

**EVALUACIÓN ELECTROQUÍMICA DE UN RECUBRIMIENTO ANTI-
TROMBOGÉNICO OBTENIDO POR ANODIZACIÓN DE MICROTUBOS DE
NITINOL**

**JENNIFER PAOLA FLÓREZ CRISTANCHO
FRANCY JOHANA MARÍA MORENO PRADA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA METALÚRGICA Y CIENCIA DE MATERIALES
BUCARAMANGA**

2011

EVALUACIÓN ELECTROQUÍMICA DE UN RECUBRIMIENTO ANTI-TROMBOGÉNICO OBTENIDO POR ANODIZACIÓN DE MICROTUBOS DE NITINOL

**JENNIFER PAOLA FLÓREZ CRISTANCHO
FRANCY JOHANA MARÍA MORENO PRADA**

*Trabajo De Grado, Presentado Como Requisito Para Optar Al Título De
Ingeniera Metalúrgica*

DIRECTOR

M.Sc HUGO ARMANDO ESTUPIÑAN DURÁN

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS

ESCUELA DE INGENIERÍA METALÚRGICA Y CIENCIA DE MATERIALES

BUCARAMANGA

2011

DEDICATORIAS

A Dios y a la Virgen María.

A mis padres Hilda Inés & Juan de Jesús por su esfuerzo y apoyo.

A mis hermanos Eliana María y Juan Daniel por su compañía y cariño.

A mi bisabuela, abuelos, tíos, tías, primos y amigos.

Gracias a todos sinceramente, sus consejos siempre me acompañaran.

Francy Johana María

A tí papíto Díos por tu perfecto e incondicional amor, por recordarme cada día que soy la niña de tus ojos, porque mí presente y futuro están en tus manos y en tí solo puedo esperar lo mejor.

A mís padres Elda Crístancho y Aníbal Flórez por su constante esfuerzo, por creer siempre en mí, por los valores virtudes que sembraron en mí, por su amor y apoyo.

A mí madre, amiga, confidente y tía Ahílen Flórez por su gran cariño, por cada frase de ánimo, cada sabio consejo, por su compañía, por tí daría mí vida entera, te amo hasta el infinito y más allá.

A Mís hermanos: Brillít por ser ejemplo, Stefanny por ser mí amiga, por nuestros sueños compartidos y que estamos empezando a alcanzar, a Katherine por esta relación tan bonita, a Jefferson mí chiníto lindo.

A mí tío Jorge Flórez por su apoyo y cariño, a mí Abuela Edelmira por sus cuidados y gran amor.

A mís amigas: Francý Moreno, Adriana Pachón, Claudia Mantilla, Marcela Cadena, Sílvia Casadiego, por su compañía, por dejarme entrar en sus vidas y permítirme el privilegio de ser su amiga.

A Edwin Bohórquez Guarín, por su apoyo, colaboración y compañía, a Camilo Araque, Jhon Torres por hacer ameno el ambiente de trabajo del laboratorio.

JENNIFER PAOLA FLÓREZ CRISTANCHO

AGRADECIMIENTOS

Al grupo de investigación en corrosión GIC, de la Universidad Industrial de Santander por abrir sus puertas y permitirnos desarrollar las pruebas en su laboratorio.

Al profesor Darío Yesid Peña Ballesteros por la colaboración, paciencia y apoyo.

Al profesor Custodio Vásquez por la motivación y el compromiso con nuestro proyecto.

Al Director de nuestro proyecto Hugo Armando Estupiñán por las enseñanzas y conocimientos aportados para el desarrollo de la investigación.

Al Ingeniero Magister Wilson Vesga por su valioso aporte a este proyecto.

Al señor Ambrosio Carrillo por estar atento a nuestras peticiones y ser incondicional en el desarrollo de este proyecto y a los técnicos de la escuela de ingeniería metalúrgica.

A la Profesora Luz Amparo Quintero y al profesor Álvaro Quiroga Correa por depositar en mí la confianza y permitirme colaborarles en su laboratorio.

Al profesor Orlando José Gómez Moreno, al profesor Arnaldo Alonso Baquero, al ingeniero Luis Orlando Aguirre, ingeniero Ivan Uribe, al ingeniero Afranio Cardona, al profesor Gustavo Neira, al profesor Jaime González, al profesor Walter Pardavé, al profe Jhon Freddy Palacios, por todo su aporte en nuestro proceso de formación.

A Christian René Ibáñez Moreno, la personita que creyó en mí, me brindó su apoyo y por la cual siento gran admiración.

A Edwin Bohórquez Guarín por colaborarnos incansablemente en realizar las pruebas de este proyecto.

A la familia Díaz Padilla por el apoyo incondicional en la culminación de esta etapa tan importante para nuestras vidas.

A la profe Marina Moreno por abrir las puertas de su casita con la sinceridad y el cariño de siempre.

A los doctores Félix Arturo Prada Díaz y Sergio Eduardo Prada Plata, por facilitar material para los montajes del proyecto.

A cada uno de nuestros amigos que siempre estuvieron con nosotras apoyándonos siempre Adriana Pachón, Claudia Mantilla, Marcela Cadena, Adriana Vega, Dora Lucia Pabón, Henry Rodríguez, Pilar Jaimes , Carolina Castillo, Layla Becerra, Chehín Arias, Manuel Mantilla, Giovanni Rivera, Dieguito Vesga, Silvia Casadiego, Juan Camilo Araque, Juliana Cote, Freddy Gutiérrez.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	19
1 OBJETIVOS.....	21
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	21
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	21
2 ESTADO DEL ARTE DE LA INVESTIGACIÓN	22
3 MARCO TEÓRICO	29
3.1 NITINOL	29
3.1.1 Nitinol como biomaterial	30
3.2 AMBIENTE BIOLÓGICO	31
3.2.1 Proteínas presente en la sangre.....	31
3.2.2 Problemas con los implantes.....	32
3.3 SUPERFICIE DE LOS MATERIALES.....	34
3.4 PROCESO DE ANODIZADO.....	34
3.4.1 Efecto del tiempo de exposición de los electrodos de trabajo (NiTi).	36
4 METODOLOGÍA	37
4.1 ESQUEMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.....	37
4.2 REVISIÓN Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO.....	38
4.3 DESARROLLO EXPERIMENTAL DEL PROYECTO.	38
4.3.1 Caracterización del material empleado.....	39
4.3.2 Evaluación superficial de los microtubos, antes y después del proceso de anodización	40
4.3.3 Proceso de anodización de microtubos de Nitinol	41
4.3.4 Desarrollo de pruebas electroquímicas	42

4.3.4.1 Materiales y equipos	42
4.3.4 Evaluación de la adsorción de proteína de albúmina sobre las superficies preparadas.....	46
5 RESULTADOS Y ANÁLISIS	47
5.1 CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DE LOS MICROTUBOS DE NITI, DESPUÉS DEL ANODIZADO.	47
5.1.1 Caracterización por AFM.....	47
5.2 PROCESO DE ANODIZADO.....	48
5.2.1 Caracterización por AFM.....	48
5.2.2 Caracterización por SEM de las superficies del Nitinol inmersas en solución Hank en presencia de albúmina.	50
5.3 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA	55
5.3.1 Modelo de circuitos equivalentes asociado al proceso de adsorción sobre las superficies de Nitinol.....	57
5.4 PROCESO DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNA REPRESENTADO MEDIANTE LA ISOTERMA DE LANGMUIR.	59
CONCLUSIONES.....	62
RECOMENDACIONES.....	63
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
ANEXOS	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microtubos de Nitinol	29
Figura 2. Fabricación de stents a partir de microtubos.....	30
Figura 3. Condiciones de entrega de los microtubos de Nitinol.....	39
Figura 4. Microcortadora Buehler.....	40
Figura 5. Montaje empleado para el anodizado de los microtubos de Nitinol.	41
Figura 6. Acople de los microtubos y alambres de Nitinol para realizar las pruebas electroquímicas a) microtubo sin anodizar, b) anodizado sulfato de sodio, c) anodizado ácido acético.	43
Figura 7. Montaje para realizar las pruebas de Espectroscopía de Impedancia Electroquímica.....	45
Figura 8. AFM de superficie de Nitinol sin modificación.	47
Figura 9. AFM de superficie modificada con sulfato de sodio por 1h.	48
Figura 10. AFM de superficie Nitinol modificada con ácido acético por 1h.....	49
Figura 11. Micrografías de SEM de Nitinol inmerso en solución Hank con 0.001g/ml de albúmina, después de 1h en solución y 37 °C de temperatura a 1 μ m. de escala.	50
Figura 12. Micrografías de SEM de Nitinol inmerso en solución Hank con 0.001g/ml de albúmina, después de 1h en solución y 37 °C de temperatura 50 μ m.	51
Figura 13. Micrografías de SEM de Nitinol inmerso en solución Hank con 0.001g/ml de albúmina, después de 1h en solución y 37 °C de temperatura, a 5 μ m de escala.	52
Figura 14. Micrografías de SEM de contraste de Nitinol inmerso en solución Hank con 0.001g/ml de albúmina, después de 1h en solución y 37 °C de temperatura, 10 μ m de escala.	53
Figura 15. Diagramas de a) Bode b) Nyquist para microtubos de Nitinol sin anodizado en presencia de proteína.	56

Figura 16. Modelos de circuitos equivalentes para el sistema de adsorción de albúmina sobre los microtubos de Nitinol.....	59
Figura 17. Representación del proceso de adsorción de proteína de acuerdo a la linealización de la isoterma de Langmuir para probetas anodizadas con sulfato de sodio, ácido acético y sin modificación superficial.	60
Figura 18. Isotermas de adsorción de albúmina sobre microtubos de Nitinol con y sin modificación superficial en solución Hank.	60

LISTA DE TABLAS

Tabla1. Composición química de microtubos de NiTi.....	39
Tabla2. Materiales y equipos utilizados en el proceso de anodizado.....	42
Tabla 3. Materiales y equipos para realizar pruebas electroquímicas.....	43
Tabla4.Composición fisiológica simulada según norma ASTM F2129 Ph =7.4....	44
Tabla 5. Rugosidad promedio microtubos anodizados 1h en los diferentes electrolitos.....	50

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I. Método de fabricación de un stent.....	69
ANEXO II. Diagrama de estabilidad del NiTi.....	71
ANEXO III. Cálculo del área de los microtubos y alambres de NiTi.....	72
ANEXO IV. Cálculo para determinar las densidades de corriente a utilizar en el proceso de anodizado.....	73
ANEXO V. Cálculo para elaborar las soluciones a utilizar como electrolitos en el proceso de anodizado.....	74
ANEXO VI. Condiciones para el proceso de anodizado.....	75
ANEXO VII. Perfiles de rugosidad del AFM.....	76
ANEXO VIII. Resultados de EDX.....	78
ANEXO IX. Diagramas de Bode y Nyquist para los diferentes sistemas....	84
ANEXO X. Valores de las resistencias a la transferencia de carga, para los microtubos anodizados, obtenidos con Z View.....	86
ANEXO XI. Resultados de las simulaciones en Zview.....	87
ANEXO XII. Tablas datos isothermas de Langmuir.....	92

RESUMEN

TÍTULO:

EVALUACIÓN ELECTROQUÍMICA DE UN RECUBRIMIENTO ANTI-TROMBOGÉNICO OBTENIDO POR ANODIZACIÓN DE MICROTUBOS DE NITINOL^{*}.

AUTOR: FLÓREZ CRISTANCHO, Jennifer Paola y MORENO PRADA, Francy Johana María**.

PALABRAS CLAVE: Nitinol, Anodizado, Adsorción de Proteínas, Trombogénesis, Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIE).

DESCRIPCIÓN

La importancia del Nitinol debido a sus propiedades de superelasticidad, memoria de forma y su aplicación como material biocompatible, ha motivado estudios de mejoramiento superficial para aplicaciones médicas específicas. Se sabe que el Nitinol es comúnmente usado como stent cardiovascular, cuya función principal es permitir el paso del flujo sanguíneo por su interior tubular sin restricciones. Problemas que pueden dificultar su correcto funcionamiento, se presentarían si estos tubos se bloquearan por la adhesión de compuestos de naturaleza fisiológica o trombos, formados por proteínas, lípidos u otras sustancias que son transportadas a través del flujo sanguíneo. Este bloqueo se debe al carácter hidrofílico comprobado de la superficie del Nitinol. Como solución a este problema, se ha planteado una alternativa de tratamiento superficial que consistió en hacer crecer un óxido sobre esta superficie con características menos hidrofílicas. En este orden de ideas, en este trabajo de grado se realizó un tratamiento de anodizado electrolítico galvanostático a partir de soluciones de sulfato de sodio y ácido acético. La caracterización de la superficie anodizada y la respectiva comparación con la superficie sin tratamiento, se llevó a cabo con las técnicas de Espectroscopía de Impedancia Electroquímica, con la cual se evaluó a 37,5°C la adsorción de proteína de albúmina sobre la superficie, proteína que fue disuelta en solución Hank. Caracterización morfológica y topográfica fue realizada por Microscopía Electrónica de Barrido y Microscopía de Fuerza Atómica. Los resultados mostraron que el tratamiento superficial realizado con ácido acético presentó menor adsorción de proteína que la superficie sin tratamiento.

^{*} Proyecto de grado

^{**} Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de Materiales. Director M.Sc. ESTUPIÑAN DURÁN, Hugo Armando

ABSTRACT

TITLE:

ELECTROCHEMICAL EVALUATION OF AN ANTI-THROMBOGENIC COATING BASED ON ANODIZATION OF NITINOL MICROTUBE *

AUTHOR: FLÓREZ CRISTANCHO, Jennifer Paola Moreno and MORENO PRADA, Francy Johana María **

KEY WORDS: Nitinol, Anodized, Protein adsorption, Thrombogenesis, Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIE).

DESCRIPTION

The Nitinol's important properties, such as superelasticity, shape memory and biocompatibility, have motivated researchers to study and improve its surface for specific medical applications. Nitinol is commonly used as cardiovascular stent, whose main function is to allow the flow of blood through its interior without restrictions. Problems that may hinder its proper functioning would arise if these tubes were blocked by the accession of compounds of physiological nature or thrombi, consisting of proteins, lipids or other substances that are transported through the bloodstream. This blockade is due to the proved hydrophilic character of the Nitinol surface. To solve this problem, an alternative surface treatment has been implemented by growing a less hydrophilic oxide on the surface. In this vein, this thesis proposes a galvanostatic anodization electrolyte treatment from solutions of sodium sulfate and acetic acid. The characterization of the anodized surface and their comparison with the untreated surface was carried out by using electrochemical impedance spectroscopy. By this technique, the protein adsorption on the surface of albumin (a protein that was dissolved in a Hank solution) was evaluated at 37.5⁰C. Morphological and topographical characterization was performed by scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM). The results showed that the surface treated with acetic acid had lower protein adsorption than the untreated surface.

*Graduation Project.

** Faculty Physical Chemistry of Engineering School of Metallurgical Engineering. Director M.Sc ESTUPIÑAN DURAN, Hugo Armando.

INTRODUCCIÓN

El avance que han tenido los metales en aplicaciones biomédicas ha llevado a un incremento en el interés de las aleaciones con memoria de forma, es el caso del Nitinol, una aleación de níquel-titanio, considerada como un material inteligente ya que éste responde a cambios de temperatura y tensión, debido a sus excelentes propiedades tales como: memoria de forma, superelasticidad y biocompatibilidad. El resultado de dicho interés ha llevado a enfocar la investigación hacia los tratamientos superficiales de este material: consiguiendo modificar el área externa de microtubos de Nitinol, mediante un proceso de anodizado con electrolitos específicos, esto se realizó por la gran importancia que tiene la interfase biomaterial-tejido. Teniendo en cuenta que este implante debe permanecer dentro del organismo en contacto de fluidos biológicos, el proceso más importante que ocurre es la adsorción de proteínas, lípidos o células, la cual es un problema, porque puede generar bloqueos en las paredes del microtubo de NiTi en forma de trombos, generando posibles problemas como trombogénesis y reestenosis, ya que la sangre no fluye de forma adecuada, posibilitando que se presente un paro cardíaco. Para la modificación superficial de los microtubos, se realizó un anodizado electrolítico en solución de ácido acético y solución de sulfato de sodio. Para la caracterización superficial se empleó la técnica de Espectroscopía de Impedancia Electroquímica con el fin estudiar la adsorción de proteína de albúmina sobre la superficie de los microtubos modificados. La albúmina es una proteína que se encuentra en gran cantidad en la sangre y por la conformación de su estructura química, se conoce que posee carga superficial, lo cual favorece la evaluación planteada en este trabajo de grado. Se manejó el concepto de cantidad de proteína adsorbida, como el inverso de la resistencia a la transferencia de carga del proceso de adsorción, medida a media-altas frecuencias en los espectros de impedancia obtenidos, cuyo valor, significa la carga transferida cuando la proteína se pone en contacto con la superficie del NiTi y es atraída por fuerzas electrostáticas, dipolo-dipolo con superficies hidratadas o fuerzas de Van

der Waals. La topografía superficial y la rugosidad del Nitinol, con y sin anodizado, son factores que posiblemente afectan la adsorción de proteínas y fueron evaluados por Microscopía de Fuerza Atómica y Microscopía Electrónica de Barrido. Esta última técnica permitió observar la adhesión posiblemente de proteína sobre las superficies evaluadas.

1 OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar electroquímicamente un recubrimiento anti-trombogénico obtenido por anodizado electrolítico en superficies de microtubos de Nitinol.

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Modificar la superficie de microtubos de Nitinol mediante anodizado electrolítico, en soluciones de ácido acético y sulfato de sodio.
- Evaluar electroquímicamente la adsorción de proteína sobre la superficie de los microtubos de Nitinol modificados por anodizado.

2 ESTADO DEL ARTE DE LA INVESTIGACIÓN

El uso del Nitinol como un material biocompatible ha llevado a varios investigadores a realizar estudios sobre esta aleación con el fin de modificar las propiedades superficiales y estudiar efectos adversos atendiendo a su aplicación biomédica. Para la documentación de este proyecto se ha tenido en cuenta el resultado de investigaciones llevadas a cabo en los últimos años sobre el NiTi como biomaterial; propiedades mecánicas, superficiales y el resultado de la modificación, ya que se puede mejorar la interacción del material con el medio circundante, atendiendo a sus propiedades como carga superficial, energía superficial, rugosidad etc.

Pohl, Heßing, Frenzel en 2003, demostraron que los procesos de acabado mecánico incidieron considerablemente en las propiedades de las aleaciones con memoria NiTi. Las probetas de Nitinol fueron electropulidas en estado austenítico y martensítico, los resultados son presentados de acuerdo con las curvas de densidad de corriente-voltaje, las cuales permitieron observar claramente las zonas de pulido satisfactorio, por otro lado les permitió determinar que a elevadas exposiciones de tiempo, se presentaron ondulaciones en la superficie de las probetas, esto de acuerdo a la segregación de material. También mostraron, que no solo los tratamientos superficiales son factores que inciden en las propiedades corrosivas de las aleaciones con memoria de forma, sino también, el estado inicial de la superficie [1].

Cheng, Shi, Man, en 2005, estudiaron el NiTi, anodizado galvanostáticamente en metanol, formando una capa de óxido uniforme, que fue caracterizada por medio de técnicas de espectroscopía y otras

como Microscopía de Barrido Electrónico (SEM por sus siglas en inglés), energy-dispersive X-ray spectrometry (EDS), difracción de rayos X (TF-XRD), microscopía de fuerza atómica (AFM por sus siglas en inglés) y Espectroscopía de rayos X (XPS). La capa de óxido estaba compuesta de una mezcla de TiO_2 y níquel metálico, mientras que la superficie de la capa presentó un compuesto no estequiométrico, la superficie estaba libre de grietas y compuesta por cristales muy finos. También realizaron medición de dureza en la superficie utilizando la escala Vickers, la dureza fue aproximadamente de 1.5GPa y se atribuyó a la presencia de nanopartículas en la capa, las cuales fueron encontradas por XRD. [2].

Hang, et al, en 2009, estudiaron el comportamiento corrosivo de la aleación de NiTi en suero fetal de bovino (FBS), utilizando técnicas para dicha investigación como potencial de circuito abierto, EIS, SEM, XPS, ICP-MS determinando que la presencia de FBS, cambia la dirección en los gráficos obtenidos por OPC hacia valores negativos, formándose una película de óxido más delgada y más porosa, que la formada en PBS. La impedancia de la película de óxido formada en FBS fue más pequeña que la de PBS, pero la impedancia total en la interfase, fue más grande que en FBS por la formación de una biopelícula superficial. Se presentó picado en la aleación después de estar inmersa 200h en FBS, lo cual, no fue observado en las probetas inmersas en PBS. Los resultados de XPS mostraron que la composición de la película de óxido formada en FBS, fue similar a la formada en PBS, la cual fue compuesta principalmente de óxidos de titanio con una pequeña cantidad de hidróxido de titanio. El titanio hidratado se observó sobre la superficie externa de la aleación de NiTi. Los espesores de la película de óxido en la aleación de NiTi inmersas en PBS fueron aproximadamente de 17 ± 3.0 nm y la de las muestras inmersas en FBS, fueron de 10 ± 3.2 nm. Estos resultados estuvieron de acuerdo con los

obtenidos por EIE. La presencia de FBS puede acelerar difusión de los iones de Ni y estos mecanismos fueron investigados y discutidos [3].

Shi, Cheng y Man, en 2006, con el fin de mejorar la resistencia a la corrosión, utilizaron ácido acético como electrolito para anodizar el NiTi para aumentar el espesor de la capa de óxido. Encontraron que existe gran diferencia en los resultados al anodizar el titanio y esta aleación, en este electrolito, siendo mucho más bajo el potencial anódico y el espesor de la película de óxido para el NiTi. Bajo condiciones adecuadas realizaron el anodizado y encontraron por ensayos de perfilometría, que el espesor de la capa de óxido fue de 20 a 25 nm. Después de modificar la superficie, los resultados de la microscopía de fuerza atómica mostraron que la rugosidad aumentó. En este estudio también se realizaron análisis por medio de espectroscopia de fotoelectrones de rayos X, espectroscopia de impedancia electroquímica, resistencia a la polarización y polarización cíclica. Los resultados de estos ensayos, mostraron que este método es simple y se puede mejorar la resistencia a la corrosión del Nitinol [4].

Shabalovskaya, Anderegg, Van Humbeeck, en 2007, investigaron la dificultad que se origina con la liberación de iones de níquel por los dispositivos usados como implantes elaborados en esta aleación. En esta investigación se establecieron las ventajas y desventajas, atendiendo a los diferentes procesos de modificación superficial realizados a esta aleación, además de determinar las limitaciones de estos trabajos. En este trabajo se presenta un estudio minucioso de la topografía de la superficie, además de la química, el comportamiento a la corrosión, la liberación de iones de níquel y las respuestas biológicas del Nitinol modificadas mecánicamente o químicamente, también estudiaron los resultados obtenidos después del

electropulido, tratamientos térmicos, implantación iónica, esterilización en autoclave, además de la deposición de sustancias bioactivas. Los análisis mostraron que la variación entre métodos de modificación, está en que las superficies variaron de unos pocos nanómetros, a micrómetros y que se puede prevenir la liberación de iones de forma eficiente. También ponen de manifiesto que algunos de estos tratamientos que se le pueden hacer al titanio comercialmente puro, pueden servir para el NiTi. También hacen paralelos a la hora de determinar el rendimiento del método para modificar la superficie [5].

Chu, et al, en 2008, estudiaron la estructura y las propiedades biomédicas del Nitinol después de ser sometidas a electropulido y pulido químico, estas características fueron determinadas y comparadas empleando microscopía electrónica de barrido, espectroscopía rayos X, análisis de hemólisis y pruebas de adhesión de plaquetas de la sangre. Los resultados indicaron que después del pulido químico aún hay alta concentración de Ni sobre la superficie del NiTi. Por otro lado, en las probetas electropulidas, se formó una capa débil y delgada de óxido de titanio (10nm espesor) en la superficie, también se encontraron pequeñas cantidades de otros óxidos como (TiO y Ti_2O_3) en dicha capa. Comparado con el pulido químico, el electropulido fue más efectivo en la mitigación (no-difusión) de los iones Ni y la mojabilidad, compatibilidad con la sangre, y la tromboresistencia también puede mejorar. Sin embargo, no encontraron diferencia en la citocompatibilidad entre las muestras químicamente pulidas o electropulidas [6].

Los arcos dentales coloreados, son producidos por la anodización de alambres comerciales de Ti-beta y alambres de NiTi. Chen Sinn-wen, et al, en 2005, realizaron un proceso de anodizado utilizando potenciales entre

10-60V, a una temperatura de 25⁰C. Los electrolitos utilizados fueron ácido sulfúrico, ácido fosfórico, sulfato de sodio y fosfato trisódico. El color de los alambres varió de acuerdo con la variación de potencial; estos fueron examinados metalográficamente. Las composiciones y el espesor de las capas de óxido se determinaron mediante el uso de la espectroscopia de electrones para el análisis químico (ESCA) y la espectroscopía de electrones Auger (AES). Las capas de TiO₂ se encontraron en ambos tipos de alambres anodizados y no se detectó Ni en la superficie del alambre de NiTi anodizado. Los colores de los alambres, se deben a interferencias de luz a través de las capas de óxido. El espesor de las capas de óxido aumentó con el aumento de los voltajes aplicados, al igual, que con el aumento en el tiempo de anodización. La capa de óxido se formó de manera uniforme en los alambres anodizados Ti -beta. Sin embargo, la rugosidad de la superficial del NiTi aumentó después de ser anodizados [7].

El Nitinol es una aleación con memoria de forma y superelasticidad, por esta razón son de gran importancia en la fabricación de dispositivos biomédicos; una de estas aplicaciones, son los stent, los cuales son dispositivos que son implantados intra vascularmente, con el fin de permitir el flujo sanguíneo sin obstáculos. Sin embargo la adsorción de proteínas o lípidos que provienen del flujo sanguíneo, sobre la superficie, es un hecho controversial, por el riesgo que genera una obstrucción del flujo sanguíneo. Clarke, et al, estudiaron, en 2006, propiedades superficiales como la rugosidad, hidrofobicidad y composición elemental en la adsorción de albúmina. Lo que buscaban con esta investigación, era determinar de forma directa la adhesión de la proteína en la superficie de alambres de Nitinol por medio de la técnica de Espectroscopía de masa matriz, asistida por laser para desorción/ionización. En todas las muestras fue detectada la albúmina. La rugosidad de la superficie y la hidrofobicidad no tuvieron

efecto sobre la adsorción de albúmina. Sin embargo se observó una clara correlación entre el níquel, la concentración oxígeno y la cantidad de albúmina adsorbida sobre la superficie. Las muestras con niveles más altos de níquel y menos oxígeno en la capa de óxido de la superficie de los alambres, mostraron un aumento en la adsorción de albúmina, lo cual podría dar lugar a mayor biocompatibilidad. Sin embargo, el níquel es un elemento tóxico y puede causar muchos efectos adversos en los seres humanos, el Nitinol presentó baja concentración superficial de iones Ni, lo cual hace de este material, atractivo en aplicaciones médicas [8].

Tepe, et al, en 2006, demostraron que material constituyente y las propiedades superficiales de los stent intravasculares, desempeñan un papel fundamental en la activación de las plaquetas, provocando la adhesión de las células inflamatorias, que consecuentemente, lleva al re-estrechamiento causado por hiperplasia neointimal. Para mejorar estas características, además de modificaciones mecánicas y químicas, se buscó desarrollar un recubrimiento. Los stents recubiertos con polímeros, se utilizan como vehículo para la entrega de fármacos locales que pueden inhibir controladamente la formación de trombos. En este estudio se compararon las diferentes modificaciones superficiales a un diseño de stent de Nitinol. Además, utilizaron técnicas convencionales, de pasivación y pulido electrolítico, se evaluaron los recubrimientos con heparina, aluminio y un polímero de poliuretano, de acuerdo a sus características trombogénicas e inflamatorias. Utilizaron el ciclo de Chandler para simular las condiciones de flujo arterial ex vivo, mediante la circulación de flujo sanguíneo dentro de tubos de PVC. Los stent fueron inmersos por 120 minutos en contacto con la sangre. Para determinar la activación plaquetaria y la reacción inflamatoria, el recuento de plaquetas, lo hicieron mediante pruebas de microscopía electrónica de barrido, visualizando así,

las reacciones que ocurrían. El pulido mecánico y la pasivación, no mejoraron las características de la superficie del stent, mientras que el electropulido, sandblasting, y el recubrimiento de aluminio, disminuyó la activación de la coagulación. En cuanto a la trombogenicidad, el recubrimiento de heparina no tuvo ningún efecto beneficioso. El menor potencial trombogénico, se encontró en los stent recubiertos de poliuretano. Si bien las modificaciones mecánicas y químicas son capaces de reducir la trombogenicidad, en particular el recubrimiento con este polímero de poliuretano, parece ser superior a estas modificaciones con respecto a los parámetros evaluados en este entorno experimental. El bucle de Chandler es una herramienta valiosa para probar recubrimientos poliméricos "ex vivo" ya que estas modificaciones pueden reducir el rendimiento de drogas mediante la inducción de la reacción inflamatoria en sí mismos [9].

Chu, Wang y Yin, en 2008, estudiaron los efectos de la oxidación anódica en la biocompatibilidad del NiTi, al ser modificados en ácido sulfúrico. Fue caracterizada la estructura superficial, la compatibilidad con la sangre, mojabilidad y la liberación de iones Ni por su nocividad. Aunque la película de óxido de titanio, como resultado de la oxidación anódica en este electrolito, mostró una estructura porosa, en la práctica se pudo bloquear la difusión de Ni en el fluido corporal simulado (SBF). Comparando con el pulido químico, la oxidación anódica en el electrolito de H_2SO_4 , también pudo mejorar la mojabilidad, la compatibilidad con la sangre y la tromboresistencia de la aleación [10].

3 MARCO TEÓRICO

3.1 NITINOL

En la figura 1 se muestra una fotografía de los microtubos de nitinol empleados en esta investigación.

Figura 1. Microtubos de Nitinol



Fuente:

http://www.uis.edu.co/portal/investigacion/centros/biomateriales/proyectos/Caracterizacion_aleacion_con_memoria_NiTi.pdf

Las aleaciones con memoria de forma NiTi son compuestos intermetálicos basados en una composición aproximadamente equiatómica (anexo II). Estas aleaciones siguen presentando propiedades de memoria de forma en un rango aproximado de entre 49% hasta 52% atómico de Ni. Dependiendo de la historia termomecánica del material, este porcentaje puede aumentar un poco más [11]. El NiTi puede ser comparado con el acero inoxidable debido a que sobre su superficie se forma una capa protectora de naturaleza y composición de la propia aleación. Los óxidos de titanio (TiO_2) y los óxidos de níquel en pequeñas

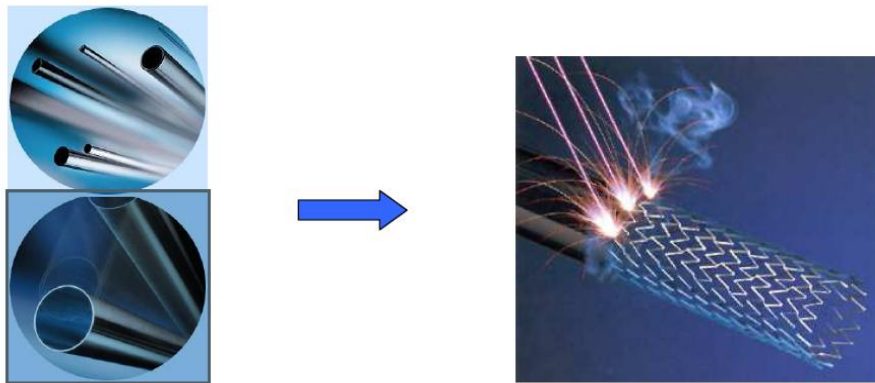
cantidades (NiO y Ni_2O_3) son los principales componentes superficiales de estas películas [12].

3.1.1 Nitinol como biomaterial

Las aleaciones de níquel-titanio son aleaciones que se utilizan cada vez más en aplicaciones biomédicas, por sus interesantes propiedades de superelasticidad, memoria de forma, resistencia a la corrosión y biocompatibilidad [13]. Estas aleaciones son muy utilizadas en (ortodoncia, cardiología, ortopedia, urología, etc) [14]. En la figura 2 se muestra el proceso de fabricación de este dispositivo.

3.1.1.1 Stent de Nitinol

Figura 2. Fabricación de stents a partir de microtubos.



Fuente: <http://www.memry.com>

Fuente:

http://www.uis.edu.co/portal/investigacion/centros/biomateriales/proyectos/Caracterizacion_aleacion_con_memoria_NiTi.pdf

Los stent, son pequeñas estructuras en forma de malla de alambre, fabricados a partir de tubos de pared delgada, (figura 2) [15], utilizados en cirugías

cardiovasculares, colocados dentro de arterias, parcialmente bloqueadas, que actúan como soporte interno y previenen la obstrucción del flujo de sangre (anexo I). Para introducir estos dispositivos, se utilizan catéteres como sistema transportador el cual se inserta en el sistema vascular hasta el sitio de la obstrucción; allí el stent se libera y se despliega produciendo la dilatación de la arteria [10].

3.2 AMBIENTE BIOLÓGICO

Para el caso de catéteres, stents y filtros cuya finalidad es su aplicación en cirugía cardiovascular, es importante mencionar algunos aspectos fisiológicos, anatómicos y biomecánicos del sistema circulatorio, para tener visualización del ambiente y establecer las condiciones referentes a cargas y medios agresivos a que son expuestos los biomateriales empleados en esta parte del cuerpo humano. La sangre es un fluido bastante agresivo para los biomateriales metálicos siendo considerada como una solución salina oxigenada con un contenido aproximado de 0,9% en sales, ligeramente alcalina con un pH \approx 7,4 y a una temperatura de 37°C [16]. El fluido sanguíneo está constituido de agua, compuestos complejos, oxígeno disuelto y grandes cantidades de iones de sodio (Na^+) y cloro (Cl^-) y otros electrolitos como bicarbonato y pequeñas cantidades de potasio, calcio, magnesio, sulfato, aminoácidos, proteínas, plasma, glucosa, etc.

3.2.1 Proteínas presente en la sangre

Una proteína es un copolímero de aminoácidos enlazados por enlaces peptídicos. Existen más de 20 aminoácidos en la naturaleza, que tienen en común una estructura dentro de la cual se distingue una función a amina (NH_2) y una función ácido carboxílico (COOH) en el mismo carbono. Estos aminoácidos difieren por su

radical, o grupos laterales, que tienen una polaridad, una hidrofobicidad y una carga diferente. Las estructuras tridimensionales de la proteína le confieren una actividad biológica específica que les permite, por ejemplo, ser reconocida e interactuar con los receptores celulares [11].

3.2.1.1 Albúmina de Suero Bovino (ASB)

La albúmina es una proteína principal, predominante en el plasma sanguíneo, con una concentración de entre 35 y 55 mg/ml correspondiente al 60-70% de este [17], es una proteína globular relativamente pequeña, su punto isoeléctrico está alrededor de pH 4.6 (albúmina humana), y consecuentemente lleva una carga global negativa a pH fisiológico [14].

3.2.2 Problemas con los implantes

La aleación de NiTi tiene buena biocompatibilidad. Sin embargo, esta puede variar, teniendo en cuenta algunos factores:

3.2.2.1 Coagulación de la sangre

La presencia de un material extraño en el cuerpo, provoca una reacción que puede causar la coagulación de la sangre en contacto con el material. Para evitar este proceso, se deben utilizar materiales antitrombogénicos o actuar sobre la superficie de ellos para mejorar esta propiedad. Se conocen diversos factores que afectan la compatibilidad con la sangre:

- Rugosidad superficial del material: más rugosidad, implica más superficie de contacto con la sangre.
- Humectabilidad de la superficie: si es hidrofílica o hidrofóbica.

- Electroquímica de la superficie: la superficie interior de los vasos sanguíneos está cargada negativamente. El carácter antitrombogénico de esta superficie, se debe a que la sangre también está cargada negativamente. Hay un fenómeno de repulsión que evita la coagulación de la sangre en la superficie de los vasos.

3.2.2.2 Trombogenicidad

La utilización del NiTi en aplicaciones en las cuales el material está constantemente en contacto con la sangre, como en el caso de los stents cardiovasculares, es problemático, ya que es un material trombogénico. A pesar de que se hayan utilizado y se siguen utilizando stents de NiTi con mucho éxito, existen casos en los cuales se han observado la formación de trombos.

Estos coágulos de sangre van, poco a poco, dificultando el paso de la sangre hasta impedirlo, pudiendo provocar la muerte del paciente [11]. La alta reactividad de los metales con la sangre, provoca la adhesión de plaquetas y su agregación, lo cual inicia los procesos trombogénicos, que aún bajo medicación, son difíciles de controlar.

3.2.2.3 Reestenosis

El stent, al mantener abierto el vaso sanguíneo, contribuye a mejorar el flujo de sangre al músculo cardíaco y a reducir el dolor de la angina de pecho. Sin embargo, un alto porcentaje de pacientes corren el riesgo de sufrir obstrucciones adicionales en la zona tratada, es decir, que la arteria se cierre de nuevo, proceso que se denomina “reestenosis”. La reestenosis está influenciada por las propiedades superficiales (la energía superficial, la textura, el potencial superficial y la estabilidad de la capa pasiva) del implante cardiovascular, ya que estas

controlan la formación de trombos y la hiperplasia o crecimiento del tejido o pared interna de las arterias [18].

3.3 SUPERFICIE DE LOS MATERIALES

Las propiedades superficiales de un metal o aleación, son esencialmente determinadas por la naturaleza y propiedades de la película superficial naturalmente formada, o capa intencionalmente producida sobre el sustrato. La superficie del Ti y sus aleaciones, son usualmente modificadas usando varios procesos para mejorar propiedades superficiales específicas del sustrato, satisfaciendo diferentes requerimientos en varias aplicaciones. La formación de la película o capa de óxido sobre la aleación de Ti, es una técnica de modificación común para mejorar la resistencia a la corrosión, resistencia al uso u adherencia, etc. Sobre las aleaciones de Ti, pueden ser formadas capas de óxido relativamente gruesas por métodos químicos, térmicos, o electroquímicos. La naturaleza y características de la capa de óxido formada, dependen de las condiciones de los procesos y también de la composición del sustrato.

3.4 PROCESO DE ANODIZADO

La anodización es un proceso electroquímico de formación de capas de óxido en la superficie del metal. La diferencia de potencial aplicado entre ánodo y cátodo, determina el espesor de la capa formada en la superficie del metal. Potenciales más altos, implica una intensidad más alta, llevando a que la capa formada tenga mayor espesor [19]. En el anodizado del titanio y sus aleaciones, pueden ser utilizados una amplia variedad de electrolitos, los cuales pueden ser ácidos o bases diluidos, en el proceso, pueden variarse las condiciones operativas, incluyendo la concentración y composición del electrolito, presencia de aditivos,

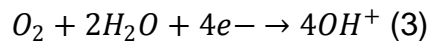
tiempo, voltaje, amperaje y temperatura. Según el proceso elegido, el anodizado puede generar en la superficie del metal, propiedades específicas, algunas de estas son [25]:

- Incremento en la resistencia a la corrosión
- Resistencia al desgaste abrasivo
- Imparte apariencias decorativas
- Incrementa la adhesión de pinturas

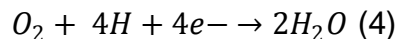
Las reacciones de oxidación (anódica) para el titanio y el níquel que se pueden presentar, son:



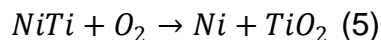
En este proceso, la reacción de reducción más importante es:



En forma natural, las aleaciones de titanio tienden a formar óxidos espontáneamente, siendo válidas las anteriores reacciones en el pH del medio fisiológico del cuerpo humano de 7,4, sin embargo, hay determinadas zonas del cuerpo humano donde se aplican implantes, en las cuales el pH tiende a ser moderadamente ácido y la reacción de reducción puede ser:



La reacción de oxidación del NiTi en presencia de oxígeno se muestra continuación:



Los iones de Ti y O_2 son formados en las reacciones redox, donde el oxígeno es conducido a través del electrolito y atraído por el ánodo en el momento de aplicar el campo eléctrico, produciendo el crecimiento de la capa de óxido. Por lo tanto, el campo eléctrico debe ser suficiente, para mover los iones a través de la capa de

óxido, indicando que el espesor final de la capa durante el anodizado, es linealmente dependiente del voltaje aplicado [20].

3.4.1 Efecto del tiempo de exposición de los electrodos de trabajo (NiTi).

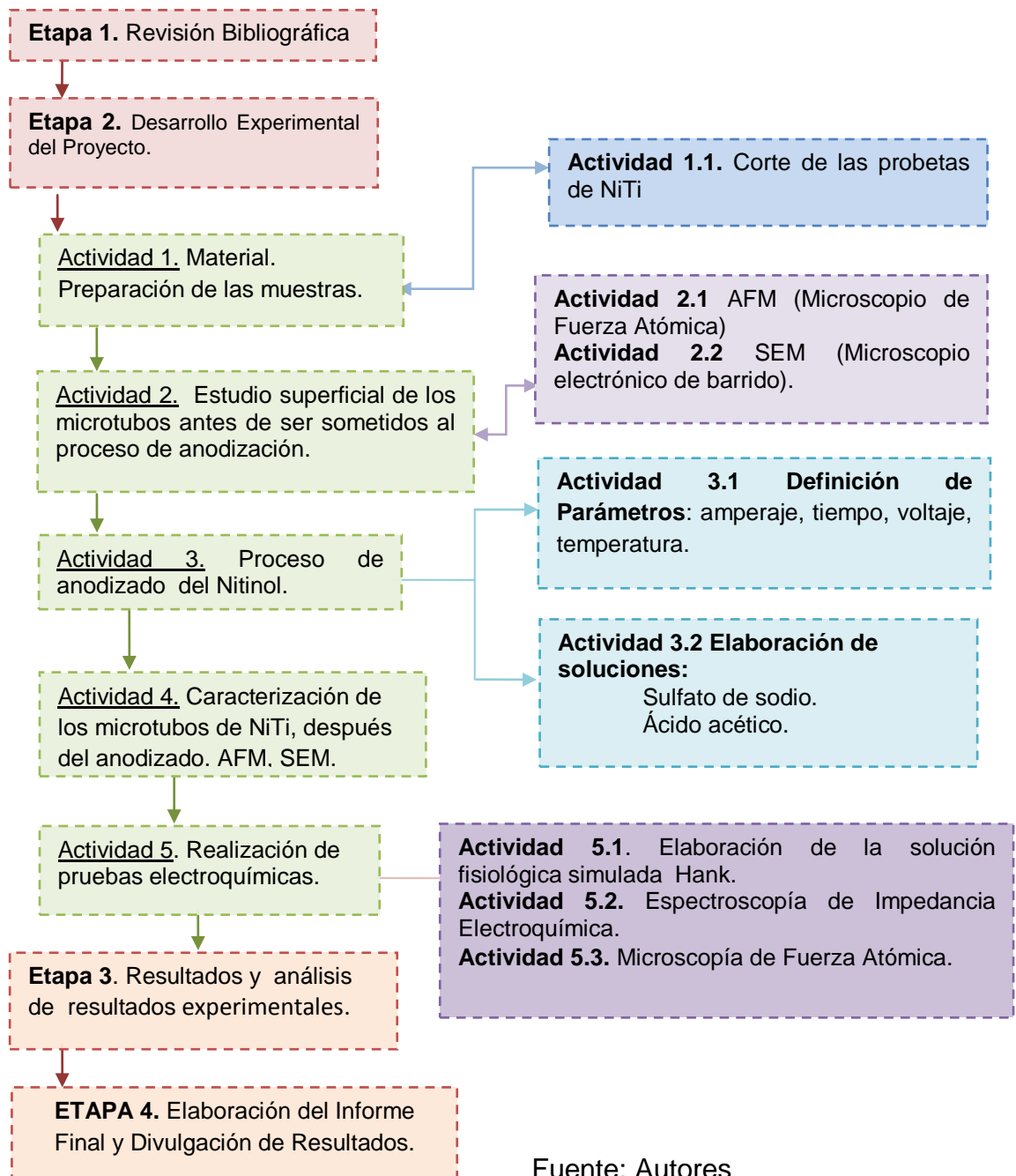
El proceso de anodizado requiere de un tiempo de exposición que puede ser en segundos o minutos, dependiendo de las condiciones de operación como el voltaje, temperatura, tipo de electrolito, y la forma de llevar a cabo oxidación.

En el anodizado electroquímico, el tiempo está directamente relacionado con la variación de densidad de corriente y con el periodo de crecimiento y estructuración del óxido formado. Cuando estos valores sean constantes, indica que el crecimiento de la capa es casi nula por lo tanto se indica además, que el tiempo de anodizado ha finalizado [20].

4 METODOLOGÍA

4.1 ESQUEMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

Figura a. Esquema general del diseño experimental.



Fuente: Autores

4.2 REVISIÓN Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO.

Durante el desarrollo del proyecto, se consultaron distintas fuentes bibliográficas, como libros especializados, trabajos de postgrado, maestría y pregrado, artículos de investigación científica y bases de datos relacionados con los siguientes temas:

- Nitinol
- Anodizado de Nitinol
- Fenómenos superficiales
- Adsorción de proteínas
- Biocompatibilidad
- Trombogénesis
- Reestenosis
- Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE)

4.3 DESARROLLO EXPERIMENTAL DEL PROYECTO.

El estudio electroquímico del recubrimiento obtenido por anodizado, realizado a los microtubos de Nitinol, se realizó en fluido fisiológico simulado Hank, preparado según la norma para evaluación electroquímica de biomateriales ASTM F2129, adicionando diferentes concentraciones de albúmina, con el fin de establecer la influencia del anodizado en la adsorción de esta proteína. Con base en la revisión de la bibliografía, se determinaron las variables y condiciones experimentales de la investigación, para el proceso de anodizado galvanostático y para las pruebas electroquímicas. Con el tratamiento de anodizado, se modificó la superficie de los microtubos, mejorando la estabilidad de la película de óxido de titanio formada sobre el NiTi, con esto se buscó, que la mojabilidad de la superficie de la aleación fuera la menor posible para disminuir considerablemente la adhesión de proteínica. Con las pruebas electroquímicas, se obtuvieron parámetros relacionados con la adsorción. Los análisis de estos ensayos, complementados

con las evaluaciones de SEM y AFM, permitieron determinar la viabilidad de usar el proceso de anodizado en alguna de las soluciones electrolíticas propuestas como alternativa de tratamiento superficial, previa a la implantación intravascular.

4.3.1 Caracterización del material empleado.

4.3.1.1 Descripción de los microtubos de Nitinol

En la figura 3, se muestran los microtubos de Nitinol evaluados.

Figura 3. Condiciones de entrega de los microtubos de Nitinol.



Fuente: Autores

La composición de los microtubos de Nitinol empleados en este trabajo, se muestra en la tabla 1. Dicha determinación de la composición química de la aleación fue realizada mediante la técnica de espectrometría de fluorescencia de rayos X (XFR) [15].

Tabla 1. Composición química de microtubos de NiTi.

<i>Composición química (% wt)</i>	
<i>Ni</i>	<i>Ti</i>
<i>55.78</i>	<i>44.09</i>

Fuente: Tesis de Maestría W. Vesga.

4.3.1.2 Preparación de los microtubos de NiTi.

- Corte transversal de los microtubos

Para la obtención de las muestras de trabajo, en una primera parte se realizó el corte de los microtubos de Nitinol, en una microcortadora *BUEHLER ISOMET 1000 PRECISIÓN SAW* (figura 4), con un disco duro de diamante HC 15. Este proceso fue realizado a bajas velocidades (100 rpm), con el fin de evitar transformaciones de fase en la aleación por sobrecalentamiento. La longitud de los microtubos de NiTi a utilizar en cada ensayo fue de $0,75 \pm 0,003$ mm. Los microtubos fueron pulidos mecánicamente en los extremos, utilizando papel abrasivo número 400, lo cual se realizó, con el fin de eliminar las rebabas resultantes después del corte, también se efectuó la posterior limpieza en un baño ultrasónico durante 7 minutos en alcohol y en agua destilada.

Figura 4. Microcortadora Buehler.



Fuente: Autores, Laboratorio GIC.

4.3.2 Evaluación superficial de los microtubos, antes y después del proceso de anodización

El estudio superficial de las probetas de NiTi, se realizó mediante Microscopía de Fuerza Atómica (AFM por sus siglas en inglés), estas pruebas se realizaron en microtubos sin modificación en su estado inicial y con el tratamiento de anodizado.

La técnica de SEM, fue usada para estudiar la morfología de la superficie de los microtubos modificados, después de ser inmersa en solución Hank, en presencia de proteína. La morfología de los microtubos se realizó con un voltaje de aceleración de 20kv, en microtubos con y sin modificación, estos microtubos fueron inmersos en solución Hank enriquecida con albúmina durante dos horas [17], con el fin de determinar el efecto que causa la anodización en la adhesión de las proteínas.

4.3.3 Proceso de anodización de microtubos de Nitinol

Teniendo en cuenta que el anodizado es un proceso de oxidación anódico, se buscó obtener una capa de óxido bien adherida a la superficie del NiTi y aumentar el espesor de la capa de óxido formada y a su vez mejorar su estabilidad. En la figura 5 se muestra el montaje usado para el anodizado de Nitinol.

Figura 5. Montaje empleado para el anodizado de los microtubos de Nitinol.



Fuente: Autores.

En la Tabla 2 se observa las especificaciones de los materiales y equipos empleados en los experimentos. Durante este proceso se utilizaron dos electrolitos: sulfato de sodio y ácido acético con los cuales fue variado también el tiempo de anodizado de los microtubos (anexo IV).

Tabla 2. Materiales y equipos utilizado en el proceso de anodizado.

MATERIALES	EQUIPOS
<ul style="list-style-type: none"> • Longitud electrodos de trabajo de Nitinol: 0.75± 0.003 mm • Electrolitos: Ácido acético 1M Sulfato de sodio P/P= 3% • Electrodo auxiliar: acero inoxidable 316L. • Celda: vaso de precipitado 50 ml. 	<ul style="list-style-type: none"> • Fuente de potencia THERMO EC570-90. Voltaje 115 V Frecuencia 50 / 60 Hz.

Fuente: Autores

4.3.4 Desarrollo de pruebas electroquímicas

En esta etapa se realizaron pruebas electroquímicas, en las cuales se utilizó como electrolito, solución fisiológica simulada Hank, elaborada según norma ASTM , todos los ensayos se realizaron en condiciones controladas de pH y temperatura (37⁰C y pH=7.4), con el fin de obtener un sistema electroquímico complejo similar al del cuerpo humano. Para desarrollar las pruebas electroquímicas fue necesario realizar una serie de actividades previas, entre las cuales están el acople de los electrodos de trabajo (sellado de los microtubos), la elaboración de la solución Hank, determinación de las condiciones para los ensayos de Espectroscopía de Impedancia Electroquímica.

4.3.4.1 Materiales y equipos

Para la realización de estos ensayos se consideraron las metodologías consignadas en la bibliografía consultada. En la tabla 4 se presentan los materiales y equipos empleados en los ensayos electroquímicos, en aras de mediciones seguras y confiables.

Tabla 3. Materiales y equipos para realizar las pruebas electroquímicas.

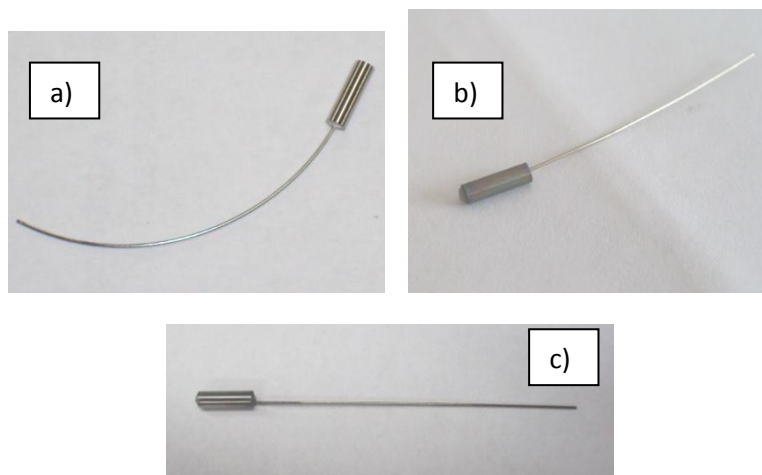
MATERIALES	EQUIPOS
<ul style="list-style-type: none"> • Longitud electrodos de trabajo de Nitinol: 0.75 ± 0.003 mm. • Solución Hank • Proteína SBF (albúmina 98%). • Electrodo de referencia Ag/AgCl • Electrodo auxiliar de grafito. • Celda: Vaso de precipitado de 50ml. 	<ul style="list-style-type: none"> • Potenciostato-Galvanostato GAMRY. • Baño termostataado

Fuente: Autores

4.3.4.2 Preparación de electrodos de NiTi

En la figura 6 se muestra los electrodos de trabajo fabricados

Figura 6. Acople de los microtubos y alambres de Nitinol para realizar las pruebas electroquímicas a) microtubo sin anodizar, b) anodizado sulfato de sodio, c) anodizado ácido acético.



Fuente: Autores

Se realizó el acople de los microtubos, con alambres de NiTi, con el fin de facilitar los ensayos con el electrodo de trabajo, por sus dimensiones y también, porque permitieron garantizar la conductividad, sin formar un par galvánico. El acople ya mencionado, permitió que la superficie expuesta a la solución Hank fuera la exterior de la probeta por esta razón, se procedió a sellar los extremos de los microtubos; este proceso se realizó utilizando resina Brillant Dentin y sellados por polimerización con una lámpara de luz UV, siendo utilizada 40 segundos por cada extremo del microtubo.

4.3.4.3 Elaboración de la solución fisiológica simulada Hank.

La solución se realizó según la norma ASTM F2129 para soluciones fisiológicas simuladas de la sangre como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Composición solución fisiológica simulada de la sangre Hank pH= 7,4 [24].

Compuesto	Peso [gramos/L]
NaCl	8
CaCl ₂	0.14
KCl	0.4
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.10
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.10
NaHCO ₃	0.35
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	0.12
KH ₂ PO ₄	0.06

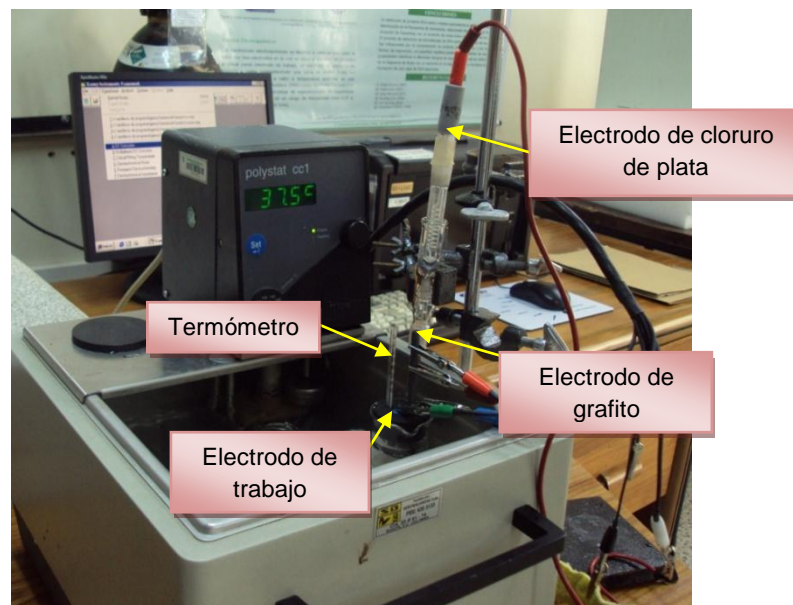
Fuente: Autores

4.3.4.4 Condiciones de las pruebas electroquímicas

Las pruebas electroquímicas se realizaron para cada microtubo de Nitinol tomando un intervalo de frecuencia de barrido de 100000 a 0.01Hz con amplitud

sinusoidal de 10 mV estabilizando el sistema mediante pruebas de potencial de circuito abierto durante 300 segundos hasta obtener variaciones que no excedieran 5mV. Como se puede ver en la Figura 7, se usó electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia, una barra de grafito como electrodo auxiliar y los microtubos de Nitinol como electrodos de trabajo. Para cada tiempo en cada electrolito se hizo un ensayo y su repetición con el fin de asegurar resultados confiables. Todas las mediciones se llevaron a cabo manteniendo la temperatura constante de 37.5°C usando un baño termostataado, acondicionando la celda con un termómetro, con el fin de controlar de eficientemente la temperatura. El montaje propuesto, se muestra en la figura 7.

Figura 7. Montaje para realizar las pruebas de Espectroscopía de Impedancia Electroquímica.



Fuente: Autores

La celda para las pruebas electroquímicas fue ajustada a un vaso de 50 ml con un tapón plástico quedando sólo espacio para los electrodos y el termómetro para controlar la temperatura de la solución, y tener confiabilidad en los resultados.

4.3.4 Evaluación de la adsorción de proteína de albúmina sobre las superficies preparadas

Para el sistema de adsorción de proteína de albumina sobre microtubos de Nitinol con y sin proceso de modificación superficial (anodizado) a 37⁰C, se hizo una representación de acuerdo a la isoterma de Langmuir [22].

Para utilizar esta representación se hace una corrección del valor obtenido de R_{TC} por medio del programa Zview, para graficarse vs la concentración de proteína en g/ ml [22]. Esta corrección se desarrolló de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$(1/RTC)_c = (1/RTC) - (1/RTC)_0 \quad (6)$$

La magnitud del inverso de la resistencia a la transferencia de carga $1/R_{tc}$ puede ser correlacionada con la concentración superficial Γ .

De acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente, se utiliza la siguiente ecuación [22]:

$$\frac{c}{\Gamma} = \frac{1}{B_{ads} \Gamma_{max}} + \frac{c}{\Gamma_{max}} \quad (7)$$

B_{ads} corresponde al intercepto de la gráfica anterior y Γ_{max} es la pendiente de la misma [22]:

$$\Gamma = \frac{B_{ads} \Gamma_{max} C}{1+B_{ads} C} \quad (8)$$

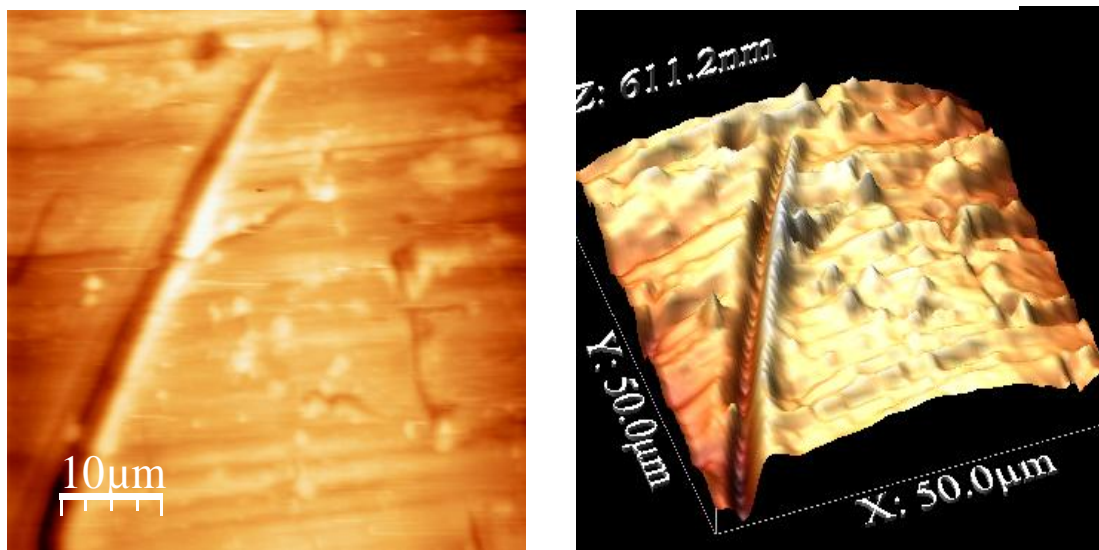
5 RESULTADOS Y ANÁLISIS

5.1 CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DE LOS MICROTUBOS DE NiTi, DESPUÉS DEL ANODIZADO.

5.1.1 Caracterización por AFM

Con la técnica de AFM, se buscó determinar topografía y la rugosidad, las cuales son propiedades superficiales importantes y se conoce que para los biomateriales, es un factor que influye considerablemente en la tromboresistencia [23]. En la figura 8, se muestra la microscopía de la superficie sin anodizado.

Figura 8. AFM de superficie de Nitinol sin modificación.



Fuente: Autores, Laboratorio GOTS. Microscopio de Fuerza Atómica Veeco.

La imagen muestra la microscopía de fuerza atómica realizada a una superficie sin anodizar la cual presenta poca rugosidad, aunque se evidencia una señal con gran profundidad lo que se atribuye al proceso de corte de los microtubos.

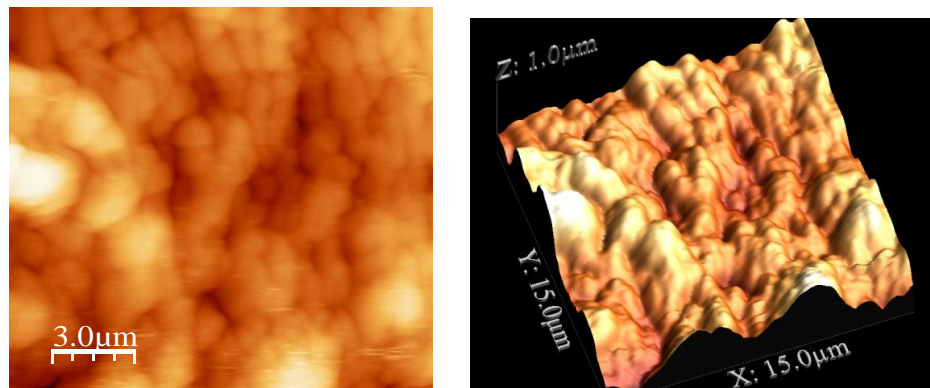
5.2 PROCESO DE ANODIZADO

En el proceso de anodizado con ácido acético se observó que el potencial se estabilizó a los pocos segundos, lo que significó, un pequeño crecimiento en la capa de óxido ya que el voltaje y el tiempo de exposición inciden considerablemente en este proceso, cabe destacar que este comportamiento está acorde con los resultados publicados por Shi, Cheng y Mang [16]. Por otra parte, el anodizado con sulfato de sodio presentó una variación de colores, que se distribuyen de forma heterogénea sobre la superficie del microtubo, en tonalidades que están en la gama del azul y verde lo cual se atribuye a interferencias de luz a través de las capas de óxidos. Las diferencias en la tonalidad de la superficie de los microtubos anodizados son apreciables sin la ayuda de instrumentación auxiliar óptica. Este resultado coincide con los obtenidos en estudios anteriores [7], en el cual se modificó la superficie de alambres de Nitinol, dando como resultado, superficies coloreadas uniformemente.

5.2.1 Caracterización por AFM

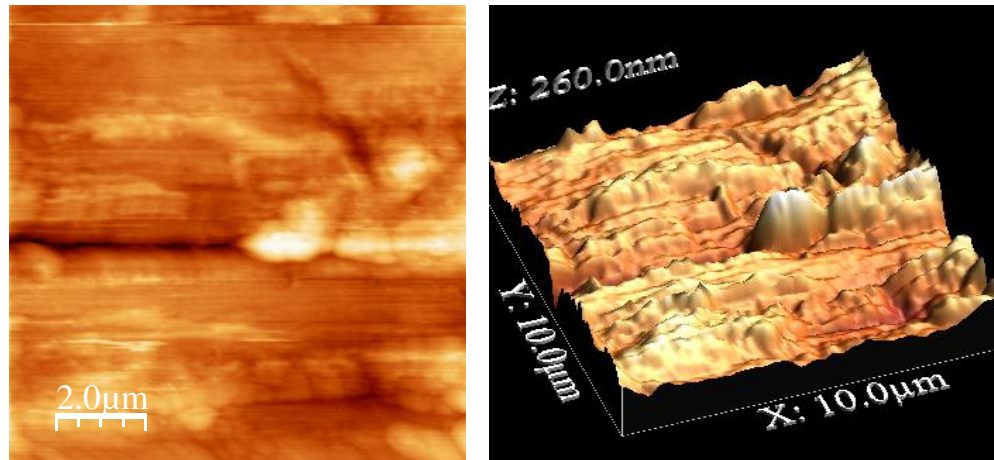
En las figuras 9 y 10 se muestran las microscopías de las superficies anodizadas con los diferentes electrolitos.

Figura 9. AFM de superficie modificada con sulfato de sodio por 1h.



Fuente: Autores, Laboratorio GOTS. Microscopio de Fuerza Atómica Veeco.

Figura 10. AFM de superficie Nitinol modificada con ácido acético por 1h.



Fuente: Autores, Laboratorio GOTS. Microscopio de Fuerza Atómica Veeco*.

De acuerdo a estos resultados, se pudo observar que el proceso de anodizado aumentó la rugosidad superficial del NiTi, especialmente en el proceso con anodizado en sulfato de sodio. Debido a que una superficie rugosa presenta un número mayor de sitios de alta energía; estos son asociados con potenciales zonas activas, debidas a las interacciones biológicas entre la superficie del biomaterial y el medio biológico [11]. Sin embargo, a pesar, que las superficies más rugosas pudieran aumentar la adhesión, prima en mayor medida el efecto hidrofóbico de las superficies con óxidos formados [27], lo cual fue comprobado en las pruebas electroquímicas. Los perfiles topográficos que se pueden obtener por medio de esta técnica (anexo VII), mostraron claramente, que las superficies modificadas con sulfato de sodio presentaron un aumento considerable en la rugosidad, permitiendo una fácil adhesión de proteína a estas superficies, mientras que los microtubos modificados con ácido acético, presentaron menos rugosidad, por lo que esta última, se podría considerar como una alternativa para la modificación superficial de Nitinol.

En la Tabla 5 se muestran las rugosidades promedio (R_a), las cuales fueron determinadas en un área de $7,0 \mu\text{m} \times 7,0 \mu\text{m}$ en los microtubos modificados.

Tabla 5. Rugosidad promedio microtubos anodizados 1h en los diferentes electrolitos.

Rugosidad promedio (Ra)	Probeta sin anodizar	Probeta anodizada en CH ₃ COOH	Probeta anodizada en Na ₂ SO ₄
	14.7797	25.0717	82,7

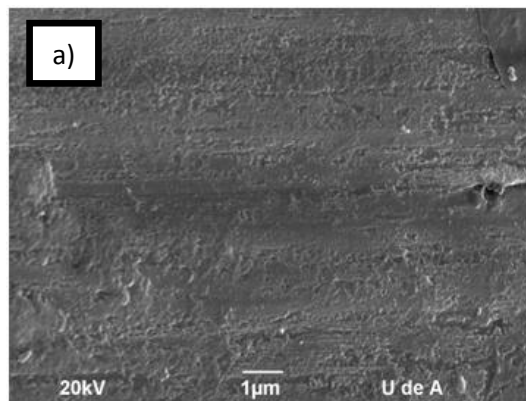
Fuente: Autores

Estos datos confirman la información presentada visualmente en las imágenes de AFM, resaltando un mayor impacto en la rugosidad (aumento) para los microtubos anodizados en sulfato de sodio.

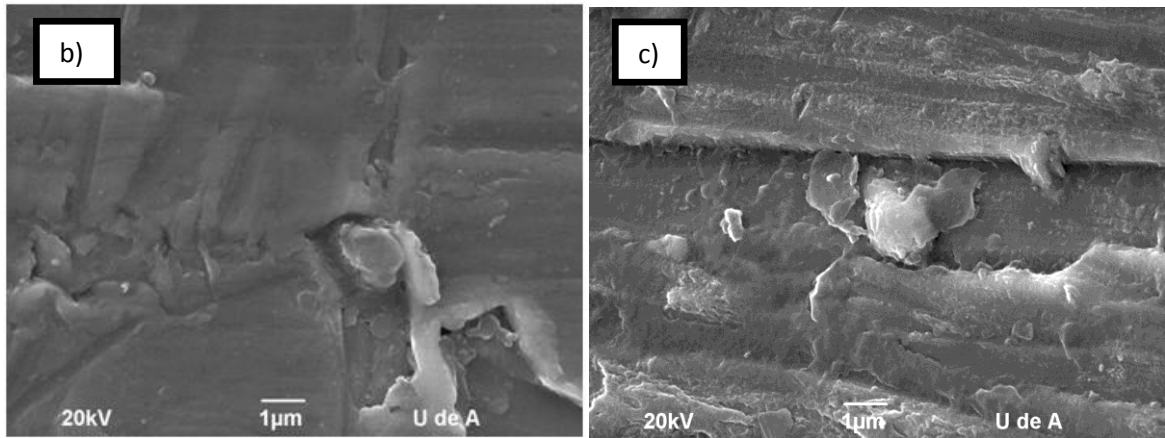
5.2.2 Caracterización por SEM de las superficies del Nitinol inmersas en solución Hank en presencia de albúmina.

En las figuras 11, 12 y 13, se presenta la caracterización realizada por SEM de las superficies sin anodizar y con anodizado, después de haber sido expuestas a albúmina en solución Hank a 1, 5 y 10 μ m de escala.

Figura 11. Micrografías de SEM de Nitinol inmerso en solución Hank con 0.001g/ml de albúmina, después de 1h en solución y 37 °C de temperatura a 1 μ m.



(a) sin anodizado

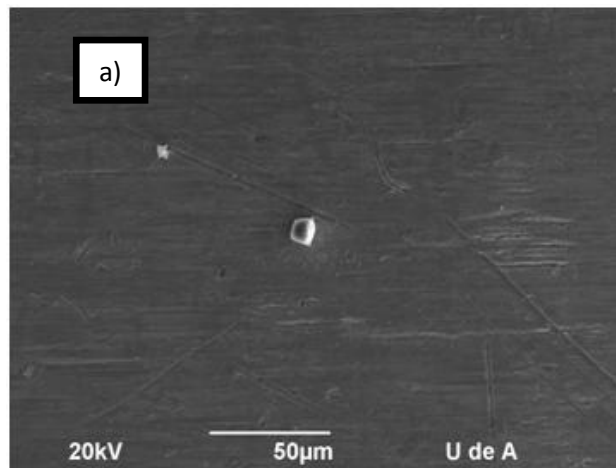


(b) sulfato de sodio

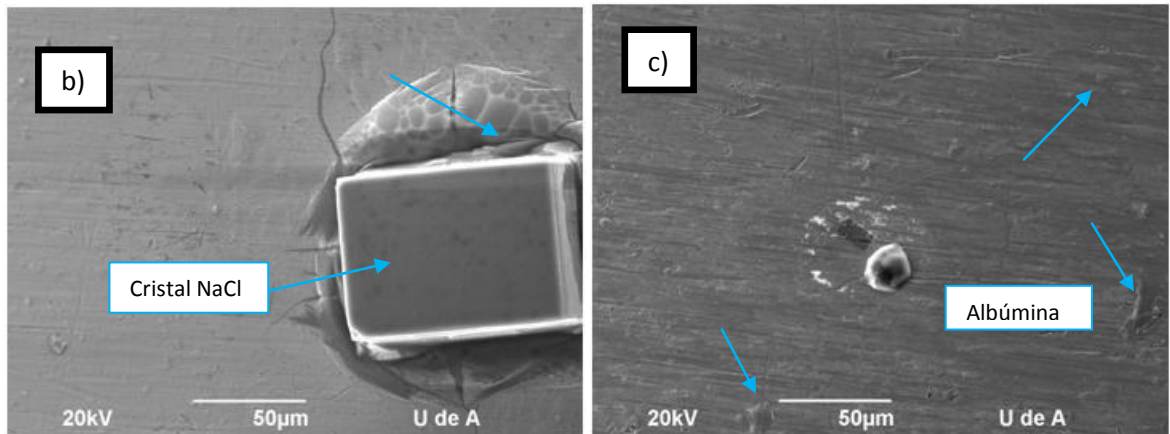
(c) ácido acético

Fuente: Autores, Laboratorio de Microscopía UDEA.

Figura 12. Micrografías de SEM de Nitinol inmerso en solución Hank con 0.001g/ml de albúmina, después de 1h en solución y 37 °C de temperatura 50 μm.



a) sin anodizado

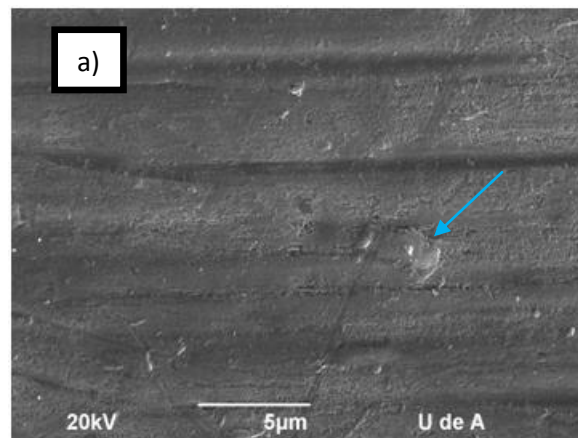


(b) sulfato de sodio

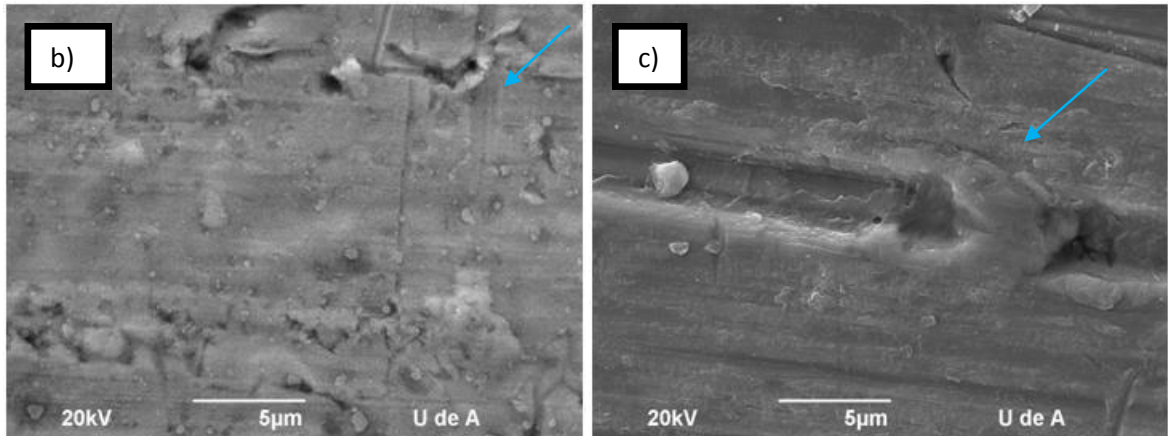
(c) ácido acético

Fuente: Autores, Laboratorio de Microscopía UDEA

Figura 13. Micrografías de SEM de Nitinol inmerso en solución Hank con 0.001g/ml de albúmina, después de 1h en solución y 37 °C de temperatura, a 5µm de escala.



(a) sin anodizado



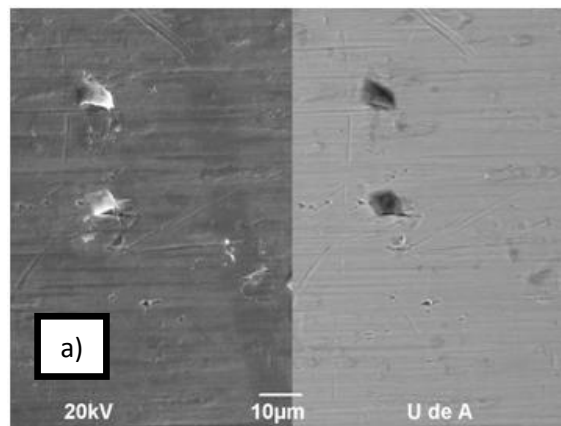
(b) sulfato de sodio

(c) ácido acético

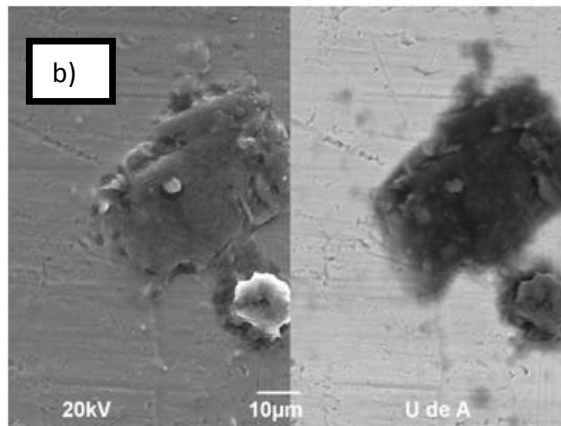
Fuente: Autores, Laboratorio de Microscopía UDEA

En la figura 14, se muestra las microscopías SEM, con la técnica de contraste para las diferentes superficies con albúmina adherida. Esto permitió diferenciar los compuestos, con diferente naturaleza o composición, a la de la superficie.

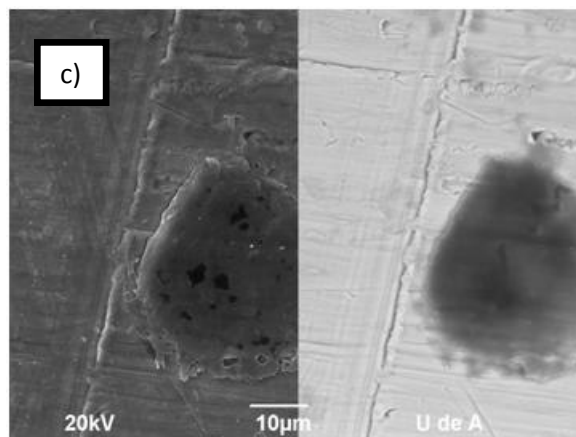
Figura 14. Micrografías de SEM de contraste de Nitinol inmerso en solución Hank con 0.001g/ml de albúmina, después de 1h en solución y 37 °C de temperatura, 10µm de escala.



(a) Sin anodizado



(b) Sulfato de sodio



(c) Ácido acético

Fuente: Autores, Laboratorio de Microscopía UDEA

En estas imágenes se observa diferencias en la morfología del Nitinol antes y después de los tratamientos de anodizado. También se observan los posibles productos de proteína adheridos sobre las superficie, los cuales fueron caracterizados por EDS. Se puede corroborar con los resultados de la caracterización química por EDS (Anexo VIII) que esta superficie presentó

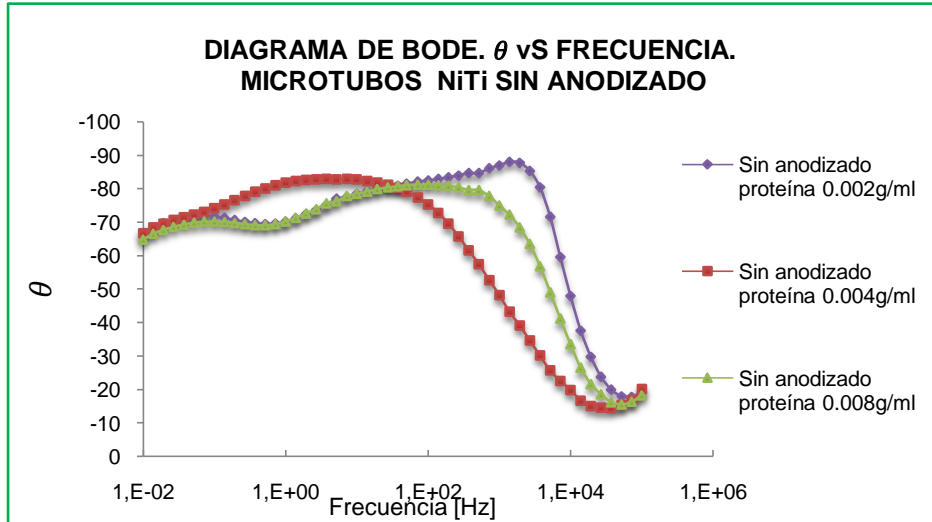
elevadas cantidades (%atómico) de Ti y Ni, también presenta cristales que contienen Na y Cl que provienen del electrolito en el cual fue inmersa la probeta. En las muestras con anodizado se observó un aumento considerable de oxígeno (78% atómico), lo cual se debió a un posible aumento de óxidos de titanio en la superficie de las probetas. La presencia de proteína en las micrografías sin tratamiento, no es visible claramente. Se observó la presencia localizada de la proteína, especialmente en las superficies con tratamiento de anodizado, confirmando que la rugosidad superficial, aumentó la adhesión de en la superficie modificada, con sulfato de sodio y ácido acético. La caracterización por EDS, no permitió obtener una información confiable de la composición de la proteína adherida.

5.3 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA

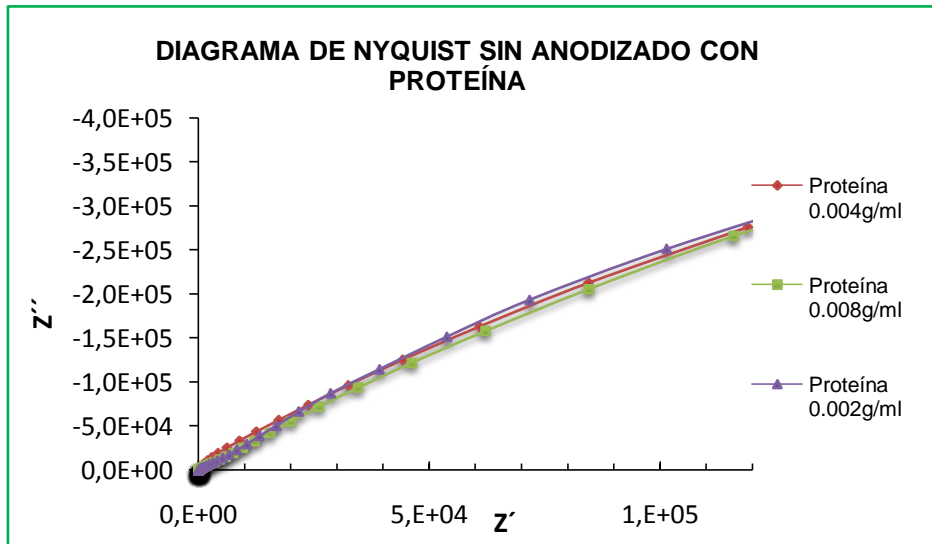
Las figuras 15a y 15b, mostradas a continuación, hacen parte de los resultados de las pruebas de EIE (Anexo IX), para NiTi en las cuales se muestran los espectros de Bode y Nyquist para los electrodos de trabajo modificados superficialmente en sulfato de sodio y ácido acético y sin anodizado, variando la concentración de proteína (albúmina) adicionada a la solución Hank en cada prueba.

Los microtubos tratados superficialmente, se sometieron a la variación de la concentración de albúmina llevando dicha concentración, a la mitad y al doble de la inicial. Estos microtubos fueron escogidos, comparando los valores de R_{tc} , (ver anexo X), obtenidos de la simulación con el respectivo ajuste a los modelos propuestos, de los espectros obtenidos en las pruebas electroquímicas, teniendo en cuenta que para un mayor valor de R_{tc} (resistencia a la transferencia de carga), la cantidad de albúmina adsorbida es menor.

Figura 15. Diagramas de a) Bode b) Nyquist para microtubos de Nitinol sin anodizado en presencia de proteína.



a) Fuente: Autores



b) Fuente: Autores

Con base en los procesos electroquímicos que ocurren en la interfase metal-óxido-electrolito determinados por la técnica EIE se realizó el análisis del comportamiento interfacial, o, las interacciones entre la proteína (albúmina) y la superficie de los microtubos de NiTi. Las proteínas por lo general se adsorben

sobre las superficies metálicas, permitiendo la transferencia de electrones de las capas adsorbidas electroactivas, dependiendo de las condiciones del área externa de los microtubos va a tener una cinética diferente para dicha transferencia [33]. En la Figura 15 b se observa una representación del diagrama de Nyquist de la impedancia imaginaria frente a la real de 1mg/ml albúmina (BSA) en función del potencial electroquímico aplicado.

Los datos de impedancia para cada prueba con proteína, revelaron un comportamiento resistivo para frecuencia alta. A medida que aumenta el potencial aplicado, la impedancia a bajas frecuencias, disminuye. Para alta frecuencia, se encontró que la impedancia imaginaria mostró un ligero incremento con el potencial.

En el diagrama de Bode de la figura 15a, se distinguen tres relajaciones que dependen de la frecuencia. En la región de bajas frecuencias, se detectan los procesos de transferencia de masa, debida a la formación del óxido que tiene lugar en la interfase metal-óxido. Para frecuencias medias, las impedancias representan la repuesta de la capa de óxido frente al electrolito, siendo dependiente de la frecuencia, con el mayor valor de ángulo de fase.

En la zona de frecuencias altas, la información se refiere al proceso de transferencia de carga relacionado a la interfase óxido-proteína.

5.3.1 Modelo de circuitos equivalentes asociado al proceso de adsorción sobre las superficies de Nitinol.

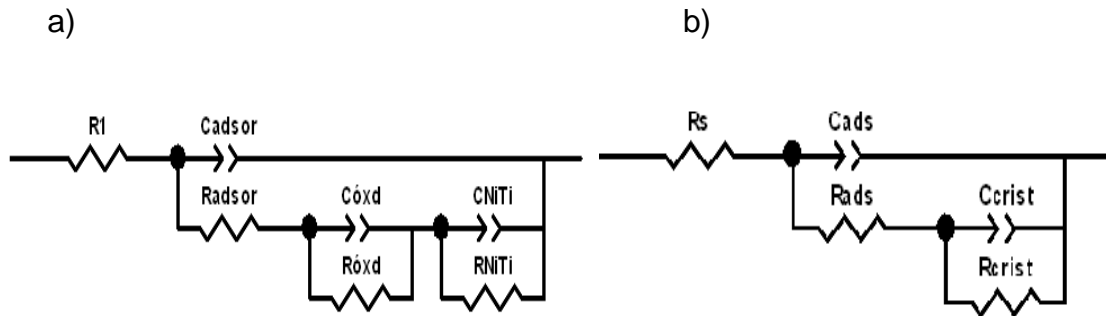
Con base en el análisis de los datos de impedancia, se plantearon dos modelos de circuitos equivalentes para el sistema de Nitinol con adsorción de albúmina, sobre los microtubos de Nitinol, buscando un ajuste entre los datos experimentales y teóricos tanto para altas, como para bajas frecuencias. El sistema con dos

constantes de tiempo corresponde a los microtubos sin anodizar, la relajación más externa, relacionada con la capa de pasivación formada espontáneamente, la relajación más interna, a la interfase óxido metal y a los procesos de transferencia de masa que suceden debido a la rugosidad y defectos del NiTi.

El circuito de la figura 16a, cuenta con los siguientes elementos: la resistencia del electrolito (R_s) que para este estudio fue solución Hank, en serie la constante de fase de adsorción (C_{ads}), que a su vez se encuentra en paralelo con la resistencia de adsorción (R_{ads}), relacionada con la resistencia a la transferencia de carga debida a la adhesión de monocapas de albúmina, esto, para altas frecuencias. A frecuencias medias, en serie se encuentra la capacitancia de la película de óxido, en paralelo la resistencia del óxido, lo cual representa un proceso más lento asociado a la formación espontanea de los óxidos, y por último, la capacitancia y la resistencia del metal de estudio de Nitinol. En general las constantes de fase usadas, se permiten representar la relajación en la distribución de los tiempos de los procesos electroquímicos, como resultado de las heterogeneidades presentes a nivel microscópico en las interfaces de estudio.

La figura 16b, representa el circuito más ajustable para las simulaciones de los datos de impedancia realizadas a los microtubos anodizados, este circuito cuenta básicamente con los mismos elementos del circuito de la figura 16a. La diferencia está en que el segundo circuito asume un control sólo por transferencia de carga, debido a que la relajación por transferencia de masa es muy corta, el oxígeno se une con el metal debido a su reactividad hasta bajar su energía libre, este es un proceso de carga muy estable que puede llegar a no ser significativo en el intervalo de frecuencia.

Figura 16. Modelos de circuitos equivalentes para el sistema de adsorción de albúmina sobre los microtubos de Nitinol.



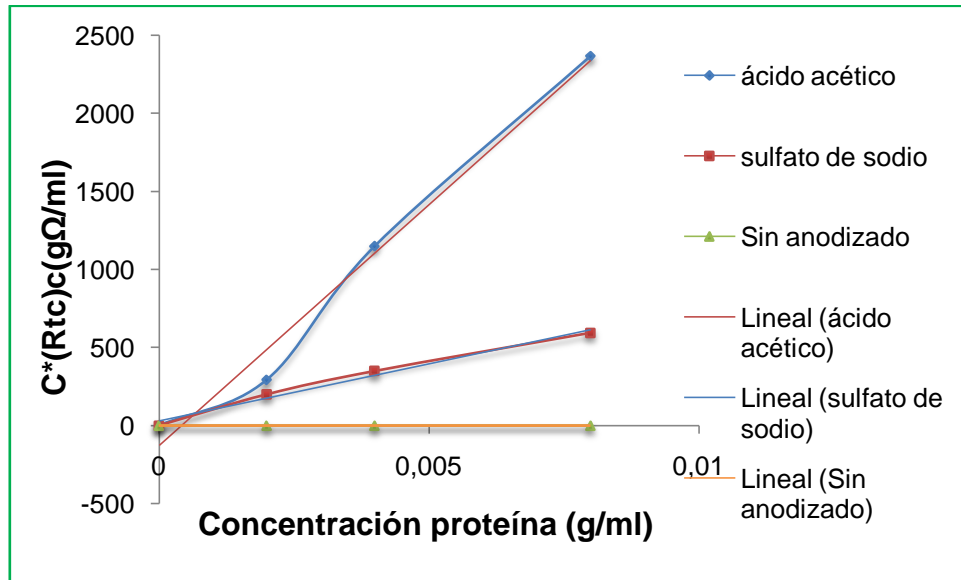
Fuente: Autores

Con base en estos circuitos, se realizó un análisis de acuerdo al comportamiento del Nitinol en presencia de la albúmina ajustándose de forma correcta a los resultados de las pruebas electroquímicas.

5.4 PROCESO DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNA REPRESENTADO MEDIANTE LA ISOTERMA DE LANGMUIR.

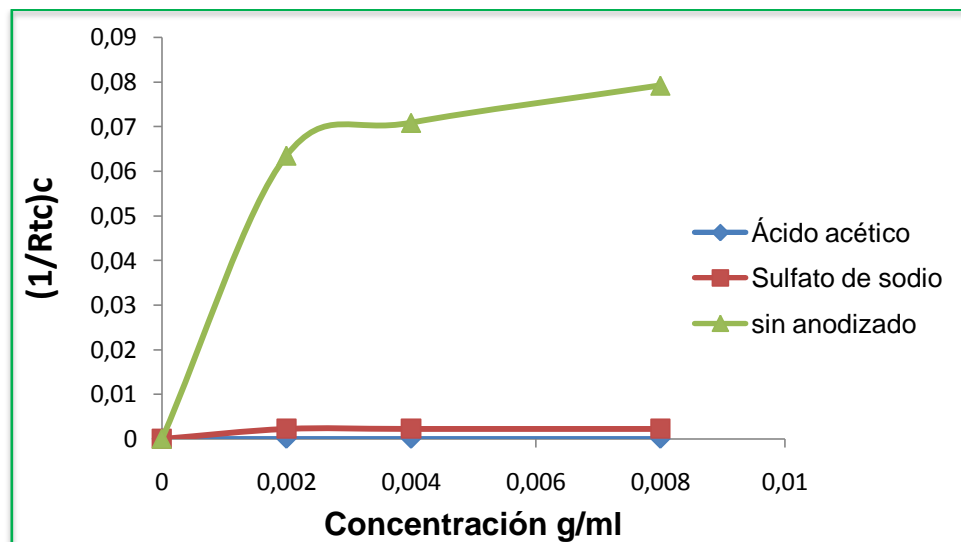
Las Figuras 17 y 18 representan los resultados de las isotermas de Langmuir, las cuales permitieron observar el comportamiento de adsorción de la proteína sobre las superficies de Nitinol con y sin modificación.

Figura 17. Representación del proceso de adsorción de proteína de acuerdo a la linealización de la isoterma de Langmuir para probetas anodizadas con sulfato de sodio, ácido acético y sin modificación superficial.



Fuente: Autores

Figura 18. Isothermas de adsorción de albúmina sobre microtubos de Nitinol con y sin modificación superficial en solución Hank.



Fuente: Autores

De acuerdo a los resultados obtenidos con las isothermas de Langmuir, Γ_{max} , corresponde a la máxima cantidad de proteína adsorbida sobre la superficie de los microtubos. Se determinó que el Nitinol modificado con sulfato de sodio es más propenso a la adhesión de proteína. La afinidad de la proteína hacia los sitios de adsorción (B_{ads}); de acuerdo a la topografía de las superficies modificadas, corresponde al aumento en la rugosidad generada por el proceso de anodizado, el cual, fue menor en los microtubos tratados en ácido acético. En la figura 18, se observa también, que el óxido formado con el ácido acético tiende a ser más estable en presencia de proteína disuelta en solución Hank, mostrando un comportamiento hidrofóbico, lo cual corresponde a que la superficie de los microtubos modificados en este electrolito presentaron una pequeña carga superficial, según los resultados del valor de la resistencia de carga, comparada con los resultados obtenidos con el tratamiento con sulfato de sodio y con la superficie sin anodizar.

Los resultados obtenidos de la morfología y la caracterización química de los microtubos modificados con sulfato de sodio, permitieron observar la presencia de cristales de sodio, los cuales pueden originar la formación de grupos hidroxilados sobre la superficie, promoviendo parcialmente la hidratación de la superficie y la atracción de compuestos de carga opuesta (-), haciéndola más hidrofílica y reactiva. Este aspecto, pudo ser la causa que generó un incremento en la adhesión de la proteína, tal como fue observado en las curvas de Langmuir para las superficies sin modificación y las modificadas con sulfato de sodio. La carga superficial del níquel y el titanio son más altas, lo cual determina un carácter hidrofílico a las superficies de NiTi sin modificación, ya que el óxido que se presenta en éstas, tiene poca estabilidad, por esta razón, se observó un incremento considerable en la adhesión de proteína, de acuerdo a la representación lineal de las isothermas de Langmuir.

CONCLUSIONES

Se realizó el anodizado de los microtubos de Nitinol, en sulfato de sodio y ácido acético, variando los tiempos de exposición, con lo que se encontró a nivel macroscópico, una variación en la tonalidad de la superficie y un aumento considerable en rugosidad con un posible aumento en la energía superficial de los microtubos, de acuerdo a los resultados de los perfiles obtenidos de la Microscopía de Fuerza Atómica.

Se evaluaron los microtubos de Nitinol anodizados, por medio de la técnica de Espectroscopía de Impedancia Electroquímica en solución Hank, con pequeñas concentraciones de proteína de albúmina, ajustando los espectros obtenidos, a modelos de circuitos equivalentes, con los cuales fue posible obtener valores de la resistencia de transferencia de carga asociada a los procesos de adsorción, con lo cual, se demostró que el sistema es muy sensible a la cantidad de proteína adsorbida en la superficie de los microtubos.

La modificación con ácido acético, presentó un mejor comportamiento frente a la adsorción de proteína, de acuerdo a los ensayos realizados y a los análisis mediante el ajuste a la isoterma de Langmuir. Esto debido a que el óxido formado fue el más estable en solución Hank con proteína, presentando altos valores de resistencia a la transferencia de carga y a bajos valores de rugosidad mostrados de los ensayos con microscopía de fuerza atómica. Esta modificación superficial con ácido acético, se puede considerar como una opción, para modificar la superficie del Nitinol evitando así, la formación de trombos. Una mayor adsorción de proteína, se presentó en las superficies sin anodizar, debido probablemente, a la inestabilidad del titanio y del níquel, lo cual representa una carga superficial más alta que incrementa la hidrofiliidad.

RECOMENDACIONES

- Realizar pulido electrolítico a las probetas antes de realizar el proceso de anodizado esto con el fin de evitar zonas rugosas que puedan interferir en la adhesión de proteínas; ya que se evidenció que son zonas de alta actividad superficial en las pruebas de caracterización topográfica de las probetas de Nitinol.
- Evaluar electroquímicamente los procesos de adhesión, en microtubos de Nitinol anodizados en ácido acético haciendo una variación en las condiciones de anodizado, es decir, aumentando el tiempo de anodizado y variando los potenciales con el fin de garantizar capas de óxido con espesores representativos.
- Determinar los espesores de la capa de óxido con el fin de determinar cuantitativamente estas dimensiones.
- Estudiar la capa de óxido con técnicas que permitan hacer una caracterización exacta de los óxidos formados en la superficie (TEM).
- Evaluar la presencia de iones Ni en la solución Hank, después de realizar los ensayos de Espectroscopia de Impedancia Electroquímica ya que este también es un factor que notoriamente alterara la interacción metal tejido por sus propiedades altamente tóxicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. POHL M, HEßING C, FRENZEL J. Electrolytic processing of NiTi Shape Memory Alloys. Junio-Septiembre 2003. Science Direct. Materials Testing, Institute for Materials, Ruhr-University Bochum, Germany. Materials Science and Engineering A 378, p 191-199.
- [2]. SHI P, CHENG F.T, MAN H.C. Nature of Oxide Layer Formed on NiTi by Anodic Oxidation in Methanol. Julio 2004- Enero 2005. Science Direct. Materials Letters 59 (2005), p 1516– 1520.
- [3]. Ruiqiang Hang, Shengli Ma, Vincent Ji, Paul K. Chu. Corrosion behavior of NiTi alloy in fetal bovine serum. Electrochimica Acta. December 2009-april 2010. Vol 55 p. 5551–5560.
- [4]. SHI P, CHENG F.T, MAN H.C. Improvement in corrosion resistance of NiTi by Anodization in Acetic Acid. Febrero-Septiembre 2006. Science Direct, Materials Letters 61 (2007), p. 2385-2388.
- [5]. S. Shabalovskaya, J. Anderegg, J. Van Humbeeck. Critical overview of Nitinol surfaces and their modifications for medical applications. Acta Biomaterialia, July 2007- February 2008. Vol 4 p. 447–467.
- [6]. C.L. Chu, R.M. Wang, T. Hu, L.H. Yin, Y.P. Pu, P.H. Lin, S.L. Wu, C.Y. Chung, K.W.K. Yeung, Paul K. Chu. Surface Structure and Biomedical Properties of Chemically Polished and Electropolished NiTi Shape Memory Alloys. Materials Science and Engineering C, January-April 2008, Vol.28, p. 1430–1434.

- [7]. Chen Sinn-wen, Yang Chiao-ling, Chen Feng-ling. Anodization of the dental arch wires. *Materials Chemistry and Physics*. August-December. 2005 Vol. 100, p. 268–274.
- [8]. B. Clarke, P. Kingshott, X. Hou, Y. Rochev, A. Gorelov, W. Carroll. Effect of Nitinol wire surface properties on albumin adsorption. *Acta Biomaterialia* 3, April-July 2006, p. 103–111.
- [9]. Gunnar Tepe, Joerg Schmehl, Hans P Wendel, Sivio Schaffner, Stephan Heller, Marc Gianotti, Claus D Claussen, Stephan H Duda. Reduced thrombogenicity of Nitinol stents—in vitro evaluation of different surface modifications and coatings. *Biomaterials* 27 (2006) 643–650.
- [10]. C.L. Chu a, R.M. Wang, L.H. Yin, Y.P.Pu, P.H. Lin, Y.S. Dong, C.Y. Chung, K.W.K. Yeung, P.K. Chu. Effects of anodic oxidation in H₂SO₄ electrolyte on the biocompatibility of NiTi shape memory alloy. *Materials Letters*, December 2007- March 2008. Vol 62 p. 3512–3514.
- [11]. MICHIARDI Alexandra, Nuevo tratamiento de oxidación en las aleaciones de NiTi para aplicaciones biomédicas. Caracterización superficial y respuesta biológica in vitro. Universidad Politécnica de Catalunya, Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica de Barcelona. Terragona, 2005.
- [12]. MONTAÑEZ, Nerly. Evaluación de la Corrosión de alambres de Nitinol y Minitornillos de aleación Titanio empleados como aparatos de ortodoncia, en suero fisiológico simulado, saliva artificial y enjuague bucal mediante técnicas electroquímica. Universidad Industrial de Santander, escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de Mteriales, Bucaramanga 2008.

- [13]. SOUALAH, Lakhdar. Influencia del rayado sobre la resistencia electroquímica de las aleaciones de NiTi para aplicaciones biomédicas. Universidad Politécnica de Catalunya, Departamento de ciencia de los materiales e Ingeniería Metalúrgica, España, 2005. Disponible en: <http://upcommons.upc.edu/pfc/handle/2099.1/2836>
- [14]. MICHIARDIA Alexandra, APARICIO Conrado, RATNER Buddy D., PLANELL Josep A., GIL Javier. The influence of surface energy on competitive protein adsorption on oxidized NiTi surfaces. En: Biomaterials. Julio-septiembre, 2006, vol. 28 p. 586–594.
- [15]. VESGA, Wilson. Transformaciones de fase y comportamiento mecánico bajo cargas cíclicas de una aleación binaria Ni-Ti. Trabajo de grado Magister en Ingeniería Metalúrgica. Bucaramanga. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Metalúrgica, 2008. 46 p.
- [16]. OCHOA, Nidya, ROJAS Mónica. Caracterización de una Aleación con Memoria de Forma Níquel-Titanio Utilizada para la Fabricación de Micro-Tubos Empleados en Operaciones Cardiovasculares. Trabajo de grado Ingeniero Metalúrgico. Bucaramanga. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de los Materiales. 2006. 112p.
- [17]. B. Clarke, P. Kingshott, X. Hou, Y. Rochev, A. Gorelov, W. Carroll. Effect of Nitinol wire surface properties on albumin adsorption. Acta Biomaterialia 3, April-July 2006, p. 103–111.

- [18]. HARRIS, Daniel. Análisis Químico Cuantitativo. Traducido por Vicente Berenguer. Tercera Edición (Sexta edición Original). Barcelona España Editorial Reverté. 394p
- [19]. CASTELLAN. Gilbert W. Fisicoquímica. E.E.U.U, Addison-Wesley Iberoamericana, 1987. 432p.
- [20]. FABREGAT, Arnal G. Mejora de la resistencia a la corrosión del titanio mediante el proceso de sellado. Trabajo de grado Magister. En: Treballs Academics UPC, 2005.
- [21]. ESPINOSA, Marcela y JAIMES Martha. Anodizado de aleaciones de titanio (Ti6Al4V), ELI, utilizados en la fabricación de implantes. Trabajo de grado en Ingeniería Metalúrgica. Bucaramanga. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Metalúrgica, 2006. 27 p.
- [22]. OMANOVIC, Sasha y ROSCOE Sharon G. interfacial behavior of β -Lactoglobulin at a Stainless Steel Surface: An electrochemical Impedance Spectroscopy Study. Journal of colloid and Interface Science. November 1999-April 2000. Vol 227, p. 452-460.
- [23]. HASEBE T, ISHIMARU T, KAMIJO A, YOSHIMOTO Y, YOSHIMURA T, YOHENA S, KODAMA H, HOTTA A, TAKAHASHI K, SUZUKI T. Effects of surface roughness on anti-thrombogenicity of diamond-like carbon films. En: Diamond and Related Materials. Disponible: online 15 Diciembre 2006, p.1343–1348.

- [24]. ASTM F2129 Standard Test Method for Conducting Cyclic Potentiodynamic Polarization Measurements to Determine the Corrosion Susceptibility of Small Implant Devices.
- [25]. HANDBOOK: Surface Engineering. Vol. 5. ASM International. 1994. p. 1416-1446

ANEXO I.

MÉTODO DE FABRICACIÓN DE UN STENT

La elección del método de fabricación depende principalmente del material y la forma de partida que se tiene. La gran mayoría de stents se producen por corte con láser a partir de la forma de tubo. Posteriormente se realiza un pulido o electropulido en el que se mejoran las características de la superficie del material. Este último paso se realiza ya que el láser provoca la aparición de una zona afectada por el calor que se debe eliminar. Otro método en el que no aparece zona afectada por el corte es la utilización de un chorro de agua con componentes abrasivos. Por último, otro método de fabricación de stents es por estampado fotoquímico. Y aunque se utilice para el corte de stents en forma de tubo su utilización es realmente beneficiosa en los stents a partir de láminas, ya que con este método se pueden cortar grandes cantidades a la vez. Los alambres se transforman en stents usando técnicas tradicionales de conformación como la producción de espiral, el trenzado o el tejido de punto. La forma más simple para fabricar un stent a partir de alambre es dándole forma de espiral. Este tipo de stents son de Nitinol y de características autoexpandibles. Para aumentar la estabilidad longitudinal del stent se realiza una soldadura en puntos específicos creando así una estructura más cerrada. En el caso de los stents fabricados por trenzado o tejido se utilizan materiales autoexpandibles y expandibles con globo aunque no es una técnica muy utilizada.

En resumen, las técnicas de fabricación más utilizadas en la fabricación de stents son:

Mayoritariamente: Corte con láser.

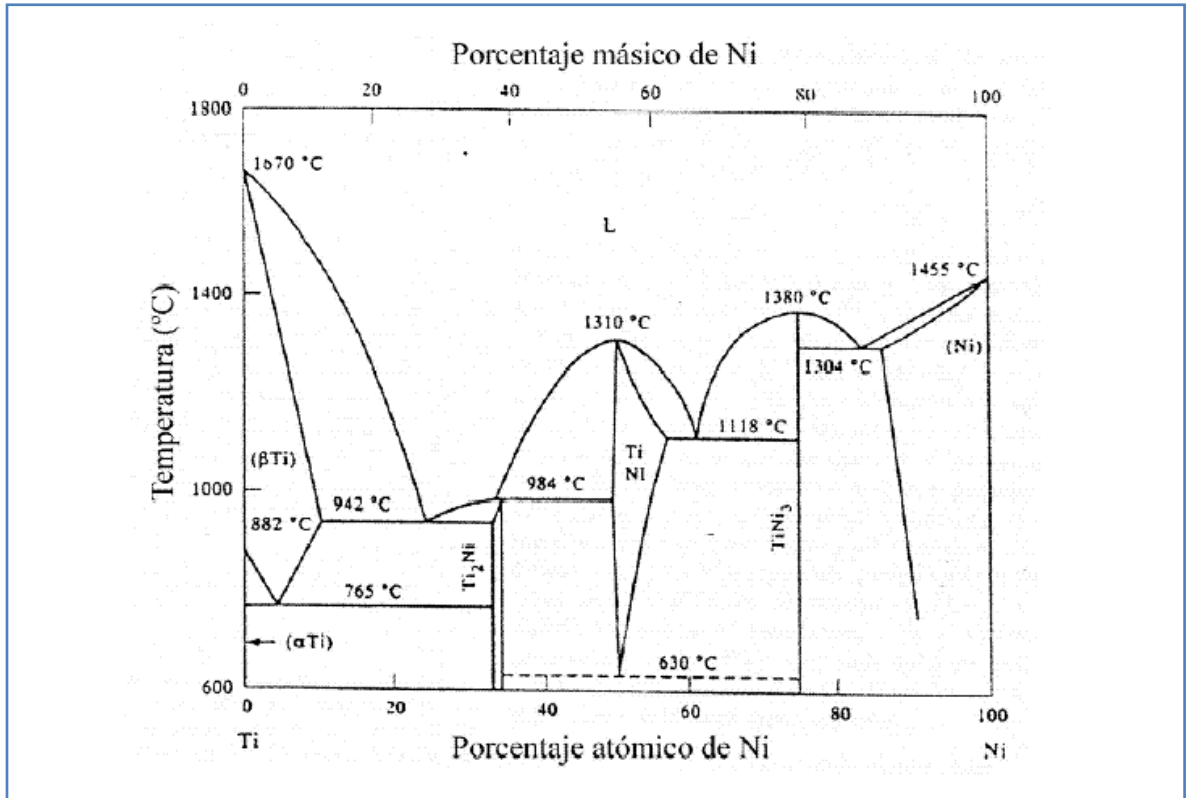
Algunos: Estampado fotoquímico.

En menor proporción:

- Chorro de agua
- Trenzado
- Tejido

ANEXO II.

DIAGRAMA ESTABILIDAD DEL NiTi



ANEXO III.

CÁLCULO DEL ÁREA DE LOS MICROTUBOS Y ALAMBRES DE NITINOL

Área del microtubo de Nitinol

Diámetro interno= 1,52 mm

Diámetro externo=2,17mm

L= longitud microtubos anodizados con sulfato de sodio 7,49 mm

$$A = 2\pi(r_{\text{externo}} - r_{\text{interno}})^2 + 2\pi r L$$

$$A = 2\pi\left(\frac{2.17}{2} - \frac{1.52}{2}\right)^2 + (2 \times \pi \times 2,17 \times 7,49)$$

$$A = 1,027 \text{ cm}^2$$

Área alambre de Nitinol Diámetro alambre = 0,31 mm, longitud=37mm

$$A = \pi r^2 + 2\pi r L$$

$$A = \pi\left(\frac{0,31}{2}\right)^2 + 2 \times \pi \times \left(\frac{0,31}{2}\right) \times 37$$

$$A = 0.36034$$

Longitud microtubos [mm ²]	Área [cm ²]
7,48	1,026
7,49	1,027
7,5	1,029
7,51	1,03

ANEXO IV.

CÁLCULO PARA DETERMINAR LAS DENSIDADES DE CORRIENTA A UTILIZAR EN LOS ANODIZADOS

Densidad corriente anodizado Na_2SO_4

Los cálculos realizados para llevar a cabo el proceso de anodizado en sulfato de sodio fueron $0,3 \text{ A/cm}^2$. [19]

$$\begin{array}{ccc} 0,3 \text{ A} & \longrightarrow & 1 \text{ cm}^2 \\ X & & 1.026 \text{ cm}^2 \end{array}$$

$$X = 0,3078 \text{ A/cm}^2$$

De esta manera se demostró que para cada microtubo la densidad de corriente a utilizar para el anodizado a los diferentes tiempos es de 308 mA/cm^2 .

Densidad de corriente anodizado con CH_3COOH

La determinación de la densidad de corriente para el anodizado con este electrolito se realizó de acuerdo a lo establecido en [16].

$$\begin{array}{ccc} 20 \text{ mA} & \longrightarrow & 1 \text{ cm}^2 \\ X & & 1.029 \text{ cm}^2 \end{array}$$

$$X = 20,58 \text{ mA}$$

De ahí, que la corriente utilizada fue la mostrada en el resultado anterior para llevar a cabo este proceso.

ANEXO V.

CÁLCULO PARA ELABORAR LAS SOLUCIONES DE ANODIZADO

Sulfato de sodio

Fórmula molecular: Na_2SO_4

Densidad: $2,7\text{g/cm}^3$

Concentración a utilizar para el anodizado **[3%Wt]**, cantidad de solución a preparar 200ml.

$$\%P/P = \frac{\text{gr soluto}}{\text{gr solución}}$$

$$3\%P/P = \frac{\text{gr soluto}}{200\text{ml}}$$

$$6\text{ml} * 2,7 \frac{\text{gr}}{\text{cm}^3} = 16,2\text{g}_{\text{Na}_2\text{SO}_4}$$

Ácido acético

Fórmula molecular: CH_3COOH

Peso molecular 60.05 g/mol

Densidad 1.049g/cm^3

Concentración a utilizar para el anodizado: **[1M]**, cantidad de solución para preparar 100ml.

$$g_{\text{ácido}} = \text{Peso molecular} \times \text{volumen} \times \text{concentración}$$

$$g_{\text{ácido}} = 60,05_{\text{g/mol}} \times 0,1\text{L} \times 1\text{M}$$

$$g_{\text{ácido}} = 6,005$$

$$V = \frac{6,005\text{ g}}{1,049\text{ g/cm}^3} = 5,73\text{ml}$$

ANEXO VI.

CONDICIONES PARA EL PROCESO DE ANODIZADO

En el anodizado las condiciones dadas con el sulfato de sodio fueron $0,3 \text{ A/cm}^2$, voltaje inicial 30 V y tiempos como se muestran en la siguiente tabla:

	Longitud [mm]	Voltaje [Voltios]	Densidad de corriente [mA/cm^2]	Tiempo [Minutos]
Electrolito	7,49	4-5	≈ 308	30
	7,49	4-5	≈ 308	30
Sulfato de sodio	7,49	4-5	≈ 308	60
	7,49	4-5	≈ 308	30
	7.49	6-7	≈ 308	90
	7.49	6-7	≈ 308	90
	7.51	6	≈ 308	60

En el anodizado las condiciones dadas con el sulfato de sodio fueron 20 mA/cm^2 , voltaje inicial 30 V y tiempos como se muestran en la siguiente tabla:

	Longitud [mm]	Voltaje [Voltios]	Densidad de corriente [mA/cm^2]	Tiempo [Minutos]
Electrolito	7.51	5	$20.58 \approx 21$	60
	7.50	5	$20.58 \approx 21$	90
Ácido acético	7.50	5-6	$20.58 \approx 21$	30
	7.50	6-7	$20.58 \approx 21$	90
	7.50	5-6	$20.58 \approx 21$	60
	7.50	5-6	$20.58 \approx 21$	30

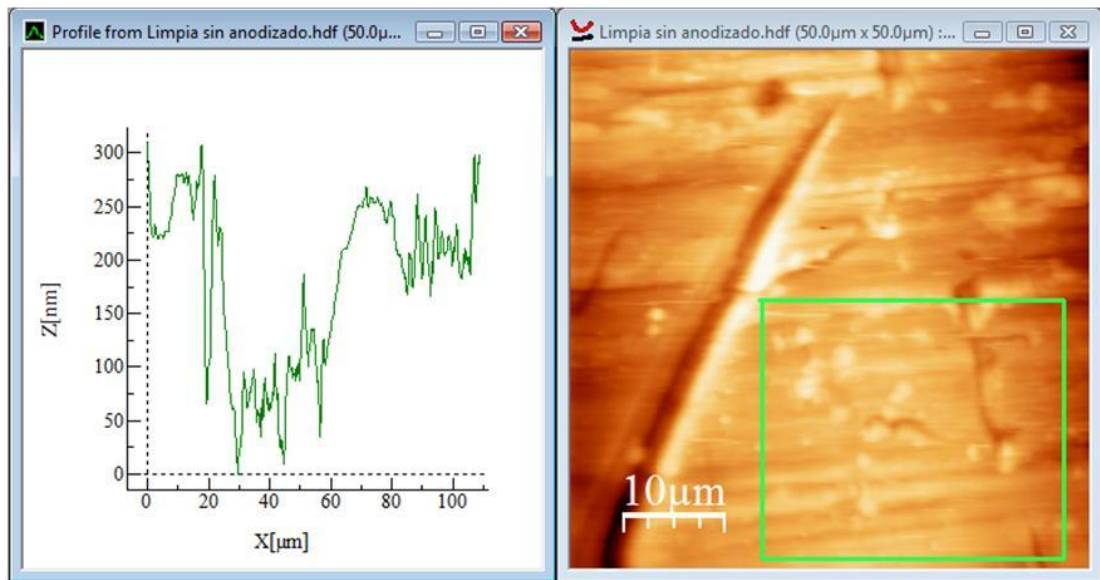
ANEXO VII.

PERFILES DE RUGOSIDAD DE LOS AFM

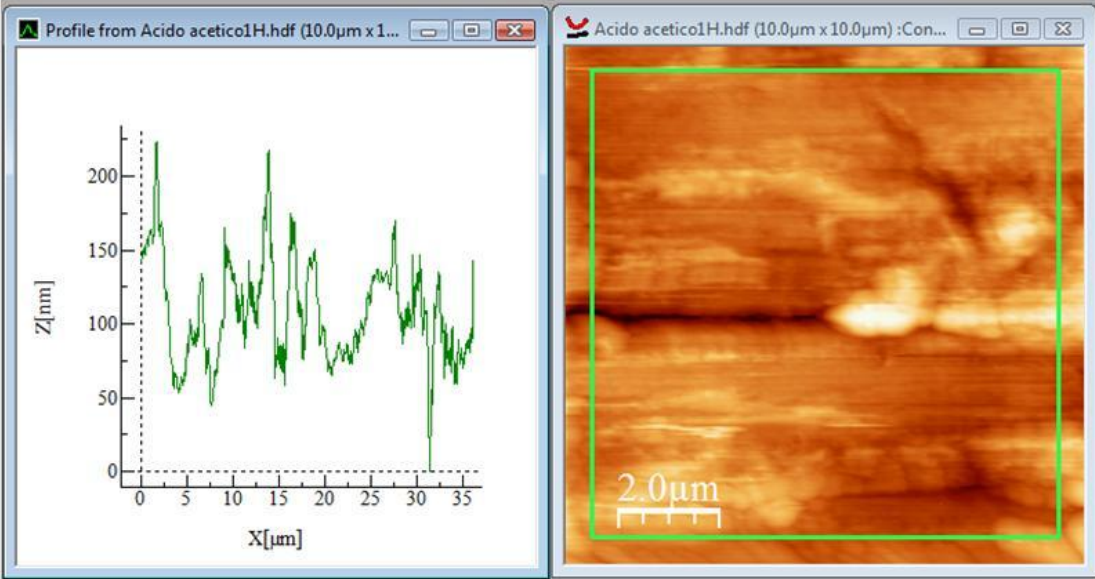
La rugosidad de la superficie se describe normalmente utilizando dos derivaciones aritméticas:

- Ra- media aritmética: el valor promedio aritmético de todas las distancias absolutas del perfil de rugosidad, R, desde la línea central dentro de la longitud de medición.
- Rq raíz cuadrada media: esta es un tipo de medición alternativa al Ra, se define como el valor RMS de un perfil calculado a lo largo de una sola longitud de muestreo, pero que se puede expresar como el resultado medio de 5 longitudes de muestreo consecutivas.

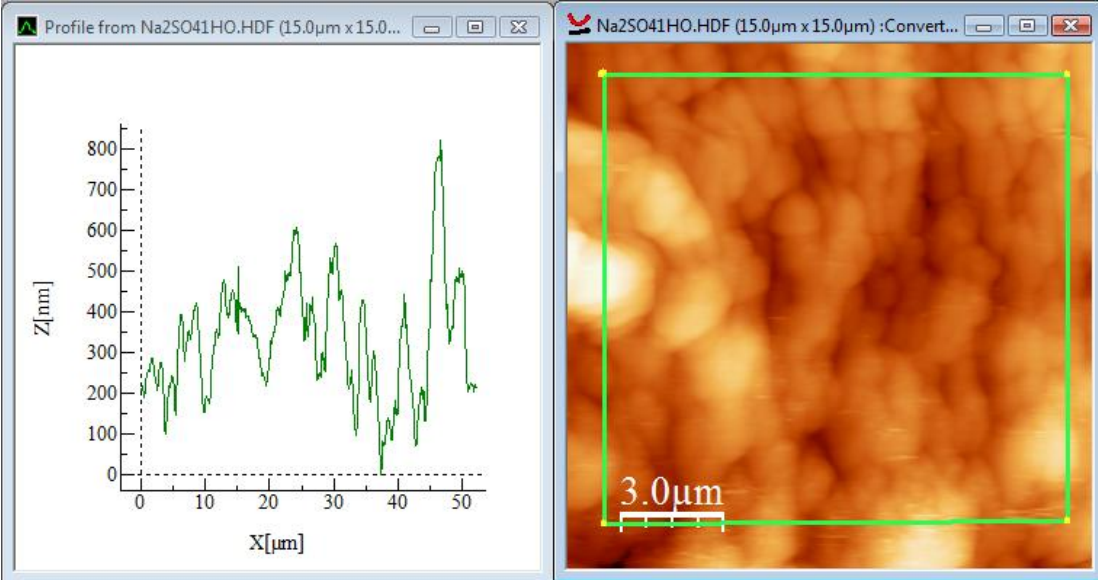
a. Perfil de rugosidad Nitinol sin anodizado



b. Perfil de rugosidad ácido acético



c. Perfil de rugosidad sulfato de sodio

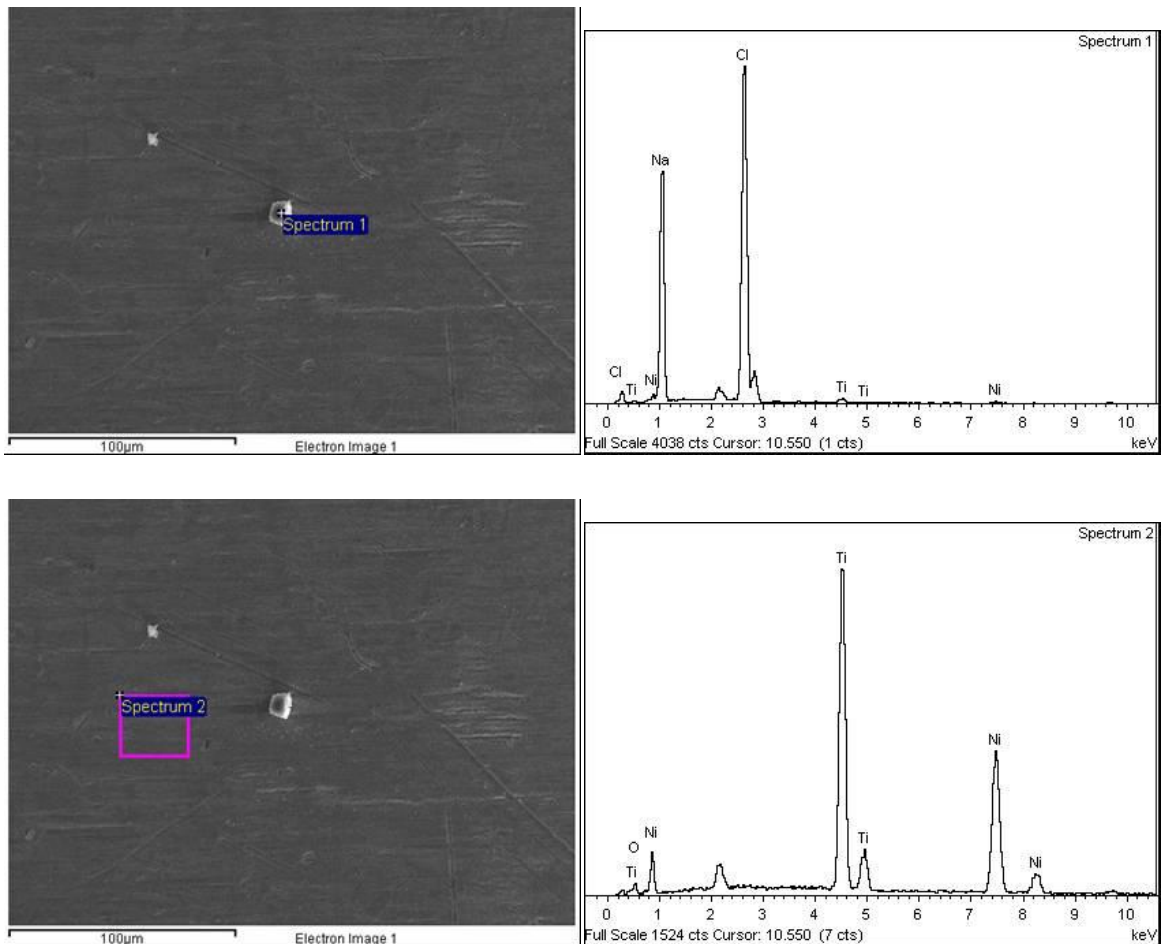


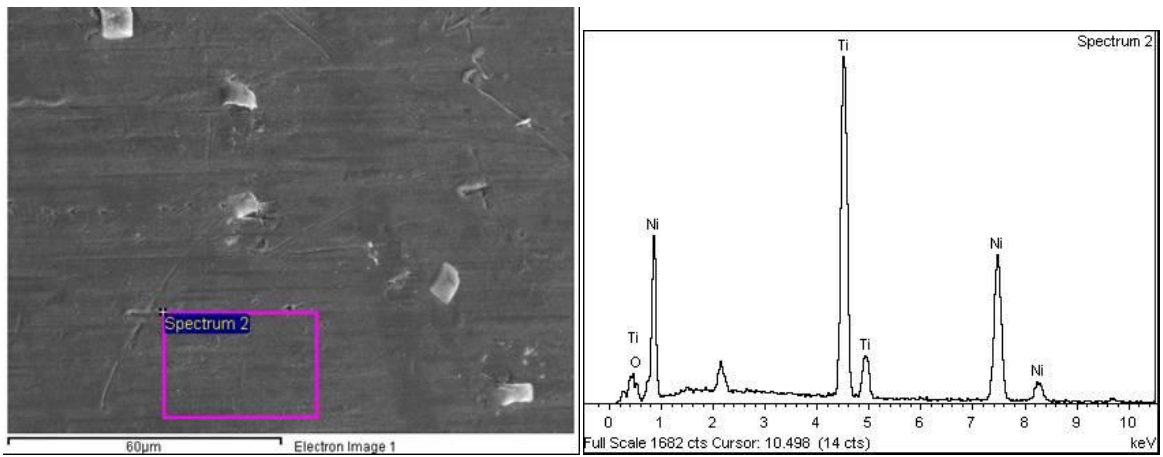
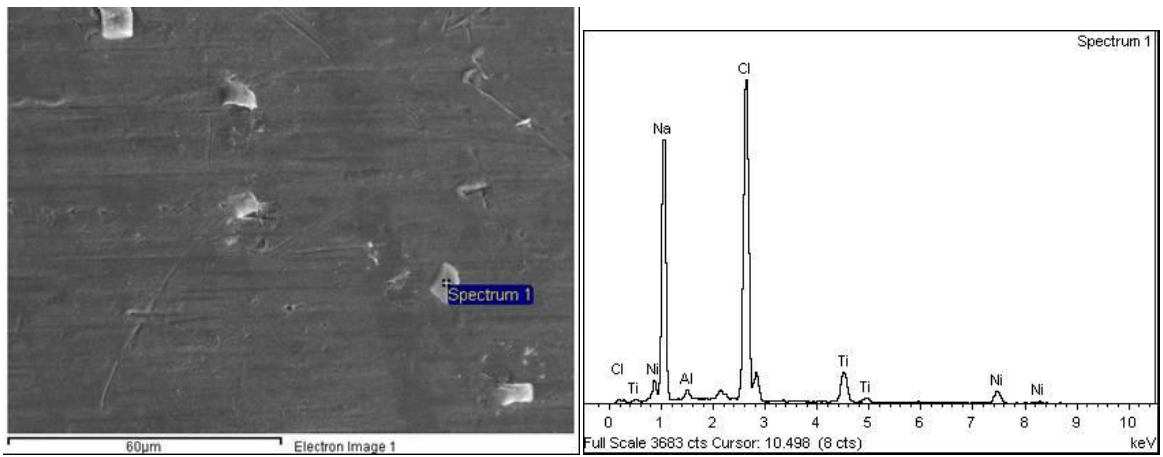
ANEXO VIII.

RESULTADO DE LOS EDX

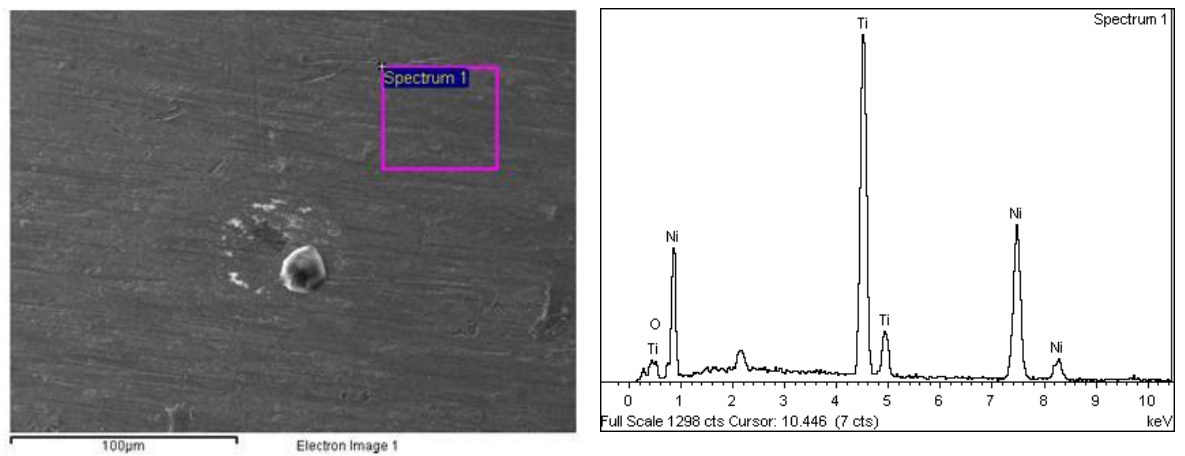
El espectro de dispersión de energía (EDX), identifica la distribución cuantitativa y cualitativa de elementos que se encuentran presentes en la muestra, mostrando gráficas e imágenes relacionadas con esa distribución.

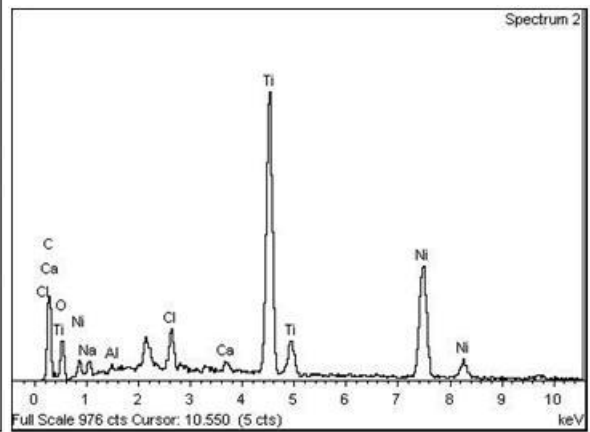
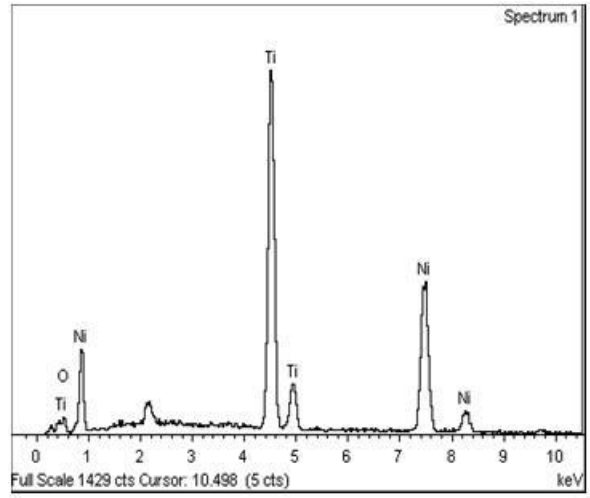
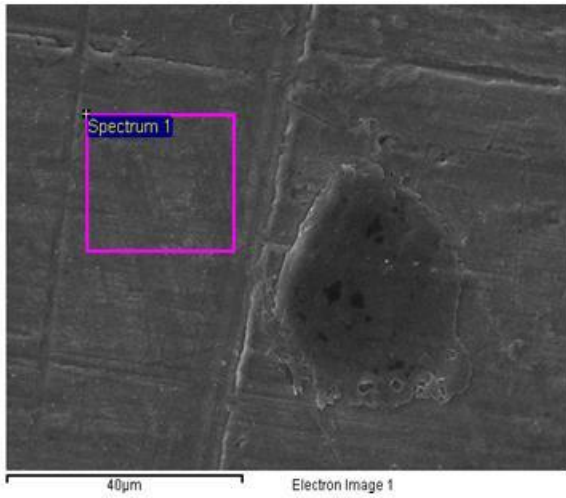
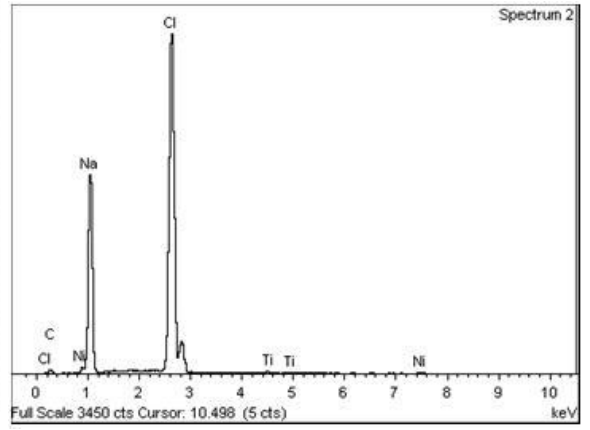
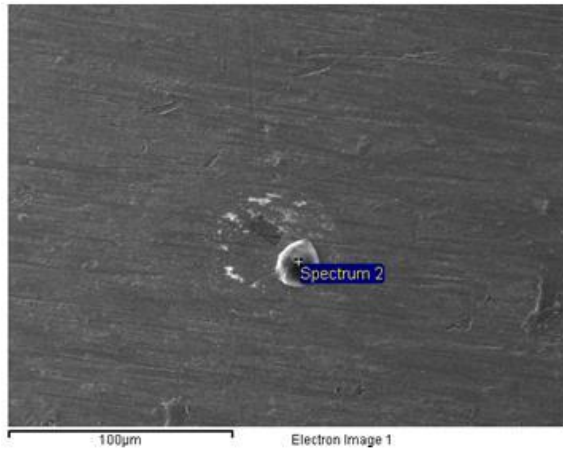
SIN ANODIZADO



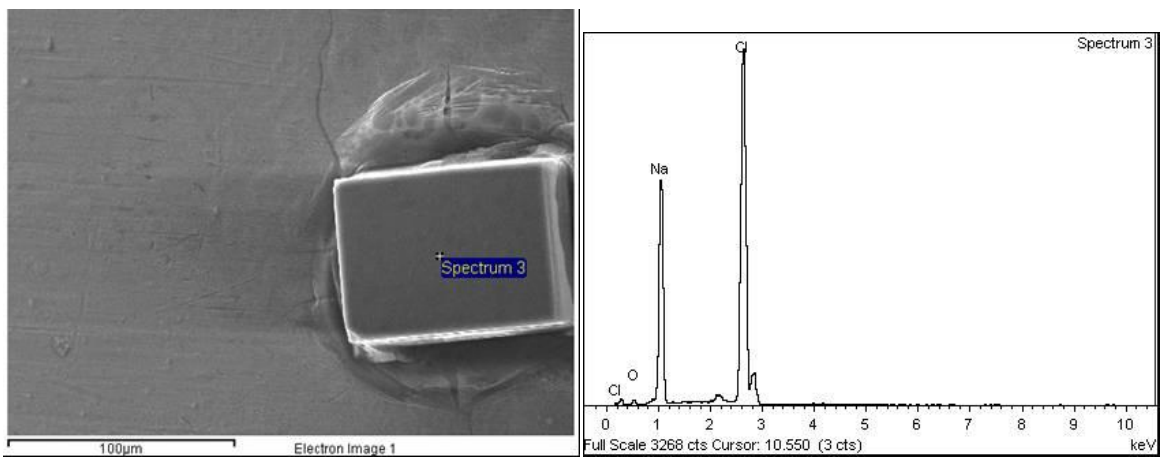
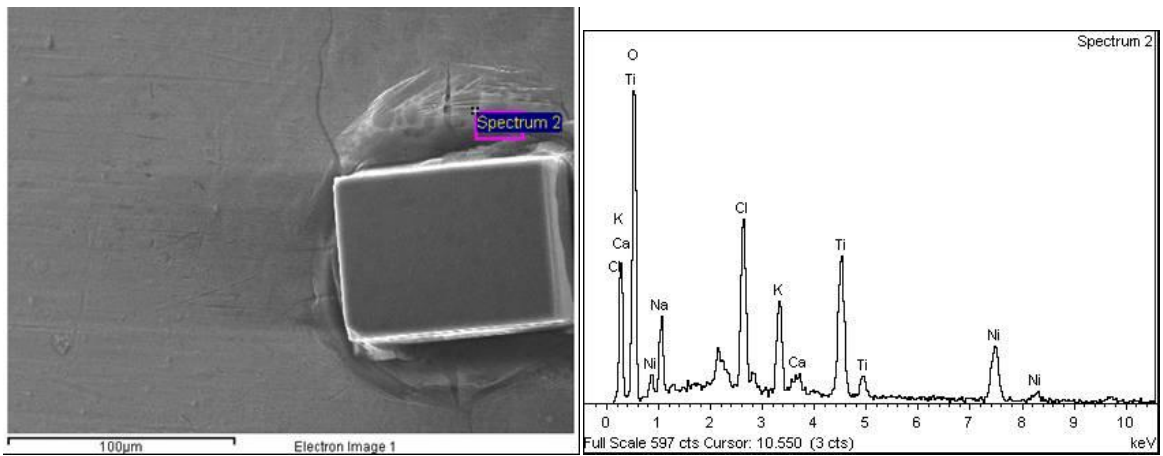
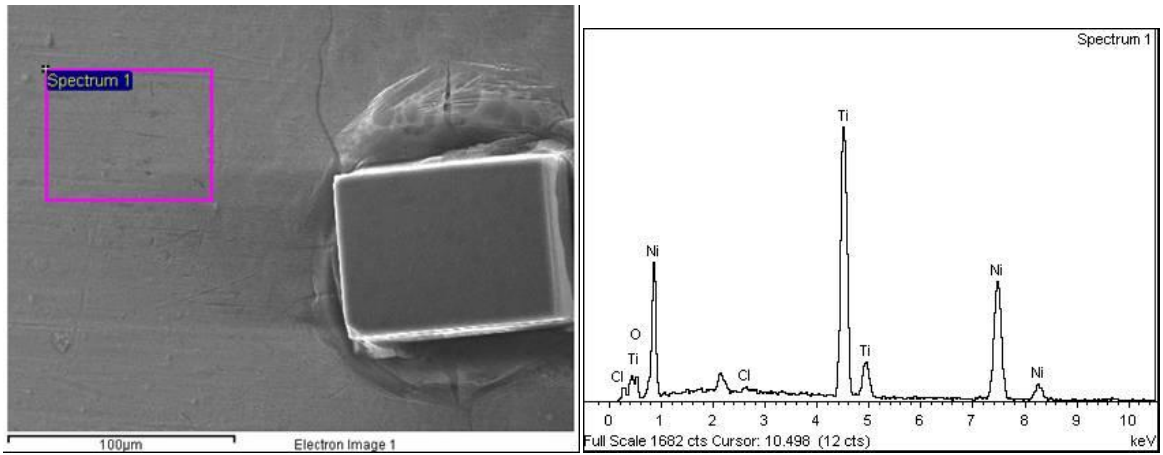


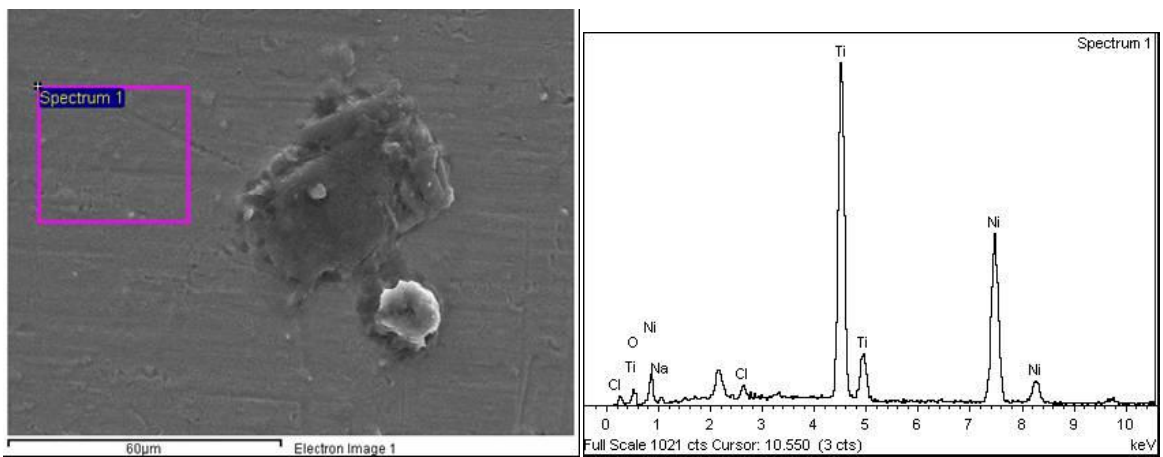
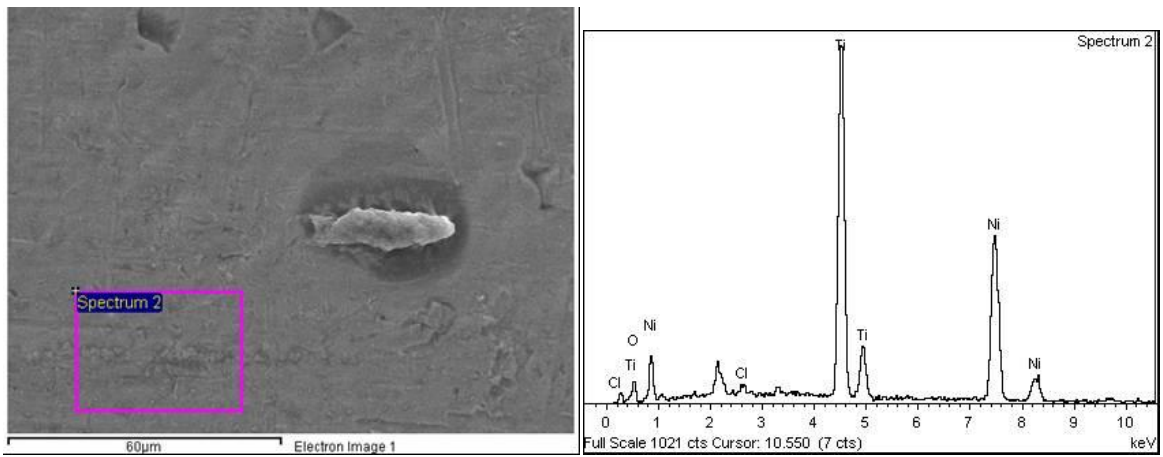
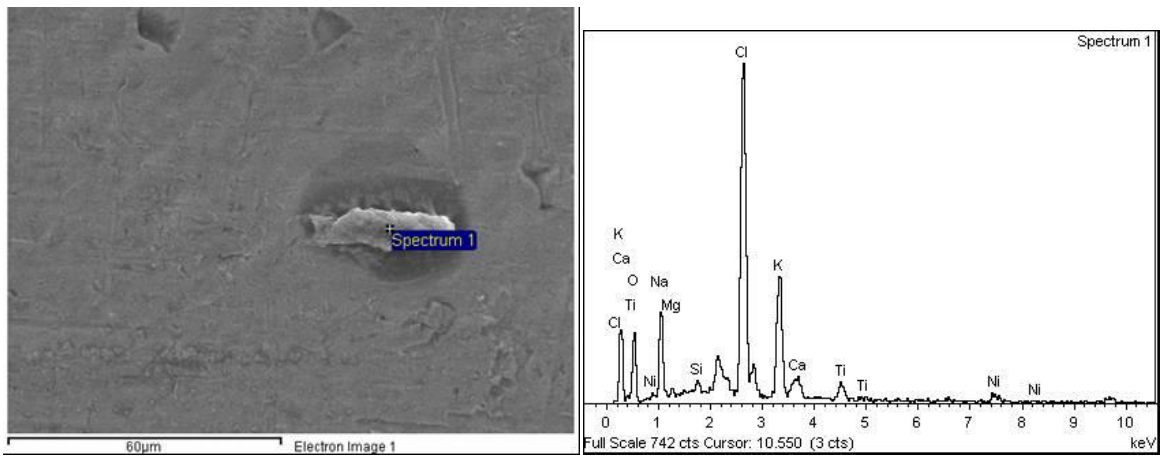
ÁCIDO ACÉTICO

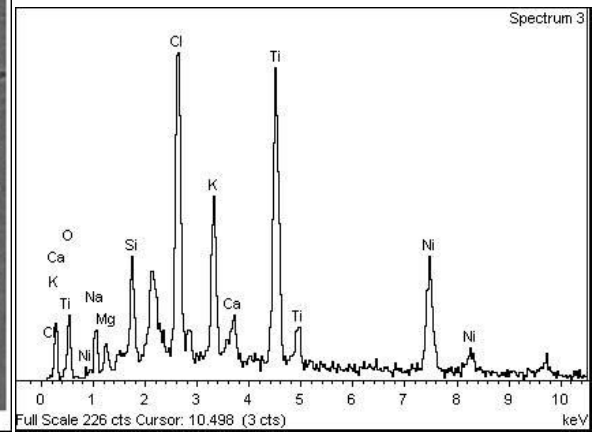
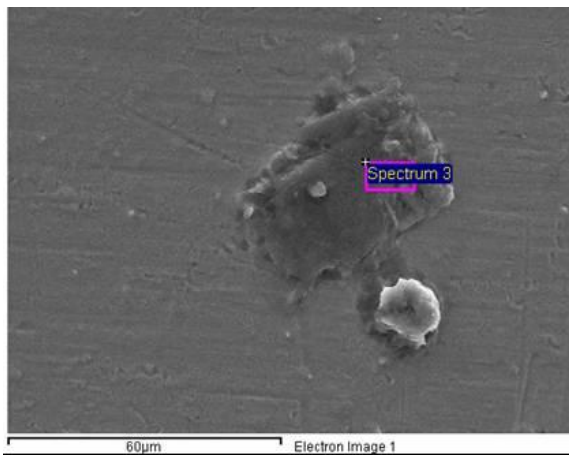
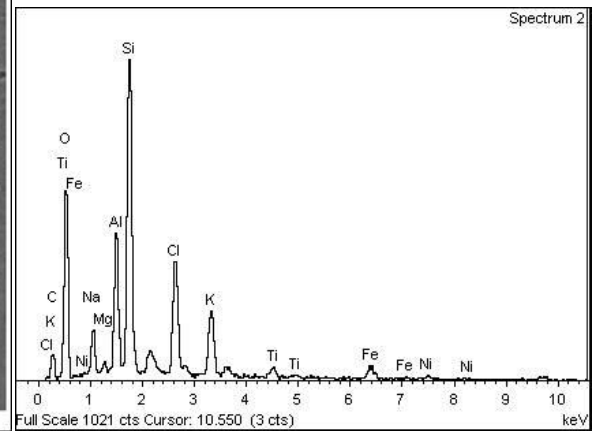
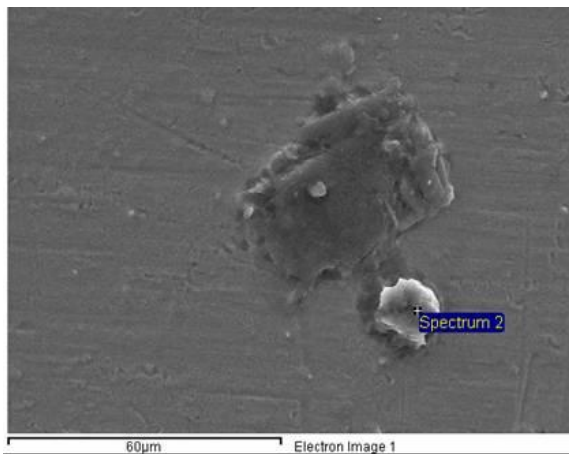




SULFATO DE SODIO



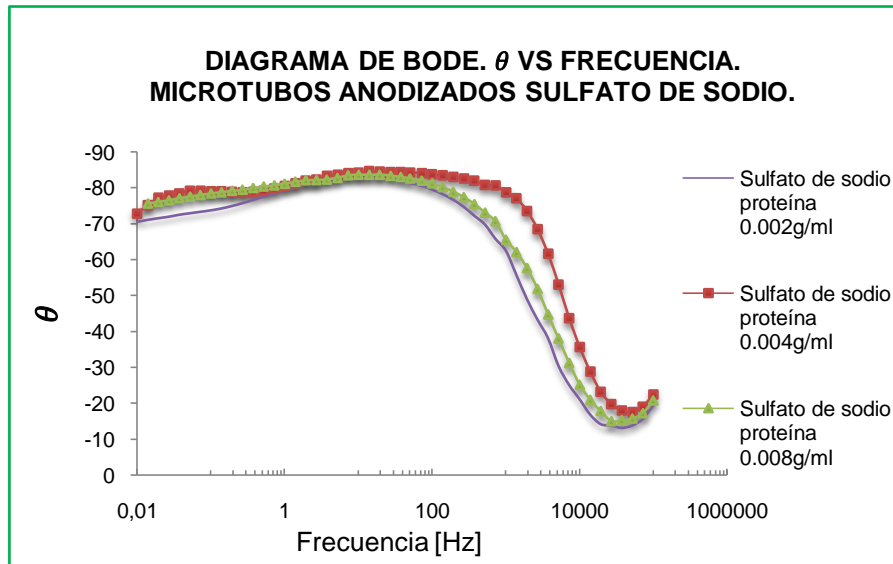




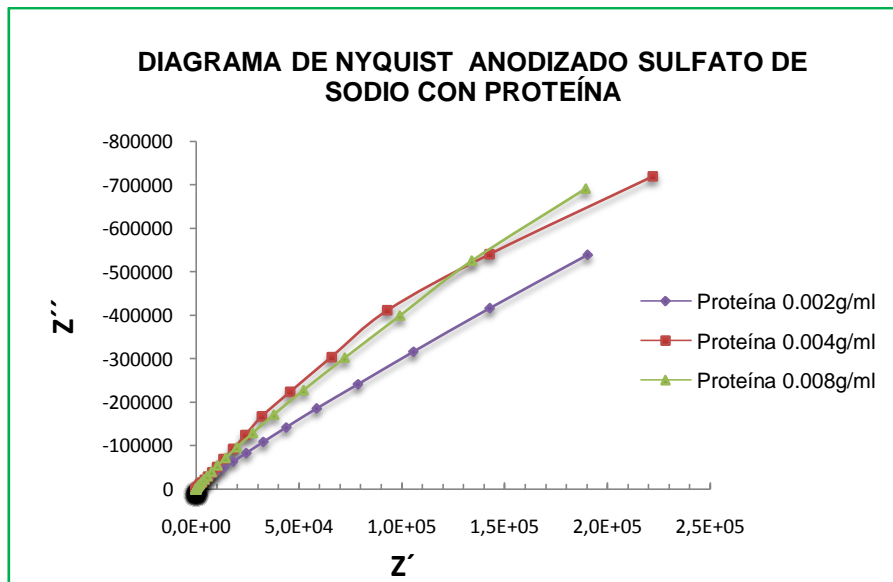
ANEXO IX.

DIAGRAMAS DE BODE Y NYQUIST PARA LOS DIFERENTES SISTEMAS

Diagramas a) Bode b) Nyquist. Probetas de Nitinol anodizadas con sulfato de sodio en presencia de proteína.

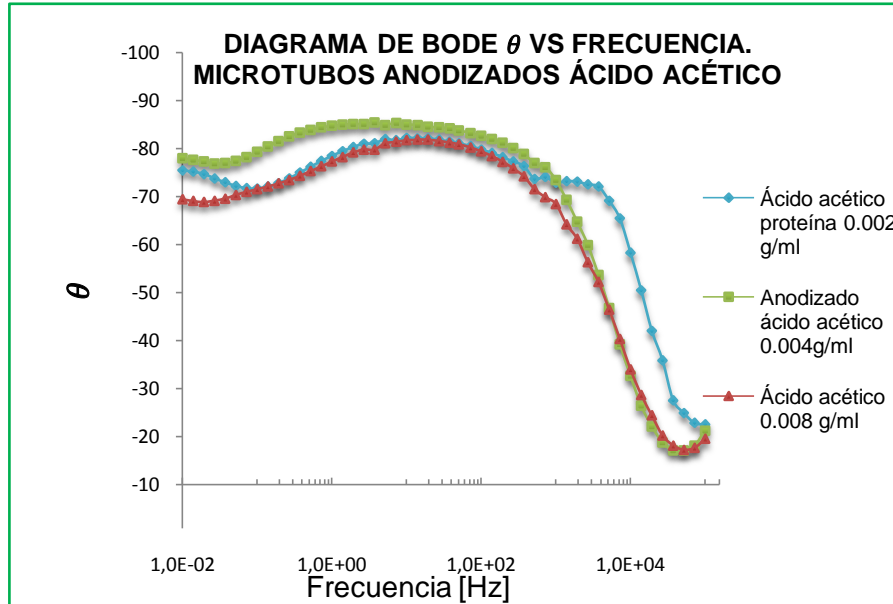


a) Fuente: Autor

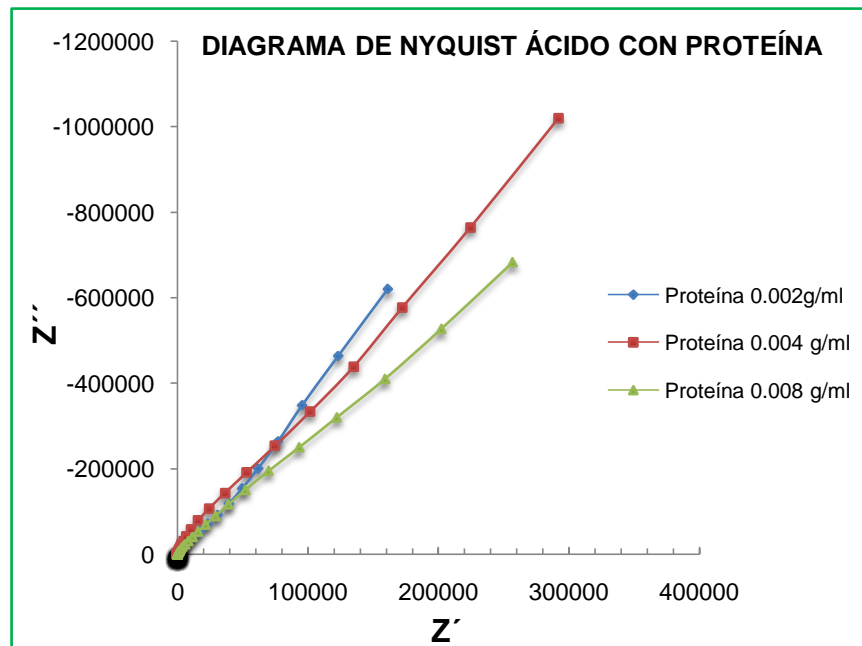


b) Fuente: Autor

Diagramas a) Bode b) Nyquist. Probetas de Nitinol anodizadas con ácido acético en presencia de proteína.



a) Fuente: Autor



c) Fuente: Autor

ANEXO X.

VALORES DE LAS RESISTENCIAS A LA TRANSFERENCIA DE CARGA OBTENIDOS CON EL PROGRAMA Z VIEW.

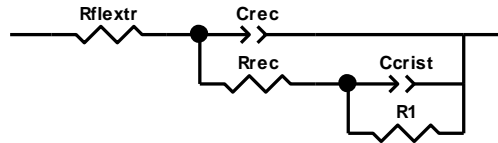
Tiempo	Resistencia a la transferencia de carga (Rtc). Sulfato de sodio	Resistencia a la transferencia de carga (Rtc). Ácido acético
30 min	174.8	2.86E06
60 min	0.652	1.4249E07
90 min	1697*	2.2269E07*

*De acuerdo a estos resultados se utilizaron las probetas anodizadas durante hora y media para hacer las pruebas electroquímicas variando la concentración de proteína.

ANEXO XI.

SIMULACIONES EN Z VIEW

Sin anodizado sin albúmina



Element	Freedom	Value	Error	Error %
Rflextr	Fixed(X)	7,384	N/A	N/A
Crec-T	Fixed(X)	1,3917E-05	N/A	N/A
Crec-P	Fixed(X)	0,93507	N/A	N/A
Rrec	Fixed(X)	12	N/A	N/A
Ccrist-T	Fixed(X)	4,5551E-07	N/A	N/A
Ccrist-P	Fixed(X)	0,39545	N/A	N/A
R1	Free(±)	-1,338E 14	2,5507E 19	1,9064E 07

Chi-Squared: 0,00058042

Weighted Sum of Squares: 0,049336

Data File: ~Clipboard

Circuit Model File: C:\SAI\ZModels\modelo medio-células--amazonsinip

Mode: Run Fitting / Freq. Range (0,0005 - 100000)

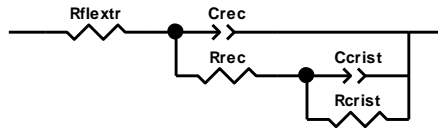
Maximum Iterations: 100

Optimization Iterations: 0

Type of Fitting: Complex

Type of Weighting: Calc-Modulus

Sin anodizado con albúmina

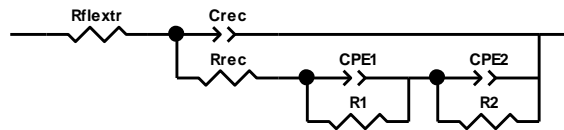


Element	Freedom	Value	Error	Error %
Rflextr	Fixed(X)	6,666	N/A	N/A
Crec-T	Fixed(X)	3,1613E-05	N/A	N/A
Crec-P	Fixed(X)	0,87389	N/A	N/A
Rrec	Fixed(X)	80,5	N/A	N/A
Ccrist-T	Fixed(X)	1,9225E-06	N/A	N/A
Ccrist-P	Fixed(X)	1,13	N/A	N/A
Rcris	Free(±)	1,0157E06	69953	6,8872

Chi-Squared: 0,004428
 Weighted Sum of Squares: 0,37638

Data File: ~Clipboard
 Circuit Model File: C:\SAI\ZModels\modelo medio-células--armazonsinp
 Mode: Run Fitting / Freq. Range (0,0005 - 100000)
 Maximum Iterations: 100
 Optimization Iterations: 0
 Type of Fitting: Complex
 Type of Weighting: Calc-Modulus

Sin anodizado doble albúmina

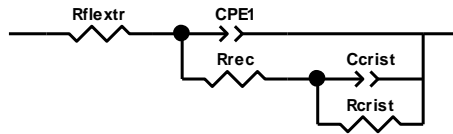


Element	Freedom	Value	Error	Error %
Rflextr	Free(±)	3,716	0,023679	0,63722
Crec-T	Free(±)	9,6882E-06	3,0936E-07	3,1932
Crec-P	Free(±)	0,96093	0,0033256	0,34608
Rrec	Fixed(X)	245,2	N/A	N/A
CPE1-T	Free(±)	1,3629E-05	8,6064E-07	6,3148
CPE1-P	Free(±)	0,66607	0,016015	2,4044
R1	Free(±)	14250	1198	8,407
CPE2-T	Free(±)	1,7283E-05	3,0672E-07	1,7747
CPE2-P	Free(±)	0,79965	0,0056151	0,70219
R2	Free(±)	1,9059E06	94814	4,9748

Chi-Squared: 0,00017973
 Weighted Sum of Squares: 0,01348

Data File: ~Clipboard
 Circuit Model File: C:\SAI\ZModels\modelo medio-células--armazonsinp
 Mode: Run Fitting / Freq. Range (0,0005 - 100000)
 Maximum Iterations: 100
 Optimization Iterations: 0
 Type of Fitting: Complex
 Type of Weighting: Calc-Modulus

Sin anodizado media albúmina

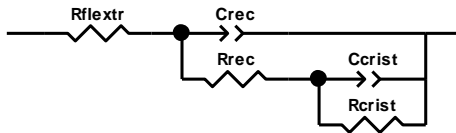


Element	Freedom	Value	Error	Error %
Rflexr	Free(±)	1,648	0,034101	2,0692
CPE1-T	Free(±)	1,9777E-06	3,0768E-07	15,557
CPE1-P	Free(±)	1,151	0,014631	1,2712
Rrec	Free(±)	54,54	13,801	25,304
Ccrist-T	Free(±)	2,4057E-05	3,7698E-07	1,567
Ccrist-P	Free(±)	0,7581	0,0051212	0,67553
Rcrist	Free(±)	1E20	1E20	100

Chi-Squared: 0,0042249
 Weighted Sum of Squares: 0,35066

Data File: ~Clipboard
 Circuit Model File: C:\SAI\ZModels\modelo medio-células--amazonsinp
 Mode: Run Fitting / Freq. Range (0,0005 - 100000)
 Maximum Iterations: 100
 Optimization Iterations: 0
 Type of Fitting: Complex
 Type of Weighting: Calc-Modulus

Sulfato de Sodio sin albúmina, Hora y media

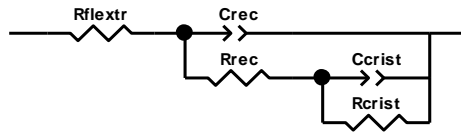


Element	Freedom	Value	Error	Error %
Rflexr	Free(+)	1,832	0,019165	1,0461
Crec-T	Free(+)	3,8584E-06	2,3103E-07	5,9877
Crec-P	Free(+)	1,069	0,0059537	0,55694
Rrec	Free(+)	435,4	61,206	14,057
Ccrist-T	Free(+)	6,7659E-06	2,3115E-07	3,4164
Ccrist-P	Free(+)	0,84508	0,0043273	0,51206
Rcrist	Free(+)	1E20	1E20	100

Chi-Squared: 0,0032853
 Weighted Sum of Squares: 0,22669

Data File: ~Clipboard
 Circuit Model File: C:\SAI\ZModels\modelo medio-células--amazonsinp
 Mode: Run Fitting / Freq. Range (0,0005 - 100000)
 Maximum Iterations: 100
 Optimization Iterations: 0
 Type of Fitting: Complex
 Type of Weighting: Calc-Modulus

Sulfato de Sodio media albumina, Hora y media

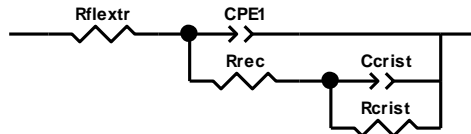


Element	Freedom	Value	Error	Error %
Rflextr	Fixed(X)	6,861	N/A	N/A
Crec-T	Fixed(X)	1,3486E-05	N/A	N/A
Crec-P	Fixed(X)	0,92761	N/A	N/A
Rrec	Fixed(X)	1,0039E05	N/A	N/A
Ccrist-T	Fixed(X)	7,718E-06	N/A	N/A
Ccrist-P	Fixed(X)	0,80138	N/A	N/A
Rcris	Free(±)	3,6466E06	4,182E05	11,468

Chi-Squared: 0,0021223
 Weighted Sum of Squares: 0,18464

Data File: ~Clipboard
 Circuit Model File: C:\SAI\ZModels\modelo medio-células--amazonsinp
 Mode: Run Fitting / Freq. Range (0,0005 - 100000)
 Maximum Iterations: 100
 Optimization Iterations: 0
 Type of Fitting: Complex
 Type of Weighting: Calc-Modulus

Sulfato de Sodio con albúmina, Hora y media.

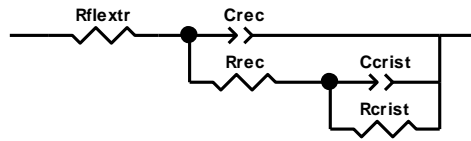


Element	Freedom	Value	Error	Error %
Rflextr	Fixed(X)	2,698	N/A	N/A
CPE1-T	Fixed(X)	1,2783E-05	N/A	N/A
CPE1-P	Fixed(X)	0,94991	N/A	N/A
Rrec	Fixed(X)	87789	N/A	N/A
Ccrist-T	Fixed(X)	3,9306E-06	N/A	N/A
Ccrist-P	Fixed(X)	0,83236	N/A	N/A
Rcris	Free(±)	4,7156E06	3,4461E05	7,3079

Chi-Squared: 0,0014451
 Weighted Sum of Squares: 0,12283

Data File: ~Clipboard
 Circuit Model File: C:\SAI\ZModels\modelo medio-células--amazonsinp
 Mode: Run Fitting / Freq. Range (0,0005 - 100000)
 Maximum Iterations: 100
 Optimization Iterations: 0
 Type of Fitting: Complex
 Type of Weighting: Calc-Modulus

Sulfato de Sodio doble albúmina, Hora y media



Element	Freedom	Value	Error	Error %
Rflextr	Fixed(X)	5,074	N/A	N/A
Crec-T	Fixed(X)	1,3798E-05	N/A	N/A
Crec-P	Fixed(X)	0,93258	N/A	N/A
Rrec	Fixed(X)	74748	N/A	N/A
Ccrist-T	Fixed(X)	9,8982E-06	N/A	N/A
Ccrist-P	Fixed(X)	0,8358	N/A	N/A
Rcris	Fixed(X)	2,8458E06	N/A	N/A

Chi-Squared: 0,00096322

Weighted Sum of Squares: 0,085726

Data File: ~Clipboard

Circuit Model File: C:\SAI\ZModel\modelo medio-células--amazonsinp

Mode: Run Fitting / Freq. Range (0,0005 - 100000)

Maximum Iterations: 100

Optimization Iterations: 0

Type of Fitting: Complex

Type of Weighting: Calc-Modulus

ANEXO XII.

DATOS PARA LA ELABORACIÓN DE LAS ISOTERMAS DE LANGMUIR.

Los resultados para las simulaciones permiten obtener valores de R_{tc} (resistencia a la transferencia de carga). De ahí se hacen los respectivos ajustes como se muestra en las tablas que se muestran a continuación.

Datos para la isoterma para los microtubos modificados con ácido acético.

Concentración de proteína (g/ ml)	Resistencia tranferencia de carga ($R_{tc} \Omega$)	R_{tc} corregida	C^*r_{tc} corregida	1/ R_{tc}	(1/ R_{tc}) c
0	350120	0	0	2.856E-06	0
0.002	496640	146520	293.04	2.0135E-06	8.425E-07
0.004	712340	362220	1148.88	1.4038E-06	1.452E-06
0.008	646070	295950	2367.6	1.55E-06	1.306E-06

Datos para la isoterma para los microtubos modificados sulfato de sodio

Concentración proteínas (g/ml)	$R_{tc}(\Omega)$	R_{tc} corregido	$C^* R_{tc}$ corregido	1/ R_{tc}	(1/ R_{tc}) c
0	435.4		0	0.00229674	0
0.002	100390	99954.6	199.9092	0.00000996	2.28678E-03
0.004	87789	87353.6	349.4144	1.139E-05	2.28535E-03
0.008	74748	74312.6	594.5008	1.34E-05	2.28334E-03