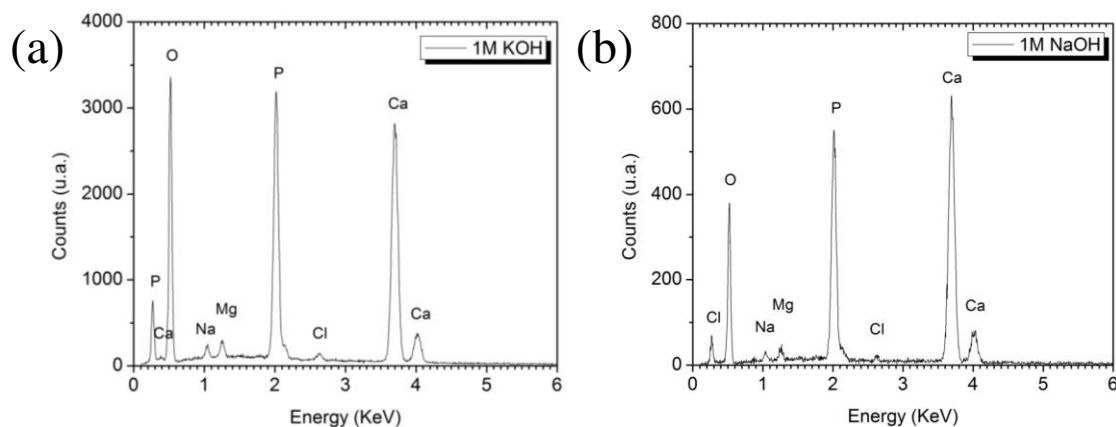


Figura 3.22: Análisis elemental EDAX de los tratamientos en a) 1M de KOH y en b) 1M de NaOH después 30 días de inmersión en 1.5SBF.

En la Figura 3.23 y 3.24 se presenta el análisis elemental EDAX de los tratamientos de 5M de NaOH, 5M de KOH y $\text{Ca}(\text{OH})_2$ respectivamente. Los resultados son muy similares a los discutidos anteriormente, es decir, el análisis elemental muestra que la composición de la superficie analizada consta principalmente de Ca, P, O y en menor proporción elementos como Na, Mg y Cl, lo cual corresponde a minerales que componen el hueso humano [88]. De la misma manera que en los tratamientos con concentraciones de 1M, no se detectaron elementos de Ti, Zr, Nb o Sn en la superficie como se muestra en la figura 3.22. Lo que indica la formación de una capa también suficientemente gruesa y homogénea que impide la difracción de la aleación. Y a su vez también concuerda con los resultados de DRX de estos

tratamientos de la figura 3.14 y 3.15 en la que no se detectaron picos característicos de la fase α'' y β de la aleación Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn.

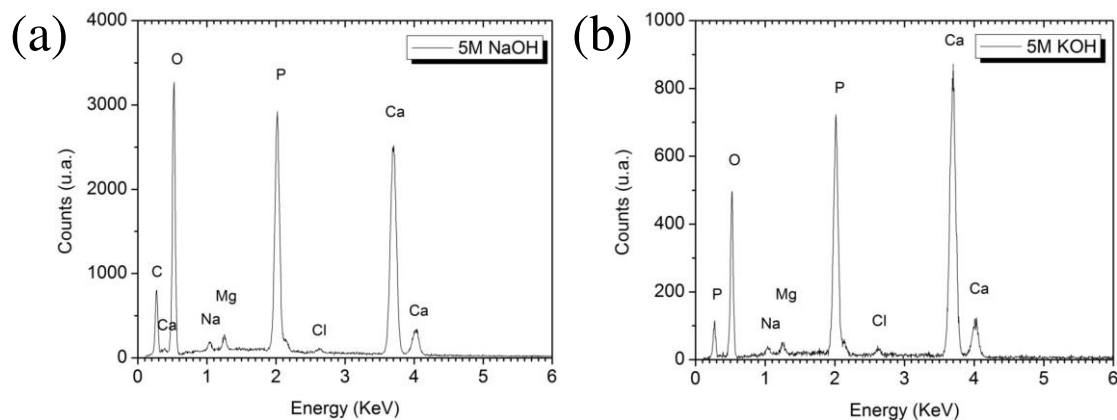


Figura 3.23: Análisis elemental EDAX de los tratamientos en a) 5M de NaOH y en b) 5M de KOH ambos después de 30 días de inmersión en 1.5SBF.

De la misma manera que en los tratamientos anteriores se calculó la relación de calcio fosforo (Ca/P) para el tratamiento de 5M NaOH y fue 1.63. Para el tratamiento de 5M de KOH fue de 1.67, es decir están muy próximas a la relación que guarda la hidroxiapatita, mientras que para el tratamiento de Ca(OH)₂ se obtuvo una relación de 1.54, sugiriendo la formación de hidroxiapatita deficiente de calcio. Ya que la hidroxiapatita es termodinámicamente más estable que la hidroxiapatita deficiente de calcio, podría esperarse para este último tratamiento que con más días de inmersión del tratamiento en SBF se llegase a formar hidroxiapatita con su relación correcta de Ca.

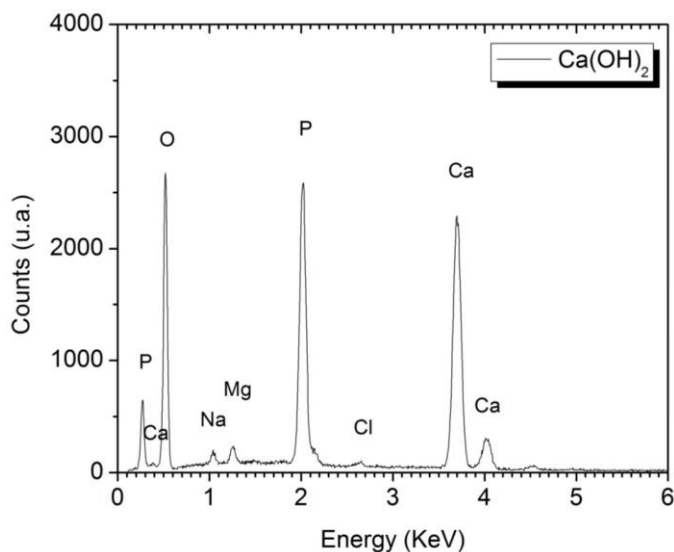


Figura 3.24: Análisis elemental EDAX del tratamiento Ca(OH)_2 seguido de inmersión en 1.5 SBF por 30 días.

Los resultados del análisis elemental superficial EDAX de cada uno de los tratamientos anteriores, fueron resumidos en la Tabla VI que se muestra a continuación. En ésta se presenta el promedio de tres mediciones superficiales de la razón de Ca/P %at. de cada uno de los tratamientos. En la tabla se encuentran vacíos algunos campos que corresponden al tratamiento con Ca(OH)_2 , ya que de acuerdo a la literatura el tratamiento con una solución supersaturada de hidróxido de calcio permite mayores concentraciones de iones calcio en la superficie de la aleación, por lo que solo se utilizó la concentración supersaturada de hidróxido de calcio a 0.185g/100cm³. La relación de calcio fosforo de los tratamientos alcalinos con concentración de 5M fueron de 1.63 y 1.67, los cuales están muy próximo a 1.65 que corresponde a la relación que conserva la hidroxiapatita, que es el principal constituyente del hueso humano. En los tratamientos con concentración de 1M se encontró una relación de Ca/P de 1.61 y 1.62 y estos valores son ligeramente menores a los obtenidos con concentraciones de 5M. Pero en general estos resultados conservan buena relación de

calcio fosforo. Como ya se mencionó anteriormente solo el tratamiento con hidróxido de calcio fue el que obtuvo la menor relación de 1.54, lo que corresponde a una hidroxiapatita deficiente de calcio [46]. Con estos resultados podemos concluir que los tratamientos son efectivos para generar sitios activos de nucleación de fosfatos de calcio en la superficie de la aleación Ti24Zr10Nb2Sn, los cuales pueden servir para generar crecimientos biomiméticos en la superficie con aplicaciones potenciales en áreas biomédicas como prótesis óseas.

Tabla VI. Razón promedio de Ca/P obtenido mediante EDAX en cada uno de los tratamientos después de inmersión en 1.5SBF por 30 días.

	Concentración		
	1M	5M	0.185g/100cm ³
NaOH	1.61	1.63	---
KOH	1.62	1.67	---
Ca(OH) ₂	----	----	1.54

La tabla VII muestra un resumen de las características morfológicas de cada película obtenida a partir de lo encontrado desde la figura 3.18 hasta la figura 3.21. Así se puede observar claramente que los tratamientos alcalinos tienen un efecto en la morfología de los fosfatos de calcio nucleados en la superficie de la aleación. De acuerdo a los resultados obtenidos por Kokubo y colaboradores, en sus estudios de bioactividad en aleaciones de titanio es aceptado que los iones sodio y potasio de radio iónico 0.95Å y 1.33Å

respectivamente se encuentran en las capas de óxido (Titanato de sodio) formadas por los tratamientos alcalinos de la superficie metálica. Estos iones se intercambian por iones hidronio presentes en el SBF, los que a su vez cambian el PH superficial y da origen a la formación de fosfatos de calcio superficiales como se explicó en la sección 1.4 de la Introducción de esta Tesis. De acuerdo a los resultados obtenidos este mecanismo podría explicar la bioactividad de las muestras evaluadas.

Tabla VII. Características superficiales de los precipitados obtenidos en las muestras después de algún tratamiento alcalino y posterior inmersión en SBF por 30 días.

	Morfología	Diámetro (μm)	Tipo de fase	Grietas superficiales
1M NaOH	Esferoidal	10	HAP	Si
1M KOH	Esferulita	4	HAP	Pocas
5M NaOH	Esferulitas	2	HAP	Pocas
5M KOH	Esferoidal	10	HAP	No
Ca(OH) ₂	Esferulitas	2	HAP deficiente de calcio	Si

Después de la inmersión de las muestras en SBF algunos tratamientos presentaron grietas en las capas de fosfatos de calcio superficiales como se marcó en la tabla II. Esto es atribuido al tiempo de inmersión en agua destilada utilizado para limpiar las muestras después del tratamiento alcalino, como se comentó anteriormente las grietas provocan la

delaminación de los baños y degradación, por lo que podemos decir que los mejores tratamientos en base a las grietas superficiales son: 5M KOH, 5M de NaOH y el tratamiento de 1M de KOH.

El tipo de fase presente después de los tratamientos de acuerdo a su relación de Ca/P fue similar en todo los tratamientos excepto en el de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ el cual presentó una relación de 1.54 que corresponde a una Hidroxiapatita deficiente de calcio. Hyun-Min kim y colaboradores demostraron que el tiempo de inmersión de las muestras en el suero SBF cambia drásticamente esta relación [89]. Por lo que sería necesario un estudio más detallado de la relación de Ca/P en función del tiempo de inmersión para para este tratamiento superficial, los tratamientos Con NaOH y KOH presentaron una fase similar a la hidroxiapatita alrededor de 1.67.

3.3 Capacidad de la aleación Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn para producir nano estructuras: Anodización como ruta para mejorar la biocompatibilidad y bioactividad.

La anodización es una ruta para incrementar la biocompatibilidad y bioactividad del Ti y sus aleaciones, ya que este proceso permite la formación de nanoestructuras de óxido en la superficie metálica, y estas estructuras tienen la capacidad de aumentar la tasa de nucleación de fosfatos de calcio y mejorar la viabilidad celular [67], Además sirven como una plataforma de liberación local de fármacos directamente en el sitio del implante como se observa en la figura 3.25, esto previene la incidencia de infecciones por bacterias. Algunos

investigadores han encontrado que baños de polímeros biocompatibles sobre las nanoestructuras pueden aumentar el tiempo de liberación del fármaco cuando es inmerso en soluciones salinas [90]–[92]. Debido a esto, es importante estudiar la capacidad de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn para producir estas nanoestructuras tubulares en la superficie por el método de oxidación anódica a potencial constante.

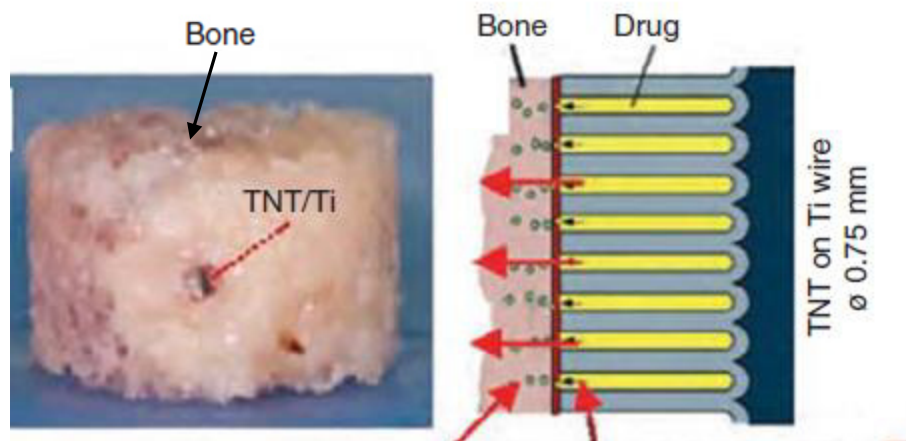


Figure 3.25. Implante en hueso de Titanio con nanoestructuras tubulares (TNT/Ti) cargado con droga [92].

En la figura 3.26 a) - h) se presentan imágenes de microscopía por SEM perpendiculares y transversales a la superficie de las placas de Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn después del proceso de oxidación anódica. El proceso se llevó a cabo en 1M de (NH₄)₂SO₄ con adición de 0.25M NH₄F anodizadas a un potencial constante de 15, 20, 25 ó 30V por un periodo de tiempo de 30 minutos. Las placas anodizadas a un potencial de 15V formaron una capa de nanoestructuras tubulares con un diámetro promedio de 48.6 nm y una longitud promedio de 2μm como se observa en la figura 3.26 a) y b). Las placas que fueron anodizadas con un

potencial de 20V se muestran en la figura 3.26 c) y d), también formaron nanoestructuras tubulares con un diámetro promedio de 72.9nm y una longitud promedio de 3.4 μ m. Las placas que fueron anodizadas con un potencial de 25V, formaron nanoestructuras tubulares con un diámetro promedio de 100nm y una longitud promedio de 4.3 μ m como se aprecia en la figura 3.26 e) y f). Por último, en las placas que fueron anodizadas con un potencial de 30V, se observó en la figura 3.26 g) y h) que el diámetro promedio de los nanotubos fue de 122.53 nm y su longitud promedio fue de 5.5 μ m. Lo anterior demuestra que es factible formar nanoestructuras tubulares en la superficie de la aleación Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn, además que al incrementar el potencial de anodización, el diámetro y la longitud de los nanotubos se incrementa, por lo que el potencial de anodización sirve como un parámetro de control en la construcción de estas nanoestructuras tubulares.

Por otro lado, cabe hacer notar, que los nanotubos durante la anodización a 25 y 30V, se arreglaron irregularmente (ver figura 3.26 e) y g)). Es claro que los nanotubos grandes en la superficie de Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn, fueron rodeados por un grupo de nanotubos con diámetro más pequeño de alrededor de 70nm, haciendo especies de racimos de ocho, once o trece nanotubos para la anodización de 25V y siete u ocho nanotubos a potenciales de 30V.

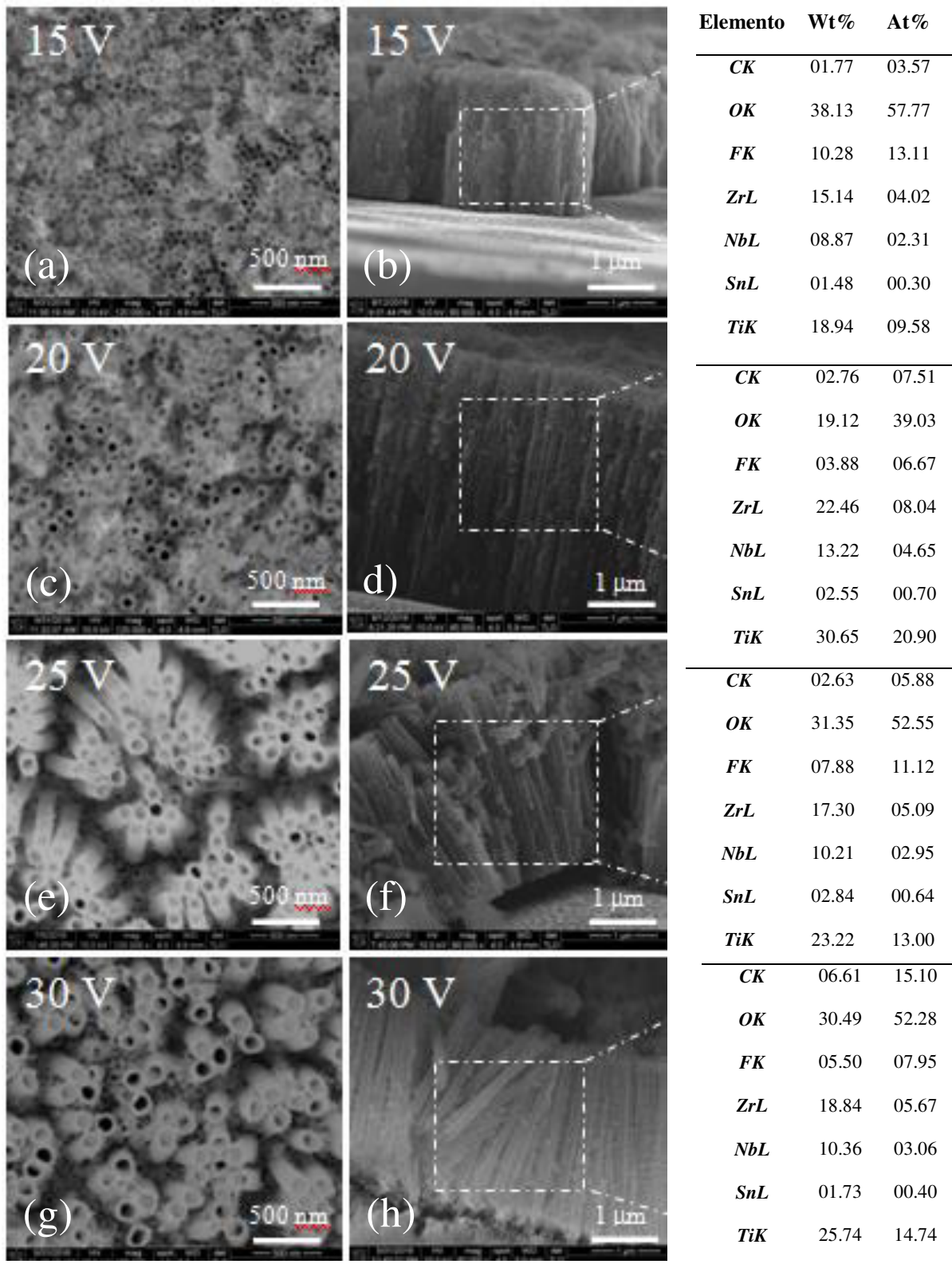


Figura 3.26. Imágenes SEM superficiales y transversales de las muestras anodizadas a 15, 20, 25 y 30 V y su composición elemental.

Con la finalidad de comprobar la relación existente entre el voltaje de anodización y las dimensiones de los nanotubos, se graficó el diámetro y la longitud de estos vs voltaje de anodización. La figura 3.27 a) muestra la dependencia del diámetro de los nanotubos contra el potencial de anodización, y resulta clara una dependencia positiva y lineal entre el diámetro y el rango de 15 a 30V de potencial aplicado. Esta relación de crecimiento tiene una pendiente de 4.33 nm de diámetro/V, con esta relación resulta fácil construir el diámetro del tubo deseado en función del voltaje.

Por otro lado, el largo de la capa que forman los nanotubos también puede ser controlado por el potencial aplicado. Como se muestra en la figura 3.27b) existe una relación lineal positiva, el largo de los nanotubos se incrementó desde alrededor de 2100 a 5500nm cuando el potencial aplicado se incrementó de 15 a 30V por un tiempo de 30 minutos de anodización. La pendiente del crecimiento de la longitud en función del voltaje de anodización es de 225.7 nm de longitud/V.

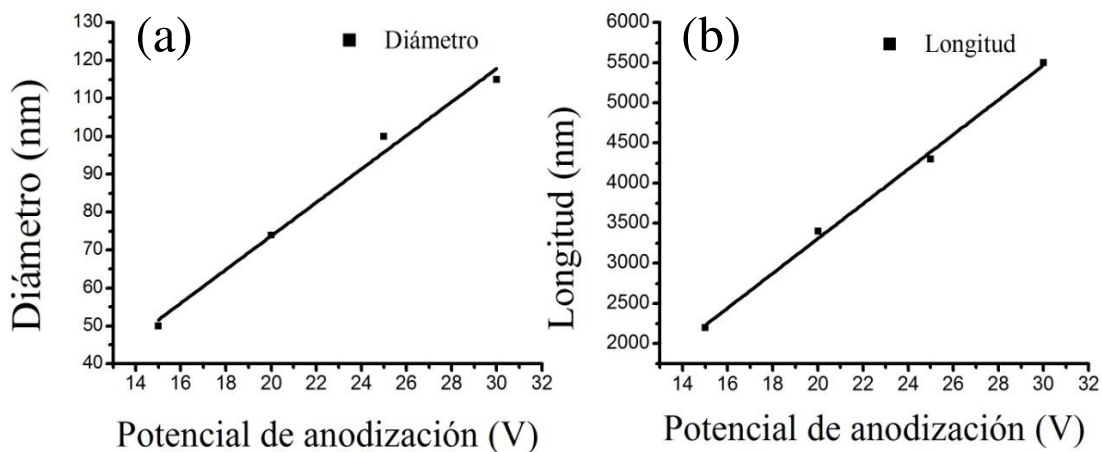


Figura 3.27. Variación en el diámetro en a) y longitud b) de los nanotubos formados sobre $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$ como función del potencial de anodización.

Un factor importante a determinar en este tipo de superficies, es la densidad de nanotubos por unidad de área, ya que esto permite, tener una idea de la cantidad de producto que se pueda dosificar, por lo que se prosiguió a medirla. Con los datos anteriores y las imágenes de SEM, se pudo determinar una densidad de tubos por unidad de área en la superficie de cada una de las placas anodizadas como se observa en la figura 3.28. Los resultados de dicho análisis indican que a un potencial de 15V la densidad fue de 80 nanotubos/ μm^2 , a un potencial de 20V fue de 40 nanotubos/ μm^2 , aplicando 25V se obtuvieron 25 nanotubos/ μm^2 y para un potencial de 30V fue de 20 nanotubos/ μm^2 . La disminución en la densidad se debe a que al aumentar el potencial, el diámetro y la longitud de algunos de los nanotubos crecen en detrimento de otros nanotubos que se quedan más pequeños, formando las especies de racimos de las figuras 3.25 a 20 y 25 Volts, en donde se aprecia que los nanotubos que crecieron están enfocados y al fondo, fuera de foco de la imagen, se

aprecian los más pequeños que ya no pudieron crecer más por falta de material. Estos espacios creados disminuyen considerablemente la densidad.

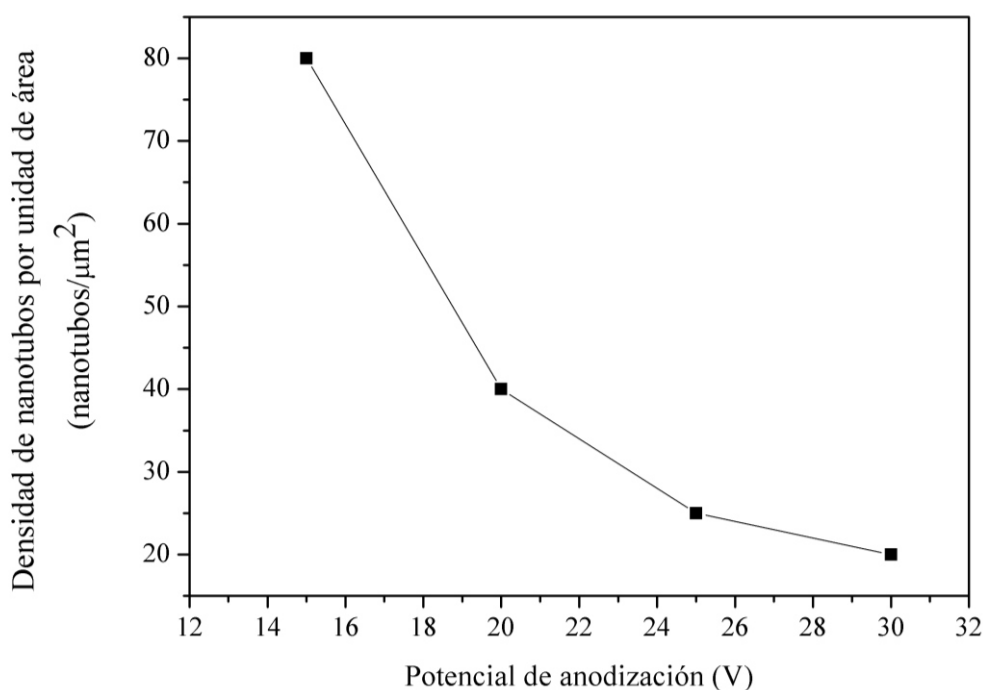


Figura 3.28. Densidad de nanotubos por unidad de área de los nanotubos formados sobre Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn como función del potencial de anodización.

Por otra parte, en las caras laterales de las tres placas anodizadas también se observó el crecimiento de estructuras nano tubulares como se ilustra en la figura 3.29 a). En la figura 3.29b) se muestra un aumento del área marcada con un círculo negro, la línea amarilla marca la arista de la muestra anodizada. Esto indica que el método de anodización a potencial constante produce nanoestructuras en toda la superficie del material lo cual es de gran utilidad para cubrir en su totalidad la superficie de implantes de hueso y obtener una respuesta

homogénea del sistema vivo debido a la interacción física y química de la interface. Además estas estructuras pueden ser cargadas con fármacos y tener una liberación local en el sitio del implante. Debido a esto la superficie con mayor densidad de nanotubos por unidad de área y con mayor volumen pueden tener más capacidad de carga de fármacos.

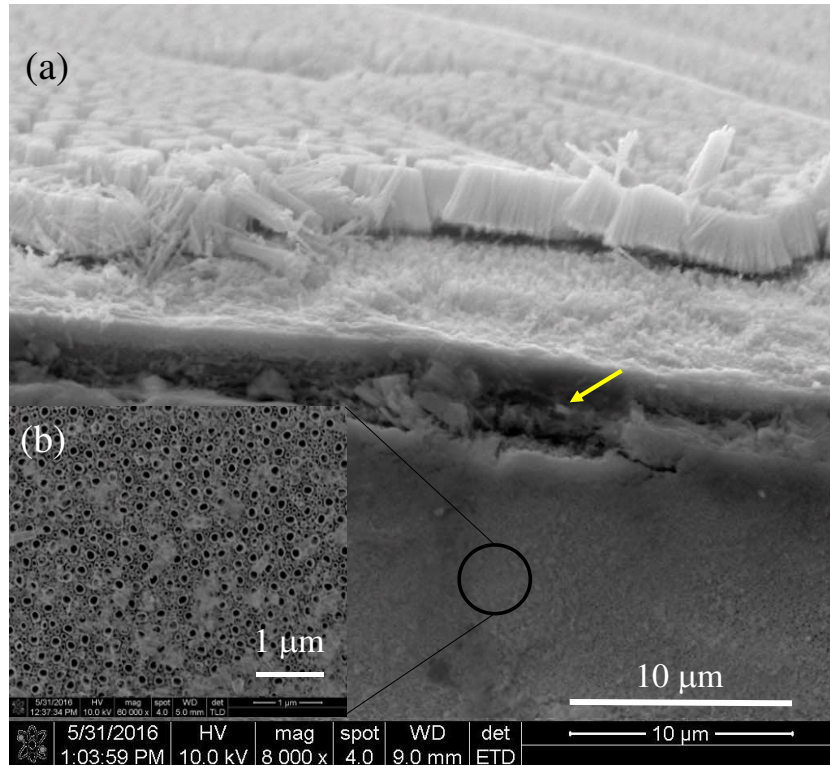


Figura 3.29. Microscopía SEM en a) se muestra la cara lateral de la muestra anodizada a 30V, la imagen b) es un aumento del área marcada con un círculo negro, la línea amarilla apunta a la arista de la muestra.

En la figura 3.30 se presentan las corrientes contra el tiempo registrado durante el proceso de anodización a 15, 20, 25 y 30V. En las cuatro muestras se observó un decaimiento exponencial hasta estabilizarse en aproximadamente 22mA. A diferencia de las muestras de

15, 20 y 25V, la muestra anodizada a 30V presentó un máximo aproximadamente a los 350s, este punto indica el crecimiento de nanoestructuras tubulares, y se puede observar con potenciales altos como se reporta en aleaciones TiNbSn [64].

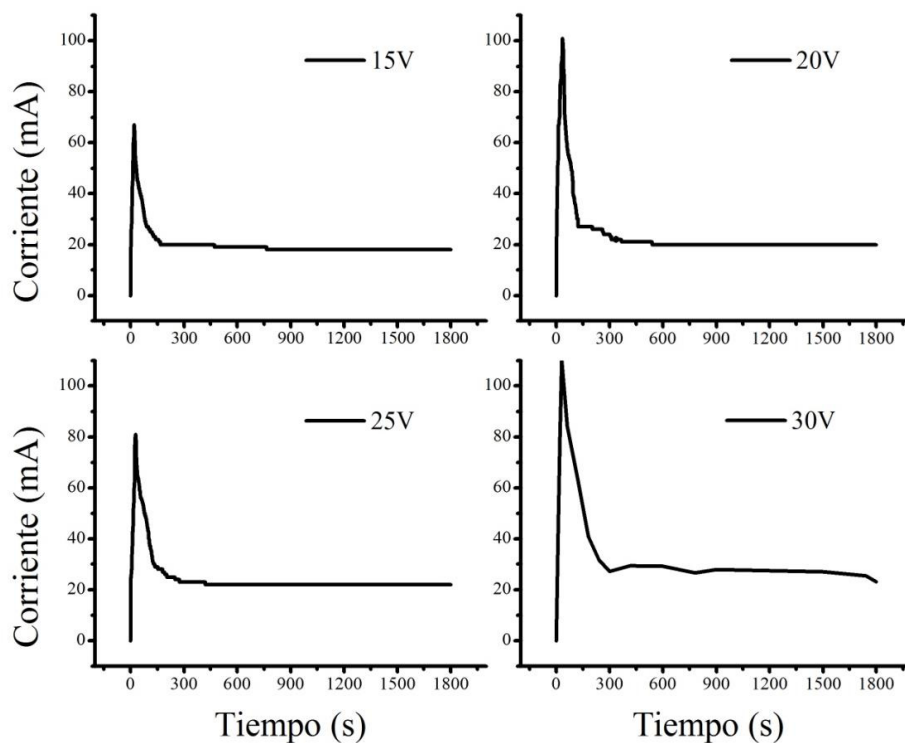


Figura 3.30. Densidad de corriente contra el tiempo de las muestras anodizadas con potenciales constante de 15, 20, 25 and 30V.

El mecanismo de crecimiento de los nanotubos se puede explicar de la siguiente manera. Durante el proceso de anodización la densidad de corriente inicia con un decaimiento exponencial lo cual es atribuido a la formación de una capa de óxido compacto como se describe en la figura 3.31 a). En este punto la superficie es localmente activada y se empiezan a formar poros aleatoriamente.

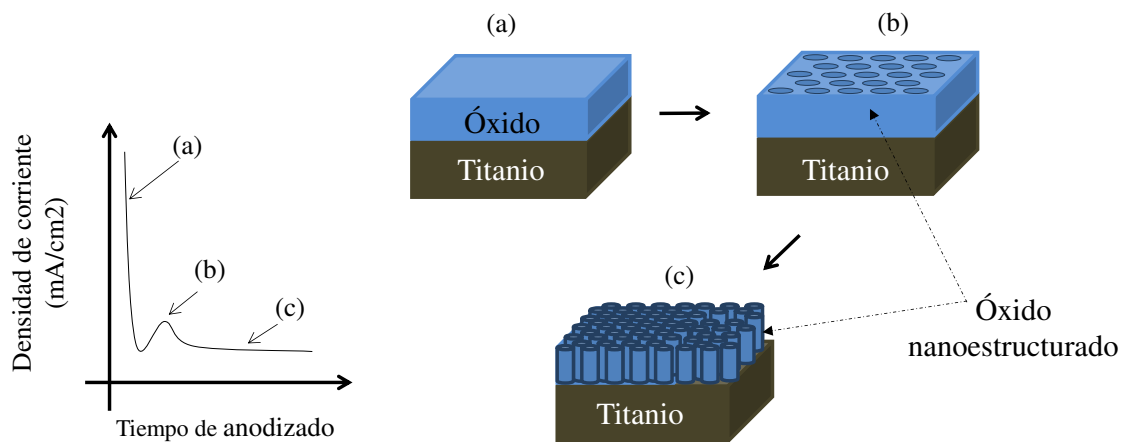


Figure 3.31 Diagrama que relaciona la densidad de corriente con la evolución superficial durante el proceso de anodización a) formación de una capa de óxido, b) Formación de poros sobre la capa de óxido, c) crecimiento de los poros en nanotubos.

Debido al crecimiento de los poros, el área superficial se incrementa resultando en un incremento en la densidad de corriente eléctrica, ver figura 3.31 b). A partir de ahí, los poros que comienzan a crecer, interfieren entre si y la densidad de corriente disminuye hasta alcanzar un valor estable y una estructura auto-ordenada continua, creciendo con respecto del tiempo como en la figura 3.31 c) [93], [94]. Este comportamiento se atribuye a la formación de nanoestructuras en la superficie de algunos metales como Ti , Zr [94], y aleaciones como Ti₂₁Nb₁₁Sn [64], Ti₂₈Zr₈Nb [95], Ti₃₅Nb(5-15)Zr [96] , TiNi [65].

Como resultado general en este punto se puede resumir que la anodización de la aleación Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn a potencial constante desarrolla nanoestructuras tubulares y el crecimiento puede ser controlado de una forma lineal con el potencial aplicado. De acuerdo

a la literatura estas superficies pueden potenciar las propiedades superficiales de biocompatibilidad y bioactividad en futuras aplicaciones médicas.

3.3.1 Capacidad de nanoestructuras tubulares de TiZrNbSn-O para liberación local de fármacos: superficie anti-infecciones.

La aplicación de antibióticos sistémicos puede causar toxicidad y baja biodisponibilidad (concentración en el sitio de infección), por lo que algunas superficies de titanio biocompatibles con arreglos nanotubulares han sido evaluadas como un mecanismo de liberación local de antibiótico en el sitio del implante. Debido a esto, se requiere tener el control preciso de la longitud y el diámetro del nanotubo, ya que esto puede permitir que cantidades diferentes a tasas diferentes de droga sean liberadas en el sitio del implante. En esta sección se estudia la liberación de fármaco de las diferentes nanoestructuras obtenidas con los potenciales de 15, 20 y 25V. Las muestras anodizadas a 30 V no fueron presentadas en este punto ya que presentaban un comportamiento distinto al resto, la capa de óxido generado en la superficie se desprendía con facilidad cuando eran manipuladas en el laboratorio por lo que se decidió recubrirla con quitosan para estabilizar la capa de óxido en el sustrato metálico los resultados se muestran en la siguiente sección. Como se comentó en el capítulo 2, la droga empleada en la carga de los nanotubos fue la gentamicina, que es un antibiótico aminoglucósido usado comúnmente para tratar algunos tipos de infecciones bacteriales. Las muestras fueron inmersas en una solución de fosfatos similar al plasma

extracelular, la liberación se cuantificó midiendo la absorbancia de la solución a diferentes tiempos.

En la imagen 3.32 se presenta la absorbancia contra el tiempo medida en cada una de las muestras anodizadas a 15, 20 y 25V. La línea negra es una aproximación o tendencia de la mayoría de los puntos. La curva etiquetada como control se utilizó como referencia y tal y como se comentó en secciones anteriores, esta muestra solo tenía un pulido superficial con acabado espejo. En esta muestra, la lectura de la absorbancia registrada de 0-720 minutos se mantuvo constante alrededor de 0.002 ± 0.002 , muy aproximado a una línea recta. Este resultado sugiere que la superficie pulida no tiene la capacidad de cargar el fármaco por adhesión de fuerzas moleculares de la superficie con la droga, en esta superficie no se registra liberación de droga considerable. La muestra anodizada a 15V presenta una absorbancia máxima de 0.018 ± 0.001 que se mantiene aproximadamente después de los 200 minutos como se observa en la figura 3.32 Esto sugiere que si existe una carga de droga en los nanotubos de la superficie y una posterior liberación de la droga en la solución de fosfatos (PBS). La muestra anodizada a 20V liberó la mayor cantidad de droga en los primeros 200 minutos con absorbancias de 0.011 ± 0.001 y después de este punto continua liberando, pero con una tasa de liberación menor hasta llegar a un máximo 0.018 ± 0.002 de en el minuto 1400 aproximadamente. Podemos concluir que la superficie nanoestructurada si cargó la gentamicina, de lo contrario observaríamos una línea recta como en el control. En la muestra anodizada a 25V se observó una liberación máxima en los primeros 400 minutos con un valor de absorbancia promedio de 0.009 ± 0.001 . La absorbancia se mantuvo constante después de

los 400 minutos con un valor de en 0.010 ± 0.001 , indicando que la superficie nanoestructurada a este potencial también carga y libera el fármaco en la solución salina.

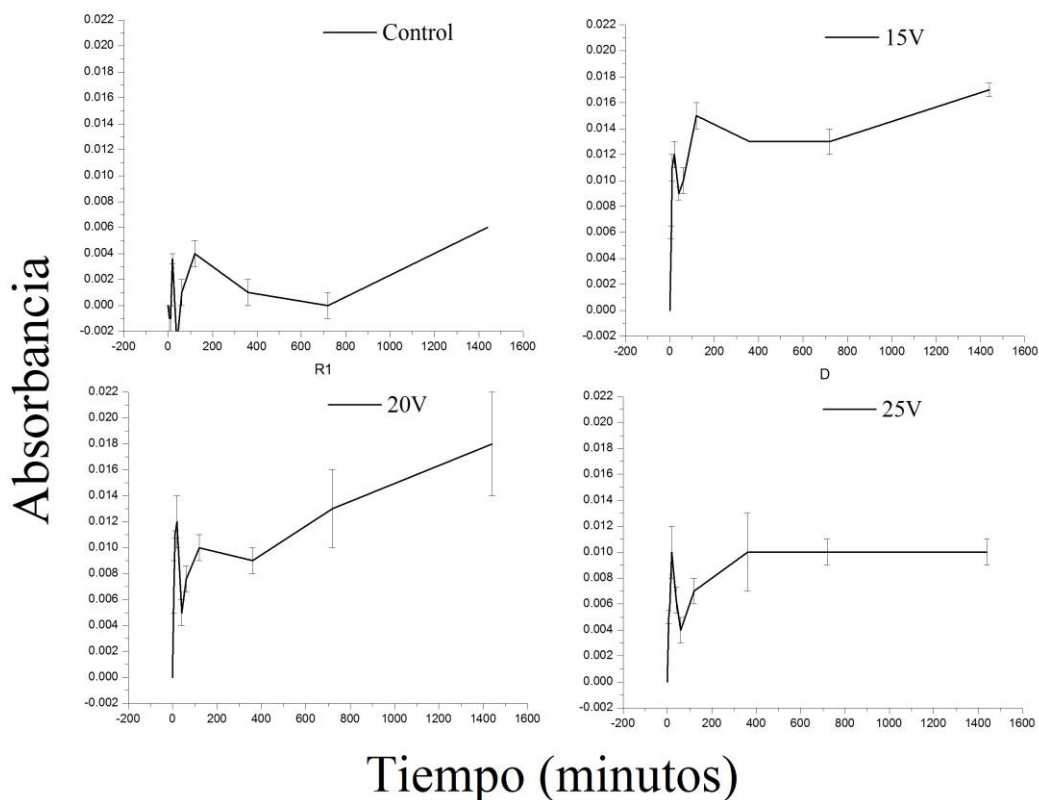


Figura 3.32. Capacidad de liberación de fármacos de las nanoestructuras anodizadas a diferentes voltajes 15, 20 y 25V y sin anodizar.

Estos resultados de carga y liberación de droga están en concordancia con los resultados reportados en la literatura, en donde se observa la misma tendencia exponencial durante el registro de la liberación en soluciones salinas [97]. También el diámetro y longitud juegan un factor importante, Ketul C. Popat y colaboradores en 2007 construyeron nanotubos de TiO_2 con diámetro de 80nm y con longitud de 400nm encontraron que pueden mantener

liberación de gentamicina por un periodo de 120 minutos [98], este periodo corresponde a los resultados que obtuvimos en este trabajo. El mismo grupo observó que cuando son cargados con diferentes moléculas como Albúmina de suero bovino o lisozima el tiempo de liberación de las proteínas en el suero se redujo[99]. Aumentando la longitud de los nanotubos aumenta el periodo de liberación, como lo demostró Karan Gulati y colaboradores [24]. Los mismos autores en 2012 proponen recubrir las nanoestructuras con diámetros de poro de 120nm y longitud de 50 μ m utilizando polímeros biocompatibles como PLGA (ácido poli(láctico-co-glicólico) o quitosán con el propósito de aumentar el tiempo de liberación del fármaco, en este estudio cargaron las nanoestructuras con Indometacina encontrando que la liberación se mantiene hasta por 11 días [91]. Podemos concluir que esta superficie de nanoestructuras que se obtuvo en Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn tiene un potencial alto en aplicación local de fármacos en el sitio del implante ya que mantiene una liberación por un periodo de tiempo mayor.

Es importante en este punto remarcar, que hay dos parámetros importantes en las nanoestructuras a regular para la liberación de fármacos:

1. La cantidad de carga, que está directamente relacionada con la morfología de la nanoestructura desarrollada, es decir, su diámetro, longitud y densidad de nanotubos.

2. El tiempo de liberación, que es la tasa de dosificación del fármaco en función del tiempo y se ha reportado que al aumentar el diámetro esta capacidad disminuye, o visto de otra forma, el fármaco se libera más rápido si el diámetro crece [31].

De tal manera que, se tiene que establecer un compromiso entre estos dos puntos, es decir entre la cantidad de carga y tiempo de liberación, o entre la morfología y el diámetro de los nanotubos. Para analizar con más claridad los datos morfológicos que impactan en la cantidad de carga, en la tabla VIII se presentan los datos de la densidad de nanotubos (nanotubos/ μm^2) y el volumen encerrado por las nanoestructuras por unidad de área (μm^3). Los resultados muestran que la menor capacidad de carga se presenta a 15v con $0.34\mu\text{m}^3$ y la mayor ($1.14\mu\text{m}^3$) la presentan las muestras anodizadas a 30V aún y cuando son las de menor densidad, pero el volumen de cada nanotubo es mayor. Estos datos son muy importantes desde el punto de vista de aplicación de las nanoestructuras, ya que se puede controlar la cantidad de fármaco en función del área de nanoestructura desarrollada.

Por otro lado, al establecer el compromiso del volumen y el tiempo de liberación (Figura 3.32), tal parece que las que presentan mejores condiciones de aplicación son las estructuras a 20 V y 15V, ya que son las que prolongan más el tiempo de liberación y tienen un mayor volumen de carga.

Tabla VIII. Datos de la densidad y el volumen encerrado por las nanoestructuras generadas a diferentes potenciales.

Potencial de anodizado (V).	Densidad de nanotubos (nanotubos/ μm^2).	Volumen encerrado por micrómetro cuadrado (μm^3).
15	80	0.34
20	40	0.56
25	25	0.82
30	20	1.14

3.3.2 Construcción de membranas inteligentes de TiZrNbSn-O/Quitosano

Como se comentó en la sección anterior, las muestras anodizadas a 30V se desprendían con facilidad durante su manipulación en el laboratorio. Esto dio pie a aprovechar esta inestabilidad del óxido superficial nanoestructurado para construir membranas compósito con polímeros biocompatibles, en una sola etapa, tal y como se mostrará a continuación.

El desarrollo de membranas con estructuras nanotubulares de óxido de titanio han llamado la atención debido a sus aplicaciones como sistemas de filtración, liberadores localizados de fármacos o como material fotocatalítico debido al TiO_2 . La mayoría de las membranas actualmente usadas para separación de partículas micrométricas en aplicaciones

bioquímicas están hechas de polímeros como poliacrilonitrilo o poliamida, o cerámicos tales como alúmina.

Con el objetivo de construir una membrana compósito con las nanoestructuras desarrolladas a 30V, las muestras fueron recubiertas con quitosano, que es un polímero biocompatible y biodegradable. En la figura 3.33, se observan imágenes transversales de la muestra anodizada a 30V de microscopía de barrido de electrones antes de recubrirlas con quitosano en a) y b) y c) es la vista TOP o perpendicular a la superficie. En la figura 3.33 d) se presenta la curva característica de la densidad de corriente contra el tiempo durante el procedimiento de oxidación anódica.

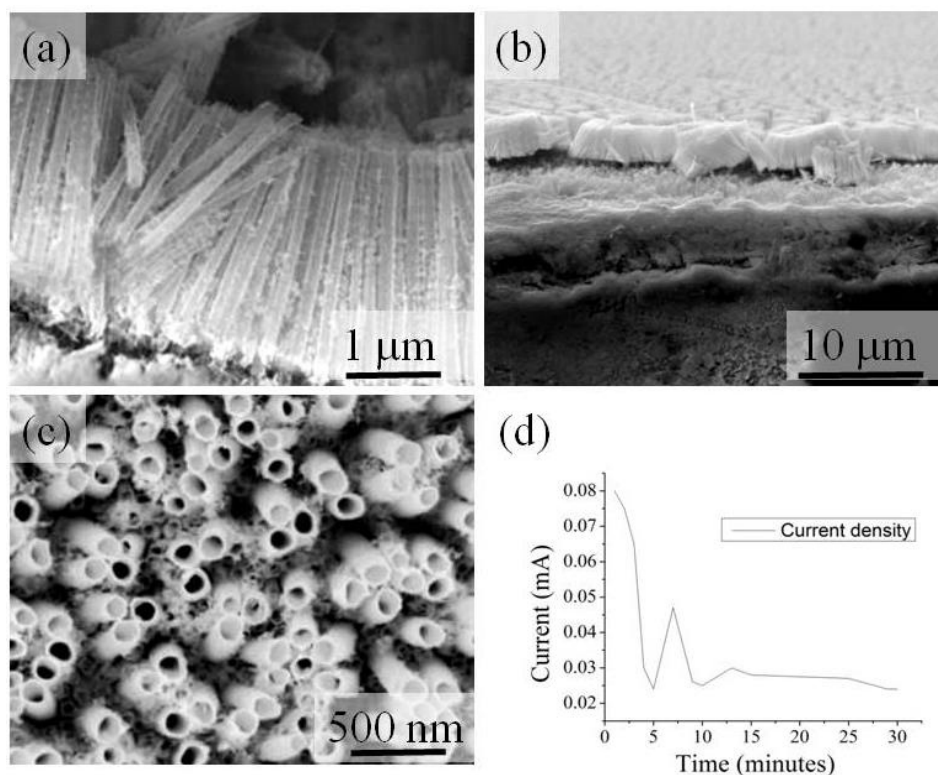


Figura 3.33. Imágenes SEM de las muestras anodizadas a 30 V antes de recubrirlas con quitosano en (a) y (b) son vistas de la sección transversal de la superficie, en (c) es la vista superior de la superficie y (d) es la densidad de corriente contra el tiempo registrada durante el proceso.

Después del procedimiento de oxidación anódica las superficies se cubrieron con quitosano en fase líquida y se mantuvo a temperatura ambiente por un periodo de 24 horas como se observa en la figura 3.34a). En este período de tiempo, se observó que el quitosano se despegaba del sustrato metálico después de evaporarse el medio en el que se encuentra diluido. En la figura 3.34 b) se observan las membranas que se obtuvieron.

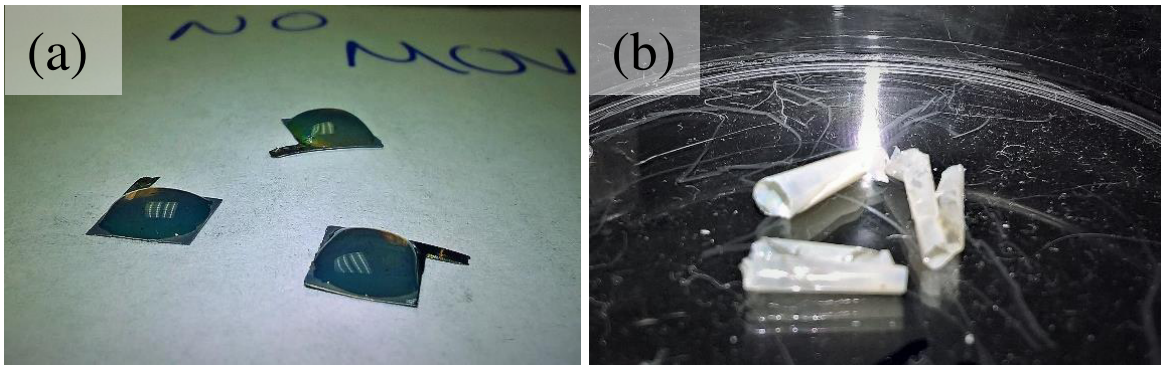


Figura 3.34. En la imagen a) se observan las muestras anodizadas a 30V recubiertas con quitosano y en b) las membranas de quitosano obtenidas después de que se despegan del sustrato metálico.

En esta parte del proceso, las membranas desprendidas del sustrato metálico, son ya un compuesto TNTM/Quitosano como se observa en la figura 3.35a), con un grosor promedio de película de quitosano de 20.94 micrómetros, que es el que se encuentra en la parte inferior de la imagen. La Figura 3.35 (b) y (d) son un aumento en el área marcada con un círculo negro de las imágenes 3.35a). En la figura 3.35 b) se observa que el fondo de los tubos está cerrado. Los resultados de EDX mostrados en la Figura 3.35 (c), fueron hechos de la zona marcada con una flecha y un círculo negro en la figura 3.35 d), y estos sugieren que la estructura nanotubular sobre la aleación es un óxido metálico principalmente de elementos como Ti, Zr, Nb y Sn.

Por otro lado, al realizar un mapeo de la composición elemental de la nanoestructura TNTM/Quitosano anodizada a 30V presentado en la figura 3.36, se puede observar que la

mayor parte de carbono se encontró en la superficie del quitosano. Los elementos metálicos como Ti, Zr, Nb y Sn se encontraron en mayor medida en los nanotubos metálicos, así como también el oxígeno. El Flúor fue detectado levemente en la superficie de nanotubos. Así estos resultados sugieren que por un lado los nanotubos se encuentran sellados del mismo óxido de la aleación, por lo que éstos pueden ser cargados con algún fármaco y posteriormente, ser recubiertos con el quitosano que servirá de barrera dosificadora y biodegradable para la liberación del fármaco.

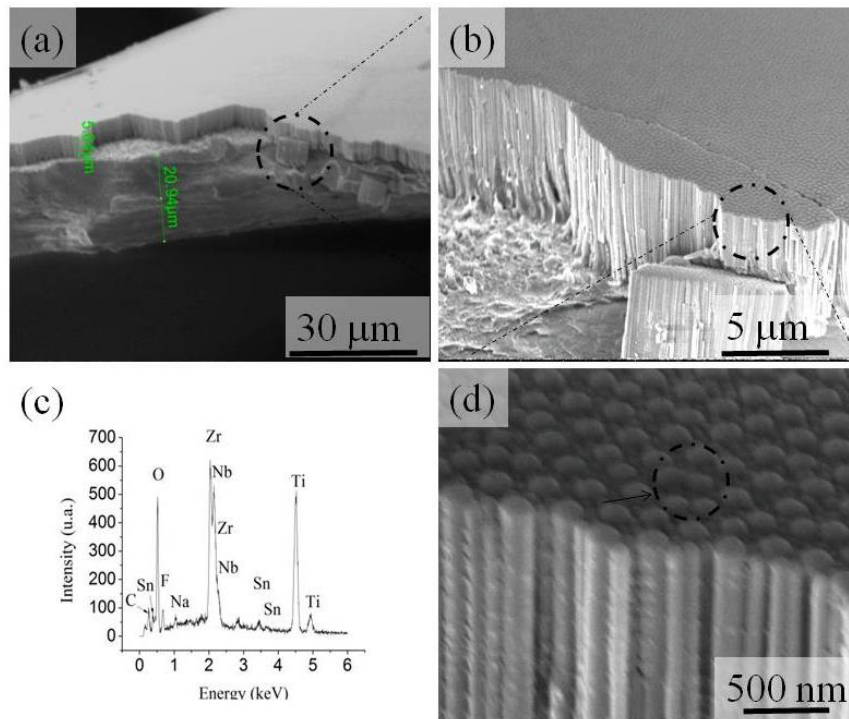


Figure 3.35. Imágenes SEM del compuesto TNTM/quitosano en (a), (b) y (d) se presentan las vistas transversales de la membrana después de ser despegada del sustrato metálico en (c) se presenta la composición elemental del área marcada con un círculo negro en d).

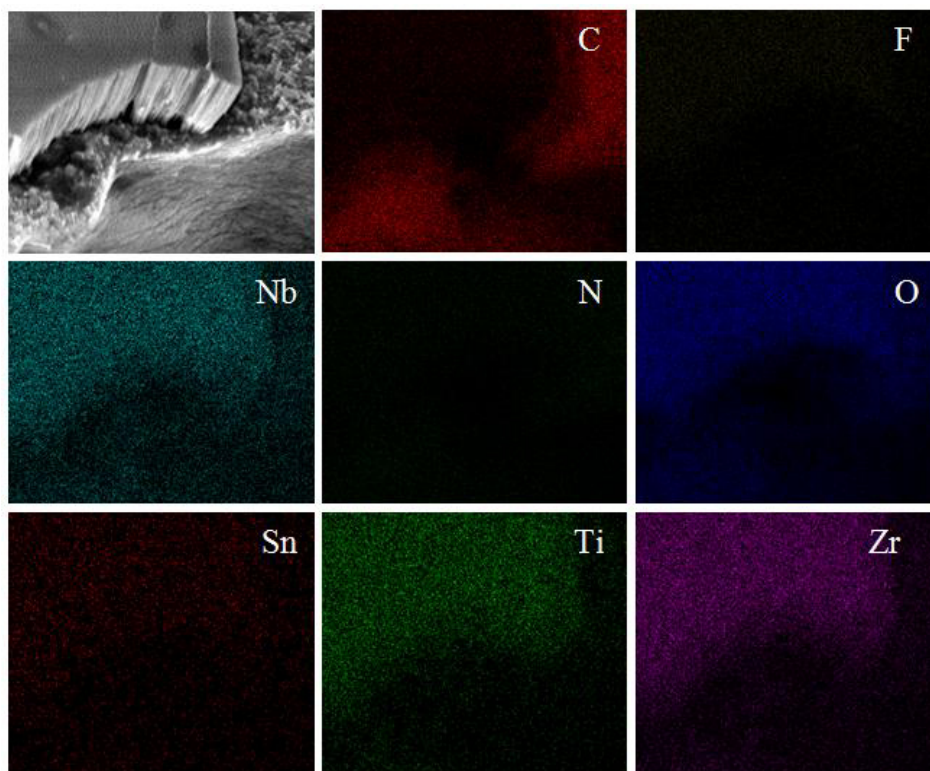


Figure 3.36. Imagen SEM de la nanoestructura TNTM/Quitosano anodizada a 30V y su composición elemental.

En resumen en esta sección, se reporta la fabricación de TNTM/Quitosano cargada con gentamicina. Debido a su composición elemental biocompatible, esta membrana puede tener gran impacto en la construcción de dispositivos biomédicos como liberación controlada de fármacos local, en fotocatalisis debido a los óxidos de titanio presentes, en catálisis debido al óxido de circonio y en sensores de gases debido al óxido de niobio. Además estas nanoestructuras podrían ser cargadas con partículas que sean capaces de interactuar con ondas mecánicas para construir un sistema inteligente de liberación [100].

4 Trabajo a futuro

4.1 Recubrimientos rápidos con fines ortopédicos.

Actualmente las prótesis ortopédicas utilizadas en implantes de hueso son tratadas superficialmente con fosfatos de calcio debido a que esta interface entre el metal y el tejido permite una mejor biocompatibilidad de la prótesis cuando es implantada en sistemas vivos. Es por esta razón que resulta importante generar una metodología de recubrimientos rápidos para futuras aplicaciones en sustituciones óseas.

En la figura 3.37 se observan las muestras que fueron anodizadas a 30V por un periodo de tiempo de 30 minutos y después inmersas en suero SBF con una concentración de 10 (10xSBF). Solo se tomó la muestra anodizada a 30V, ya que los resultados en este sentido, deben ser muy similares a los demás voltajes. En la imagen se observan las nanoestructuras, las cuales fueron cubiertas con fosfatos de calcio. La relación de Ca/P fue de 1.66, que es muy aproximado a la relación que conserva la hidroxiapatita. Además debido a la morfología parecida a una flor se puede corroborar que el recubrimiento generado sobre la superficie de la aleación es hidroxiapatita.

Este procedimiento genera capas de fosfatos de calcio sobre la aleación Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn en un periodo de tiempo menor a 4 horas. Y esto se puede atribuir al gran

aumento de área superficial de las muestras después del anodizado electroquímico por la generación morfológica de los nanotubos. Por lo que la aleación Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn puede generar recubrimientos rápidos de fosfatos de calcio.

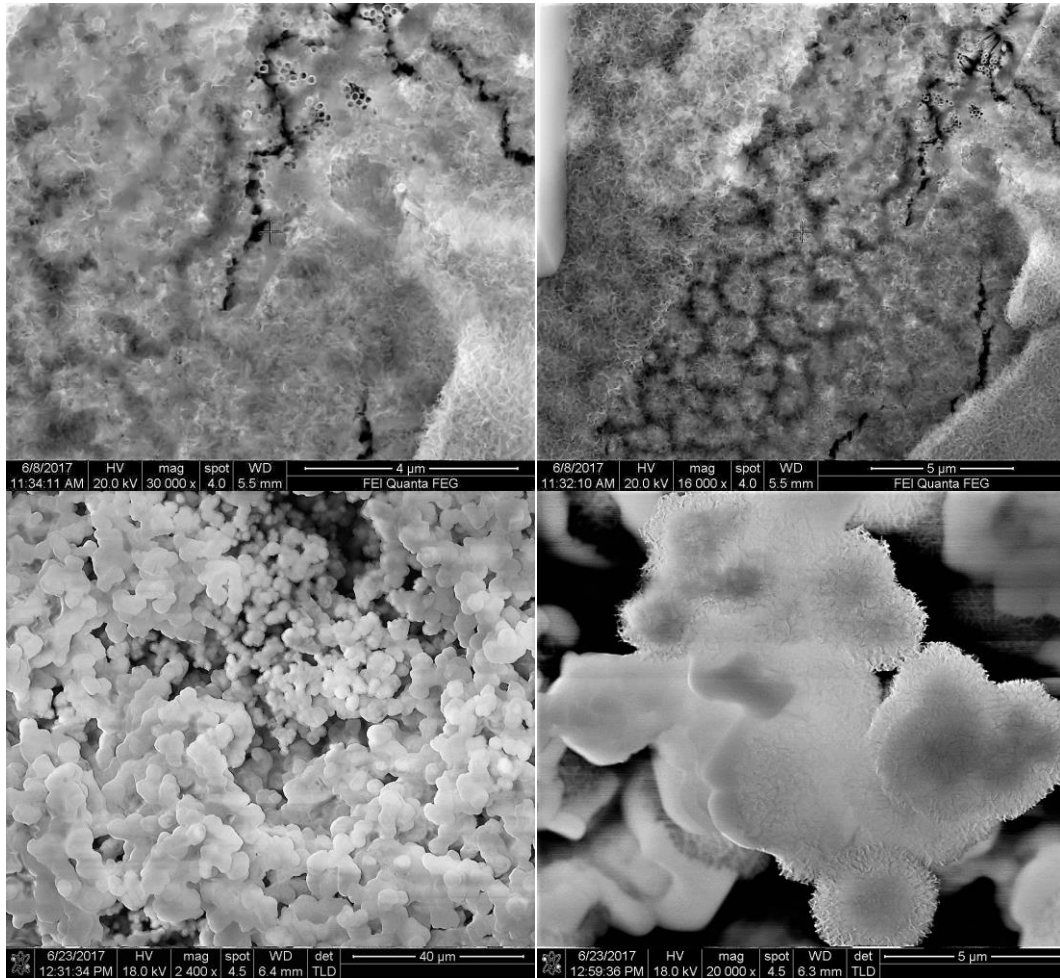


Figure 3.37. Imágenes de SEM de las muestras de Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn anodizadas a 30V por 30 minutos e inmersas en 10xSBF por cuatro horas.

Los resultados de modificación superficial de la aleación Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn que se obtuvieron en este trabajo de investigación sugieren que es posible activar la superficie mediante tratamientos alcalinos. Las pruebas de biocompatibilidad *in vivo* e *in-vitro* sugieren una buena aceptación del material. Las pruebas de anodización electroquímica producen nanoestructuras en la superficie del material que pueden mejorar la bioactividad y biocompatibilidad del material. Las pruebas de carga y liberación de drogas indican que el material tiene la capacidad suministrar localmente gentamicina en un periodo de tiempo corto, el cual podría mejorarse con polímeros biocompatibles como el quitosano. Y finalmente la nanoestructura generada podría ser un compósito con aplicaciones biomédicas debido a la composición elemental de las nanoestructuras.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las conclusiones obtenidas a partir del análisis y discusión de los resultados experimentales desarrollados en este trabajo de tesis son presentadas a continuación:

- La evidencia que se mostró de las pruebas de viabilidad celular sugieren que no hay efecto citotóxico significativo, esto indica que la aleación Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn presenta buena biocompatibilidad *in-vitro* ya que puede ser aceptado biológicamente.
- Las pruebas *in-vivo* en ratones BALB/C corroboran que la aleación Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn es un metal biocompatible. Debido a que los tejidos del organismo como bazo, hígado y tejido circundante toleran su presencia sin

que se hayan observado reacciones alérgicas del sistema inmunitario ni tejido necrótico alrededor del implante y unido a las propiedades superelásticas, este biomaterial puede ser utilizado para reconstruir partes dañadas del cuerpo humano.

- La aleación $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$ presenta bioactividad en fluido corporal simulado con tratamientos alcalinos de NaOH, KOH y soluciones supersaturadas de $Ca(OH)_2$ debido a que estos tratamientos cambian las propiedades superficiales del biomaterial lo que favorece la formación de fosfatos de calcio.
- Los fosfatos de calcio formados en la superficie de la aleación es una hidroxiapatita ya que presentan morfología tipo flor, esferulita y esferoidales, su relación de calcio fosforo fue de alrededor 1.66 y los principales picos de difracción fueron 26 y 32° , por lo que el biomaterial puede ser utilizado para el reemplazo de partes de la estructura ósea.
- Las capas de fosfatos de calcio en la superficie del biomaterial presentaron grietas superficiales excepto el tratamiento con 5M de KOH.
- El proceso de anodización electroquímica a potencial constante permite formar capas de óxido nanoestructurado en la superficie de la aleación $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$ lo cual le confiere al biomaterial una biocompatibilidad muy

superior a un implante sin tratamiento, los parámetros del diámetro y longitud pueden ser controlados con el potencial aplicado ya que presentan un crecimiento lineal.

- Los resultados de las pendientes del diámetro de nanotubos y de longitud de nanotubos en función del voltaje de anodización de 4.3 nm de diámetro/V y 225 nm de longitud/V respectivamente, resultan importantes desde el punto de vista del control del volumen de los nanotubos en la ingeniería biomédica, ya que en función de esto, y la densidad superficial de los nanotubos, es posible estimar la cantidad de carga de medicamento a suministrar.
- Las nanoestructuras superficiales de la aleación $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$ pueden ser cargadas con gentamicina y permitir una liberación local del fármaco. Esto puede reducir el riesgo de infección del biomaterial cuando es implantado además el fármaco puede actuar de forma local sin interactuar con otras partes del organismo
- Los resultados de tiempo de dosificación, sugieren que éste está directamente relacionado con el diámetro del nanotubo. A mayor diámetro, menor tiempo de dosificado.
- De tal manera que para una dosificación de medicamento, se tiene que establecer un compromiso entre la cantidad de carga y tiempo de liberación,

o entre la morfología y el diámetro de los nanotubos. Que para los resultados de la aleación $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$ anodizada, se encontró que las mejores superficies son las desarrolladas a 20 y 15 Volts, ya que son las que presentan un mejor compromiso entre la mayor carga y mayor tiempo de liberación.

- Finalmente es posible construir membranas de un compuesto de óxido nanoestructurado de la aleación $Ti_{24}Zr_{10}Nb_2Sn$ con polímeros biocompatibles como el quitosano mediante el proceso de anodización electroquímica a potencial constante de 30V en un solo paso. Los cuales pueden ser utilizados para tratar enfermedades de la piel si son cargados con drogas.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Como todo trabajo de investigación de vanguardia, éste presenta perspectivas importantes ya que si bien se abordó el efecto de los tratamientos alcalinos a la formación de fosfatos de calcio en la superficie de las muestras y la biocompatibilidad *in-vitro* e *in-vivo* de la aleación TiZrNbSn, en futuras investigaciones otros temas interesantes a tratar serían:

- Desarrollar un protocolo de la generación de recubrimientos rápidos con fines ortopédicos. Esto implicará estudiar la tasa de nucleación de cada una de las superficies obtenidas con tratamientos alcalinos o por el método de anodización electroquímica a potencial constante.
- Desarrollar pruebas de biocompatibilidad *in-vivo* en cerdos o perros con prótesis diseñadas para propósitos específicos como postes dentales o tornillos de fijación ósea.
- Continuar estudiando el método de anodización electroquímica a potencial y corriente constante, con el propósito de buscar generar nuevas morfologías nanoestructuradas.

- Realizar pruebas de la capacidad de liberación de drogas del compuesto de nanotubos de Titanio/Quitosano con diferentes moléculas, ya que esto puede influir en la cantidad de carga y el tiempo de liberación.

BIBLIOGRAFIA

- [1] C. A. Jones, L. A. Beaupre, D. W. C. Johnston, and M. E. Suarez-Almazor, “Total Joint Arthroplasties: Current Concepts of Patient Outcomes after Surgery,” *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, vol. 33, no. 1, pp. 71–86, 2007.
- [2] S. Leopold, “Minimally invasive total knee arthroplasty for osteoarthritis,” *N. Engl. J. Med.*, pp. 1749–1758, 2009.
- [3] “Articulación de rodilla.” [Online]. Available: <http://sjhsyr.adam.com/content.aspx?productId=113&pid=2&gid=9494>.
- [4] Q. Chen and G. A. Thouas, “Metallic implant biomaterials,” *Mater. Sci. Eng. R Reports*, vol. 87, no. January 2015, pp. 1–57, 2015.
- [5] L. Petrini and F. Migliavacca, “Biomedical Applications of Shape Memory Alloys,” *J. Metall.*, vol. 2011, no. Figure 1, pp. 1–15, 2011.
- [6] F. Mahyudin, L. Widhiyanto, and H. Hermawan, “Biomaterials in orthopaedics,” *Adv. Struct. Mater.*, vol. 58, no. July, pp. 161–181, 2016.
- [7] A. S. Vasilevich, A. Carlier, J. de Boer, and S. Singh, “How Not To Drown in Data: A Guide for Biomaterial Engineers,” *Trends Biotechnol.*, vol. xx, pp. 1–13, 2017.
- [8] Dorland, “Dorland’s Illustrated Medical Dictionary, 32e.” p. 2176, 2011.

- [9] A. J. Hart, J. A. Skinner, J. Henckel, B. Sampson, and F. Gordon, “Insufficient acetabular version increases blood metal ion levels after metal-on-metal hip resurfacing,” *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 469, no. 9, pp. 2590–2597, 2011.
- [10] A. Abdel-Gadir *et al.*, “Detection of metallic cobalt and chromium liver deposition following failed hip replacement using T2* and R2 magnetic resonance,” *J. Cardiovasc. Magn. Reson.*, vol. 18, no. 1, p. 29, 2016.
- [11] M. Niinomi, “Recent metallic materials for biomedical applications,” *Metall. Mater. Trans. A*, vol. 33, no. 3, pp. 477–486, 2002.
- [12] C. M. Abraham, “A brief historical perspective on dental implants, their surface coatings and treatments,” *Open Dent. J.*, vol. 8, pp. 50–5, 2014.
- [13] P. I. Branemark, “Osseointegration and its experimental background,” *J. Prosthet. Dent.*, vol. 50, no. 3, pp. 399–410, 1983.
- [14] H. R. and J. M. Y. P. I. Branemark, U. Breine, B. Johansson, P. J. Roylance, “regeneration of bone marrow,” *acta anat.*, vol. 59, pp. 1–46, 1964.
- [15] N. S. Manam *et al.*, “Study of corrosion in biocompatible metals for implants: A review,” *J. Alloys Compd.*, vol. 701, pp. 698–715, 2017.
- [16] J. L. Woodman, J. Black, and D. M. Nunamaker, “Release of cobalt and nickel from a new total finger joint prosthesis made of vitallium,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 17, no. 4, pp. 655–668, 1983.
- [17] I. Kopova, J. Stráský, P. Harcuba, M. Landa, M. Janeček, and L. Bačáková, “Newly developed Ti-Nb-Zr-Ta-Si-Fe biomedical beta titanium alloys with increased strength

- and enhanced biocompatibility,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 60, pp. 230–238, 2016.
- [18] A. H. Hussein, M. A. H. Gepreel, M. K. Gouda, A. M. Hefnawy, and S. H. Kandil, “Biocompatibility of new Ti-Nb-Ta base alloys,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 61, pp. 574–578, 2016.
- [19] L. L. Pavón, H. Y. Kim, H. Hosoda, and S. Miyazaki, “Effect of Nb content and heat treatment temperature on superelastic properties of Ti-24Zr-(8-12)Nb-2Sn alloys,” *Scr. Mater.*, vol. 95, no. 1, pp. 46–49, 2015.
- [20] X. Li *et al.*, “Modified surface morphology of a novel Ti-24Nb-4Zr-7.9Sn titanium alloy via anodic oxidation for enhanced interfacial biocompatibility and osseointegration,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 144, pp. 265–275, 2016.
- [21] J. E. Lemons, K. M. W. Niemann, and A. B. Weiss, “Biocompatibility studies on surgical-grade titanium-, cobalt-, and iron-base alloys,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 10, no. 4, pp. 549–553, 1976.
- [22] S. L. Assis, S. Wolyneć, and I. Costa, “The electrochemical behaviour of Ti-13Nb-13Zr alloy in various solutions,” *Mater. Corros.*, vol. 59, no. 9, pp. 739–743, 2008.
- [23] J. C. M. R. Mihai V. Popa, Ecaterina Vasilescu*, Paula Drob, Cora Vasilescu and Silviu I. Drob, Daniel Mareci, “CORROSION RESISTANCE IMPROVEMENT OF TITANIUM BASE ALLOYS,” *Quim. Nova*, vol. 33, no. 9, pp. 1892–1896, 2010.
- [24] G. Rondelli, “Corrosion resistance tests on NiTi shape memory alloy,” *Biomaterials*, vol. 17, no. 20, pp. 2003–2008, 1996.
- [25] X. Zhang *et al.*, “Corrosion behavior of Zn-incorporated antibacterial TiO₂ porous

- coating on titanium,” *Ceram. Int.*, vol. 42, no. 15, pp. 17095–17100, 2016.
- [26] E. Lukina, M. Kollerov, J. Meswania, A. Khon, P. Panin, and G. W. Blunn, “Fretting corrosion behavior of nitinol spinal rods in conjunction with titanium pedicle screws,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 72, pp. 601–610, 2017.
- [27] G. Xu, X. Shen, Y. Hu, P. Ma, and K. Cai, “Fabrication of tantalum oxide layers onto titanium substrates for improved corrosion resistance and cytocompatibility,” *Surf. Coatings Technol.*, vol. 272, pp. 58–65, 2015.
- [28] G. Manivasagam, D. Dhinasekaran, and A. Rajamanickam, “Biomedical Implants: Corrosion and its Prevention - A Review,” *Recent Patents Corros. Sci.*, vol. 2, no. 1, pp. 40–54, 2010.
- [29] F. E. A. Lucas G.L., Cooke F.W., “Stress Shielding of Bone,” in *In: A Primer of Biomechanics*, New York, NY, 1999, pp. 79–88.
- [30] van R. B. Huiskes R, Weinans H, “The relationship between stress shielding and bone resorption around total hip stems and the effects of flexible materials.,” *Clin Orthop Relat Res*, vol. 274, p. 124–34., 1992.
- [31] T. M. Glassman AH, Bobyn JD, “New femoral designs: do they influence stress shielding?,” *Clin Orthop Relat Res.*, vol. 453, pp. 64–74, 2006.
- [32] R. Korabi, K. Shemtov-Yona, and D. Rittel, “On stress/strain shielding and the material stiffness paradigm for dental implants,” *Clin. Implant Dent. Relat. Res.*, no. May, pp. 10–13, 2017.
- [33] A. Ait Moussa, J. Fischer, R. Yadav, and M. Khandaker, “Minimizing Stress Shielding

and Cement Damage in Cemented Femoral Component of a Hip Prosthesis through Computational Design Optimization,” *Adv. Orthop.*, vol. 2017, 2017.

- [34] M. R. A. & A. A. H. Asgharzadeh Shirazi, “To reduce the maximum stress and the stress shielding effect around a dental implant–bone interface using radial functionally graded biomaterials,” *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.*, vol. 20, pp. 750–759, 2017.
- [35] M. A. McGee *et al.*, “Implant retrieval studies of the wear and loosening of prosthetic joints: A review,” *Wear*, vol. 241, no. 2, pp. 158–165, 2000.
- [36] Y. Yan, A. Neville, and D. Dowson, “Tribo-corrosion properties of cobalt-based medical implant alloys in simulated biological environments,” *Wear*, vol. 263, no. 7–12 SPEC. ISS., pp. 1105–1111, 2007.
- [37] S. S. I. C. C. BROWN, “A Review of Lubrication Conditions for Wear Simulation in Artificial Hip Replacements,” *Tribol. Trans.*, vol. 49, no. 1, pp. 72–78, 2006.
- [38] H. Li, Y. Cong, Y. Zheng, and L. Cui, “In vitro investigation of NiTiW shape memory alloy as potential biomaterial with enhanced radiopacity,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 60, pp. 554–559, 2016.
- [39] M. Sciences, “Metallic biomaterials of knee and hip--areview.,” no. January 2016, 2013.
- [40] J.-H. Chang, J.-F. Liu, Y.-S. Sun, C.-P. Wu, H.-H. Huang, and Y. Han, “Mesoporous surface topography promotes bone cell differentiation on low elastic modulus Ti–25Nb–25Zr alloys for bone implant applications,” *J. Alloys Compd.*, vol. 707, pp. 220–

226, 2017.

- [41] X. H. Liu, L. Wu, H. J. Ai, Y. Han, and Y. Hu, “Cytocompatibility and early osseointegration of nanoTiO₂-modified Ti-24 Nb-4 Zr-7.9 Sn surfaces,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 48, pp. 256–262, 2015.
- [42] S. Sobieszczyk, “Hydroxyapatite coatings on porous ti and ti alloys,” *Adv. Mater. Sci.*, vol. 10, pp. 19–28, 2010.
- [43] W. A. Camargo *et al.*, “Effect of surface alkali-based treatment of titanium implants on ability to promote in vitro mineralization and in vivo bone formation,” *Acta Biomater.*, vol. 57, pp. 511–523, 2017.
- [44] 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.
- [45] W. Zhao, J. Lemaire, and P. Bowen, “A comparative study of simulated body fluids in the presence of proteins,” *Acta Biomater.*, vol. 53, pp. 506–514, 2016.
- [46] J. A. J. Betty Leon, *book. Thin calcium phosphates coatings for medical implants.* 2009.
- [47] H.-A. H. & J. L. T. Albrektsson, P.-I. Brånemark and B. Narayan, “Osseointegrated titanium implants: Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man,” *Class. Pap. Orthop.*, vol. 52, pp. 155–170, 1981.
- [48] C. H. J. A. links open the author workspace. J. T. Berry, “A study of the bone machining process—Drilling,” *J. Biomech.*, vol. 9, no. 5, pp. 343–344, 1976.

- [49] H. T. Tadashi Kokubo, “kokubo 2. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?,” *Biomaterials*, vol. 27, pp. 2907–2915, 2006.
- [50] N. T. Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, “Bonding strength of bonelike apatite layer to Ti metal substrate.,” *J Biomed Mater Res*, vol. 38, no. 2, pp. 121–127, 1997.
- [51] T. Kokubo and S. Yamaguchi, “Novel bioactive materials developed by simulated body fluid evaluation : Surface-modified Ti metal and its alloys,” *Acta Biomater.*, vol. 44, pp. 16–30, 2016.
- [52] T. Kokubo, H. Kim, F. Miyaji, H. Takadama, and T. Miyazaki. “Ceramic – metal and ceramic – polymer composites prepared by a biomimetic process,” vol. 30, pp. 405–409, 1999.
- [53] T. Kokubo, M. Hanakawa, M. Kawashita, and M. Minoda. “Apatite formation on non-woven fabric of carboxymethylated chitin in SBF,” vol. 25, pp. 4485–4488, 2004.
- [54] H. Kim, T. Himeno, T. Kokubo, and T. Nakamura. Process and kinetics of bonelike apatite formation on sintered hydroxyapatite in a simulated body fluid,” vol. 26, pp. 4366–4373, 2005.
- [55] P. D. H. and C. W. Alireza Nouri, “Biomimetic Porous Titanium Scaffolds for Orthopedic and Dental Applications,” in *Biomimetic Porous Titanium Scaffolds for Orthopedic and Dental Applications*, A. Mukherjee, Ed. 2010.
- [56] C. Nouri, A., Chen, X., Hodgson, P. D., Long, J. M., Yamada, Y. and Wen, “Preparation of bioactive porous Ti-Sn-Nb alloy for biomedical applications,” in *MetFoam 2007 : International Conference on Porous Metals and Metallic Foams*,

2007, pp. 307–310.

- [57] C. Y. Zheng, S. J. Li, X. J. Tao, Y. L. Hao, and R. Yang, “Surface modification of Ti-Nb-Zr-Sn alloy by thermal and hydrothermal treatments,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 29, no. 4, pp. 1245–1251, 2009.
- [58] C. Y. Zheng, S. J. Li, X. J. Tao, Y. L. Hao, and L. Z. , R. Yang, “Calcium phosphate coating of Ti–Nb–Zr–Sn titanium alloy,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 27, pp. 824–831, 2007.
- [59] W. Jackson, Mark J., Ahmed, “Anodization : A Promising Nano-Modification Technique of Titanium-based Implants for Orthopedic Applications,” in *Surface Engineered Surgical Tools and Medical Devices*, ILUSTRADA., W. Jackson, Mark J., Ahmed, Ed. Surface Engineered Surgical Tools and Medical Devices, 2007, pp. 22–47.
- [60] Y. R. Smith, R. S. Ray, K. Carlson, B. Sarma, and M. Misra, “Self-Ordered titanium dioxide nanotube arrays: Anodic synthesis and their photo/electro-catalytic applications,” *Materials (Basel)*, vol. 6, no. 7, pp. 2892–2957, 2013.
- [61] S. Minagar, C. C. Berndt, J. Wang, E. Ivanova, and C. Wen, “A review of the application of anodization for the fabrication of nanotubes on metal implant surfaces,” *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 8, pp. 2875–2888, 2012.
- [62] V. Zwillig, D. David, M. Y. Perrin, and M. Aucouturier. “Structure and Physicochemistry of Anodic Oxide Films on Titanium and TA6V Alloy,” vol. 637, no. January, pp. 629–637, 1999.

- [63] V. Zwillling, M. Aucouturier, and E. Darque-ceretti, "Anodic oxidation of titanium and TA6V alloy in chromic media . An electrochemical approach," vol. 45, pp. 921–929, 1999.
- [64] J. Fornell *et al.*, "Electrochemistry Communications Anodic formation of self-organized Ti (Nb , Sn) oxide nanotube arrays with tuneable aspect ratio and size distribution," *Electrochem. commun.*, vol. 33, pp. 84–87, 2013.
- [65] R. Hang *et al.*, "Fabrication of Ni-Ti-O nanotube arrays by anodization of NiTi alloy and their," pp. 21–24, 2014.
- [66] P. Roy, S. Berger, and P. Schmuki, "TiO₂ Nanotubes : Synthesis and Applications Angewandte," pp. 2904–2939, 2011.
- [67] G. K. M. Craig A. Grimes, *TiO₂ Nanotube Arrays Synthesis, Properties, and Applications*. 2009.
- [68] J. M. Cordeiro and V. A. R. Barbo, "Is there scientific evidence favoring the substitution of commercially pure titanium with titanium alloys for the manufacture of dental implants?," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 71, pp. 1201–1215, 2017.
- [69] S. X. Liang, Z. H. Feng, L. X. Yin, X. Y. Liu, M. Z. Ma, and R. P. Liu, "The effects of v content on the microstructure and mechanical properties of hot rolled TiZr based alloys," *J. Alloys Compd.*, vol. 664, no. December, pp. 11–18, 2016.
- [70] F. W. Wood and P. A. Romans, "Segregation of alpha and beta stabilizers in titanium," *Mater. Sci. Eng.*, vol. 10, no. C, pp. 182–185, 1972.
- [71] S. Prasad, M. Ehrensberger, M. P. Gibson, H. Kim, and E. A. Monaco, "Biomaterial

- properties of titanium in dentistry,” *J. Oral Biosci.*, vol. 57, no. 4, pp. 192–199, 2015.
- [72] M. Niinomi, M. Nakai, and J. Hieda, “Development of new metallic alloys for biomedical applications,” *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 11, pp. 3888–3903, 2012.
- [73] Y. Li, C. Yang, H. Zhao, S. Qu, X. Li, and Y. Li, “New developments of ti-based alloys for biomedical applications,” *Materials (Basel)*, vol. 7, no. 3, pp. 1709–1800, 2014.
- [74] L. Torrisi, “disp1. The NiTi superelastic alloy application to the dentistry field,” *Biomed. Mater. Eng.*, vol. 9, pp. 39–47, 1999.
- [75] K. N. M. and D. S. T W Duerig, *book SMA. Engineering Aspects of Shape Memory Alloys*. Butterworth-Heinemann Ltd; First Edition edition (Nov. 1990), 1990.
- [76] Z. Laster, A. D. Macbean, P. R. Ayliffe, and L. C. Newlands, “Fixation of a frontozygomatic fracture with a shape-memory staple,” pp. 324–325, 2001.
- [77] M. Scholz *et al.*, “The use of composite materials in modern orthopaedic medicine and prosthetic devices : A review,” *Compos. Sci. Technol.*, vol. 71, no. 16, pp. 1791–1803, 2011.
- [78] Gene Mayer, “IMMUNOLOGY - CHAPTER ONE INNATE (NON-SPECIFIC) IMMUNITY,” 2017. [Online]. Available: <http://www.microbiologybook.org/ghaffar/innate.htm>.
- [79] V. Sansone, D. Pagani, and M. Melato, “The effects on bone cells of metal ions released from orthopaedic implants. A review.,” *Clin. Cases Miner. Bone Metab.*, vol. 10, no. 1, pp. 34–40, 2013.

- [80] D. Bitar and J. Parvizi, "Biological response to prosthetic debris.," *World J. Orthop.*, vol. 6, no. 2, pp. 172–89, 2015.
- [81] T. Kokubo and S. Yamaguchi, "Novel bioactive titanate layers formed on ti metal and its alloys by chemical treatments," *Materials (Basel)*., vol. 3, no. 1, pp. 48–63, 2010.
- [82] L. Jonášová, F. A. Müller, A. Helebrant, J. Strnad, and P. Greil, "Biomimetic apatite formation on chemically treated titanium," *Biomaterials*, vol. 25, no. 7–8, pp. 1187–1194, 2004.
- [83] T. T. Demirtaş, G. Kaynak, and M. Gümüşderelioğlu, "Bone-like hydroxyapatite precipitated from 10×SBF-like solution by microwave irradiation," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 49, pp. 713–719, 2015.
- [84] Y. W. Gu, B. Y. Tay, C. S. Lim, and M. S. Yong, "Characterization of bioactive surface oxidation layer on NiTi alloy," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 252, no. 5, pp. 2038–2049, 2005.
- [85] A. Rakngarm, Y. Miyashita, and Y. Mutoh, "Formation of hydroxyapatite layer on bioactive Ti and Ti-6Al-4V by simple chemical technique," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 19, no. 5, pp. 1953–1961, 2008.
- [86] J. C. V. Acosta, N. S. L. Parra, and D. A. Garzón-Alvarado, "Mecanobiología de la interfase hueso-implante dental," *Rev. Cubana Estomatol.*, vol. 47, no. 1, pp. 14–36, 2010.
- [87] S. Jalota, S. Bhaduri, S. B. Bhaduri, and a. C. Tas, "A protocol to develop crack-free biomimetic coatings on Ti6Al4V substrates," *J. Mater. Res.*, vol. 22, no. 6, pp. 1593–

1600, 2007.

- [88] Delphine Farlay and Georges Boivin, “Bone Mineral Quality,” in *osteoporosis*, P. Y. Dionyssiotis, Ed. 2012.
- [89] H.-M. Kim, T. Himeno, M. Kawashita, T. Kokubo, and T. Nakamura, “The mechanism of biomineralization of bone-like apatite on synthetic hydroxyapatite: an in vitro assessment.,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 1, no. April, pp. 17–22, 2004.
- [90] K. Gulati, M. Aw, and D. Losic, “Drug-eluting Ti wires with titania nanotube arrays for bone fixation and reduced bone infection,” *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 6, no. 1, p. 571, 2011.
- [91] K. Gulati, S. Ramakrishnan, M. S. Aw, G. J. Atkins, D. M. Findlay, and D. Losic, “Biocompatible polymer coating of titania nanotube arrays for improved drug elution and osteoblast adhesion,” *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 1, pp. 449–456, 2012.
- [92] D. Losic, M. S. Aw, A. Santos, K. Gulati, and M. Bariana, “Titania nanotube arrays for local drug delivery: recent advances and perspectives,” *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 12, no. 1, pp. 103–127, 2015.
- [93] A. Ghicov and P. Schmuki, “Self-ordering electrochemistry: a review on growth and functionality of TiO₂ nanotubes and other self-aligned MO_x structures,” *Chem. Commun.*, no. 20, p. 2791, 2009.
- [94] D. Losic and S. Simovic, “Self-ordered nanopore and nanotube platforms for drug delivery applications.,” *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 6, no. 12, pp. 1363–1381, 2009.
- [95] X. J. Feng, J. M. Macak, S. P. Albu, and P. Schmuki, “Electrochemical formation of

self-organized anodic nanotube coating on Ti-28Zr-8Nb biomedical alloy surface,” *Acta Biomater.*, vol. 4, no. 2, pp. 318–323, 2008.

- [96] Q. Liu, D. Ding, and C. Ning, “Anodic fabrication of Ti-Nb-Zr-O nanotube arrays,” *J. Nanomater.*, vol. 2014, 2014.
- [97] Craig A. Grimes Gopal K. Mor, *TiO₂ Nanotube Arrays Synthesis, Properties, and Applications*, vol. 1. 2009.
- [98] K. C. Popat, M. Eltgroth, T. J. LaTempa, C. A. Grimes, and T. A. Desai, “Decreased Staphylococcus epidermis adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes,” *Biomaterials*, vol. 28, no. 32, pp. 4880–4888, 2007.
- [99] K. C. Popat, M. Eltgroth, T. J. LaTempa, C. A. Grimes, and T. A. Desai, “Titania nanotubes: A novel platform for drug-eluting coatings for medical implants?,” *Small*, vol. 3, no. 11, pp. 1878–1881, 2007.
- [100] M. S. Aw and D. Losic, “Ultrasound enhanced release of therapeutics from drug-releasing implants based on titania nanotube arrays,” *Int. J. Pharm.*, vol. 443, no. 1–2, pp. 154–162, 2013.



Luis López Pavón^{a,*}, Daniel Dagnino-Acosta^a, Iván E. Moreno-Cortez^a, Enrique Lopez Cuéllar^a, Diana Zarate-Trivino^b, Hee Young Kim^c, Shuichi Miyazaki^c

^a CHIDIT, Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, Universidad Autónoma de Nuevo León, Avenida Universidad s/n, Ciudad Universitaria, C.P. 66451 San Nicolás de los Garza, N.L., Mexico

^b Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad s/n, Ciudad Universitaria, C.P. 66451 San Nicolás de los Garza, N.L., Mexico

^c Division of Materials Science, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8573, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 December 2016

Received in revised form 30 May 2017

Accepted 15 June 2017

Available online 16 June 2017

Keywords:

Nanotubes

Chitosan

Anodization

Ti-24Zr-10Nb-2Sn

Nanocomposite

ABSTRACT

We report the fabrication of nanocomposite film by a novel and simple method. Oxide nanotubes were grown on Ti24Zr10Nb2Sn alloy by well-known electrochemical anodization. Then, solubilized chitosan was poured on nanotube surface, the evaporation of the solvent led to the formation of the chitosan film on the nanotubes surface. This new film formed links with the nanotubes strong enough to create a composite film that was self-removable from the alloy surface. Moreover, the nanotube array had a specific arrangement on the chitosan. This film can be used in many applications, as known, mainly in catalysis, biomaterial and drug release systems.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Titanium and titanium alloys favor the development of a non-reactive and biocompatible oxide layer on the surface, which is the main reason for the use of Ti-based products in biomedical applications [1,2]. On the other hand, anodization is a commonly used method in order to induce the growth of a nanostructured oxide layer on the Ti and Ti alloys surface. By controlling some parameters like the applied current or the distance between electrodes different nanostructured architectures can be achieved, for instance: nanotubes and nanoporous layer [3–9]. Drug delivery is one of the applications of these nanostructured surfaces due to their porous nature [10]. Moreover, TiO₂ nanotubes have outstanding properties of charge transportation and carrier lifetime that make them useful for applications such as: sensors, dye sensitized solar cells, hydrogen generation by water photoelectrolysis, photocatalytic reduction of CO₂ under outdoor sunlight, and supercapacitors [11]. The development of chitosan film over the surface with a nanotube array has been specially studied due to its antibacterial activity [12] and the increasing biofunctionality of the Ti alloy for

orthopedic use [13]. Furthermore, in the case of drug release application, depending on the thickness of the chitosan film over the titanium nanotubes, the modulation of the drug delivery, the osteoblast adhesion and proliferation can be improved [13,14]. It is known that, depending on the applied voltage, the TiO₂ layer is easily removable from the metal surface using different methods like the ultrasound bath [15–18]. Taking advantage of this characteristic, in this work a novel method to fabricate a chitosan/Ti-Zr-Nb-Sn-O nanotube membrane is proposed. The nanotube array was grown on Ti-24Zr-10Nb-2Sn alloy followed by the formation of chitosan film over the nanotubes by solvent evaporation. The recently developed Ti-24Zr-10Nb-2Sn alloy was used because of its excellent superelastic properties reported by Lopez Pavon L. et al. [19] with an elastic modulus similar to that of the bones. Besides, our group is currently studying the biocompatibility of this superelastic alloy with and without nanotubular layer, the preliminary results have been promissory; these results will be published shortly in a future manuscript. In this context, Fu et al. [20] demonstrated the biocompatibility in a very similar alloy, Ti18Zr11Nb3Sn. Hence, the nanocomposite developed in this work, composed by this new titanium oxide nanotubes along with the chitosan film, can be profitable in biomedical application due its excellent biocompatibility and biodegradability characteristics.

* Corresponding author.

E-mail address: lpavon07@gmail.com (L. López Pavón).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2017.06.078>

0167-577X/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

2. Experimental

2.1. Synthesis of Ti-Zr-Nb-Sn-O nanotubes

The Ti-24Zr-10Nb-2Sn alloy samples were anodized at 30 V for 30 min in 100 ml of electrolyte with a DC power supply. The distance between the working electrode and the counterpart of Pt mesh was set at 20 mm. The electrolyte was 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution with an addition of 0.25 M NH_4F at room temperature. The chitosan was solubilized in acidic medium until reaching a 2% w/v concentration. The nanocomposite of chitosan/nanotubes was obtained by the solvent evaporation of the chitosan solution over the nanotubes alloy surface, followed by the self-removal of the chitosan film from the metal nanotube surface. After the peeling, this chitosan film revealed a change in color caused by the nanotube layer over the chitosan film as was confirmed by subsequent analysis, indicating the formation of the nanocomposite. The morphology and chemical composition of the chitosan/nanotube nanocomposite were investigated using a scanning electron microscope Nova NanoSEM 200 with field emission of FEI brand, equipped with energy dispersive X-ray analysis (EDX).

3. Results and discussion

SEM images of the nanotube array formed on Ti24Zr10Nb2Sn surface after the anodization process are presented in Fig. 1. Fig. 1a and b shows the transversal view of the nanotubes array over the alloy surface at different scales, and it can be seen that the length of the nanotubes is around $5.5 \mu\text{m}$. A top view of the nanotubes array is shown in Fig. 1c presenting an average diameter of 122.5 nm. The behavior of current density during the anodization process was also analyzed in Fig. 1d, where it can be seen that the current density increased rapidly at around $95 \text{ mA}/\text{cm}^2$, and then dropped to a steady value of about $24 \text{ mA}/\text{cm}^2$. This is a common reported behavior of the current during the formation of nan-

otube layers that have been observed occurring in three stages. First, the metal is continuously dissolved, electropolishing of metal is observed and a compact oxide layer starts to grow. In the second stage, the nanopores formation of this oxide layer is characterized by an increase in the current. And finally, a nanotubes array is obtained under a steady current condition [21].

After the anodic oxidation, the titanium nanostructured surface was covered with a chitosan solution and it was let stand during 10 h in a ventilated chamber at room temperature. In Fig. 2a is shown the material obtained after this process, and it can be seen that a nanocomposite formed of Ti24Zr10Nb2Sn nanotubes (upper part) and chitosan (lower part) is developed. The average thickness of this nanocomposite detached from the titanium alloy substrate was $26.94 \mu\text{m}$. This micrograph was taken from a fracture of the film. The composite is obtained in this manner because with the evaporation of the solvent, the interaction between the chitosan polymer chains with the nanotubes layer became stronger than the interaction of the nanotube surface layer with the alloy bulk phase. These interactions arise from the coordination of the NH_2 functional groups of the molecular structure of the chitosan with the alloy nanotube surface. These interactions coupled with the reinforcement of the interactions between the polymeric chains of the chitosan as a result of the solvent evaporation lead to detachment of the chitosan/alloy nanotube nanocomposite from the alloy surface. This combination of interactions is strong enough to keep the chitosan film and the alloy nanotubes layer together, even when the chitosan film was self-removed from the metal surface. In this manner, a nanocomposite was synthesized in one single step through the formation of the chitosan film over the surface of titanium nanotubes. Then this detachment of the chitosan/alloy nanotube nanocomposite from the alloy surface could be achieved due to the weaker interaction of the nanotube layer with the titanium substrate. The conservation of the two phase morphology of the nanocomposite even after the fracture of the film can be seen as an evidence of the uniformity and the strength of the interac-

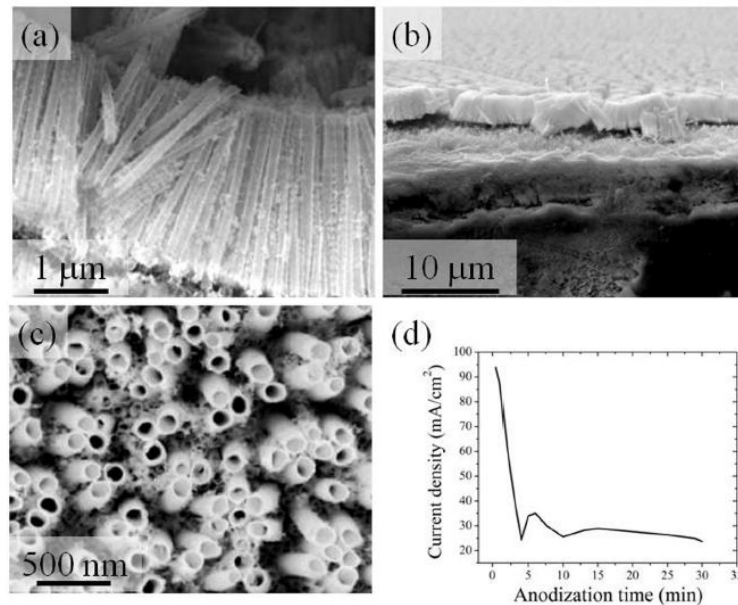


Fig. 1. (a) and (b) are cross section views and (c) is the top view of the nanotube layer formed on Ti24Zr10Nb2Sn samples for electrochemical anodization, (d) represents the current transient recorded during anodization at 30 V.

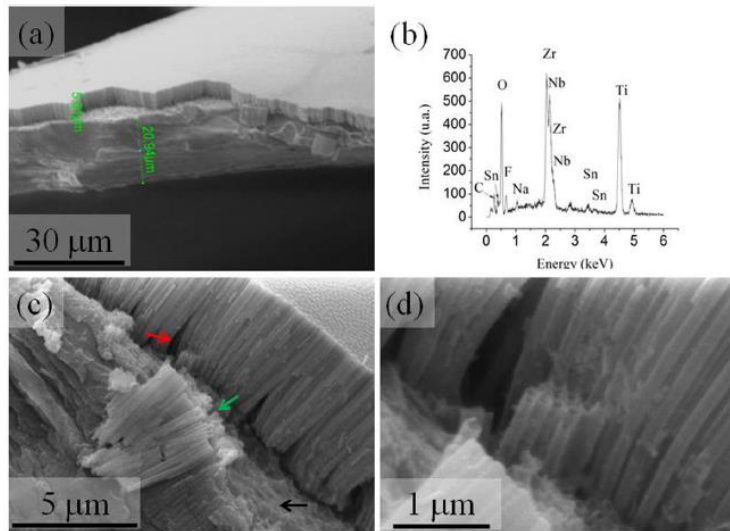


Fig. 2. (a) Shows the Cross section view of the chitosan/nanotube nanocomposite detached from the alloy surface, (b) shows the elemental composition, (c) and (d) show the fractured nanotubes.

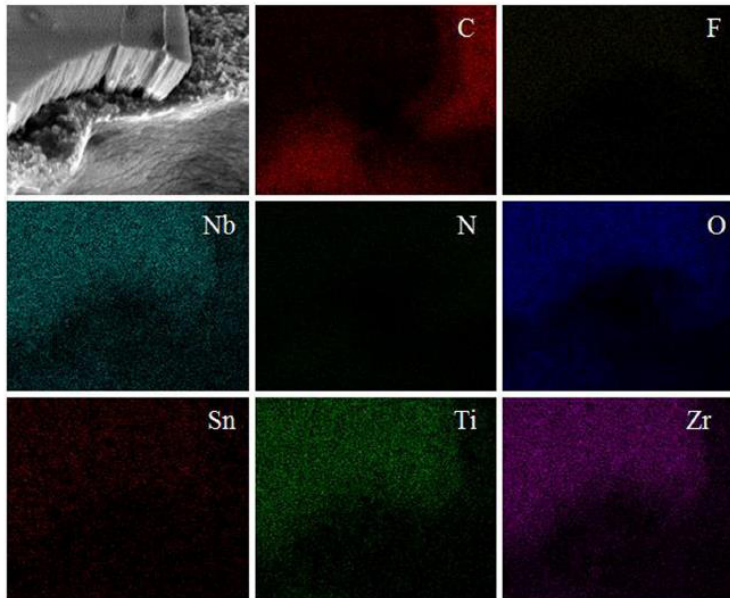


Fig. 3. EDX mapping of the composite chitosan/nanotube nanocomposite.

tions between the two phases of this nanocomposite. In Fig. 2b, the EDX of the membrane composite is shown. This elemental composition suggests that the nanotubular structure on the alloy is a metallic oxide of Ti, Zr, Nb, Sn elements, i.e. the same elements of the bulk.

Fig. 2c is an image of a fractured zone. The black arrow identifies the chitosan and the red arrow, an empty place formed between the interphase of the chitosan and the nanotubes suggesting that the polymer did not penetrate around the nanotubes. Finally the green arrow indicates a zone with fractured nanotubes. In the Fig. 2d a zoom of this fracture is shown and it is clear that the inside of the nanotubes is also empty indicating that the array of nanotubes forms a barrier to the chitosan polymer phase impeding it to penetrate inside or outside the nanotubes.

Furthermore, an elemental analysis mapping was carried out in order to identify the elements distribution in the nanocomposite. In the EDAX mapping (Fig. 3) this distribution of each element in the composite film can be seen. The nanotubes composition is in perfect concordance with the alloy Ti₂₄Zr₁₀Nb₂Sn composition and the oxygen is uniformly distributed. Fluor comes from the electrolyte used in the anodization process. The carbon is, as a part of the chitosan film, clearly distributed only in the polymer organic phase. It is thus clear that the formation of the chitosan/nanotube nanocomposite has a great potential to be used in many scientific and technological applications due to the chitosan and nanotubes characteristics.

In order to prove the biodegradation of the composite, a test of degradation in 10 ml of phosphate-buffered saline solution was carried out. Results were similar to other degradation and swelling studies reported in chitosan/PVA films [22,23]. The material showed high stability during 4 days and a decrease of weight around 13% was registered after 5 days of immersion (not shown for space reason).

4. Conclusions

In summary, a novel method to produce a nanocomposite film of chitosan/nanotube of TiZrNbSn-O is reported. This nanocomposite was self-removable from the alloy surface and the nanotubes were kept attached to the chitosan even after the self-removal process. Further analyses need to be done in order to realize the

chemical, mechanical and biocompatibility properties of the nanocomposite film, and in this manner to propose an appropriate application. However, taking into account the biocompatibility of the oxide nanotube of the present alloy and the characteristics of the chitosan, the authors propose a possible use of the membrane for health important issues such as: drug release systems or wound dressing promoting skin regeneration.

Acknowledgement

This work was supported by the project 219535 from CONACYT.

References

- [1] M. Long, H.J. Rack, *Biomaterials* 19 (1998) 1621–1639.
- [2] M. Kulkarni, A. Mazare, E. Gongadze, Š. Perutkova, V. Kralj-Iglič, I. Milošev, P. Schmuki, A. Iglič, M. Mozetič, *Nanotechnology* 26 (2015) 062002, <http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/26/6/062002>.
- [3] J.M. Macak, H. Tsuchiya, L. Taveira, S. Aldabergerova, P. Schmuki, *Angew. Chem. Int. Ed.* 44 (2005) 7463–7465.
- [4] X. Feng, J.M. Macak, P. Schmuki, *Chem. Mater.* 19 (2007) 1534–1536.
- [5] J.M. Macak, H. Tsuchiya, P. Schmuki, *Angew. Chem. Int. Ed.* 44 (2005) 2100–2102.
- [6] J.M. Macak, H. Tsuchiya, L. Taveira, A. Ghicov, P. Schmuki, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 75 (2005) 928–933.
- [7] H. Tsuchiya, J.M. Macak, L. Müller, J. Kunze, F. Müller, P. Greil, S. Virtanen, P. Schmuki, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 77A (2006) 534–541.
- [8] K. Yasuda, J.M. Macak, S. Berger, A. Ghicov, P. Schmuki, *J. Electrochem. Soc.* 154 (2007) C472–C478.
- [9] K. Yasuda, P. Schmuki, *Electrochim. Acta* 52 (2007) 4053–4061.
- [10] D. Losic, S. Simovic, *Expert Opin. Drug Deliv.* 6 (12) (2009) 1363–1381.
- [11] A.C. Grimes, G.K. Mor, *TiO₂ Synthesis, Properties and Applications*, Springer, 2009.
- [12] R.C. Goy, D. Britto, O.B.G. Assis, *Polimeros* 19 (3) (2009) 241–247.
- [13] T. Kumeria, H. Mon, M.S. Aw, K. Gulati, A. Santos, H.J. Griesser, D. Losic, *Colloids Surf.* 130 (2015) 255–263.
- [14] K. Gulati, S. Ramakrishnan, M.S. Aw, G.J. Atkins, D.M. Findlay, D. Losic, *Acta Biomater.* 8 (2012) 449–456.
- [15] K. Kant, D. Losic, *Phys. Status Solidi BRL* 3 (2009) 139–141.
- [16] G.H. Liu, N. Høivik, K.Y. Wang, H. Jakobsen, *J. Mater. Sci.* 46 (2011) 7931–7935.
- [17] D.A. Wang, L.F. Liu, *Chem. Mater.* 22 (2010) 6656–6664.
- [18] S. Ji, G. Zhang, *J. Ceram. Soc. Jpn.* 118 (2010) 291–294.
- [19] L.L. Pavón, H.Y. Kim, H. Hosoda, S. Miyazaki, *Scr. Mater.* 95 (2015) 46–49.
- [20] J. Fu, A. Yamamoto, H.Y. Kim, H. Hosoda, S. Miyazaki, *Acta Biomater.* 17 (2015) 56–67.
- [21] P. Roy, S. Berger, P. Schmuki, *TiO₂ nanotubes: synthesis and applications*, *Angew. Chem.* 50 (2011) 2904–2939.
- [22] W. Carhuapoma, J. Santiago, *Rev. Iberoam. Polimeros* 6 (2005) 333–346.
- [23] E. Costa, M. Pereira, H. Mansur, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 20 (2009) 553–561.