

Análisis fisicoquímico y bioquímico de recubrimientos compuestos de hidroxiapatita
reforzados con nanotubos de carbono depositados sobre Ti6Al4V

Diana Katherynne Sierra Herrera

Ing. Metalúrgica

Trabajo de grado para optar al título de Magister en Ingeniería de Materiales

Director:

Ph.D Darío Yesid Peña Ballesteros

Codirectora:

MSc Nerly Deyanira Montañez Supelano

Universidad Industrial de Santander

Facultad de ingenierías fisicoquímicas

Escuela de ingeniería metalúrgica y ciencia de materiales

Maestría en ingeniería de materiales

Bucaramanga

2018

Agradecimientos

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a:

Ph.D. Darío Yesid Peña Ballesteros, por darme la oportunidad de ser parte de este proyecto de investigación, por haberme abierto las puertas del GIC, por sus enseñanzas, confianza y apoyo.

MSc Nerly Deyanira Montañez Supelano, por brindarme su colaboración y enseñanzas para el desarrollo de esta investigación, por mantener un espíritu de amabilidad y paciencia.

Ph.D. Sergio Ismael Blanco Vásquez, por su colaboración incondicional en las diferentes etapas de mi formación, por compartir su gran conocimiento y enseñarme lo interesante que es el mundo de la electroquímica.

MSc Anderson Sandoval, por guiar mis primeros pasos experimentales durante las etapas iniciales de mi investigación.

A los laboratorios de microscopía electrónica de barrido, difracción de rayos X, laboratorio de espectrometría, laboratorio de electroquímica, laboratorio de alimentos (CICTA), al centro de investigación en catálisis (CICAT) y al Centro de Enfermedades Tropicales (CINTROP) de la Universidad Industrial de Santander, especialmente al profesor José Henao y a los profesionales Jhon Bonilla, Carlos Chacón, Said Mora, Wendy Mancipe y Heyder Carreño García por su importante colaboración.

A la escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de Materiales y a todos sus maestros que me permitieron formar parte de ella.

Finalmente, a la Universidad Industrial de Santander, por la beca asignada para el desarrollo de mis estudios. A la vicerrectoría de investigación y extensión (VIE) y a la facultad de Físico-química por su apoyo para la participación en los diferentes eventos académicos.

Dedicatoria

*A Dios,
Por darme tranquilidad, fortaleza y sabiduría.
Por poner en mi camino personas que contribuyeron enormemente en el cumplimiento de esta
meta.*

*A mis Amados Padres,
Hernando y Marylu, porque con su apoyo y Amor incondicional esto fue posible.*

*A Carlos, Diego, Silvia y Rossy Por el Amor, aprecio, comprensión y su compañía
incondicional.*

A Fabian, Ana y Nathaly por su gran apoyo y cariño.

Tabla de contenido

Introducción	15
1 Descripción del trabajo de investigación	18
1.1 Planteamiento del problema	18
1.2 Hipótesis	20
1.3 Impacto del trabajo de investigación	20
2 Estado del arte y fundamentos teóricos	21
3 Objetivos	28
3.1 Objetivo general	28
3.2 Objetivos específicos	28
4 Metodología	29
4.1 Preparación superficial del sustrato	29
4.2 Preparación de MWCNT funcionalizados	29
Purificación y funcionalización de CNT	29
4.3 Caracterización de los MWCNT funcionalizados	30
4.4 Obtención de recubrimientos de HAP reforzada con MWCNT	30
4.5 Caracterización de los recubrimientos de <i>HAP/MWCNT</i>	31
4.6 Ensayos Bioelectroquímicos	31
4.7 Evaluación de la respuesta celular de los recubrimientos de HAP+MWCNT sobre Ti- 6Al-4V	32
4.7.1 Cultivo celular de osteoblastos de la línea HOS.	32
4.7.2 Ensayos de citotoxicidad.	33

4.7.3	Ensayos de adhesión celular por microscopía de epifluorescencia.....	33
4.7.4	Medición de fosfatasa alcalina.....	33
4.8	Análisis de resultados, publicaciones e informe final	34
5	Resultados y análisis de resultados	35
5.1	Caracterización y funcionalización de nanotubos de carbono de pared múltiple.....	35
5.2	Obtención y caracterización de recubrimientos de HAP reforzada con MWCNT.....	40
5.2.1	Estudio de la influencia de la variación de los parámetros de síntesis en las características de los recubrimientos de HAP.....	40
5.2.2	Electrodeposición de recubrimientos de HAP reforzada con MWCNT.	60
5.3	Evaluación electroquímica de recubrimientos de HAP reforzados con MWCNT.	68
5.4	Evaluación de la respuesta celular de los recubrimientos de HAP/MWCNT sobre Ti-6Al-4V	76
5.4.1	Ensayos de citotoxicidad.....	76
5.4.2	Ensayos de adhesión celular por microscopia de epifluorescencia.....	77
5.4.3	Medición de fosfatasa alcalina.....	80
6	Conclusiones	82
7	Recomendaciones	84
	Referencias bibliográficas.....	85
	Apéndices.....	98

Lista de figuras

Figura 1. Tipos de nanotubos de carbono de acuerdo con la cantidad de láminas de grafeno que lo conforman. Nanotubos de pared simple (izquierda) nanotubos de pared múltiple (derecha) <i>Adaptado de</i> (H. He et al., 2013)	23
Figura 2. Espectro Raman de MWCNT, a) prístinos, b) tratamiento 1 y c) tratamiento 2.....	37
Figura 3. Microscopía electrónica de barrido de MWCNT a) prístinos, b) tratamiento 1 y c) tratamiento 2	38
Figura 4. Voltamperometría cíclica de Ti6Al4V en una solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (a) pH 4,5 (b) pH 6.....	40
Figura 5. Curva Cronopotenciométrica de los recubrimientos a pH:4,5 (a) condición I, (b) condición II, (c) condición III y (d) condición IV.	44
Figura 6. Imágenes SEM de los recubrimientos de Fosfatos de calcio por electrodeposición galvanostática (a) condición I, (b) condición II, (c) condición III y (d) condición IV.	45
Figura 7. Espectros FTIR de los recubrimientos obtenidos mediante electrodeposición galvanostática pulsada. (a) condición I, (b) condición II, (c) condición III y (d) condición IV... ..	46
Figura 8. Difractograma de rayos X de los recubrimientos obtenidos mediante electrodeposición galvanostática pulsada (a) condición I, (b) condición II, (c) condición III y (d) condición IV....	47
Figura 9. Curva Cronoamperométrica de los recubrimientos a pH 4,5 con diferente relación de pulsos. (a) condición I (b) condición II (c) condición III.	49
Figura 10. Imágenes SEM de los recubrimientos a pH 4,5 con diferente relación de pulsos. (a) condición I (b) condición II (c) condición III.	50
Figura 11. Espectros FTIR de los recubrimientos a pH 4,5 con diferente relación de pulsos.	51
Figura 12. Difractograma de rayos X del recubrimiento a pH 4,5 condición I.	52

Figura 13. Imágenes de microscopía confocal (3D) de los recubrimientos a pH 4,5 con diferente relación de pulsos. (a) condición I (b) condición II (c) condición III.....	54
Figura 14. Curva Cronoamperométrica de los recubrimientos a pH 6 con diferente relación de pulsos. (a) condición I (b) condición II (c) condición III	55
Figura 15. Imágenes SEM de los recubrimientos a pH 6 con diferente relación de pulsos. (a) condición I (b) condición II (c) condición III	57
Figura 16. Espectros FTIR de los recubrimientos a pH 6 con diferente relación de pulsos.....	58
Figura 17. Difractograma de rayos X del recubrimientos a pH 6 condición I.....	59
Figura 18. Imágenes de microscopía confocal (3D) de los recubrimientos a pH 6 con diferente relación de pulsos. (a) condición I (b) condición II (c) condición III.....	60
Figura 19. Voltamperometría cíclica de Ti6Al4V en una solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ con presencia de 1 g/L MWCNT ($v: 20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, pH: 6).	61
Figura 20. Cronoamperometría de los recubrimientos hidroxiapatita con diferentes concentraciones de MWCNT a) 0.1 g/L MWCNT, b) 0.5 g/L MWCNT y c) 1 g/L MWCNT. Inseto: detalle de la repuesta obtenida en un pulso de potencial.....	63
Figura 21. Imágenes SEM de los recubrimientos de hidroxiapatita con diferentes concentraciones de MWCNT a) 0.1 g/L MWCNT, b) 0.5 g/L MWCNT y c) 1 g/L MWCNT	64
Figura 22. Variación en la cantidad de MWCNT incorporados en el recubrimiento con respecto a la concentración de MWCNT presentes en solución.....	65
Figura 23. Espectros FTIR de los recubrimientos de hidroxiapatita con diferentes concentraciones de MWCNT.	66
Figura 24. Difractograma de rayos X de los recubrimientos de hidroxiapatita con diferentes	

concentraciones de nanotubos de carbono (0.1 g/l MWCNT, 0.5 g/l MWCNT y 1 g/l MWCNT).	67
Figura 25. Diagrama de (a) Nyquist y (b) Bode de la muestra Ti6Al4V sin recubrimiento.	69
Figura 26. Diagrama Nyquist de los recubrimientos de hidroxiapatita con diferentes concentraciones de MWCNT.....	70
Figura 27. Diagrama Bode de los recubrimientos de hidroxiapatita con diferentes concentraciones de MWCNT.	71
Figura 28. Circuitos equivalentes que representan los resultados de la impedancia de las muestras (a) aleación de Ti6Al4V sin recubrimiento; (b) Ti6Al4V+HAP; (c) Ti6Al4V+HAP+ % MWCNT	73
Figura 29. Curvas de polarización potenciodinámicas de los recubrimientos de hidroxiapatita con diferentes concentraciones de MWCNT.....	74
Figura 30. Porcentaje de viabilidad de las muestras Ti6Al4V con y sin recubrimiento.....	77
Figura 31. Micrografías de las muestras de incubación celular a 40x a) 24 horas, b) 72 horas y c) 120 horas.....	78
Figura 32. Medición de la producción de fosfatasa alcalina de osteoblastos HOS	81

Lista de tablas

Tabla 1: Descripción de muestras para pruebas bioelectroquímicas.	32
Tabla 2: Análisis de Espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) de Nanotubos de pared Múltiple a) Prístinos, b) Tratamiento 1 y c) Tratamiento 2.	35
Tabla 3. Resultados de las mediciones de EIS y polarización potenciodinámicas en medio RPMI 1640 a 37 °C.	68
Tabla 4. Medidas de ángulo de contacto en agua sobre las muestras de Ti6Al4V con y sin recubrimiento.	80

Lista de Apéndices

Apéndice A. Imágenes SEM de los depósitos de hidroxiapatita con diferentes concentraciones de MWCNT a) 0.1 g/L MWCNT, b) 0.5 g/L MWCNT y c) 1 g/L MWCNT a 500x.	98
Apéndice B. Imágenes de microscopía confocal (3D) de los depósitos a pH 4,5 con diferente relación de pulsos. $t_{on}/t_{off}=30s/15s$ (b) $t_{on}/t_{off} = 60s/30s$ (c) $t_{on}/t_{off} = 120s/60s$	99
Apéndice C. Imágenes de microscopía confocal (3D) de los depósitos a pH 6 con diferente relación de pulsos. (a) $t_{on}/t_{off}=30s/15s$ (b) $t_{on}/t_{off} = 60s/30s$ (c) $t_{on}/t_{off} = 120s/60s$	100
Apéndice D. Medición de rugosidad media.	101
Apéndice E. Ecuación de Butler Volmer y Nernst Plank	102

Resumen

TITULO: ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO Y BIOQUÍMICO DE RECUBRIMIENTOS COMPUESTOS DE HIDROXIAPATITA REFORZADOS CON NANOTUBOS DE CARBONO DEPOSITADOS SOBRE Ti6Al4V*

AUTOR: ING. DIANA KATHERYNNE SIERRA HERRERA **

PALABRAS CLAVES: BIOMATERIAL, RECUBRIMIENTOS, ELECTRODEPOSICIÓN, HIDROXIAPATITA

DESCRIPCIÓN:

Se estudió el efecto de la variación de los parámetros experimentales en la síntesis de recubrimientos de hidroxiapatita reforzada con nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT) sobre Ti6Al4V obtenidos mediante electrodeposición pulsada. El análisis fisicoquímico se realizó mediante difracción de rayos X (DRX), espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y microscopía electrónica de barrido (MEB). Se estudió la estabilidad electroquímica de los recubrimientos en presencia de medio de cultivo celular, mediante la medición de potencial de circuito abierto (OCP), espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) y curvas de polarización potenciodinámicas (LSV). Se estudió el potencial citotóxico de las muestras aplicando el método colorimétrico (MTT), la adhesión celular mediante microscopía de epifluorescencia y la actividad celular realizando mediciones de producción de fosfatasa alcalina (ALP). Los análisis obtenidos por DRX y FTIR confirmaron la presencia de hidroxiapatita (HAP), mediante el análisis de las imágenes obtenidas por MEB se pudo comprobar la incorporación de los MWCNT en la matriz del recubrimiento. Las variaciones en las condiciones de electrodeposición pulsada influyen en la homogeneidad del recubrimiento, presentando una morfología en forma de agujas. Los resultados electroquímicos mostraron una mayor estabilidad termodinámica en las pruebas de OCP para las muestras recubiertas, además existe una relación entre la incorporación de MWCNT con la resistividad del recubrimiento reflejado en las pruebas EIS Y LVS. El ensayo de MTT confirma que las muestras presentan una viabilidad celular mayor al 87%. No obstante, los resultados de adhesión celular y medición de ALP revelaron una marcada inhibición en la adhesión y proliferación de células de osteoblastos HOS sobre las muestras recubiertas.

* Trabajo de grado

**Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Metalúrgica. Director: PhD Dario Yesid Peña Ballesteros

Abstract

TITLE: PHYSICOCHEMICAL AND BIOCHEMICAL ANALYSIS OF CARBON NANOTUBE REINFORCED HYDROXYAPATITE COMPOSITE COATING ON Ti6Al4V*

AUTHOR: ENG. DIANA KATHERYNNE SIERRA HERRERA**

KEYWORDS: BIOMATERIAL, COATING, ELECTRODEPOSITION, HYDROXYAPATITE

DESCRIPTION:

We studied the effect of the electrochemical parameters variation in the synthesis of multiwall carbon nanotubes (MWCNT) reinforced hydroxyapatite (HAP) coating on Ti6Al4V obtained by pulsed potential electrodeposition. The physicochemical analysis was made by X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and scanning electron microscopy (SEM). The electrochemical stability of the coating was evaluated on cell culture media by the measured of open circuit potential, electrochemical impedance spectroscopy and linear sweep voltammetry. The cytotoxicity was studied using MTT colorimetric assay, cell adhesion by epifluorescence microscopy and cell activity measured by alkaline phosphatase production. XRD and FTIR results confirm the hydroxyapatite formation, the incorporation of MWCNT on the coating structure was verified by SEM. The coated showed a needle-like structure, this structure are related to the pulsed electrodeposition parameters variation. The OCP test showed that the coated samples are more stable than the Ti6Al4V samples. A relationship between MWCNT incorporation and the coating resistivity was determined by EIS and LSV analysis. The MTT assay confirms that the samples exhibited a cell viability greater than 87%. Furthermore, the results of cell adhesion and ALP revealed an inhibition of the adhesion and proliferation of HOS osteoblast cells on the coated samples.

* Thesis

**Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Metalúrgica. Director: PhD Dario Yesid Peña Ballesteros

Introducción

Los biomateriales han sido ampliamente usados para diversas aplicaciones médicas con la finalidad de reparar, reemplazar o mejorar cierta región del cuerpo humano aumentando su funcionalidad, fortaleciendo simultáneamente la salud y aumentando la expectativa de vida del paciente.

En este sentido, existe una gran demanda en el uso de implantes ortopédicos en Colombia debido a que alrededor de 100.000 pacientes al año, son intervenidos quirúrgicamente implantando dispositivos que mejoren la movilidad del paciente usando principalmente piezas metálicas biocompatibles. Sin embargo, la inserción de un material ajeno al cuerpo humano puede acarrear alteraciones cercanas al tejido circundante del implante ocasionando el rechazo de este, debido a la carencia de bioactividad.

Considerando lo anterior, se ha llevado a cabo numerosas investigaciones en donde su principal propósito ha sido la modificación superficial de los dispositivos de mayor demanda en la industria ortopédica. La búsqueda de nuevas alternativas está ligada a obtener materiales con mejores propiedades de biocompatibilidad y bioactividad sin dejar a un lado el costo que implica la modificación y desarrollo de nuevos productos que puedan eventualmente ser usado como dispositivos médicos. Una de estas modificaciones superficiales, es el desarrollo de recubrimientos con materiales que permitan incrementar la biocompatibilidad y bioactividad del dispositivo cuando se encuentre en contacto con medio biológico; de acuerdo con esto, los fosfatos de calcio en especial la hidroxiapatita ha sido considerada un material bioactivo, demostrando ser

ampliamente usado para mejorar las propiedades biológicas requeridas, de modo que, se han estudiado numerosas técnicas como pulverización por plasma, sol gel, deposición electroforética y electrodeposición directa en la obtención de recubrimientos de hidroxiapatita sobre materiales de osteosíntesis, haciendo énfasis en la obtención de recubrimientos con propiedades fisicoquímicas sobresalientes desarrollados de una manera sencilla, de bajo costo y efectiva.

La electrodeposición pulsada es una técnica que recientemente ha mostrado ser de gran interés en diferentes investigaciones. Con ella se pueden obtener recubrimientos con mejores características en cuanto adherencia y propiedades fisicoquímicas asociado a los intervalos de trabajo que se llevan a cabo, en comparación con la electrodeposición convencional. Permite que la solución precursora de fosfatos de calcio se mantenga estable y no se presente una disminución de la concentración durante el proceso. Se destaca de las anteriores debido a las significativas ventajas que presentan, en donde los procesos se pueden llevar a cabo a bajas temperaturas, no requiere tiempos prolongados de trabajo ni el uso de equipos sofisticados, manteniendo un control en la morfología y espesor de los recubrimientos; Pese a que los recubrimientos de hidroxiapatita proporcionan una mejora en las propiedades biológicas del metal base, es un material frágil, por lo cual, estudios previos han encontrado que reforzar los recubrimientos de hidroxiapatita con la inserción de nanotubos de carbono mejoran las propiedades mecánicas sin afectar las propiedades biológicas del recubrimiento.

En el presente trabajo se modificó superficialmente la aleación Ti6Al4V (siendo un material considerablemente usado en la ortopedia), desarrollando un recubrimiento de hidroxiapatita reforzada con nanotubos de carbono mediante electrodeposición pulsada, con el propósito de

estudiar y mejorar los parámetros experimentales del procedimiento de obtención, siendo una técnica destacada debido a su fácil aplicación y bajo costo.

La presente investigación se realizó bajo el marco del proyecto financiado por la vicerrectoría de investigación y extensión (VIE) titulado: Obtención y caracterización de superficies biomiméticas nanoestructuradas sobre materiales de osteosíntesis para generación de nuevos productos de innovación de las empresas Quirúrgicos Especializados y Jaimes Rueda & Cía. Ltda.

1 Descripción del trabajo de investigación

1.1 Planteamiento del problema

El titanio y sus aleaciones han sido materiales ampliamente utilizados en implantes ortopédicos y dentales, debido a su biocompatibilidad y que poseen excelentes propiedades mecánicas. Presentan una baja densidad (4.7 g.cm^{-3}), comparada con la del acero inoxidable 316L (7.9 g.cm^{-3}) y las aleaciones CoCrMo (8.3 g.cm^{-3}), que también son usadas como materiales para implantes, su módulo de Young es el menor entre las aleaciones mencionadas anteriormente (110 GPa), logrando una elasticidad cercana con el tejido óseo humano. Posee elevada resistencia a la corrosión debido a su fina capa protectora de óxido que se forma en su superficie (Gil & Planell, 1993); y presenta baja toxicidad *in vivo* (Ahmed et al., 2012); haciendo que este material sea adecuado para la fabricación de implantes quirúrgicos. Sin embargo, sus características bioinertes conllevan, a que la tasa de formación de hueso en el cuerpo a partir del bioimplante sea muy baja (S. young Kim et al., 2014), siendo este un parámetro importante en la selección del material de fabricación.

En vista de lo anterior, la industria ortopédica ha centrado sus investigaciones en gran medida, al desarrollo de tecnologías avanzadas de modificación superficial para mejorar la fijación biológica de los implantes y consecuentemente, reducir el tiempo de curación del paciente, evitando la aparición de complicaciones que pongan en riesgo su salud (Frandsen, Brammer, Noh, Johnston, & Jin, 2014). Un estudio realizado por Meirelles y colaboradores demostró que las células responden a los cambios en las características superficiales de los materiales, tales como: hidrofiliidad/hidrofobicidad, rugosidad, nanotopografía y superficie química (Meirelles, Currie, Jacobsson, Albrektsson, & Wennerberg, 2008). Por ello, una de las posibles modificaciones superficiales que se han desarrollado es el uso de recubrimientos con materiales cerámicos, siendo

el de mayor aplicación la hidroxiapatita (*HAP*, por sus siglas en inglés) dado que promueve un entorno óptimo para el crecimiento del hueso.

La *HAP* es el componente principal en los tejidos duros de los seres vivos y desde hace algunas décadas ha sido de gran interés en los campos de la medicina ortopédica y dental. La síntesis de este tipo de material es sencilla, y debido a que su composición es similar a la fase mineral del hueso, se considera un material bioactivo, facilitando la regeneración del tejido óseo (Pulyala et al., 2017). No obstante, los recubrimientos obtenidos a partir de estos compuestos tienen baja tenacidad y baja resistencia a la flexión, lo cual representa una gran limitación para su aplicación, en especial en aquellos implantes destinados como soporte de carga del esqueleto (Drevet et al., 2016). Por ello, una posible solución es el reforzamiento de compuestos de *HAP* con otros materiales.

En este sentido, los nanotubos de carbono (*CNT*, por sus siglas en inglés) se presentan como un tipo de material carbonoso altamente versátil. Exhibe un enorme potencial para aplicaciones biomédicas, debido principalmente a su comportamiento inerte ante ambientes fisiológicos, presentando a su vez notable resistencia mecánica, flexibilidad y otras propiedades únicas estructurales, eléctricas y fisicoquímicas (Álvarez Merino, Carasco Marin, & Maldonado Hódar, 2014). Un aspecto para tener en cuenta es que los *CNT* no presentan una respuesta activa al estar en contacto con ambientes fisiológicos, y, por consiguiente, no permitirían la regeneración del tejido óseo. No obstante, los *CNT* pueden ser fácilmente funcionalizados mediante la inserción de grupos oxigenados superficiales que, a su vez, pueden servir como puntos de anclaje para compuestos de mayor dimensión, sus excelentes propiedades mecánicas podrían ser aprovechadas para mejorar el comportamiento de los materiales que presenten bioactividad y permitan la regeneración del tejido óseo.

En diferentes investigaciones se ha conseguido dispersar los *CNT* en una matriz de *HAP* mediante diferentes técnicas para las cuales se necesitan prolongados tiempos de trabajo, entornos a alta temperatura, equipos especializados y en algunos casos atmosferas controladas durante el proceso, lo cual incide directamente en un aumento en los costos de obtención. En lo que a esta investigación concierne, se espera que la implementación de una técnica sencilla y de bajo costo como lo es la electrodeposición pulsada siendo un proceso llevado a cabo a bajas temperaturas que permite un gran control en la composición, la morfología y el espesor de la capa (Mokabber, Lu, van Rijn, Vakis, & Pei, 2018; Szcześ, Hołysz, & Chibowski, 2017), permita la obtención de recubrimientos compuestos de *HAP* reforzada con *CNT*.

Por tal motivo, en este trabajo de investigación se propone la obtención de recubrimientos de *HAP* reforzada con *CNT* sobre la aleación de Ti-6Al-4V, haciendo énfasis en estudiar y mejorar los parámetros experimentales del procedimiento de obtención, caracterizando y evaluando sus propiedades fisicoquímicas y electroquímicas, además de su citotoxicidad y su efecto en la respuesta de adhesión y proliferación de células de osteosarcoma humano (*HOS*, por sus siglas en inglés) cuando se encuentran en contacto con medio biológico.

1.2 Hipótesis

La obtención de un recubrimiento de hidroxiapatita reforzada con nanotubos de carbono sobre material de osteosíntesis Ti-6Al-4V por medio de electrodeposición pulsada, permitirá obtener un compuesto con mejores propiedades de osteointegración e interacción celular, el cual eventualmente podría ser usado en implantes ortopédicos.

1.3 Impacto del trabajo de investigación

Con el trabajo de investigación realizado se logra una contribución al estado del arte y un avance en cuanto a la línea de biomateriales desarrollada en el grupo de investigación con la obtención de

recubrimientos compuesto de hidroxiapatita reforzada con nanotubos de carbono mediante la aplicación de electrodeposición por pulsos. Por otro lado, los resultados obtenidos en las pruebas biológicas promueven la continuación en el estudio de las propiedades superficiales requeridas en los recubrimientos que permitan una mejor interacción celular.

2 Estado del arte y fundamentos teóricos

Desde tiempos ancestrales el humano ha utilizado diferentes elementos metálicos en la medicina (Park & Lakes, 2007). Existen registros que en el antiguo Perú se realizaba trepanación con diferentes herramientas metálicas, adicionalmente la misma civilización probó el uso de diferentes materiales para cubrir defectos craneales, entre estos se encontraban: conchas marinas, cascara de coco, diferentes hierbas y placas de oro y plata (Bonfield, Kumar, & Gerszten, 2014; Harris et al., 2014). En el mundo científico moderno nos podemos remitir a los trabajos de Lane a finales del siglo XIX (Lane, 1895) quien evaluó de manera exitosa el uso de tornillos de acero para la unión de huesos fracturados. Progresivamente durante el siglo XX se evaluó el uso de diferentes metales y aleaciones entre las que se destacan el oro, aleaciones de cobalto-cromo, aceros inoxidable, titanio comercialmente puro y sus aleaciones (Saini, 2015). El desarrollo de esta rama científica ha llevado al estudio de lo que actualmente se denomina biomaterial (geetha 2009).

Los biomateriales son definidos como aquellos materiales que interactúan con el tejido humano y fluidos corporales para tratar, mejorar o reemplazar partes anatómicas del cuerpo humano (Rodríguez-González, 2009), cumpliendo con unas características especiales como: *i*) ser resistentes a la corrosión en el entorno del cuerpo; *ii*) poseer una excelente combinación de propiedades mecánicas, tales como bajo módulo de Young, resistencia a la fatiga y al desgaste

(estarán expuestos a cargas cíclicas); *iii*) no presentar citotoxicidad; y *iv*) ser biocompatibles, esto específicamente en implantes ortopédicos (Geetha, Singh, Asokamani, & Gogia, 2009).

Actualmente, uno de los materiales más empleados e investigados en la ortopedia, es el titanio y sus aleaciones, siendo la aleación Ti-6Al-4V la de mayor aplicación (Hee et al., 2018; Kalantari, Arabi, Mirdamadi, & Mirsalehi, 2015). Dicha aleación presenta propiedades mecánicas cercanas al hueso (Q. Chen & Thouas, 2015), siendo este un parámetro importante, puesto que disminuye el fenómeno conocido como *stress shielding*, causando que el hueso pierda densidad y se debilite (Hench, Jones, & Institute of Materials, 2005). Las aleaciones de titanio son superiores en términos de biocompatibilidad debido a su excelente resistencia a la corrosión; presentan bajos índices de rechazo en el cuerpo humano haciendo buenas conexiones físicas con el hueso (Q. Chen & Thouas, 2015).

Existe en la literatura numerosos estudios en los cuales se han conseguido recubrimientos de *HAP* ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), mediante diferentes técnicas de deposición, obteniendo excelentes mejoras en el comportamiento del material (Cotrut, Vladescu, Dinu, & Vranceanu, 2018; Stango, Karthick, Swaroop, Mudali, & Vijayalakshmi, 2018). Huang y colaboradores (S. Huang et al., 2008) desarrollaron un revestimiento de *HAP* porosa sobre titanio por electrodeposición, encontrando baja citotoxicidad en pruebas *in vitro* y poca reacción inflamatoria en pruebas *in vivo*.

Sin embargo, la naturaleza frágil de la *HAP* impide sus aplicaciones clínicas, especialmente bajo condiciones de carga y esfuerzos mecánicos. Una alternativa viable para obtener un recubrimiento que sea posible utilizarlo bajo dichas condiciones, es la modificación con diferentes tipos de materiales sin afectar su biocompatibilidad. En este sentido, los *CNT* presentan un gran atractivo para la comunidad científica (Abden, Afroze, Alam, & Bahadur, 2016; Chakraborty et al., 2017; Mohajernia, Pour-Ali, Hejazi, Saremi, & Kiani-Rashid, 2018; Neelgund & Oki, 2016).

Los *CNT* son materiales carbonosos descubiertos por Iijima en 1991 (Iijima, 1991). Son formas alotrópicas del carbono y están hechos de láminas de grafeno enrolladas sobre sí mismas, constituidos por anillos hexagonales en formas de tubos cilíndricos de escala nanométrica en diámetro y longitudes micrométricas (Ghiazza, Vietti, & Fenoglio, 2014).

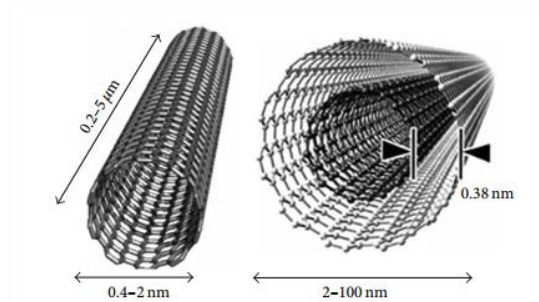


Figura 1. Tipos de nanotubos de carbono de acuerdo con la cantidad de láminas de grafeno que lo conforman. Nanotubos de pared simple (izquierda) nanotubos de pared múltiple (derecha)
Adaptado de (H. He et al., 2013)

Basados en el número de láminas de grafeno que lo conforman, existen dos clases de *CNT*: los nanotubos de pared simple (*SWCNT*, por sus siglas en inglés), con diámetros entre 0.4 y 2 nm; y los nanotubos de pared múltiple (*MWCNT*, por sus siglas en inglés), con diámetros entre 2 y 100 nm; los cuales presentan diferentes propiedades según su presentación (ver figura 1) (H. He et al., 2013).

Los *CNT* poseen excepcionales propiedades electrónicas, térmicas y mecánicas, que están relacionadas con sus características estructurales (Álvarez Merino et al., 2014). Además, debido a su carácter inerte, sus aplicaciones en implantes subcutáneos o ingeniería de tejidos muestran buena biocompatibilidad y no presentan alta toxicidad (Abrishamchian, Hooshmand, Mohammadi, & Najafi, 2013; Chakraborty et al., 2017).

Los *CNT* son apolares, por lo cual tienen carácter hidrófobo, reflejándose en su débil capacidad de dispersión y su tendencia a aglomerarse en solventes acuosos; por consiguiente, se requieren de tratamientos químicos de funcionalización. Existen dos tipos de procesos de funcionalización: covalente y no covalente (Guldi, Dirk M; Martin, 2010). La funcionalización covalente permite obtener grupos oxigenados (carboxílicos, lactonas, quinonas, entre otros) en la superficie del *CNT* mediante procesos de oxidación con ácidos fuertes y el aprovechamiento de la reactividad de la estructura grafénica de las paredes de los nanotubos, y la aún mayor reactividad de los defectos estructurales existentes (Datsyuk et al., 2008; Goyanes et al., 2007). En la funcionalización no covalente se utilizan moléculas que se absorben sobre la superficie de los *CNT*, formando un recubrimiento alrededor de los nanotubos preservando las propiedades de los nanotubos, a la vez que mejora su dispersión (Tasis, Tagmatarchis, Alberto Bianco, & Maurizio Prato, 2006).

Existen diferentes técnicas para la obtención de compuestos cerámicos de hidroxiapatita reforzados con *CNT*, entre las más usadas se tienen: pulverización por plasma (*sprayed plasma*) presentando recubrimientos de *HAP/CNT* con presencia de microgrietas (Balani et al., 2007), sinterización por descarga de plasma (*spark plasma sintering*) en donde las temperaturas de trabajo son elevadas, entre 800 °C hasta 1200 °C (J. L. Xu, Khor, Sui, & Chen, 2009), precipitación química *in situ*, el cual necesita prolongado tiempo de trabajo para dispersar *CNT* en la matriz de *HAP* (Khanal, Mahfuz, Rondinone, & Leventouri, 2016; Liu, Li, Su, Guo, & Zhang, 2017), injerto *in situ* (*in situ grafting*) (Oyefusi et al., 2014), sol gel (Abrishamchian et al., 2013), deposición electroforética (Zhong, Qin, & Ma, 2015), entre otras.

Generalmente, estas técnicas implican procesos a altas temperaturas, tiempos prolongados de trabajo y requieren de equipos e infraestructuras costosas y complicadas. Por esa razón, se requiere desarrollar y mejorar metodologías que permitan la obtención de recubrimientos de *HAP*

incorporando MWCNT sobre matrices de materiales de titanio de una forma económica y sostenible.

Los métodos de electrodeposición presentan enormes ventajas para la obtención de este tipo de materiales. Se depositan capas de *HAP* a partir de precursores de calcio y fósforo disueltos en un electrolito conductor, mediante la aplicación de procedimientos potencioestáticos o galvanostáticos sobre un electrodo conductor de titanio. Se realiza a bajas temperaturas permitiendo gran control en la composición (relación molar Ca/P), morfología y espesor, permitiendo obtener recubrimientos sobre superficies irregulares y de formas complicadas (Cotrut et al., 2018; Fornell et al., 2017; Harun et al., 2018; Mokabber et al., 2018). Este proceso depende de numerables variables, dentro de las que se encuentran el pH de la solución, la fuerza iónica del electrolito, la relación molar Ca/P y potencial o densidades de corrientes; el efecto de estos parámetros sobre la superficie de *HAP* que se desea obtener debe ser estudiado cuidadosamente.

Existen dos principales métodos para obtener recubrimientos mediante electrodeposición, el primero hace referencia a la aplicación de potencial continuo durante determinado tiempo. El segundo método se trabaja con intervalos de tiempo en la aplicación de potencial, seguido de un tiempo de relajación y se aplican varios ciclos durante determinado tiempo. Algunos estudios realizados han manifestado que la electrodeposición continua presenta recubrimientos poco adherentes al sustrato (Fornell et al., 2017; Gopi, Indira, & Kavitha, 2012), es por esto que la electrodeposición pulsada se ha establecido como una alternativa adecuada para la obtención de recubrimientos de *HAP* reforzada con CNT. En el proceso de electrodeposición pulsada, durante el tiempo de aplicación de potencial, los iones más cercanos al sustrato pueden ser depositados adecuadamente. Durante el tiempo de relajación, ocurre la difusión de iones desde la solución a la

superficie del sustrato, permitiendo que la concentración de la solución sea homogénea influyendo en la mejora de las propiedades fisicoquímicas de los recubrimientos.

Es importante caracterizar las propiedades fisicoquímicas del recubrimiento obtenido, con el propósito de conocer el comportamiento o cambios que puede presentar el material cuando se encuentre en contacto con medio biológico. Una manera de caracterizarlos es mediante la aplicación de pruebas electroquímicas. Estudios realizados por (Azem, Delice, Ungan, & Cakir, 2016; Benea, Danaila, & Ponthiaux, 2015; C. H. Huang, Chen, & Yoshimura, 2017) demostraron que las técnicas electroquímicas proporcionan información relevante acerca de la estabilidad del material, cinética, mecanismos de reacción, comportamiento ante la corrosión o disolución del recubrimiento.

Por otro lado, se han realizado pruebas biológicas, evaluando la adhesión y proliferación celular sobre los recubrimientos, además del porcentaje de toxicidad que representan las muestras en contacto con medio biológico (Chakraborty et al., 2018; Y. Huang et al., 2015, 2017). Se han realizado pruebas de citotoxicidad aplicando el ensayo de reducción de MTT, en el cual se mide la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables, en donde el MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-5-difeniltetrazólico) es captado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazan. El compuesto queda retenido en las células y es liberado mediante la solubilización de las mismas, de esta forma se cuantifica la cantidad de MTT reducido, relacionando la toxicidad de la muestra que se evalúa (Arencibia, Rosario, & Curveco, 2009).

Otros estudios se basan en la observación de las células adheridas a la muestra mediante microscopía de epifluorescencia, en donde las células son tratadas con un colorante fluorescente. Uno de los marcadores celulares usados es el reactivo Hoechst, éste es absorbido por el núcleo celular permitiendo la visualización directa de los mismos, al penetrarse al núcleo de la célula se une a la adenina y la timina del ADN y el ARN emitiendo un color azul. La producción fosfatasa alcalina (ALP, por sus siglas en inglés) es utilizada para evaluar la actividad celular de los osteoblastos, en donde se presenta la liberación de fosfato inorgánico para la formación de la hidroxiapatita del hueso, y tiene un papel importante en la mineralización de la matriz extracelular, indicando el inicio de la etapa de diferenciación o formación del hueso (Navarro, 2005).

Chakraborty (Chakraborty et al., 2018) estudió la adhesión y proliferación celular sobre un recubrimiento de fosfatos de calcio mediante microscopía de epifluorescencia y microscopía electrónica, revelando un número considerable de células adheridas en todas las muestras recubiertas después de 3 días de incubación. Huang (Y. Huang et al., 2016) analizó la resistencia a la corrosión y bioactividad de recubrimientos de hidroxiapatita/Sr/Mn evaluando la viabilidad celular aplicando el método colorimétrico MTT y ALP, después de 7 días de cultivo celular, el recubrimiento reveló una viabilidad celular superior que el control. Después de 14 días de cultivo celular, se obtuvo una mayor actividad de ALP comparada con el control de HAP.

3 Objetivos

3.1 Objetivo general

Evaluar la respuesta fisicoquímica y bioquímica de recubrimientos de hidroxiapatita reforzada con nanotubos de carbono obtenidos mediante electrodeposición catódica sobre una aleación de Ti-6Al-4V.

3.2 Objetivos específicos

- Evaluar la formación de grupos oxigenados por medio de tratamientos de oxidación sobre la superficie de nanotubos de carbono.
- Obtener recubrimientos de hidroxiapatita reforzada con nanotubos de carbono sobre la aleación de Ti-6Al-4V mediante electrodeposición catódica.
- Caracterizar fisicoquímica, electroquímica y morfológicamente los recubrimientos obtenidos.
- Evaluar la respuesta bioquímica mediante ensayos de citotoxicidad, adherencia y fosfatasa alcalina del material obtenido.

4 Metodología

A continuación, se describen las etapas y actividades que se llevaron a cabo durante la investigación:

4.1 Preparación superficial del sustrato

La aleación de Ti-6Al-4V fue utilizada como sustrato para el desarrollo de la investigación (suministrada por la empresa Quirúrgicos Especializados S.A). Las muestras se trataron adecuadamente para su preparación superficial: Inicialmente se realizó un desbaste, limpieza y decapado químico de acuerdo con los parámetros establecidos en las normas ASTM E3-11 y ASTM G1-01, con el fin de asegurar una mayor adherencia del recubrimiento.

4.2 Preparación de MWCNT funcionalizados

Se utilizaron MWCNT con diámetros entre 7-12 nm y longitudes aproximadas entre 0.5-10 μm (Sigma-Aldrich). Se probaron tres diferentes concentraciones de *MWCNT* (0.1, 0.5 y 1.0 g/L), en las soluciones precursoras para la obtención de los recubrimientos; lo anterior debido a que en las revisiones bibliográficas se obtienen mejores propiedades mecánicas con concentraciones menores a 2 % en peso (Gopi et al., 2013; Pei et al., 2014).

Purificación y funcionalización de CNT.

Debido al carácter apolar que presentan los MWCNT y las impurezas metálicas residuales del proceso de fabricación de estos materiales, se estudiaron los diferentes tratamientos de oxidación, evaluando la purificación, formación de grupos oxigenados y morfología de los MWCNT finalizado el proceso.

Tratamiento 1: Inicialmente los MWNCT fueron tratados en una solución 9M de ácido nítrico (HNO_3) durante 3 horas a 110°C , fueron filtrados y lavados con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro, seguido se neutralizaron en una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1M durante 1

hora a temperatura ambiente. Finalmente se agregaron a una solución de ácido clorhídrico (HCl) 5M a 110 °C por 6 horas, se filtraron, lavaron hasta pH 7 y se secaron durante 12 horas a 80 °C.

Tratamiento 2: Los MWCNT fueron agregados en ácido clorhídrico HCl (37%) a temperatura ambiente acompañado por agitación durante 2 horas, se filtraron y lavaron con agua desionizada hasta alcanzar un pH 7. Posteriormente fueron tratados con una mezcla de ácido nítrico y ácido sulfúrico (HNO_3 (68%) / H_2SO_4 (98%)) en proporciones de 1:3 en volumen a 80°C durante 2 horas, bajo agitación continua, se realizó el lavado y filtrado hasta llegar a un pH neutral, por último fueron secados a 80°C durante 12 horas.

4.3 Caracterización de los MWCNT funcionalizados

Los MWCNT funcionalizados fueron caracterizados mediante espectroscopia Raman y microscopía electrónica de barrido (*SEM*) con el fin de corroborar la existencia de los grupos oxigenados superficiales, la purificación y morfología al finalizar los tratamientos de oxidación.

4.4 Obtención de recubrimientos de HAP reforzada con MWCNT

Los depósitos electroquímicos se realizaron a partir de las soluciones precursoras de nitrato de calcio tetrahidratado $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y fosfato de amonio dihidrogenado $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ en concentraciones de 0.042M y 0.025M respectivamente. Se manejaron tres diferentes concentraciones de MWCNT (0.1, 0.5 y 1.0 g/L), manteniendo constante la relación molar de los precursores, en una celda electroquímica convencional de tres electrodos, utilizando como cátodo la probeta de Ti-6Al-4V, como contraelectrodo una malla de platino y como referencia un electrodo de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl).

Las condiciones experimentales para la electrodeposición, tales como potencial aplicado, número de pulsos, tiempo de tratamiento, entre otras, fueron estudiadas y mejoradas para obtener los recubrimientos de HAP+MWCNT sobre la superficie de Ti-6Al-4V.

Por último, los recubrimientos fueron expuestos a un tratamiento térmico a 550 °C durante 1 hora con el fin de mejorar la cristalinidad de la *HAP*.

4.5 Caracterización de los recubrimientos de *HAP/MWCNT*

La evaluación de los recubrimientos obtenidos se llevó a cabo mediante técnicas de caracterización química, fisicoquímica, morfológica y superficial, tales como microscopía electrónica de barrido (*SEM*) con el equipo Quanta FEG-650 field emission scanning electron microscope (FESEM), DRX (Difractómetro de rayos X Bruker D8 advance) y FTIR (Espectrómetro Nicolet iS50), corroborando la existencia y deposición de las matrices de HAP+MWCNT sobre el sustrato, microscopía confocal (Microscopio Hirox KH 7700) para obtener una medida aproximada del espesor y rugosidad superficial del recubrimiento y ángulo de contacto (DataPhysics OCA15EC) evaluando la humectabilidad de las muestras de Ti6Al4V con y sin recubrimiento. Los equipos se encuentran ubicados en las instalaciones del Parque Tecnológico Guatiguará de la Universidad Industrial de Santander

4.6 Ensayos Bioelectroquímicos

Se estudió la biodegradación de los recubrimientos obtenidos mediante pruebas bioelectroquímicas. Inicialmente las pruebas se llevaron a cabo en medio de cultivo celular RPMI-1640 para los recubrimientos con diferentes concentraciones de MWCNT, utilizando un potenciostato y una celda electroquímica de tres electrodos. Se usó como referencia un electrodo de Calomel, como contra electrodo un alambre de platino y como electrodo de trabajo las muestras de Ti6Al4V con y sin recubrimiento. Las técnicas aplicadas para este estudio fueron: potencial a circuito abierto medido durante 3600 s, espectroscopia de impedancia electroquímica (*EIS*, por sus siglas en inglés) medido en un rango de frecuencia de 100.000 Hertz a 0.01 Hertz, registrando 7

punto/dec con una amplitud de 10 mV y curvas de polarización potenciodinámicas medidas en el rango de potencial entre -30 mV y +1200 mV vs OCP, a una velocidad de barrido de $0,166\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$

Estos ensayos fueron aplicados a 5 muestras como lo indica la tabla 1.

Tabla 1: Descripción de muestras para pruebas bioelectroquímicas.

MUESTRA	DESCRIPCIÓN
1	Ti6Al4V sin recubrir
2	Ti6Al4V/ HAP
3	Ti6Al4V/ HAP + 0.1 g/L MWCNT
4	Ti6Al4V/ HAP + 0.5 g/L MWCNT
5	Ti6Al4V/ HAP + 1 g/L MWCNT

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos fisicoquímicos y electroquímicos se escogió la muestra con mayor concentración de MWCNT incorporados con la cual se realizaron las evaluaciones de respuesta celular.

4.7 Evaluación de la respuesta celular de los recubrimientos de HAP+MWCNT sobre Ti-6Al-4V

4.7.1 Cultivo celular de osteoblastos de la línea HOS.

Las probetas recubiertas previamente fueron esterilizadas cuidadosamente en autoclave durante 20 min a 121°C y 21 PSI, luego bajo luz UV durante 30 minutos antes de realizar los estudios biológicos. Se emplearon células de osteosarcoma humano procedentes de la línea celular HOS (ATCC, CRL-1543), el cultivo celular se realizó en placas de cultivo Falcon, con medio RPMI-1640, con 1% de L-glutamina, suplementado con 10% de SBF (Suero Fetal Bovino) y una solución de antibiótico al 1% de Penicilina $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ y estreptomicina $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$, sin fenol rojo $\text{pH}=7,2$, a $37^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ y 5% de CO_2 . Con el fin de garantizar el adecuado suministro de nutrientes en las placas de cultivo, el medio de cultivo fue cambiado cada dos días.

4.7.2 Ensayos de citotoxicidad.

Se realizó este ensayo con el fin de evaluar el grado de toxicidad que presenta el recubrimiento de HAP+MWCNT por medio de un ensayo *in vitro*. Las muestras recubiertas fueron sumergidas en placas de 24 pozos, en medio de cultivo RPMI-1640, suplementado con 10% de suero fetal bobino y encubadas durante 30 días a $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 95% de humedad y 5% de CO_2 . Para evaluar la toxicidad las células HOS fueron incubadas a una concentración de 1.5×10^4 células/pozo con una dilución de cada uno de los sobrenadantes durante 72 h.

El potencial citotóxico de las muestras fue evaluado con base en la norma ISO 10993-5:2009, usando el ensayo de reducción de MTT aplicando la fórmula $[\% \text{ Viabilidad} = \frac{100 * OD_{580e}}{OD_{580b}}]$, siendo OD_{580e} el promedio de la absorbancia de las muestras y OD_{580b} el promedio de la absorbancia del blanco. Posteriormente fueron solubilizados por medio del Dimetil sulfoxido DMSO realizando la medida de densidad óptica a 580 nm. Se consideró como 100% la absorbancia obtenida de cultivos no tratados (control).

4.7.3 Ensayos de adhesión celular por microscopía de epifluorescencia.

Se evaluó la adhesión celular sobre los recubrimientos en estudio. Probetas ubicadas en el interior de placas de cultivo de 24 pozos fueron incubadas con células HOS a una concentración celular de 1.5×10^4 células/pozo durante 24, 72 y 120 horas. Luego se realizó el retiro de las probetas del pozo, para ser lavadas con PBS y se adicionó el reactivo Hoechst $1 \mu\text{g/mL}$ en oscuridad por 10 minutos para marcar el núcleo. Las células fueron fijadas con paraformaldehído y la lectura se llevó a cabo en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E400, utilizando el filtro UV2a.

4.7.4 Medición de fosfatasa alcalina.

Se realizó la medición de fosfatasa alcalina (ALP) para estudiar la actividad de los osteoblastos. Células HOS en una concentración de 1.5×10^4 células/pozo fueron sembradas en plaza de 24

pozos. La preparación fue incubada durante 14 días a $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ en una atmosfera de 5 % de CO_2 . Al final del periodo de incubación las células adheridas en la superficie de las probetas fueron lisadas con una solución de Triton X-100 al 5% y centrifugadas. La concentración de ALP presente en el lisado celular fue determinado por espectrofotometría siguiendo la técnica descrita en el kit de fosfatasa alcalina de BioSystems. La lectura se realizó en el espectrofotómetro (Multiscan go, Thermo scientific) a 405 nm, la medición de ALP en las muestras fue calculada a partir de la siguiente formula indicada por el fabricante.

$$\Delta A / \text{min} \times \frac{Vt \times 10^6}{\epsilon \times l \times Vs} = U/L$$

Donde $\Delta A / \text{min}$ es el incremento de absorbancia por minuto promedio, el coeficiente de absorción molar (ϵ) del 4-nitrofenol a 405 nm es 18.450, el paso de luz (l) es 1 cm, el volumen total de reacción (Vt) es 1,02 y el volumen de muestra (Vs) es 0,02.

4.8 Análisis de resultados, publicaciones e informe final

Se analizaron e interpretaron los resultados obtenidos en cada una de las etapas anteriores y fueron comparados con los aspectos teóricos y bibliográficos consultados, de tal manera que a partir de ellos se derivaron conclusiones, observaciones y recomendaciones pertinentes. Para finalizar se realizó un informe recopilando la información y los resultados adquiridos durante el desarrollo de la investigación con su respectiva presentación y divulgación de resultados.

5 Resultados y análisis de resultados

5.1 Caracterización y funcionalización de nanotubos de carbono de pared múltiple

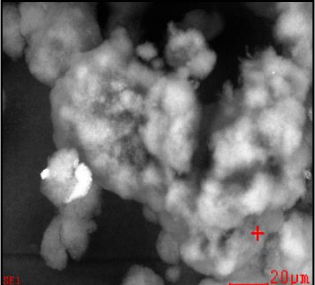
De acuerdo con la ficha técnica entregada por el proveedor Sigma-Aldrich, los nanotubos de carbono de pared múltiple utilizados en la investigación presentan diámetros entre 6-13 nm y longitudes aproximadas entre 0.5-20 μm , con una pureza del 98%.

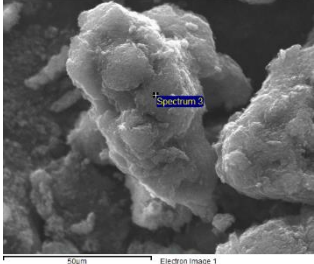
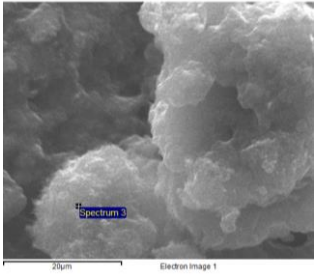
En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos del análisis realizado por EDS a las muestras en estudio, donde se evidencia la presencia de impurezas metálicas remanentes. Estas impurezas pueden estar relacionadas con el proceso de fabricación de los MWCNT, entre estas se encuentra el Magnesio, Aluminio y Cobalto para la muestra de MWCNT prístinos (A). El porcentaje total de impurezas no supera el 4%. Los resultados obtenidos para las muestras (B) y (C) confirman la reducción del porcentaje de Co presente y la eliminación de Magnesio y Aluminio, producto de los tratamientos químicos realizados.

Para la muestra (C) se puede observar la presencia de un nuevo elemento, el azufre, el cual es atribuido al ácido sulfúrico con el cual se llevó a cabo el tratamiento oxidación.

Tabla 2: Análisis de Espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) de Nanotubos de pared Múltiple a) Prístinos, b) Tratamiento 1 y c) Tratamiento 2.

A	Elemento	Peso (%)	Atómico%
MWCNT/	CK	68.30	81.28
Prístinos	OK	13.58	12.14
	MgK	06.01	03.53
	AlK	00.39	00.21
	CoK	11.72	02.84



B MWCNT / Tratamiento 1	Elemento	Peso (%)	Atómico%	
	C K	96.14	97.12	
	O K	3.77	2.86	
	Co K	0.09	0.02	
C MWCNT / Tratamiento 2	Elemento	Peso (%)	Atómico%	
	C K	92.08	94.07	
	O K	7.64	5.86	
	S K	0.08	0.03	
	Co K	0.20	0.04	

Para evaluar la formación de grupos oxigenados sobre la superficie de los MWCNT se analizaron las muestras mediante Espectroscopia Raman (Figura 2), estableciendo un análisis cualitativo del grado de funcionalización y modificación superficial que presentaron las muestras.

La banda a 1580 cm^{-1} (banda G) es asignada a la vibración del enlace C-C y corresponde al plano basal (dominios sp^2) del grafito monocristalino o grafeno (Bokobza & Zhang, 2012; Metoki et al., 2016; Zanin et al., 2015). La banda a 1326 cm^{-1} (banda D) es típica de materiales defectuosos similares al grafito y es asociada con la presencia de desorden en los sistemas de carbono y la banda a 1611 cm^{-1} (banda D') siendo un hombro débil que presenta la banda G a frecuencias más altas también es una característica de doble resonancia inducida por desorden y defectos presentes en el nanotubo (Datsyuk et al., 2008). La relación de intensidad de la banda G con la banda D (IG/ID) sugiere la modificación de la superficie de las muestras tratadas (Neelgund & Oki, 2016). Calculando las intensidades de los espectros obtenidos, e integrando las áreas de las bandas D y G se obtiene la relación IG/ID variando desde 0,37 para la muestra sin tratamiento a 0,42 y 0,52 para las muestras tratadas.

Por otro lado, el desplazamiento en las frecuencias de las bandas G y D en los MWCNT tratados es atribuido a la generación de defectos en la estructura gráfica de los nanotubos y la reducción de las interacciones entre las paredes de los tubos debido al proceso de oxidación (Bokobza & Zhang, 2012; Jain et al., 2009; Neelgund & Oki, 2016).

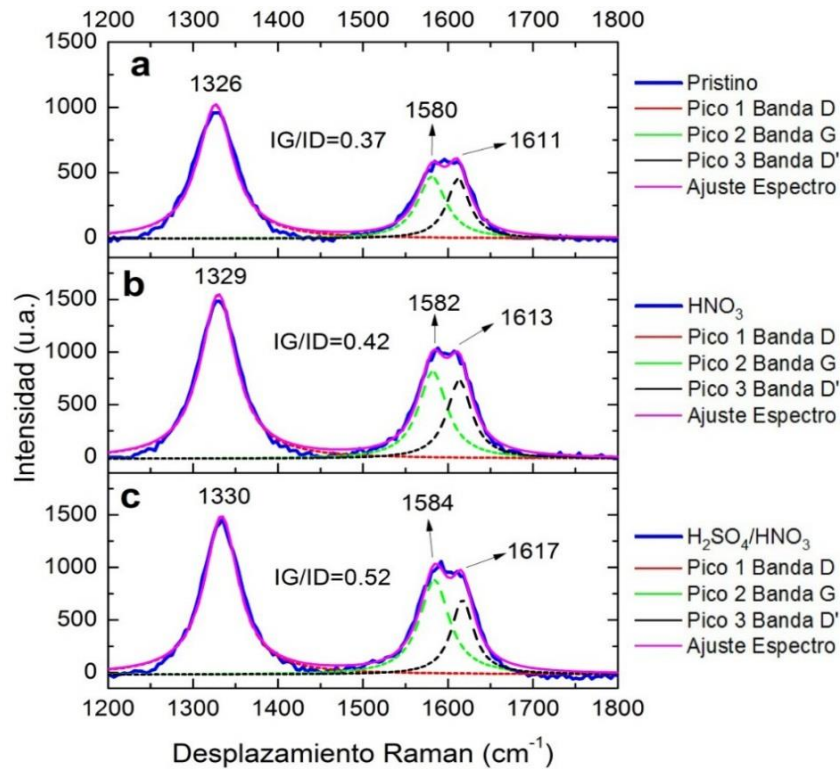


Figura 2. Espectro Raman de MWCNT, a) prístinos, b) tratamiento 1 y c) tratamiento 2.

El valor inferior de la relación IG/ID que presentan los MWCNT prístinos expresa que esta muestra consistía en grafito bien cristalizado. El aumento en la relación IG/ID calculada para los nanotubos tratados indica que el desorden de la estructura intrínseca de estos aumentó (Neelgund & Oki, 2016). Esta variación es un indicador de una exitosa alteración superficial en la pared de los nanotubos donde se modificó la integridad gráfica y la posterior formación de pequeños fragmentos gráficos, lo cual se relaciona con la introducción de grupos funcionales en las paredes de los nanotubos de carbono (Neelgund & Oki, 2016).

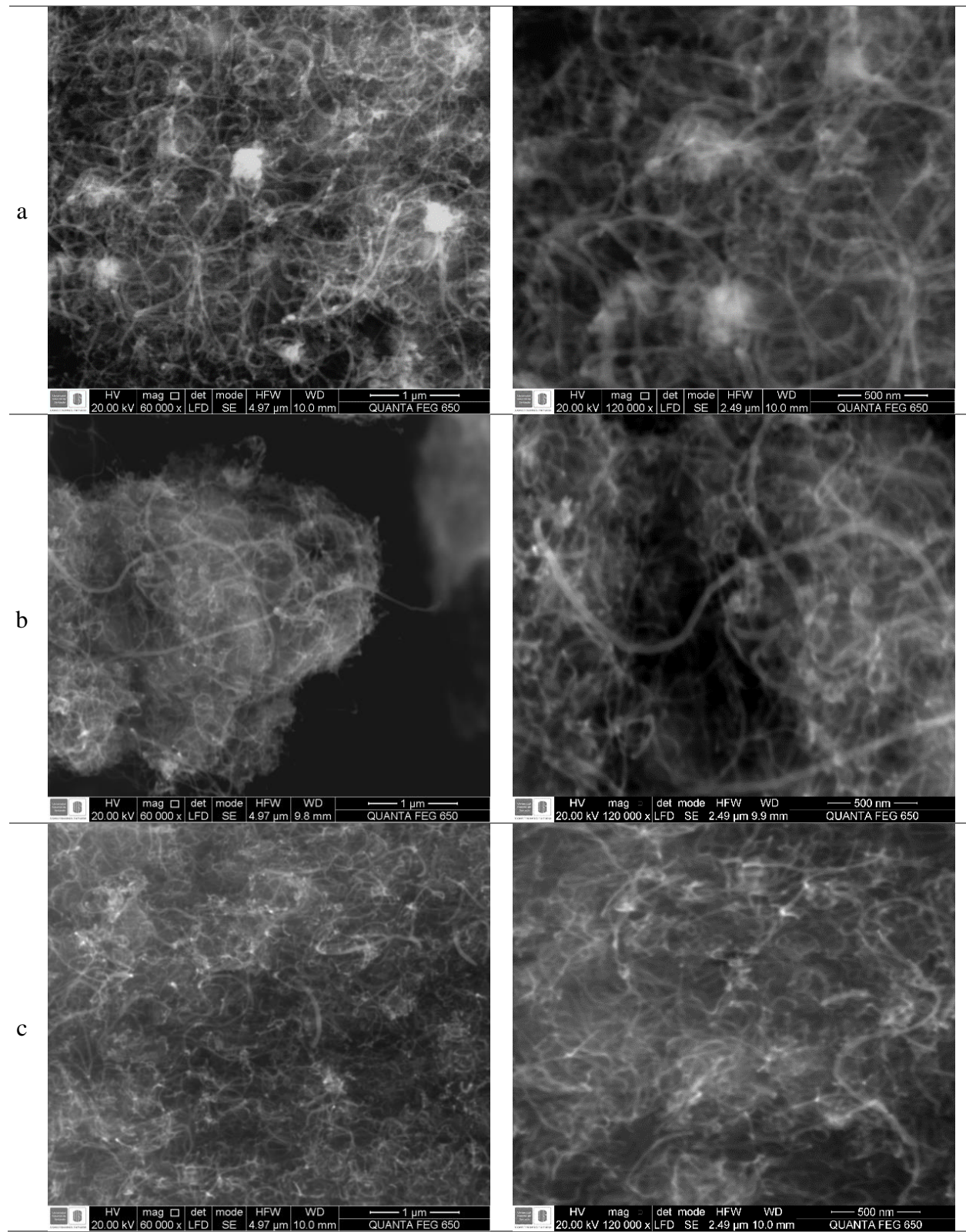


Figura 3. Microscopía electrónica de barrido de MWCNT a) prístinos, b) tratamiento 1 y c) tratamiento 2

La figura 3 muestra la morfología de los MWCNT antes y después de los tratamientos de oxidación. En la figura 3(a) se observa la presencia de inclusiones como partículas brillantes, las cuales son atribuidas a las impurezas derivadas del proceso de fabricación, dichas impurezas no son observadas en las figuras 3(b) y 3(c) confirmando la efectividad del tratamiento de purificación.

Los MWCNT sufren cambios morfológicos después de los tratamientos de oxidación, como se puede observar en las micrografías, sus dimensiones en diámetro y longitud se ven reducidas. El tratamiento que mayor cambio genera sobre la superficie de los nanotubos de carbono es el segundo, este resultado es acorde con los resultados obtenidos por Lee, quien relaciona esta respuesta con la concentración del ácido (G. W. Lee et al., 2008).

Las micrografías indican una reducción en el diámetro de los nanotubos tratados con ácido en comparación con los prístinos. Se observa que, el diámetro de los nanotubos prístinos varía aproximadamente entre 17 y 30 nm, después del tratamiento 1 estos diámetros varían entre 15 y 20 nm mientras que los oxidados con el tratamiento 2 presentan una reducción significativa del diámetro el cual se encuentra entre 12 y 15 nm.

Este resultado sugiere que la condición ácida que presenta cada tratamiento es un factor crítico para el daño superficial que enfrentan los nanotubos de carbono durante el proceso de oxidación. Con los resultados obtenidos de los dos tratamientos realizados, teniendo en cuenta la relación con el grado de funcionalización y asimismo la afectación morfológica que presentan los nanotubos, se escoge el tratamiento 1, el cual presenta la menor variación en la estructura de los nanotubos.

5.2 Obtención y caracterización de recubrimientos de HAP reforzada con MWCNT

5.2.1 Estudio de la influencia de la variación de los parámetros de síntesis en las características de los recubrimientos de HAP.

Con el propósito de estudiar los potenciales de reducción de las especies involucradas en la formación de los recubrimientos se realizaron voltamperometrías cíclicas de barrido. Estos ensayos se llevaron a cabo con una ventana de potencial desde -2 V hasta 0,1 V vs Ag/AgCl, con una velocidad de barrido de 20 mV/s a 65°C, con agitación en el electrolito de 700 rpm a pH 4.5 y 6.

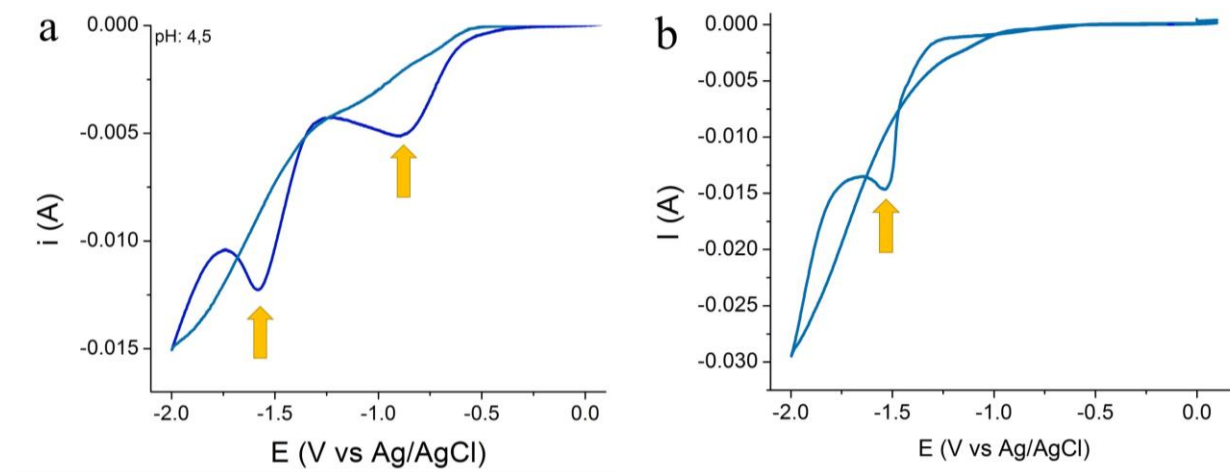
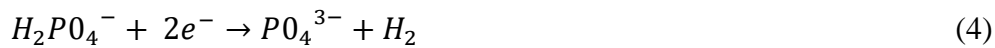


Figura 4. Voltamperometría cíclica de Ti6Al4V en una solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (a) pH 4,5 (b) pH 6.

En la figura 4 se muestran los voltamperogramas obtenidos con diferente pH. En la imagen 4(a) correspondiente a pH 4.5, se observan dos máximos en la zona de reducción, el primer máximo se presenta a -0.877 V vs Ag/AgCl con una corriente de -5 mA/cm^2 , y el segundo máximo a -1.58 V vs Ag/AgCl con una corriente de -12 mA/cm^2 , la presencia de estos dos picos son atribuidos a la reducción de diferentes especies.

En la curva mostrada en la Figura 4(b) se observa un máximo de reducción a -1.6 V vs Ag/AgCl, por lo tanto, se presenta una variación en el mecanismo de formación de los productos.

En este sentido es importante conocer las posibles reacciones que se presentan durante el proceso de electrodeposición, en donde se debe tener en cuenta que la concentración de iones OH^- juega un papel importante en la formación de fosfatos de calcio, y por lo tanto ocurren diferentes reacciones durante el proceso de deposición de estos (Mokabber et al., 2018). A continuación, se presenta el mecanismo propuesto por Mokabber y colaboradores involucrando reacciones químicas y electroquímicas:

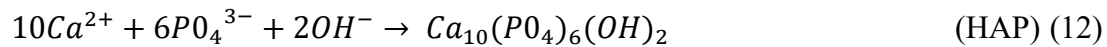
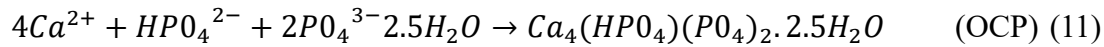
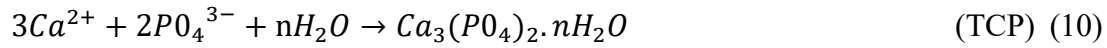
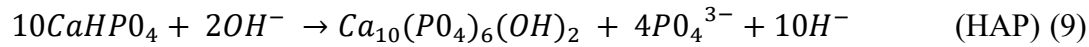
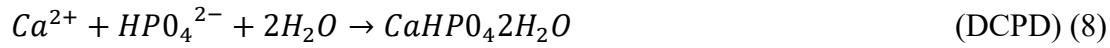


Los iones OH^- que se producen durante la reacción 1, conducen a un aumento en el pH local cerca al electrodo de trabajo, es por esto que, durante la electrodeposición la concentración de iones HPO_4^{2-} y PO_4^{3-} aumenta con el aumento del ion OH^- de acuerdo con las siguientes reacciones:



Mientras tanto, los iones de Ca^{2+} se acercan al electrodo de trabajo (cátodo) y reaccionan con los diferentes grupos fosfatos y con los iones OH^- . De acuerdo con las especies de fosfato predominante durante el proceso, diversos tipos de compuestos de fosfatos de calcio se depositan en el electrodo acorde con las siguientes reacciones, entre los cuales se tiene la brushita (DCPD),

fosfato tricálcico (TCP), fosfato octacálcico (OCP) y la hidroxiapatita (HAP) (D. H. He et al., 2016; Mokabber et al., 2018):



De acuerdo con Mokabber y colaboradores la síntesis de fosfatos de calcio puede ocurrir mediante diferentes reacciones consecutivas de tipo químico y electroquímico. La posibilidad de que cada una de estas reacciones ocurra depende de la concentración de los reactivos, el pH de la solución y las posibles variaciones del pH local en la superficie del electrodo debido a la evolución de hidrógeno. Por ejemplo, la formación de HAP puede ocurrir directamente en la solución sin la aplicación de ningún potencial mediante la secuencia de las reacciones 6-7-12, estos productos difícilmente serán adherentes y constituirán un recubrimiento. En las voltamperometrías cíclicas se distinguen diferentes potenciales de reducción a -0.877 V vs Ag/AgCl y -1.58 V vs Ag/AgCl, el proceso de reducción que ocurre a un potencial de -0.877 V se ve disminuido cuando el pH aumenta de 4.5 a 6, por lo cual, esta reacción puede ser desplazada por una reacción química que incluye el OH⁻ como reactivo. La reacción que ocurre a -1,58V que conduce a la formación de HAP puede estar relacionada con la producción de PO₄³⁻ mediante las reacciones 4 y 5.

Se estudió la influencia de los parámetros de síntesis, para la obtención de recubrimientos que presenten una morfología y superficie homogénea de hidroxiapatita, además de la inclusión de

MWCNT en la matriz del recubrimiento, variando parámetros tales como: potencial y corriente de electrodeposición, ciclos de aplicación de pulsos (tiempos de encendido de pulso y tiempo de relajación) y pH de la solución.

Inicialmente se realizaron recubrimientos aplicando electrodeposición galvanostática por pulsos, debido a que este proceso es de fácil aplicación a escala industrial. La densidad de corriente aplicada en los ensayos fue de $-10 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ y $-20 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$, estos valores se eligieron a partir de los resultados reportados por Kuo y colaboradores, en donde reportan que a densidades de corriente mayores a $-10 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ se obtiene un recubrimiento de HAP sin presencia de otros fosfatos de calcio (Kuo & Yen, 2002). El tiempo de aplicación de pulso se fijó a 1s y se varió el tiempo de relajación de pulso, la condición I hace referencia a $-10 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ - $t_{\text{on}}/t_{\text{off}} = 1\text{s}/4\text{s}$, la condición II $-10 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ - $t_{\text{on}}/t_{\text{off}} = 1\text{s}/8\text{s}$, condición III $-20 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ - $t_{\text{on}}/t_{\text{off}} = 1\text{s}/4\text{s}$ y condición IV $-20 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ - $t_{\text{on}}/t_{\text{off}} = 1\text{s}/8\text{s}$. La relación de pulso fue escogida teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Gopi (Gopi et al., 2013) en donde reportan la obtención de un recubrimiento con morfología en forma de flor de loto de tamaño uniforme bajo prolongados tiempos de relajación.

En la figura 5 se muestra la respuesta cronopotenciométrica al realizar electrodeposición galvanostática. Se observa que para las cuatro condiciones estudiadas el potencial correspondiente a t_{on} varía entre -1.5V y -3V . La curva obtenida a una densidad de corriente de $-10 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ (figura 5a) expone una variación del potencial en función del tiempo, lo que implica directamente una variación en los equilibrios termodinámicos en la superficie del electrodo, de modo que, al cambiar dicha condición, los productos presentes pueden variar. En todos los casos el potencial registrado está por encima de los potenciales obtenidos en las voltamperometrías (fig. 4) presentándose una alta evolución de hidrógeno.

El potencial t_{off} varía desde un potencial similar al potencial de equilibrio del electrodo de titanio en la solución, a un potencial correspondiente al electrodo recubierto en la solución, esto quiere decir que el electrodo se recubre progresivamente. La variación que se observa en los potenciales de deposición (t_{on}) en función del tiempo muestra un incremento del potencial con un máximo aproximadamente a 1200s para la Fig. 5(a), a 270s para Fig. 5(c) y 600s para la fig. 5(d), seguido de una reducción del potencial, estos se relacionan con la condición termodinámica de la superficie, ya que inicialmente las reacciones ocurren sobre el electrodo desnudo y progresivamente se recubre hasta tener una cobertura total del electrodo.

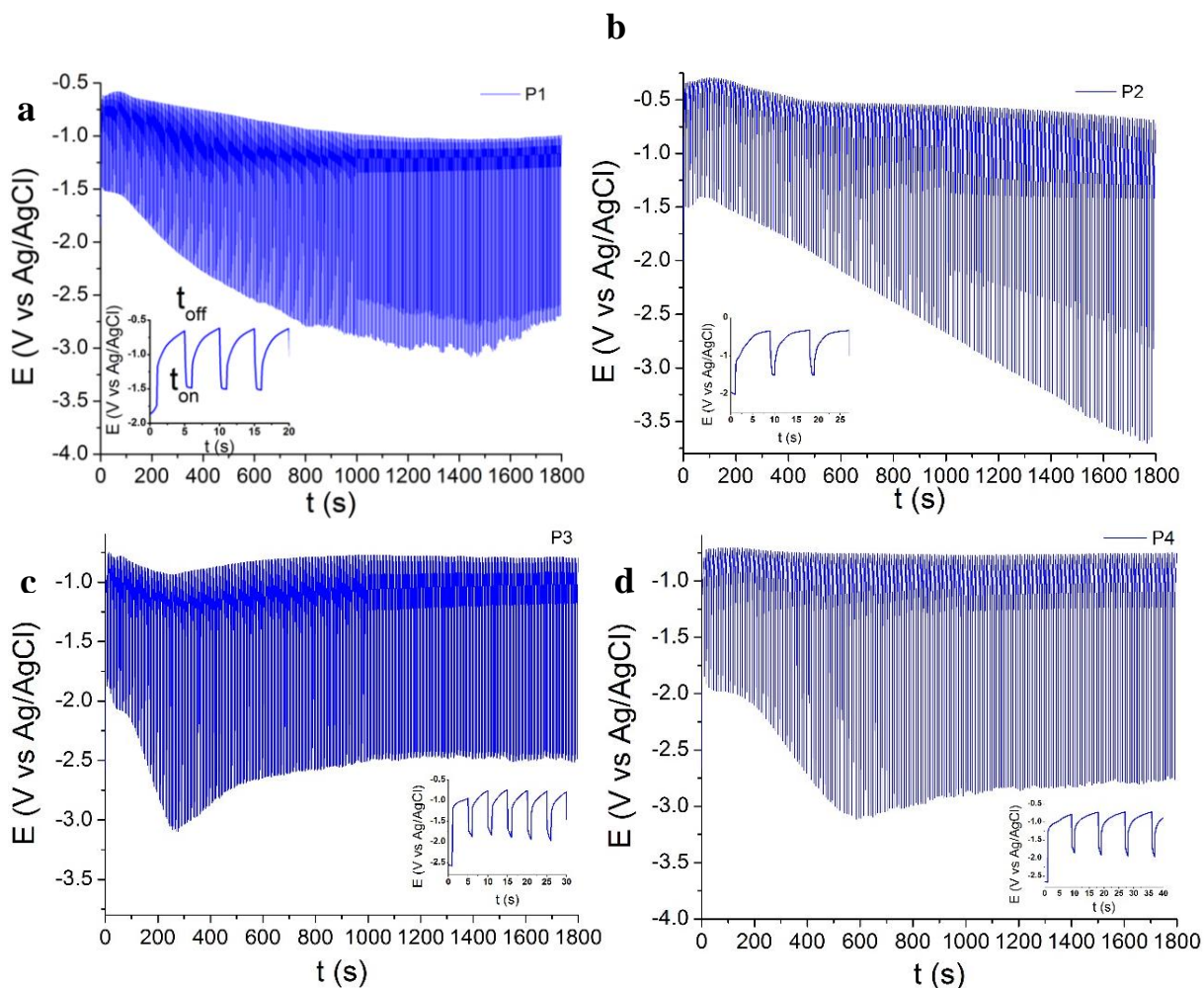


Figura 5. Curva Cronopotenciométrica de los recubrimientos a pH:4,5 (a) condición I, (b) condición II, (c) condición III y (d) condición IV.

Estas variaciones en el potencial durante el proceso de electrodeposición involucran la ocurrencia de distintas reacciones de reducción generando la obtención de un recubrimiento de composición variada. Por otro lado, la reacción de evolución de hidrógeno se presenta en diferentes proporciones con respecto a la variación de potencial registrado.

En la figura 6(a) se observa la morfología obtenida a $-10 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ $t_{\text{on}}/t_{\text{off}}=1\text{s}/4\text{s}$, presentando una mezcla de cristales de tipo aguja y estructuras similares a placas. Esta diferencia de estructura podría atribuirse a una pequeña cantidad de brushita ($\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) y pirofosfato de calcio ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) contenido en el recubrimiento depositado relacionado con la variación de potencial. Este resultado es similar en los demás casos fig. 5(b-d).

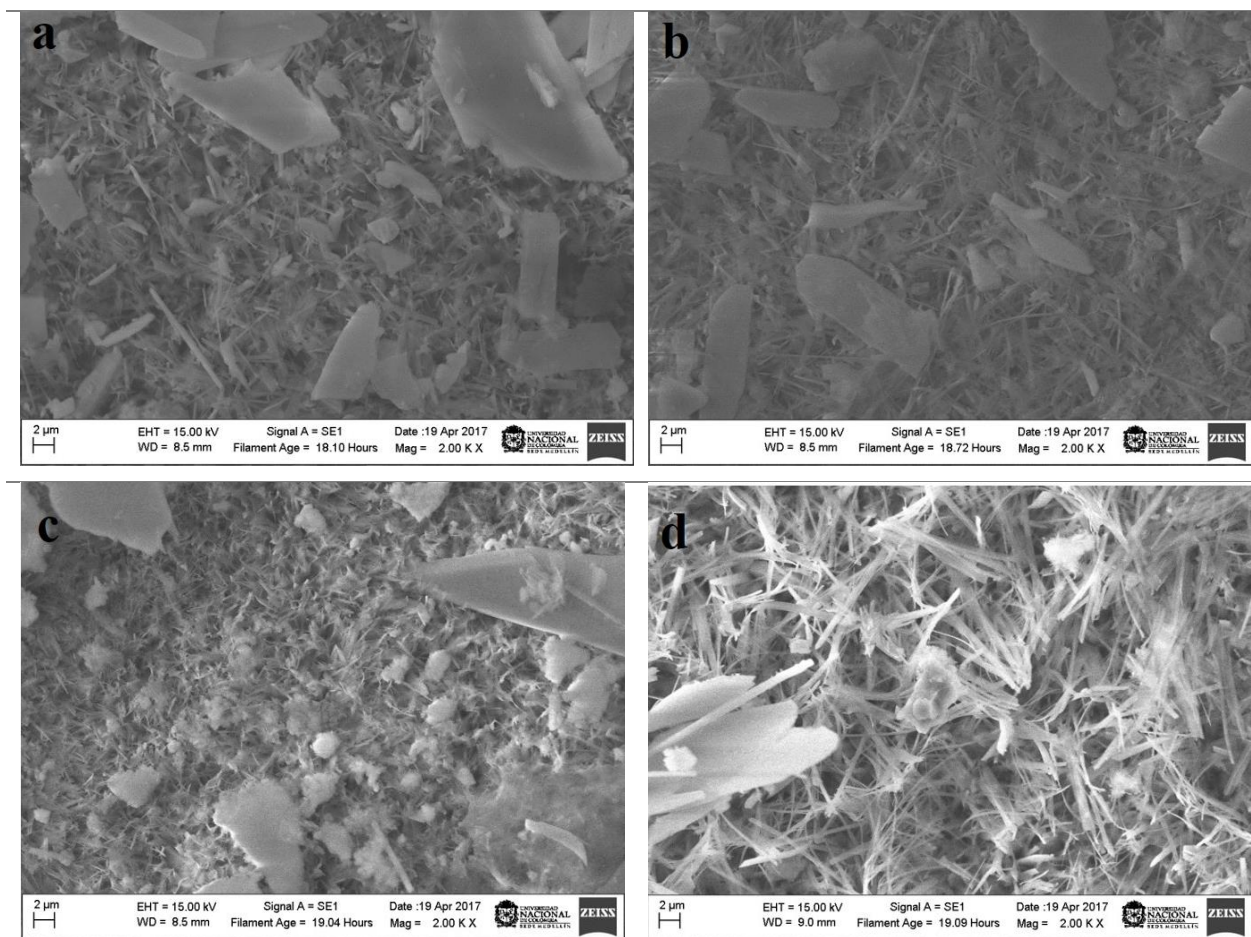


Figura 6. Imágenes SEM de los recubrimientos de Fosfatos de calcio por electrodeposición galvanostática (a) condición I, (b) condición II, (c) condición III y (d) condición IV.

La única diferencia notable que se observa entre las condiciones estudiadas es el tamaño de los cristales comparando la fig. 5(c) y fig. 5(d). Esto puede estar relacionado con un cambio en los mecanismos de transporte que podrían afectar los mecanismos de nucleación y crecimiento de los cristales depositados (Seyedraoufi, Mirdamadi, & Rastegari, 2014).

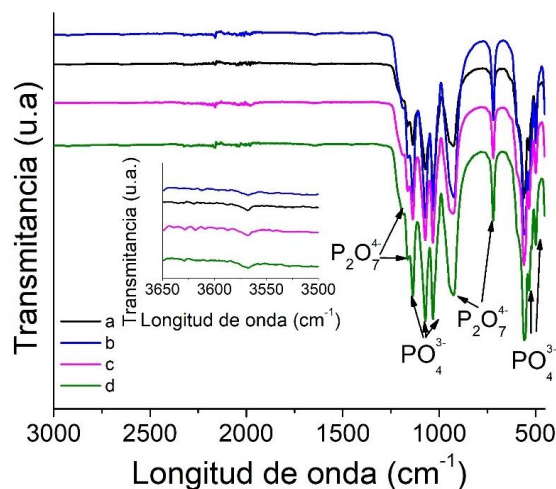


Figura 7. Espectros FTIR de los recubrimientos obtenidos mediante electrodeposición galvanostática pulsada. (a) condición I, (b) condición II, (c) condición III y (d) condición IV.

En la Figura 7 se presentan los espectros FTIR de los recubrimientos obtenidos. Se observan las bandas características de los fosfatos de calcio entre ellos hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) y pirofosfato de calcio ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) los cuales han sido reportados en la literatura (Raynaud, Champion, Bernache-Assollant, & Thomas, 2002; J. Xu, Butler, & Gilson, 1999; Yu, Zhu, Qi, & Wu, 2017). Las bandas características de los grupos fosfatos (PO_4^{3-}) aparecen en 497-557, 1032-1135 cm^{-1} y para el grupo $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ aparecen en 719, 923 y 1168 cm^{-1} . El pico que aparece a 497 cm^{-1} se atribuye al modo de flexión del enlace PO_4^{3-} O—P—O (ν_2), el modo de flexión para el grupo fosfato O—P—O (ν_4) se refleja a 533, 557 cm^{-1} y el modo de estiramiento P - O (ν_3) de los PO_4^{3-} 1032, 1075 y 1135 cm^{-1} . Por otra parte, la aparición de las bandas asignadas a los grupos de

pirofosfato $P_2O_7^{4-}$ se atribuyen a la conversión de $CaHPO_4$ en $Ca_2P_2O_7$ durante el tratamiento térmico realizado a las muestras, según lo informado por Raynaud y Destainville 2003 (Destainville, 2003; Raynaud et al., 2002) el cual se describe con la siguiente reacción iniciando aproximadamente a $450^\circ C$:

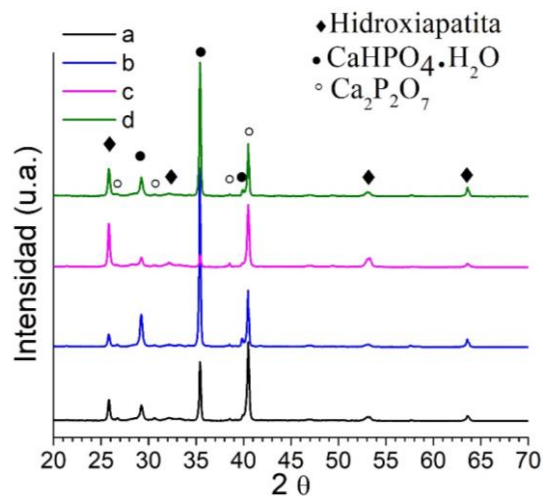
$$2CaHPO_4 \rightarrow Ca_2P_2O_7 + H_2O \quad (13)$$


Figura 8. Difractograma de rayos X de los recubrimientos obtenidos mediante electrodeposición galvanostática pulsada (a) condición I, (b) condición II, (c) condición III y (d) condición IV.

En la figura 8 se representan los diagramas de difracción de rayos X, estos indican que durante el proceso de electrodeposición se obtuvo una mezcla de fosfatos de calcio en el recubrimiento, los resultados fueron comparados con la base de datos PDF-2 del International Centre for Diffraction Data (ICDD) mostrando una relación con fosfatos de calcio como la hidroxiapatita, brushita y pirofosfato de calcio los cuales se asociaron a las tarjetas PDF n° 010-86-0740 [$Ca_5(P_4O_{13})(OH)$], 000-09-0077 [$CaPO_3(OH) \cdot 2H_2O$], 000-09-0346 [$Ca_2P_2O_7$] respectivamente. Los picos de difracción se observan a valores de 2θ para HAP a 25.8° , 32.2° , 53.1° y 63.6° , para pirofosfato de calcio a 26.7° , 30.7° , 38.5° , 40.6° y brushita a 29.2° , 35.4° y 39.9° . Resultados similares se observaron en investigaciones de Gopi y Saremi (Gopi et al., 2012; Saremi & Golshan, 2006).

Con los resultados obtenidos se puede confirmar que los mecanismos de formación del recubrimiento están relacionados con las reacciones 3-8 y 3-7-12. Como conclusión parcial se tiene que trabajando bajo esta técnica, los recubrimientos presentan una mezcla de fosfatos de calcio en su composición exhibiendo una morfología con cristales de tipo placa y aguja relacionada con la variación del potencial que se presenta durante el proceso.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en la electrodeposición galvanostática se procedió a estudiar la síntesis de los recubrimientos bajo electrodeposición potencioestática pulsada, ya que al controlar los potenciales de reducción se espera obtener recubrimientos más homogéneos. Se fijó un valor de potencial a $-1,6\text{V}$ en función de los resultados obtenidos en la voltamperometría cíclica. Se fijaron 3 condiciones de pulsos las cuales serán nombradas condición I: $t_{\text{on}}/t_{\text{off}}=30\text{s}/15\text{s}$, condición II: $t_{\text{on}}/t_{\text{off}} = 60\text{s}/30\text{s}$ y condición III: $t_{\text{on}}/t_{\text{off}} = 120\text{s}/60\text{s}$, teniendo en cuenta los resultados obtenidos por (Drevet, Velard, Potiron, Laurent-Maquin, & Benhayoune, 2011), considerando que la presencia de agitación forzada permite la recuperación en la concentración de iones en solución cerca al electrodo a cortos tiempos de relajación.

La figura 9 presenta las curvas cronoamperométricas obtenidas al realizar la electrodeposición a pH 4.5, en las condiciones I, II y III.

En la figura 9(a) se puede observar una disminución en la respuesta de la densidad de corriente en función del tiempo, registrando una variación en un rango de $-9 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ a $-2 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$. Este comportamiento se relaciona con un aumento progresivo del espesor del recubrimiento en función de los ciclos de potencial aplicado. Considerando que la resistencia de los fosfatos de calcio (material cerámico) es mayor que la del sustrato metálico, al aumentar el espesor del recubrimiento disminuye la densidad de corriente por la caída IR que genera el mismo.

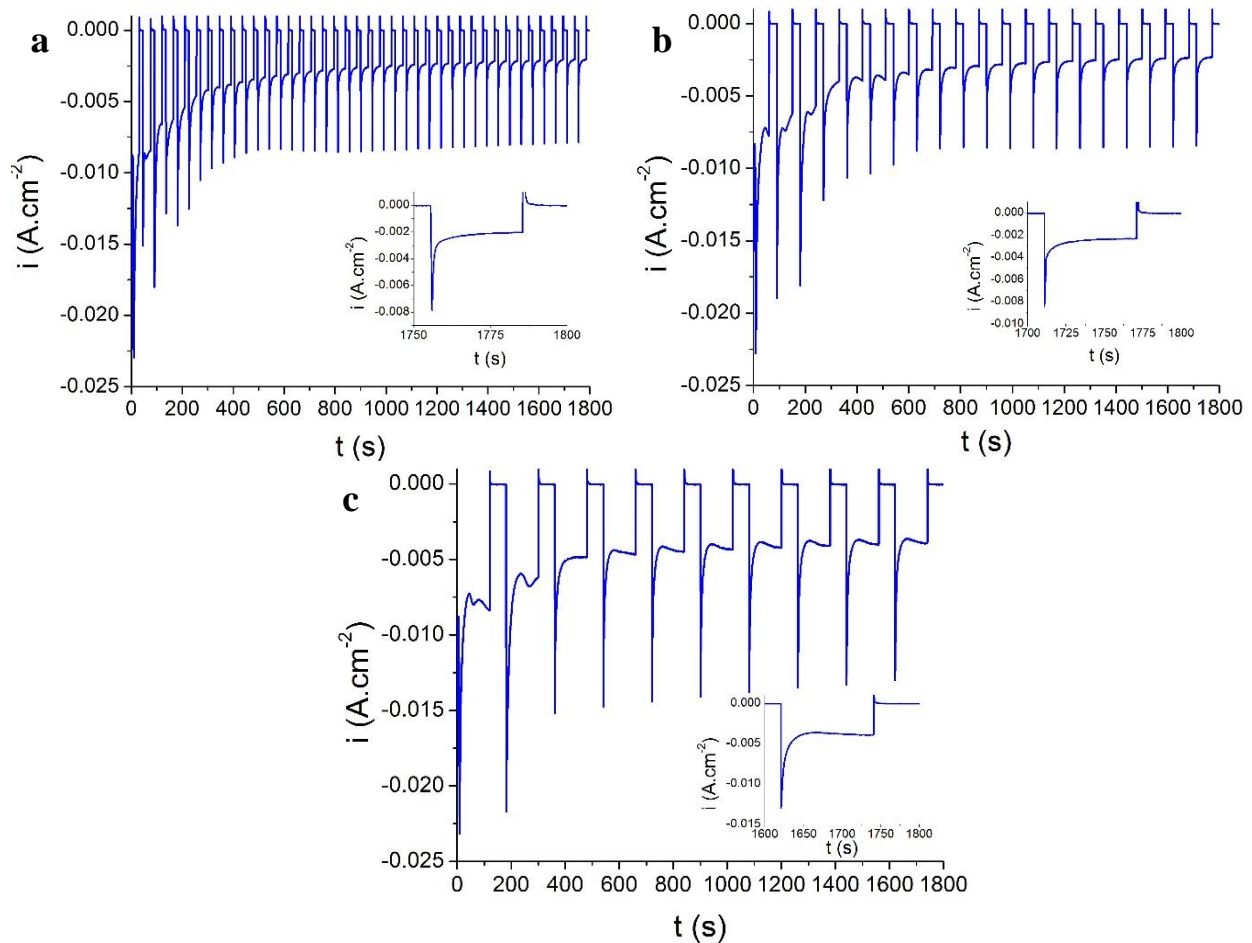


Figura 9. Curva Cronoamperométrica de los recubrimientos a pH 4,5 con diferente relación de pulsos. (a) condición I (b) condición II (c) condición III.

La principal diferencia entre las tres condiciones de trabajo es la densidad de corriente de estabilización, con una variación entre $-9\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ a $-2,5\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ y $-9\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ a $-4\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ para las condiciones II y III respectivamente. Esta variación se presenta con el aumento en los tiempos de relajación (t_{off}) que permite la homogenización de las especies en solución cerca al electrodo de trabajo, tal como se observa en las ecuaciones 3 y 4.

La morfología de los recubrimientos obtenidos por medio de electrodeposición potenciostática por pulsos a pH 4,5 fue caracterizada mediante SEM como se muestran en la Figura 10.

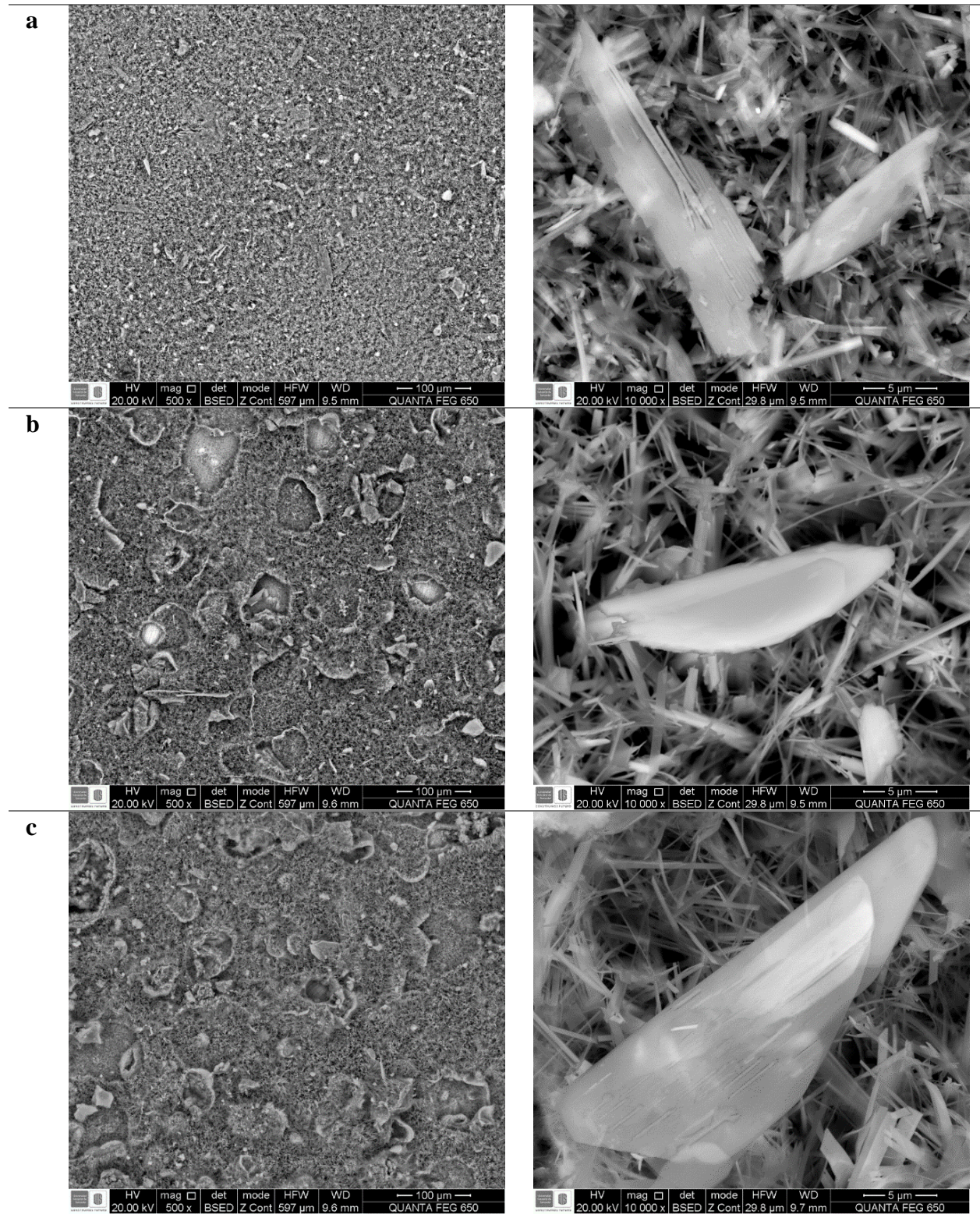


Figura 10. Imágenes SEM de los recubrimientos a pH 4,5 con diferente relación de pulsos. (a)

condición I (b) condición II (c) condición III.

Se observa una cobertura homogénea, presentando una morfología variada, con cristales en forma de agujas y placas, asociado con una ruta preferencial a pH ácido para la formación de fosfatos de calcio que sigue las reacciones 3 – 5 – 12 y 3 – 8 – 9.

Al comparar las tres condiciones se observa que al aumentar el tiempo de deposición (t_{on}) el recubrimiento presenta mayor cantidad de porosidades, distribuidas como se observa en las figura 10(b y c). Estas porosidades se forman durante el tiempo de deposición, donde se presenta la reacción 1 y 2 generando burbujas de hidrógeno de manera simultánea con el crecimiento de la capa depositada. En cuanto al tamaño del material depositado se tiene que las placas y las agujas aumentan en función del tiempo de deposición. En la condición I se tiene una distribución de tamaños entre 569 nm a 861 nm, para la condición II desde 849 nm a 1,3 μm y para la condición III desde 838 nm a 1,7 μm . Esto ocurre porque a mayor t_{on} los núcleos formados tienen mayor tiempo para crecer.

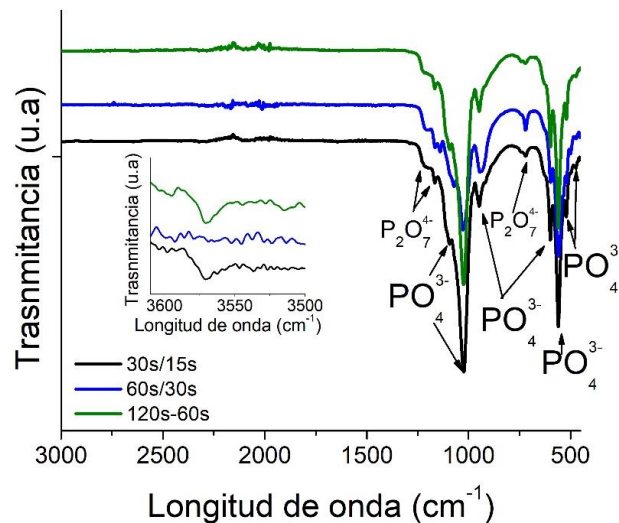


Figura 11. Espectros FTIR de los recubrimientos a pH 4,5 con diferente relación de pulsos.

En la Figura 11 se presentan los espectros FTIR de los recubrimientos obtenidos a pH 4,5. Las bandas características de los grupos fosfatos (PO_4^{3-}) aparecen en rangos desde 471-600, 950-1091

cm^{-1} y para el grupo $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ aparecen en 719, 1165 y 1220 cm^{-1} . La banda relacionada a una longitud de onda de 471 cm^{-1} es característica de las variaciones de flexión del grupo PO_4^{3-} ($\nu_2 \text{ O} - \text{P} - \text{O}$), los modos de deformación del grupo PO_4^{3-} ($\nu_4 \text{ O} - \text{P} - \text{O}$) aparecen a 520, 560, 599 cm^{-1} , la banda a 950 cm^{-1} corresponde a un modo de estiramiento simétrico del grupo fosfato ($\nu_1 \text{ P} - \text{O}$) y el modo de estiramiento asimétrico ($\nu_3 \text{ P} - \text{O}$) de los PO_4^{3-} aparecen a 1024 y 1093 cm^{-1} , se advierte la presencia de una pequeña banda relacionada con la vibración del enlace O-H ubicada a 3570 cm^{-1} . Las bandas de absorción de los enlaces químicos encontrados sugieren la presencia de pirofosfato de calcio e hidroxiapatita.

En la figura 12 se presenta el difractograma de las muestras depositadas a pH 4.5.

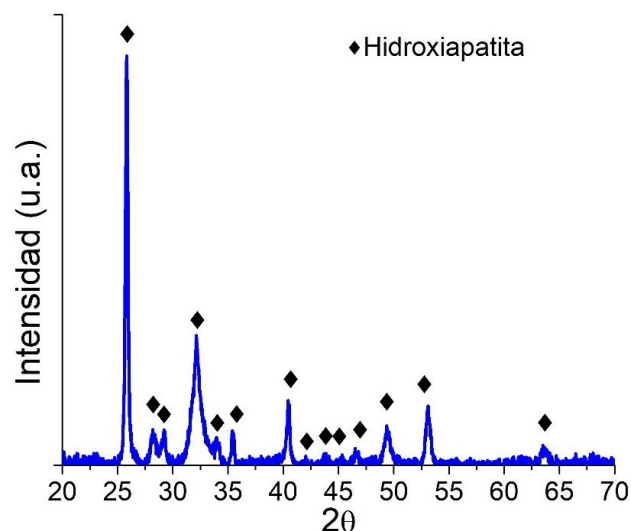


Figura 12. Difractograma de rayos X del recubrimiento a pH 4,5 condición I.

Los resultados fueron comparados con la base de datos PDF-2 (2014) del International Centre for Diffraction Data (ICDD), los perfiles de difracción que mayor coincidencia mostraron con la base de datos arrojan la existencia de una fase cristalina de fosfatos de calcio siendo identificada la fase de hidroxiapatita asociada a las tarjetas con n° 010-86-0740[$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$], y 010-74-

9770 [$\text{Ca}_{4.92}(\text{H}_{0.03}(\text{PO}_4)_3)(\text{OH})_{0.87}$]. Los picos de difracción asociados a estas tarjetas se identifican a valores de 2θ a 25.8° , 28.1° , 29.2° , 32.1° , 34.0° , 35.4° , 40.4° , 42.0° , 43.8° , 45.1° , 46.5° , 49.37° , 53.0° y 63.4° .

A pesar de que en los espectros infrarrojos se observan bandas de absorción de ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$), se esperaba que en los perfiles de difracción se encontraran picos asociados a pirofosfato de calcio, por lo que se relaciona que este fosfato hace parte del recubrimiento en fase amorfa.

En la figura 13 se presentan las imágenes tomadas con microscopía confocal a los recubrimientos realizados a pH 4.5. Se llevó a cabo un rayado al recubrimiento hasta llegar a la superficie del sustrato obteniendo una medida aproximada del espesor de recubrimiento.

El recubrimiento obtenido bajo la condición de trabajo I, muestra una rugosidad media de $R_z=4,1\mu\text{m}$ (ver calculo en Apéndice D) y un espesor promedio de $19\mu\text{m}$ (fig 13(a)) sin presencia de poros o grietas. Las muestras depositadas a condición de trabajo II exponen un promedio de $20\mu\text{m}$ con un $R_z=7,5\mu\text{m}$, reflejando una superficie heterogénea, para la condición de trabajo III se obtuvo un espesor de $40\mu\text{m}$ con un $R_z=7,8\mu\text{m}$. En la figura 13(c) se observa la presencia de porosidades con una profundidad cercana a la superficie del sustrato, lo que indica que el aumento en los tiempos de electrodeposición afecta la superficie del sustrato incrementando la cantidad de poros presentes en el recubrimiento corroborando los resultados obtenidos en SEM.

Teniendo en cuenta que la morfología de los recubrimientos presenta dos tipos de cristales (aguja y placas), los cuales son relacionados con diferentes fosfatos de calcio, que pueden estar influenciados por los parámetros de electrodeposición usados, en este caso el pH de la solución, se puede inferir que la concentración de iones OH^- no fue la suficiente para lograr convertir todos

los iones HPO_4^{2-} en PO_4^{3-} como se describe en la reacción 5, el cual está directamente relacionado con las posibles especies de equilibrio presentes en el electrolito, se deduce que bajo las condiciones de trabajo a pH 4,5 se tiene una mezcla de fosfatos de calcio depositados en el sustrato.

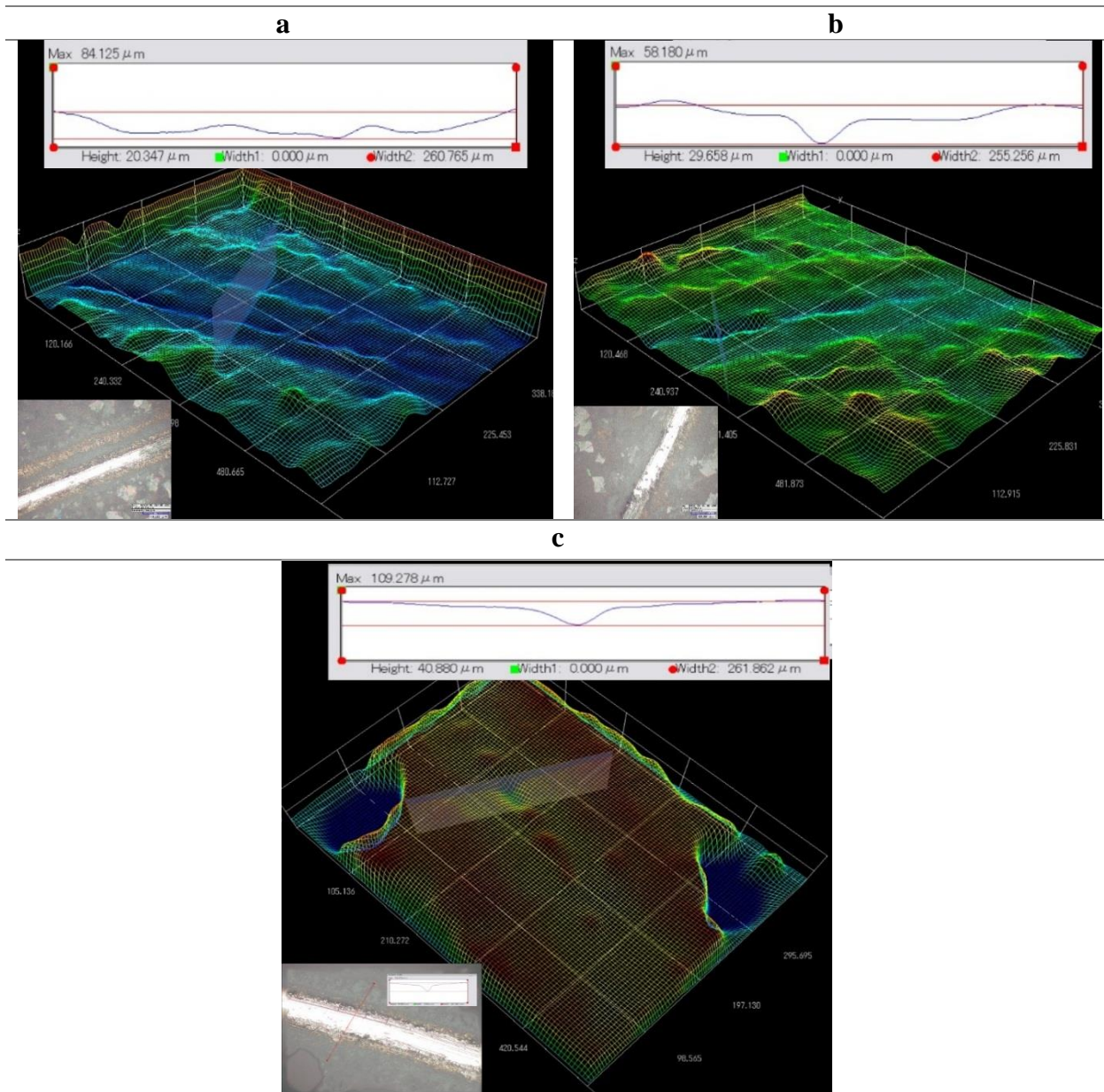


Figura 13. Imágenes de microscopía confocal (3D) de los recubrimientos a pH 4,5 con diferente relación de pulsos. (a) condición I (b) condición II (c) condición III

Para estudiar el efecto del pH sobre la electrodeposición potenciostática pulsada se llevaron a cabo pruebas trabajando a pH 6 manteniendo las condiciones de pulso como condición I: $t_{on}/t_{off} = 30s/15s$, condición II: $t_{on}/t_{off} = 60s/30s$ y condición III: $t_{on}/t_{off} = 120s/60s$.

En la figura 14 se encuentran las curvas cronoamperométricas obtenidas al realizar la electrodeposición a pH 6. En la figura 14(a) se evidencia una disminución en la densidad de corriente en función del tiempo de electrodeposición similar al comportamiento presentado en las muestras depositadas a pH 4,5. La condición I exhibe una variación desde $-8,5 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ hasta una corriente de estabilización de $-2,5 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$, relacionado con un aumento del espesor del recubrimiento durante cada ciclo de deposición.

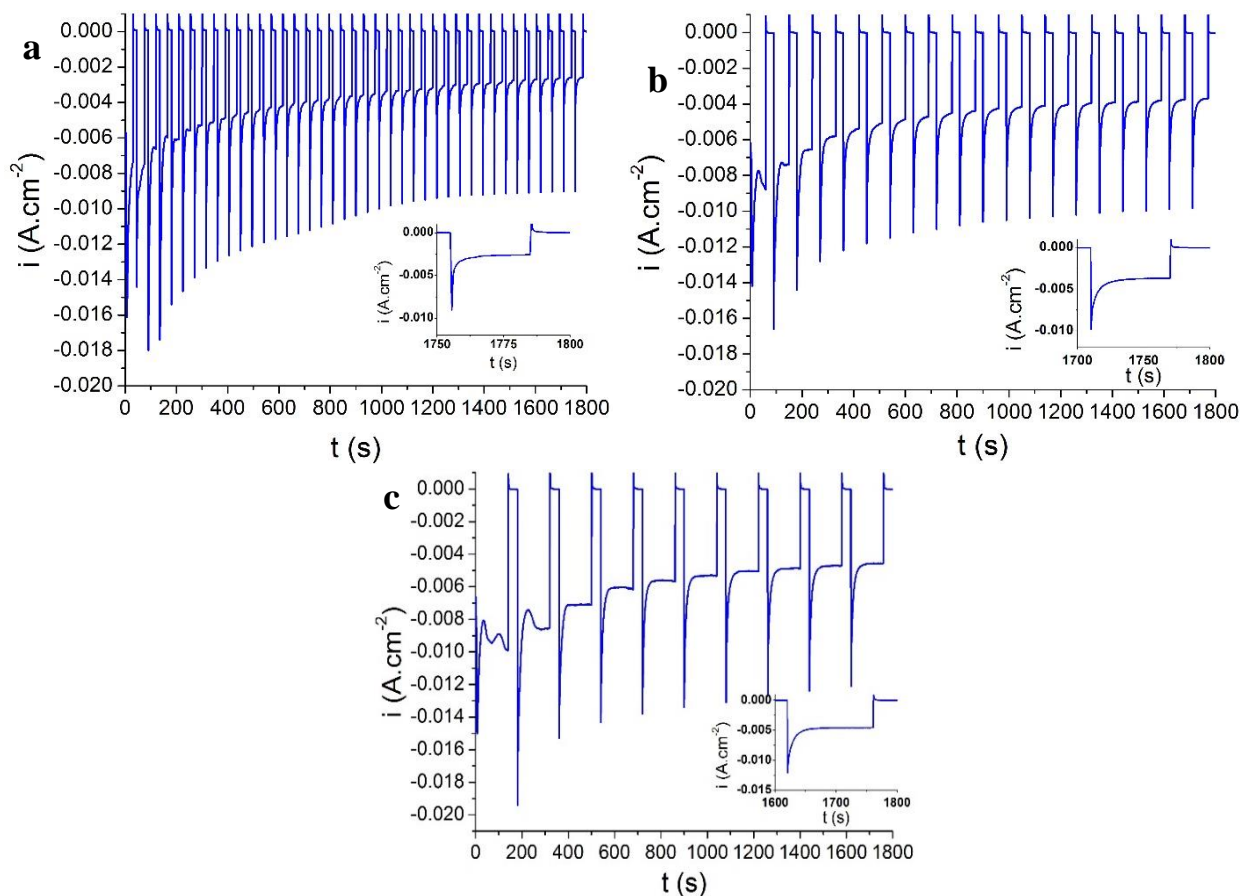
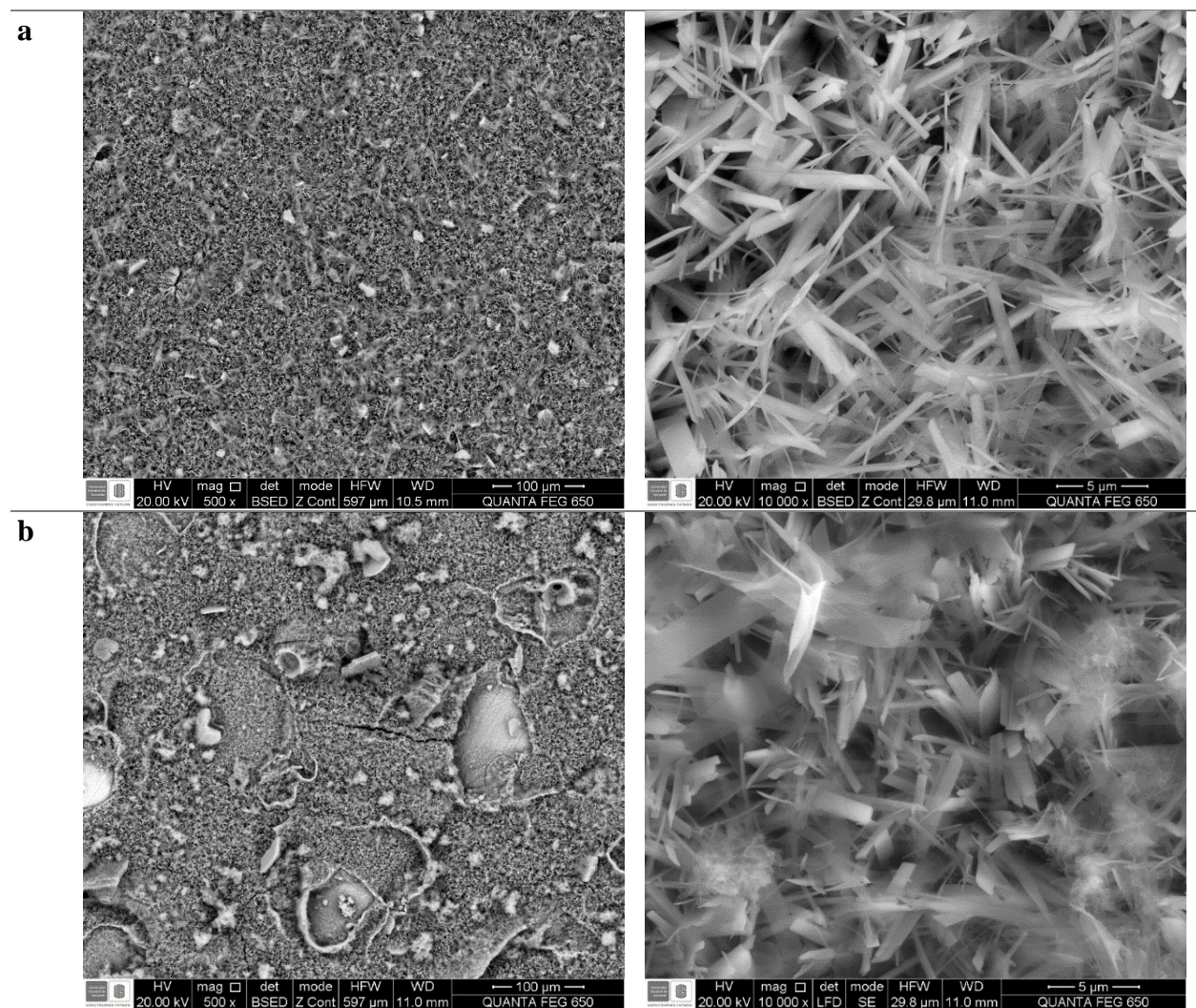


Figura 14. Curva Cronoamperométrica de los recubrimientos a pH 6 con diferente relación de pulsos. (a) condición I (b) condición II (c) condición III

Las condiciones II y III presentaron una variación entre $-9\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ a $-3\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ y $-9,5\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ a $-4\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ respectivamente. Como se explicó anteriormente, este comportamiento se relaciona con la resistencia del recubrimiento, generando una disminución en la densidad de corriente basándose en la ley de Ohm ($R=V/i$) (Bard et al., 1944). Por otro lado, el aumento en la densidad de estabilización final es relacionado con el aumento en los tiempos de relajación (t_{off}).

En la figura 15 se presentan las imágenes SEM de los recubrimientos obtenidos a pH 6. De forma general se observa una cobertura homogénea de las muestras, exhibiendo un comportamiento similar a las muestras con pH 4.5, en donde los recubrimientos presentan mayor cantidad de poros con el aumento del tiempo de electrodeposición.



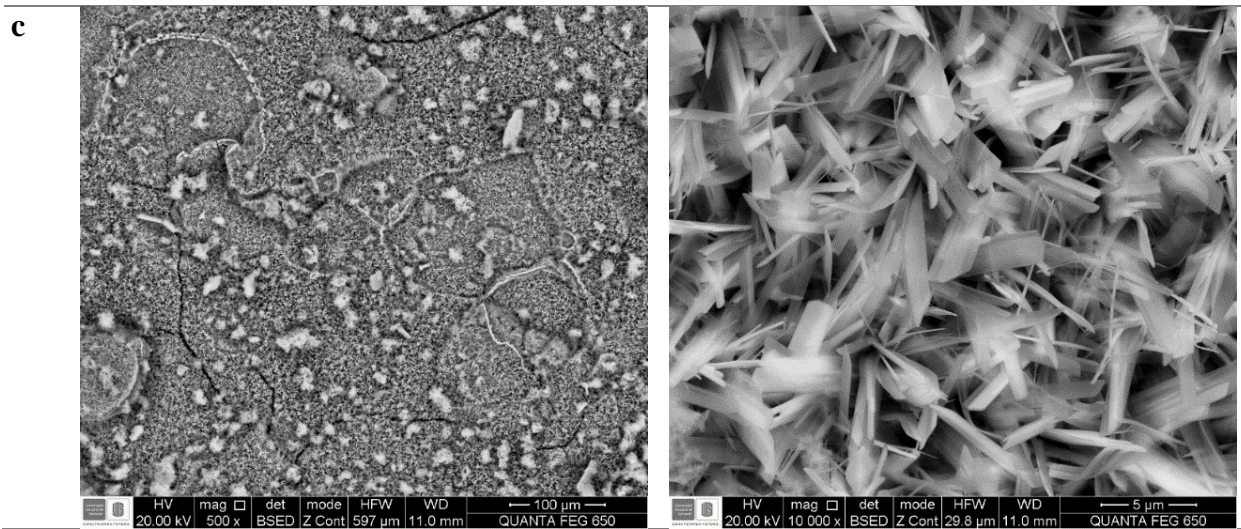


Figura 15. Imágenes SEM de los recubrimientos a pH 6 con diferente relación de pulsos. (a) condición I (b) condición II (c) condición III

La morfología de los cristales obtenidos conserva forma de aguja, con un ancho entre 500 nm a 717 nm para la condición I, 641 nm a 723 nm para la condición II y 750 nm a 2 µm para la condición III presentando la misma tendencia del aumento en el tamaño de los cristales con el tiempo de deposición (t_{on}). Con el aumento del pH a un valor de 6 se advierte que la presencia de placas que se observaba a pH 4.5 desaparece, lo cual indica que variando el pH de la solución se puede tener un mayor control en los fosfatos de calcio depositados. Esto puede estar relacionado con un cambio en la ruta preferencia que sigue las reacciones 4 – 12, disminuyendo las reacciones que ocurren en 3-5-8.

En la Figura 16 se presentan los espectros FTIR de los recubrimientos obtenidos a pH 6. Las bandas del grupo $P_2O_7^{4-}$ aún se presentan con el aumento del pH en 720, 1163 y 1223 cm^{-1} , sin embargo, el porcentaje de transmitancia disminuye en comparación con los resultados obtenidos a pH 4.5. Se considerando que el enlace asociado con el pirofosfato de calcio puede verse afectado

con la variación del pH, el cual modifica simultáneamente la ruta preferencial de reducción de especies.

Las bandas relacionadas a una longitud de onda de $[474\text{cm}^{-1}]$, $[520, 560, 600\text{ cm}^{-1}]$, $[950\text{ cm}^{-1}]$ y $[1023\text{ y }1095\text{ cm}^{-1}]$ son las características de las variaciones en las vibración de los grupos PO_4^{3-} siendo semejantes a las encontradas en la figura 11. Se observa una vibración del enlace O-H ubicada a 3570 cm^{-1} el cual es característico de la hidroxiapatita. Es necesario recalcar que las bandas de absorción de OH^- son afectadas térmicamente por la temperatura a la que fue expuesta la muestra durante el tratamiento térmico como lo expuso Meejoo (Meejoo, Maneepkorn, & Winotai, 2006).

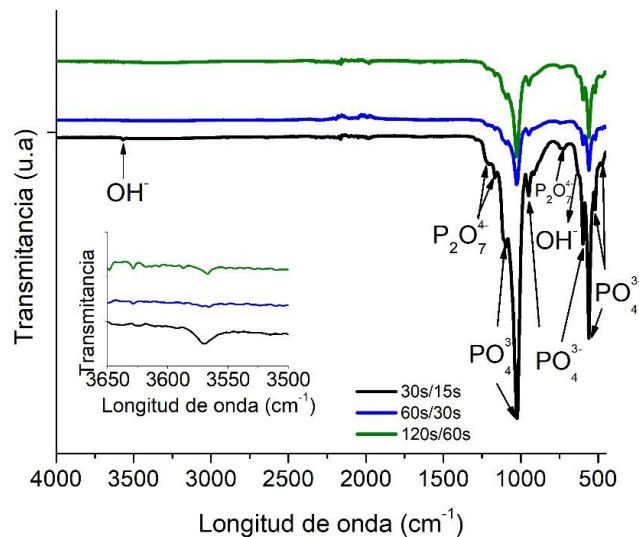


Figura 16. Espectros FTIR de los recubrimientos a pH 6 con diferente relación de pulsos.

Los difractogramas obtenidos de las muestras depositadas a pH 6 fueron comparados con la base de datos PDF-2 (2014) del International Centre for Diffraction Data (ICDD) y se presentan en la figura 17. En los perfiles de difracción se identifica una fase cristalina asociada a la hidroxiapatita con las tarjetas n° 010-86-0740 $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})]$, y 010-74-9770 $[\text{Ca}_{4.92}$

($H_{0.03}(PO_4)_3(OH)_{0.87}$]. Los picos de difracción son identificados a valores de 2θ a 25.7° , 28.1° , 32.0° , 34.0° , 35.3° , 40.5° , 43.7° , 45.3° , 46.5° , 49.37° , 52.9° y 63.4° .

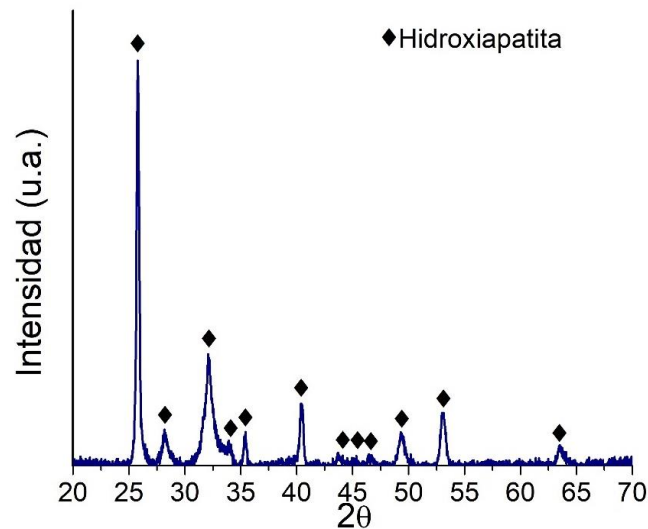


Figura 17. Difractograma de rayos X del recubrimientos a pH 6 condición I.

En la figura 18 se presentan las imágenes tomadas con microscopía confocal a los recubrimientos realizados a pH 6. Se llevó a cabo un rayado al recubrimiento hasta la superficie del sustrato obteniendo una medida aproximada del espesor de recubrimiento.

La figura 18(a) muestra una rugosidad media de $Rz=2,6\mu m$ (ver calculo en Apéndice D) y un espesor promedio de $19\mu m$ libre de poros. Las muestras obtenidas bajo las condiciones II y III presentan una rugosidad superficial $Rz=7,5\mu m$ y $Rz=10,6\mu m$ con un espesor de aproximadamente de $20\mu m$ y $29\mu m$ respectivamente, reflejando un aumento en la heterogeneidad superficial del recubrimiento, asociado con el aumento en los tiempos de aplicación de pulso (t_{on}) durante la electrodeposición, el cual coincide con los resultados obtenidos en SEM.

Luego de variar los parámetros de obtención de recubrimientos de fosfatos de calcio por medio de electrodeposición pulsada, teniendo en cuenta los resultados que exponen mayor homogeneidad tanto en morfología como en superficie, sin presencia de grietas, se escogen las siguientes

condiciones de trabajo: potencial de trabajo -1.6V , relación de aplicación de pulsos de $t_{\text{on}}/t_{\text{off}} = 30\text{s}/15\text{s}$, pH 6 a 65°C bajo agitación constante (700 RPM).

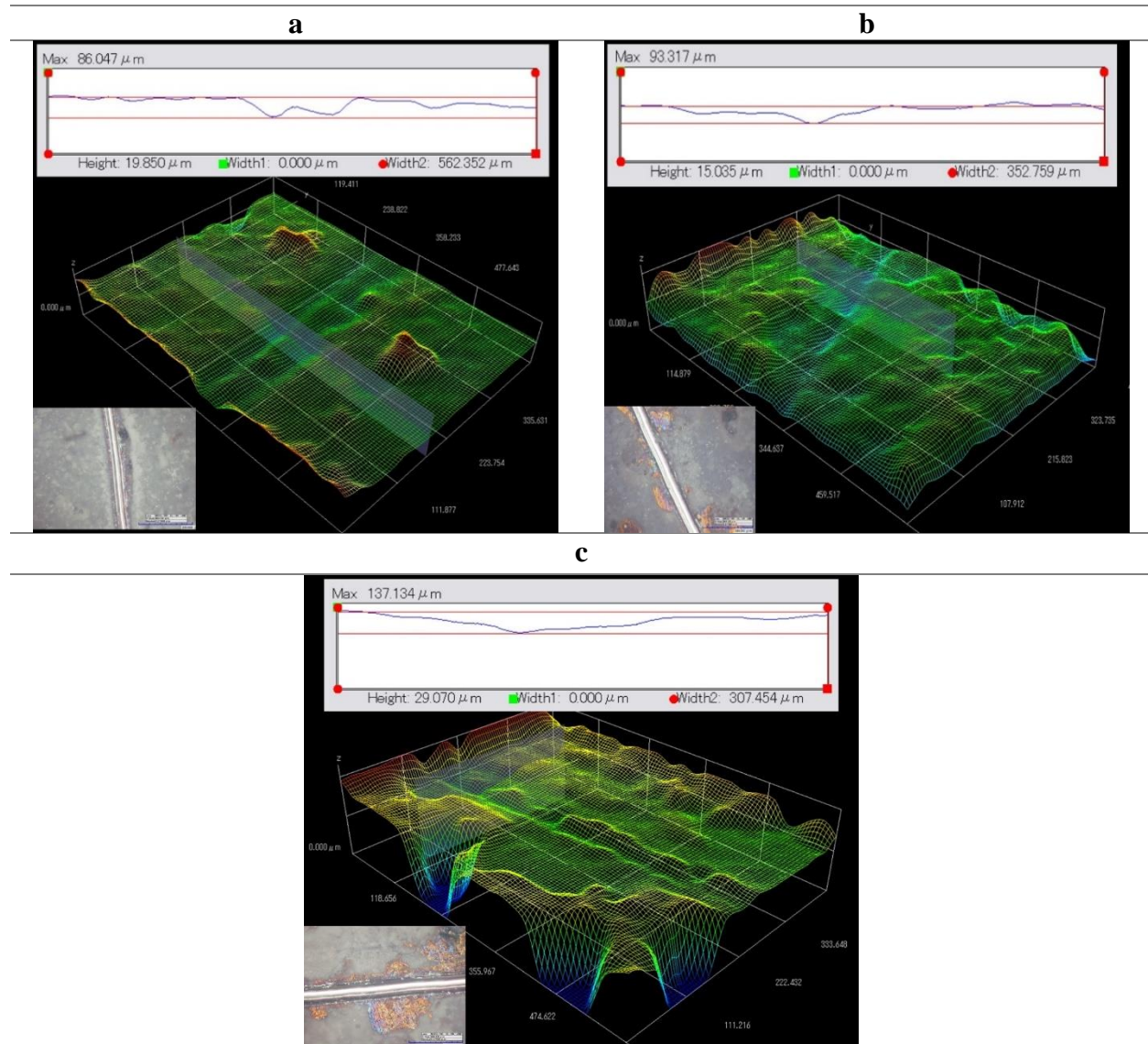


Figura 18. Imágenes de microscopía confocal (3D) de los recubrimientos a pH 6 con diferente relación de pulsos. (a) condición I (b) condición II (c) condición III.

5.2.2 Electrodeposición de recubrimientos de HAP reforzada con MWCNT.

Una vez escogido los parámetros de electrodeposición de HAP, se procede a preparar las nuevas soluciones precursoras de fosfatos de calcio con presencia de 3 diferentes concentraciones de

MWCNT (0,1g/L, 0,5g/L y 1g/L). Considerando que la presencia de MWCNT puede afectar los procesos de reducción de especies durante la electrodeposición pulsada, se realizó una prueba de voltamperometría cíclica a la nueva solución preparada con presencia de la mayor concentración de MWCNT (1g/L).

En la figura 19 se muestran los voltamperogramas obtenidos en un electrolito con y sin presencia de MWCNT donde el barrido de potencial se realizó en sentido catódico desde 0.1 V hasta -2 V vs Ag/AgCl.

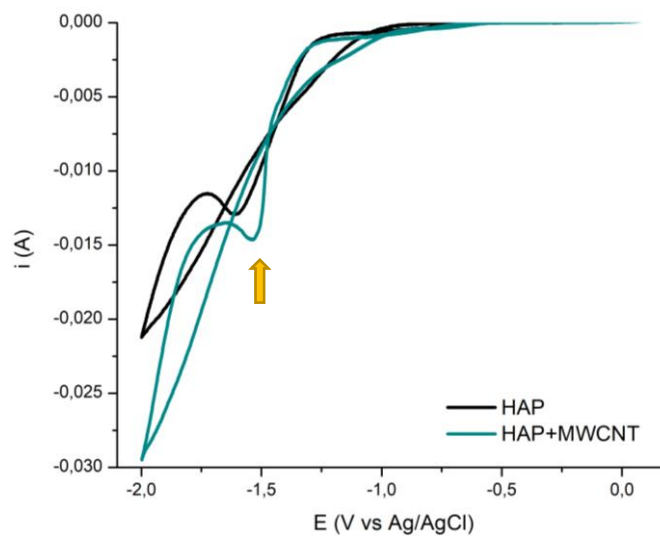


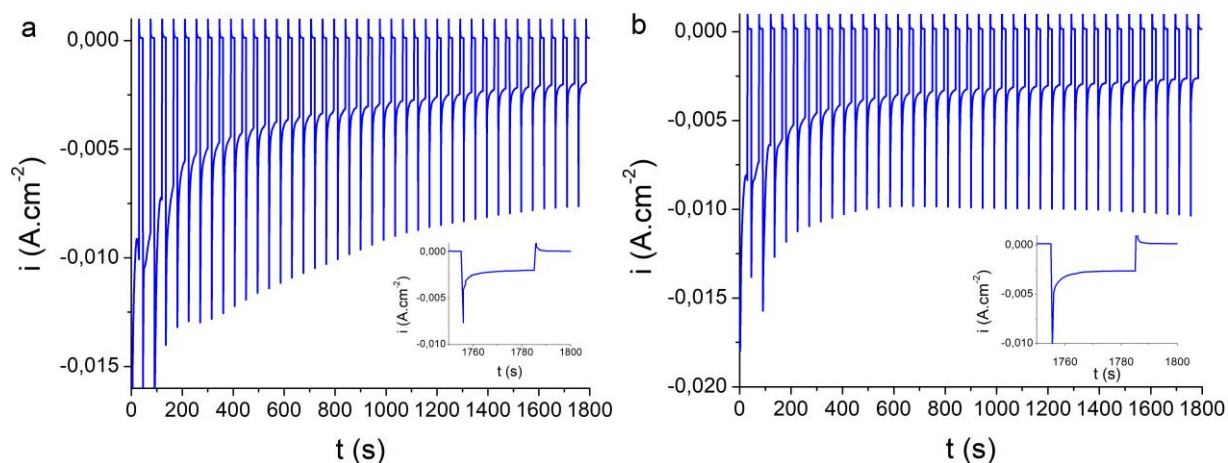
Figura 19. Voltamperometría cíclica de Ti6Al4V en una solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ con presencia de 1 g/L MWCNT ($v: 20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, pH: 6).

El voltamperograma obtenido en ausencia de MWCNT presenta un hombro de potencial que inicia a -0,9 V vs Ag/AgCl relacionado con el primer proceso de reducción, seguidamente se observa un segundo proceso de reducción que inicia aproximadamente a -1,2 V vs Ag/AgCl, presentando un pico bien definido a -1,59 V vs Ag/AgCl. Este máximo de reducción es típico de la transición del tipo de control, donde inicialmente se tiene el crecimiento exponencial de la corriente en función del potencial aplicado relacionado con un control cinético (Ecuación de

Butler-Volmer) (apéndice E), seguido por una reducción de la corriente asociada a un control difusional (Ecuación de Nernst Planck) (apéndice E) (Bard et al., 1944). En la muestra con MWCNT se presenta invariable el primer hombro de reducción observado, a diferencia del segundo proceso de reducción donde se presenta un desplazamiento de 60 mV en el pico máximo de potencial hasta -1,53 V vs Ag/AgCl con una variación de la corriente de pico desde $-12\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ hasta $-15\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$. Este desplazamiento en el potencial indica que la presencia de MWCNT aumenta la cinética del proceso.

Considerando que el potencial del pico máximo es menos electronegativo que el potencial escogido para la electrodeposición del electrolito sin MWCNT (-1.6V vs Ag/AgCl), se concluye que a este potencial se presentan los mismos procesos de reducción y que el segundo proceso estaría controlado por transporte. Por lo tanto, se realizó la electrodeposición bajo las mismas condiciones de trabajo ($t_{\text{on}}/t_{\text{off}}=30\text{s}/15\text{s}$) durante 30 minutos a temperatura de 65°C y agitación constante de 700 rpm.

Las curvas cronoamperométricas obtenidas en presencia de MWCNT se presentan en la figura 20. Se observa la misma tendencia mostrada en la electrodeposición de HAP en donde se presenta una disminución en la densidad de corriente con el tiempo como respuesta del potencial aplicado.



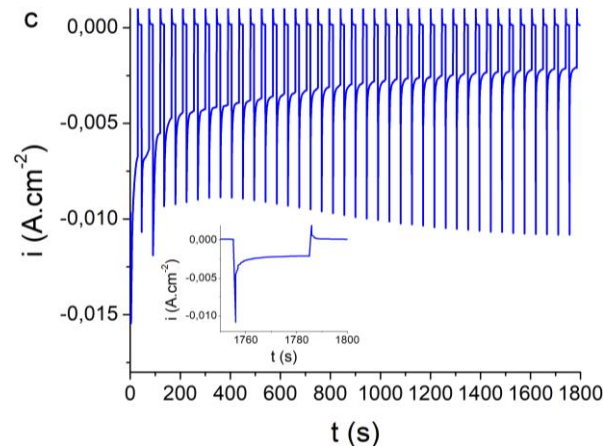


Figura 20. Cronoamperometría de los recubrimientos de hidroxiapatita con diferentes concentraciones de MWCNT a) 0.1 g/L MWCNT, b) 0.5 g/L MWCNT y c) 1 g/L MWCNT. Inserto: detalle de la respuesta obtenida en un pulso de potencial.

En la figura 21 se muestran las imágenes SEM de los recubrimientos con presencia de MWCNT variando las concentraciones en solución entre 0.1 g/L hasta 1g/L. Se tomaron imágenes con aumentos de 500x para observar la morfología general del recubrimiento (apéndice A). Se observa que la morfología de los recubrimientos no se ve afectada con la presencia de MWCNT conservando forma de agujas. La figura 21(a) representa los recubrimientos con 0,1g/L de MWCNT en solución. Al analizar cualitativamente las imágenes de SEM se puede observar que la cantidad de MWCNT depositados sobre el sustrato es mínima, en donde se infiere que la cantidad de nanotubos en solución no es suficiente para obtener una incorporación significativa en el depósito.

Los recubrimientos obtenidos con una concentración de 0,5g/L de MWCNT se muestran en la figura 21(b), se evidencia un aumento en la cantidad de MWCNT incorporados en el depósito, además de una distribución regular en el recubrimiento. Por último, la figura 21(c) representa los recubrimientos con 1g/L de MWCNT en solución, presentando menor cantidad de MWCNT incorporados comparada con los resultados obtenidas a 0,5g/L MWCNT.

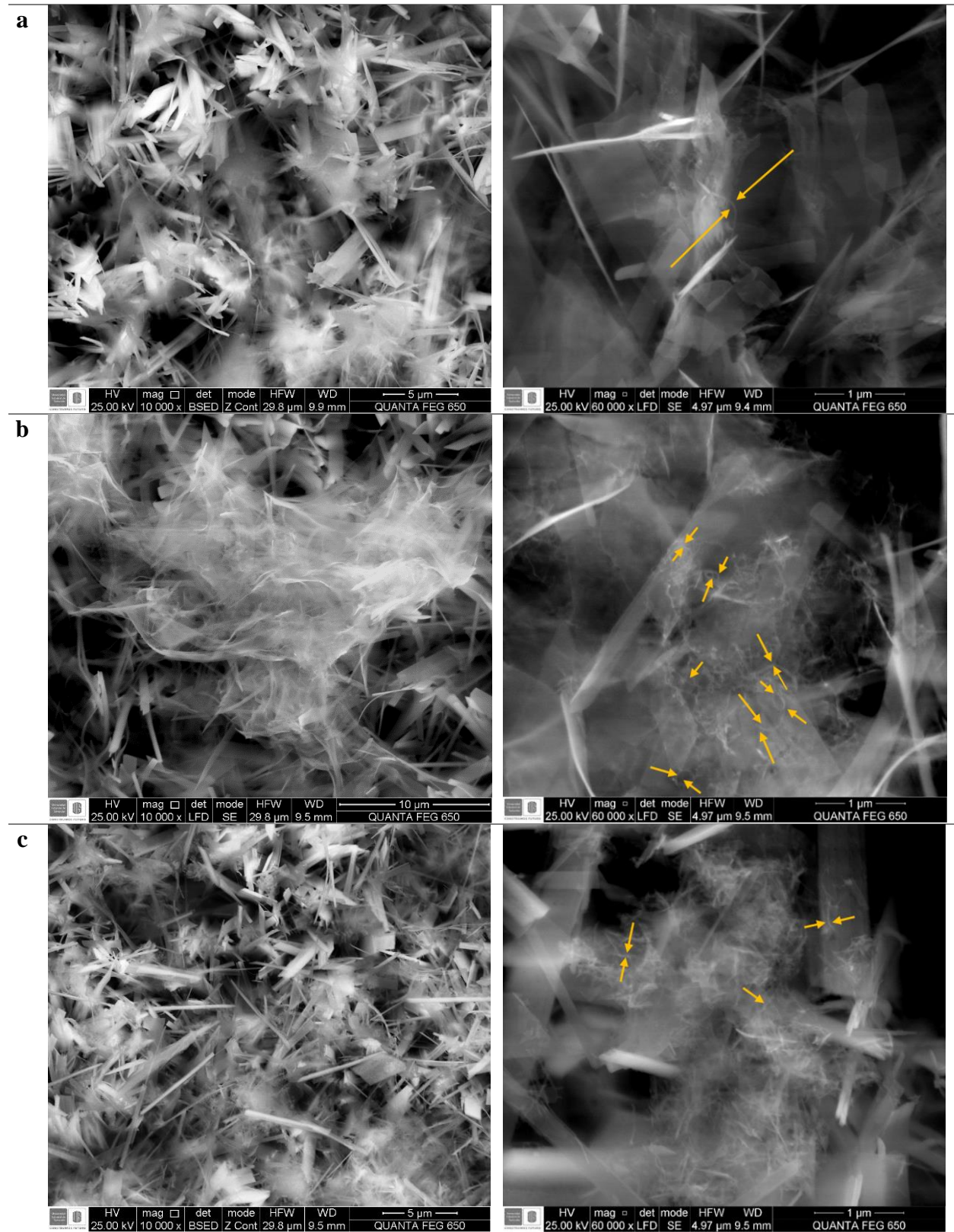


Figura 21. Imágenes SEM de los recubrimientos de hidroxapatita con diferentes concentraciones de MWCNT a) 0.1 g/L MWCNT, b) 0.5 g/L MWCNT y c) 1 g/L MWCNT

Este comportamiento se relaciona con el carácter apolar que tienen los nanotubos de carbono y a sus propiedades hidrofóbicas, por lo que es necesario realizar un tratamiento superficial en las paredes de los MWCNT para mejorar su dispersión en soluciones acuosas por medio de repulsión electrostática. Ahora bien, con la variación en las concentraciones de MWCNT presentes en solución se puede presentar tres comportamientos durante el proceso de electrodeposición como se ilustra en la figura 22. En la zona I se tiene un aumento progresivo de la incorporación de MWCNT en el recubrimiento en función de la concentración en solución. La zona II representa el equilibrio entre la cantidad de MWCNT incorporados en el depósito con la concentración de los mismos en solución.

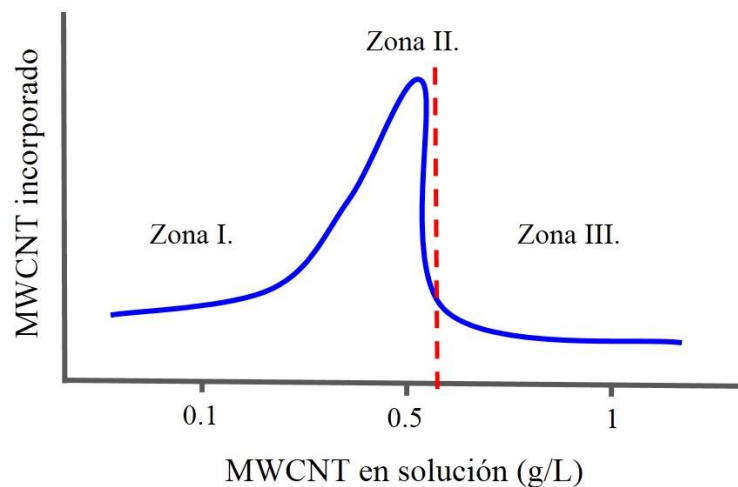


Figura 22. Variación en la cantidad de MWCNT incorporados en el recubrimiento con respecto a la concentración de MWCNT presentes en solución.

La zona III representa la disminución en la cantidad de MWCNT incorporados en el recubrimiento con el aumento de la concentración de MWCNT en la solución. Este comportamiento ocurre posiblemente porque en esta zona aumenta la probabilidad de colisión entre los MWCNT ocasionando una aglomeración.

A continuación, se presentan las posibles causas de aglomeración:

1. Con el aumento en la concentración de MWCNT en solución, la probabilidad de colisión entre MWCNT aumenta. Esto se ve influenciado por el movimiento convectivo debido a la agitación, sumado al movimiento Browniano que aumenta con la temperatura durante el proceso de electrodeposición.
2. Atracción por las fuerzas de Van der Waals donde se establecen puentes de hidrógeno entre los MWCNT.

Como conclusión parcial de este análisis se tiene que al trabajar con una concentración de 0,5 g/L de MWCNT se evidencia una mayor incorporación de los MWCNT en el recubrimiento.

En la Figura 23 se presentan los espectros FTIR de los recubrimientos obtenidos variando las concentraciones de MWCNT.

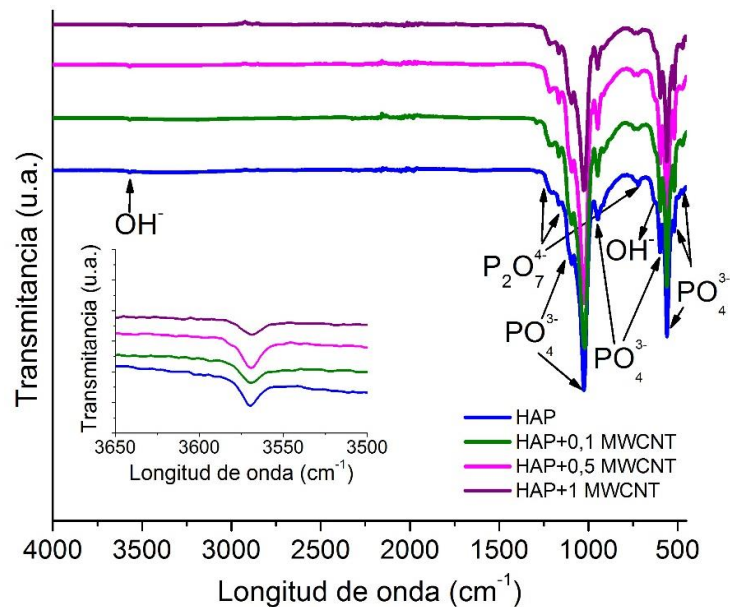


Figura 23. Espectros FTIR de los recubrimientos de hidroxiapatita con diferentes concentraciones de MWCNT.

Comparando los resultados obtenidos de los recubrimientos con las tres concentraciones de MWCNT, no se encuentran diferencias en las bandas características de los fosfatos encontrando una gran similitud en las longitudes de onda donde se presentan las vibraciones de los enlaces PO_4^{3-} y del enlace $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$.

Las bandas encontradas son relacionadas con las siguientes longitudes de onda: 474cm^{-1} , 520cm^{-1} , 560cm^{-1} , 600cm^{-1} , 950cm^{-1} , 1023cm^{-1} y 1095cm^{-1} , características de las variaciones en la vibración de los grupos PO_4^{3-} , además se observa una vibración del enlace O-H ubicada a 630cm^{-1} en forma de hombro y 3570cm^{-1} .

Los difractogramas obtenidos de las muestras con variación en la concentración de MWCNT fueron comparados con la base de datos PDF-2 (2014) del International Centre for Diffraction Data (ICDD) y se presentan en la figura 24.

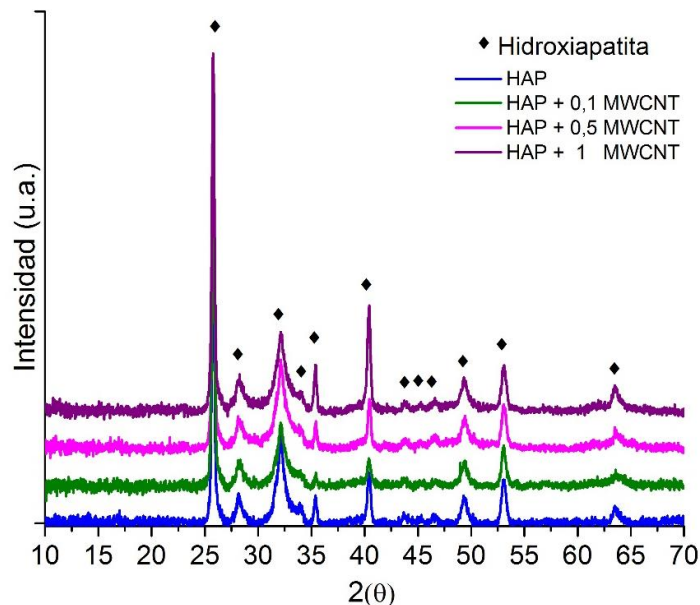


Figura 24. Difractograma de rayos X de los recubrimientos de hidroxapatita con diferentes concentraciones de nanotubos de carbono (0.1 g/l MWCNT, 0.5 g/l MWCNT y 1 g/l MWCNT).

En los perfiles de difracción se identifica la presencia de hidroxiapatita con las tarjetas PDF n° 010-74-9770 [$\text{Ca}_{4.92}(\text{H}_{0.03}(\text{PO}_4)_3(\text{OH})_{0.87})$], 010-73-8421 [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$] y 010-71-5049 [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$]. Los picos de difracción son identificados y asociados con las tarjetas a valores de 2θ a 25.7° , 28.1° , 32.1° , 33.9° , 35.3° , 40.4° , 43.7° , 45.3° , 46.6° , 49.4° , 53.9° y 63.5° .

Es importante mencionar que en los resultados de FTIR y DRX se esperaba observar bandas características asociadas a la presencia de MWCNT. Sin embargo, no se presentaron en ninguno de los espectros obtenidos, indicando que el tamaño nanométrico y la distribución de los MWCNT incorporados en los recubrimientos hace difícil la detección dentro del límite de sensibilidad de las técnicas empleadas como también lo expone Chen (Y. Chen et al., 2006).

5.3 Evaluación electroquímica de recubrimientos de HAP reforzados con MWCNT.

Con la finalidad de estudiar la biodegradación de los recubrimientos con diferentes concentraciones de MWCNT, obteniendo información acerca de los procesos faradaicos que ocurren en la interfase sustrato-electrolito se llevaron a cabo pruebas de potencial a circuito abierto, espectroscopia de impedancia electroquímica y curvas de polarización usando como electrolito medio de cultivo RPMI 1640.

En la Tabla 3 se encuentran las medidas obtenidas de potencial a circuito abierto.

Tabla 3. Resultados de las mediciones de EIS y polarización potenciodinámicas en medio RPMI 1640 a 37°C .

<i>Muestra</i>	<i>OCP (mV)</i>	<i>OHM.CM⁻²</i>	<i>I_{corr} (A.cm⁻²)</i>	<i>E_{corr} (mV vs SCE)</i>	<i>β_a (mV/dec)</i>
<i>Ti6Al4V</i>	-425	250000	6.65×10^{-8}	-420	143
<i>Ti6Al4V+ HAP</i>	-106	50000	1.5×10^{-6}	-93	153
<i>Ti6Al4V+ HAP+ 0,1g/L MWCNT</i>	-132	28200	7.83×10^{-7}	-138	128
<i>Ti6Al4V+ HAP+ 0,5g/L MWCNT</i>	-89	9700	2.44×10^{-6}	-90	115
<i>Ti6Al4V+ HAP+ 1 g/L MWCNT</i>	-124	37000	1×10^{-6}	-99	117

La muestra de Ti6Al4V desnudo presenta el potencial más negativo (-0,425V vs Ag/AgCl) de las muestras estudiadas. Con la presencia de los recubrimientos de HAP y HAP+MWCNT se presenta un desplazamiento a potenciales más nobles, oscilando alrededor de -110 mV vs Ag/AgCl. Este aumento en el potencial de aproximadamente 300 mV indica que las muestras recubiertas son más estables termodinámicamente en presencia del electrolito de trabajo, estos resultados están de acuerdo con lo reportado en la literatura (Chakraborty et al., 2018; Drevet et al., 2011).

En la figura 25 se observa los diagramas de Nyquist y Bode para la muestra de Ti6Al4V.

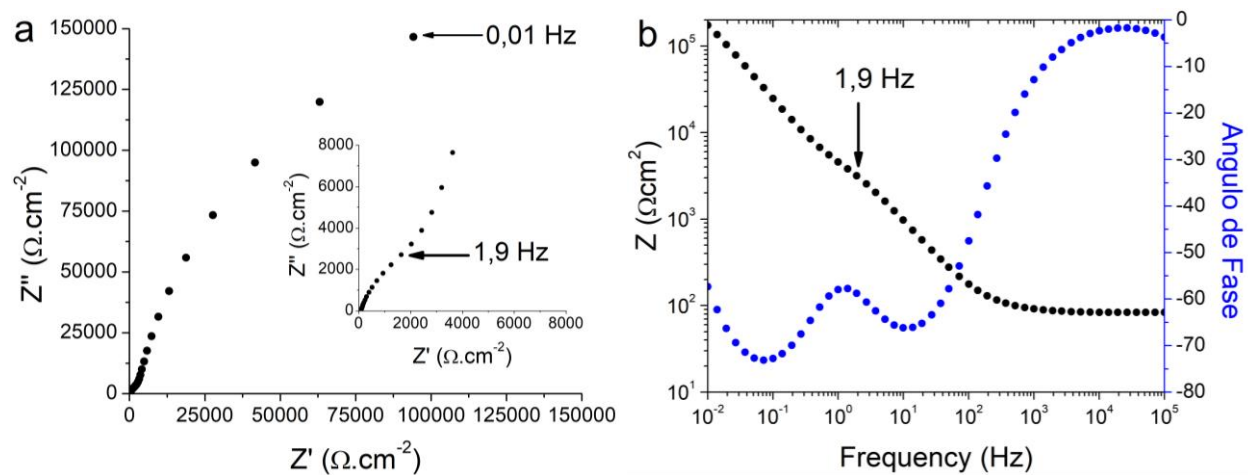


Figura 25. Diagrama de (a) Nyquist y (b) Bode de la muestra Ti6Al4V sin recubrimiento.

Los resultados de Ti6Al4V sin recubrimiento muestran que los puntos obtenidos desde 10KHz hasta 1.9Hz siguen una tendencia con la forma de un semicírculo cuya proyección cierra en aproximadamente $4480 \text{ Ohm}\cdot\text{cm}^{-2}$. Esta respuesta se relaciona con la resistencia del titanio metálico. Desde 1.9Hz hasta 0.01Hz los puntos siguen otra función de un segundo semicírculo incompleto cuya proyección cerraría aproximadamente en $239500 \text{ Ohm}\cdot\text{cm}^{-2}$. Este valor de resistencia está relacionado con la presencia de la capa pasiva natural que se forma en el titanio. El diagrama de bode (fig. 25(b)) presenta un comportamiento capacitivo típico de un material

metálico (Grosogeat, Boinet, Dalard, & Lissac, 2004; C. H. Huang et al., 2017), con una variación a 1.9Hz correspondiente a la capa pasiva.

Las figuras 26 y 27 muestran los diagramas de Nyquist y Bode obtenidos en los recubrimientos con diferentes concentraciones de MWCNT.

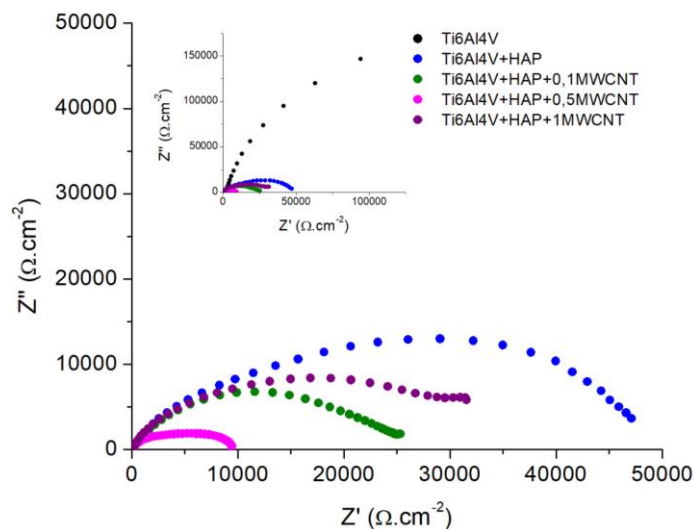


Figura 26. Diagrama Nyquist de los recubrimientos de hidroxiapatita con diferentes concentraciones de MWCNT.

El diagrama de Bode presenta un comportamiento con dos constantes de tiempo, la primera constante de tiempo se localiza entre 10^2 y 10^5 Hz asociada al comportamiento farádico de la interfase recubrimiento/electrolito, la segunda constante se presenta entre 10^{-2} y 10^2 Hz que se asocia a la interfase sustrato/recubrimiento. Las muestras con recubrimiento presentan una disminución en el valor de la resistencia total calculada en la proyección sobre el eje real.

Recordando el procedimiento experimental, se tiene que para realizar la electrodeposición de recubrimientos se realiza un decapado químico de la superficie del titanio eliminando la capa de óxido natural. Por lo tanto, al comprar la resistencia de los diferentes recubrimientos, en el inserto

de la figura 26 se observa que todos los valores son menores de los que se presentan con una capa de óxido de titanio.

Este comportamiento se evidencia igualmente en el diagrama de Nyquist en el cual se presenta un semicírculo aplanado compuesto por dos semicírculos superpuestos, con una resistencia total de aproximadamente $50000 \text{ Ohm.cm}^{-2}$ para la muestra recubierta con HAP. Las muestras de HAP+MWCNT exhiben un comportamiento semejante al descrito anteriormente, manifestando dos constantes de tiempo en los diagramas de Bode y Nyquist, considerando que la incorporación de los MWCNT en el recubrimiento no actúa como una capa separada de la hidroxiapatita.

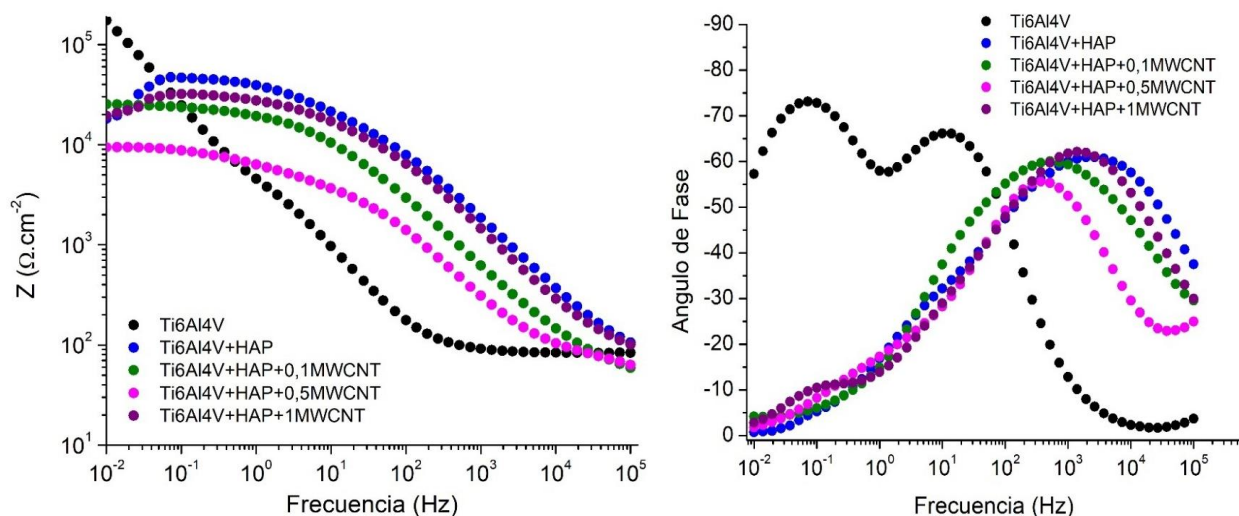


Figura 27. Diagrama Bode de los recubrimientos de hidroxiapatita con diferentes concentraciones de MWCNT.

La disminución de la resistencia en las muestras con MWCNT está relacionada con la conductividad de los mismos. Por lo tanto, al tener mayor cantidad de MWCNT incorporados en el recubrimiento se presentarán menores resistencias. Al observar los resultados expuestos en el diagrama de Nyquist encontramos que la muestra con 1 g/L de MWCNT es la de mayor resistencia

en comparación con las demás, debido al bajo porcentaje de MWCNT incorporados corroborando lo observado por microscopia electrónica de barrido, de esta manera la muestra que presentó una mayor incorporación presenta la menor resistencia de las tres (9700 Ohm.cm^{-2}). La muestra a $0,1 \text{ g/L}$ tiene una resistencia intermedia de $28200 \text{ Ohm.cm}^{-2}$.

Los gráficos de ángulo de fase (figura 27) de todas las muestras indican dos picos, uno que se presenta a frecuencia entre 10^2 y 10^5 Hz y otro entre 10^{-2} y 10^2 Hz . En el rango de alta frecuencia, las muestras recubiertas con y sin MWCNT presentan un ángulo de fase entre -56° a -62° , indicando un comportamiento capacitivo de los recubrimientos (en la interfase recubrimiento-electrolito), sin embargo, los ángulos obtenidos a baja frecuencia oscilan entre -4° y -11° que indica la predominancia de un comportamiento resistivo en la interfase electrodo-recubrimiento. A lo largo de la región de baja frecuencia, la muestra de Ti6Al4V exhibe una naturaleza capacitiva con un ángulo de fase de -73° siendo el mayor de todas las muestras el cual es característico de la presencia de una película pasiva (C. H. Huang et al., 2017).

En la Figura 28 se muestran los modelos propuestos de circuitos equivalentes para los ensayos con medio de cultivo. La Figura 28(a) representa el circuito equivalente asociado a la muestra de Ti6Al4V sin recubrimiento, mientras que las muestras recubiertas con y sin MWCNT incorporados son modeladas con el circuito expuesto en la figura 28(b-c). El circuito equivalente para la muestra de Ti6Al4V desnudo presenta una capacitancia debido a la doble capa eléctrica, el cual es representado con un elemento de fase constante (CPE) en paralelo a la resistencia de transferencia de carga (R_{ct}) y una resistencia de poro asociada a una capa compacta de óxido (R_2) con su respectivo elemento de fase constante CPE_2 , en serie con la resistencia a la solución (R_s). Para las muestras con recubrimiento se registra la presencia de dos constantes de tiempo relacionadas con

la interacción recubrimiento-electrolito y sustrato-recubrimiento, en este caso R_s representa la resistencia del electrolito, R_3 es la resistencia a la transferencia de carga a través de los poros del recubrimiento con un elemento de fase constante el cual representa la capacitancia en la interfase recubrimiento/electrolito CPE_3 , y R_1 la resistencia de transferencia de carga sustrato-recubrimiento con su respectivo elemento de fase constante CPE_1 . Para la muestra con presencia de MWCNT se representa con el mismo circuito, pero en este caso con una resistencia a la transferencia de carga a través de los poros del recubrimiento (R_4) y un elemento de fase constante CPE_4 .

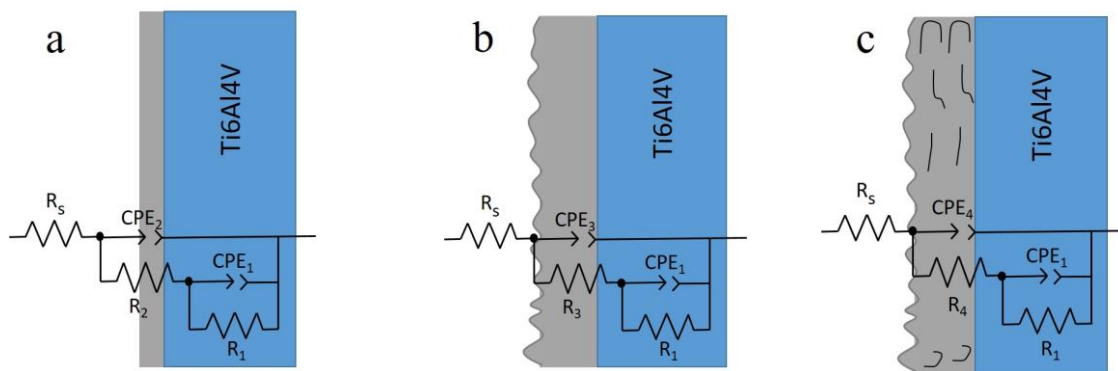


Figura 28. Circuitos equivalentes que representan los resultados de la impedancia de las muestras (a) aleación de Ti6Al4V sin recubrimiento; (b) Ti6Al4V+HAP; (c) Ti6Al4V+HAP+ % MWCNT

Las curvas de polarización potenciodinámicas de los recubrimientos obtenidos con diferentes concentraciones de MWCNT son presentadas en la figura 29. La muestra de Ti6Al4V presenta un comportamiento típico de metales pasivos, en donde la disolución de la aleación ocurre bajo control cinético iniciando desde el potencial de corrosión (-420 mV vs SCE) a -220 mV vs SCE, seguido por la formación de la capa de óxido pasiva característica de las aleaciones de titanio.

El comportamiento de la primera sección de la rama anódica se describe mediante la ecuación de Butler-Volmer (Bard et al., 1944), comparando la pendiente experimental ($\beta_a = 143 \text{ mV / dec}$) con la pendiente teórica (línea de color naranja). Variando el número de electrones participantes,

se obtuvo correspondencia con el modelo teórico que incluye un electrón en la reacción de oxidación. Sin embargo, este valor difiere del esperado para la oxidación del titanio ya que este elemento maneja estados de oxidación de +2,+3 y +4. Este comportamiento puede presentarse debido a que la velocidad de reacción es cercana a la velocidad de transporte de las especies en solución, en donde se puede tener un control mixto, aunque los datos de las pendientes experimentales concuerden con el valor teórico.

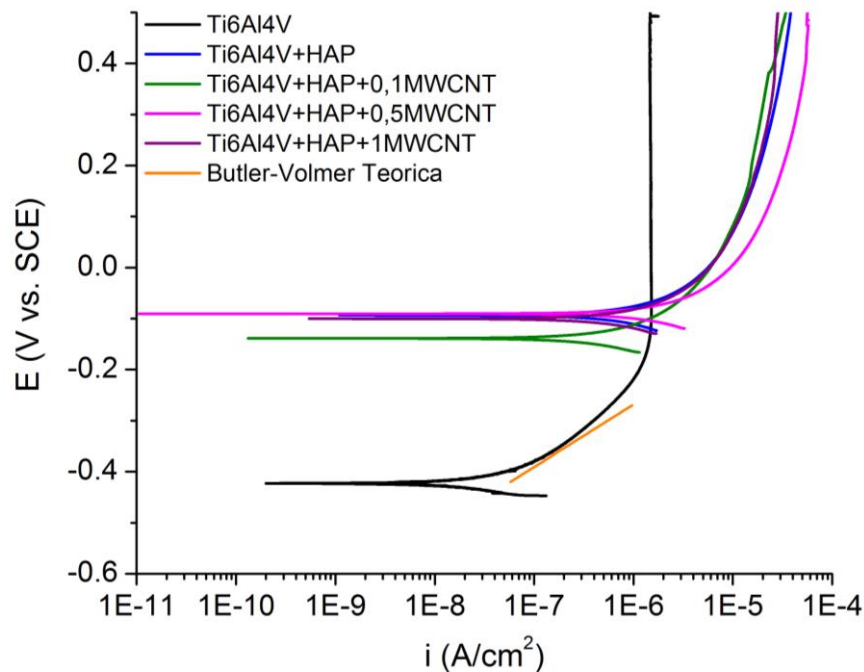


Figura 29. Curvas de polarización potenciodinámicas de los recubrimientos de hidroxiapatita con diferentes concentraciones de MWCNT

Las muestras con recubrimientos no exhiben el mismo comportamiento que Ti6Al4V. En este caso, las corrientes anódicas pueden dividirse en tres zonas: la primera, entre el potencial de corrosión (-93 mV vs SCE) y 14 mV vs SCE, donde la corriente muestra un incremento con el sobrepotencial aplicado, con una pendiente Tafel de 153 mV / dec, similar al valor obtenido para el electrodo Ti6Al4V, relacionado con la oxidación electroquímica de la aleación de titanio.

La segunda zona entre 14 y 310 mV vs SCE, donde la corriente muestra un incremento exponencial, relacionado con un control mixto y la última zona, superior a 310 mV vs SCE la corriente muestra un incremento lineal en función del potencial aplicado con una pendiente de 770 mV / dec. Este comportamiento se relaciona con una disolución bajo control mixto y la capa pasiva.

Este efecto se atribuye debido a que el recubrimiento se disuelve progresivamente, de modo que, la respuesta electroquímica de HAP se relaciona con la morfología observada en las imágenes SEM (Figura 15 y 22), donde la estructura poco compacta permite la interacción de iones entre la aleación de titanio y el electrolito.

La respuesta de la muestra de Ti6Al4V+HAP+MWCNT presenta un comportamiento similar con la muestra de Ti6Al4V+HAP, con un incremento en los valores de corriente registrados, relacionado con la conductividad eléctrica de los MWCNT incorporados acorde con los resultados obtenidos por EIS.

En comparación con la muestra de Ti6Al4V sin recubrimiento, el potencial de corrosión (E_{corr}) de las muestras con recubrimiento se ha desplazado a direcciones de potencial más positivos, mientras que la densidad de corriente de corrosión (i_{corr}) se muestra en la tabla 3. Es necesario recalcar que el recubrimiento no experimenta un proceso de corrosión como el que ocurre en los metales. Con los resultados de polarización se desea establecer una interpretación de la disolución de los recubrimientos o la interacción entre el recubrimiento y el electrolito con el aumento en las corrientes registradas.

Este aumento se relaciona con los resultados obtenidos en las pruebas de EIS, ya que se presenta una disminución en la resistencia con las muestras de MWCNT y con relación a la ley de Ohm, la muestra con una mayor densidad de corriente de corrosión fue la obtenida con 0,5g/L MWCNT siendo a su vez la que menor resistencia a la polarización.

Con base en los resultados obtenidos en SEM y en las pruebas electroquímicas, se puede concluir que los recubrimientos con mayor concentración de MWCNT incorporados, fueron los electrodepositados utilizando una solución con 0,5 g/L MWCNT. Por lo tanto, en la sección 5.4 estas serán las muestras por evaluar.

5.4 Evaluación de la respuesta celular de los recubrimientos de HAP/MWCNT sobre Ti-6Al-4V

Los ensayos biológicos fueron realizados a muestras de Ti6Al4V sin recubrir, Ti6Al4V/HAP y Ti6Al4V/HAP-0,5 g/L MWCNT. La evaluación de la respuesta celular de los recubrimientos se realizó mediante tres tipos de experimentos realizando un análisis de varianza Anova ($n=3$) considerando un valor $p < 0,05$ estadísticamente significativo.

5.4.1 Ensayos de citotoxicidad.

Se realizó el ensayo de reducción de MTT con el fin de determinar la viabilidad celular con la reducción de este compuesto mediante un método colorimétrico. La cantidad de células para reducir el compuesto a formazan es un indicador de la integridad de las mitocondrias y su funcionalidad, lo que permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa. La cantidad de formazan generado es directamente proporcional al número de células viables.

En la figura 30 se presenta el porcentaje de viabilidad de las muestras estudiadas con su respectivo coeficiente de variabilidad. El análisis de datos mostró diferencias no significativas con respecto al control. Se observa que la muestra de Ti6Al4V y la muestra de Ti6Al4V/HAP-MWCNT presentan un porcentaje de viabilidad del 100%. Por otro lado, la muestra de Ti6Al4V/HAP presentó un valor de viabilidad menor en comparación con el blanco.

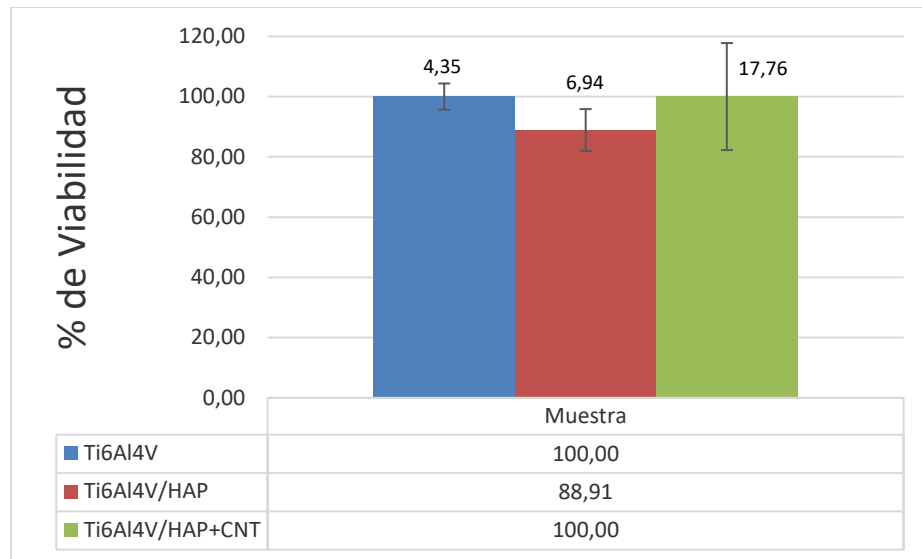


Figura 30. Porcentaje de viabilidad de las muestras Ti6Al4V con y sin recubrimiento.

Mediante inspección visual se observó una disolución superficial en los bordes del recubrimiento. Esto pudo generar una concentración local de productos de disolución o un cambio en el pH del medio de cultivo, afectando el comportamiento celular y las mediciones obtenidas según lo reportado por (Kasper, Witte, & Pörtne, 2012). Posiblemente la incorporación de 0,5g/L MWCNT mejora la estabilidad química del recubrimiento, lo cual previene que ocurra cambios en la composición del medio.

Teniendo en cuenta que una muestra se considera citotóxica si presenta un % de viabilidad menor al 70%, se puede considerar que las muestras con y sin recubrimiento no son citotóxicas.

5.4.2 Ensayos de adhesión celular por microscopía de epifluorescencia.

Para evidenciar las células adheridas a las superficies de las muestras se realizó microscopía de epifluorescencia. En la Figura 31 se muestran las micrografías tomadas a las muestra estudiadas, las microscopías se realizaron a 24, 72 y 120 horas de incubación de células HOS con un aumento microscópico de 40X.

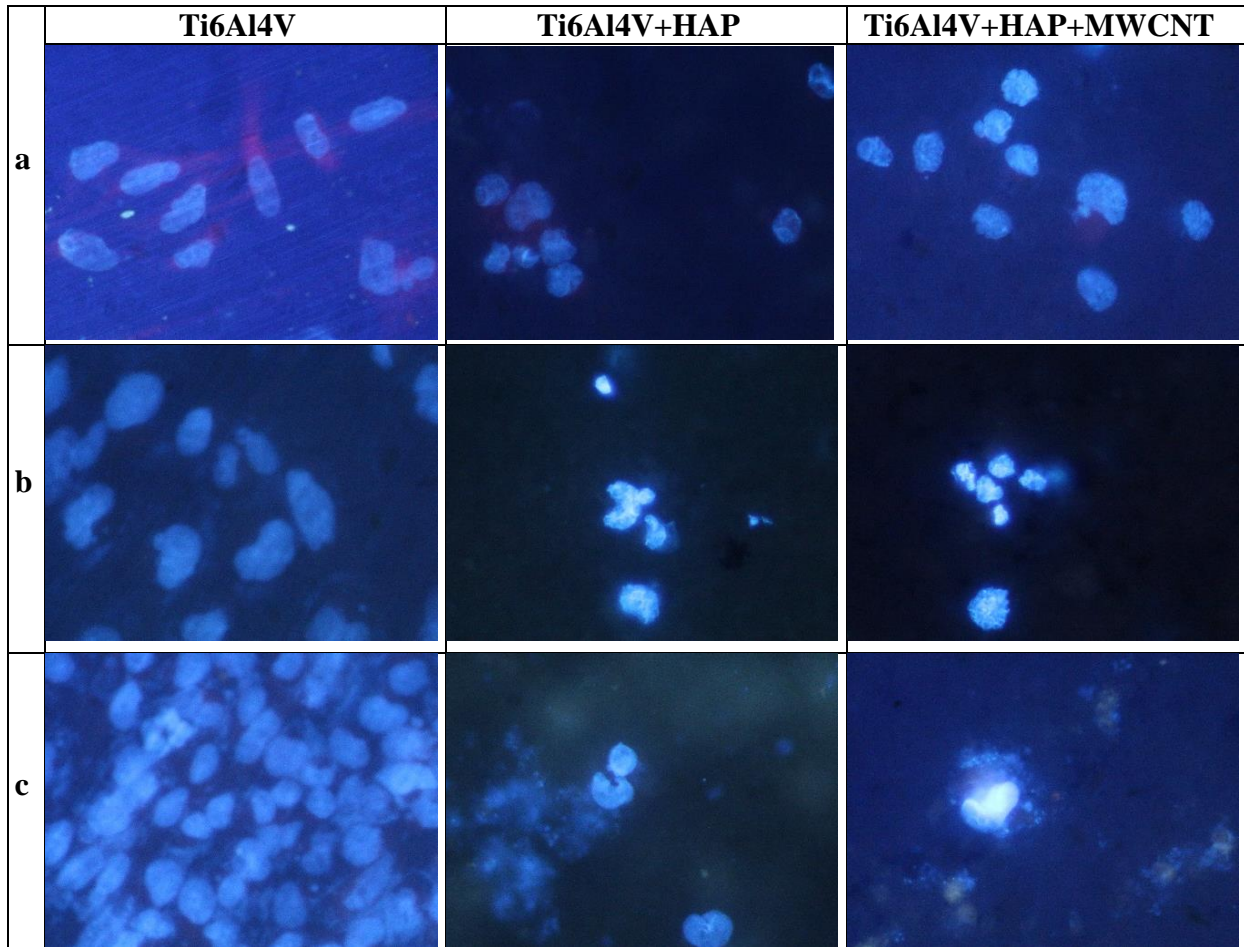


Figura 31. Micrografías de las muestras de incubación celular a 40x a) 24 horas, b) 72 horas y c) 120 horas.

La muestra de Ti6Al4V desnudo, presentó un aumento proporcional en la densidad celular con el tiempo, la morfología celular exhibe núcleos semejantes a óvalos lisos y alargados. Por el contrario, en las muestras recubiertas con y sin MWCNT se observa una marcada inhibición del crecimiento celular. Lo que se evidencia dado que las células HOS no se adhieren a la superficie de las muestras, presentando una disminución en la densidad celular con el aumento en los días de incubación. Los núcleos observados en las muestras con recubrimiento tienden a ser menos ovalados presentando un cambio morfológico en su interior, el cual esta relacionando con el

proceso de apoptosis que sufre la célula de acuerdo a investigaciones realizadas por Meshkini y Geng (Geng et al., 2016; Meshkini & Oveisi, 2017).

Aunque trabajos previos han demostrado que los fosfatos de calcio permiten la adhesión y proliferación celular (Chakraborty et al., 2018; Geng et al., 2017), se ha presentado un comportamiento diferente en el presente estudio. Debido a esto y teniendo en cuenta que las propiedades superficiales de los biomateriales incluida la composición química, rugosidad e hidrofiliidad, juegan un papel importante en el comportamiento y la respuesta de las células en contacto con implantes (W. K. Lee, Lee, & Kim, 2009), se evaluó las propiedades superficiales del recubrimiento, en términos de su hidrofiliidad e hidrofobicidad. Se llevaron a cabo medidas de ángulo de contacto sobre las muestras estudiadas como se observa en la tabla 4. Las medidas de ángulo de contacto reflejan una superficie hidrofílica con un valor de aproximadamente 74° para la muestra de Ti6Al4V y de aproximadamente 0° para las muestras de Ti6Al4V/HAP y Ti6Al4V/HAP/MWCNT.

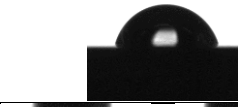
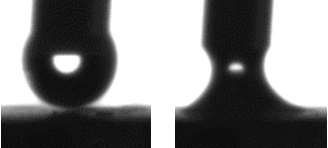
De estos resultados se puede inferir que la presencia de nanotubos de carbono en el recubrimiento no produce cambios superficiales en la muestra, debido a su tamaño nanométrico y a su incorporación dentro de la matriz, pues el ángulo de contacto en ambas muestras es similar. Adicionalmente, la evaluación del ángulo de contacto permite concluir que la disminución en el % de viabilidad celular de las muestras con recubrimiento se debe principalmente al carácter hidrofílico presentado.

La adsorción de proteínas es la primera etapa en los mecanismos de adhesión celular, por lo tanto, las células se unen a una capa de proteína preadsorbida antes de proliferar (Anselme, 2000). En este sentido, diferentes estudios demuestran que la adsorción de proteínas presenta mejores resultados con materiales que cuentan con ángulos de contacto mayores a 50° y con ángulos

menores 41° presenta menor interacción o adsorción de proteínas, lo cual dificulta la etapa temprana de adhesión celular (Akiyama, Kikuchi, Yamato, & Okano, 2004; S. H. Kim et al., 2007; Nakamura et al., 2016; L. C. Xu & Siedlecki, 2007).

Zheng y col. evaluaron la fuerza de interacción de una proteína en tres superficies (CH_3 , OH y OEG). Concluyeron que la capa de agua unida a las superficies de las muestras OH y OEG debido al carácter hidrofílico es la causa principal de la fuerza de repulsión entre los enlaces de hidrógeno y las proteínas. Estos resultados se relacionan con lo reportado por Keselowsky y col (Keselowsky, Collard, & García, 2003).

Tabla 4. Medidas de ángulo de contacto en agua sobre las muestras de Ti6Al4V con y sin recubrimiento.

<i>MUESTRA</i>	<i>ÁNGULO DE CONTACTO</i>	<i>IMAGEN</i>
TI6AL4V	74°	
TI6AL4V+HAP Y TI6AL4V+HAP+MWCNT	0°	

5.4.3 Medición de fosfatasa alcalina.

La fosfatasa alcalina es una enzima que se encuentra adherida en la superficie de la membrana celular, siendo un indicador de la diferenciación osteoblástica. Tiene un papel importante en la mineralización de la matriz extracelular, indispensable para la formación de hueso y su secreción indica la formación de hueso o inicio de la etapa de diferenciación (Navarro, 2005).

Se determinó la producción de fosfatasa alcalina de las muestras transcurridos 14 días de incubación de las células HOS. Los resultados que se presentan en la figura 32 muestran que la

producción de fosfatasa alcalina exhibe valores similares al control para la muestra sin recubrimiento, mientras que para las muestras recubiertas decae a valores cercanos a cero encontrando diferencias significativas con respecto al control ($p < 0.01$). Este resultado se relaciona con el ensayo de adhesión celular, en donde se evidencia el decrecimiento de células HOS con el aumento en los días de incubación debido a que las células no se adhieren a su superficie.

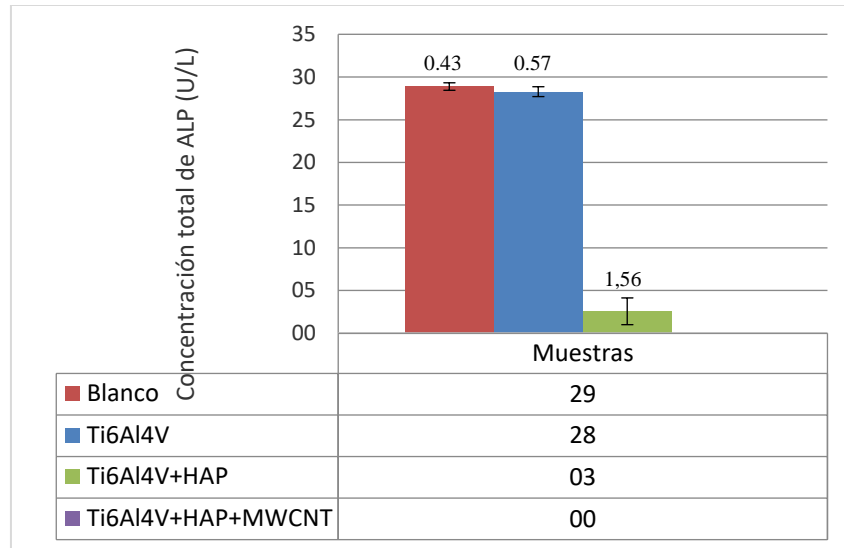


Figura 32. Medición de la producción de fosfatasa alcalina de osteoblastos HOS

Al finalizar las pruebas biológicas, se secaron las muestras a temperatura ambiente durante 1 hora dentro de la cámara extractora, se evidenció que a medida que transcurre el tiempo en cada ensayo, las muestras recubiertas no mostraron desprendimiento del sustrato, esto indica que la adherencia recubrimiento-sustrato no se ve afectada cuando se encuentra en contacto con medio biológico.

Como una conclusión parcial se presenta que los ensayos de adhesión celular y los ensayos de ALP muestran coherencia entre ellos. Las muestras evaluadas no presentan un alto porcentaje de citotoxicidad. Sin embargo, los recubrimientos no se consideran potencialmente bioactivos.

6 Conclusiones

- La evaluación del grado de funcionalización de los nanotubos de carbono mediante la técnica de espectroscopia Raman, puede dar información relevante a cerca de los cambios morfológicos a los que se exponen los nanotubos. Con base a los resultados obtenidos de los tratamientos de oxidación aplicados se concluye que el tratamiento con ácido nítrico permite la funcionalización de los nanotubos de carbono presentando la menor afectación sobre sus paredes.
- La aplicación de la técnica de electrodeposición pulsada, demuestra ser un proceso eficiente, de fácil empleo para la obtención de recubrimientos de hidroxiapatita reforzada con nanotubos de carbono, logrando obtener recubrimientos con morfología homogénea en forma de aguja sin presencia de grietas ni porosidades significativas. Adicionalmente se evidencia una relación directa entre el pH, potencial y relación de pulso con la morfología y características del recubrimiento.
- Las técnicas electroquímicas tales como potencial a circuito abierto, espectroscopia de impedancia electroquímica y curvas de polarización potenciodinámicas, permitieron caracterizar el comportamiento del material en contacto con medio biológico, encontrando que la inserción de nanotubos de carbono causa una disminución en la resistencia del recubrimiento, relacionado con una mayor interacción entre el medio y el recubrimiento.
- A partir de los análisis obtenidos de las pruebas biológicas, se concluye que las muestras recubiertas con y sin nanotubos de carbono no resultaron ser tóxicas. Sin embargo, las características superficiales de los recubrimientos como su hidrofiliidad influyen en la adhesión celular, presentado inhibición en la adherencia celular sobre las muestras estudiadas.

- La hipótesis planteada en el trabajo de investigación no pudo ser validada debido a que la superficie del recubrimiento no promueve la adhesión celular. Sin embargo, los resultados obtenidos abren las puertas a futuras investigaciones.

7 Recomendaciones

Con base en los resultados obtenidos del trabajo de investigación se recomienda para futuros trabajos:

- Realizar un estudio de los parámetros de síntesis que permitan obtener recubrimientos de hidroxiapatita mediante electrodeposición pulsada con características superficiales de hidrofiliidad que puedan mejorar los procesos de adhesión y proliferación celular.

Referencias bibliográficas

- Abden, M. J., Afroze, J. D., Alam, M. S., & Bahadur, N. M. (2016). Pressureless sintering and mechanical properties of hydroxyapatite/functionalized multi-walled carbon nanotube composite. *Materials Science and Engineering: C*, 67, 418–424. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.018>
- Abrishamchian, A., Hooshmand, T., Mohammadi, M., & Najafi, F. (2013). Preparation and characterization of multi-walled carbon nanotube/hydroxyapatite nanocomposite film dip coated on Ti–6Al–4V by sol–gel method for biomedical applications: An in vitro study. *Materials Science and Engineering: C*, 33(4), 2002–2010. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.014>
- Ahmed, M. H., Byrne, J. A., Keyes, T. E., Ahmed, W., Elhissi, A., Jackson, M. J., & Ahmed, E. (2012). *Characteristics and applications of titanium oxide as a biomaterial for medical implants. Woodhead Publishing Reviews: Mechanical Engineering Series*. Elsevier Masson SAS. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1533/9781908818188.1>
- Akiyama, Y., Kikuchi, A., Yamato, M., & Okano, T. (2004). Ultrathin poly(N-isopropylacrylamide) grafted layer on polystyrene surfaces for cell adhesion/detachment control. *Langmuir*, 20(13), 5506–5511. <http://doi.org/10.1021/la036139f>
- Álvarez Merino, M. Á., Carasco Marin, F., & Maldonado Hódar, F. J. (2014). *Desarrollo y aplicaciones de materiales avanzados carbonosos*. (M. Á. Á. M. F. C. M. F. J. M. Hódar, Ed.) (UNIA). Sevilla: Universidad Internacional de Andalucía. Retrieved from www.unia.es
- Anselme, K. (2000). Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, 21(7), 667–681. [http://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00242-2](http://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00242-2)
- Arencibia, D. F., Rosario, L. A., & Curveco, D. L. (2009). Principal assays that to determine the

- citotoxicity of a substance , some considerations and their utility. *Revista de Toxicologia En Linea*, (May), 40–51.
- Azem, F. A., Delice, T. K., Urgan, G., & Cakir, A. (2016). Investigation of duty cycle effect on corrosion properties of electrodeposited calcium phosphate coatings. *Materials Science and Engineering C*, 68, 681–686. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2016.06.010>
- Balani, K., Anderson, R., Laha, T., Andara, M., Tercero, J., Crumpler, E., & Agarwal, A. (2007). Plasma-sprayed carbon nanotube reinforced hydroxyapatite coatings and their interaction with human osteoblasts in vitro. *Biomaterials*, 28(4), 618–624. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.09.013>
- Bard, A. J., Faulkner, L. R., York, N., @bullet, C., Brisbane, W., & Toronto, S. E. (1944). *ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications. Electrochemistry. I. Faulkner, Larry R.* <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00056-9>
- Benea, L., Danaila, E., & Ponthiaux, P. (2015). Effect of titania anodic formation and hydroxyapatite electrodeposition on electrochemical behaviour of Ti-6Al-4V alloy under fretting conditions for biomedical applications. *Corrosion Science*, 91, 262–271. <http://doi.org/10.1016/j.corsci.2014.11.026>
- Bokobza, L., & Zhang, J. (2012). Raman spectroscopic characterization of multiwall carbon nanotubes and of composites. *Express Polymer Letters*, 6(7), 601–608. <http://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2012.63>
- Bonfield, C. M., Kumar, A. R., & Gerszten, P. C. (2014). The history of military cranioplasty. *Neurosurgical Focus*, 36(4), E18. <http://doi.org/10.3171/2014.1.FOCUS13504>
- Chakraborty, R., Seesala, V. S., Sen, M., Sengupta, S., Dhara, S., Saha, P., ... Das, S. (2017). MWCNT reinforced bone like calcium phosphate—Hydroxyapatite composite coating

- developed through pulsed electrodeposition with varying amount of apatite phase and crystallinity to promote superior osteoconduction, cytocompatibility and corrosion protection. *Surface and Coatings Technology*, 325, 496–514. <http://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2017.06.073>
- Chakraborty, R., Seesala, V. S., Sengupta, S., Dhara, S., Saha, P., Das, K., & Das, S. (2018). Comparison of Osteoconduction, cytocompatibility and corrosion protection performance of hydroxyapatite-calcium hydrogen phosphate composite coating synthesized in-situ through pulsed electro-deposition with varying amount of phase and crystallinity. *Surfaces and Interfaces*, 10(September 2017), 1–10. <http://doi.org/10.1016/j.surfin.2017.11.002>
- Chen, Q., & Thouas, G. A. (2015). Metallic implant biomaterials. *Materials Science & Engineering R*, 87, 1–57. <http://doi.org/10.1016/j.mser.2014.10.001>
- Chen, Y., Zhang, Y. Q., Zhang, T. H., Gan, C. H., Zheng, C. Y., & Yu, G. (2006). Carbon nanotube reinforced hydroxyapatite composite coatings produced through laser surface alloying. *Carbon*, 44(1), 37–45. <http://doi.org/10.1016/j.carbon.2005.07.011>
- Cotrut, C. M., Vladescu, A., Dinu, M., & Vranceanu, D. M. (2018). Influence of deposition temperature on the properties of hydroxyapatite obtained by electrochemical assisted deposition. *Ceramics International*, 44(1), 669–677. <http://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.09.227>
- Datsyuk, V., Kalyva, M., Papagelis, K., Parthenios, J., Tasis, D., Siokou, A., ... Galiotis, C. (2008). Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes. *Carbon*, 46(6), 833–840. <http://doi.org/10.1016/j.carbon.2008.02.012>
- Destainville, a. (2003). Synthesis, characterization and thermal behavior of apatitic tricalcium phosphate. *Materials Chemistry and Physics*, 80(1), 269–277. <http://doi.org/10.1016/S0254->

0584(02)00466-2

- Drevet, R., Ben Jaber, N., Faur, J., Tara, A., Ben Cheikh Larbi, A., & Benhayoune, H. (2016). Electrophoretic deposition (EPD) of nano-hydroxyapatite coatings with improved mechanical properties on prosthetic Ti6Al4V substrates. *Surface and Coatings Technology*, 301, 94–99. <http://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2015.12.058>
- Drevet, R., Velard, F., Potiron, S., Laurent-Maquin, D., & Benhayoune, H. (2011). In vitro dissolution and corrosion study of calcium phosphate coatings elaborated by pulsed electrodeposition current on Ti6Al4V substrate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 22(4), 753–761. <http://doi.org/10.1007/s10856-011-4251-5>
- Fornell, J., Feng, Y. P., Pellicer, E., Suriñach, S., Baró, M. D., & Sort, J. (2017). Mechanical behaviour of brushite and hydroxyapatite coatings electrodeposited on newly developed FeMnSiPd alloys. *Journal of Alloys and Compounds*, 729, 231–239. <http://doi.org/10.1016/j.jallcom.2017.09.187>
- Frandsen, C. J., Brammer, K. S., Noh, K., Johnston, G., & Jin, S. (2014). Tantalum coating on TiO₂ nanotubes induces superior rate of matrix mineralization and osteofunctionality in human osteoblasts. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 37, 332–41. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2014.01.014>
- Geetha, M., Singh, A. K., Asokamani, R., & Gogia, A. K. (2009). Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review. *Progress in Materials Science*, 54(3), 397–425. <http://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2008.06.004>
- Geng, Z., Cui, Z., Li, Z., Zhu, S., Liang, Y., Liu, Y., ... Yang, X. (2016). Strontium incorporation to optimize the antibacterial and biological characteristics of silver-substituted hydroxyapatite coating. *Materials Science and Engineering C*, 58, 467–477.

<http://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.061>

Geng, Z., Wang, R., Zhuo, X., Li, Z., Huang, Y., Ma, L., ... Yang, X. (2017). Incorporation of silver and strontium in hydroxyapatite coating on titanium surface for enhanced antibacterial and biological properties. *Materials Science and Engineering C*, 71, 852–861.

<http://doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.079>

Ghiazza, M., Vietti, G., & Fenoglio, I. (2014). *Carbon nanotubes: properties, applications, and toxicity*. (K. P. and H. Z. . Njuguna, Ed.) *Health and environmental safety of nanomaterials: Polymer nanocomposites and other materials containing nanoparticles* (Woodhead). Elsevier. <http://doi.org/10.1533/9780857096678.3.147>

Gil, F., & Planell, J. (1993). Aplicaciones biomédicas del titanio v sus aleaciones. *Biomecánica*, 1, 34–42. Retrieved from <http://upcommons.upc.edu/handle/2099/6814>

Gopi, D., Indira, J., & Kavitha, L. (2012). A comparative study on the direct and pulsed current electrodeposition of hydroxyapatite coatings on surgical grade stainless steel. *Surface and Coatings Technology*, 206(11–12), 2859–2869. <http://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2011.12.011>

Gopi, D., Shinyjoy, E., Sekar, M., Surendiran, M., Kavitha, L., & Sampath Kumar, T. S. (2013). Development of carbon nanotubes reinforced hydroxyapatite composite coatings on titanium by electrodeposition method. *Corrosion Science*, 73, 321–330. <http://doi.org/10.1016/j.corsci.2013.04.021>

Goyanes, S., Rubiolo, G. R., Salazar, A., Jimeno, A., Corcuera, M. A., & Mondragon, I. (2007). Carboxylation treatment of multiwalled carbon nanotubes monitored by infrared and ultraviolet spectroscopies and scanning probe microscopy. *Diamond and Related Materials*, 16(2), 412–417. <http://doi.org/10.1016/j.diamond.2006.08.021>

Grosogeat, B., Boinet, M., Dalard, F., & Lissac, M. (2004). Electrochemical studies of the

corrosion behaviour of titanium and the Ti – 6Al – 4V alloy using electrochemical impedance spectroscopy. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 14, 323–331.

Guldi, Dirk M; Martin, N. (2010). *Carbon Nanotubes and Related Structures: Synthesis, Characterization, Functionalization, and Applications*. Wiley-VCH.
<http://doi.org/10.1002/9783527629930>

Harris, D. A., Fong, A. J., Buchanan, E. P., Monson, L., Khechoyan, D., & Lam, S. (2014). History of synthetic materials in alloplastic cranioplasty. *Neurosurgical Focus*, 36(4), E20.
<http://doi.org/10.3171/2014.2.FOCUS13560>

Harun, W. S. W., Asri, R. I. M., Alias, J., Zulkifli, F. H., Kadirgama, K., Ghani, S. A. C., & Shariffuddin, J. H. M. (2018). A comprehensive review of hydroxyapatite-based coatings adhesion on metallic biomaterials. *Ceramics International*, 44(2), 1250–1268.
<http://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.10.162>

He, D. H., Wang, P., Liu, P., Liu, X. K., Ma, F. C., & Zhao, J. (2016). HA coating fabricated by electrochemical deposition on modified Ti6Al4V alloy. *Surface and Coatings Technology*, 301, 6–12. <http://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2016.07.005>

He, H., Pham-Huy, L. A., Dramou, P., Xiao, D., Zuo, P., & Pham-Huy, C. (2013). Carbon Nanotubes : Applications in Pharmacy and Medicine. *BioMed Research International*, 2013, 1–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24195076>

Hee, A. C., Cao, H., Zhao, Y., Jamali, S. S., Bendavid, A., & Martin, P. J. (2018). Cytocompatible tantalum films on Ti6Al4V substrate by filtered cathodic vacuum arc deposition. *Bioelectrochemistry*, 122, 32–39. <http://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.02.006>

Hench, L. L., Jones, J. R., & Institute of Materials, M. (2005). *Biomaterials, artificial organs and tissue engineering* (Woodhead P). CRC Press.

- Huang, C. H., Chen, R. S., & Yoshimura, M. (2017). Direct bioactive ceramics coating via reactive Growing Integration Layer method on α -Ti-alloy. *Materials Science and Engineering C*, 76, 1216–1223. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.182>
- Huang, S., Zhou, K., Huang, B., Li, Z., Zhu, S., & Wang, G. (2008). Preparation of an electrodeposited hydroxyapatite coating on titanium substrate suitable for in-vivo applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(1), 437–442. <http://doi.org/10.1007/s10856-006-0104-z>
- Huang, Y., Qiao, H., Nian, X., Zhang, X., Zhang, X., Song, G., ... Han, S. (2016). Improving the bioactivity and corrosion resistance properties of electrodeposited hydroxyapatite coating by dual doping of bivalent strontium and manganese ion. *Surface and Coatings Technology*, 291, 205–215. <http://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2016.02.042>
- Huang, Y., Zhang, H., Qiao, H., Nian, X., Zhang, X., Wang, W., ... Pang, X. (2015). Anticorrosive effects and in vitro cytocompatibility of calcium silicate/zinc-doped hydroxyapatite composite coatings on titanium. *Applied Surface Science*, 357, 1776–1784. <http://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.10.034>
- Huang, Y., Zhang, X., Zhang, H., Qiao, H., Zhang, X., Jia, T., ... Yang, H. (2017). Fabrication of silver- and strontium-doped hydroxyapatite/TiO₂nanotube bilayer coatings for enhancing bactericidal effect and osteoinductivity. *Ceramics International*, 43(1), 992–1007. <http://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.10.031>
- Iijima, S. (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature, Published*, 354(6348), 56–58. <http://doi.org/10.1038/354056A0>
- Jain, A. K., Dubey, V., Mehra, N. K., Lodhi, N., Nahar, M., Mishra, D. K., & Jain, N. K. (2009). Carbohydrate-conjugated multiwalled carbon nanotubes: development and characterization.

Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 5(4), 432–442.
<http://doi.org/10.1016/j.nano.2009.03.001>

Kalantari, S. M., Arabi, H., Mirdamadi, S., & Mirsalehi, S. A. (2015). Biocompatibility and compressive properties of Ti-6Al-4V scaffolds having Mg element. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 48, 183–191.
<http://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.04.015>

Kasper, C., Witte, F., & Pörtne, R. (2012). *Tissue Engineering III: Cell–Surface Interactions for Tissue Culture*. Springer.

Keselowsky, B. G., Collard, D. M., & García, A. J. (2003). Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 66A(2), 247–259.
<http://doi.org/10.1002/jbm.a.10537>

Khanal, S. P. P., Mahfuz, H., Rondinone, A. J. J., & Leventouri, T. (2016). Improvement of the fracture toughness of hydroxyapatite (HAp) by incorporation of carboxyl functionalized single walled carbon nanotubes (CfSWCNTs) and nylon. *Materials Science and Engineering C*, 60, 204–210. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2015.11.030>

Kim, S. H., Ha, H. J., Ko, Y. K., Yoon, S. J., Rhee, J. M., Kim, M. S., ... Khang, G. (2007). Correlation of proliferation, morphology and biological responses of fibroblasts on LDPE with different surface wettability. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 18(5), 609–622. <http://doi.org/10.1163/156856207780852514>

Kim, S. young, Kim, Y. kyoung, Park, I. song, Jin, G. chun, Bae, T. sung, & Lee, M. ho. (2014). Effect of alkali and heat treatments for bioactivity of TiO₂ nanotubes. *Applied Surface Science*, 321, 412–419. <http://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.09.177>

- Kuo, M. C., & Yen, S. K. (2002). The process of electrochemical deposited hydroxyapatite coatings on biomedical titanium at room temperature. *Materials Science and Engineering C*, 20(1–2), 153–160. [http://doi.org/10.1016/S0928-4931\(02\)00026-7](http://doi.org/10.1016/S0928-4931(02)00026-7)
- Lane, A. w. (1895). SOME REMARKS ON THE TREATMENT OF FRACTURES. *British Medical Journal*, 1, 861–863.
- Lee, G. W., Kim, J., Yoon, J., Bae, J. S., Shin, B. C., Kim, I. S., ... Ree, M. (2008). Structural characterization of carboxylated multi-walled carbon nanotubes. *Thin Solid Films*, 516(17), 5781–5784. <http://doi.org/10.1016/j.tsf.2007.10.071>
- Lee, W. K., Lee, S. M., & Kim, H. M. (2009). Effect of surface morphology of calcium phosphate on osteoblast-like HOS cell responses. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 15(5), 677–682. <http://doi.org/10.1016/j.jiec.2009.09.044>
- Liu, S., Li, H., Su, Y., Guo, Q., & Zhang, L. (2017). Preparation and properties of in-situ growth of carbon nanotubes reinforced hydroxyapatite coating for carbon/carbon composites. *Materials Science and Engineering: C*, 70, 805–811. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.060>
- Meejoo, S., Maneepakorn, W., & Winotai, P. (2006). Phase and thermal stability of nanocrystalline hydroxyapatite prepared via microwave heating. *Thermochimica Acta*, 447(1), 115–120. <http://doi.org/10.1016/j.tca.2006.04.013>
- Meirelles, L., Currie, F., Jacobsson, M., Albrektsson, T., & Wennerberg, A. (2008). The effect of chemical and nanotopographical modifications on the early stages of osseointegration. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 23(4), 641–647. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-50849138836&partnerID=tZOtx3y1>
- Meshkini, A., & Oveisi, H. (2017). Methotrexate-F127 conjugated mesoporous zinc

- hydroxyapatite as an efficient drug delivery system for overcoming chemotherapy resistance in osteosarcoma cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 158, 319–330. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.07.006>
- Metoki, N., Rosa, C. M. R., Zanin, H., Marciano, F. R., Eliaz, N., & Lobo, A. O. (2016). Surface & Coatings Technology Electrodeposition and biomineralization of nano- β -tricalcium phosphate on graphenated carbon nanotubes. *Surface & Coatings Technology*, 297, 51–57. <http://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2016.04.035>
- Mohajernia, S., Pour-Ali, S., Hejazi, S., Saremi, M., & Kiani-Rashid, A. R. (2018). Hydroxyapatite coating containing multi-walled carbon nanotubes on AZ31 magnesium: Mechanical-electrochemical degradation in a physiological environment. *Ceramics International*, in *Press*(January), 0–1. <http://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.02.015>
- Mokabber, T., Lu, L. Q., van Rijn, P., Vakis, A. I., & Pei, Y. T. (2018). Crystal growth mechanism of calcium phosphate coatings on titanium by electrochemical deposition. *Surface and Coatings Technology*, 334(December 2017), 526–535. <http://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2017.12.011>
- Nakamura, M., Hori, N., Ando, H., Namba, S., Toyama, T., Nishimiya, N., & Yamashita, K. (2016). Surface free energy predominates in cell adhesion to hydroxyapatite through wettability. *Materials Science and Engineering C*, 62, 283–292. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2016.01.037>
- Navarro, M. E. (2005). *Desarrollo y Caracterización de Materiales Biodegradables para Regeneración Ósea*. Universitat Politècnica de Catalunya.
- Neelgund, G. M., & Oki, A. R. (2016). Influence of carbon nanotubes and graphene nanosheets on photothermal effect of hydroxyapatite. *Journal of Colloid and Interface Science*, 484, 135–

145. <http://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.07.078>

Oyefusi, A., Olanipekun, O., Neelgund, G. M., Peterson, D., Stone, J. M., Williams, E., ... Oki, A. (2014). Hydroxyapatite grafted carbon nanotubes and graphene nanosheets: Promising bone implant materials. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 132, 410–416. <http://doi.org/DOI 10.1016/j.saa.2014.04.004>

Park, J., & Lakes, R. S. (2007). *Biomaterials*.

Pei, X., Zeng, Y., He, R., Li, Z., Tian, L., Wang, J., ... Bao, H. (2014). Single-walled carbon nanotubes/hydroxyapatite coatings on titanium obtained by electrochemical deposition. *Applied Surface Science*, 295, 71–80. <http://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.01.009>

Pulyala, P., Singh, A., Dias-Netipanyj, M. F., Cogo, S. C., Santos, L. S., Soares, P., ... Popat, K. C. (2017). In-vitro cell adhesion and proliferation of adipose derived stem cell on hydroxyapatite composite surfaces. *Materials Science and Engineering C*, 75, 1305–1316. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.175>

Raynaud, S., Champion, E., Bernache-Assollant, D., & Thomas, P. (2002). Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders. *Biomaterials*, 23(4), 1065–1072. [http://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00218-6](http://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00218-6)

Rodríguez-González, F. Á. (2009). Introduction to Biomaterials in Orthopaedic Surgery. In ASM International (Ed.), *Biomaterials In Orthopaedic Surgery* (pp. 1–10). Retrieved from <http://books.google.com/books?id=dM6mOr2IUdUC&pgis=1>

Saini, M. (2015). Implant biomaterials: A comprehensive review. *World Journal of Clinical Cases*, 3(1), 52. <http://doi.org/10.12998/wjcc.v3.i1.52>

Saremi, M., & Golshan, B. M. (2006). ELECTRODEPOSITION OF NANO SIZE HYDROXYAPATITE COATING ON Ti ALLOY. *Iranian Journal of Materials Science and*

Engineering, 3(3), 1–5.

- Seyedraoufi, Z. S., Mirdamadi, S., & Rastegari, S. (2014). Electrodeposition of Nano Hydroxyapatite Coating on Biodegradable Mg-Zn Scaffold (TECHNICAL NOTE). *International Journal of Engineering*, 27(6 (C)), 939–944. <http://doi.org/10.5829/idosi.ije.2014.27.06c.12>
- Stango, S. A. X., Karthick, D., Swaroop, S., Mudali, U. K., & Vijayalakshmi, U. (2018). Development of hydroxyapatite coatings on laser textured 316 LSS and Ti-6Al-4V and its electrochemical behavior in SBF solution for orthopedic applications. *Ceramics International*, 44(3), 3149–3160. <http://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.11.083>
- Szcześ, A., Hołysz, L., & Chibowski, E. (2017). Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 249(April), 321–330. <http://doi.org/10.1016/j.cis.2017.04.007>
- Tasis, D., Tagmatarchis, N., Alberto Bianco, A., & Maurizio Prato. (2006). Chemistry of Carbon Nanotubes. *Chemical Reviews*, 106(3), 1105–1136. <http://doi.org/10.1021/CR050569O>
- Xu, J., Butler, I. S., & Gilson, D. F. R. (1999). FT-Raman and high-pressure infrared spectroscopic studies of dicalcium phosphate dihydrate (CaHPO₄·2H₂O) and anhydrous dicalcium phosphate (CaHPO₄). *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 55(14), 2801–2809. [http://doi.org/10.1016/S1386-1425\(99\)00090-6](http://doi.org/10.1016/S1386-1425(99)00090-6)
- Xu, J. L., Khor, K. A., Sui, J. J., & Chen, W. N. (2009). Preparation and characterization of a novel hydroxyapatite / carbon nanotubes composite and its interaction with osteoblast-like cells. *Materials Science & Engineering C*, 29(1), 44–49. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2008.05.009>
- Xu, L. C., & Siedlecki, C. A. (2007). Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials*, 28(22), 3273–3283.

<http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.03.032>

Yu, Y.-D., Zhu, Y.-J., Qi, C., & Wu, J. (2017). Hydroxyapatite nanorod-assembled hierarchical microflowers: rapid synthesis via microwave hydrothermal transformation of CaHPO₄ and their application in protein/drug delivery. *Ceramics International*, 43(8), 6511–6518.

<http://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.02.073>

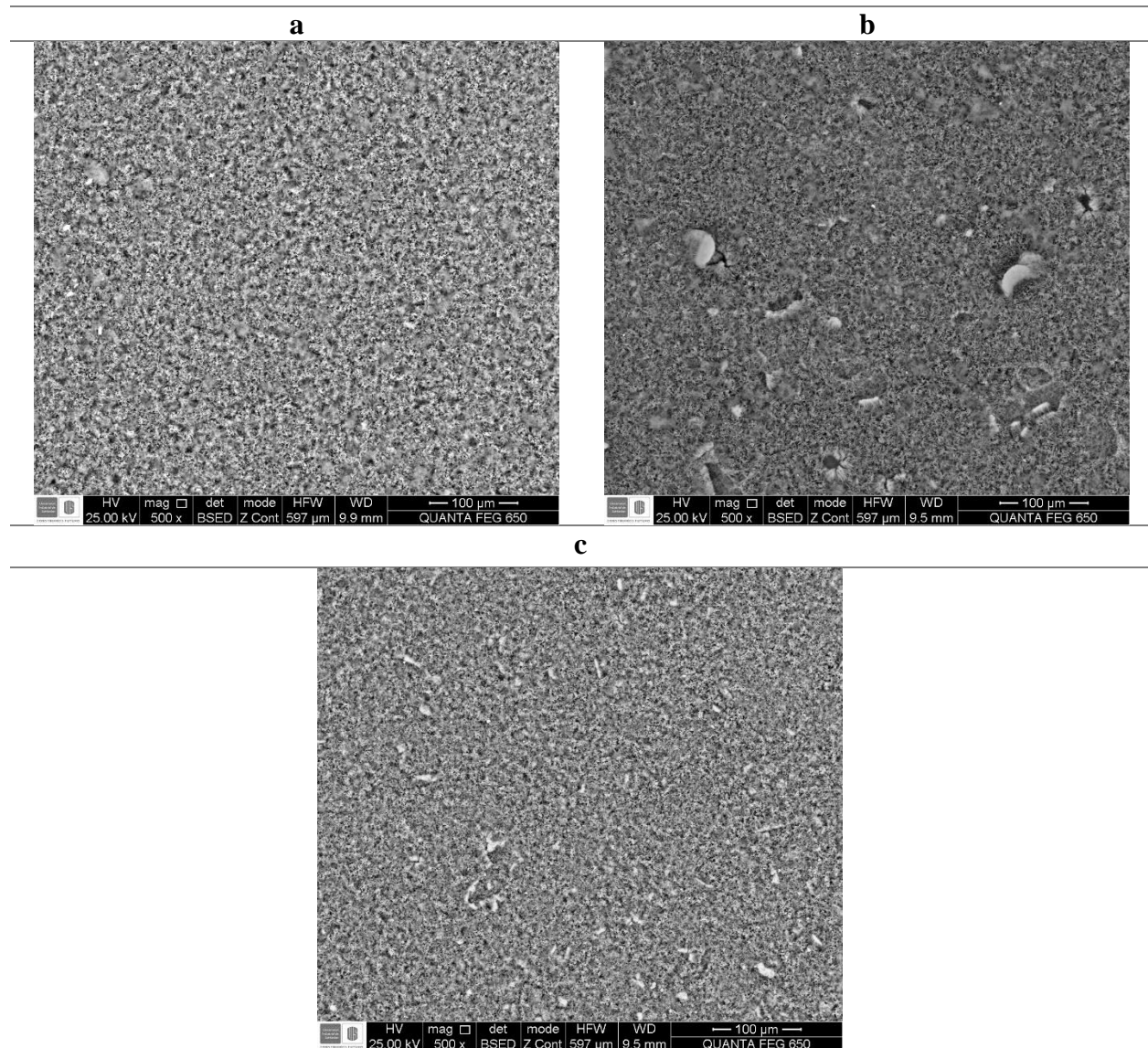
Zanin, H., Rosa, C. M. R., Eliaz, N., May, P. W., Marciano, F. R., & Lobo, A. O. (2015). Assisted deposition of nano-hydroxyapatite onto exfoliated carbon nanotube oxide scaffolds.

Nanoscale, 7(22), 10218–10232. <http://doi.org/10.1039/C4NR07317G>

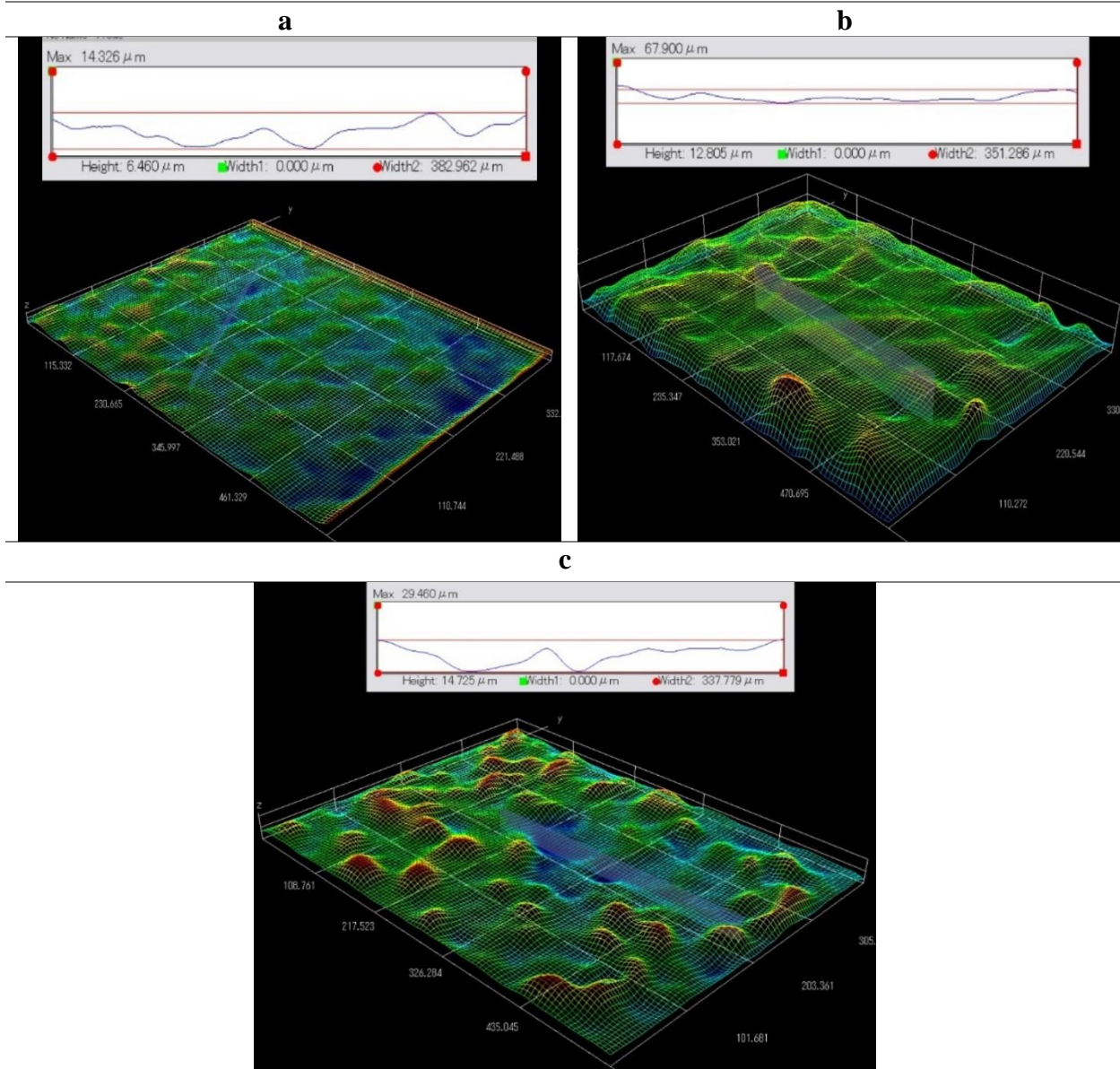
Zhong, Z., Qin, J., & Ma, J. (2015). Electrophoretic deposition of biomimetic zinc substituted hydroxyapatite coatings with chitosan and carbon nanotubes on titanium. *Ceramics International*, 41(7), 8878–8884. <http://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.03.145>

Apéndices

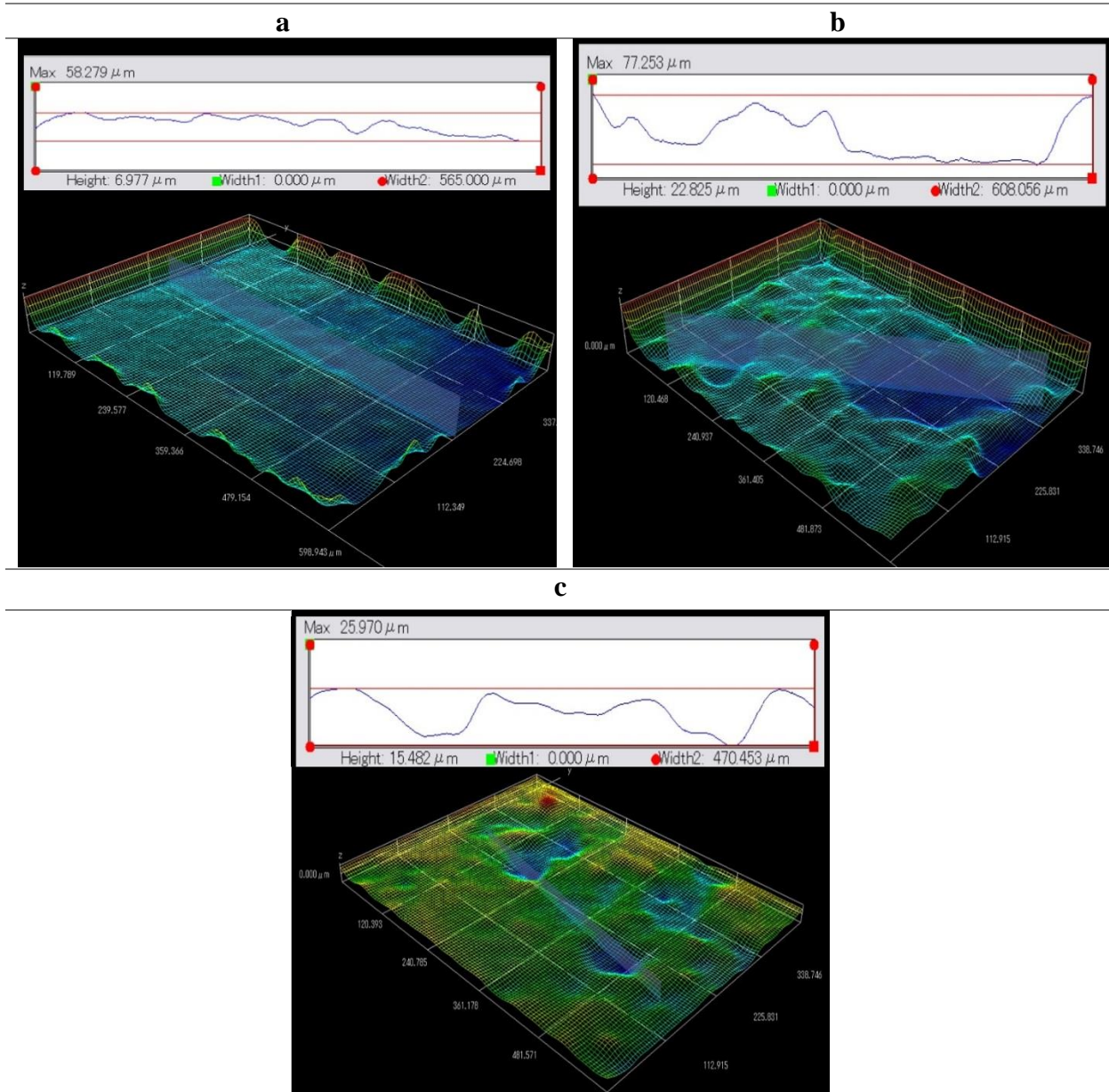
Apéndice A. Imágenes SEM de los depósitos de hidroxiapatita con diferentes concentraciones de MWCNT a) 0.1 g/L MWCNT, b) 0.5 g/L MWCNT y c) 1 g/L MWCNT a 500x.



Apéndice B. Imágenes de microscopía confocal (3D) de los depósitos a pH 4,5 con diferente relación de pulsos. $t_{on}/t_{off}=30s/15s$ (b) $t_{on}/t_{off} = 60s/30s$ (c) $t_{on}/t_{off} = 120s/60s$.



Apéndice C. Imágenes de microscopía confocal (3D) de los depósitos a pH 6 con diferente relación de pulsos. (a) $t_{on}/t_{off}=30s/15s$ (b) $t_{on}/t_{off}=60s/30s$ (c) $t_{on}/t_{off}=120s/60s$.



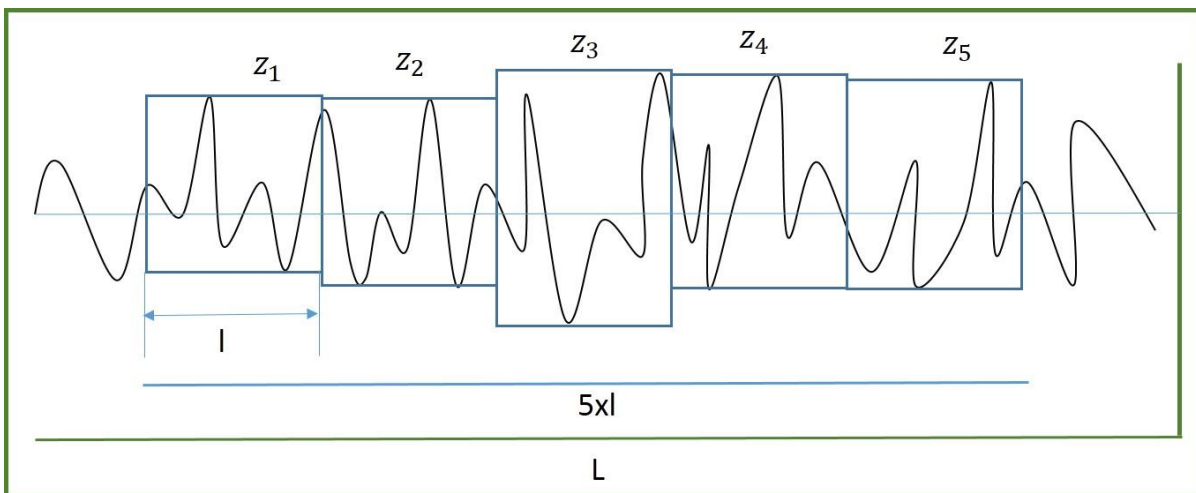
Apéndice D. Medición de rugosidad media.

De acuerdo con la Norma Din 4768, se hallaron los valores de Rugosidad media en base a la variación en la altura de la rugosidad registrada por el microscopio confocal Hirox KH 7700, dividiendo la longitud total de medición en cinco secciones registrando la variación en la altura.

Rugosidad Media: Es la media aritmética de los valores de rugosidad parcial Z_i correspondientes a cada uno de los cinco módulos de la longitud de medición.

$$R_z = \frac{1}{5}(z_1 + z_2 + z_3 + z_4 + z_5)$$

Esquema representativo de las mediciones de Z_i para un perfil de rugosidad.



Apéndice E. Ecuación de Butler Volmer y Nernst Plank

Ecuación de Butler-Volmer

$$i_{reacción} = \left[\exp \left(-\beta \frac{ZF}{RT} n_{reacción} \right) - \exp \left((1 - \beta) \frac{ZF}{RT} n_{reacción} \right) \right]$$

$i_{reacción}$: Corriente anódica o catódica

β : coeficiente de simetría o barrera de transferencia de carga para la reacción anódica o catódica, usualmente cercano a 0.5

F: constante de Faraday

n: sobrepotencial aplicado

R: constante de los gases

T: temperatura absoluta

Z: número de electrones involucrados en la reacción

Ecuación de Nernst Plank

$$J(x) = -D_i \frac{dC_i(x)}{dx} - \frac{z_i F}{RT} D_i C_i \frac{Q(x)}{dx} + C_i V(x)$$

D_i : Coeficiente de Difusión

$\frac{dC_i(x)}{dx}$: Gradiente de concentración

$\frac{Q(x)}{dx}$: Gradiente de potencial

C: concentración

V(x): velocidad en dirección x

Z_i : carga

F: constante de Faraday

R: constante de los gases

T: temperatura absoluta