Recubrimientos de cerámicos cálcicos, policaprolactona y colágeno reforzados con nanotubos de carbono multipared para uso en ortopedia

Nerly Deyanira Montañez Supelano

Ing. Química. Magíster en Ingeniería de Materiales

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

Directores:

Darío Yesid Peña Ballesteros

PhD en Corrosión

Sandra Judith García Vergara

PhD en Corrosión

Codirector:

Hugo Armando Estupiñán Durán

Doctor en Ingeniería Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas

Escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de los Materiales

Doctorado en Ingeniería de Materiales

Bucaramanga

2020

Dedicatoria

A Dios, por guiar mi vida y regalarme tantas bendiciones.

A mi hermosa familia, sin ellos, esto no hubiera sido posible. A ti Juan Pablo, por todo tu apoyo y amor y a mi más grande motor, a ti hijo adorado Juan Felipe, por entender siempre a mamá y ser ese hijo maravilloso, mi regalo de Dios.

A mis queridos padres, Josefa y Carlos, a quienes les debo todo quien soy.

A mis hermanas, que siempre me hacen sentir valorada y amada.

A mi madrina Elena, por su apoyo incondicional.

¡Gracias!

Agradecimientos

Expreso mis sinceros agradecimientos a:

PhD Darío Yesid Peña Ballesteros, por darme la oportunidad de seguir siendo parte del Grupo de Investigaciones en Corrosión (GIC) y por su apoyo incondicional.

PhD Sandra Judith García Vergara, por brindarme toda su colaboración en el desarrollo de esta investigación.

Al Doctor Hugo Armando Estupiñan Durán, por abrirme el espacio en su laboratorio y por su valiosa colaboración, así mismo, quiero dar mis agradecimientos a los estudiantes del Laboratorio de Biomateriales de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, especialmente a Sara, Benjamín, James y demás compañeros que me trataron como una compañera más, siempre con la mejor disposición.

Un especial agradecimiento a la PhD Patricia Escobar y al estudiante de Doctorado Heider Carreño del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales CINTROP, por su valiosa colaboración, porque siempre tuvieron una sonrisa y una mano amiga. Por compartir sus conocimientos, algo invaluable.

A mis estudiantes, de quienes también aprendí y a mis compañeros del GIC, que hicieron más ameno mi paso por el GIC.

A los laboratorios: LEAM (Grupo de Espectroscopía Atómica y Molecular), especialmente al profesor Rafael Cabanzo, Ximena y David por su importante apoyo, al Grupo de Investigacion en Fisicoquímica Teórica y Experimental (GIFTEX), especialmente a Manuel, al laboratorio de Difracción de Rayos X y al Centro de Investigación en Catálisis (CICAT).

PhD Jose Luis Endrino, del Instituto de Ingeniería de Superficies y Precision – Cranfield University, por brindarme una enriquecedora estadía y darme la oportunidad de trabajar en su Grupo.

Por último, a mi alma máter, la Universidad Industrial de Santander, a la Escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de los Materiales y a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión por su apoyo en los diferentes eventos académicos.

Tabla de Contenido

Introducción 26

1 Fundamentos teóricos y estado del arte 32

1.1 Biomateriales e interacción 32

1.1.1 Biomaterial 32

1.1.2 Biocompatibilidad 32

1.1.3 Bioactividad 33

1.1.4 Osteoconducción y Osteoinducción 33

1.1.5 Osteogénesis y osteointegración 34

1.2 Tejido óseo 34

1.3 Propiedades eléctricas de sistemas biológicos 35

1.3.1 Conductividad y permitividad 35

1.3.2 Piezoelectricidad 37

1.4 Titanio y sus aleaciones 39

1.5 Polímeros biocompatibles 41

1.5.1 Policaprolactona (PCL) 42

1.5.2 Colágeno 43

1.6 Cerámicas bioactivas 43

1.7 Nanotubos de carbono 47

1.7.1 Descripción 47

1.7.2 Síntesis 50

1.7.3 Propiedades 52

1.7.4 Toxicidad y purificación 53

1.7.5 Funcionalización 54

1.8 Nanotubos de carbono en materiales compuestos y su aplicación en biomateriales 59

1.9 Métodos electroquímicos, microbalanza de cristal de cuarzo y piezorespuesta de fuerza atómica en la evaluación de biomateriales.....64

2 Objetivos e hipótesis..... 71

2.1 Objetivo general.....71

2.2 Objetivos específicos 71

2.3 Hipótesis… 72

3 Síntesis y caracterización de cerámicos cálcicos provenientes de otolitos de la especie Plagioscion Squamosissimus 73

3.1 Introducción 73

3.2 Metodología 75

3.3 Resultados……79

3.3.1 Caracterización de otolitos de Plagioscion Squamosissimus..... 79

3.3.2 Síntesis y caracterización de fosfatos de calcio tipo hidroxiapatita y β-fosfato tricálcico .. 88

3.4 Conclusiones 95

4 Recubrimientos de cerámicos cálcicos reforzados con NTC multipared funcionalizados 96

4.1 Introducción 96

4.2 Metodología 98

4.2.1 Purificación de nanotubos de carbono multipared por ruta ácida..... 98

4.2.2 Funcionalización y caracterización de nanotubos de carbono multipared/fosfatos de calcio de otolitos de pez (NTC/FC)..... 100

4.2.3 Síntesis y caracterización química de recubrimientos de compuestos cálcicos reforzados con NTC..... 102

4.2.4 Ensayo de scratch test en los recubrimientos FC/NTC..... 102

4.3 Resultados……..103

4.3.1 Caracterización de nanotubos de carbono multipared expuestos a tratamientos de purificación 103

4.3.2 Evaluación de la funcionalización de nanotubos de carbono multipared/fosfatos de calcio de otolitos de pez (NTC/FC)..... 110

4.3.3 Síntesis y caracterización química de recubrimientos de compuestos cálcicos reforzados con NTC..... 119

4.3.4 Evaluación de la adherencia recubrimiento-sustrato por Scratch test 130

4.4 Conclusiones 134

5 Películas delgadas poliméricas reforzadas con NTC multipared funcionalizados con compuestos cálcicos 136

5.1 Introducción 136

5.2 Metodología 139

5.2.1 Síntesis y caracterización de películas delgadas poliméricas reforzadas con NTC 139

5.2.2 Síntesis y caracterización de películas delgadas poliméricas reforzadas con FC/NTC 141

5.2.3 Ensayo de scratch test de PCL/NTC, PCL/FC/NTC, COL/NTC, COL/FC/NTC 142

5.3 Resultados. 142

5.3.1 Evaluación química y morfológica de películas delgadas poliméricas reforzadas con NTC 142

5.3.2 Evaluación química y morfológica de películas delgadas poliméricas reforzadas con FC/NTC 154

5.3.3 Adherencia de las películas de PCL/NTC, PCL/FC/NTC, COL/NTC y COL/FC/NTC ... 157

5.4 Conclusiones 160

6 Características eléctricas y topográficas de recubrimientos de cerámicos cálcicos, policaprolactona y colágeno reforzado con NTC multipared 162

6.1 Introducción 162

6.2 Metodología 165

6.3 Resultados. 166

6.3.1 Potencial de superficie local y rugosidad de recubrimientos cerámicos y poliméricos modificados con NTC 166

6.3.2 Piezorespuesta de fuerza atómica de recubrimientos cerámicos y poliméricos modificados con NTC 173

6.4 Conclusiones 182

7 Evaluación EQCM de recubrimientos de cerámicos cálcicos, policaprolactona y colágeno, reforzados con NTC multipared 183

7.1 Introducción 183

7.2 Metodología 185

7.3 Resultados……..190

7.3.1 Evaluación microgravimétrica de FC, PCL y COL con y sin NTC multipared 190

7.3.2 Evaluación electroquímica de FC, PCL y COL con y sin NTC multipared 199

7.4 Conclusiones 212

8 Biocompatibilidad de recubrimientos de cerámicos cálcicos, policaprolactona y colágeno, reforzados con NTC multipared 213

8.1 Introducción 213

8.2 Metodología 220

8.2.1 Materiales..... 220

8.2.2 Cultivo celular..... 220

8.2.3 Pruebas de toxicidad 221

8.2.4 Determinación de fosfatasa alcalina 222

8.2.5 Adhesión y morfología celular..... 223

8.2.6 Análisis estadístico..... 224

8.3 Resultados……..224

8.3.1 Toxicidad de los recubrimientos FC/NTC, PCL/NTC, PCL/FC/NTC, COL/NTC y COL/FC/NTC 224

8.3.2 Medición de fosfatasa alcalina en recubrimientos FC/NTC, PCL/NTC, PCL/FC/NTC, COL/NTC y COL/FC/NTC con células HOS 231

8.3.3 Adhesión de células HOS por fluorescencia y SEM en recubrimientos FC/NTC, PCL/NTC, PCL/FC/NTC, COL/NTC y COL/FC/NTC 236

8.4 Conclusiones 260

9 Conclusiones generales 262

10 Recomendaciones 266

11 Apropiación social del conocimiento 268

Referencias Bibliográficas 271

Apéndices 317

Lista de Tablas

Tabla 1. *Requerimientos químicos de la aleación Ti6Al4V.* 40

Tabla 2. *ASTM relacionadas con titanio y sus aleaciones para implantes quirúrgicos.* 40

Tabla 3. Análisis cuantificable por el método Rietveld para los fosfatos de calcio obtenidos a partir de otolitos 90

Tabla 4. Intensidades en Raman para NTC prístinos y con los tratamientos ácidos. 105

Tabla 5. Números de onda (cm^{-1}) y sus asignaciones FTIR para los recubrimientos de FC/NTC. 122

Tabla 6. Números de onda IR para recubrimientos de PCL NTC. 144

Tabla 7. *Potenciales de superficie local medio y rugosidades Ra de los recubrimientos cerámicos y poliméricos.* 172

Tabla 8. *Coeficientes piezoeléctricos de Ti6Al4V y recubrimientos cerámicos y poliméricos.*. 179

Tabla 9. *Tangente de pérdida de los recubrimientos cerámicos y poliméricos a 0h, 24h y 48h de cultivo celular.* 199

Tabla 10. *Picos de corriente y voltaje para los diferentes sistemas recubrimientos – células HOS a 48 h de cultivo celular*..... 211

Tabla 11. *Etapas del proceso de adhesión celular in vitro*..... 217

Tabla 12. *Tipos de superficies expuestas a los ensayos in vitro.* 221

Lista de Figuras

Figura 1. *Cráneo de peces óseos con locación de los otolitos.* 46

Figura 2. *Estructuras de NTC de pared simple y de paredes múltiples de tipo concéntrico.*..... 49

Figura 3. *Estructuras de nanotubo de carbono (a) sillón, (b) zig-zag, (c) quiral.* 50

Figura 4. *Diferentes cadenas de polímeros sobre SWNT.* 57

Figura 5. *Espectro de permitividad y conductividad en sistemas biológicos.* 65

Figura 6. Configuración esquemática para PFM. 69

Figura 7. Otolito de la especie Plagioscion Squamosissimus, (a) completo, (b) sección transversal. 76

Figura 8. *Patrón de difracción de polvo de otolitos de pez.* 79

Figura 9. *Espectro Raman de polvo de otolitos de pez.* 81

Figura 10. *Micrografía SEM de otolito de pez OTH1. a) zona blanca, b) zona translúcida* 82

Figura 11. Micrografía SEM de otolito de pez OTH2. a) zona blanca, b) zona translúcida 82

Figura 12. *Mapeo micro Raman en la interfase (a) blanco-opaco y (b) blanco-translúcido en OTH1*..... 84

Figura 13. *Mapeo micro Raman en la interfase (a) blanco-opaco y (b) blanco-translúcido en OTH2*..... 85

Figura 14. *(a) Micrografía Raman con imagen superpuesta y (b) ER en la interfase blanco-opaco OTH1*..... 86

Figura 15. *(a) Micrografía Raman con imagen superpuesta y (b) ER en la interfase blanco – translúcido OTH1* 86

Figura 16. *(a) Micrografía Raman con imagen superpuesta y (b) ER en la interfase blanco – opaco OTH2* 87

Figura 17. *(a) Micrografía Raman con imagen superpuesta y (b) ER en la interfase blanco – translúcido OTH2* 87

Figura 18. Patrón de difracción de fosfato de calcio derivado de otolito de pez a diferentes pH 89

Figura 19. Espectro FTIR de fosfatos de calcio sintetizados a partir de otolitos a diferentes pH y tiempos de precipitación 91

Figura 20. Espectro Raman de fosfatos de calcio sintetizados a partir de otolito a diferentes pH y tiempos de precipitación, a) espectro completo, b) espectro de $PO43 - \nu 1$ y c) espectro de $PO43 - \nu 4$ 92

Figura 21. *Micrografías SEM de fosfatos de calcio sintetizados para 48 h a (a) pH 4, (b) pH 5 y (c) pH 6.* 93

Figura 22. *Micrografías SEM de fosfatos de calcio sintetizados para 96 h a (a) pH 5, (b) pH 6, (c) pH 8, (d) pH 10 y (e) mapeo químico para fosfato de calcio sintetizado a pH 10*..... 94

Figura 23. Montaje experimental para la purificación de NTC. 100

Figura 24. (a) Espectro Raman y tratamiento de deconvolución para NTC multipared prístinos, (b) Espectro Raman para NTC multipared prístinos y los tratamientos de purificación. 104

Figura 25. (a) Termogravimetría y (b) derivada de la pérdida de peso de NTC prístinos y los diferentes tratamientos de purificación. 106

Figura 26. Micrografías SEM de NTC, (a, a') NTC prístinos 107

Figura 27. Micrografías SEM de NTC, (a, a') NTC con tratamiento 1, (b, b') NTC con tratamiento 2 y (c, c') NTC con tratamiento 3 108

Figura 28. Porcentaje en peso elemental para NTC sin y con tratamientos encontrado por EDS 109

Figura 29. *Espectro FTIR de polvos de FC/NTC con diferentes concentraciones de nanotubos de carbono multipared, obtenidos por el método de precipitación acuosa, a) espectro completo, b) y c) espectro en el número de onda de 1200 a 900 y 1500 a 1300 cm^{-1}* 112

Figura 30. *Espectro Raman de polvos de FC/NTC con diferentes concentraciones de nanotubos de carbono multipared, obtenidos por el método de precipitación acuosa*..... 114

Figura 31. *Micrografías SEM de polvos de fosfatos de calcio sin presencia de NTC*..... 116

Figura 32. *Micrografías SEM de polvos de fosfatos de calcio y NTC (a, a') 0.5 g/L NTC, (b, b') 1.0 g/L NTC, y (c, c') 1.5 g/L NTC* 117

Figura 33. *Micrografías TEM de fosfatos de calcio y nanotubos de carbono multipared (a) NTC con el tratamiento de purificación 1 (b, b') 0.5 g/L de NTC y (c, c') 1.0 g/L de NTC* 118

Figura 34. *(a) Voltamperometría cíclica de Ti6Al4V en una solución de $Ca(OH)_2$ y H_3PO_4 con 0.5 g/L de NTC a pH 4 y (b) curva cronoamperométrica de recubrimientos de FC/NTC a diferentes concentraciones de NTC.* 120

Figura 35. *Espectro FTIR de recubrimientos de FC/NTC con diferentes concentraciones de nanotubos de carbono multipared.* 121

Figura 36. *Espectro Raman de recubrimientos de FC/NTC con diferentes concentraciones de nanotubos de carbono multipared.* 124

Figura 37. *Micrografia y espectro micro-Raman de recubrimientos (a, a') FC NTC 0.0 g/L, (b, b') FC NTC 0.5 g/L, (c, c') FC NTC 1.0 g/L y (d, d') FC NTC 1.5 g/L* 125

Figura 38. *Difractograma de recubrimientos de FC/NTC con diferentes concentraciones de nanotubos de carbono multipared.* 127

Figura 39. *Micrografías SEM y mapeo químico de recubrimientos (a, a') FC/NTC 0.0 g/L, (b, b') FC/NTC 0.5 g/L, (c, c') FC/NTC 1.0 g/L y (d, d') FC/NTC 1.5 g/L* 129

Figura 40. P*orcentaje atómico elemental encontrado por EDS para recubrimientos FC/NTC*130

Figura 41. *Scratch test de recubrimientos de FC NTC con diferentes concentraciones de nanotubos de carbono multipared* 132

Figura 42. *Equipo de spin coating y soluciones de PCL/NTC y COL/NTC* 141

Figura 43. *Espectro FTIR de recubrimientos de (a) PCL/NTC con diferentes concentraciones de nanotubos de carbono multipared y (b) COL/NTC, obtenidos por el método de spin coating* .. 143

Figura 44. *Micrografías SEM (a1-a3) y espectro Raman (b1) del recubrimiento PCL NTC 0.0 g/L* 146

Figura 45. *Micrografías SEM (a1-a3) y espectros Raman (b1-b2) del recubrimiento PCL NTC 0.5 g/L* 147

Figura 46. *Micrografías SEM (a1-a3) y espectros Raman (b1-b2) del recubrimiento PCL NTC 1.0 g/L* 148

Figura 47. *Micrografías SEM (a1-a3) y espectros Raman (b1) del recubrimiento PCL NTC 1.5 g/L* 149

Figura 48. *Micrografías SEM de recubrimientos (a1-a2) COL NTC 0.0 g/L, (b1-b2) COL NTC 0.5 g/L, (c1-c2) COL NTC 1.0 g/L y (d1-d2) COL NTC 1.5 g/L*..... 152

Figura 49. *Espectros Raman de recubrimientos (a1) COL NTC 0.0 g/L, (b1) COL NTC 0.5 g/L, (c1) COL NTC 1.0 g/L y (d1) COL NTC 1.5 g/L y sus respectivas micrografías.*..... 153

Figura 50. *Espectro Raman de recubrimientos (a) PCL/FC/NTC y (b) COL/FC/NTC con diferentes concentraciones de nanotubos de carbono multipared* 155

Figura 51. *Micrografías SEM de recubrimientos (a, a') PCL FC NTC 0.0 g/L, (b, b') PCL FC NTC 0.5 g/L, (c, c') PCL FC NTC 1.0 g/L, (d, d') PCL FC NTC 1.5 g/L, (e, e') COL FC NTC 0.0 g/L, (f, f') COL FC NTC 0.5 g/L, (g, g') COL FC NTC 1.0 g/L y (h, h') COL FC NTC 1.5 g/L* 157

Figura 52. *Scratch test de recubrimientos poliméricos con FC y diferentes concentraciones de nanotubos de carbono multipared. (a) fuerza de fricción vs carga normal PCL/NTC y PCL/FC/NTC, (b) primera derivada de la fuerza de fricción vs carga normal PCL/NTC y PCL/FC/NTC, (c) fuerza de fricción vs carga normal COL/NTC y COL/FC/NTC y (d) primera derivada de la fuerza de fricción vs carga normal COL/NTC y COL/FC/NTC.* 160

Figura 53. *Micrografía AFM y perfil de potencial de superficie local de recubrimientos de FC/NTC*..... 169

Figura 54. *Micrografías AFM y perfil de potencial de superficie local. (a) PCL/NTC y (b) PCL/FC/NTC* 170

Figura 55. *Micrografías AFM y perfil de potencial de superficie local. (a) COL/NTC y (b) COL/FC/NTC*..... 171

Figura 56. *Variación de la amplitud y la fase PFM con respecto al voltaje DC de las superficies (a, a') Ti6Al4V, (b, b') FC/NTC, (c, c') PCL/NTC con y sin FC y (d, d') COL/NTC con y sin FC.* 175

Figura 57. *Amplitud PFM (pm) vs voltaje aplicado DC de las superficies (a) Ti6Al4V, (b) FC/NTC, (c) PCL/NTC con y sin FC y (d) COL/NTC con y sin FC.* 180

Figura 58. *Topografía, imágenes PFM de fase a 0V, fase a 5V, fase a -5V y perfiles de fase de los recubrimientos (a) FC/NTC 0.0 g/L, (b) PCL/FC/NTC 1.0 g/L y (c) COL/FC/NTC 1.0 g/L.* 181

Figura 59. *Metodología de 6 pasos para realizar ensayos EQCM de recubrimientos de FC/NTC in vitro* 187

Figura 60. *Respuesta de ΔF (Hz) vs tiempo (s) del proceso de adhesión celular de células HOS sobre cristal de cuarzo para recubrimientos FC/NTC (a) 0h, (b) 24h y (c) 48h* 194

Figura 61. *Respuesta de ΔF (Hz) vs tiempo (s) del proceso de adhesión celular de células HOS sobre cristal de cuarzo para recubrimientos PCL/NTC a (a) 0h, (b) 24h y (c) 48h y recubrimientos PCL/FC/NTC a (d) 0h, (e) 24h y (f) 48h* 194

Figura 62. *Respuesta de ΔF (Hz) vs tiempo (s) del proceso de adhesión celular de células HOS sobre cristal de cuarzo para recubrimientos COL/NTC a (a) 0h, (b) 24h y (c) 48h y recubrimientos COL/FC/NTC a (d) 0h, (e) 24h y (f) 48h* 195

Figura 63. *Respuesta de ΔR (Ohm) vs ΔF (Hz) del proceso de adhesión celular de t_i = 0 h a t_f = 2 h de células HOS sobre cristal de cuarzo, recubrimientos cerámicos y poliméricos: a) recubrimientos FC/NTC, b) recubrimientos PCL/NTC, c) recubrimientos PCL/FC/NTC, d) recubrimientos COL/NTC y e) recubrimientos COL/FC/NTC.* 197

Figura 64. *Diagramas de Nyquist de los recubrimientos (a) FC/NTC, (b) PCL/NTC, PCL/FC/NTC y (c) COL/NTC, COL/FC/NTC* a 48 h de cultivo celular 202

Figura 65. *Circuitos equivalentes usados para el ajuste de los datos experimentales de impedancia de células HOS en contacto con los diferentes recubrimientos, (a) sin difusión y (b) con difusión.* 204

Figura 66. *Capacitancia celular (F/cm^2) vs tiempo de cultivo celular (h) para los recubrimientos (a) FC/NTC, (b) PCL/NTC, (c) PCL/FC/NTC, (d) COL/NTC y (e) COL/FC/NTC.* 205

Figura 67. *Permitividad relativa y conductividad a 48 h de cultivo celular en los recubrimientos (a) FC/NTC, (b) PCL/NTC, PCL/FC/NTC y (c) COL/NTC, COL/FC/NTC* 208

Figura 68. *Voltametría cíclica a 48 h de cultivo celular en los recubrimientos (a) FC/NTC, (b) PCL/NTC, PCL/FC/NTC y (c) COL/NTC, COL/FC/NTC* 210

Figura 69. *Viabilidad celular de cultivo de células HOS en sobrenadantes de recubrimientos FC y FC/NTC* 226

Figura 70. *Viabilidad celular de cultivo de células HOS en sobrenadantes de recubrimientos PCL/NTC y PCL/FC/NTC* 228

Figura 71. *Viabilidad celular de cultivo de células HOS en sobrenadantes de recubrimientos COL/NTC y COL/FC/NTC* 230

Figura 72. *Producción de ALP de células HOS en lisado celular y sobrenadantes de recubrimientos FC/NTC* 232

Figura 73. *Producción de ALP de células HOS en lisado celular y sobrenadantes de recubrimientos PCL/NTC y PCL/FC/NTC* 233

Figura 74. *Producción de ALP de células HOS en lisado celular y sobrenadantes de recubrimientos COL/NTC y COL/FC/NTC* 236

Figura 75. *Micrografías de fluorescencia de células HOS a 96 h de cultivo (a, a') control y (b, b') Ti6Al4V*..... 238

Figura 76. *Micrografías de fluorescencia de células HOS a 96 h de cultivo sobre recubrimientos (a, a') FC/NTC 0.0 g/L, (b, b') FC/NTC 0.5 g/L, (c, c') FC/NTC 1.0 g/L y (d, d') FC/NTC 1.5 g/L* 239

Figura 77. *Micrografías de fluorescencia de con células HOS a 96 h de cultivo sobre recubrimientos (a, a') PCL/NTC 0.0 g/L, (b, b') PCL/NTC 0.5 g/L, (c, c') PCL/NTC 1.0 g/L y (d, d') PCL/NTC 1.5 g/L*..... 241

Figura 78. *Micrografías de fluorescencia de recubrimientos de células HOS a 96 h de cultivo sobre recubrimientos (a, a') PCL/FC/NTC 0.0 g/L, (b, b') PCL/FC/NTC 0.5 g/L, (c, c') PCL/FC/NTC 1.0 g/L y (d, d') PCL/FC/NTC 1.5 g/L*..... 242

Figura 79. *Micrografías de fluorescencia de células HOS a 96 h de cultivo sobre recubrimientos (a, a') COL/NTC 0.0 g/L, (b, b') COL/NTC 0.5 g/L, (c, c') COL/NTC 1.0 g/L y (d, d') COL/NTC 1.5 g/L* 244

Figura 80. *Micrografías de fluorescencia de células HOS a 96 h de cultivo sobre recubrimientos (a, a') COL/FC/NTC 0.0 g/L, (b, b') COL/FC/NTC 0.5 g/L, (c, c') COL/FC/NTC 1.0 g/L y (d, d') COL/FC/NTC 1.5 g/L*..... 245

Figura 81. *Micrografías SEM de células HOS a 48 h de cultivo sobre recubrimientos (a, a') control y (b, b') Ti6Al4V*..... 248

Figura 82. *Micrografías SEM de células HOS a 48 h de cultivo sobre recubrimientos (a, a') FC/NTC 0.0 g/L, (b, b') FC/NTC 0.5 g/L, (c, c') FC/NTC 1.0 g/L y (d, d') FC/NTC 1.5 g/L*.... 249

Figura 83. *Micrografías SEM de células HOS a 48 h de cultivo sobre recubrimientos (a1, a2, a3) PCL/NTC 0.0 g/L, (b1, b2, b3) PCL/NTC 0.5 g/L, (c1, c2, c3) PCL/NTC 1.0 g/L y (d1, d2, d3) PCL/NTC 1.5 g/L* 252

Figura 84. *Micrografías SEM de células HOS a 48 h de cultivo sobre recubrimientos (a1, a2, a3) PCL/FC/NTC 0.0 g/L, (b1, b2, b3) PCL/FC/NTC 0.5 g/L, (c1, c2, c3) PCL/FC/NTC 1.0 g/L y (d1, d2, d3) PCL/FC/NTC 1.5 g/L*..... 253

Figura 85. *Micrografías SEM de células HOS a 48 h de cultivo sobre recubrimientos (a, a') COL/NTC 0.0 g/L, (b, b') COL/NTC 0.5 g/L, (c, c') COL/NTC 1.0 g/L y (d, d') COL/NTC 1.5 g/L* 256

Figura 86. *Micrografías SEM de células HOS a 48 h de cultivo sobre recubrimientos (a, a') COL/FC/NTC 0.0 g/L, (b, b') COL/FC/NTC 0.5 g/L, (c, c') COL/FC/NTC 1.0 g/L y (d, d') COL/FC/NTC 1.5 g/L*..... 257

Lista de apéndices

Apéndice A. Scratch test y micrografías de rayado de los recubrimientos PCL/NTC, PCL/FC/NTC, COL/NTC y COL/FC/NTC. 317

Apéndice B. Topografía 3D y perfil de rugosidad de Ti6Al4V y de los recubrimientos FC/NTC, PCL/NTC, PCL/FC/NTC, COL/NTC y COL/FC/NTC. 322

Apéndice C. Cambio en la frecuencia, masa y resistencia en un cristal de cuarzo y recubrimientos cerámicos y poliméricos a 0, 24 y 48 h..... 330

Apéndice D. Diagramas de Bode, Nyquist y parámetros de los circuitos equivalentes eléctricos 335

Abreviaturas

AFM: Microscopia de Fuerza Atómica

ALP: Fosfatasa Alcalina

β-TCP: Fosfato tricálcico beta

COL: Colágeno

DC-EFM: Microscopia de Fuerza Electrostática de Contacto Dinámico

DRX: Difracción de Rayos X

EDS: Espectrometría de Dispersión de Energía de Rayos X

EIS: Espectroscopia de Impedancia Electroquímica

EQCM: Microbalanza Electroquímica de Cristal de Cuarzo

FC: Fosfatos de Calcio

FTIR: Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier

HA: Hidroxiapatita

HOS: Células de Osteosarcoma Humano

Ia: Pico de corriente anódica

Ic: Pico de corriente catódica

Ip: Punto isoeléctrico

MEC: Matriz Extracelular

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio

NTC: Nanotubos de Carbono

OTH: Otolito

PCL: Policaprolactona

PFM: Microscopia de Fuerza de Piezorespuesta

QCM: Microbalanza de Cristal de Cuarzo

SEM: Microscopia Electrónica de Barrido

SKPM: Microscopia de Barrido de Sonda Kelvin

TEM: Microscopia Electrónica de Transmisión

TGA: Termogravimetría

VC: Voltametría Cíclica

Resumen

Título: Recubrimientos de cerámicos cálcicos, policaprolactona y colágeno reforzados con nanotubos de carbono multipared para uso en ortopedia[*]

Autor: Nerly Deyanira Montañez Supelano[**]

Palabras Clave: Biomaterial, Cerámicos Cálcicos, Policaprolactona, Colágeno, Células HOS

DESCRIPCIÓN:
La interacción material–célula es un complejo proceso en donde las propiedades superficiales de los biomateriales influyen directamente en el comportamiento celular. Determinar cualquier cambio superficial en los biomateriales es crucial para entender las respuestas en los procesos celulares, especialmente el proceso de adhesión. En este trabajo, fueron desarrollados materiales cerámicos, poliméricos y compuestos de polímeros como policaprolactona (PCL) y colágeno (COL) con fosfatos cálcicos (FC) y nanotubos de carbono multipared (NTC) en diferentes concentraciones (0.5, 1.0 y 1.5 g/L). Estos materiales fueron depositados por electrodeposición (fosfatos cálcicos) y spin coating (polímeros y compuestos) sobre un material de osteosíntesis (Ti6Al4V). Varias técnicas de caracterización química, física y biológica como espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia Raman, difracción de rayos X (DRX), microscopia electrónica de barrido (SEM), espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS), microscopia electrónica de transmisión (TEM), termogravimetría (TGA), prueba colorimétrica MTT, fosfatasa alcalina (ALP), microscopia de fluorescencia, scratch test, espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS), voltametría cíclica (VC), microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), microscopia de fuerza atómica (AFM), piezorespuesta de fuerza atómica (PFM) y microscopia de barrido de sonda Kelvin (SKPM) se llevaron a cabo para evaluar exhaustivamente los recubrimientos. Se encontró que un aumento en la concentración de NTC induce cambios en la fase microestructural del fosfato de calcio que conduce a la formación de brushita, monetita e hidroxiapatita. Así mismo, el aumento de NTC en las matrices poliméricas disminuye los potenciales superficiales locales, lo que favorece la adherencia celular y la morfología de los núcleos de células de osteosarcoma humano (HOS) en la mayoría de los casos. Cuando se agregan diferentes concentraciones de NTC funcionalizado con FC a las matrices poliméricas, se inducen cambios en la rugosidad, potencial superficial y piezorespuesta, encontrando que superficies como COL/FC/NTC mejoran sustancialmente el proceso de adhesión celular especialmente a altas concentraciones de NTC.

[*] Trabajo de grado

[**] Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de los Materiales. Directores: PhD Darío Yesid Peña Ballesteros y PhD Sandra Judith García Vergara. Codirector: PhD Hugo Armando Estupiñán Durán

Abstract

Title: Calcium ceramics coatings, polycaprolactone and collagen reinforced with multiwall carbon nanotubes for use in orthopedics[*]

Author: Nerly Deyanira Montañez Supelano[**]

Key Words: Biomaterial, Calcium Ceramics, Polycaprolactone, Collagen, HOS Cells

DESCRIPTION:
The material-cell interaction is a complex process in which the surface properties of biomaterials directly influence cellular behavior. Determining any surface changes in biomaterials is crucial to understand the responses in cellular processes, especially the adhesion process. In this work, ceramic, polymeric and polymer composite materials such as polycaprolactone (PCL) and collagen (COL) were developed with calcium phosphates (FC) and multiwalled carbon nanotubes (NTC) in different concentrations (0.5, 1.0 and 1.5 g/L). These materials were deposited by electrodeposition (calcium phosphates) and spin coating (polymers and compounds) on an osteosynthesis material (Ti6Al4V). Various chemical, physical and biological characterization techniques such as Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), Raman spectroscopy, X-ray diffraction (DRX), scanning electron microscopy (SEM), X-ray energy dispersion spectrometry (EDS) , transmission electron microscopy (TEM), thermogravimetry (TGA), MTT colorimetric test, alkaline phosphatase (ALP), fluorescence microscopy, scratch test, electrochemical impedance spectroscopy (EIS), cyclic voltammetry (VC), quartz crystal microbalance (QCM), atomic force microscopy (AFM), piezoresponse force microscopy (PFM) and scanning Kelvin probe microscopy (SKPM) were performed to evaluate comprehensively the coatings. It was found that an increase in the concentration of carbon nanotubes induces changes in the microstructural phase of calcium phosphate that leads to the formation of brushite, monetite and hydroxyapatite. Likewise, the increase of NTC in the polymeric matrices decreases the local surface potentials, which favors cell adherence and the morphology of the nuclei of human osteosarcoma cells (HOS) in most cases. When different concentrations of NTC functionalized with FC are added to polymer matrices, changes in roughness, surface potential, and piezo response are induced, finding that surfaces such as COL/FC/NTC substantially improve the cell adhesion process especially at high concentrations of NTC.

[*] Bachelor Thesis

[**] Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de los Materiales. Directores: PhD Darío Yesid Peña Ballesteros y PhD Sandra Judith García Vergara. Codirector: PhD Hugo Armando Estupiñán Durán

Introducción

Con las últimas investigaciones en materiales para regeneración y reparación ósea, vienen más retos en la exploración de compuestos para sustitutos óseos para eliminar la necesidad de autoinjertos, aloinjertos o xenoinjertos (Ebrahimi et al., 2017; Habraken et al., 2016). El aumento de desórdenes musculoesqueléticos como osteopenia, osteoporosis, artrosis, entre otras, en conjunto con el aumento de la población, hace que exista un mayor impacto tanto en la salud como en la economía de cualquier país. En Colombia, existe actualmente una población de alrededor de 50.3 millones de personas y para el año 2023 habrá una población de alrededor de 52.1 millones (Departamento Administrativo Nacional de Estadística DANE, 2018). Según datos de la IOF *(International Osteoporosis Foundation)*, se estima que 1 de cada 3 mujeres y 1 de cada 5 hombres mayores de 50 años experimentarán fracturas osteoporóticas, además, se calcula que la osteoporosis afecta a 200 millones de mujeres en todo el mundo; aproximadamente una décima parte de las mujeres de 60 años, una quinta parte de las mujeres de 70 años, dos quintos de las mujeres de 80 años y dos tercios de las mujeres de 90 años. Sólo esta enfermedad causa más de 8.9 millones de fracturas anualmente, lo que equivale en una fractura osteoporótica cada 3 s. Para Latinoamérica, se proyecta que en el año 2050 el número de fracturas (ejemplo de cadera), se incrementará en un 400% para hombres y mujeres entre 50 y 64 años y para edades mayores a los 65 años este incremento será de 700% (International Osteoporosis Foundation, 2019). Todas estas estadísticas, muestran una realidad nacional y mundial en cuanto al aumento de la demanda de implantes y biomateriales.

Ahora bien, estudios clínicos previos acerca de implantes metálicos han demostrado que existe riesgo considerable a la infección después de la implantación, debido principalmente a que bacterias como estafilococos tienen una gran adherencia a los metales. En un estudio de reemplazo total de cadera se muestra que un total de 14 pacientes de 80 tuvieron fallas en el implante de titanio por infección (Bori *et al.*, 2019). Por lo tanto, se requiere una modificación superficial del metal para soportar el crecimiento de hueso, ya que una mala integración de un implante ortopédico puede causar residuos de desgaste perjudicial y deformaciones en la superficie de contacto, lo que lleva al aflojamiento y fracaso del implante (Sahithi et al., 2010). La dificultad de esta modificación radica en la manera de obtener un implante bioactivo, resistente a la corrosión, con mejores propiedades eléctricas, mecánicas y biológicas y con una buena adherencia entre cualquier tipo de recubrimiento y el sustrato, especialmente aquellos que se posicionan en contacto con el hueso como prótesis o matrices funcionales.

Una diversidad de materiales cerámicos, poliméricos, metales, vítreos y combinación de estos, se han probado en la búsqueda de mejora en las propiedades de los materiales usados para reparación del sistema esquelético. Para esto, los ingenieros de materiales deben tener en cuenta muchas características de los materiales como mecánicas, biológicas, eléctricas, químicas, físicas, morfológicas, etc. Dentro de esta estrategia del desarrollo de un material compuesto apto para aplicaciones ortopédicas, parece evidente la necesidad de una combinación de estímulos físicos y bioquímicos que dan lugar a un ambiente adecuado para la regeneración de tejidos. La manera de obtener materiales de implante como prótesis o matrices funcionales que permitan una buena adherencia al contacto con el hueso es todavía hoy estudiada.

Una aproximación a los mecanismos biológicos se encuentra en las propiedades eléctricas, ya que en el organismo muchas funciones están controladas por señales eléctricas. En los huesos, por ejemplo, cuando se tensionan mecánicamente, se generan corrientes eléctricas. Este es un mecanismo del hueso para su constante remodelación de acuerdo con la ley de Wolf, en donde el hueso se deposita y se refuerza en las áreas de mayor estrés. Esta generación de corrientes eléctricas es conocida como piezoelectricidad directa y es independiente de la viabilidad celular. Se ha planteado que estas señales piezoeléctricas pueden estimular el crecimiento del hueso (Ribeiro et al., 2015), mediante la atracción de iones calcio y fósforo en el fluido corporal, lo cual resulta en el desarrollo de callo en el hueso vivo y mejora la integración del material de implante con el hueso del huésped (Y. Zhang et al., 2014). A partir de estas aproximaciones, existe un interés creciente, por un lado, en la mejora de biomateriales para promover el crecimiento de hueso examinando el comportamiento electromecánico de los materiales para mejorar el rendimiento del implante y por otro, en desarrollar mejores alternativas de materiales promisorios en el campo biomédico y específicamente para recubrimientos de implantes ortopédicos.

Un material que ha mostrado beneficio en el campo de los biomateriales debido a sus excelentes propiedades mecánicas, eléctricas y térmicas con numerosas aplicaciones son los nanotubos de carbono (Musto *et al.*, 2015), los cuales poseen buenas propiedades electrónicas y estructurales dadas por su diámetro, longitud y quiralidad (Harrison y Atala, 2007). Los nanotubos de carbono (NTC) han sido utilizados ampliamente en la última década en muchas aplicaciones como aparatos electrónicos, sensores electroquímicos, dispositivos biomédicos, almacenamiento de energía, liberación controlada de fármacos, entre otros (Lawal, 2016). Los NTC en aplicaciones biomédicas requieren procesos de síntesis más controlados, métodos adicionales de purificación y

modificación, ya que las impurezas como carbono amorfo y residuos de catalizador provenientes del mismo proceso de fabricación pueden afectar los sistemas de tipo biológico (Harutyunyan et al., 2002). Adicionalmente, los nanotubos de carbono poseen escasa solubilidad en agua y solventes orgánicos, tienden a formar agregaciones en solución, son bioincompatibles y limitan la compatibilidad con matrices poliméricas. Por esta razón, los NTC considerados para aplicaciones biomédicas deben cumplir con este requisito básico de la solubilidad (Lawal, 2016).

Para optimizar los NTC es necesario que sean funcionalizados, por ejemplo, ensamblando otras nanoestructuras vinculadas o que recubran los nanotubos (Chetibi et al., 2014), lo que puede mejorar también la dispersión en matrices poliméricas (Spitalsky et al., 2010). Dicha funcionalización con materiales de otra naturaleza se hace necesaria, porque los nanotubos originales tienen efectos adversos y han mostrado citotoxicidad a la exposición en sistemas biológicos, debido a los residuos de catalizadores metálicos y al carbono tipo hollín proveniente del proceso de producción de los mismos, incluso, nanotubos funcionalizados con grupos hidroxilo y carboxilo (Giuseppa *et al.*, 2015; Ursini *et al.*, 2012). La funcionalización de NTC además de mejorar la solubilidad acuosa, ha tenido resultado en la disminución de la toxicidad, lo que mejora la biocompatibilidad (Srinivasarao et al., 2016).

Los NTC funcionalizados para ser usados en materiales de ortopedia, generalmente contienen ancladas moléculas de fosfatos de calcio, como la hidroxiapatita, la cual es un biomaterial cerámico con fórmula $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ que muestra una excelente biocompatibilidad y un potencial osteogénico para promover adhesión al tejido y crecimiento óseo (Núñez *et al.*, 2014). En ocasiones los NTC son funcionalizados con estos fosfatos de calcio antes de ser

introducidos en una matriz polimérica, lo que hace que el material reduzca la toxicidad de los NTC a la que algunos autores hacen referencia (Oyefusi *et al.*, 2014). Adicionalmente, cuando los NTC se encuentran en matrices poliméricas, éstas deben ser biocompatibles y biodegradables. La degradación del biomaterial debe ser relativamente lenta, ya que tiene que mantener la resistencia mecánica hasta que la regeneración de tejidos está casi terminada (Sahithi *et al.*, 2010). Polímeros sintéticos biocompatibles se han investigado ampliamente, dentro de los más comunes se encuentra el ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), policaprolactona (PCL), polietilenglicol (PEG), poli metil metacrilato (PMMA), entre otros.

La policaprolactona es un poliéster alifático biodegradable, biocompatible, con adecuada tasa de degradación, aprobado por la FDA (US Food and Drug Administation), usado en ingeniería de tejidos y sistemas de liberación controlada de fármacos. La policaprolactona es un buen candidato para diseñar recubrimientos de materiales híbridos basados en la combinación de componentes orgánicos e inorgánicos para aplicaciones biomédicas (Saveleva et al., 2018). Otros polímeros naturales como el colágeno han mostrado una buena respuesta bioactiva en sistemas implantables, ya que puede ser reabsorbido por el cuerpo asegurando condiciones favorables para la adhesión de osteoblastos y fibroblastos (Türk *et al.*, 2018a).

En este sentido, este trabajo de investigación propuso una funcionalización de los nanotubos de carbono expuestos a procesos de purificación por ruta ácida con cerámicos cálcicos sintetizados a partir de una fuente natural llamada otolito. El otolito o estatolito (otolith en inglés), es un carbonato de calcio tipo aragonita formado en la cápsula óptica de peces teleósteos (Degens et al., 1969). En este proyecto se desarrolló y evaluó un recubrimiento de cerámicos cálcicos y

nanotubos de carbono por electrodeposición, así mismo, se usó esta funcionalización de nanotubos de carbono con carbonatos de calcio en dos matrices poliméricas, la policaprolactona y el colágeno tipo I, este material híbrido fue puesto sobre material de osteosíntesis Ti6Al4V mediante una técnica de deposición de películas delgadas (spin-coating). La investigación del efecto de estas superficies funcionalizadas en contacto con medio biológico y células de tipo óseo permitió lograr un aporte significativo en el estudio de la biodegradación, respuesta electromecánica y bioactiva de materiales biofuncionalizados. Adicionalmente, esta investigación permitió fortalecer el conocimiento de las tecnologías de punta en el desarrollo de biomateriales para incorporación de nuevos productos biomédicos y la eventual utilización de los resultados de esta tesis a nivel productivo en las empresas Quirúrgicos Especializados S.A. y Jaimes Rueda y Cia Ltda.

Este proyecto se realizó bajo el marco del proyecto financiado por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander titulado “Obtención y caracterización de superficies biomiméticas nanoestructuradas sobre materiales de osteosíntesis para generación de nuevos productos de innovación de la empresa Quirúrgicos Especializados S.A y Jaimes Rueda y Cia”. Así mismo, bajo el marco del macroproyecto de salud código BPIN: 2012000100172 del sistema general de regalías SGR (Universidad Nacional de Colombia sede Medellín). La financiación de la estudiante de doctorado se llevó a cabo bajo el marco de la convocatoria 647 becas nacionales de Colciencias.

1 Fundamentos teóricos y estado del arte

1.1 Biomateriales e interacción

1.1.1 Biomaterial

Una definición aprobada de un biomaterial fue dada en la Conferencia de Consenso sobre definiciones en Biomateriales en 1987 de la Sociedad Europea de Biomateriales, en donde se definió un biomaterial como "un material no vivo usado en un dispositivo médico, destinado para interactuar con los sistemas biológicos" (Williams 1987) (Ratner et al., 1996). Pero tal vez la más aceptada fue dada en la segunda Conferencia de Consenso sobre definiciones en Biomateriales, donde un biomaterial es un "material destinado a interactuar con los sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar, o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo" (Leeuwenburg *et al.*, 2008). A partir de estas definiciones, los expertos en el tema empezaron a establecer los requerimientos de un biomaterial, dentro de los cuales se encuentra que el biomaterial sea biocompatible, bioactivo, osteoconductivo u osteoinductivo.

1.1.2 Biocompatibilidad

Una de las primeras definiciones para biocompatibilidad se extiende hacia los biomateriales, éstos no deben perturbar o inducir una respuesta no favorable (Ratner *et al.*, 1996), sino promover la buena integración del implante al tejido o inducir una respuesta apropiada del anfitrión en una situación específica (Hin, 2004). La anterior definición se amplió al entendimiento

del concepto y los mecanismos que intervienen en la interacción del biomaterial y el tejido circundante, lo que conlleva al estudio de la composición, estructura, morfología, cristalinidad, constante elástica, porosidad, topografía, características eléctricas de la superficie, corrosión, degradación y toxicidad del biomaterial (Clavijo et al., 2010). Queda entonces claro que la biocompatibilidad esta vista como un evento de interacción, no como una propiedad del biomaterial (Kurtz, 2012).

1.1.3 Bioactividad

La bioactividad o actividad biológica de un biomaterial usado en tejido óseo se refiere a la habilidad biológica de formar una capa de apatita en la superficie del biomaterial de implante, en donde debe haber una nucleación de cristales de apatita, inducida por la presencia de grupos funcionales específicos en la superficie (Hao y Lawrence, 2005).

1.1.4 Osteoconducción y Osteoinducción

La osteoconducción se produce cuando el material sirve como un andamio para el crecimiento de hueso nuevo en su superficie por los poros o canales. Los osteoblastos utilizan el material como un marco para difundir y generar hueso nuevo. La osteoinducción consiste en la estimulación de células osteoprogenitoras de diferenciarse en osteoblastos, que luego empiezan la formación de hueso nuevo (Albrektsson y Johansson, 2001). La aplicación de cerámicas de fosfato cálcico como posibles sustitutos de hueso permiten el crecimiento del tejido óseo en el interior de sus poros.

1.1.5 Osteogénesis y osteointegración

Osteogénesis es la producción de nuevo hueso. Este proceso se da cuando los osteoblastos viables o sus precursores se trasplantan con el injerto. Un material osteogénico es aquel que contiene células vivas capaces de diferenciarse hacia hueso (Abarrategui, 2008). La osteointegración se define como el anclaje directo de un implante por la formación de tejido óseo alrededor del implante sin el crecimiento de tejido fibroso en la interfase hueso-implante (Albrektsson y Johansson, 2001).

1.2 Tejido óseo

El hueso está compuesto por dos estructuras arquitectónicas básicas que son hueso compacto o cortical y hueso trabecular o esponjoso. El hueso cortical es denso, mientras que el hueso trabecular aparece como un entramado de fibras y láminas, descritas generalmente como trabéculas, separadas por espacios intercomunicados (Becerra et al., 2001).

La formación ósea resulta de una compleja cascada de eventos que incluyen proliferación de células mesenquimales primitivas (células capaces de diferenciarse en el camino adecuado), su posterior diferenciación a células precursoras osteoblásticas (osteoprogenitoras o preosteoblastos), maduración de osteoblastos, formación de matriz y finalmente mineralización. Los osteoblastos son las células responsables de la síntesis y secreción del componente orgánico sin mineralizar de la matriz ósea, también conocido como osteoide. Mientras que los osteoclastos son las células encargadas de la reabsorción del hueso (Becerra et al., 2001; J.-H. Chen et al., 2010).

El hueso compacto es 35% orgánico, compuesto principalmente de colágeno tipo I, con un porcentaje pequeño de proteínas no colágenas. El otro 65% está compuesto por minerales orgánicos predominando la hidroxiapatita, con otros elementos como fluoruro, magnesio y citrato. El hueso compacto tiene un sistema vascular bien desarrollado que se encuentra paralelo al eje largo del hueso. Los vasos sanguíneos se encuentran en sus propios canales denominados canales de Havers, acomodándose alrededor de estos el hueso compacto. Las capas concéntricas de hueso y el canal forman una unidad llamada un sistema de Havers (Ahn y Grodzinsky, 2009).

El hueso es un tejido dinámico en constante adaptación y remodelación a través de complejos mecanismos de retroalimentación, que implica procesos electromecánicos, debido a sus características piezoeléctricas (Ribeiro *et al.*, 2015). El hueso es remodelado para satisfacer sus demandas mecánicas, lo que sugiere que las fuerzas mecánicas, es uno de los factores más importantes en la formación y resorción de hueso (Chen *et al.*, 2010).

1.3 Propiedades eléctricas de sistemas biológicos

1.3.1 Conductividad y permitividad

La respuesta eléctrica en tejidos biológicos en el campo AC (corriente alterna) esta atribuida a la polarización interfacial en estructuras heterogéneas como las células. La membrana celular se considera menos conductiva que el citoplasma y el medio externo, por lo tanto, la

membrana juega un papel importante en la polarización interfacial. Las membranas se polarizan dependiendo de la frecuencia en AC aplicada (Heileman et al., 2013).

La conductividad σ' (Ecuación 1) del sistema biológico también es posible calcularla a partir de los datos de impedancia Z, obtenidos con la técnica AC espectroscopia de impedancia electroquímica. Z' es la impedancia real y Z'' es la impedancia imaginaria, t es el espesor y A el área (Gittings et al., 2009). La permitividad en un sistema biológico se puede entender como la relación entre la carga y los campos eléctricos, tales cargas se asocian con capas dobles eléctricas que se producen en las superficies de la membrana o alrededor de moléculas polares (Pethig y Douglas, 1987).

$$\sigma' = G = \frac{Z\prime}{Z\prime^2 + Z\prime\prime^2} \cdot \frac{t}{A} \quad (1)$$

Las propiedades eléctricas de la materia biológica y tejidos son inusuales debido a que la permitividad y la conductividad dependen de la frecuencia, los cambios en frecuencia ocurren en tres pasos llamados dispersiones α, β, γ, y la permitividad muestra enormes valores a bajas frecuencias (H Schwan, 1994). Una membrana celular intacta es similar a un condensador de alta resistencia que envuelve los fluidos intracelulares. En las frecuencias bajas, la membrana es muy resistente y la corriente eléctrica viajará en el fluido extracelular, esto conlleva a que la impedancia sea muy alta (Dean et al., 2008).

1.3.2 Piezoelectricidad

La piezoelectricidad es una propiedad extendida en sistemas biológicos, la cual se puede encontrar en diferentes partes del cuerpo humano, tales como hueso, tendón, ligamentos, cartílago, piel, dentina, colágeno, ácidos desoxirribonucleico (ADN) y en las membranas celulares (Ribeiro *et al.*, 2015).

El primer estudio que reportó las propiedades piezoeléctricas del hueso fue en 1955, luego se evidenciaron las corrientes eléctricas y la generación de potenciales eléctricos cuando el hueso se tensiona mecánicamente. El estrés mecánico produce señales eléctricas y estas señales representan el estímulo que promueve el crecimiento y remodelación ósea según la ley de Wolff (Ahn y Grodzinsky, 2009; Chen *et al.*, 2010). El mecanismo de remodelación del hueso se asume que se genera por fuerzas internas que a su vez son inducidas por un campo de señales bioeléctricas externas contenidas en las células óseas. Esta actividad bioeléctrica, descrita como el acople constitutivo por los campos mecánicos y eléctricos conlleva a la respuesta electromecánica del hueso (V. Duarte y Cerrolaza, 2013).

En un material piezoeléctrico, una respuesta eléctrica se da debido a la excitación mecánica y viceversa, estos materiales son generalmente anisotrópicos. El efecto piezoeléctrico directo es la conversión de la energía mecánica en energía eléctrica y está dado por la Ecuación 2, donde dij es el coeficiente piezoeléctrico directo.

$$dij = \left(\frac{\partial Di}{\partial Xj}\right)^{E} = \left(\frac{\partial xi}{\partial Ej}\right)^{X} \quad (2)$$

Donde D es la inducción eléctrica; E es la intensidad de campo eléctrico; X es la tensión mecánica; y x es la deformación. Es posible encontrar el coeficiente piezoeléctrico inverso (Ecuación 3), el cual describe la conversión de la energía eléctrica en energía mecánica (Ribeiro *et al.*, 2015).

$$eij = \left(\frac{\partial Di}{\partial Xj}\right)^{E} = \left(\frac{\partial xi}{\partial Ej}\right)^{X} \quad (3)$$

En el hueso, la tensión (V) generada por estrés se expresa por la Ecuación 4.

$$V = \left(\frac{d_{ijk}L}{\varepsilon}\right) B\ exp\left(-\frac{\sigma t}{\varepsilon}\right) \quad (4)$$

Donde d_{ijk} es el coeficiente piezoeléctrico, L, espesor de la muestra, ε, permitividad dieléctrica, B, carga aplicada a la muestra, σ, la conductividad de la solución y t, el tiempo (Ahn y Grodzinsky, 2009).

El origen de la piezoelectricidad en sistemas biológicos como el hueso se atribuye al efecto piezoeléctrico de las micelas cristalinas (hidroxiapatita) inmersas en las moléculas orientadas de colágeno y no sólo a la parte orgánica del tejido óseo (E Fukada, 1968; Eiichi Fukada y Yasuda, 1957).

1.4 Titanio y sus aleaciones

Titanio y sus aleaciones han sido ampliamente usadas en una variedad de aplicaciones en la industria aeroespacial, automotriz, biomédica, entre otras (Ya *et al.*, 2015). Estas aleaciones tienen alta resistencia mecánica, comparado con los polímeros y mayor tenacidad comparado con los materiales cerámicos, por lo que son apetecidas en aplicaciones biomédicas, sin embargo, las superficies metálicas en general no son bioactivas, para lo cual este tipo de aleaciones son recubiertas con cerámicas como hidroxiapatita, o tienen otro tipo de tratamiento superficial como el patronamiento o crecimiento de películas de óxido para mejorar las características superficiales (Kwok et al., 2009).

Una de las aleaciones más comunes en la industria biomédica es la aleación Ti6Al4V debido a su peso ligero, moderada resistencia a la corrosión en ambientes fisiológicos y otras propiedades químicas y mecánicas (Chetibi *et al.*, 2014; Ya *et al.*, 2015). Esta aleación presenta transformación alotrópica α y β; donde α tiene una estructura cristalina hexagonal compacta y beta una estructura cubica centrada en el cuerpo (Gill et al., 1999). La presencia de aluminio en la aleación estabiliza la fase α mientras que el vanadio estabiliza la fase β, en donde su microestructura es una mezcla de granos α y β, razón por la cual las propiedades mecánicas son mejores que el titanio puro (Echavarría, 2003). Otros elementos que estabilizan la fase β son molibdeno, cromo, hierro y niobio (Enderle et al., 2005).

La aleación de Ti6Al4V es usada en implantología dental y dispositivos de reemplazo ortopédico, tiene una excelente integración hueso-implante y biocompatibilidad. Estudios in vitro con células osteoblásticas humanas sobre la aleación Ti6Al4V, indican que las células son capaces

de diferenciar en osteoblastos maduros, mostrando una morfología estable con apariencia de fibroblastos, adhiriéndose a la superficie de la aleación correctamente (Tognarini *et al.*, 2008). La composición química de la aleación Ti6Al4V para implantes quirúrgicos se da en la Tabla 1, de acuerdo con la norma ASTM F1108-14 (ASTM International, 2014).

Tabla 1.

Requerimientos químicos de la aleación Ti6Al4V.

Elemento	Composición % masa
Nitrógeno	0.05 máx.
Carbono	0.10 máx.
Hidrógeno	0.015 máx.
Hierro	0.30 máx.
Oxígeno	0.20 máx.
Aluminio	5.5 a 6.75
Vanadio	3.5 a 4.5
Titanio	Balance

Otras aleaciones de titanio y las normas ASTM para usos médicos y quirúrgicos se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2.

ASTM relacionadas con titanio y sus aleaciones para implantes quirúrgicos.

Especificación	Contenido
F 67-13	Titanio no aleado
F 136-13	Ti-6Al-4V ELI forjado
F 620-11	Ti-6Al-4V ELI piezas forjadas
F 1108-14	Ti-6Al-4V ELI piezas fundidas
F 1295-11	Ti-6Al-7Nb forjado
F 1472-14	Ti-6Al-4V forjado
F 1713-08	Ti-13Nb-13Zr forjado
F 1813-13	Ti-12Mo-6Zr-2Fe forjado

Aleaciones como Ti-Nb-Zr, son aleaciones beta con menor módulo de Young en comparación con aleaciones tipo $\alpha + \beta$, en donde el módulo de Young del Ti6Al4V es de 110 GPa, mientras que el módulo de Young de Ti-34Nb-25Zr es de 62 ± 3.6 GPa y el de hueso cortical es de 27 GPa. Sin embargo, la aleación Ti6Al4V es todavía la más usada para aplicaciones ortopédicas (Ozan et al., 2015).

1.5 Polímeros biocompatibles

Los polímeros en general presentan propiedades atractivas en comparación con materiales inorgánicos, son ligeros, de bajo costo, eléctricamente resistentes, muestran una excelente compatibilidad con otros materiales orgánicos e inorgánicos, presentan propiedades como biodegradación y biocompatibilidad (Ribeiro *et al.*, 2015). Los polímeros usados en la industria biomédica pueden ser de origen sintético, natural o la combinación de los dos. Cada polímero presenta su particularidad, por ejemplo, los polímeros naturales presentan propiedades similares a las del tejido que están reemplazando, sin embargo, este tipo de polímeros son a menudo difíciles de procesar, su degradación no se controla fácilmente y muestran pobres propiedades mecánicas y eléctricas.

Varios polímeros sintéticos han sido estudiados para aplicaciones en ingeniería de tejidos tales como ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico) (PGA), ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA), poli etilenglicol (PEG), policaprolactona (PCL), poli metil metacrilato (PMMA), polifluoruro de vinilideno (PVDF), entre otros, no obstante, algunos polímeros no cuentan con la capacidad de degradación, o producen en su proceso de degradación microclimas ácidos en el

ambiente biológico, como el caso del PLGA (Petricca et al., 2006). Por otro lado, polímeros como PVDF han tomado auge en los últimos años, ya que se encuentra categorizado como un polímero inteligente. Los materiales inteligentes tienen variaciones reproducibles, significativas y estables de al menos una propiedad cuando se someten a estímulos externos (Ribeiro *et al.*, 2015). Polímeros de tipo natural también tienen aplicación en material de osteosíntesis, sobre todo por la biomimeticidad (simulación de características físicas o químicas de superficies biológicas) que estos presentan, dentro de los más comunes se encuentra el colágeno, quitosano, ácido hialurónico etc.

1.5.1 Policaprolactona (PCL)

La policaprolactona (PCL), de fórmula molecular $(C_6H_{10}O_2)_n$ es un poliéster lineal alifático que puede ser sintetizado por polimerización por apertura de anillo con catalizadores o por radicales libres de 2-metileno-1-3-dioxolano. Este polímero es conocido por su biodegradabilidad, biocompatibilidad, fácil procesamiento, buena solubilidad, compatibilidad con otros compuestos, bajo punto de fusión (59-64 °C) y de transición vítrea (-60 °C). Tiene aplicaciones en ingeniería de tejidos como andamio para varios órganos como hueso, cartílago, tendón, ligamento, piel y sistemas controlados de liberación. La PCL es hidrofóbica, semicristalina y sus propiedades mecánicas son pobres (Pan et al., 2012; Papageorgiou et al., 2015).

1.5.2 Colágeno

Una molécula de colágeno consiste en una secuencia de aminoácidos y cada aminoácido está conectado por un enlace peptídico. La mayoría de los aminoácidos tienen cadenas laterales de grupos R. El grupo R puede contener un grupo carboxilo (COO^- - H^+) cargado negativamente o grupo amino cargado positivamente (NH_2+H^+), las cadenas laterales de una molécula de colágeno se comportan similar a un aminoácido. En un hueso compacto, el colágeno ocupa alrededor de 40-50% del volumen, el mineral 40% y los poros el resto (Telega y Wojnar, 2002). El colágeno se encuentra en el hueso altamente orientado, en donde la estructura de colágeno proporciona la respuesta colectiva, coherente a la carga mecánica necesaria para un efecto fisiológicamente significativo (Ahn y Grodzinsky, 2009).

1.6 Cerámicas bioactivas

La hidroxiapatita (HA) es un biomaterial cerámico con fórmula $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (relación Ca/P=1.67) que muestra una excelente biocompatibilidad y un potencial osteogénico para promover adhesión al tejido y crecimiento óseo (Núñez *et al.*, 2014). Es un material ampliamente usado como relleno óseo, en dispositivos de ortopedia y odontología, debido a su similitud en composición química con el hueso. Además, posee la característica de osteoconducción y es bioactiva (Padilla et al., 2006). La HA es usada frecuentemente como recubrimiento en metales, sin embargo, la adhesión a los sustratos metálicos es pobre debido a las diferencias en la estructura, modulo elástico y coeficiente de expansión (K. Lee et al., 2010).

Otras cerámicas bioactivas son los biovidrios o vitrocerámicos basados en los sistemas SiO_2-CaO-P_2O_5 o SiO_2-Na_2O-CaO-P_2O_5, generalmente obtenidos por la técnica sol-gel. Exámenes histológicos in vivo muestran que los vidrios bioactivos en contacto con fluidos fisiológicos y tejidos forman sobre la superficie una capa reactiva en el periodo de implantación y a partir de entonces la matriz ósea se integra en la capa reactiva mediante enlace químico (Catauro et al., 2015; Hao y Lawrence, 2005). Estas reacciones superficiales que se llevan a cabo relativamente rápido son seguidas por la cristalización de cristales de apatita, adhesión celular y formación de colágeno (Ravarian *et al.*, 2010).

Otro fosfato de calcio ampliamente reportado es el fosfato tricálcico (TCP, $Ca_3(PO_4)_2$), el cual existe en dos formas alotrópicas α o β con relación calcio/fosforo de 1.50, es considerado reabsorbible debido a que a medida que se degrada, es reemplazado por tejido huésped (Habraken et al., 2016). Algunos fosfatos de calcio con relaciones menores de Ca/P son el fosfato dicálcico dihidratado (DCPD, $CaHPO_4.2H_2O$) y fosfato dicálcico anhidro (DCPA, $CaHPO_4$), también llamados brushita y monetita respectivamente, ambos con relación Ca/P de 1.0. Algunos estudios han demostrado que la brushita es osteoconductiva, osteoinductiva, biocompatible, bioreaborbible y tiene una solubilidad mayor que la HA, factor predominante en las primeras semanas luego de una implantación, ya que aumenta los niveles de calcio y fósforo en la interfase tejido implante, lo que puede llevar a una conversión de un fosfato de calcio como la HA menos soluble (Tamimi, Sheikh, y Barralet, 2012; Türk *et al.*, 2018b). Estas biocerámicas se han usado ampliamente como sustitutos óseos porque promueven la formación de hueso en su superficie y pueden asegurar la curación de hueso en un año (Habraken *et al.*, 2016; Ravarian *et al.*, 2010).

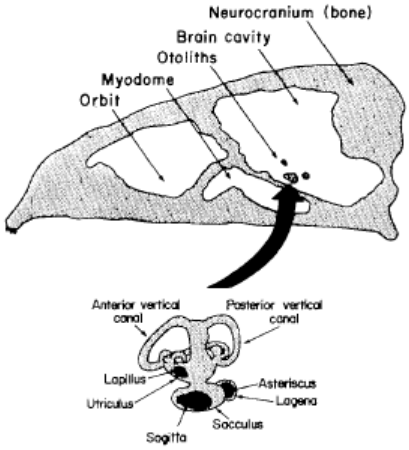
Si se compara los fosfatos cálcicos como TCP con la hidroxiapatita, éstos se degradan más fácilmente que la HA cristalina, siendo la HA la fase más estable de los fosfatos cálcicos (Ergun et al., 2011). La HA se ha investigado para uso en implantes óseos y como material de andamio en ingeniería de tejidos (Kumta et al., 2005). Sin embargo, se ha encontrado que la hidroxiapatita densa obstaculiza el crecimiento óseo debido a su baja biodegradabilidad, por lo que en estos casos funciona mejor β-TCP. Los fosfatos de calcio son sintetizados por técnicas químicas como precipitación acuosa, sol-gel, método hidrotermal y deposición térmica, sin embargo, los costos de materias primas son altos y el rendimiento es pequeño. Otros materiales de origen natural se han empezado a probar para fabricar HA o β-TCP tales como conchas de cardiidae (familia de moluscos) y cáscaras de huevo. La HA obtenida tiene alta habilidad de precipitar apatita (Lertcumfu *et al.*, 2016).

Un material que en esta tesis doctoral se plantea como precursor natural para la obtención de fosfatos de calcio y para funcionalizar nanotubos de carbono multipared son los otolitos o estalotitos (otolith en inglés). Los otolitos son un material que se encuentran en la cavidad interna del oído de los peces, ubicados en el sáculo, utrículo y canales; de unos pocos gramos o miligramos de peso y su morfología depende de la especie. Los otolitos sirven para balance y/o escucha de peces teleósteos (Campana, 1999; Degens *et al.*, 1969). Montañez *et al*., sintetizó fosfatos de calcio (FC) a partir de otolitos de Corvina de Rio por el método de precipitación acusosa. Cambiando el pH y el tiempo de envejecimiento, se encontraron fosfatos de calcio compuestos por HA y β-TCP o HA de tamaño nanométrico (Montañez et al., 2018; Montañez-Supelano et al., 2017).

En Colombia, este material es obtenido por los comerciantes de peces de la familia Sciaenidae de la especie Plagioscion (Plagioscion squamosissimus), llamado comúnmente como Curvinata, Corvina de Rio o Cabeza de Piedra, este material no se consume y es desechado, por lo que el uso de otolitos como precursor de fosfato de calcio podría ser una alternativa viable en la gestión de estos residuos. En la Figura 1 se muestra la locación de los otolitos en el oído interno de los peces.

Figura 1.

Cráneo de peces óseos con locación de los otolitos.



Nota. Tomada de (Degens et al., 1969).

Hay tres pares de otolitos, sagitta (en el sáculo), lapillus (en el utrículo) y asteriscus (en la lagena), en general la sagitta es más grande que lapillus y asteriscus. Un análisis de difracción de rayos X muestra que los otolitos son especies monominerálicas compuestas de aragonita. El otolito crece a partir de un núcleo central de materia orgánica denominado primordium. La matriz orgánica proporciona un soporte que favorece la nucleación de los cristales de aragonita los cuales

crecen en su eje c, por lo que aparentemente la aragonita se encuentra acompañada de proteínas denominadas otolina (Degens et al., 1969; Mulcahy et al., 1979).

1.7 Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono (NTC) fueron descubiertos en 1991 (Sumio Iijima) como nanoestructuras multicapa y en 1993 como nanoestructuras de pared simple, aunque no todos los investigadores dan el crédito a Iijima, ya que un artículo publicado por Radushkevich y Lukyanovich en 1952 describe la síntesis de tubos de carbono que tenían 50 nanómetros de diámetro y un artículo publicado en 1976 por Oberlin y sus colegas describe la formación de fibras de carbono huecas mediante el uso de una técnica de crecimiento de vapor, el tamaño de los tubos formados de escala nanométrica (Sajid *et al.*, 2016). Los nanotubos de carbono (CNTs por sus siglas en inglés) han sido ampliamente estudiados por sus propiedades electrónicas, químicas y mecánicas, lo cual deja a este material en un sinnúmero de aplicaciones potenciales (Eftekhari, 2008). NTC han sido sintetizados como productos de la acción de un catalizador sobre las especies gaseosas procedentes de la descomposición térmica de hidrocarburos (Bhushan, 2010).

1.7.1 Descripción

Los nanotubos de carbono son formados exclusivamente por átomos de carbono dispuestos en una serie de anillos de benceno condensados enrollados en una estructura tubular (Sajid *et al.*, 2016). El carbono tiene una estructura cristalina hexagonal formada por enlaces covalentes fuertes. La energía de enlace carbono-carbono es de 114 Kcal/mol, mientras que la unión entre los planos

es de 4 Kcal/mol. Su buena resistencia se debe a la alta energía de enlace covalente, mientras que la baja energía entre los planos le proporciona a esta estructura un bajo módulo, cercano al del hueso (Kutz, 2009). Basado en el número de capas, los nanotubos de carbono se clasifican en dos estructuras, los nanotubos de carbono de pared simple y los de pared múltiple o multicapa.

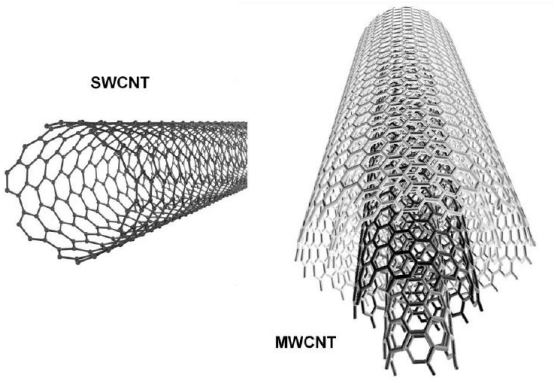
Nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT por sus siglas en inglés): Es una hoja de grafeno enrollada en un cilindro transparente que puede ser al final abierto o cubierto, tiene una alta relación de aspecto con diámetros tan pequeños que varían entre 0,4 y 2 nm y una longitud de varios micrómetros (Sajid *et al.*, 2016). Todos los átomos de carbono están envueltos en anillos aromáticos en donde los ángulos del enlace C=C no son totalmente planares, lo que indica que la hibridación de los átomos no es sp^2 pura y que tiene carácter sp^3 que aumenta a medida que disminuye la curvatura del tubo (Bhushan, 2010).

Nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT por sus siglas en inglés): Constituidos por varias capas de grafeno, con diámetros de 2-2,5 a 100 nm y longitudes hasta 10 µm, tienen una gran versatilidad debido a las diferentes maneras en las que se pueden mostrar. Los nanotubos multicapa más sencillos son los de tipo concéntrico (c-MWNT), en donde los nanotubos de pared simple con diámetros crecientes regularmente están dispuestos coaxialmente separados regularmente por 0,34 nm (Bhushan, 2010; Lawal, 2016). Otros nanotubos multicapa son los llamados espina de pescado (h-MWNT), en donde los grafenos marcan un ángulo con respecto al eje del nanotubo (Assali, 2012).

En la Figura 2 se muestran las estructuras de nanotubos de carbono de pared simple y de paredes múltiples de tipo concéntrico.

Figura 2.

Estructuras de NTC de pared simple y de paredes múltiples de tipo concéntrico.

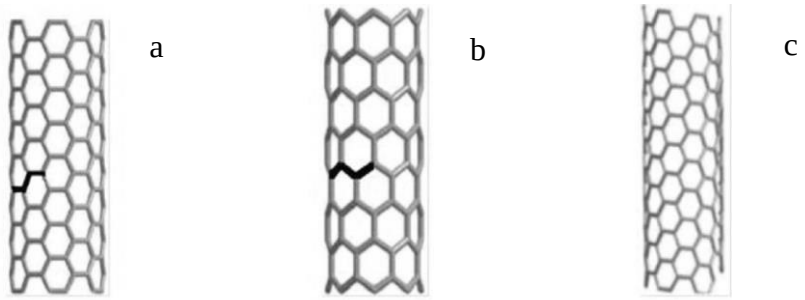


Nota. Tomada de (Jiménez, 2011).

Los nanotubos de carbono se pueden diferenciar en dos zonas: las extremidades y las paredes laterales. Un factor importante que controla estas propiedades únicas proviene de una variación de las estructuras tubulares que son causadas por el enrollado de la hoja de grafeno en un tubo. Hay tres maneras distintas en que el nanotubo se puede presentar dependiendo de su dirección: sillón, zig-zag, y quiral (ver Figura 3).

Figura 3.

Estructuras de nanotubo de carbono (a) sillón, (b) zig-zag, (c) quiral.



Nota. Tomada de (Sajid et al., 2016).

1.7.2 Síntesis

Los nanotubos de carbono son formados por el método de descarga de arco eléctrico, ablación laser y craqueo térmico de hidrocarburos gaseosos o desproporcionamiento de CO, la cual es una variante de la deposición química de vapor, en donde los nanotubos se obtienen a partir de un flujo continuo de monóxido de carbono utilizando pentacarbonilo de hierro ($Fe(CO)_5$) como catalizador (Assali, 2012; Bhushan, 2010).

Método de descarga de arco: En la técnica de arco eléctrico, se exponen dos electrodos al menos uno de ellos de grafito a una diferencia de potencial en corriente continua, en donde en ambos electrodos se produce una descarga eléctrica producida por una corriente de 50 a 100 A y una diferencia de potencial de 20 V. A estas condiciones el ánodo es sublimado, el material sublimado se autoensambla formando los NTC. Algo importante es que si el ánodo es de grafito puro se producirá NTC de paredes múltiples, mientras que para la producción de SWCNT se necesita de catalizadores que estarán como impurezas en el nanotubo (Sajid *et al.*, 2016).

Método de ablación laser: En este método, los electrodos de carbono se usan como fuente mientras pulsos de láser proporcionan la fuente de energía. Impulsos láser sucesivos se utilizan para vaporizar el electrodo objetivo de manera uniforme y se supone que el segundo pulso láser rompe las partículas más grandes sometidas a ablación por la primera. Las partículas más pequeñas a continuación, se convierten en nanotubos de carbono. En este proceso se utilizan como catalizadores metales de transición y los nanotubos obtenidos por este método tienen generalmente un diámetro uniforme de alrededor de 10 a 20 nm mientras que la longitud de los tubos es de aproximadamente 100 micrómetros (Sajid *et al.*, 2016).

Método deposición química de vapor (CVD): Es el método más ampliamente utilizado para la producción a gran escala de nanotubos de carbono. Fuentes de carbono de hidrocarburos como metano (CH_4), acetileno (C_2H_2) y monóxido de carbono (CO) son usadas, mientras que la alta temperatura proporciona energía suficiente para la descomposición de los hidrocarburos para formar nanotubos de carbono. Deposición química de vapor de acetileno usando cobalto o hierro como catalizador y sílice o zeolita como soporte puede dar lugar a la síntesis de grandes cantidades de nanotubos de carbono (en su mayoría SWCNTs) (Lawal, 2016; Sajid *et al.*, 2016).

Otros métodos mencionados para sintetizar nanotubos de carbono son el método síntesis de llama y el método de solución de silano. El método de síntesis de llama es una modificación de la deposición química de vapor, en donde la llama proporciona la fuente de energía y el catalizador (pentacarbonilo de hierro) se agrega con aerosol. En el método de solución de silano (SiH_4), un papel de carbono o una malla de acero inoxidable actúa como sustrato, el cual es sumergido en

una solución de silano que contiene cobalto y níquel como catalizador en una proporción de 1: 1. Después de eso, una fuente de carbono (por ejemplo, etileno) en forma gaseosa se introduce en esta solución y el sustrato se calienta con corriente eléctrica. El calor proporciona la energía para la reacción que resulta en la formación de nanotubos de carbono que están soportados sobre el sustrato (Lawal, 2016; Sajid *et al.*, 2016).

1.7.3 Propiedades

La conductividad de los nanotubos depende de su estructura. Los NTC multicapa se consideran conductores metálicos, mientras que si se trata de nanotubos de pared simple el problema de la conductividad es más complicado. La reactividad de los NTC aumenta con la disminución en el diámetro de nanotubos y depende de su quiralidad, la cual puede afectar la funcionalización o pre tratamiento (Eftekhari, 2008). Los NTC tienen excelentes propiedades mecánicas como dureza, tenacidad, resistencia mecánica, flexibilidad y elasticidad elevadas. Cuentan con un módulo de Young más alto de 1 TPa y una resistencia a la tensión de 63 GPa (Tran et al., 2009). También son estables térmicamente hasta 750°C en aire y cuentan con una baja densidad (1,33-1,4 g/cm^3 para SWCNTs). Los NTC tienen tendencia al empaquetamiento y formar agrupaciones, por lo que en la formación de materiales compuestos es complicado encontrar una buena dispersión (Assali, 2012; Jiménez, 2011).

1.7.4 Toxicidad y purificación

El análisis del impacto de los NTC sobre la salud tiene resultados contradictorios, debido a que los nanotubos de carbono pueden variar en cuanto a sus propiedades físicas y químicas dependiendo de la forma de producción, funcionalización o purificación, diámetro, longitud, tendencia a aglomerarse, impurezas y presencia de catalizadores metálicos (Bhattacharya, Torres, El-Sayed, y Fadeel, 2013; Giuseppa *et al.*, 2015). Algunos estudios muestran que la citotoxicidad es menor si aumenta la funcionalización de los NTC, mientras que otros estudios (por ejemplo funcionalizando NTC con ácidos carboxílicos) muestran que hubo mayor citotoxicidad de los nanotubos funcionalizados comparados con los no funcionalizados (Ursini *et al.*, 2012).

Se han usado los nanotubos de carbono como transporte de biomoléculas, funcionalizando SWCNTs con ADN y proteínas para el estudio de la adsorción de células HeLa y HL60. Los resultados mostraron biocompatibilidad no presentando citotoxicidad (Assali, 2012). La toxicidad de nanotubos depende de la presencia de impurezas provenientes del mismo proceso de obtención, longitud de los tubos y el tipo de funcionalización.

Los nanotubos de carbono generalmente tienen altos niveles de impurezas, como partículas de metal, carbono amorfo (hollín) y cualquier material de soporte (alúmina, sílice, óxido de magnesio o zeolita) que pueden influir en sus propiedades. Se requiere una purificación extensa de los NTC para aplicaciones biomédicas (Sajid *et al.*, 2016). Existen varios métodos para la purificación de los nanotubos de carbono, los cuales se explican a continuación.

Métodos de purificación de NTC: La purificación por oxidación es un método adecuado para eliminar carbono amorfo y catalizadores metálicos, como cobalto, níquel o itrio etc. La oxidación se lleva a cabo a 673 kelvin por 40 min. El método ácido es también útil para reducir la carga de impurezas, adicionalmente los ácidos pueden atacar las terminaciones reactivas de los nanotubos abriendo el mismo y creando ácidos carboxílicos (Harrison y Atala, 2007). En este método, la muestra se somete a reflujo con ácidos como el ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido nítrico. El ácido clorhídrico puede ser más eficaz en la eliminación de las impurezas. Por último, se encuentra el método de sonicación basado en surfactante, en donde este método es usado ya que, en el método de purificación de reflujo ácido, se producen NTC purificados, sin embargo, pueda que los nanotubos atrapen muchas de las impurezas que no se pueden eliminar por filtración simple, por lo tanto, se realiza sonicación con base de tensioactivo. Por lo general, se prefiere el sulfato de dodecil benceno sódico (DBSS) para este propósito. El DBSS se disuelve en un disolvente orgánico como etanol o metanol. La ultrafiltración se realiza seguida de recocido a alta temperatura (1273 Kelvin) en presencia de gas de nitrógeno durante 4 h. El recocido se realiza para optimizar la estructura de los nanotubos (Sajid *et al.*, 2016).

1.7.5 Funcionalización

Los nanotubos de carbono poseen escasa solubilidad en agua y solventes orgánicos, tienden a formar agregaciones en solución, son bioincompatibles y limitan la compatibilidad con matrices poliméricas, por esta razón, los NTC considerados para aplicaciones biomédicas deben cumplir con este requisito básico de la solubilidad (Lawal, 2016). La funcionalización de los NTC es el método más eficaz no sólo puede mejorar su solubilidad acuosa sino también ha mostrado ser

prometedor en la disminución de su toxicidad, lo que mejora la biocompatibilidad (Sajid *et al.*, 2016; Srinivasarao *et al.*, 2016).

La funcionalización de los NTC se clasifica y subclasifica en: funcionalización covalente: Oxidación, reacción de cicloadición, reacción acil peróxido o sulfóxido y funcionalización no covalente.

Funcionalización covalente por oxidación: Hace referencia a la oxidación química de nanotubos de carbono con el fin de incrementar la reactividad dejando grupos funcionales como carboxílicos, carbonil o hidróxidos en los extremos y defectos de los nanotubos, que luego van a servir para otras reacciones adicionales aumentando el carácter hidrofílico, con una pérdida en las propiedades eléctricas y mecánicas. Los agentes oxidantes son por ejemplo el ácido nítrico o ácido sulfúrico. Otra forma de funcionalizar NTC es por reacción directa con la superficie del nanotubo sin un paso intermedio. En el primer caso, la oxidación ácida lleva a la apertura de los extremos de los nanotubos y formación de agujeros en las paredes, lo que lleva a la obtención de grupos funcionales oxigenados, mientras que, para la reacción directa, se necesita de agentes más agresivos como la interacción de la superficie del nanotubo con moléculas de flúor. El fuerte tratamiento en solución de ácido produce defectos en las paredes laterales de los NTC y defectos excesivos pueden alterar las propiedades electrónicas y el tamaño de los NTC, además, aunque la solubilidad acuosa de los NTC oxidados mejore, se observa que, en presencia de sales, se forman agregados de NTC que pueden ser debidos al efecto carga por lo que los NTC oxidados no se pueden utilizar directamente en los sistemas biológicos debido a la posible agregación. Este

problema es objeto de nuevas modificaciones adicionales de los NTC oxidados para hacerlos solubles y estables (Assali, 2012; Bhushan, 2010; Jiménez, 2011; Sajid *et al.*, 2016).

Funcionalización covalente por reacción de cicloadición: Esta reacción se produce en las paredes laterales de los NTC en lugar de los extremos o en los defectos. Las reacciones de cicloadición pueden llevarse a cabo en presencia de una base fuerte para obtener carbenos (R_2C) o por reacción fotoquímica con azidas (N^{3-}) (Sajid *et al.*, 2016; Spitalsky *et al.*, 2010).

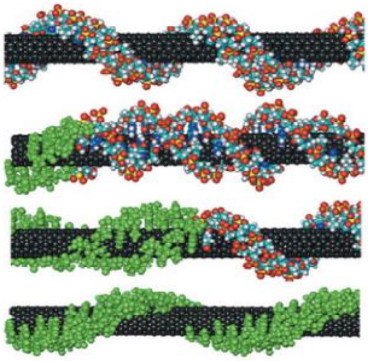
Funcionalización covalente por reacción acil peróxido o sulfóxido: Peróxidos de acilo se pueden utilizar para generar radicales libres de carbono sobre la superficie de los nanotubos de carbono y estos radicales libres luego pueden ser usados para su funcionalización. Este método tiene un potencial para unir una variedad de grupos funcionales a las paredes laterales o al extremo de los NTC a través de enlaces de carbono covalentes, además no destruye la estructura de nanotubos de carbono o introduce defectos en las paredes laterales como en el caso de la oxidación por el uso de ácidos fuertes (Sajid *et al.*, 2016).

Funcionalización no covalente: Los NTC tienen fuertes interacciones interfaciales $\pi - \pi$, estas propiedades también se pueden utilizar para la funcionalización no covalente. Los acoplamientos no covalentes se basan comúnmente en las interacciones hidrofóbicas entre un NTC y una biomolécula. Una ventaja importante de este tipo de funcionalización es la reversibilidad y la integridad estructural del nanotubo (Lawal, 2016).

Un tipo de funcionalización no covalente consiste en la interacción con polímeros, compuestos aromáticos y biomoléculas (ejemplo ver Figura 4).

Figura 4.

Diferentes cadenas de polímeros sobre SWNT.



Nota. Tomada de (Assali, 2012; Bhushan, 2010; Jiménez, 2011).

Otras funcionalizaciones son compuestos de nanotubos-metal y son raramente estudiados. Las matrices incluyen Al, Cu, Mg, Ni, entre otros. Los materiales son generalmente preparados por técnicas metalúrgicas de polvos. Otras técnicas se han usado como plasma spray o solidificación rápida. Los compuestos de matriz cerámica con nanotubos son más usados que los materiales compuestos con metales. Se han preparado estos materiales compuestos por rutas sol gel para obtener nanotubos de carbono con películas delgadas (Bhushan, 2010).

Un ejemplo de lo anterior es la adición de nanotubos de carbono entre Ti e hidroxiapatita (HA), lo cual incrementa la dureza, el módulo elástico y resistencia al cizallamiento. Han sido desarrolladas con éxito capas de hidroxiapatita/nanotubos de carbono sobre titanio o nanotubos de Ti. Ha sido interesante combinar las propiedades biológicas y mecánicas de materiales individuales

como Ti, TiO_2, NTC e HA, capa por capa u obtener un solo material con propiedades mecánicas y biológicas altas (Chetibi *et al.*, 2014).

Por otro lado, los compuestos de matriz polimérica han sido ampliamente reportados y los más estudiados son los materiales de matrices poliméricas epóxicas y poli-metil metacrilato (PMMA) (Bhushan, 2010). Básicamente, para obtener un material compuesto de matriz polimérica, se emplean tres métodos: mezcla en disolución, mezcla en fundido y polimerización in situ. La mezcla en disolución no aplicable a polímeros insolubles, dispersa NTC en una disolución del polímero, el compuesto se obtiene por secado o precipitación del polímero adicionando un precipitante. La dispersión de NTC es complicada, por lo que este método usa bajas proporciones de NTC. El método de mezcla en fundido requiere llevar el polímero a su punto de fusión mezclándolo mecánicamente con los nanotubos, en donde la temperatura y la agitación deben ser altas. De igual manera como en el método de mezcla en disolución, la dispersión de los NTC es complicada. Este método es adecuado para polímeros que no pueden ser solubilizados en solventes comunes. El último método es la polimerización in situ, en donde los NTC son dispersados junto con el monómero para luego efectuar la polimerización, la principal ventaja de este método es que produce tubos de polímero injertado, mezclados con cadenas de polímero libres. Adicionalmente, debido al pequeño tamaño de las moléculas monoméricas, la homogeneidad de los compuestos resultantes es mucho más alta que la de los otros dos métodos. Este método permite cantidades más altas de NTC (Jiménez, 2011; Sahoo, Rana, Cho, Li, y Chan, 2010; Spitalsky *et al.*, 2010).

1.8 Nanotubos de carbono en materiales compuestos y su aplicación en biomateriales

Los nanotubos de carbono han sido investigados para formar materiales compuestos, gracias a la habilidad de ser modificados y funcionalizados, los NTC son candidatos ideales para aplicaciones tales como scaffolds para regeneración ósea, adecuados para nucleación y crecimiento de hidroxiapatita, el mayor componente inorgánico del hueso (Tran *et al.*, 2009). Muchos métodos han sido reportados para fabricación de NTC – HA como precipitación química, deposición química por vapor, deposición electroforética, e injerto de HA in-situ. Neelgund *et al.*, realizaron este último método sobre nanotubos de carbono de pared simple, oxidando primero el nanotubo mediante ácido sulfúrico y ácido nítrico. A los nanotubos oxidados se les agregó hidróxido de calcio y ácido fosfórico bajo ciertas condiciones, los resultados mostraron HA injertada sobre NTC de pared simple (Neelgund et al., 2011).

Xiao *et al.*, usaron el método de biomineralizacion para depositar HA sobre la superficie de polietilenglicol con nanotubos de carbono multipared funcionalizados previamente por medio acido, en donde se encontró que en la superficie del nanotubo se introdujeron grupos carboxílicos e hidroxilos y en particular la unión covalente con polietilenglicol jugó un papel importante en el crecimiento de cristales de HA. La respuesta en biocompatibilidad del material fue excelente, los autores hacen referencia que los nanotubos de carbono tienen alto potencial en aplicaciones de ingeniería de tejidos (Y. Xiao, Gonig, y Zhou, 2010). Estudios de NTC en aplicaciones ortopédicas muestran crecimiento acelerado de hueso in vitro y proliferación de osteoblastos.

La modificación de NTC con fosfatos de calcio también se usó para relleno óseo, con un método muy simple de mezcla de nanotubos hidroxilados con cemento de fosfato de calcio y suero bovino. Las propiedades mecánicas fueron evaluadas y se encontró una resistencia a la compresión de 16 MPa comparado con el cemento solo 1 MPa. Chew *et al.*, concluyeron que los grupos funcionales Ca^{2+} y $PO4^{3-}$ del fosfato establecen atracción con el grupo hidroxilado donde lo esperado es que se promueva el crecimiento de cristales de HA (Chew *et al.*, 2011). Otro estudio de Ahmed *et al.*, usa nanotubos de carbono multipared, carbonato de calcio y quitosano como recubrimiento sobre la aleación Ti6Al4V usada en implantes ortopédicos. El método usado por Ahmed es una mezcla por utrasonicación de los componentes por más de 8 h y posterior recubrimiento con una celda electroquímica sobre una superficie de Ti6Al4V tratada con glutaraldehído para que los grupos funcionales pertenecientes al aldehído tengan interacción con los grupos funcionales del quitosano. La introducción de nanotubos de carbono y el carbonato de calcio incrementan la resistencia a la transferencia de carga, lo que hace que la superficie de Ti6Al4V se proteja de mejor manera (Ahmed et al., 2013).

Prodana *et al.*, funcionalizaron nanotubos de carbono con grupos –COOH por medio ácido para encontrar nanotubos oxidados MWCNT-COOH. Los autores electrodepositaron hidroxiapatita (HA) para obtener un material híbrido MWCNT-COOH-HA con una codeposicion de este material sobre nanotubos de TiO_2. Se observó biocompatibilidad en términos de integridad de membrana y viabilidad celular. No hay efecto citotóxico de ninguno de los materiales. Se concluye que el hecho de introducir nanotubos de carbono funcionalizados con HA incrementa la microdureza y el índice hemolítico del material, al mismo tiempo que decrece el ángulo de contacto encontrando una superficie bastante hidrofílica (Prodana *et al.*, 2015).

Se han probado varios métodos para dispersar nanotubos de carbono y recubrir superficies metálicas empleadas en ortopedia. De acuerdo con Barabás *et al.*, probando dos solventes, método de precipitación y método de agitación mecánica, el mejor resultó ser el de precipitación en términos de dispersión de los nanotubos de carbono (Barabás *et al.*, 2015). Otro método como impregnación bajo vacío se usó para recubrir una superficie de dióxido de titanio con nanotubos de carbono carboxilados e hidroxiapatita. De nuevo como describe Chetibi *et al.*, grupos funcionales de NTC carboxilados con hidroxilos provenientes de la reacción de TiO_2 con agua interaccionan para formar el compuesto NTC - TiO_2 para luego depositar HA. La microestructura de la superficie se mostró homogénea y densa. Los recubrimientos mostraron ser adherentes y tener buena resistencia a la corrosión en SBF analizado mediante ensayos de polarización cíclica (Chetibi *et al.*, 2014).

Además de la funcionalización de nanotubos de carbono con grupos funcionales como hidroxilos y carboxílicos, y fosfatos de calcio, métodos de dispersión en matrices poliméricas se han estudiado. Liao *et al.*, prepararon un biocomposite reforzado con nanotubos de carbono e hidroxiapatita, usando polipropileno como matriz polimérica. Este biocomposite fue preparado por el método de mezcla por ablandamiento o fusión del polímero por calor por medio de extrusión junto con NTC e HA. La respuesta de proliferación de osteoblastos confirma la viabilidad del material para su uso en reemplazo de hueso, así mismo las propiedades mecánicas y estabilidad térmica estuvieron dentro de los rangos esperados (Zhu *et al.*, 2013). Poli metil-metacrilato (PMMA) ha sido muy estudiado para ser usado como relleno óseo. Ormsby *et al.*, se interesaron en observar la biocompatibilidad y fatiga del compuesto PMMA-NTC. El material compuesto se preparó por mezcla mediante un desintegrador ultrasónico. Procesos de adherencia y viabilidad

celular de osteoblastos dejaron claro que el material es biocompatible para que se integre adecuadamente con el hueso (Ormsby *et al.*, 2012). Musto *et al.*, prepararon composites de un copolímero PHBV/PBAT (poli hidroxi butirato covalerato/ poli butileno adipato co-tereftalato) con relleno de nanotubos de carbono con diferentes proporciones de radio (η=L/D). En la formación de composite, todas las mezclas se hicieron con contenidos de nanotubos de C hasta 1,5% usando un mezclador polilab a 175°C y 60 rpm por 7 min. La respuesta en conductividad se evaluó y hubo un aumento en la conductividad cuando se aumenta la concentración de nanotubos de carbono en %vol. (Musto *et al.*, 2015).

Polímeros completamente degradables como policaprolactona se han evaluado con NTC multipared en una preparación sencilla con cloroformo como solvente del polímero y mezcla con los nanotubos de carbono. La respuesta en adhesión y proliferación de células óseas de ratas mostraron que los compositos con 0.5% en peso de NTC mostraron más proliferación que con altas concentraciones de nanotubos, sin embargo, todos los compositos fueron biocompatibles (Pan *et al.*, 2012). Mattioli *et al.*, reportan scaffolds de policaprolactona y nanotubos de carbono, las propiedades mecánicas del scaffold mejoró con la adición de NTC hasta una concentración de 12.5 mg/ml, ya que después de esta concentración el módulo elástico desciende debido a fuerzas electrostáticas de NTC, además, el scaffold soportó de manera adecuada osteoblastos tipo MG63, este compuesto puede representar un soporte adecuado para aplicaciones en ingeniería de tejidos (Mattioli *et al.*, 2012). Montañez *et al*., reportaron recubrimientos de PCL con NTC multipared en diferentes concentraciones de 0.0, 0.5, 1.0 y 1.5 g/L realizados con la técnica de spin-coating. Se mostró que al aumentar el número de días en inmersión en SBF aumenta la resistencia del recubrimiento a la degradación, especialmente para los de mayor concentración de NTC, así como

aumenta el ángulo de contacto. Se evidencia que existe un proceso de adsorción de iones del SBF hacia los recubrimientos, lo que les atribuye una buena interacción con el medio fisiológico simulado. Adicionalmente, estos recubrimientos con fosfatos de calcio (PCL/FC/NTC) con las misma concentración de NTC, mostraron que la viabilidad celular con células de tipo osteoblástico disminuye al aumento de NTC; sin embargo, no se consideraron tóxicos a las células (Montañez et al., 2020; Montañez-Supelano et al., 2019).

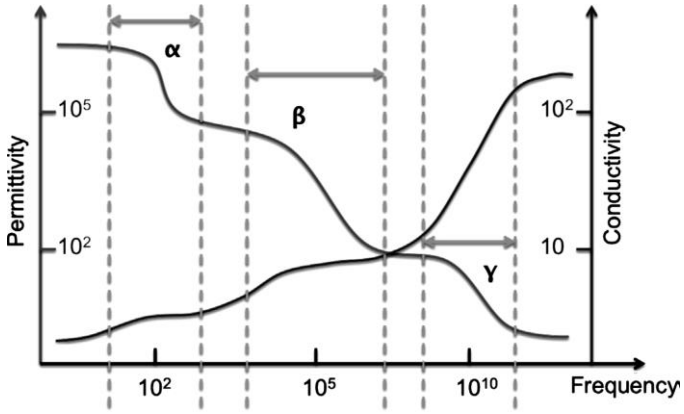
Otro polímero degradable es el ácido poli láctico (PLA) es un polímero ampliamente usado como biomaterial, por su biocompatibilidad y capacidad de degradación a ácido láctico, lo cual puede ser metabolizado por el cuerpo humano (Obarzanek *et al.*, 2014). Material compuesto de PLA con nanotubos de carbono fue preparado por el método de moldeo con disolvente. El material compuesto resultó en un incremento de la dureza y el módulo elástico en todas las composiciones agregadas de NTC, además, estudios con células osteoblásticas muestran que este material es citocompatible, las células se adhieren y proliferan correctamente en 2, 5 y 10 días (Leal et al., 2016). Estudios de biomineralización se han llevado a cabo en NTC de pared múltiple funcionalizados en matrices de ácido poliacrílico y poliacrilamida con el fin de observar el crecimiento de cristales de HA. Los polímeros se unieron a los NTC mediante foto inicialización de los monómeros. Li *et al.*, concluyeron que los grupos funcionales afectan la nucleación de los cristales de HA, ya que las cargas de estos afectan la relación calcio – fósforo. Sin embargo, la modificación superficial del material puede ser una estrategia promisoria de compuestos para regeneración ósea (X. Li *et al.*, 2014).

1.9 Métodos electroquímicos, microbalanza de cristal de cuarzo y piezorespuesta de fuerza atómica en la evaluación de biomateriales

Espectroscopia dieléctrica en tejidos biológicos ha sido ampliamente investigada. La permitividad relativa y la conductividad siguen el comportamiento mostrado en la Figura 5. Existen cuatro tipos de dispersiones descritas por Schwan (1957), dispersiones α (10 Hz a pocos kHz) asociadas con procesos de difusión de especies iónicas correlacionadas con el potencial de membrana celular, dispersiones β (1 kHz a varios MHz) debidas a la polarización interfacial a través de la membrana plasmática celular y sus interacciones con los electrolitos intra y extra celular, dispersiones δ asociadas a momentos dipolares de moléculas largas tales como las proteínas y dispersiones γ (> 10 GHz) causadas por el contenido acuoso de especies biológicas en presencia de moléculas pequeñas. Generalmente, las características dieléctricas de suspensiones celulares están dadas por la dispersión β el cual se debe a la polarización interfacial y a las interfases interna y externa de las células (Dean *et al.*, 2008; Heileman *et al.*, 2013; Ron *et al.*, 2010).

Figura 5.

Espectro de permitividad y conductividad en sistemas biológicos.



Nota. Tomada de (Heileman *et al.*, 2013).

La permitividad eléctrica del hueso incrementa dramáticamente con el incremento de la humedad y la disminución de la frecuencia. Aunque la investigación acerca de cómo afecta el campo eléctrico al hueso se ha hecho desde el siglo XIX, este fenómeno no es todavía totalmente entendido (Ciuchi et al., 2010). A partir de datos obtenidos por la técnica espectroscopia de impedancia electroquímica es posible encontrar el espectro característico de permitividad y conductividad eléctrica del sistema biológico en estudio.

Otro método electroquímico interesante aplicado sobre sistemas biológicos es la voltametría cíclica. Este método provee información acerca de la identificación de especies activas electroquímicas y las reacciones que ocurren en la muestra (Ismail *et al.*, 2008). La respuesta en corriente es el resultado de procesos farádicos y no farádicos que están ocurriendo en el electrodo de trabajo, los procesos envuelven la reorganización de la doble capa iónica en la interfase sólido

líquido como resultado de las condiciones eléctricas impuestas y la transferencia electrónica en esa interfase (Izquierdo y Kranz, 2016).

La microbalanza de cristal de cuarzo (QCM por sus siglas en inglés), es un sensor que detecta principalmente los cambios másicos de una película mediante los cambios de frecuencia de un cristal de cuarzo piezoeléctrico al ser modificado por una pequeña cantidad de masa. Ha sido ampliamente usada en varios bioanálisis tales como detección de enzimas, ADN y bacterias. Los últimos usos de la QCM son la detección de células que se adhieren a la superficie del sensor, y los procesos de adhesión celular controlados mediante los cambios de frecuencia de resonancia de la QCM (Jia et al., 2008). El mecanismo de detección fundamental de una QCM se basa en la detección del desplazamiento de frecuencia resonante causada por la carga de masa superficial. Los sensores QCM han sido ampliamente desarrollados para la detección de masa con una sensibilidad muy alta (aproximadamente 1 ng/cm^2 por Hz). La correlación entre la masa acumulada sobre el sensor y la frecuencia se obtiene por medio de la ecuación de Sauerbrey (Ecuación 5) (P. Wang *et al.*, 2015).

$$\Delta f = f_1 - f_0 = -\frac{2f_0^2}{Z_q}\frac{\Delta m}{A} \quad (5)$$

Donde Δf es el desplazamiento de frecuencia debido a la carga superficial, f_0 y f_1 son las frecuencias de resonancia sin y con carga superficial respectivamente. Z_q es la impedancia acústica característica del cristal de cuarzo y m/A es la masa superficial por unidad de área de detección.

Piezorespuesta de fuerza atómica (PFM por sus siglas en inglés) sondea la deformación mecánica de una muestra en respuesta a un campo eléctrico aplicado con la punta de un microscopio de fuerza atómica. Esta técnica usada para estudiar materiales ferroeléctricos inicialmente se ha utilizado para investigar la funcionalidad electromecánica en una amplia gama de materiales piezoeléctricos incluidos los sistemas orgánicos y biológicos. El principio de la técnica PFM consiste en una punta de AFM conductora (metal recubierto) se pone en contacto con la superficie de una muestra, mientras el otro lado de la muestra está conectado a un electrodo de fondo como una conexión a tierra. A la punta se le aplica un voltaje (Vtip) o en otros casos al electrodo de fondo (Ecuación 6) (D Denning et al., 2016).

$$V_{tip} = V_{dc} + V_{ac} \cdot cos(\omega t) \quad (6)$$

Donde ω es la frecuencia escogida y Vdc es el voltaje de polarización. Se mide entonces la deformación mecánica como respuesta al voltaje aplicado, por el efecto piezoeléctrico inverso. El desplazamiento de la superficie se detecta a través del movimiento del cantiléver del AFM monitoreado por la deflexión del haz óptico, asumiendo que el desplazamiento de la punta es igual al desplazamiento en la superficie de la muestra (Denning *et al.*, 2016).

Por otro lado, polímeros piezoeléctricos se han investigado para aplicaciones en regeneración ósea por la propiedad de piezoelectricidad del hueso, como el polipirrol (PPy) y polianilina (PANI), sin embargo, estos polímeros carecen de biodegradabilidad, lo que puede causar inflamación crónica en un implante (Ribeiro *et al.*, 2015), por esta razón otros polímeros degradables biocompatibles se han probado como los mencionados anteriormente. Uno de los

primeros estudios de la respuesta piezoeléctrica de hueso humano los hizo Iwao Yasuda en 1955, luego Fukada se unió a los estudios de Yasuda. Se designó el eje del hueso como la dirección de la longitud de un cilindro, de acuerdo con esta convención las fibras de colágeno hacen una espiral a lo largo del eje. La constante piezoeléctrica de un hueso humano se midió como $2.9X10^{-9}$ c.g.s.e.s.u (unidades electrostáticas), lo que equivale alrededor de la décima parte de la constante piezoeléctrica del cuarzo (Eiichi Fukada y Yasuda, 1957).

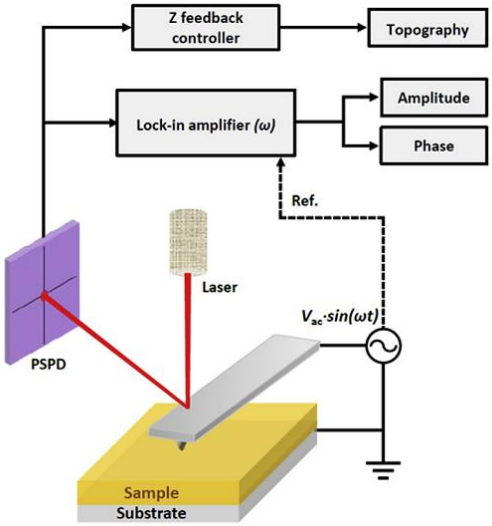
Años más tarde se midieron las constantes piezoeléctricas de las proteínas, específicamente de interés el colágeno de diferentes partes; hueso, tendón y piel, los resultados fueron 0.2, 2.0 y 0.2 pC/N respectivamente, mientras que la constante del cuarzo es 2.2 pC/N (E Fukada, 1995). Se reporta que el tejido óseo muestra un coeficiente piezoeléctrico de 0.7 pC/N, en donde se ha demostrado que biológicamente responde a estrés micromecánico tales como el movimiento del cuerpo (Y. Zhang *et al.*, 2014). Este último dato del coeficiente piezoeléctrico es mayor que el presentado para colágeno presente en hueso, lo que indica que los cristales de hidroxiapatita también contribuyen al efecto piezoeléctrico del hueso.

Estudios de la respuesta piezoeléctrica de hueso humano usando microscopia de fuerza de piezorespuesta a escala nanométrica dan como resultado una constante piezoeléctrica de 7.66 – 8.72 pC/N tomados en diferentes puntos de la muestra de hueso (Halperin *et al.*, 2004). Estos resultados son muy diferentes a los reportados anteriormente, los autores atribuyen esta gran diferencia a que la punta del AFM sigue una medición nanométrica directamente en la matriz de colágeno y que la respuesta piezoeléctrica depende del hueso humano específico.

La técnica de piezorespuesta de fuerza atómica (PFM), se basa en el efecto piezoeléctrico inverso, en donde las oscilaciones piezoeléctricas son inducidas por un voltaje sinusoidal aplicado por la punta del AFM y detectado por la señal de deflexión del cantiléver (Brubaker et al., 2016). La respuesta electromecánica en PFM se puede dar en términos de amplitud (A) y fase (φ), comparando el voltaje AC de entrada con las vibraciones periódicas (señal de la muestra) usando un amplificador de bloqueo como se observa en la Figura 6.

Figura 6.

Configuración esquemática para PFM.



Nota. Tomada de (Seol et al., 2017a).

PFM mide la deformación bajo un campo externo eléctrico aplicado en materiales piezo-ferroeléctricos, puede medir amplitud, fase, frecuencia de resonancia, y energía disipada (Q) por el seguimiento de la frecuencia de resonancia en un rango de frecuencia predeterminada. En otras palabras, la frecuencia de resonancia es determinada por las propiedades de contacto de la superficie de la punta, lo cual provee una medida de las interacciones de la superficie de la punta.

Los parámetros de piezorespuesta (amplitud y fase), frecuencia de resonancia de contacto y energía de disipación Q, pueden ser medidos y mostrados en diagramas 2D simultáneamente, dichos parámetros son independientes. Los resultados de estos diagramas y la distribución de los parámetros anteriormente mencionados, cambiando las condiciones de los compuestos pueden mostrar por ejemplo grados de rigidez del material y energía disipada (J. Xiao et al., 2017).

2 Objetivos e hipótesis

2.1 Objetivo general

Evaluar el comportamiento piezoeléctrico, electroquímico y bioactivo de nanotubos de carbono funcionalizados embebidos en matrices poliméricas para uso en dispositivos de ortopedia, mediante técnicas electroquímicas, piezorespuesta de fuerza atómica y microbalanza de cristal de cuarzo.

2.2 Objetivos específicos

- Funcionalizar nanotubos de carbono multipared con carbonato de calcio natural y fosfatos de calcio con precursor natural, determinando sus diferencias químicas y morfológicas mediante técnicas de DRX, FTIR, Raman, AFM, SEM-EDS y TEM.
- Obtener un recubrimiento de material compuesto de nanotubos de carbono funcionalizados embebidos en matrices de policaprolactona (PCL) y colágeno sobre material de osteosíntesis empleando técnicas de deposición de películas delgadas.
- Evaluar la respuesta piezoeléctrica y electroquímica del material compuesto funcionalizado mediante espectroscopia de impedancia electroquímica, voltamperometría cíclica, piezorespuesta de fuerza atómica y microbalanza de cristal de cuarzo.
- Evaluar la influencia de la funcionalización de nanotubos de carbono sobre la respuesta de células de osteosarcoma humano HOS (adhesión y proliferación) y citotoxicidad, por análisis bioquímico y microscópico.

2.3 Hipótesis

Recubrimientos poliméricos reforzados con nanotubos de carbono (NTC) depositados sobre Ti6Al4V adquieren la propiedad de piezorespuesta al funcionalizar los NTC con fosfatos de calcio, permitiendo mejorar la adhesión de células osteoblásticas (HOS) y la producción de fosfatasa alcalina al incrementar la capacidad de generar gradientes de carga eléctrica en los procesos de adhesión y crecimiento celular.

3 Síntesis y caracterización de cerámicos cálcicos provenientes de otolitos de la especie Plagioscion Squamosissimus

3.1 Introducción

Los fosfatos de calcio (FC), son ampliamente utilizados en recubrimientos o implantes tipo scaffold para mejorar la unión entre el hueso y el implante. Los FC más conocidos son el fosfato beta-tri-cálcico ($Ca_3(PO_4)_2$, β-TCP) y la hidroxiapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, HA), los cuales han sido utilizados en terapias correctivas para defectos óseos y enfermedades (Ergun *et al.*, 2011; Kumta *et al.*, 2005; McEntire, Bal, Rahaman, Chevalier, y Pezzotti, 2015). La HA tiene una excelente biocompatibilidad, sus componentes son similares a los de hueso natural y dientes. El β-TCP es un fosfato de calcio con relación calcio fósforo de 1.5, ha sido propuesto para aplicaciones ortopédicas porque su tasa de bioresorción es más alta comparada con la hidroxiapatita pura. No obstante, la hidroxiapatita en tamaño nanométrico incrementa la bioactividad en biomateriales (Shojai et al., 2013). Una mezcla de HA y β-TCP denominada "fosfato de calcio bifásico (BCP)" fue introducida inicialmente por Moore y Anuta en 1985. El BCP consiste en una mezcla de fases FC con un radio molar Ca / P diferente (Ebrahimi, Botelho, y Dorozhkin, 2017; Lertcumfu *et al.*, 2016). Ambos fosfatos muestran diferentes capacidades de resorción, por lo que un adecuado balance entre HA y β-TCP combina las propiedades mecánicas, biodegradabilidad y estabilidad de las fases (Marques *et al.*, 2017; Shim *et al.*, 2017).

Sin embargo, hay controversias en la cantidad apropiada de cada una de las fases de calcio presentes y las propiedades fisicoquímicas del BCP, ya que por un lado el fosfato tricálcico tiene una alta solubilidad biológica relativa y por otro lado la HA cuenta con una disolución parcial en medio biológico, lo que hace que aumente la concentración local de iones de fosfato (HPO_4^{2-}, PO_4^{3-}) y de calcio (Ca^{2+}), seguido de la precipitación de fosfato de carbonato cálcico, estos precipitados inducen el crecimiento de hueso al implante por atracción de osteoblastos, seguido los osteoclastos disuelven los precipitados carbonosos en hueso nativo, en los defectos de la baja resorción de HA. La cinética de reabsorción rige la fijación del implante y por lo tanto la formación de hueso (Ebrahimi y Botelho, 2017; Ebrahimi *et al.*, 2017; McEntire *et al.*, 2015).

Los fosfatos de calcio se sintetizan mediante técnicas químicas tales como precipitación acuosa, sol-gel, método hidrotérmico y deposición térmica. Los costos de la materia prima para la síntesis son altos y el rendimiento es pequeño. Otros materiales de origen natural han empezado a ser probados para sintetizar fosfatos de calcio, tales como conchas de cardiidae (familia de moluscos) y cáscaras de huevo. La HA obtenida tiene alta capacidad para precipitar apatita (Ebrahimi y Botelho, 2017; Lertcumfu *et al.*, 2016; Medvecky, Sopcak, Durisin, y Briancin, 2011).

Un material natural no muy estudiado en este tipo de aplicaciones son los otolitos. Los otolitos se encuentran en la cavidad del oído interno de los peces teleósteos, situado en el sáculo, el utrículo y los canales, tiene unos pocos gramos o miligramos de peso y su morfología depende de la especie. Un análisis de difracción de rayos X muestra que los otolitos son especies monominerálicas compuestas de aragonita (Degens et al., 1969). El otolito crece a partir de un núcleo central de material orgánico llamado primordio. La matriz orgánica proporciona un soporte

que favorece la nucleación de cristales de aragonita que crecen en su eje c, por lo que aparentemente la aragonita está acompañada de proteínas llamadas otolina (Degens *et al.*, 1969; Mulcahy *et al.*, 1979; Wojtas *et al.*, 2015). En un ensayo de biocompatibilidad en ratones, tubos de polietileno que contenían otolitos se implantaron subcutáneamente en la parte posterior de ratones Wistar. Los resultados de esta investigación mostraron que después de 30 días el tejido que rodea los implantes estaba compuesto de fibroblastos y nuevas fibras de colágeno corrugado (Santos *et al.*, 2013). En la presente investigación se utilizaron otolitos de peces de la familia Sciaenidae de la especie Plagioscion Squamosissimus, comúnmente llamada en Colombia Curvinata, Corvina de río o Cabeza de piedra. A partir de los otolitos se sintetizaron fosfatos de calcio con características fisicoquímicas adecuadas para ser utilizados en aplicación biomédica.

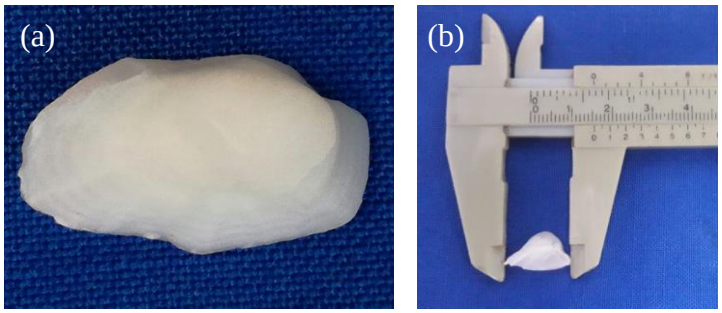
3.2 Metodología

En Colombia la especie Plagioscion Squamosissimus está distribuida en Orinoquía, Amazonía y Magdalena, y se pesca para consumo humano. El material otolito (Figura 7 (a)) fue recolectado de peces Corvina de Rio provenientes de Orocué – Casanare – Colombia, presenta en su aspecto a simple vista unos anillos alternados que llamaremos “zona blanca” y “zona translúcida”, esto se interpreta comúnmente para representar anillos de crecimiento anuales o estacionales que permiten estimar la edad del pez (Degens *et al.*, 1969). Los otolitos fueron caracterizados fisicoquímicamente para evaluar la posibilidad de su uso como materia prima en la síntesis de fosfatos cálcicos. En la Figura 7 (b), se muestra un corte transversal del otolito de ancho 1,5 cm aproximadamente y se evidencia la zona blanca y translúcida. Debido al uso de este material, esta investigación solicitó aval del Comité de Ética en Investigación Científica de la

Universidad Industrial de Santander, el cual fue otorgado por acta No. 25 del 16 de diciembre de 2016.

Figura 7.

Otolito de la especie Plagioscion Squamosissimus, (a) completo, (b) sección transversal.



Inicialmente, los otolitos se lavaron con etanol y agua desionizada por sonicación durante 1 hora para cada solución y se dejaron secar en una cámara de bioseguridad de flujo laminar horizontal durante 30 min. La frecuencia de vibración y naturaleza de los átomos presentes en el biomineral se evaluó mediante espectroscopia Raman (Labram HR Evolution HORIBA Scientific) a temperatura ambiente, usando un láser de 532 nm, una potencia de 50 mW, tiempo de adquisición de 7s y tiempo de acumulación de 5s. Las micrografías del otolito se llevaron a cabo en el equipo de microscopia electrónica de barrido SEM Evo Ma10 Carl Zeiss (Oxford Instruments) con una distancia de trabajo de 24.5 – 25.5 mm, detectores de electrones secundarios y un voltaje de 30 kV, para esto, se llevó a cabo un cubrimiento con oro (Quorum Q1SORES) en el vacío durante 100 s, produciendo una capa de espesor de aproximadamente 6 nm.

La evaluación de la fase cristalina se llevó a cabo por difracción de rayos X (DRX Avance Bruker D8, Alemania) en 2θ = 20 - 70 °. El análisis cualitativo de la fase presente en los otolitos se realizó comparando el perfil observado con los perfiles de difracción reportados en la base de datos PDF-2 del Centro Internacional de Difracción de Datos (ICDD por sus siglas en inglés). El análisis cuantitativo de las fases se realizó por refinamiento mediante el método Rietveld del perfil observado, añadiendo una cantidad estándar interna conocida (óxido de aluminio, malla -100, 99%, corindón (Al_2O_3) fase α, Aldrich n.º 23474-5), correspondiente a 20 %.

Para sintetizar el fosfato de calcio a partir de otolitos, éstos se molieron en un molino de bolas para reducción de tamaño y homogeneización (Retsch PM 1000) durante 6 min a 500 rpm y 10 s de intervalo. El material natural se calcinó a 1000 °C durante 2 h a una velocidad de calentamiento de 2 º C/min para producir óxido de calcio (CaO). Dado que el CaO es altamente higroscópico, se formó hidróxido de calcio ($Ca(OH)_2$) según la Ecuación 7.

Se mezcló una solución de ácido fosfórico 0,6 M (H_3PO_4 al 85%, Merck) con una dispersión de hidróxido de calcio 1 M del obtenido de la calcinación de los otolitos hasta llegar a un valor de pH específico, a una velocidad de 5 ml/min con agitación continua a 90 ºC durante 1 h y otra hora más sin temperatura. La mezcla se dejó sin agitación durante 48 h a temperatura ambiente. Inicialmente se llevó a cabo la reacción a pH 4, 5 y 6. De acuerdo con los resultados obtenidos y con el fin de aumentar la cantidad de la fase hidroxiapatita, se decidió ampliar el tiempo de precipitación a otros cuatro valores de pH 5, 6, 8 y 10. Los fosfatos de calcio precipitados se lavaron con agua desionizada y se secaron durante 24 h a 105 °C. Con el fin de obtener un BCP, la calcinación se llevó a cabo por encima de 700 °C, ya que se conoce que por encima de esta

temperatura, la hidroxiapatita puede ser descompuesta en β-TCP y CaO (Fathi et al., 2008). La reacción de la Ecuación 8 (Sequeda et al., 2012) se llevó a cabo a 1050 °C durante 3 h.

$$CaCO_3 \xrightarrow[1000°C]{} CaO \xrightarrow[H_2O]{} Ca(OH)_2 \quad (7)$$

$$10Ca(OH)_2 + 6H_3PO_4 \xrightarrow[1050°C]{} Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 18H_2O \quad (8)$$

El análisis cuantitativo de las fases por DRX se realizó por refinamiento mediante el método Rietveld del perfil observado, añadiendo una cantidad Al_2O_3 fase α, correspondiente a 21.69, 21.52, 20.93, 20.82, 20.61, 21.35 y 19.60 % en peso para pH 4, 5 y 6 (48 h), 5, 6, 8 y 10 (96 h) respectivamente. Las condiciones de medición fueron a un voltaje de 40 kV, una corriente de 40 mA, muestreo de 0,02 ° y tiempo de muestreo de 0,6 s.

La morfología de las muestras obtenidas se analizó por microscopia electrónica de barrido (SEM Evo Ma10 Carl Zeiss, acoplado con la técnica espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS)), electrones secundarios, con una distancia de trabajo de 8.0-8.5 mm y un voltaje de aceleración de 15-20 kV. Los grupos funcionales de FC se verificaron mediante espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) en un espectrómetro Nicolet iS50 con la técnica de reflexión total atenuada ATR en un intervalo de 4000 a 400 cm^{-1}, con 32 scans a una resolución de 4 cm^{-1}, así como la frecuencia de vibración y naturaleza de los átomos presentes se evaluó mediante espectroscopia Raman (Labram HR Evolution HORIBA Scientific) usando un láser de 532 nm.

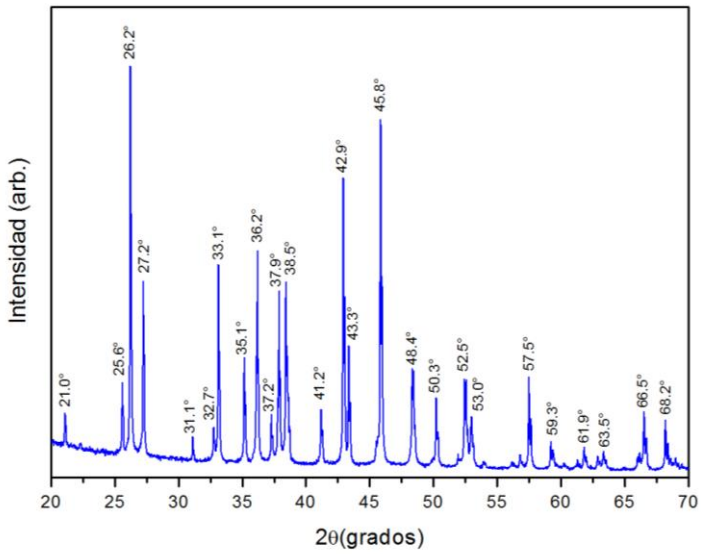
3.3 Resultados

3.3.1 Caracterización de otolitos de Plagioscion Squamosissimus

El patrón de difracción de rayos X del polvo de otolito se muestra en la Figura 8. En el análisis cuantitativo de DRX se encontró un 82.5 % en peso de la fase cristalina aragonita ($CaCO_3$) y 17,5 % en peso de amorfos.

Figura 8.

Patrón de difracción de polvo de otolitos de pez.

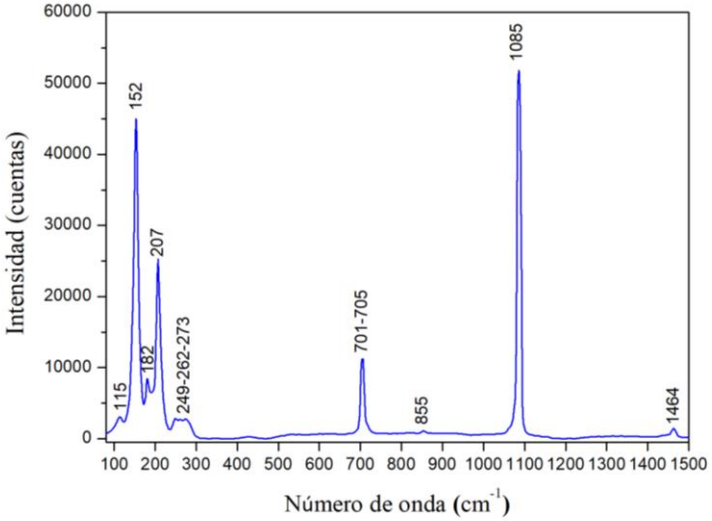


El perfil observado de DRX muestra los picos principales para este tipo de carbonato de calcio que coincide con la tarjeta PDF 000-75-2230 del ICDD. Según Pattanaik, el crecimiento de la matriz cálcica está mediado por factores cinéticos tales como el grado de supersaturación de carbonato de calcio que favorece la formación de aragonita (Pattanaik, 2005). Además, otras condiciones ambientales como la temperatura, la contaminación y la actividad biológica afectan la formación de la estructura biomineral (Yan *et al.*, 2012).

La Figura 9 muestra el espectro Raman de otolitos de pez en polvo. La cristalización del carbonato de calcio en su fase de aragonita se muestra marcada por los picos principales 152, 207, 701-705 y 1085 cm^{-1}. Las bandas entre 115 y 273 cm^{-1} fueron asignadas a los modos vibracionales de la celda, dos bandas de 701 y 705 cm^{-1} fueron atribuidas a flexión plana de CO_3, 855 cm^{-1} al enlace δ(CCH) y estiramiento de C-C, 1085 cm^{-1} al estiramiento simétrico de C-O y la banda de 1464 cm^{-1} al estiramiento asimétrico de CO_3. Ambas bandas de 855 y 1464 cm^{-1} son también atribuidas a los modos vibracionales de fracciones orgánicas en el otolito como la prolina, ácido glutámico y serina (Jolivet et al., 2013). Esta estructura biomineral no puede formarse en ambientes abiológicos y está acompañada por glicoproteínas ácidas, parte del porcentaje de amorfo se debe al contenido de grupos ácidos en las proteínas, que están implicados en procesos de biomineralización, y que dan lugar a una mayor capacidad de atraer iones Ca^{2+}, la estructura puede construir estructuras de gel insolubles en agua en las matrices biominerálicas. Debido a que las proteínas no son fácilmente separables, la identificación es muy complicada (Tohse, Saruwatari, Kogure, Nagasawa, y Takagi, 2009; Wojtas *et al.*, 2015; Wojtas, Wozcyrz, Ozyhar, y Dobryszycki, 2012).

Figura 9.

Espectro Raman de polvo de otolitos de pez.



Las micrografías SEM de otolito de pez muestran diferentes morfologías en su superficie exterior. Dos otolitos de diferente tamaño se observaron, otolito 1 (OTH1) y otolito 2 (OTH2) donde OTH1 es más grande que OTH2 y el tamaño del otolito está directamente relacionado con el crecimiento del pez. En OTH1, se marcó la zona blanca y la zona translúcida (Figura 10). El área translúcida muestra una estructura agregada en forma de copos formados a partir de pequeños cristales de aragonita (Figura 10 (b)). Estos cristales son similares en apariencia a los otolitos de los peces de Hoplostethus Atlanticus, que se describieron como aragonita (Gauldie, R, 1993). La zona blanca tiene agregados en la misma dirección que los descritos anteriormente, sin embargo, la morfología no es la misma, y los cristales de aragonita no son tan evidentes (Figura 10 (a)). A pesar de ello, no hubo diferencias significativas en el porcentaje de calcio en el análisis EDS de las dos zonas, estos porcentajes oscilaron entre el 18 y el 22% (porcentaje atómico) de calcio.

Figura 10.

Micrografía SEM de otolito de pez OTH1. a) zona blanca, b) zona translúcida

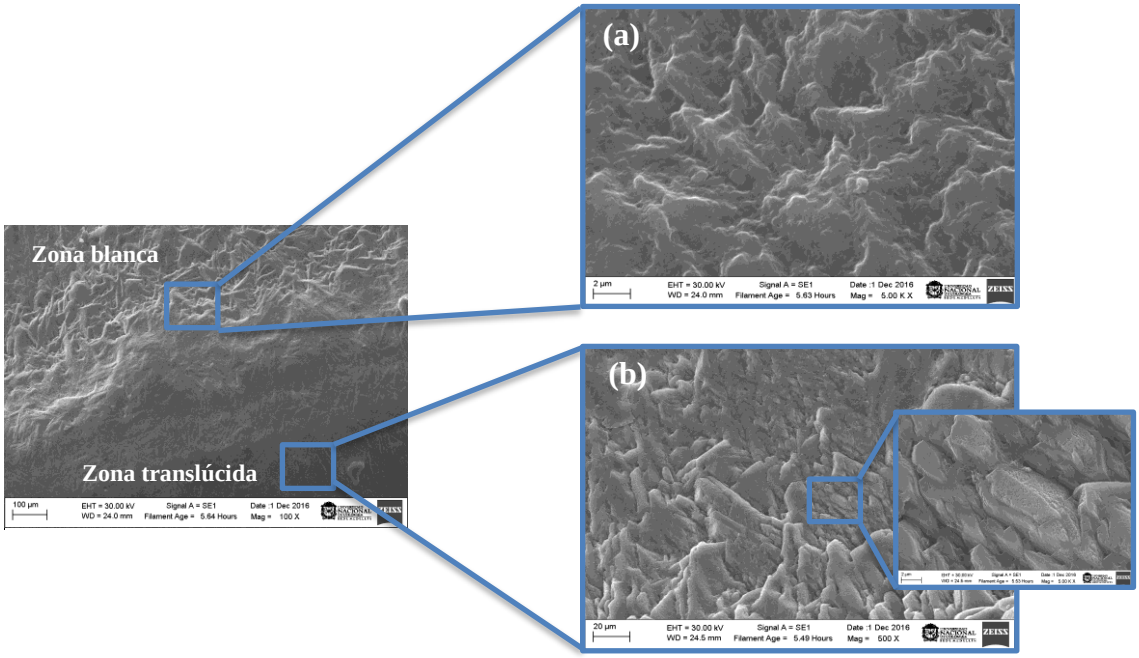
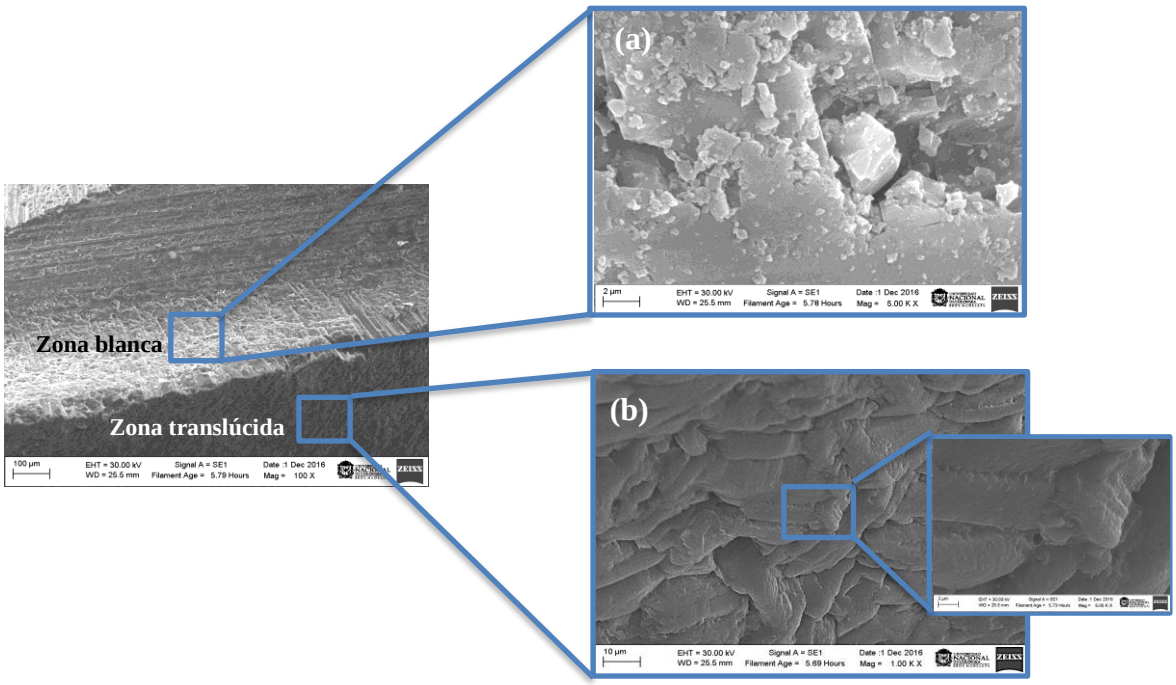


Figura 11.

Micrografía SEM de otolito de pez OTH2. a) zona blanca, b) zona translúcida



Para OTH2, la zona blanca se diferencia más con respecto a OTH1 (Figura 11), sin embargo, para la zona translúcida, los cristales de aragonita ya no se observan tan bien formados (Figura 11 (b)), evidenciando que el crecimiento de los cristales de aragonita se da a partir una matriz orgánica que favorece la nucleación de cristales de aragonita. La zona blanca para OTH2 (Figura 11 (a)) es completamente diferente a la de OTH1, mostrando una superficie completamente irregular.

Debido a las marcadas diferencias en la morfología del otolito, se realizó espectrometría micro Raman en las zonas blanco y translúcido. A partir de estos ensayos, se encontró tres zonas, una más que se llamó "zona opaca" y que se encuentra dentro de la zona translúcida. La zona opaca se llamó así debido a que no en toda la zona translúcida la luz es transmitida y se pudo evidenciar que existen diferencias químicas en esas zonas. Se realizaron mapeos micro Raman que van desde -30 µm hasta +30 µm en *x* y *y* en las zonas de interfase blanco – opaco y blanco – translúcido a dos otolitos de tamaño diferente OTH1 y OTH2, siendo OTH2 un otolito de tamaño menor. Lo anterior se realizó con el fin de identificar diferencias químicas significativas, para así tomar como población para síntesis de FC, otolitos de un tamaño similar.

En la Figura 12 y Figura 13, se muestran los mapas en las interfases blanco-opaco y blanco translúcido para ambos otolitos. Para OTH1 se evidencia en las dos interfases que no hay cambio de las bandas en los números de onda (Figura 12 (a) y 12 (b)), mientras que si existe cambio en las intensidades de dichas bandas. Una intensidad de banda menor indica menor cristalinidad de la fracción mineral, en este caso aragonita. Adicionalmente se presenta mayor fluorescencia en las interfases donde existe la zona opaca, atribuyéndose este comportamiento a mayor presencia de

orgánicos (Jolivet *et al.*, 2013) siendo más representativo este fenómeno en el OTH2 (Figura 13 (a)), donde se disminuye considerablemente la intensidad de las bandas en 152, 207 y 701 cm^{-1} atribuidas a la fracción mineral del otolito. Luego, para otolitos pequeños la contribución de la fracción orgánica es considerable. Observando la interfase blanco-translúcido para ambos otolitos (Figura 12 (b) y Figura 13 (b)), existen cambios en las intensidades de las bandas, menos evidentes para OTH2. Sin embargo, para OTH1 la fracción aragonita es más cristalina, ya que los valores de intensidad son mayores que en OTH2 en esa interfase, confirmando que existen cambios importantes en la composición química del otolito, lo cual depende de su tamaño.

Figura 12.

Mapeo micro Raman en la interfase (a) blanco-opaco y (b) blanco-translúcido en OTH1

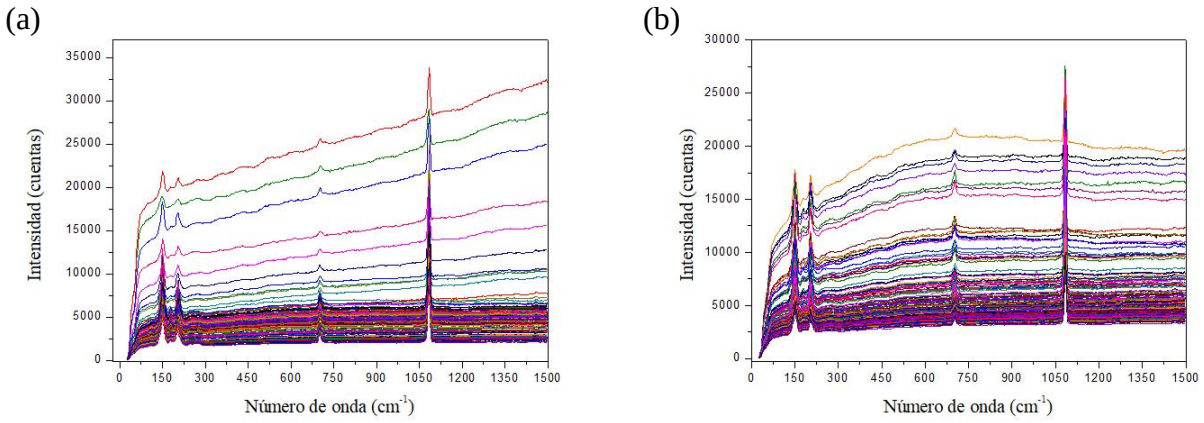
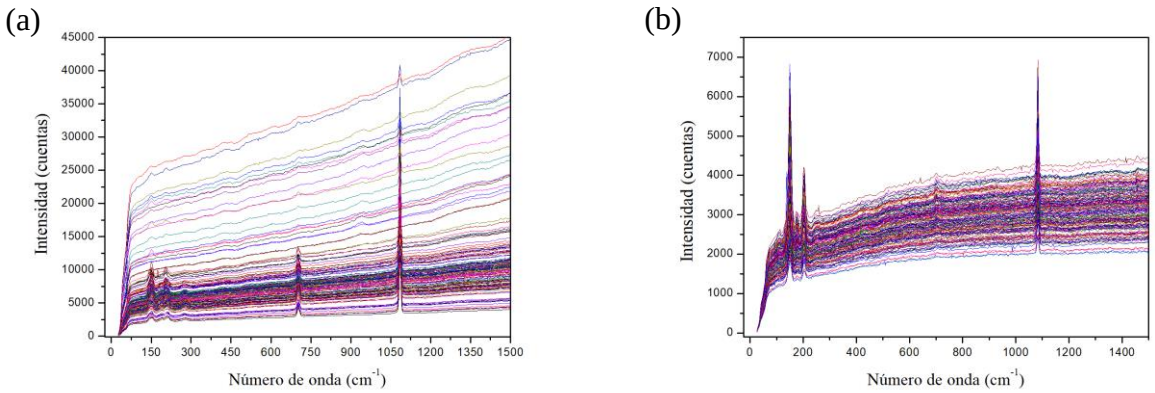


Figura 13.

Mapeo micro Raman en la interfase (a) blanco-opaco y (b) blanco-translúcido en OTH2



Como se observó en los mapas micro Raman, se muestran cambios importantes en los espectros para las diferentes interfases de OTH1 y OTH2. Para identificar estos cambios, se realizó una micrografía con el microscopio Raman con una imagen superpuesta sobre la micrografía, en donde cada color de esa imagen superpuesta representa un espectro micro Raman (espectro representativo ER), los cuales son mostrados en la Figura 14 a la Figura 17. Estos espectros fueron procesados con correcciones de línea base para eliminar efectos de fluorescencia y normalizados para eliminar por ejemplo las fluctuaciones de la intensidad del láser (Hovde et al., 2016). Se observa para OTH1, que la zona opaca (menor intensidad) se encuentra inmersa dentro de la zona blanca (Figura 14 (a) y 14 (b)) y una amplia zona de transición (principalmente aragonita), mientras que en la interfase blanco-translúcido (Figura 15 (a) y 15 (b)) los cambios no son considerables, encontrando menores intensidades para la zona de transición. Para ambas interfases en OTH1 se identificaron las bandas entre 115 y 273 cm^{-1}, ~705 cm^{-1} y 1085 cm^{-1} asociadas a los modos vibracionales de la celda, a la flexion plana de CO_3 y al estiramiento simétrico de C-O respectivamente (Jolivet et al., 2013).

Para OTH2 en la interfase blanco-translúcido (Figura 17 (a) y 17 (b)) sucede lo mismo que para OTH1, mientras que para la interfase blanco-opaco (

Figura **16** (a) y 16 (b)) la contribución de la fracción orgánica se ve reflejada principalmente en la zona opaca, atribuída a una intensidad muy baja en las bandas 115 y 273 cm^{-1}, adicionalmente, la intensidad de la banda a 1085 cm^{-1} es menor en la zona de transición que en la zona blanca, en la que pueden coexistir fracciones tanto orgánicas como mineral.

Figura 14.

(a) Micrografía Raman con imagen superpuesta y (b) ER en la interfase blanco-opaco OTH1

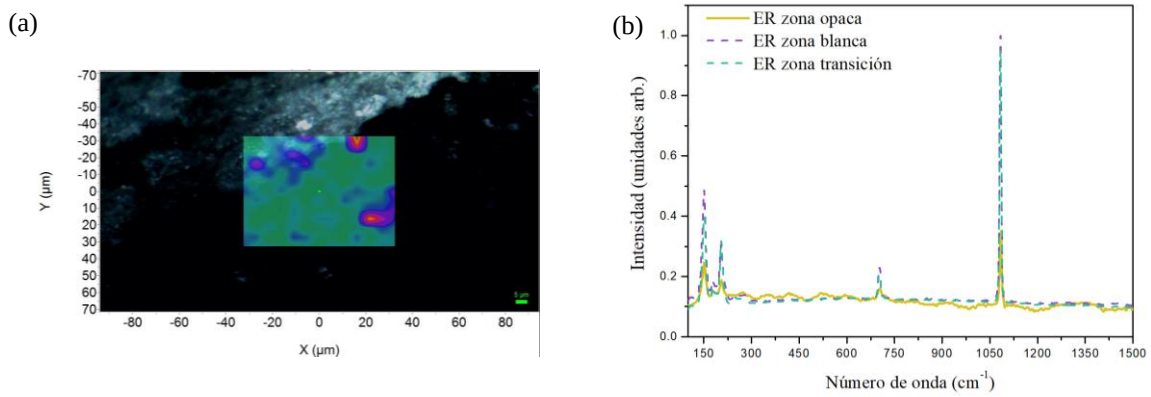


Figura 15.

(a) Micrografía Raman con imagen superpuesta y (b) ER en la interfase blanco – translúcido OTH1

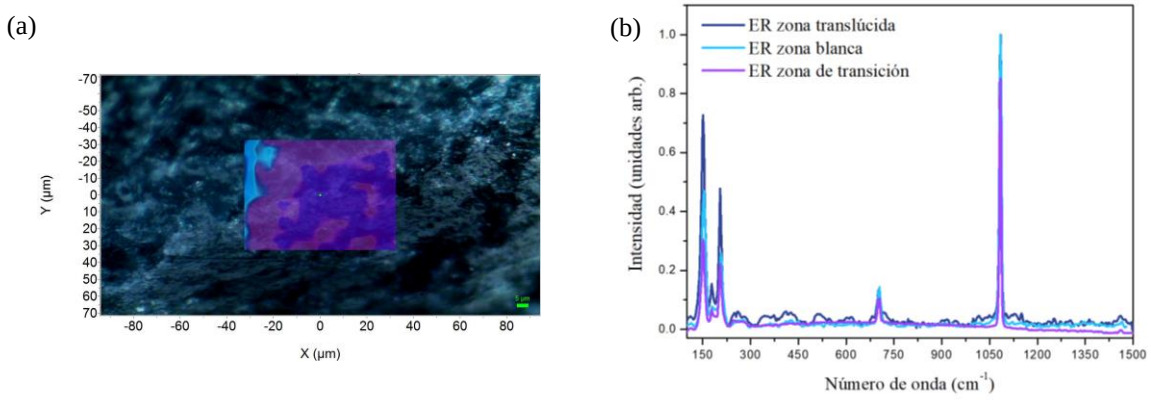


Figura 16.

(a) Micrografía Raman con imagen superpuesta y (b) ER en la interfase blanco – opaco OTH2

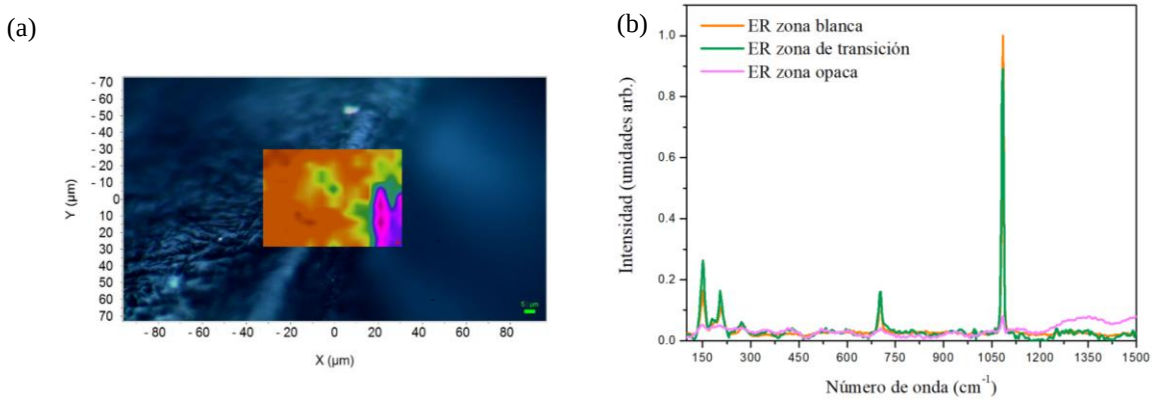
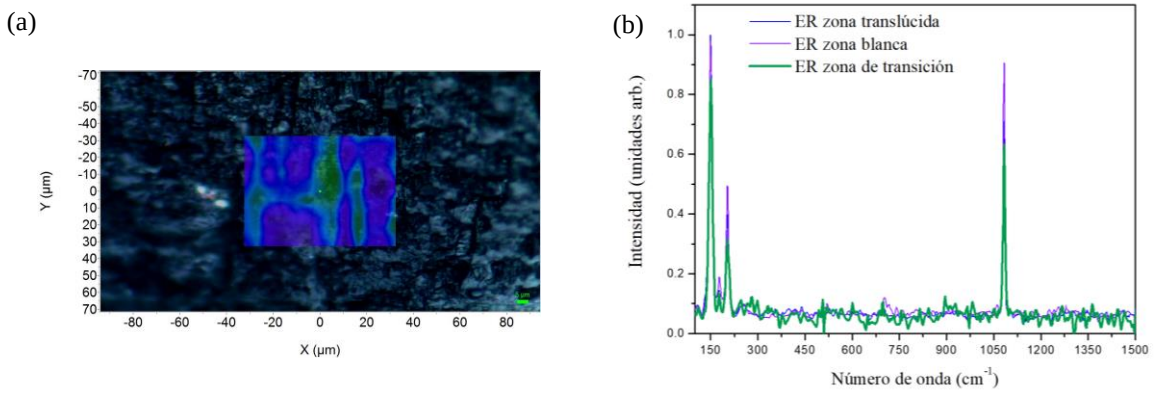


Figura 17.

(a) Micrografía Raman con imagen superpuesta y (b) ER en la interfase blanco – translúcido OTH2



Con la caracterización anterior, se determina que los otolitos son especies químicamente cambiantes con el tiempo que dependen del crecimiento del pez, y que la fracción mineral no se encuentra totalmente separada de la fracción orgánica, sino que hay transiciones entre una y otra. Así mismo, con esta caracterización se determinó escoger otolitos grandes de tamaño similar a OTH1 (aproximadamente 1,5 cm de ancho) para la síntesis de FC, ya que la contribución de la parte mineral es mayor que en OTH2.

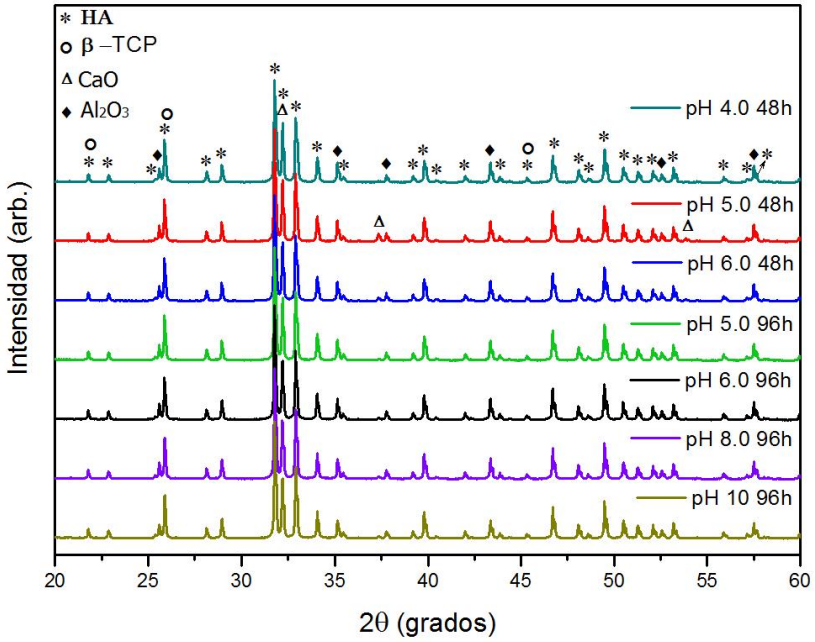
3.3.2 Síntesis y caracterización de fosfatos de calcio tipo hidroxiapatita y β-fosfato tricálcico

Los patrones de difracción de rayos X de las muestras sintetizadas a partir de otolitos de Corvina de Río se muestran en la Figura 18. El análisis de DRX para los diferentes valores de pH indica la presencia de hidroxiapatita cristalina como mayor fase acompañada por las fases β-TCP y óxido de calcio (CaO) como fases menores. Los picos característicos principales de HA en ángulos de difracción de 2θ relevantes para cada pico son: 25.87°, 31.77°, 32.18°, 32.90°, 34.05°, 46.69° y 49.47° correspondientes a los resultados mostrados por Ebrahimi (Ebrahimi *et al.*, 2017); para β-TCP, los picos encontrados en el DRX fueron: 21.78°, 25.87° y 45.35°, resultados consistentes con otros trabajos (Fathi *et al.*, 2008; M.-C. Wang *et al.*, 2015) para un fosfato de calcio con relación Ca/P de 1,67; para CaO 32.18°, 37.37°, 53.84° y para Al_2O_3 25.57°, 35.17°, 37.79°, 43.34°, 52.53° y 57.49°. El patrón de difracción observado estuvo de acuerdo con los perfiles de difracción informados en la base de datos PDF-2 (2014) del ICCD, tarjeta PDF 010-76-0694 para hidroxiapatita, PDF 000-55-0898 para β-TCP, PDF 010-77-9574 para CaO y PDF 010-89-7715 para Al_2O_3.

El patrón de difracción muestra picos a 30-35° con alta intensidad, esto puede indicar la presencia de una fase cristalina de hidroxiapatita de tamaño nanométrico (Mattews et al., 2016; Poinern et al., 2009), así como los picos bien definidos indican una buena cristalinidad de la HA (M.-C. Wang *et al.*, 2015). Para todos los valores de pH los picos fueron identificados en las mismas posiciones 2θ, con diferencias no significativas en cuanto a las intensidades. Las muestras sintetizadas a pH 10 (96 h), pH 5.0 (48 h) y pH 4.0 (48 h), fueron las muestras con porcentajes bajos de CaO y con porcentajes por debajo de 20% de amorfos (Tabla 3).

Figura 18.

Patrón de difracción de fosfato de calcio derivado de otolito de pez a diferentes pH



Los porcentajes cuantitativos del análisis de Rietveld para la cristalinidad de las diferentes muestras se muestran en la Tabla 3. Fue posible cuantificar la fase de hidroxiapatita para todos los valores de pH; sin embargo, la fase β-TCP se identifica, pero no hay un modelo en la base de datos para realizar su respectiva cuantificación. Se encontró una fase secundaria de óxido de calcio (CaO), esto puede deberse a la descomposición o transformación de la fase durante el procesamiento, como el proceso de sinterización (Ebrahimi y Botelho, 2017).

Tabla 3.

Análisis cuantificable por el método Rietveld para los fosfatos de calcio obtenidos a partir de otolitos

pH	Tiempo de	Fase HA	Fase β-TCP	CaO	Total amorfo
4.0	48	89.0 %	NC	0.4 %	10.6 %
5.0	48	78.3 %	NC	2.4 %	19.3 %
6.0	48	82.2 %	NC	1.1 %	16.7 %
5.0	96	80.9 %	-	0.3 %	18.8 %
6.0	96	75.6 %	-	0.5 %	23.9 %
8.0	96	78.1 %	-	0.5 %	21.4 %
10.0	96	80.4 %	-	0.6 %	19.0 %

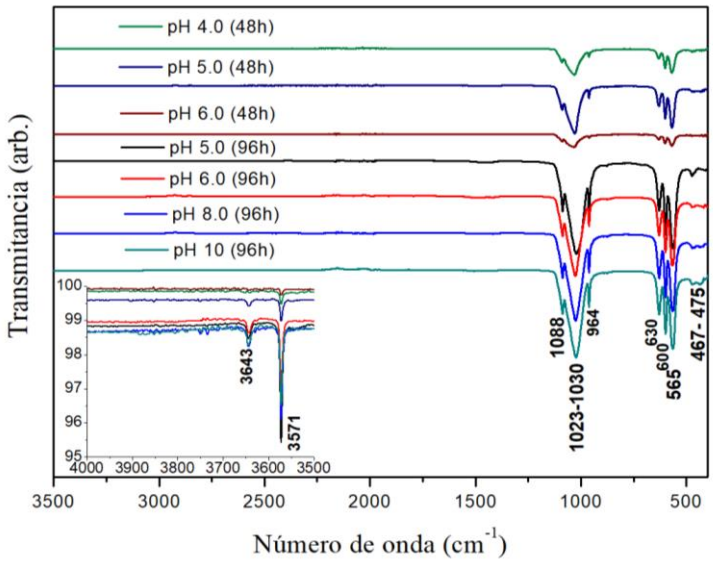
Nota. NC (No cuantificable).

Todas las muestras sintetizadas se evaluaron por espectrometría infrarroja y espectroscopia Raman, con el fin de corroborar la presencia HA, β-TCP y CaO, tanto en fases cristalinas como amorfas.

Los resultados obtenidos en la espectrometría infrarroja se muestran en la Figura 19. Los espectros muestran las bandas de absorción correspondientes al ion PO_4^{3-} alrededor de 1088 cm^{-1} (ν_3), 1023-1030 cm^{-1} (ν_3), 964 cm^{-1} (ν_1), 600 cm^{-1} (ν_4), 565 cm^{-1} (ν_4) y 467-475 cm^{-1} asignados a la flexión O-P-O (ν_2), donde $\nu_1, \nu_2, \nu_3, \nu_4$ son las vibración simétrica modo estiramiento, vibración de flexión, vibración antisimétrica modo estiramiento y vibración modo flexión respectivamente. Las bandas correspondientes al ion hidroxilo OH^- se encuentran alrededor de 3570 cm^{-1} y 630 cm^{-1} (vibración de la deformación P-OH), lo que indica que el fosfato de calcio sintetizado contiene HA en una proporción considerable (Dalmónico et al., 2015; Marques et al., 2017; Poinern et al., 2009). Las bandas observadas se han atribuido a polvos de HA.

Figura 19.

Espectro FTIR de fosfatos de calcio sintetizados a partir de otolitos a diferentes pH y tiempos de precipitación



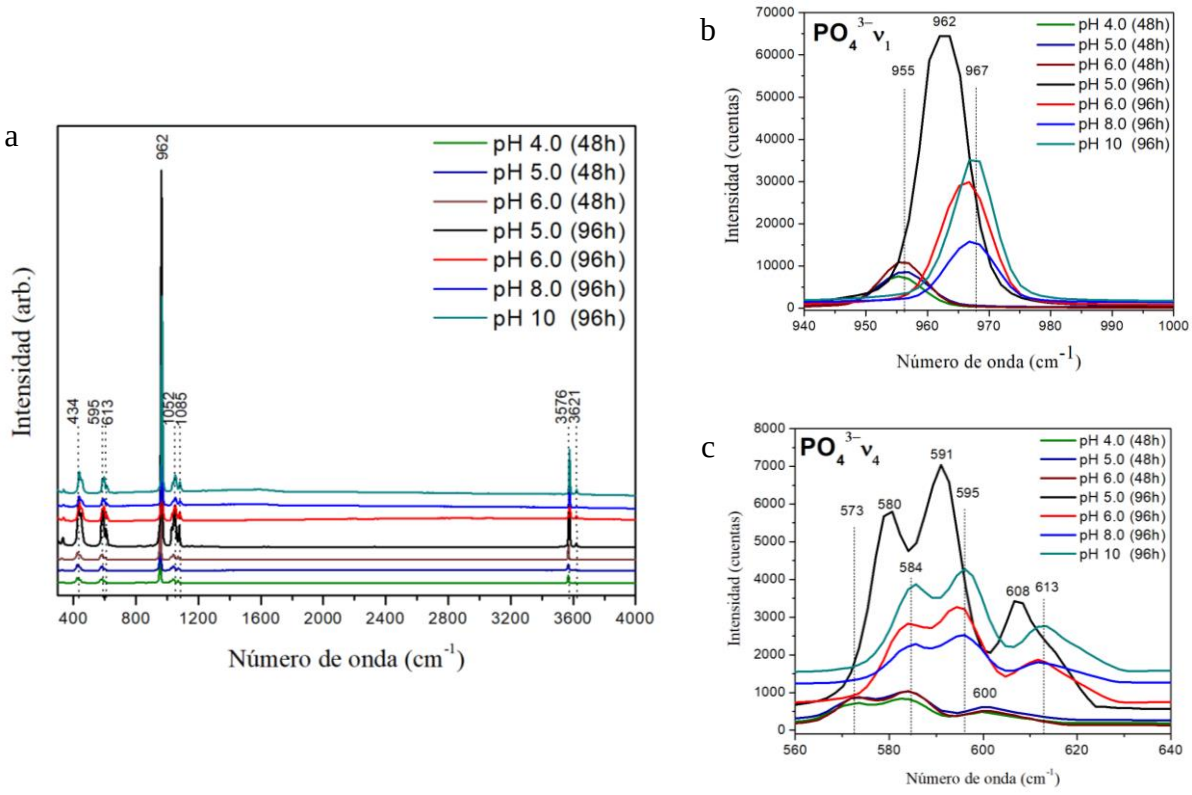
El espectro de Raman del fosfato de calcio sintetizado a partir de otolitos se muestra en la Figura 20. Las vibraciones típicas de HA se presentaron en ($\nu_2 PO_4^{3-}$) modo de flexión (O–P–O) alrededor de 430-450 cm^{-1}, así como la vibración asimétrica ($\nu_3 PO_4^{3-}$) a 1015-1089 cm^{-1} y la vibración simétrica O–P modo estiramiento ($\nu_1 PO_4^{3-}$) alrededor de 960 cm^{-1}. Las bandas entre 580 y 613 cm^{-1} se atribuyen a la fase HA para la vibración asimétrica modo estiramiento ($\nu_4 PO_4^{3-}$) (Gao et al., 2013; Khan et al., 2013; Kim et al., 2014; Sidane et al., 2017) y las bandas 3576-3621 cm^{-1} se asignan al estiramiento del enlace O–H (Khan *et al.*, 2013). Adicionalmente, para la vibración ν_1 (Figura 20 b) hay un corrimiento de la banda a 962-967 cm^{-1} hacia valores más bajos (955 cm^{-1}) con menor intensidad relacionado con la aparición de la fase β-TCP (Kim *et al.*, 2014), lo que explica la identificación de esta fase por DRX para el menor tiempo de precipitación, no obstante, no se logró cuantificar debido a que se encuentra en baja proporción.

Las asignaciones típicas de la banda Raman para hueso son 422-454 cm^{-1} asignadas a ($\nu_2 PO_4^{3-}$), 568-617 cm^{-1} asignadas a ($\nu_4 PO_4^{3-}$), 957-962 cm^{-1} asignadas a ($\nu_1 PO_4^{3-}$), 1006-1055 cm^{-1} asignadas a ($\nu_3 PO_4^{3-}$) y 3572-3575 cm^{-1} asignadas al estiramiento OH^- (Khan et al., 2013). Las bandas en el espectro de la Figura 20 son consistentes con las bandas descritas por Khan para hueso. Para el tiempo de precipitación menor, hay un corrimiento en las bandas entre 573 y 613 cm^{-1} (Figura 20

Figura 20 c) hacia valores menores, que de acuerdo con Kazanci et al, se deben a los cambios en la cristalinidad del mineral por presencia de fosfatos de calcio amorfos (Kazanci et al., 2006).

Figura 20.

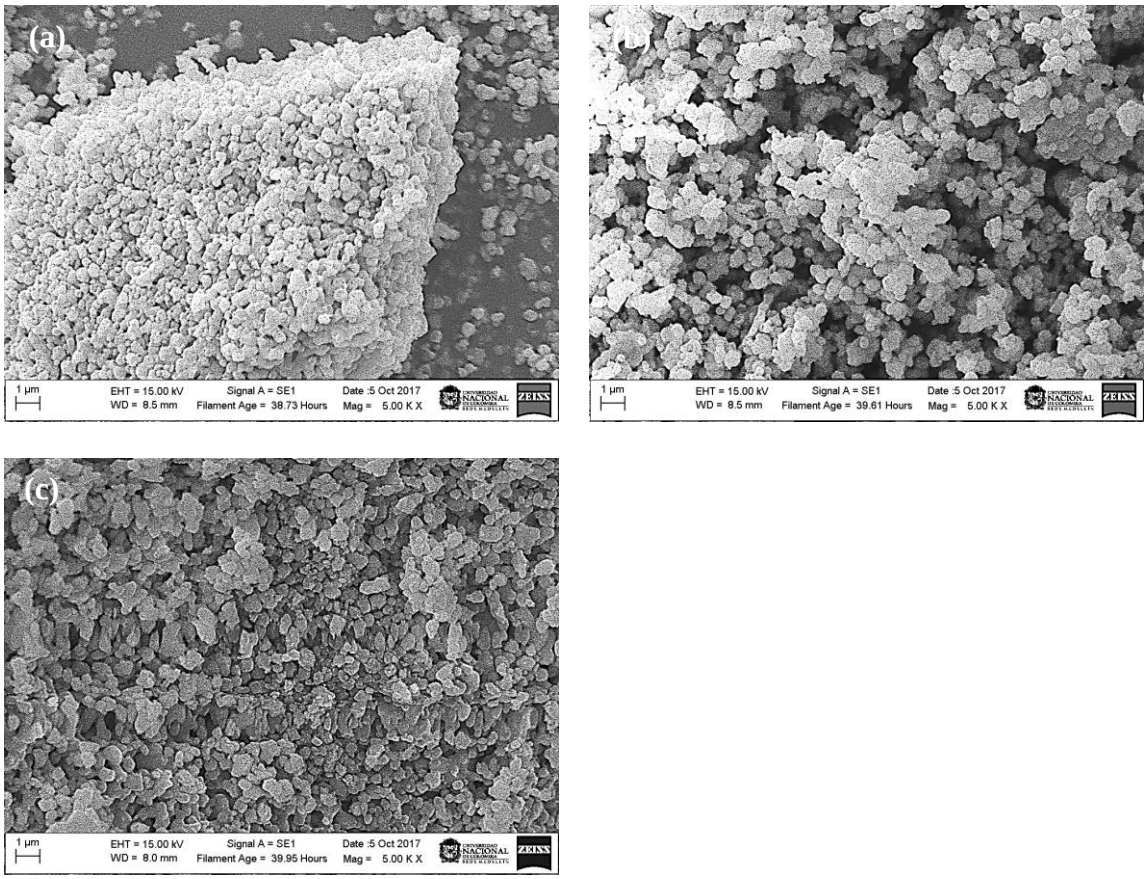
Espectro Raman de fosfatos de calcio sintetizados a partir de otolito a diferentes pH y tiempos de precipitación, a) espectro completo, b) espectro de $PO_4^{3-}\nu_1$ y c) espectro de $PO_4^{3-}\nu_4$



La Figura 21 y la Figura 22 muestran micrografías electrónicas de barrido de fosfato de calcio sintetizado a pH entre 4 y 10. Se observan fosfatos de calcio densificados, de tamaño nanométrico y forma esferoidal irregular. Algunas de estas partículas de forma esferoidal se encuentran aglomeradas en partículas más grandes, como en el caso de la síntesis a pH 8 y 10 (Figura 22 c y d). Esta morfología es similar a la presentada por Mattews et al para nanohidroxiapatita (Mattews et al., 2016). Las diferencias en la morfología son debidas al porcentaje de HA y amorfo. La distribución de oxígeno, fósforo y calcio es homogénea en todas las muestras, ejemplo pH 10 (Figura 22 e).

Figura 21.

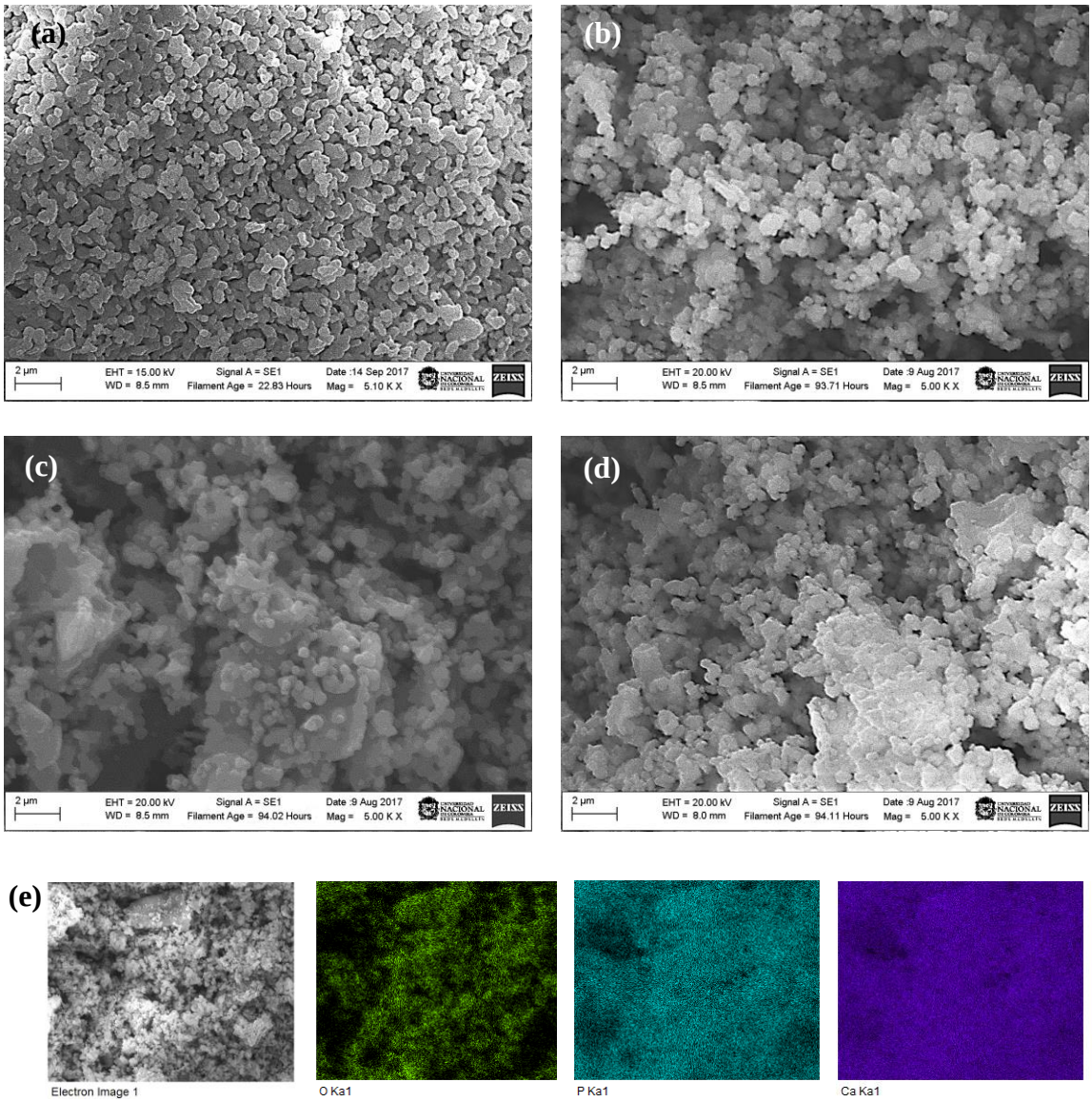
Micrografías SEM de fosfatos de calcio sintetizados para 48 h a (a) pH 4, (b) pH 5 y (c) pH 6.



Nota. La magnificación original fue de 5000X para (a, b y c).

Figura 22.

Micrografías SEM de fosfatos de calcio sintetizados para 96 h a (a) pH 5, (b) pH 6, (c) pH 8, (d) pH 10 y (e) mapeo químico para fosfato de calcio sintetizado a pH 10



Nota. La magnificación original fue de 5000X para (a, b, c, d, e).

Debido a lo anterior, y con el ánimo de realizar electrodeposiciones de fosfatos de calcio sobre Ti6Al4V, se escogió el pH de 4.0 ya que tiene baja cantidad de CaO, menor porcentaje de amorfos, menor tiempo de precipitación y mayor porcentaje de HA.

Las biocerámicas con alta tasa de disolución promueven importantes cambios de pH que pueden dar lugar a procesos inflamatorios (Garrido et al., 2011), mientras que biocerámicas con velocidades de disolución muy lenta puede dificultar el crecimiento óseo. Por lo tanto, la fabricación y evaluación de fosfatos de calcio con diferentes tasas de disolución son de interés científico, ya que los resultados respecto a la cinética de degradación pueden ser variados. De acuerdo con los resultados encontrados, el fosfato de calcio sintetizado a partir de otolitos con alto porcentaje de HA para el menor tiempo de precipitación, puede proporcionar una superficie adecuada para la proliferación celular.

3.4 Conclusiones

Los otolitos de la especie Plagioscion squamosissimus son especies monominerálicas de tipo aragonita acompañadas de fracciones orgánicas. Las fracciones de las fases orgánica y mineral cambian dependiendo del tamaño del otolito, el cual a su vez cambia dependiendo de la edad del pez. Teniendo en cuenta que este material es desechado, se puede considerar como alternativa económica para producción de sustitutos óseos.

Los ensayos micro Raman y los mapas Raman en otolitos de diferente tamaño permitieron encontrar una interfase más de las reportadas en literatura, observando que la fracción mineral no

se encuentra separada de la fracción orgánica, sino que hay transiciones entre una y otra. Estos cambios se evidencian por cambios importantes en las intensidades de las bandas asociadas a la fracción mineral aragonita.

El análisis DRX, FTIR y Raman del fosfato de calcio sintetizado a partir de otolitos de peces confirmó la presencia de la fase cristalina HA en todas las muestras, β-TCP para el tiempo de precipitación de 48h y los diferentes modos de vibración del ion PO_4^{3-}. El porcentaje de cristalinidad es mayor al 75 % en peso, la cual puede ser modificada por el tiempo de precipitación y el valor de pH utilizado. Por otra parte, se encontró una morfología de fosfatos de calcio densificados, de tamaño nanométrico y forma esferoidal irregular, lo que puede promover tanto la sustitución como la regeneración ósea.

4 Recubrimientos de cerámicos cálcicos reforzados con NTC multipared funcionalizados

4.1 Introducción

Como ya es conocido, los fosfatos de calcio (FC) sintetizados son usados ampliamente como sustitutos óseos o como recubrimientos de metales como titanio o sus aleaciones para aplicaciones en ortopedia, debido a que el titanio es inerte y al contacto con el hueso vivo, la superficie del titanio se recubre con una capa de tejido fibroso que aísla el material del tejido circundante (Sheikh, Zhang, Tamimi, y Barralet, 2017; Türk *et al.*, 2018b). Los fosfatos de calcio

se usan porque mejoran el contacto directo entre el implante y el tejido huésped, tienen excelente biocompatibilidad y promueven la proliferación y diferenciación de células de tipo óseo. Los FC varían de acuerdo con la relación Ca/P y esta variación se relaciona con la degradabilidad en ambiente biológico (Mokabber et al., 2018), los compuestos de FC más evaluados en recubrimientos de tipo electroquímico son hidroxiapatita (HA), fosfato tricálcico (β-TCP), fosfato dicálcico dihidratado (DCPD o brushita) y fosfato octacálcico (OCP) con relaciones Ca/P de 1.67, 1.50, 1.00 y 1.33 respectivamente. La electrodeposición comparada con otras técnicas de deposición es una técnica de bajo costo, de fácil implementación y usa bajas temperaturas a tiempos relativamente cortos (Mokabber et al., 2019).

La HA es la fase de Ca-P termodinámicamente más estable; sin embargo, como se mencionó anteriormente, la HA densa obstaculiza el crecimiento óseo debido a su baja biodegradabilidad. Otros FC tienen mayor tasa de degradabilidad, por ejemplo, la brushita tiene la habilidad de soportar la formación de hueso nuevo con cantidades variables de tejido óseo (Sheikh *et al.*, 2017) y se cree que juega un papel importante como precursor en la calcificación de hueso, donde el FC amorfo (considerado como la primera fase inorgánica de la mineralización del colágeno) que luego se hidroliza a HA, lleva a cabo el proceso de calcificación a través de DCPD y OCP como fases intermedias (Karampas y Kontoyannis, 2013; Xie et al., 2001).

Los fosfatos de calcio muestran baja rigidez a la fractura y alta fragilidad. Con el objetivo de mejorar la resistencia mecánica, se han dopado con iones metálicos como Zn, Ag, Ti y otros materiales como sílice, zirconio, óxido de titanio y nanotubos de carbono, entre otros (Arul y Vijayalakshmi, 2019). Los NTC son un excelente refuerzo de recubrimientos cerámicos debido a

sus excelentes propiedades mecánicas, estabilidad térmica y conductividad. Además, los nanotubos de carbono se pueden funcionalizar, lo que permite que otras moléculas puedan ser adheridas a las paredes y extremos, mejorando las propiedades de los materiales. Esta estrategia se ha usado ampliamente para incorporar fosfatos de calcio como hidroxiapatita (Khanal et al., 2016; H. Li et al., 2017; Saveleva et al., 2018; Ustundag, 2016) o polímeros para aplicaciones como tratamiento de cáncer, transporte de medicamentos, aplicaciones biotecnológicas y energía (Punetha *et al.*, 2017; Sahithi *et al.*, 2010; T.-M. Wu y Chen, 2006).

El objetivo de este capítulo fue purificar nanotubos de carbono multipared para luego funcionalizarlos con cerámicos cálcicos obtenidos a partir de otolito de Corvina de Río. La caracterización de la funcionalización permitió identificar si el método escogido es ideal para incorporar partículas de cerámicos cálcicos en las paredes de los nanotubos y usar este material para llevar a cabo electrodeposiciones sobre Ti6Al4V. Adicionalmente, se evaluó el efecto de la incorporación de NTC sobre la adherencia recubrimiento-sustrato.

4.2 Metodología

4.2.1 Purificación de nanotubos de carbono multipared por ruta ácida

Se purificaron nanotubos de carbono multipared (NTC) con diámetro de 6-13 nm y longitud 2.5-20 µm (Sigma Aldrich No. CAS 308068-56-6) por ruta ácida para mejorar su solubilidad de los NTC en soluciones orgánicas. Se llevaron a cabo tres tratamientos, los cuales se describen a continuación:

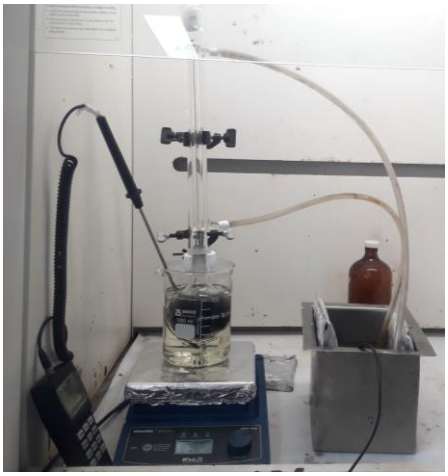
Tratamiento 1: Los NTC se mezclaron con 9 M de ácido nítrico por 3 h a 110 °C bajo agitación leve, seguidamente se lavaron con agua desionizada y se filtraron. Luego fueron tratados con 0.1 M de NaOH por 1 h bajo agitación magnética a temperatura ambiente para remover restos oxidados. Luego se trataron con 5 M de HCl a 110 °C por 6 h para remover residuos metálicos de catalizadores (Leal *et al.*, 2016; Y. Xiao *et al.*, 2010).

Tratamiento 2: Los NTC fueron expuestos a 37 %V/V de ácido clorhídrico HCl a 25 °C con agitación durante 2 h, luego se filtraron y lavaron con agua desionizada hasta alcanzar un pH 7. A continuación, 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 h bajo agitación continua, se realizó el lavado y filtrado al vacío hasta pH neutro. Posteriormente, fueron secados a 80 °C durante 12 h.

Tratamiento 3: Se agregaron los NTC (0.25 % p/V) a una mezcla de H_2SO_4-HNO_3 relación 3:1 a temperatura ambiente y agitación magnética por 2 h y 15 h más sin agitación. Luego se adicionó HCl y posteriormente se neutralizó con NaOH (Osorio et al., 2008). Finalmente, se filtraron con agua desionizada hasta llegar a pH 6. En la Figura 23 se muestra el montaje experimental para la purificación de NTC por ruta ácida. Los tratamientos descritos anteriormente se llevaron a cabo para establecer en la superficie (defectos en las paredes y extremos) del nanotubo carga superficial negativa para efectos de solubilización y compatibilidad en otros sistemas (Y. Xiao *et al.*, 2010).

Figura 23.

Montaje experimental para la purificación de NTC.



La caracterización de los nanotubos purificados se llevó a cabo mediante espectroscopia Raman, SEM y termogravimetría (TGA) con el fin de verificar daños extremos, estabilidad térmica y eliminación de elementos catalizadores como cobalto y magnesio. La técnica de espectroscopia Raman se llevó a cabo a temperatura ambiente, usando un láser de 532 nm y un rango de número de onda de 400 a 3600 cm^{-1}. Para realizar TGA, las muestras fueron escaneadas en un rango de temperatura de 30 a 965 °C a una tasa de calentamiento de 5 °C/min bajo continuo flujo de aire.

4.2.2 Funcionalización y caracterización de nanotubos de carbono multipared/fosfatos de calcio de otolitos de pez (NTC/FC)

La funcionalización de los nanotubos de carbono (NTC) con fosfatos de calcio (FC) se llevó a cabo por dos objetivos; el primero, usar el material en polvo para que sirva como refuerzo en recubrimientos de matrices poliméricas de policaprolactona y colágeno y el segundo, para

producir recubrimientos de FC/NTC sobre material de osteosíntesis. La funcionalización se realizó mediante el procedimiento de precipitación acuosa de los fosfatos de calcio. Los NTC en tres concentraciones se agregaron a una dispersión 1 M de hidróxido de calcio ($Ca(OH)_2$), seguidamente se dispersan con ultrasonido durante 20 min a una amplitud de 45 kHz y pulsos 2:1 usando el equipo Sonics Vibra Cell VCX500 equipado con una punta de 13 mm. A la solución anterior se agregó una solución 0.6 M de ácido fosfórico hasta llegar a un pH de 4.0 a una velocidad de 5 ml/min y una temperatura de 90 °C durante 1 h y 25 °C por una hora más sin temperatura manteniendo la agitación a 400 rpm. La solución resultante se dejó precipitar durante 48 h, se filtró, se lavó y se secó a 120 °C por 24 h. La concentración final de nanotubos de carbono fue de 0.5, 1.0 y 1.5 g/L.

La caracterización química de la funcionalización de los NTC con los fosfatos de calcio (FC) se realizó mediante espectroscopia Raman (Labram HR Evolution HORIBA Scientific) a temperatura ambiente, usando un láser de 532 nm, una potencia de 50 mW, tiempo de adquisición de 7 s y tiempo de acumulación de 5 s (grating 600 gr/mm objetivo x50), y espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) en un espectrómetro Nicolet iS50 con la técnica de reflexión total atenuada ATR en un intervalo de 4000 a 400 cm^{-1}, con 32 scans a una resolución de 4 cm^{-1}. La morfología fue observada mediante microscopia electrónica de barrido FEI Quanta 650, electrones secundarios, con una distancia de trabajo de 8.5 mm y un voltaje de aceleración de 15 kV y microscopia de transmisión electrónica en un equipo Tecnai F20 Super Twin TMP - FEI realizando la dispersión de NTC/FC en etanol, sumergiendo la solución en un baño de ultrasonido durante 5 min.

4.2.3 Síntesis y caracterización química de recubrimientos de compuestos cálcicos reforzados con NTC

Para realizar la electrodeposición se usó una solución de calcio, fósforo y nanotubos de carbono multipared preparada según se describió en el apartado 4.2.2. Se utilizó una celda electroquímica de tres electrodos, donde se empleó como electrodo de referencia un electrodo de calomel (SCE), una malla de platino como electrodo auxiliar y una muestra de Ti6Al4V como electrodo de trabajo. Con el objetivo de observar los potenciales de reducción de las especies involucradas en la deposición de fosfatos de calcio, se realizó voltametría cíclica de barrido desde un potencial de -2 hasta 0.3 V vs SCE, velocidad de barrido de 20 mV/s a temperatura ambiente y 400 rpm de agitación.

Una vez realizados los recubrimientos de compuestos cálcicos reforzados con nanotubos de carbono multipared, estos se caracterizaron mediante FTIR (32 scans, ATR), Raman (láser de 532 nm), DRX (2θ=10°-55°, 40Kv, 40mA) y SEM-EDS (distancia de trabajo de 8.5 mm y un voltaje de aceleración de 15 kV).

4.2.4 Ensayo de scratch test en los recubrimientos FC/NTC

Con el fin de evaluar la adherencia recubrimiento-sustrato, se realizó scratch test en un equipo Teer Scratch ST3001 con una punta de diamante (Rockwell C, radio de la punta de 200 µm) de acuerdo con la norma ASTM C1624-05 (ASTM International, 2015b), bajo carga progresiva continua (4-50 N) con una velocidad de carga de 23 N / min y una velocidad de deslizamiento de 5 mm / min para una longitud total de rayado de 10 mm. El coeficiente de fricción

se calculó con la fuerza de fricción o fuerza tangencial (N) y la fuerza normal (N). La fuerza de fricción y la primera derivada de la fuerza de fricción frente a la carga normal permitieron determinar la carga crítica (Lc_3) como la carga normal en la que existe la falla adhesiva del recubrimiento. Se tomaron micrografías de la longitud total del rayado y el punto de falla en un sistema de adquisición de imágenes estereoscopio Nikon y en el microscopio Leica DM 2700M respectivamente, ambos con el software LAS (Leica Application Suite V 4.8). Se llevaron a cabo tres ensayos por cada tipo de recubrimiento.

4.3 Resultados

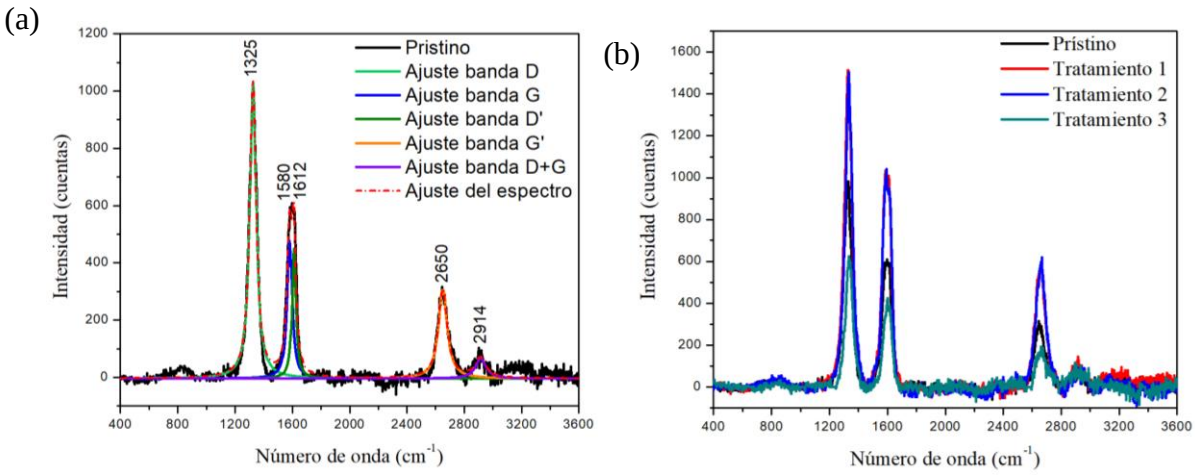
4.3.1 Caracterización de nanotubos de carbono multipared expuestos a tratamientos de purificación

A partir de los análisis Raman y tratamientos de deconvolución usando el ajuste Lorentziano para encontrar los números de onda y las intensidades de las bandas del espectro (Figura 24 (a)), se hallaron diferencias en las intensidades de las bandas D y G (área bajo cada banda), características de los nanotubos de carbono. Una banda D, característica de los defectos en las paredes y extremos de los nanotubos es identificada a 1325, 1329, 1332 y 1336 cm^{-1} para las muestras sin tratar, tratamiento 1, tratamiento 2 y tratamiento 3 respectivamente. La banda G, característica de los enlaces –C–C modo estiramiento, se encuentra a 1580, 1582, 1584 y 1589 cm^{-1} para las muestras sin tratar, tratamiento 1, tratamiento 2 y tratamiento 3 respectivamente. Estos cambios en los números de onda pueden deberse a que los tratamientos ácidos rompen algunos enlaces para insertar grupos oxidados que se pueden interpretar como defectos en la

superficie (Thi, 2018). La banda D' a 1612 cm^{-1} se presenta como un hombro débil de la banda G debido a la doble resonancia inducida por desorden y defectos en el nanotubo, mientras que la banda G' o también denominada 2D ~ 2650 cm^{-1} es característica del proceso de dispersión elástica de dos fotones. Por último, una banda débil a 2914 cm^{-1} denominada D+G es también indicativa de una red grafítica altamente ordenada (Datsyuk et al., 2008; Gindl-Altmutter et al., 2019; C. Wu et al., 2012; Yadav et al., 2019). En la Figura 24 (b) se muestran los espectros Raman para nanotubos de carbono multipared y los diferentes tratamientos ácidos, se observa un aumento en las intensidades para los tratamientos 1 y 2, mientras que para el tratamiento 3 hay una disminución de la intensidad con respecto a los prístinos (nanotubos sin tratamiento). Un aumento de la intensidad de la banda 2D es característica de materiales oxidados (Rebelo et al., 2016). El aumento en la intensidad de las bandas D y D' para los tratamientos 1 y 2, son indicativos de defectos en las paredes como resultado de la oxidación de los nanotubos.

Figura 24.

(a) Espectro Raman y tratamiento de deconvolución para NTC multipared prístinos, (b) Espectro Raman para NTC multipared prístinos y los tratamientos de purificación.



En la Tabla 4, se encuentra la relación IG/ID de las áreas bajo las bandas G y D para los diferentes tratamientos y nanotubos de carbono prístinos. Esta relación indica la posible modificación de los nanotubos por los tratamientos ácidos utilizados, se evidencia un aumento de la relación para todos los tratamientos, con mayor cambio para el tratamiento 2. Por otro lado, una relación de intensidades IG'/IG cercana a 1 indica el grado de pureza de los NTC, debido a que la aparición de la banda G' solo ocurre en carbonos ordenados (C. Wu et al., 2012). En ese orden de ideas el tratamiento 1 es el que presenta mayor relación IG'/IG, indicativo del grado de modificación de los nanotubos. No obstante, se requirió de otras técnicas como TGA y SEM-EDS para evidenciar los cambios en las temperaturas de degradación y la morfología de los NTC.

Tabla 4.

Intensidades en Raman para NTC prístinos y con los tratamientos ácidos.

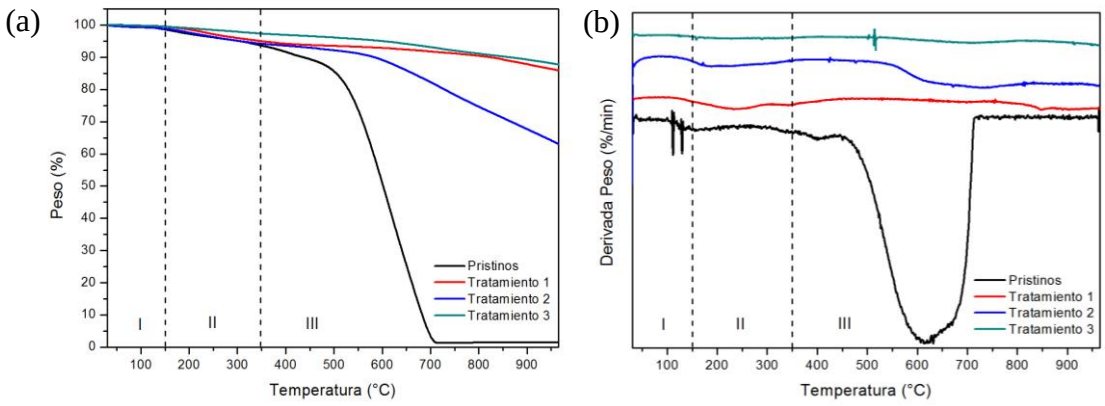
Tratamiento	Reactivos utilizados en el tratamiento	IG/ID	IG'/IG	R^2
Prístino	- - -	0.36	1.13	0.969
Tratamiento 1	HNO_3-NaOH-HCl	0.39	1.31	0.975
Tratamiento 2	HCl-HNO_3-H_2SO_4	0.45	1.25	0.978
Tratamiento 3	HNO_3-H_2SO_4-HCl-NH_4OH	0.38	1.04	0.915

La Figura 25 (a) muestra las diferencias en el comportamiento térmico de los NTC prístinos y los nanotubos expuestos a los diferentes tratamientos de purificación. Es evidente que para los nanotubos prístinos la descomposición completa existe entre 500 y 700 °C, mientras que para los tratamientos de purificación la temperatura de degradación completa se encuentra por encima de 965 °C, a esa temperatura, solo existe una pérdida de peso entre ~14 % (tratamiento 1 y 3) y 40 % (tratamiento 2). De acuerdo con Osorio *et al.*, una descomposición temprana ocurre cuando los

nanotubos tienen defectos superficiales como grupos carboxilos, alrededor de 200 °C y el carbono amorfo o desordenado tiende a oxidarse alrededor de 500 °C (Osorio *et al.*, 2008). En la Figura 25 (b), se muestra la derivada del peso vs temperatura, las inflexiones muestran las temperaturas de degradación de grupos presentes en la muestra. Los termogramas se separaron en tres zonas: La zona I comprende temperaturas entre 30 y 150 °C correspondiente a la evaporación del agua adsorbida, la zona II de 150 a 350 °C es atribuida a la decarboxilación de grupos carboxílicos presentes en las paredes de los nanotubos y la zona III de 350 °C en adelante, corresponde a la oxidación térmica de los carbonos desordenados.

Figura 25.

(a) Termogravimetría y (b) derivada de la pérdida de peso de NTC prístinos y los diferentes tratamientos de purificación.



De acuerdo con lo anterior, el tratamiento 1 seguido del tratamiento 2 muestran una inflexión en la zona II, con pérdidas de peso del 5 y 6 % respectivamente, mientras que el tratamiento 3 no muestra inflexión en la zona II, lo que indica que existen algunos grupos funcionales como carboxilos en las paredes de los nanotubos con los tratamientos 1 y 2. Sólo para

los nanotubos de carbono prístinos se evidencia una temperatura de degradación completa de la muestra a 617 °C.

En la Figura 26 y Figura 27 se muestran las micrografías electrónicas de barrido de los NTC prístinos y con los diferentes tratamientos de purificación. Adicionalmente, se encuentran los porcentajes en peso de cada elemento encontrado en los NTC después de los tratamientos base-ácido por análisis EDS (Figura 28).

Figura 26.

Micrografías SEM de NTC, (a, a') NTC prístinos

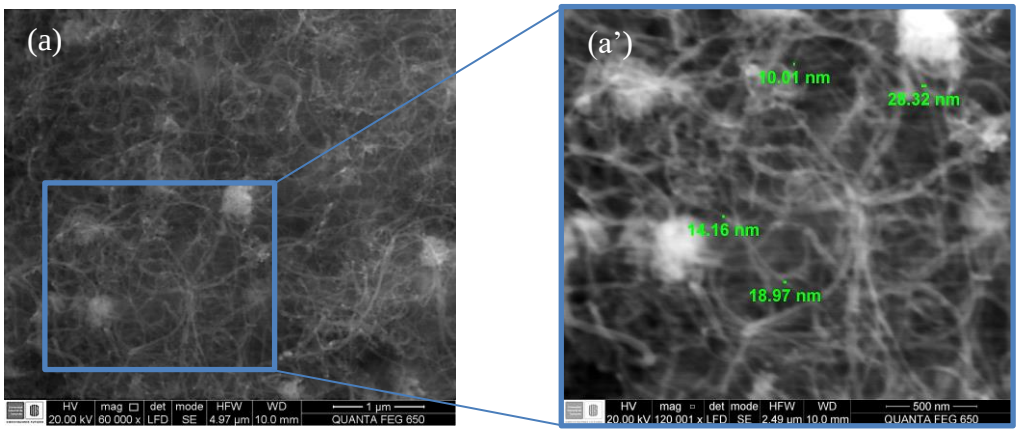


Figura 27.

Micrografías SEM de NTC, (a, a') NTC con tratamiento 1, (b, b') NTC con tratamiento 2 y (c, c') NTC con tratamiento 3

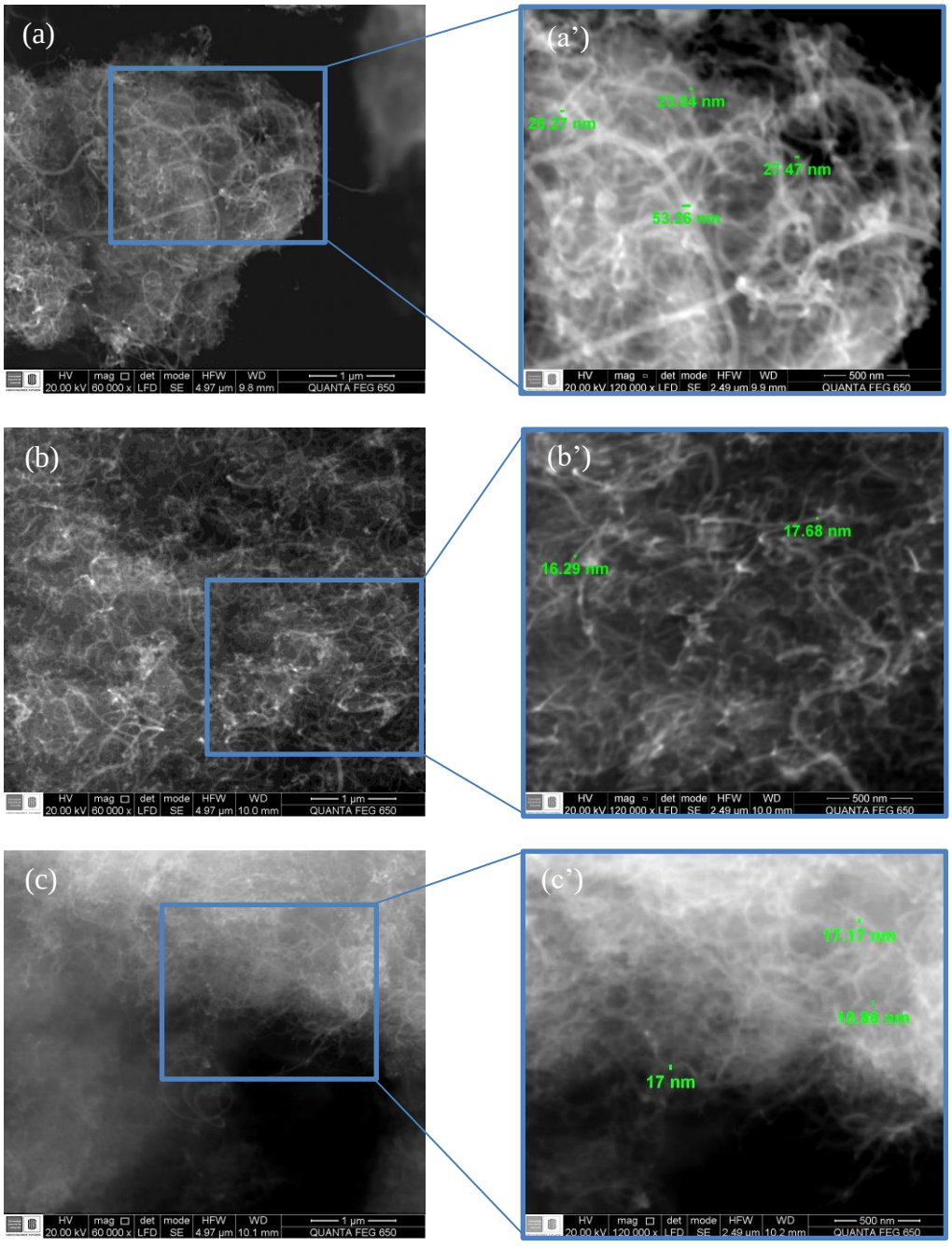
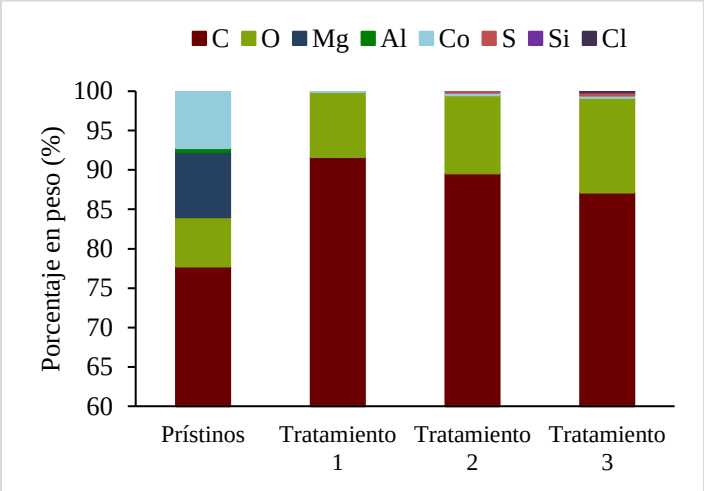


Figura 28.

Porcentaje en peso elemental para NTC sin y con tratamientos encontrado por EDS



Los NTC prístinos contienen cantidades considerables de impurezas como magnesio, aluminio y cobalto, provenientes de los catalizadores usados en el proceso de fabricación. Es claro que las cantidades de impurezas disminuyeron con los tratamientos de purificación; sin embargo, en el tratamiento 3 se encuentran más trazas de catalizadores y elementos provenientes de los reactivos usados como cloro y azufre. La morfología de los NTC cambia con los tratamientos, observándose cambios en el diámetro. El mayor cambio se encuentra en el tratamiento 2 y 3, en donde el diámetro de los NTC disminuye. El tratamiento de NTC con agentes oxidantes fuertes puede adherir con mayor probabilidad grupos funcionales como OH y COOH; sin embargo, conlleva a daños estructurales en las paredes de los nanotubos y acortamiento de estos (Datsyuk *et al.*, 2008). Por esta razón, es importante la búsqueda de un tratamiento adecuado que mejore la pureza y la solubilidad de los NTC en otros medios, sin afectar las paredes de los nanotubos.

Con base en las caracterizaciones anteriores y teniendo en cuenta la relación de intensidades IG’/IG, la presencia de posibles grupos carboxílicos evidenciado por las inflexiones

presentadas en la zona II del TGA, la morfología y análisis por EDS, se usa el tratamiento 1 para la próxima etapa de la funcionalización de los NTC con fosfatos de calcio provenientes de otolitos de pez.

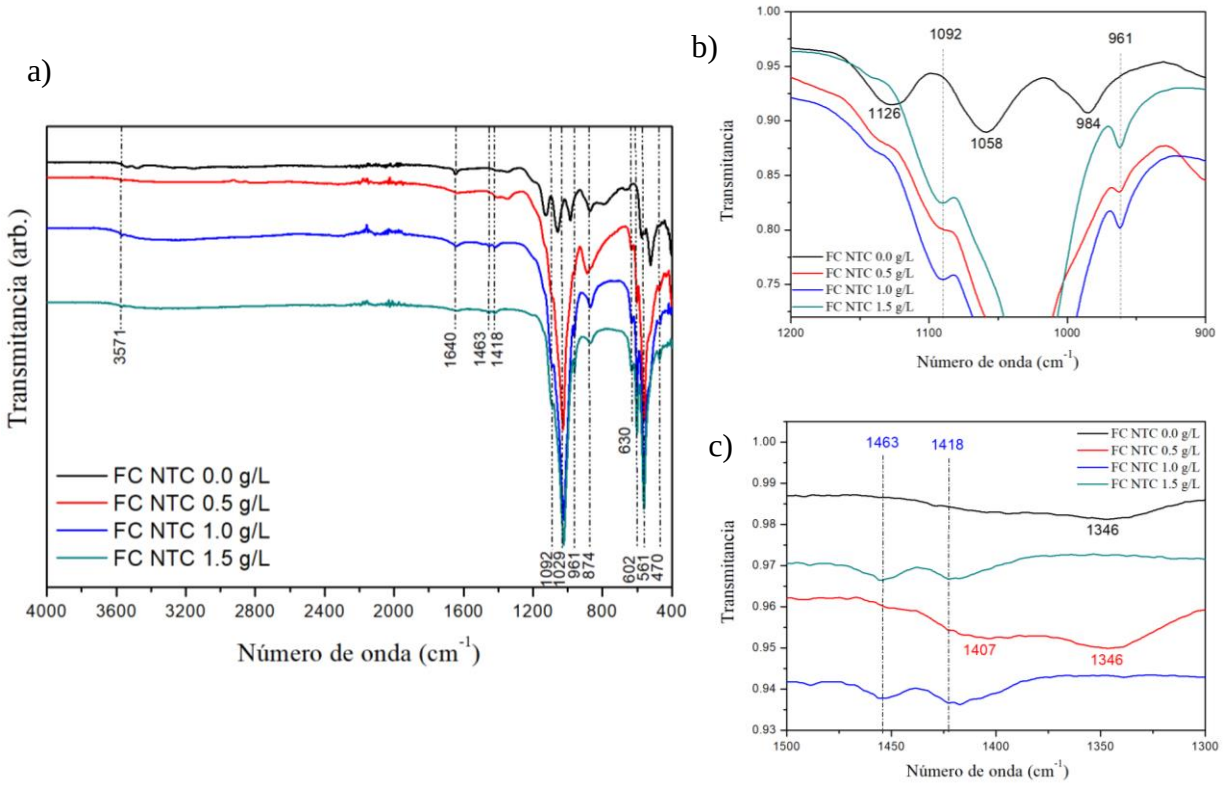
4.3.2 Evaluación de la funcionalización de nanotubos de carbono multipared/fosfatos de calcio de otolitos de pez (NTC/FC)

El espectro FTIR de fosfatos de calcio y nanotubos de carbono se muestra en la Figura 29. Las bandas de absorción a 3571 cm^{-1} y 630 cm^{-1} son originadas por el estiramiento del enlace O–H y la deformación de la vibración P–OH. La banda a 1640 cm^{-1} es asignada a la flexión de H–O–H. Las bandas asociadas con el ion PO_4^{3-} son 1092 cm^{-1} (ν_3), 1029 cm^{-1} (ν_3), 961 cm^{-1} (ν_1), 602 cm^{-1} (ν_4), 561 cm^{-1} (ν_4), correspondiente al estiramiento asimétrico (ν_3) P–O, estiramiento simétrico (ν_1) P–O y estiramiento asimétrico (ν_4) O–P–O respectivamente. La banda para el ion HPO_4 se encuentra a 874 cm^{-1}. La banda a 470 cm^{-1} está asociada al estiramiento fuera del plano $\nu_2(PO_4{}^{3-})$. Estas bandas son consistentes con un fosfato de calcio tipo hidroxiapatita (HA) (Dalmónico *et al.*, 2015; Marques *et al.*, 2017; Medvecky *et al.*, 2011; Poinern *et al.*, 2009), las cuales concuerdan con los polvos FC NTC 1.0 g/L y FC NTC 1.5 g/L. Así mismo, las bandas a 1418 y 1463 cm^{-1} son apreciables para las muestras con mayor cantidad de nanotubos, debido a la vibración del grupo carbonato (CO_3^{2-}) que sustituye los grupos PO_4^{3-} en la estructura de la HA, encontrándose una HA carbonatada tipo B, en donde el carbonato sustituye los grupos fosfato en vez de los grupos hidroxilo (tipo A), ya que cuando la hidroxiapatita carbonatada es tipo A, las bandas se encuentran en 1455-1545 cm^{-1} (Titorenkova et al., 2019; Türk et al., 2018b).

Para el polvo FC NTC 0.0 g/L, se aprecia un espectro IR consistente con un fosfato dicálcico dihidratado (DCPD-$CaHPO_4.2H_2O$-brushita). Las bandas observadas en los diferentes números de onda tienen unas variaciones con respecto a las descritas anteriormente. Dos bandas pronunciadas en 3478 y 3540 cm^{-1} y dos más a 3270 y 3156 cm^{-1}, indican la presencia de enlaces O–H provenientes de la molécula de agua de la brushita. La banda a 1640 cm^{-1} está asociada a la vibración de flexión del enlace H–O–H, mientras que las bandas observadas a 1195, 1126 y 1058 cm^{-1} son las vibraciones de estiramiento de $P-O$ (Figura 29 b). Las bandas de absorción a 984, 873 y 783 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de estiramiento asimétricas de P–O–P (Karampas y Kontoyannis, 2013; Sánchez-Enríquez y Reyes-Gasga, 2013; Türk et al., 2018b; Z.-L. Zhang et al., 2014). La banda fuerte a 520 cm^{-1} y una más débil a 575 cm^{-1} son debidas a los modos de vibración de enlace del fosfato ácido $(H-O-)\,P=O$ (Türk *et al.*, 2018b). Aparece una banda débil a 1346 cm^{-1} correspondiente a la flexión en plano de O−H. Para la muestra FC NTC 0.5 g/L, las bandas encontradas en el FTIR son consistentes con las descritas para HA, sin embargo, un doblete encontrado a 1346-1407 cm^{-1} indican la presencia de O−H en modo flexión en el plano para la brushita y no a las bandas asociadas para el ion carbonato, lo que sugiere una mezcla de HA y brushita para esta última muestra (Figura 29 c).

Figura 29.

Espectro FTIR de polvos de FC/NTC con diferentes concentraciones de nanotubos de carbono multipared, obtenidos por el método de precipitación acuosa, a) espectro completo, b) y c) espectro en el número de onda de 1200 a 900 y 1500 a 1300 cm^{-1}



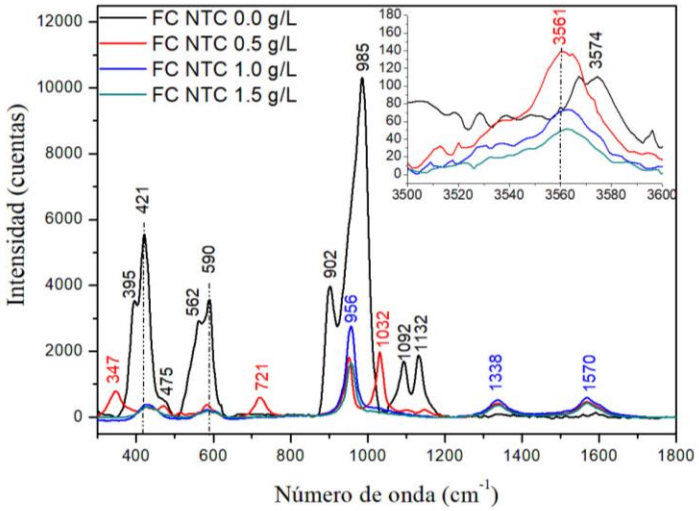
Con el fin de confirmar los resultados encontrados en FTIR, se llevaron a cabo mediciones Raman en las muestras en polvo. Para brushita, el pico Raman más intenso ocurre a 985 cm^{-1} asociado al estiramiento simétrico P–O modo ν_1, otra banda a 590 cm^{-1} se identifica para DCPD asociada a la vibración de O–P–O(H) modo flexión y a 1132 cm^{-1} atribuido a la vibración de HPO_4^{2-} modo estiramiento (Figura 30). Además de la presencia de brushita en FC NTC 0.0 g/L, fue posible identificar en el espectro Raman bandas características de fosfato dicálcico anhidro (DCPA - $CaHPO_4$ - monetita), en números de onda 395, 421, 475, 562, 902 y 1092 cm^{-1} correspondientes a ν_2 P–O modo flexión (395, 421 y 475 cm^{-1}), ν_4 P–O modo flexión, ν_3 P–O(H)

modo estiramiento y ν_3 P–O modo estiramiento asimétrico respectivamente (Karampas y Kontoyannis, 2013; Švecová y Bartůněk, 2018; J. Xu et al., 1999). El espectro Raman para hidroxiapatita tiene un pico característico alrededor de 960 cm^{-1}, correspondiente al estiramiento simétrico P–O (ν_1), O–P–O modo de flexión doblemente degenerado ~ 430 cm^{-1} y modo de flexión del grupo PO_4 (O–P–O) a 585 cm^{-1} (Pierre et al., 2019; Türk et al., 2018b), lo que concuerda con las bandas observadas en las muestras FC NTC 1.0 g/L y FC NTC 1.5 g/L. Las bandas alrededor de 3550 cm^{-1} se asocian a las vibraciones del grupo hidroxilo.

Para el polvo FC NTC 0.5 g/L, los modos Raman a 347 y 721 cm^{-1} concuerdan con el espectro de $Ca(OH)_2$ (Schmid y Dariz, 2015). Adicionalmente, aparece la banda a 475 cm^{-1} atribuida a ν_2 P–O modo de flexión de la monetita y a 590 cm^{-1} se registra la banda de la vibración de O–P–O(H) modo de flexión para brushita con menor intensidad que FC NTC 0.0 g/L pero mayor intensidad que FC NTC 1.0 g/L y FC NTC 1.5 g/L. Por último, se encuentra la banda a 1032 cm^{-1} con una intensidad fuerte que no es atribuida a brushita, monetita o hidroxiapatita directamente. Esta banda es atribuida a la presencia de carbonato presente en la red, que cambia la estructura cristalina, provocando una disminución en las apatitas no estequiométricas, lo que concuerda con los resultados observados por FTIR (Toledano *et al.*, 2018). Las bandas a 1338 cm^{-1} (banda D) y a 1570 cm^{-1} (banda G) confirman la presencia de nanotubos de carbono (–C–C modo estiramiento), visible en todas las muestras con NTC. Estas bandas están asociadas con un modo inducido por desorden en el grafito y la pureza o simetría de la estructura grafítica respectivamente (H. Li et al., 2016; S. Liu et al., 2017; Neelgund et al., 2011; Ribeiro et al., 2015).

Figura 30.

Espectro Raman de polvos de FC/NTC con diferentes concentraciones de nanotubos de carbono multipared, obtenidos por el método de precipitación acuosa



Nota. Detalles del espectro en numero de onda 3500-3600 cm^{-1} pueden ser vistas en el inserto.

Basados en los espectros FTIR y Raman, para un fosfato de calcio obtenido por precipitación acuosa, usando como materia prima los otolitos de pez y sin presencia de nanotubos, se obtiene un fosfato de calcio tipo brushita en mezcla con monetita. A medida que cambia la concentración de nanotubos de carbono multipared, la naturaleza del fosfato de calcio cambia. Así, para el polvo FC NTC 0.5 g/L, se encuentra una mezcla entre brushita, monetita e hidroxiapatita con $Ca(OH)_2$, finalmente para FC NTC 1.0 g/L y FC NTC 1.5 g/L hidroxiapatita carbonatada.

Los cambios en la estructura del fosfato de calcio obtenido del otolito con nanotubos de carbono se atribuyen al hecho de que a medida que aumenta la cantidad de nanotubos de carbono, se reemplazan más grupos PO_4^{3-} por CO_3^{2-}, lo que da lugar a una transición de fosfato de calcio que comienza en una brushita-monetita, pasando a través de brushita-monetita-hidroxiapatita y

$Ca(OH)_2$ al disminuir las bandas de Raman de 1092 y 1132 cm^{-1} y aumentar las bandas de 1032 y 956 cm^{-1}. Se encontró que las muestras con la mayor cantidad de nanotubos contenían hidroxiapatita carbonatada, donde la banda de Raman a 3561 cm^{-1} disminuye por la presencia de grupos hidroxilo y no por la presencia de agua en la brushita, además de la eliminación completa de la banda 1032 cm^{-1}, estas transiciones son favorables, ya que, en el hueso, la apatita contiene 2 a 6% en peso de CO_3^{2-} que sustituye a PO_4^{3-} (Khan *et al.*, 2013), estos polvos de hidroxiapatita tipo B sustituidos son más amorfos, de tamaño de partícula nanométrica y tienen mejor bioactividad (Türk *et al.*, 2018b).

La brushita es un biomaterial ampliamente utilizado en osteogénesis, se ha detectado en callos de fractura, en formas calcificadas, no induce inflamación y tiene una biocompatibilidad excelente, su tasa de reabsorción es menor que la HA, también tiene la capacidad de aumentar los niveles de iones de calcio y fosfato cerca de la interfaz del implante-tejido y puede convertirse en un fosfato de calcio menos soluble como HA (Sheikh *et al.*, 2017; Türk *et al.*, 2018b). El proceso de disolución de brushita y conversión a hidroxiapatita se muestra en la Ecuación 9 (T.-M. Wu y Chen, 2006; Xie *et al.*, 2001). Por otro lado, la aparición de la monetita es posible por la deshidratación de brushita que se da entre 30 y 400 °C (proceso de secado de los polvos a 120 °C por 24h), de acuerdo con la Ecuación 10. La monetita ha mostrado buena capacidad para la formación ósea en defectos óseos (Tamimi, Nihouannen, et al., 2012), tiene una tasa de reabsorción similar a la de la brushita y en pruebas in vitro e in vivo ha demostrado que se puede convertir en fosfato octacálcico (Sheikh *et al.*, 2015).

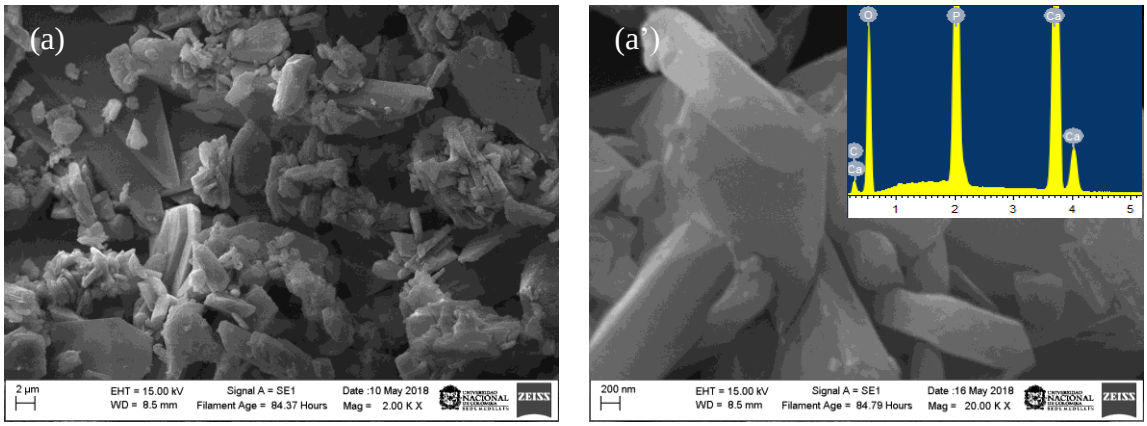
$$10CaHPO_4.2H_2O \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 4H_3PO_4 + 18H_2O \quad (9)$$

$$CaHPO_4.2H_2O \rightarrow CaHPO_4 + H_2O \quad (10)$$

La morfología de los polvos de FC y FC/NTC fue evaluada por SEM como se muestra en la Figura 32 y la Figura 32. Se evidencian unas morfologías variables, compuestas de pequeñas partículas. El polvo compuesto por brushita y monetita, contiene partículas de mayor tamaño de tipo nano hojas auto ensambladas, que concuerda con la morfología de la nucleación de brushita (Türk *et al.*, 2018b). Con la adición de nanotubos de carbono, la morfología del cerámico cambia hacia granos tipo varilla de tamaño menor a 200 nm en espesor, lo cual se pudo comprobar con TEM (Figura 33). Los análisis EDS permitieron encontrar que la relación Ca/P fue de 1.31, 1.19, 1.43 y 1.53 para FC NTC 0.0 g/L, FC NTC 0.5 g/L, FC NTC 1.0 g/L, FC NTC 1.5 g/L respectivamente, encontrándose los mayores valores para los polvos con mayor cantidad de NTC. Estas relaciones fueron calculadas usando el porcentaje atómico de cada elemento.

Figura 31.

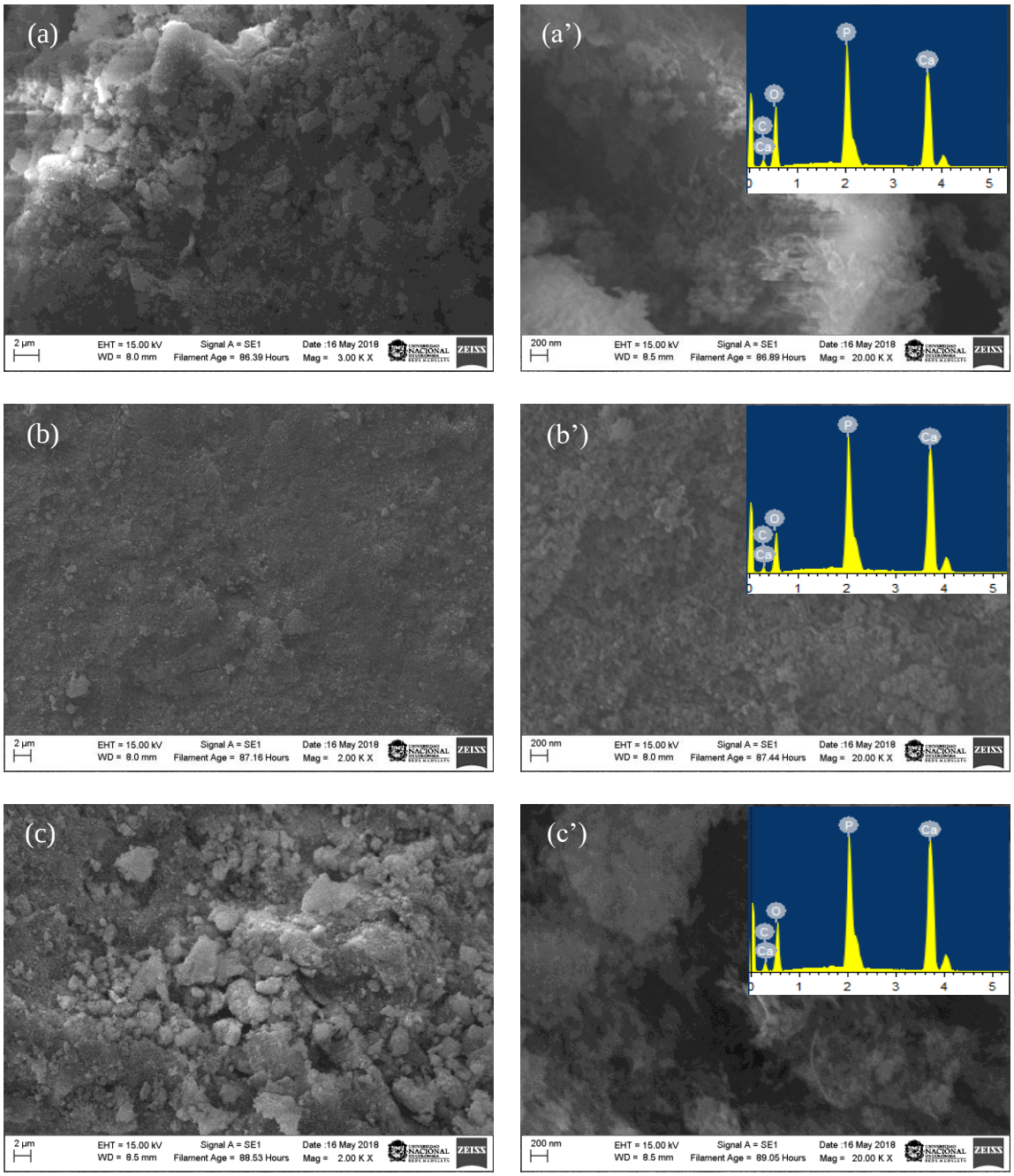
Micrografías SEM de polvos de fosfatos de calcio sin presencia de NTC



Nota. La magnificación original fue de 2000X para (a) y 20000X para (a').

Figura 32.

Micrografías SEM de polvos de fosfatos de calcio y NTC (a, a') 0.5 g/L NTC, (b, b') 1.0 g/L NTC, y (c, c') 1.5 g/L NTC

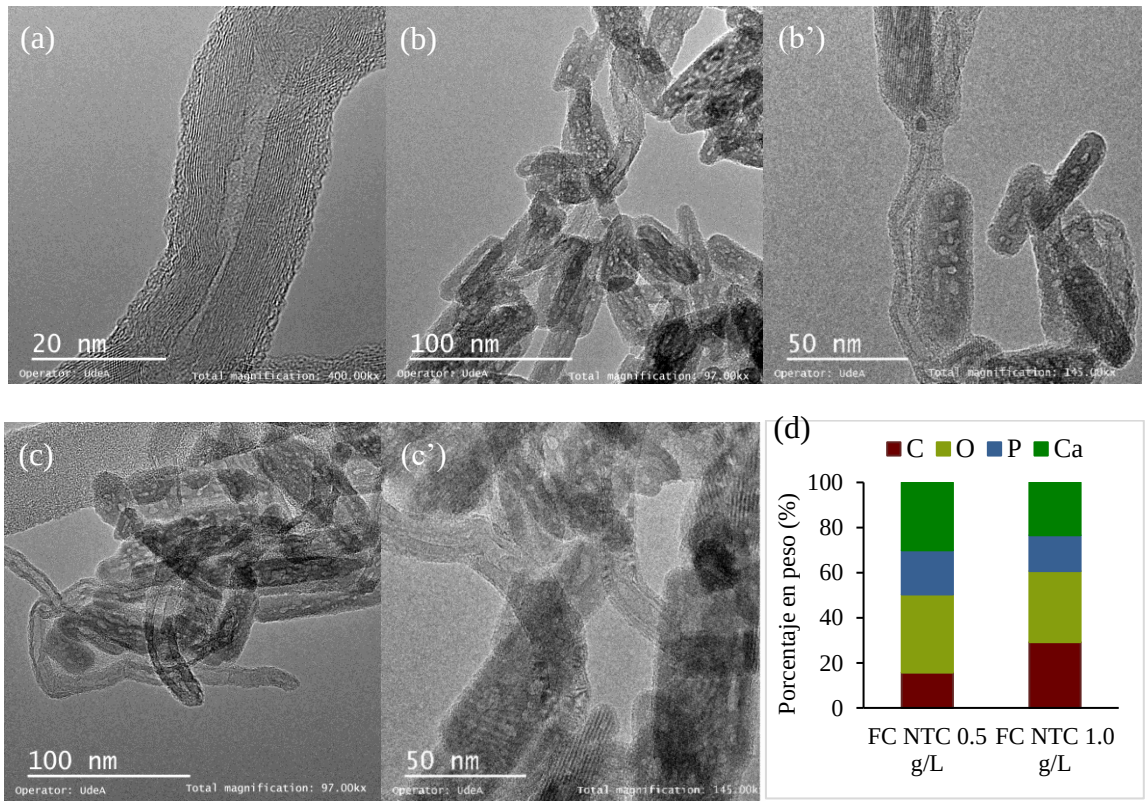


Nota. La magnificación original fue de 2000X para (b y c) y 3000X para (a) y 20000X para (a', b', c'). Barra de escala = 2 µm para (a, b, c) y barra de escala = 200 nm para (a', b', c'). El espectro de EDS puede verse en los insertos en (a', b', c').

De acuerdo con los análisis de la técnica TEM acoplada con la técnica EDS (Figura 33), es evidente que la estructura cerámica se une a las paredes de los nanotubos, aún después de realizar el ultrasonido. También se evidencia, que el diámetro de los nanotubos no cambió drásticamente con el tratamiento de purificación, las paredes no fueron dañadas y las partículas individuales cerámicas fueron satisfactoriamente injertadas en las paredes de los nanotubos multipared. La composición elemental observada en TEM muestra un aumento de la cantidad de carbono (% peso) en la muestra FC NTC 1.0 g/L comparada con una muestra en polvo con menor cantidad de nanotubos.

Figura 33.

Micrografías TEM de fosfatos de calcio y nanotubos de carbono multipared (a) NTC con el tratamiento de purificación 1 (b, b') 0.5 g/L de NTC y (c, c') 1.0 g/L de NTC



Nota. La magnificación original fue de 400000X para (a), 97000X para (b, c) y 145000X para (b', c'). Barra de escala = 20 nm para (a), barra de escala = 100 nm para (b, c) y barra de escala = 50 nm para (b', c'). (d) composición superficial elemental (% peso) usando EDS.

Por medio de la técnica de precipitación acuosa de fosfatos de calcio provenientes de otolitos agregando nanotubos de carbono multipared, es posible funcionalizar los nanotubos y obtener fosfatos de calcio de tamaño nanométrico adheridos a las paredes de los nanotubos de carbono. Se decidió entonces usar esta metodología para producir recubrimientos sobre el material de osteosíntesis Ti6Al4V por electrodeposición.

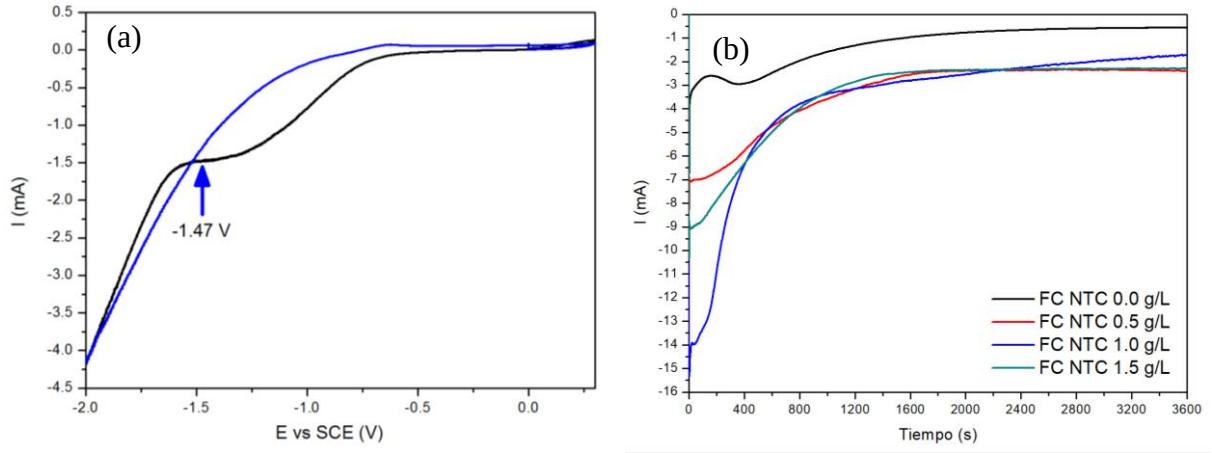
4.3.3 Síntesis y caracterización química de recubrimientos de compuestos cálcicos reforzados con NTC

En la Figura 34 (a) se muestra el voltamperograma en una solución de $Ca(OH)_2$ y H_3PO_4 con 0.5 g/L de NTC. Se observa un máximo en la zona de reducción de -1.47 V vs SCE con una corriente de -1.48 mA/cm^2, indicando que a ese valor de voltaje es posible electrodepositar fosfatos de calcio. Este valor se calculó con ayuda del software Echem Analyst Gamry Instruments 6.3.0.3.

Para soluciones con $Ca(OH)_2$ y H_3PO_4 con 1.0 y 1.5 g/L de NTC, el potencial de reducción se mueve un poco hacia valores más negativos, por esta razón, las condiciones de electrodeposición para todas las concentraciones de NTC fueron -1.6 V vs SCE (electrodo de calomel saturado) y 3600 s. En la Figura 34 (b), se muestran las curvas cronoamperométricas de los recubrimientos a diferentes concentraciones de NTC.

Figura 34.

(a) Voltamperometría cíclica de Ti6Al4V en una solución de $Ca(OH)_2$ y H_3PO_4 con 0.5 g/L de NTC a pH 4 y (b) curva cronoamperométrica de recubrimientos de FC/NTC a diferentes concentraciones de NTC.



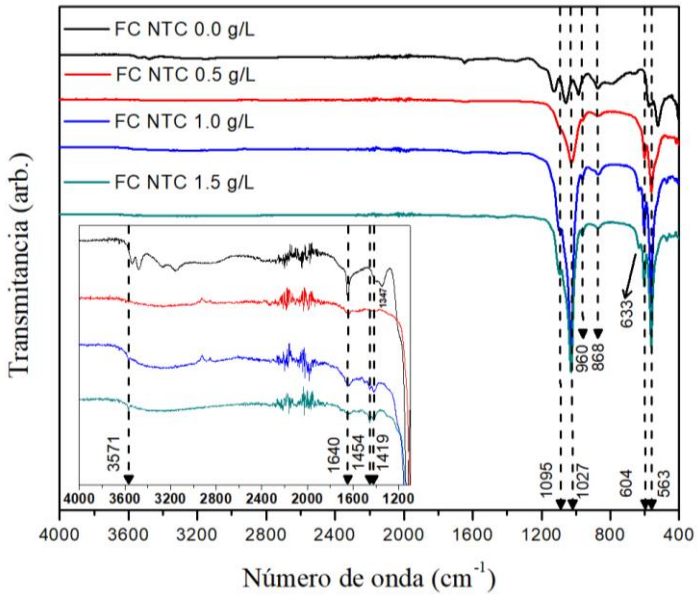
A un voltaje aplicado de -1.6 V vs SCE, la respuesta en corriente oscila entre -15 y -3 mA, las corrientes más negativas se obtuvieron para las electrodeposiciones con más alta concentración de NTC. Estas variaciones en la corriente involucran una serie de reacciones de reducción que dan lugar a recubrimientos de diferente composición, como se analiza más adelante con los ensayos de FTIR, Raman y DRX. Por otro lado, se obtuvo una alta repetibilidad en los ensayos de electrodeposición, encontrando desviaciones estándar entre 0.87 hasta 2.91 mA calculadas con n=8 tomando como dato los valores de corriente iniciales.

A continuación, en la Figura 35 se presenta el espectro infrarrojo de los diferentes recubrimientos. Como es posible apreciar, se obtiene un espectro muy similar al encontrado para los polvos FC/NTC descrito anteriormente (ver Figura 29). Así, se obtienen números de onda que concuerdan con fosfatos de calcio tipo brushita (FC NTC 0.0 g/L) e hidroxiapatita carbonatada (FC NTC 0.5, 1.0 y 1.5 g/L). En la Tabla 5 se muestran los números de onda de las vibraciones de

los diferentes enlaces presentes en los recubrimientos (Karampas y Kontoyannis, 2013; Logesh et al., 2019; Titorenkova et al., 2019).

Figura 35.

Espectro FTIR de recubrimientos de FC/NTC con diferentes concentraciones de nanotubos de carbono multipared.



Nota. Detalles de partes del espectro pueden ser vistas en el inserto.

Tabla 5.

Números de onda (cm^{-1}) y sus asignaciones FTIR para los recubrimientos de FC/NTC.

Números de onda (cm^{-1})	Asignaciones	Tipo de fosfato de calcio
470	O–P–O flexión doble degenerado	HA
521	(H–O–)P=O	Brushita
563	P–O estiramiento asimétrico	HA
575	(H–O–)P=O	Brushita
604	P–O estiramiento asimétrico	HA
633	P–OH	HA
868	P–O–P estiramiento asimétrico	Brushita, HA
960	P–O estiramiento simétrico	HA
984	P–O–P estiramiento asimétrico	Brushita
1027	O–P–O estiramiento asimétrico	HA
1058	P–O estiramiento	Brushita
1095	O–P–O estiramiento asimétrico	HA
1126	P–O estiramiento	Brushita
1347	O–H flexión en plano	Brushita
1405	O–H flexión en plano	Brushita
1419	CO_3^{2-}	HA
1454	CO_3^{2-}	HA
1640	H–O–H; C–OH	Brushita, HA; grupos carboxílicos
3161	O–H	Brushita
3268	O–H	Brushita
3480	O–H	Brushita
3540	O–H	Brushita
3571	O–H	HA

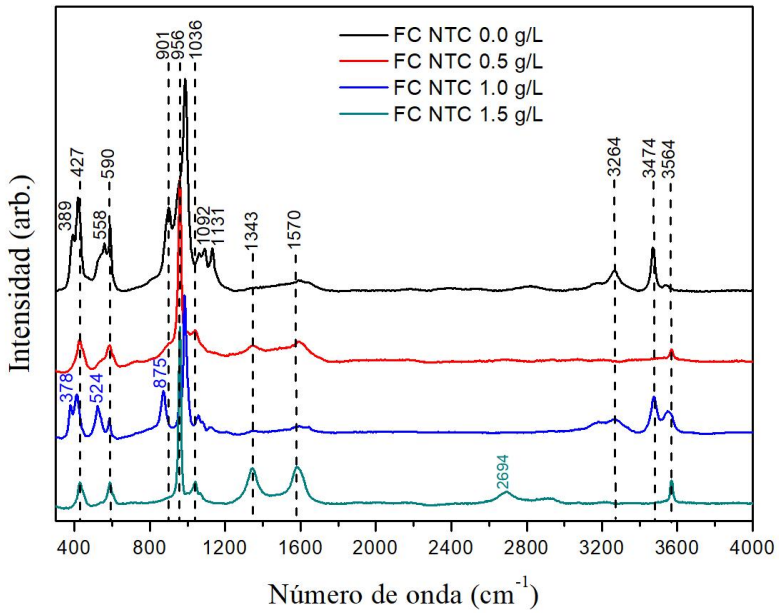
En la Figura 36 se muestra el espectro Raman de los recubrimientos FC/NTC. Las bandas correspondientes a los modos vibracionales del ion PO_4^{3-} en la HA se encuentran a 427 cm^{-1}, 590 cm^{-1}, 956 cm^{-1} correspondientes a ν_2 O–P–O modo flexión doblemente degenerado, ν_4 O–P–O modo flexión triplemente degenerado y ν_1 P–O estiramiento simétrico respectivamente, presentes en los recubrimientos FC NTC 0.5 g/L y FC NTC 1.5 g/L. La banda a 3564 cm^{-1} corresponde al estiramiento del enlace O–H y la banda a 1036 cm^{-1} es atribuida a los carbonatos presentes en la red de HA. Para el recubrimiento FC NTC 0.0 g/L se localizaron números de onda que también concuerdan con la monetita, encontrando bandas a 389 cm^{-1}, 421 cm^{-1}, 558 cm^{-1}, 901 cm^{-1}, 985

cm^{-1} y 1092 cm^{-1} atribuidos a los enlaces ν_2 P–O modo flexión (389 y 421 cm^{-1}), ν_4 P–O modo flexión, ν_3 P–O(H) estiramiento asimétrico, ν_1 P–O estiramiento simétrico y ν_3 P–O estiramiento asimétrico respectivamente, mientras que las bandas a 378 cm^{-1}, 417 cm-1, 524 cm^{-1}, 875 cm^{-1}, 990 cm^{-1}, 1060 cm^{-1}, 1083 cm^{-1} y 1121 cm^{-1} corresponden a los enlaces de H_2O, ν_2 P–O modo flexión (417 y 524 cm^{-1}), ν_3 P–O(H) estiramiento asimétrico, ν_1 P–O estiramiento simétrico, P–O modo estiramiento y O–H modo flexión en plano (1083 y 1121 cm^{-1}) respectivamente, son atribuidas a la brushita. Las bandas de Raman muestran que hay monetita + brushita para FC NTC 0.0 g/L, brushita para FC NTC 1.0 g/L e HA carbonatada para FC NTC 0.5 y 1.5 g/L. Las bandas a 1343 cm^{-1} (banda D) y a 1570 cm^{-1} (banda G) confirman la presencia de nanotubos de carbono (–C–C modo estiramiento). Adicionalmente, se presenta una banda a 2694 cm^{-1} para FC NTC 1.5 g/L correspondiente a la banda G′ descrita anteriormente para los nanotubos de carbono (Arul y Vijayalakshmi, 2019; Karampas y Kontoyannis, 2013; Švecová y Bartůněk, 2018; J. Xu et al., 1999). Es posible observar esta banda G′ en el recubrimiento FC NTC 1.5 g/L, ya que es el recubrimiento con mayor concentración de NTC.

Las variaciones presentadas en los recubrimientos de FC y NTC pueden ser atribuidos al hecho de que la incorporación de los nanotubos de carbono conduce a la sustitución de grupos PO_4^{3-} por grupos CO_3^{2-}, para el caso de hidroxiapatita carbonatada, dando como resultado recubrimientos con diferente composición química.

Figura 36.

Espectro Raman de recubrimientos de FC/NTC con diferentes concentraciones de nanotubos de carbono multipared.

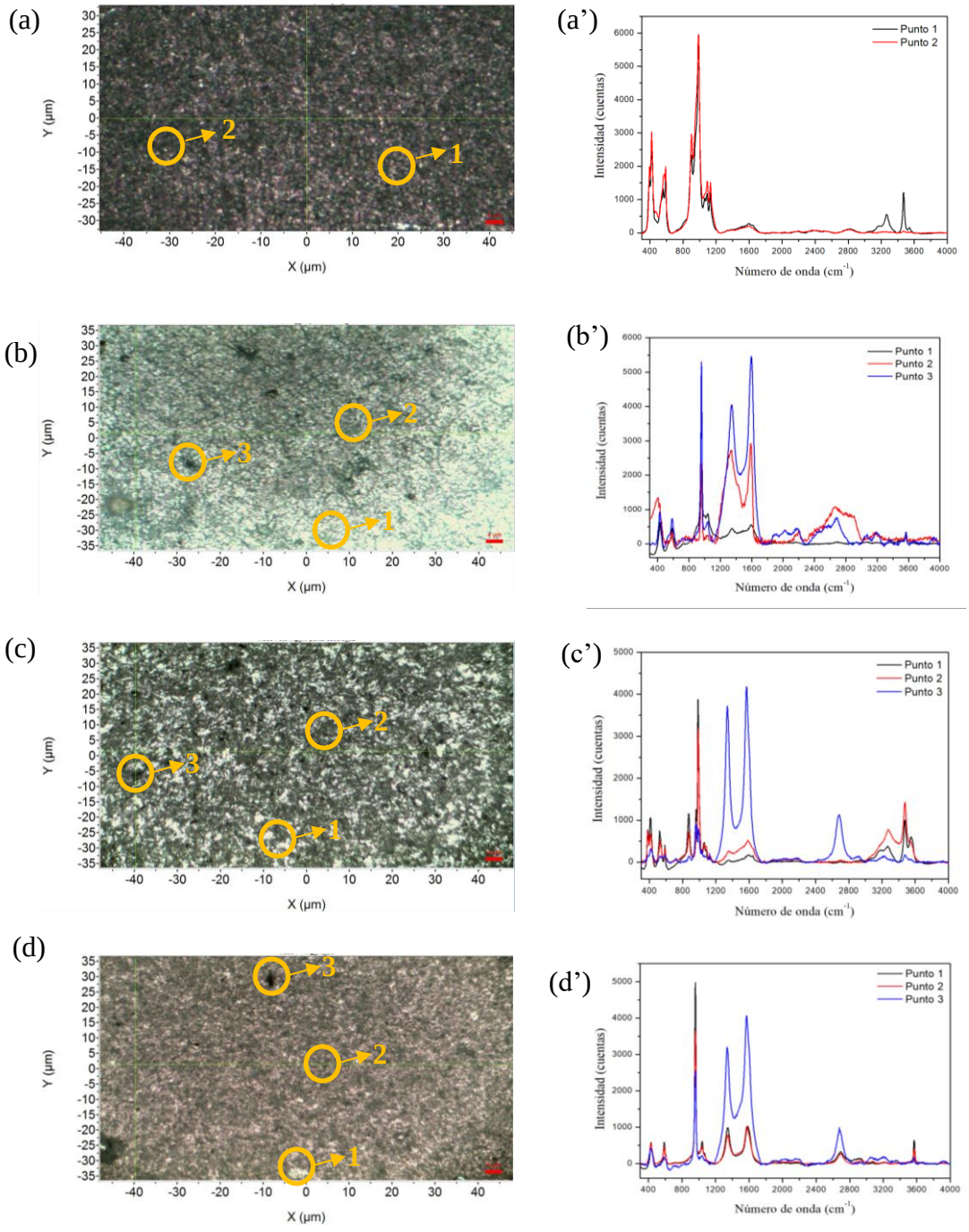


Al obtener espectros Raman en diferentes zonas de los recubrimientos, se encontró que estos presentan diferencias químicas a nivel micro que vale la pena estudiar. Para los recubrimientos con nanotubos de carbono, se identificaron tres espectros que se diferenciaron por puntos 1, 2 y 3 que van de un color claro, gris a oscuro. En la Figura 37 se muestran los espectros con la correspondiente micrografía obtenidas por espectroscopia Raman.

Es claro que los cambios en los espectros son debido a la dispersión de los nanotubos en los recubrimientos y al grado de funcionalización. Existen zonas tanto de alta concentración de nanotubos de carbono como de menor cantidad de NTC. Sin embargo, el tipo de fosfato para cada recubrimiento de acuerdo con lo analizado en la Figura 36 no cambia. El espectro en el punto 3 es un espectro en el que las mayores intensidades se observan para los números de onda características de las bandas D, G y G’ de los NTC, luego las diferencias químicas se atribuyen a mayor o menor concentración de nanotubos de carbono, existiendo en todos los casos FC/NTC.

Figura 37.

Micrografia y espectro micro-Raman de recubrimientos (a, a') FC NTC 0.0 g/L, (b, b') FC NTC 0.5 g/L, (c, c') FC NTC 1.0 g/L y (d, d') FC NTC 1.5 g/L



Nota. Barra de escala para (a, b, c, d) = 4 µm.

En la electrodeposición de FC con NTC no solo existe la reacción química de formación de fosfatos de calcio, sino también reacciones de tipo electroquímico que intervienen en la síntesis de FC por electrodeposición (Ecuaciones 11 a 19). La concentración de iones OH^- juega un papel importante en la deposición de FC; con la presencia de los iones OH^-, HPO_4^{2-} y PO_4^{3-}, los iones Ca^{2+} migran hacia el cátodo reaccionando con los iones del ácido fosfórico e hidroxilos, precipitando fosfatos como la brushita y la hidroxiapatita (Chakraborty et al., 2016; Hu et al., 2009; Mokabber et al., 2018; Tamimi, Sheikh, et al., 2012).

$$O_2 + 2H_2O + 4e^- \rightarrow 4OH^- \quad (11)$$

$$2H_2O + 2e^- \rightarrow 2OH^- + H_2 \uparrow \quad (12)$$

$$2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2 \uparrow \quad (13)$$

$$2H_2PO_4^- + 2e^- \rightarrow 2HPO_4^{2-} + H_2 \quad (14)$$

$$2HPO_4^{2-} + 2e^- \rightarrow 2PO_4^{3-} + H_2 \quad (15)$$

$$H_2PO_4^- + OH^- \rightarrow HPO_4^{2-} + H_2O \quad (16)$$

$$HPO_4^{2-} + OH^- \rightarrow PO_4^{3-} + H_2O \quad (17)$$

$$Ca^{2+} + 2HPO_4^{2-} + 2H_2O \rightarrow CaHPO_4.2H_2O \quad (18)$$

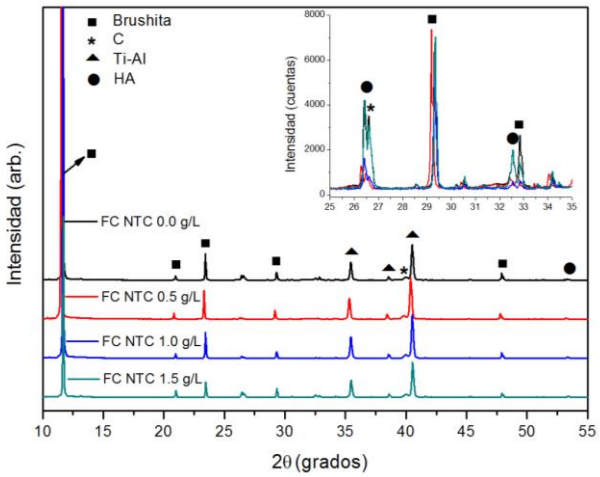
$$Ca^{2+} + 3PO_4^{3-} + OH^- \rightarrow 1/2(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2) \quad (19)$$

De acuerdo con Hu *et al*, para este sistema y usando el estudio de la actividad de calcio como función del pH en ácido fosfórico diluido (0.1M), en el rango de pH 0-14, dos fases HA y brushita termodinámicamente estables son posibles y el punto de conversión entre ellas se da a un pH=4.2 (Hu *et al.*, 2009). Todas las electrodeposiciones se llevaron a cabo a un pH=4.0, por lo cual concuerda con los hallazgos observados en las técnicas FTIR y Raman.

Para evaluar la(s) fase(s) cristalinas en los recubrimientos se llevó a cabo un análisis cualitativo de DRX. En la Figura 38 se muestra el difractrograma de los diferentes recubrimientos FC/NTC. La fase brushita (ICDD PDF-2 # 01-072-1240) fue identificada como la principal fase cristalina en todos los recubrimientos, carbono (ICDD PDF-2 # 00-008-0415) y Titanio-Aluminio (ICDD PDF-2 # 01-077-6855). Los picos característicos de difracción principales de brushita son: 11.6°, 21.0°, 23.4°, 29.3° y 47.9°; solo se observaron dos picos con una intensidad muy baja que se atribuyeron a la fase HA no estequiométrica en ángulos 2θ = 26.4° y 32.5° (Khanal *et al.*, 2016; Pierre *et al.*, 2019; Türk *et al.*, 2018b).

Figura 38.

Difractograma de recubrimientos de FC/NTC con diferentes concentraciones de nanotubos de carbono multipared.



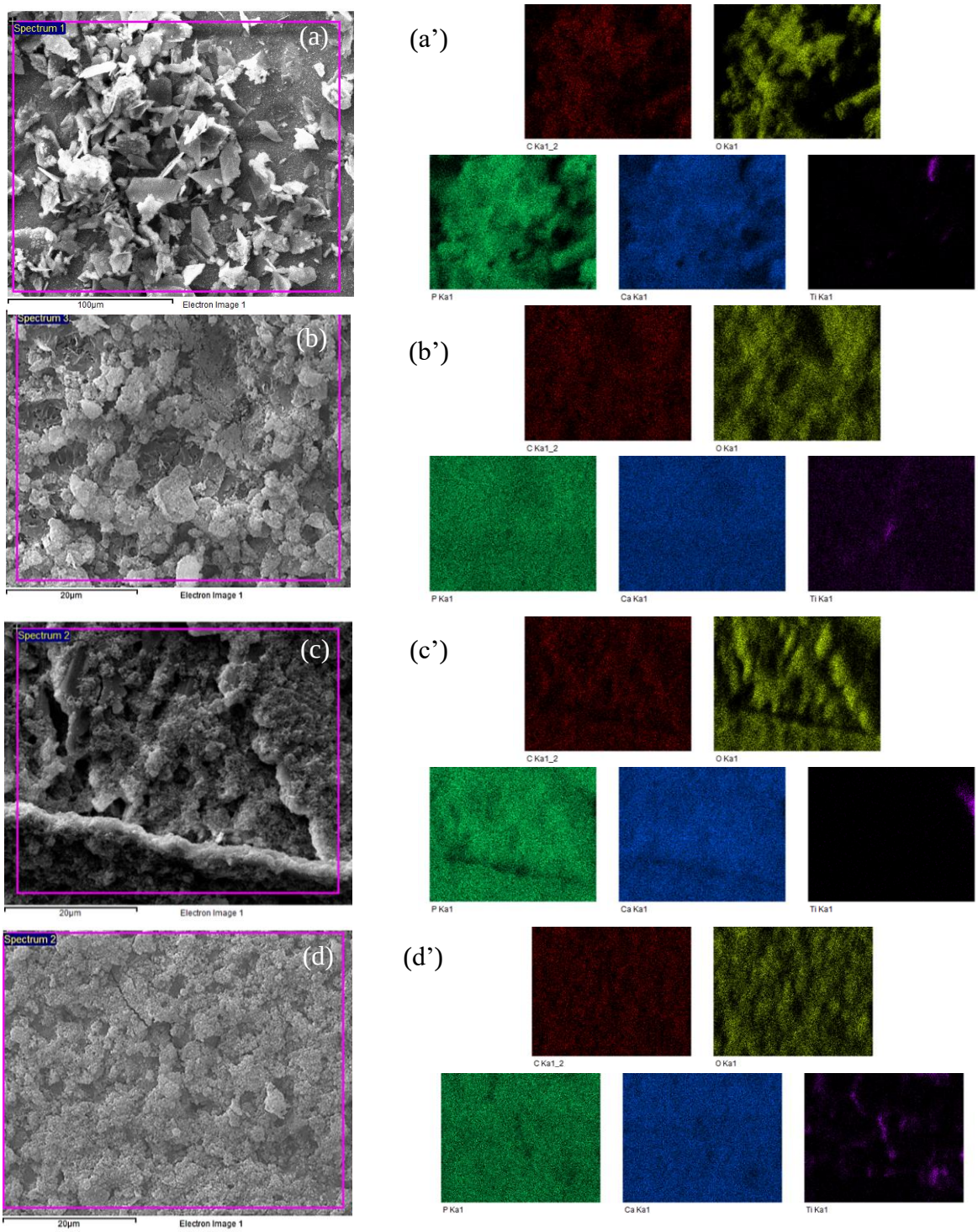
En la Figura 39 se muestra la morfología de los recubrimientos y la distribución de los elementos (mapeo químico) Ca, P, O y C, observados por microscopia electrónica de barrido y EDS. La morfología cambia dependiendo de la concentración de NTC, los recubrimientos son altamente porosos, con estructuras no muy ordenadas encontrándose mayor homogeneidad en los recubrimientos FC NTC 0.5 g/L y 1.5 g/L, correspondientes a los recubrimientos brushita-

hidroxiapatita carbonatada. Así mismo, la distribución de elementos es homogénea en los recubrimientos, principalmente Ca, P y C. Los análisis EDS (Figura 40) permitieron calcular la relación Ca/P = 0.98, 1.30, 1.07 y 1.33 para FC NTC 0.0 g/L, FC NTC 0.5 g/L, FC NTC 1.0 g/L, FC NTC 1.5 g/L respectivamente, encontrándose los mayores valores para los recubrimientos FC NTC 0.5 y 1.5 g/L. Estas relaciones fueron calculadas usando el %at de cada elemento coincidiendo con fosfatos de calcio tipo brushita y monetita con relación Ca/P de 1.0 y fosfatos de calcio tipo amorfos o hidroxiapatitas deficientes en calcio. Adicionalmente la cantidad de carbono aumenta de 4.91 a 8.28 %at relacionándose con una buena incorporación de nanotubos de carbono al recubrimiento.

Comparando estos resultados con los polvos sintetizados FC/NTC, se encuentran algunas similitudes, la morfología del recubrimiento de FC sin la presencia de NTC es de tipo hojas autoensambladas, tal como se presenta en el polvo de FC. Los recubrimientos que contienen HA carbonatada están formados por granos irregulares de menor tamaño que FC/NTC 0.0 g/L, con mayor homogeneidad para FC/NTC 1.5 g/L.

Figura 39.

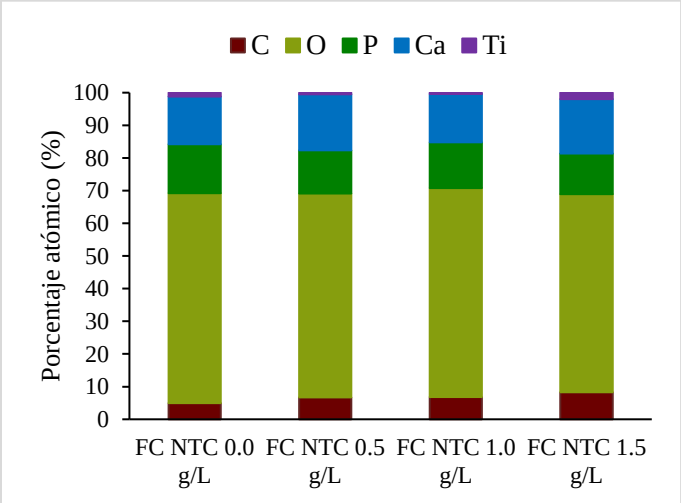
Micrografías SEM y mapeo químico de recubrimientos (a, a') FC/NTC 0.0 g/L, (b, b') FC/NTC 0.5 g/L, (c, c') FC/NTC 1.0 g/L y (d, d') FC/NTC 1.5 g/L



Nota. La magnificación original fue de 500X para (a) y 2000X para (b, c, d).

Figura 40.

Porcentaje atómico elemental encontrado por EDS para recubrimientos FC/NTC



4.3.4 Evaluación de la adherencia recubrimiento-sustrato por Scratch test

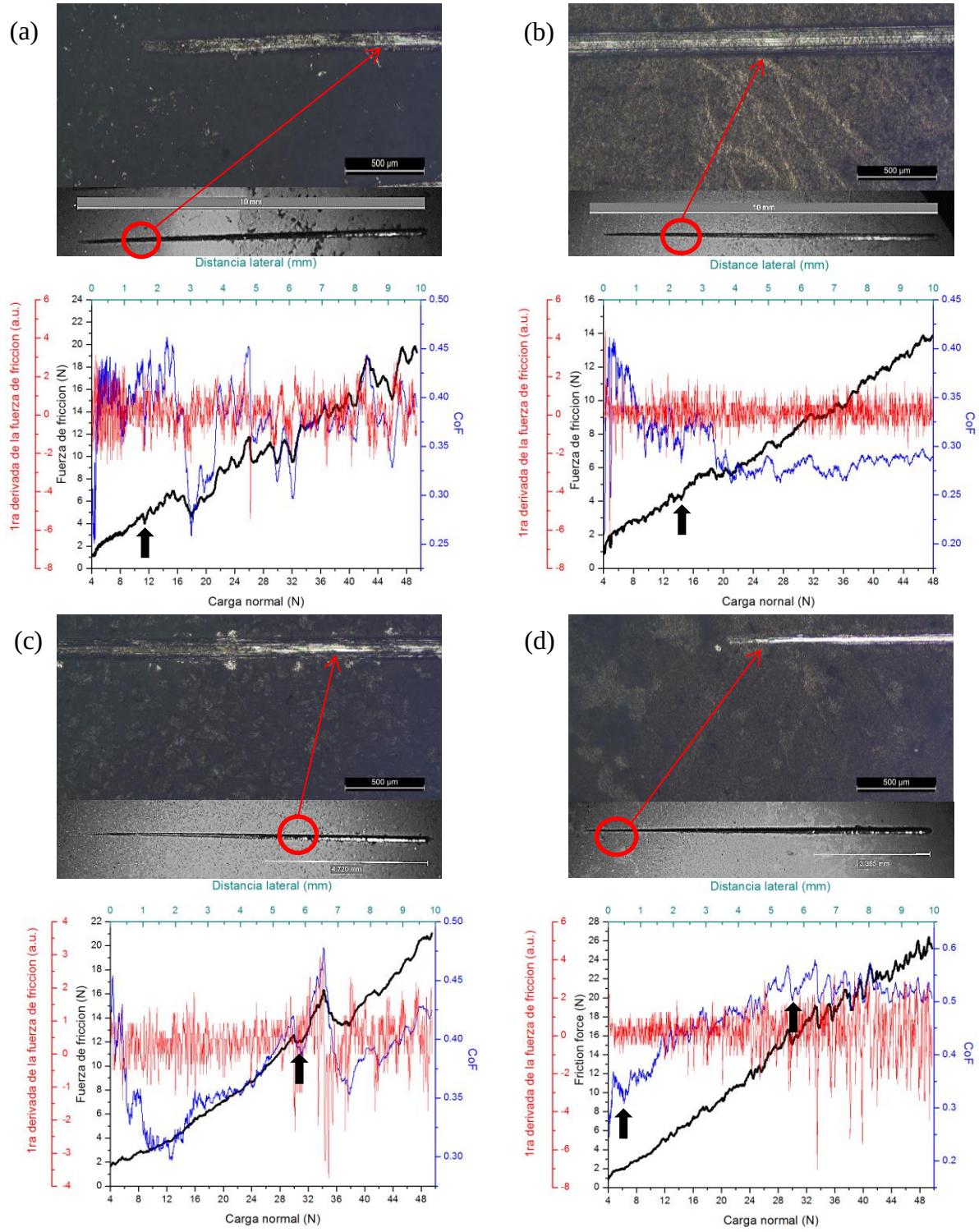
En la Figura 41 se muestran las imágenes microscópicas después del ensayo de scratch test junto con la gráfica obtenida en este ensayo. Dicha gráfica entrega la variación de la fuerza de fricción (N), primera derivada de la fuerza de fricción y coeficiente de fricción, todas estas variables vs la carga normal aplicada (N) y distancia lateral (mm) del rayado. La carga crítica (Lc_3), calculada con la variación de la primera derivada de la fuerza de fricción, es la carga normal en la que existe la delaminación total del recubrimiento.

Una variación significativa en la fuerza de fricción ocurre junto con una disminución abrupta en el coeficiente de fricción, a su vez, se produce un aumento en la variación de la primera derivada de la fuerza de fricción. Este punto se observa en la Figura 41 a, b, c y d; identificado con flechas negras. El valor de la carga normal en donde existe la variación significativa de la fuerza

de fricción fue de 10.06±2.15, 12.89±1.37, 29.03±1.20 y 6.24±0.51 N para FC NTC 0.0 g/L, FC NTC 0.5 g/L, FC NTC 1.0 g/L y FC NTC 1.5 g/L respectivamente y se estableció como la carga crítica Lc_3. Las imágenes microscópicas muestran el punto cercano donde existe la delaminación total del recubrimiento y se observa material desgastado en el borde del rayado.

Figura 41.

Scratch test de recubrimientos de FC NTC con diferentes concentraciones de nanotubos de carbono multipared



Nota. La Figura representa la variación de la fuerza de fricción, primera derivada de la fuerza de fricción, coeficiente de fricción vs distancia de rayado (0 a 10 mm) y carga normal (4 a 50 N). Imágenes de microscopio óptico del rayado, (a) FC NTC 0.0 g/L, (b) FC NTC 0.5 g/L, (c) FC NTC 1.0 g/L y (d) FC NTC 1.5 g/L. Barra de escala = 500 µm para (a, b, c, d).

Se observa para todos los recubrimientos que desde el inicio del rayado (4N) existe falla cohesiva (Figura 41), sin embargo, la delaminación total del recubrimiento se lleva a cabo a valores de carga considerables. Behera *et al.*, encontró un valor de 7.8 N como el valor de carga a la cual un recubrimiento de HA-βTCP hecho por magnetron sputtering sobre Ti6Al4V se delamina completamente (Behera et al., 2018). Farnoush *et al.*, encontró que modificando un recubrimiento por electrodeposición de HA con nanopartículas de TiO_2, la carga crítica aumenta de 4.83 a 8.53 N con un porcentaje máximo de TiO_2 de 20% p (Farnoush et al., 2015). Basados en estos resultados y en los de otros autores, se observa que los recubrimientos desarrollados acá tienen buena adherencia, con un valor mayor para Lc_3 de 29.03 N para FC NTC 1.0 g/L.

La disminución de la carga crítica a medida que aumenta la cantidad de NTC en el recubrimiento puede estar asociado con la alta porosidad y la densificación de material (Fornell *et al.*, 2017), particularmente en la densificación de nanotubos de carbono que no tienen alto grado de funcionalización con los FC. No obstante, para el recubrimiento FC/NTC 1.5 g/L a una carga de 6.24 N, se observa que la fuerza de fricción no tiene oscilaciones, y el ancho de la marca de rayado es más delgada que para los demás recubrimientos, lo que está asociado con la presión de contacto Hertziana, donde a mayor presión de contacto mayor es la fuerza de adhesión y menor es el ancho de rayado (Farnoush et al., 2015; Hatem et al., 2017). Un segundo punto es marcado (flecha negra en la Figura 41 d) en 29.96 N como una segunda carga crítica, esto puede estar

relacionado con las propiedades mecánicas de los nanotubos presentes en el recubrimiento, lo cual refuerza la matriz cerámica y le confiere resistencia mecánica al rayado. Así mismo, hay un aumento en el coeficiente de fricción en los recubrimientos con mayor cantidad de nanotubos.

Los recubrimientos realizados por electrodeposición tienen una desventaja en cuanto al control del tipo de fosfato depositado, ya que depende de la concentración de iones OH^- producidas en el cátodo y esto afecta directamente la composición del FC. Así mismo, el H_2 es producido al mismo tiempo que OH^- dejando formación de burbujas de gas que pueden afectar la adherencia de los FC sobre Ti6Al4V. Se produce entonces mayor cantidad de FC de tipo brushita-monetita, que puede cambiarse a HA, aumentando las densidades de corriente, pero esto produciría más iones OH^- que resultan en más burbujas de hidrógeno y generan menor adhesión del recubrimiento al sustrato (Blackwood y Seah, 2009; Rakngarm y Mutoh, 2009). En consecuencia, se decide electrodepositar FC a pH 4 sin y con nanotubos de carbono, en donde se demuestra que a partir de otolitos es posible electrodepositar FC tipo brushita y monetita, y que la adición de NTC cambia la composición del FC depositado cambiando a brushita + HA carbonatada para las condiciones FC NTC 0.5 y 1.5 g/L, mejorando la adherencia de este tipo de recubrimientos con una mejor condición para FC NTC 1.0 g/L.

4.4 Conclusiones

Con base en la caracterización por Raman, SEM-EDS y TGA, el tratamiento de purificación 1 aplicado a los nanotubos de carbono eliminó en gran porcentaje los elementos metálicos presentes en la estructura sin afectar su morfología. Esta eliminación permite que los

nanotubos tengan menos efectos adversos al ser usados en recubrimientos para implantología, adicionalmente, la relación IG'/IG de 1.31 indica el grado de modificación sin daño aparente en las paredes de los nanotubos de carbono multipared. La presencia de posibles grupos carboxílicos evidenciado por las inflexiones presentadas en la zona II del TGA, se dió para los tratamientos 1 y 2 con pérdidas de peso del 5 y 6% respectivamente.

Los nanotubos de carbono de pared múltiple utilizados en concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5 g/L en una disolución de $Ca(OH)_2$ y H_3PO_4 se funcionalizaron con fosfatos de calcio de tamaño nanométrico preparados por precipitación acuosa a partir de otolitos de Corvina de Rio. Un aumento en la concentración de nanotubos de carbono muestra un cambio en la química de los fosfatos de calcio, por lo tanto, se establece que las fases brushita-monetita y brushita-monetita-hidroxiapatita coexisten para los polvos FC NTC 0.0 g/L y FC NTC 0,5 g/L respectivamente, y para FC NTC 1,0 g/L y FC NTC 1,5 g/L se encontró la fase hidroxiapatita carbonatada. Mientras que para los recubrimientos realizados por electrodeposición coexisten las fases brushita - monetita para FC NTC 0.0 g/L, brushita para FC NTC 1.0 g/L y brushita + HA carbonatada para FC NTC 0.5 y 1.5 g/L.

Los ensayos de adherencia del recubrimiento al sustrato por scratch mostraron que la carga crítica aumenta con el aumento de la concentración de NTC en la solución de electrodeposición hasta cierto valor de NTC agregado, cuando la densificación de los nanotubos de carbono multipared se hace importante. Tratándose de recubrimientos por electrodeposición, los recubrimientos propuestos de FC y NTC tienen buena adherencia, con un valor mayor para Lc_3 de 29.03 N para FC NTC 1.0 g/L.

5 Películas delgadas poliméricas reforzadas con NTC multipared funcionalizados con compuestos cálcicos

5.1 Introducción

Los biomateriales metálicos utilizados en implantología permiten reforzar mecánicamente la fractura o el defecto óseo para la recuperación del paciente, pero suelen ser inertes ya que no hay intercambio activo de iones. Esta propiedad no permite que las células reconozcan el microambiente, proliferen y se diferencien de una mejor manera. Por esta razón, los materiales biocompatibles en recubrimientos como las cerámicas de calcio con una naturaleza química similar a la del hueso o los polímeros naturales o sintéticos permiten la fácil incorporación de materiales bioactivos o ingredientes activos, lo que hace que la recuperación del tejido duro sea más rápida.

Uno de los polímeros sintéticos ampliamente utilizados en la ingeniería de tejidos es la policaprolactona (PCL - poli ε-caprolactona). Posee un estado semicristalino, carácter hidrofóbico, buena solubilidad, bajo punto de fusión, velocidad de degradación adecuada y excelente compatibilidad (Cesur y Kahraman, 2016; Pan *et al.*, 2012; Saveleva *et al.*, 2018), por lo que es un buen candidato para su uso como material de recubrimiento. Un inconveniente como con muchos otros polímeros que tiene la PCL es su baja resistencia mecánica, que se propone modificar en este trabajo mediante la adición de nanotubos de carbono funcionalizados de paredes múltiples (MWCNT por sus siglas en inglés). Recientemente, se ha demostrado que la PCL y los nanotubos de carbono pueden formar una interfaz que mejora ciertas propiedades en el compuesto

(Papageorgiou *et al.*, 2015). Además, los nanotubos de carbono pueden funcionalizarse, permitiendo que otras moléculas se adhieran a las paredes y los extremos, mejorando las propiedades de los materiales. Esta estrategia se ha utilizado ampliamente para incorporar fosfatos de calcio (FC) como la hidroxiapatita (Khanal *et al.*, 2016; H. Li *et al.*, 2017; Ustundag, 2016), $CaCO_3$ o polímeros para aplicaciones como el tratamiento del cáncer, el transporte de medicamentos, las aplicaciones biotecnológicas y la energía (Punetha *et al.*, 2017; Sahithi *et al.*, 2010; T.-M. Wu y Chen, 2006).

Existen escasos estudios centrados en nanotubos de carbono funcionalizados con fosfatos de calcio en una matriz polimérica que se revisan aquí. Grandfield *et al.*, (Grandfield et al., 2009) incorporó en una matriz de quitosano, nanopartículas de hidroxiapatita y nanotubos de carbono, y luego electrodepositó este material sobre Nitinol, concluyendo que estas capas protegen el Nitinol de la corrosión, sin embargo, no se estudió la funcionalización de los nanotubos de carbono. Nawrotek *et al.*, (Nawrotek et al., 2016) electrodepositaron quitosano-nanotubos de carbono con iones de calcio, reportaron que los NTC mejoraron las propiedades mecánicas y que las concentraciones utilizadas de nanotubos de carbono de 10 y 100 mg no afectaron la citotoxicidad del material compuesto. Cai *et al.*, (Cai et al., 2014) funcionalizaron nanotubos de carbono con fosfato de calcio, verificando la adherencia de los fosfatos a los NTC. Este material se agregó a una matriz de PLLA (ácido poliláctico) para obtener armazones de PLLA-HA-CNT, con mejores propiedades mecánicas.

Un polímero natural muy interesante en el área de la biomédica es el colágeno (COL), usado por ser la proteína fibrosa más abundante en el cuerpo humano y otros vertebrados. Está

compuesto por dos cadenas peptídicas α1 y una α2 que se envuelven entre sí, formando una estructura de 1.5 nm de diámetro y 300 nm de longitud aproximadamente. Cada cadena de péptidos es una secuencia de glicina (Gly), prolina (Pro) e hidroxiprolina (Hyp), donde Gly-Pro-Hyp constituye al menos 30% de la cadena (Chatzipanagis *et al.*, 2016; Ding, Du, Cao, Yue, y Cheng, 2019; Kang *et al.*, 2008). Al igual que la PCL, las propiedades mecánicas y químicas del colágeno han sido investigadas por la adición de nanotubos de carbono. Ding *et al.*, tomaron colágeno tipo I de tendón de cola de rata y adicionaron nanotubos de carbono multipared con diferentes relaciones diámetro-longitud para realizar andamios por electrohilado. Encontraron que las fibras de colágeno con NTC multipared preparadas con ácido acético (AA) aumentaron su resistencia a la tensión y la temperatura de degradación de la proteína fue incrementada (Ding *et al.*, 2019). Chakoli *et al.*, dispersaron NTC multipared en AA, acido glutámico, N-hidroxisuccinimida y EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) y agregaron esponjas de colágeno. Como en el estudio de Ding 2019, se mejoró la temperatura de degradación de la proteína y se disminuyó el tiempo de coagulación de sangre de conejo con el aumento de la concentración de nanotubos de carbono (Chakoli et al., 2018).

El objetivo de este capítulo fue evaluar la mejora del rendimiento en la resistencia del polímero PCL y COL con nanotubos de carbono de pared múltiple sin funcionalizar y funcionalizados con fosfatos de calcio. En cuanto a la funcionalización, se usó el material obtenido en el capítulo inmediatamente anterior y se incorporó en una matriz de PCL y COL para usarse como recubrimiento sobre sustrato Ti6Al4V realizado por spin coating. Se evaluaron las propiedades fisicoquímicas, así como la prueba de scratch que permitió verificar la adherencia del

recubrimiento al sustrato. En este estudio se observó el comportamiento del material desde varios puntos de vista para proponerlo o no como material potencial en aplicaciones ortopédicas.

5.2 Metodología

5.2.1 Síntesis y caracterización de películas delgadas poliméricas reforzadas con NTC

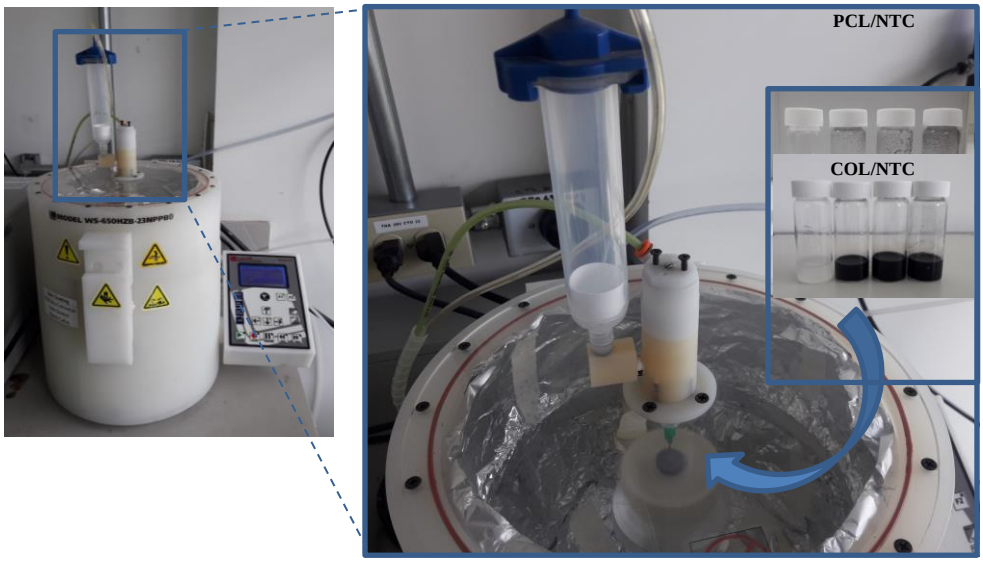
Con el fin de obtener películas delgadas de material compuesto polímero-NTC-FC sobre material de osteosíntesis (Ti6Al4V) se empleó la técnica de Spin Coating. Para esto, se usó Policaprolactona (PCL - Sigma Aldrich número CAS 24980-41-4 Mn 80000) y colágeno tipo I de piel de becerro (COL - Sigma Aldrich número CAS 9007-34-5) para preparar soluciones en ácido acético con y sin nanotubos de carbono multipared. Se disolvió PCL en ácido acético glacial obteniendo una solución 2.5 % p/V mediante agitación mecánica durante 4 h a temperatura ambiente. Se prepararon 3 soluciones adicionales, agregando NTC en concentraciones de 0.5 g/L, 1.0 g/L y 1.5 g/L. Cada una de estas 3 soluciones se llevaron a un equipo de ultrasonido con el fin de mejorar la dispersión usando amplitud de 45 % y pulsos 2:1 durante 60 min (Pan *et al.*, 2012). Finalmente, las soluciones se sometieron a agitación mecánica y a baño ultrasónico durante 30 min a 25 °C. Para la matriz de colágeno, se preparó una solución 0.5 M de ácido acético y se disolvió colágeno tipo I en una concentración de 0.8 % p/V con agitación mecánica de 200 rpm durante 2 h a temperatura ambiente. Se agregó NTC en las concentraciones anteriormente mencionadas y se dispersaron mediante ultrasonido de alta frecuencia usando amplitud de 45%, pulsos 2:1 durante 5 min cuidando la no desnaturalización de la proteína.

Se utilizó un equipo de spin coating (Laurell WS-650H2B Figura 42) en el método distribución estática para obtener películas delgadas poliméricas, llevándose a cabo la deposición de 5 capas sobre un sustrato de Ti6Al4V, cada una con tiempo de 60 s y con un volumen de gota de 30 µL y 40 µL para PCL y COL respectivamente. La velocidad utilizada para la primera capa fue de 3000 rpm, mientras que las otras 4 se realizaron a 4000 rpm. Con el fin de mejorar la adhesión del recubrimiento, los sustratos se expusieron a un tratamiento térmico a 50 °C y 35 °C para PCL y COL respectivamente durante 10 min entre capa y capa. El sustrato de Ti6Al4V de 13 mm de diámetro y 3 mm de espesor se preparó superficialmente con papel de carburo de silicio número 180, 240, 360, 400 y 600 y se usó el método de decapado químico de acuerdo con la norma ASTM E407-07 (2015) durante 20 s para eliminar impurezas de la superficie.

La caracterización química y morfológica se realizó mediante SEM (distancia de trabajo de 8.0 - 9.0 mm y un voltaje de aceleración de 15 kV), espectroscopia Raman (láser de 532 nm), FTIR (32 scans, modo ATR).

Figura 42.

Equipo de spin coating y soluciones de PCL/NTC y COL/NTC



5.2.2 Síntesis y caracterización de películas delgadas poliméricas reforzadas con FC/NTC

El polvo de fosfato de calcio/nanotubos de carbono evaluado anteriormente se utilizó para incorporar este material de refuerzo en dos matrices poliméricas, policaprolactona y colágeno. Para la dispersión de FC/NTC en los polímeros y deposición de 5 capas sobre Ti6Al4V se usaron las mismas condiciones descritas en 5.2.1, cambiando el tiempo de dispersión de 20 min para PCL y 5 min para COL. La caracterización química se llevó a cabo mediante espectroscopia Raman y FTIR. Así mismo, se usó SEM para evaluar la morfología de las películas bajo las condiciones descritas anteriormente.

5.2.3 Ensayo de scratch test de PCL/NTC, PCL/FC/NTC, COL/NTC, COL/FC/NTC

Para evaluar la adherencia de los diferentes recubrimientos poliméricos, se empleó el ensayo de scratch test bajo carga progresiva continua de acuerdo con la norma ASTM D7027-13 modo A (ASTM International, 2013). Las condiciones de ensayo fueron carga progresiva continua de 4 a 50 N, una velocidad de carga de 23 N/min y una velocidad de deslizamiento de 5 mm / min, para una longitud total de rayado de 10 mm.

5.3 Resultados

5.3.1 Evaluación química y morfológica de películas delgadas poliméricas reforzadas con NTC

En la Figura 43 se muestra el espectro IR de los recubrimientos de PCL, PCL/NTC y COL. En la Figura 43 (a), se identifica la presencia de los estiramientos C=O, C-C, C-O, C-O-C asimétrico y C-O-C simétrico, y los estiramientos C-H asimétrico y simétrico propios de los enlaces presentes en PCL (Jing et al., 2015; Yang et al., 2015). En la Tabla 6 se muestran las posiciones en los números de onda IR para cada banda asignada. La presencia de la policaprolactona en los recubrimientos es perceptible con concentraciones de nanotubos de carbono de 0.5 y 1.0 g/L, tal como se visualiza en los espectros mostrados en la Figura 43; sin embargo, cuando la concentración es mayor (1.5 g/L), el alto orden o enlazamiento simétrico de los NTC interfiere en la apreciación de las vibraciones de los enlaces químicos y en el señalamiento de los grupos funcionales presentes (Papageorgiou *et al.*, 2015). En la Figura 43 (b) se identifican las bandas a 3291 cm^{-1}, 2924 y 2852 cm^{-1}, 1628 cm^{-1}, 1536 cm^{-1}, 1446 cm^{-1}, 1310-1340 cm^{-1}, 1229

cm^{-1}, y 522 cm^{-1}, correspondientes al estiramiento O-H y N-H, estiramiento C-H, estiramiento C=O de la amida I, vibración de flexión N-H de la amida II, deformación de CH_2 y CH_3, vibración de aleteo CH_2, estiramiento C-N en la amida III y aleteo N-H de la amida respectivamente, propias de la proteína de colágeno (Ding *et al.*, 2019; Türk *et al.*, 2018a). No obstante, tal como sucede con PCL al agregar NTC, hay una disminución completa de las bandas de vibración, en este caso la técnica de espectroscopia Raman funciona mejor, ya que no sufre la fuerte absorción observada en otros tipos de espectroscopía, como en FTIR (Chatzipanagis *et al.*, 2016). Estos espectros Raman para los recubrimientos COL/NTC pueden ser vistos más adelante en la Figura 49.

Figura 43.

Espectro FTIR de recubrimientos de (a) PCL/NTC con diferentes concentraciones de nanotubos de carbono multipared y (b) COL/NTC, obtenidos por el método de spin coating

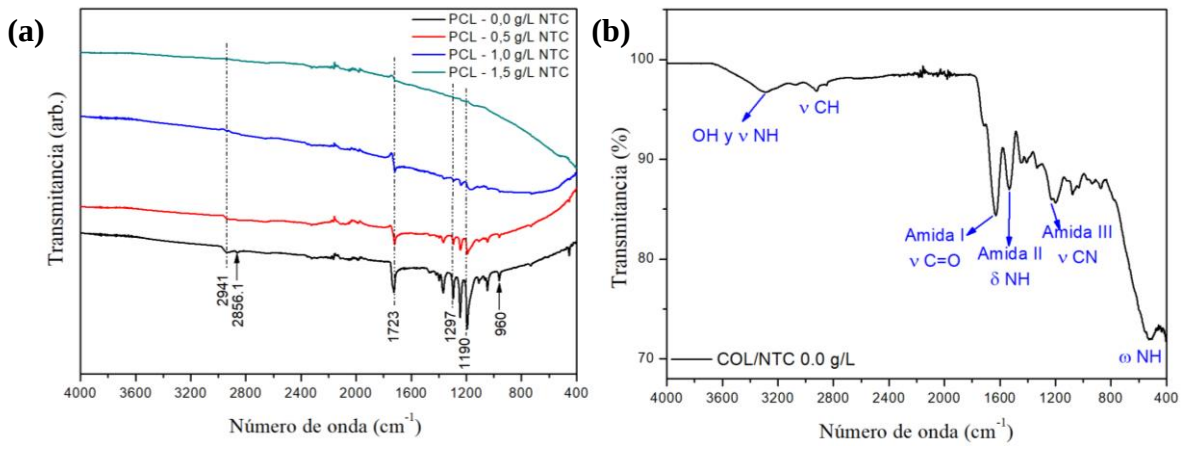


Tabla 6.

Números de onda IR para recubrimientos de PCL NTC.

	Estiramiento asimétrico C-H	Estiramiento simétrico C-H	Tensión C=O	Tensión C-C y C-O	Estiramiento simétrico C-O-C	Estiramiento simétrico C-O-C
PCL – NTC 0.0 g/L	2941.4	2856.1	1727.9	1297.4	1247.7	965.2
PCL – NTC 0.5 g/L	2937.1	2849.3	1723.6	1294.5	1244.9	960.9
PCL – NTC 1.0 g/L	-	-	1723.1	1296.4	1242.9	957.5
PCL – NTC 1.5 g/L	-	-	1722.0	-	-	-

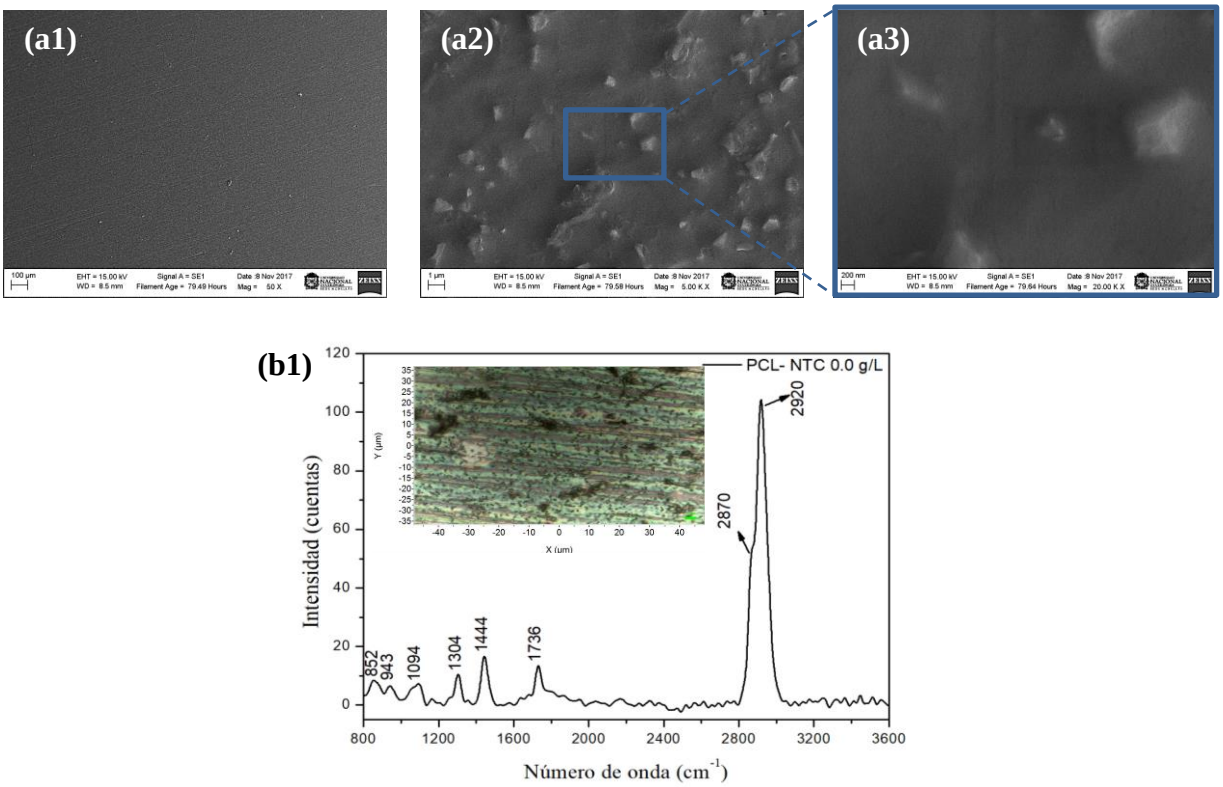
En la Figura 44 a la Figura 47 se presentan las micrografías SEM de los recubrimientos PCL/NTC junto con el espectro Raman. En el caso de la Figura 45 y Figura 46, se muestran dos espectros Raman correspondientes a espectros tomados en dos puntos diferentes del mismo recubrimiento. Con el fin de observar la morfología de los recubrimientos, se realizó microscopia electrónica de barrido a diferentes aumentos, donde se puede observar una baja dispersión de nanotubos de carbono especialmente para la muestra PCL NTC 0.5 g/L. Esto se debe principalmente a que los NTC tienen fuertes interacciones de Van der Waals que son muy difíciles de romper y que los hacen formar agregados (Papageorgiou *et al.*, 2015). Aunque las soluciones preparadas de PCL-NTC fueron estables por un tiempo de 2 h, el medio ácido como el AA y las interacciones anteriormente mencionadas no permitieron una adecuada dispersión de nanotubos de carbono en el recubrimiento. Wesełucha *et al.*, preparó membranas de PCL (Mn 45000) y nanotubos de carbono multipared para ser usadas como scaffolds en ingeniería de tejidos, encontró que los nanotubos funcionan como núcleos de cristalización del polímero, aun cuando son visibles los aglomerados de NTC (Wesełucha-Birczyńska *et al.*, 2015). Tanto en los recubrimientos 0.5 g/L de NTC como en los de 1.0 g/L de NTC, se denotan claramente dos interfases que fueron

analizadas por micro-Raman en un rango de 800 a 3600 cm^{-1}, con una potencia de 50 mW, tiempo de adquisición de 12 s y tiempo de acumulación de 8 s.

La PCL es un polímero semicristalino que, con aditivos orgánicos puede incrementarse los dominios amorfos o cristalinos. En la Figura 44 (b1), es posible identificar las bandas a números de onda a 2920 cm^{-1} (νCH_2 estiramiento antisimétrico), 2870 cm^{-1} (νCH_2 estiramiento simétrico), 1736 cm^{-1} ($\nu C = O$; amorfo), 1444 cm^{-1} (δCH_2; cristalino), 1304 cm^{-1} (ωCH_2; cristalino y amorfo), 1094 cm^{-1} (νCOC ; amorfo), 943 cm^{-1} ($\nu C - COO$) y 852 cm^{-1} ($\nu C - COO$; amorfo) propias de la PCL con dominio amorfo. En el recubrimiento PCL – NTC 0.5 g/L, los espectros Raman de dos interfases identificadas como P1 y P2 son mostrados en la Figura 45 (b1 y b2). Los números de onda para P1 son muy similares a las descritas anteriormente, no obstante, hay una variación para ($\nu C = O$), ya que se modifica de 1736 cm^{-1} a 1727 cm^{-1} indicando un cambio de dominio amorfo a cristalino. Para P2 (Figura 45 (b2)), es claro que el espectro es característico de los NTC descrito en el capítulo 4. Sin embargo, dos bandas más aparecen a 951 y 852 cm^{-1} asociadas al enlace $\nu C - COO$ en la PCL. Para el punto P1 de PCL – NTC 1.0 g/L aparece nuevamente la banda para $\nu C = O$ a 1732 cm^{-1} (Figura 46 (b1)), mientras que para P2 (Figura 46 (b2)), la banda a 2920 cm^{-1} está asociada al enlace CH_2 de la PCL y por último una banda a 3215 cm^{-1} asociada al ión OH, indicativo de la formación de enlaces hidrógeno entre el solvente (ácido acético) y los grupos funcionales de los nanotubos de carbono (Hudecki et al., 2019), lo que indica que a nivel micro, coexiste el polímero y los NTC.

Figura 44.

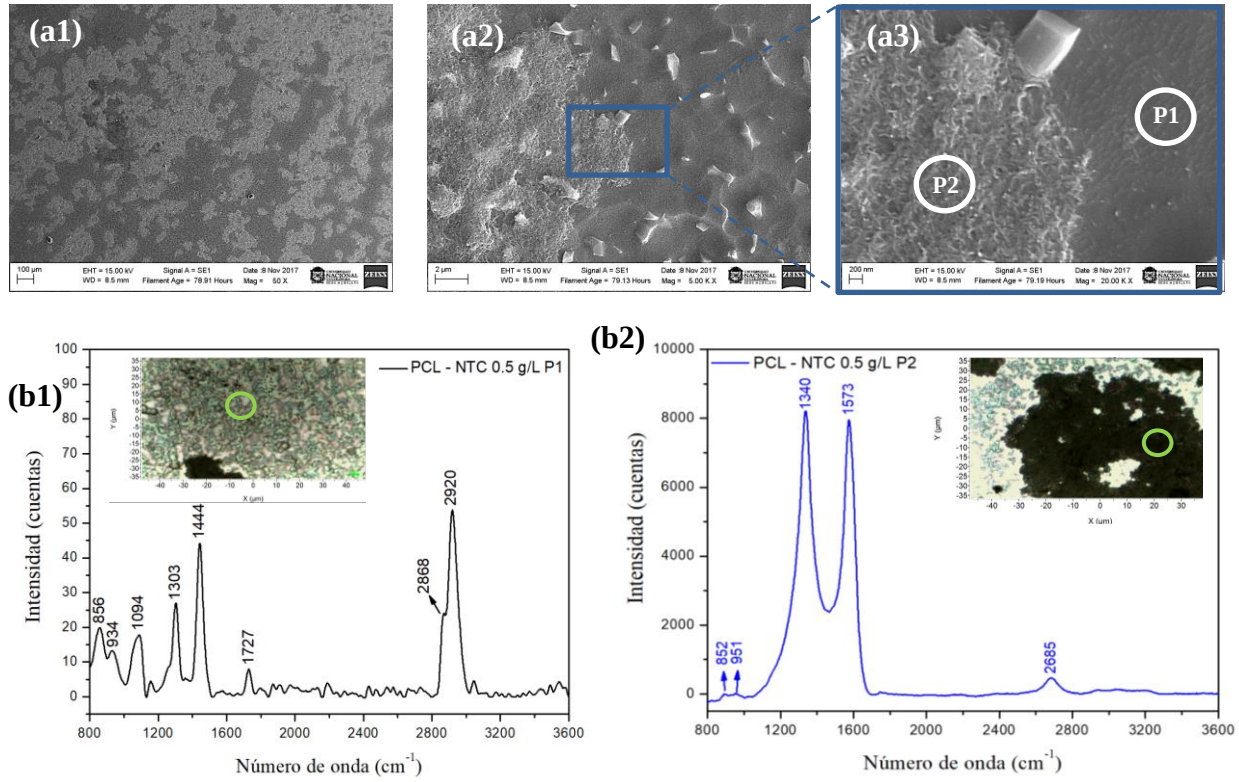
Micrografías SEM (a1-a3) y espectro Raman (b1) del recubrimiento PCL NTC 0.0 g/L



Nota. La magnificación original fue de 50X para (a1), 5000X para (a2) y 20000X para (a3).

Figura 45.

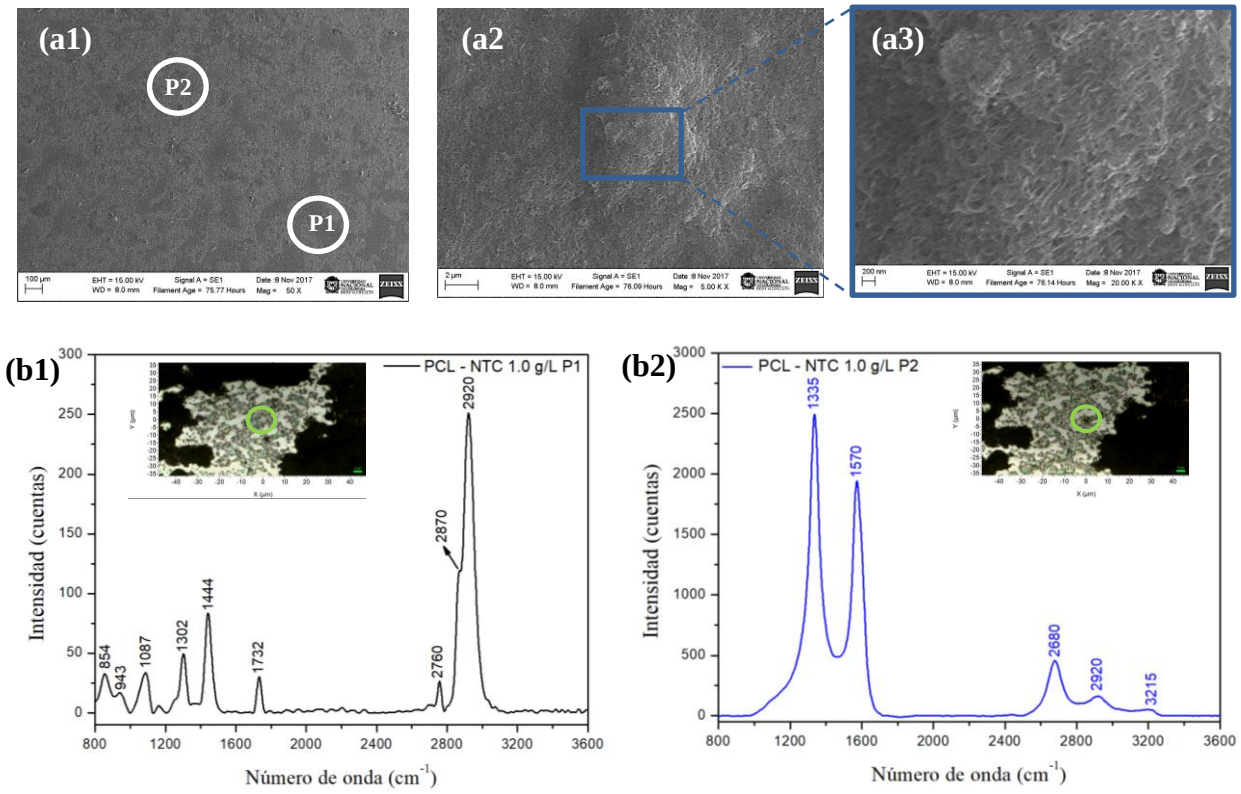
Micrografías SEM (a1-a3) y espectros Raman (b1-b2) del recubrimiento PCL NTC 0.5 g/L



Nota. La magnificación original fue de 50X para (a1), 5000X para (a2) y 20000X para (a3).

Figura 46.

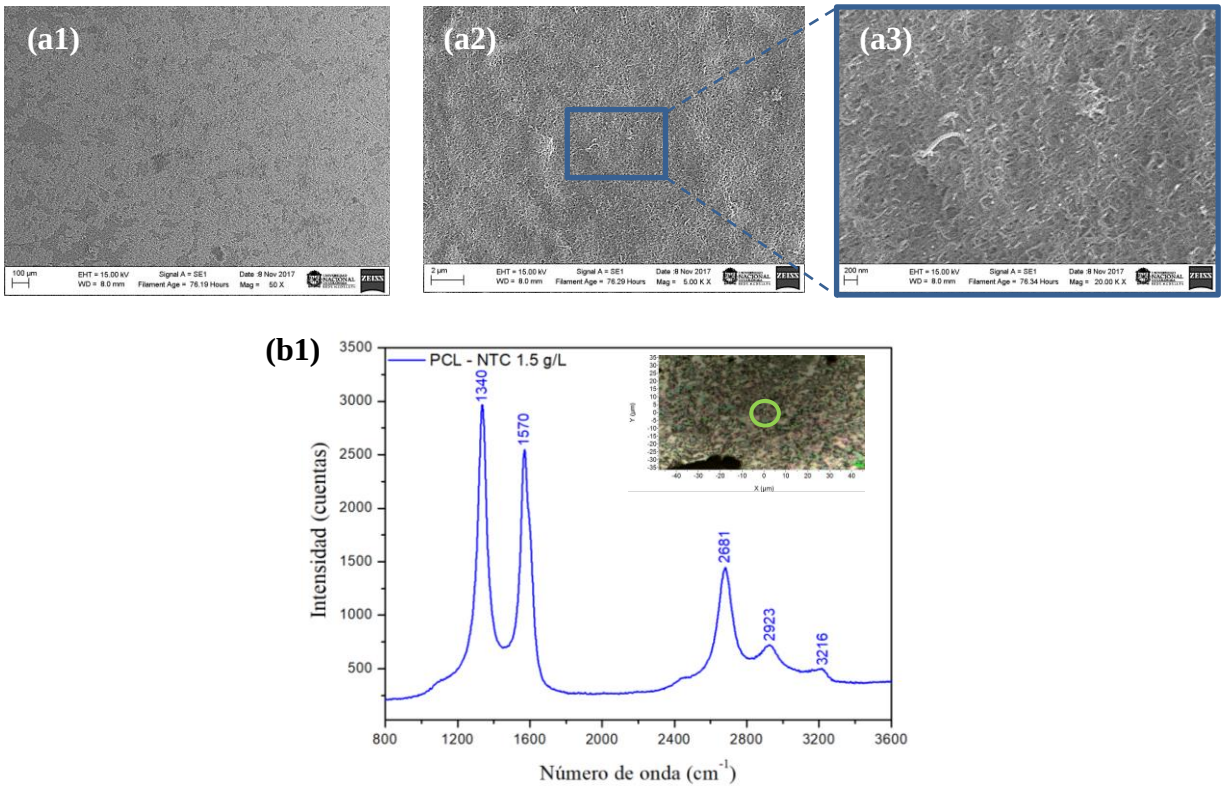
Micrografías SEM (a1-a3) y espectros Raman (b1-b2) del recubrimiento PCL NTC 1.0 g/L



Nota. La magnificación original fue de 50X para (a1), 5000X para (a2) y 20000X para (a3).

Figura 47.

Micrografías SEM (a1-a3) y espectros Raman (b1) del recubrimiento PCL NTC 1.5 g/L



Nota. La magnificación original fue de 50X para (a1), 5000X para (a2) y 20000X para (a3).

Se puede entonces mencionar que la cadena de PCL se ve afectada por interacciones de tipo químico y físico, como puede ser aparición de enlaces covalentes entre PCL y NTC o la distorsión de la cadena polimérica por influencia de los nanotubos de carbono multipared. Finalmente, para un recubrimiento de PCL – NTC 1.5 g/L (Figura 47 (b1)) el espectro micro-Raman es más representativo para NTC, ya que la mayor parte de la superficie esta recubierta por nanotubos de carbono y el carbono grafítico absorbe la mayor parte de la luz incidente y dispersa (Wesełucha-Birczyńska et al., 2015; Yıldırım et al., 2018), no obstante, aparece la banda a 2923 y 3216 cm^{-1} indicando la presencia de PCL y el ion OH.

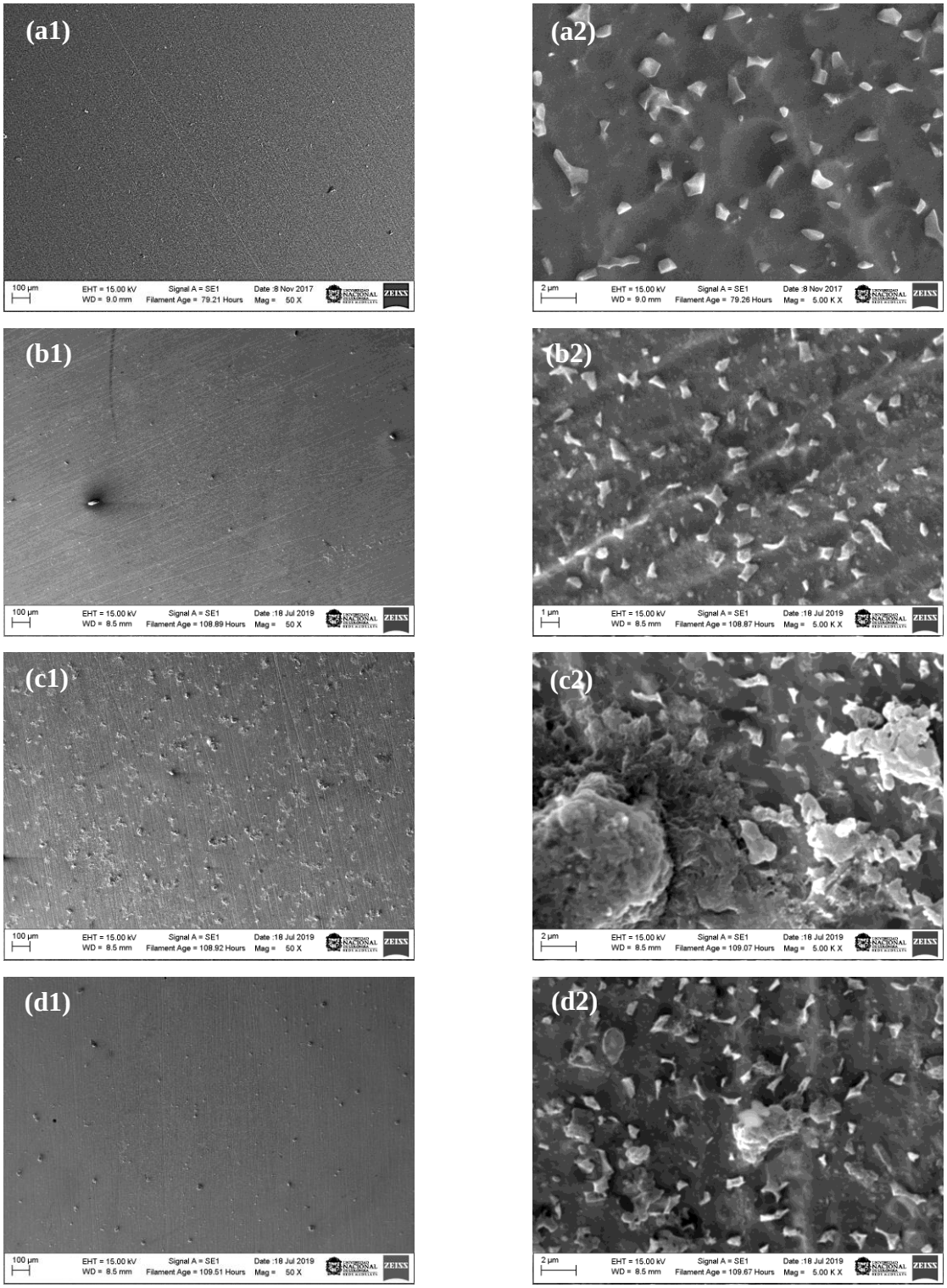
De igual manera como para los recubrimientos de PCL-NTC, se presentan en la Figura 48 y Figura 49 las microscopias electrónicas de barrido y los espectros Raman para los recubrimientos de COL-NTC respectivamente realizados por spin coating. A 50X se observan recubrimientos más homogéneos que los presentados con PCL. Se encontró que la dispersión de los NTC se mejora con polímeros más solubles en soluciones orgánicas de menor concentración ácida (AA 0.5M). En la Figura 49 (a1), las bandas Raman a 853 cm^{-1}, 878 cm^{-1}, 929 cm^{-1}, 1014 cm^{-1}, 1242 cm^{-1}, 1453 cm^{-1}, 1660 cm^{-1}, 2881 cm^{-1}, 2940 cm^{-1} y 3339 cm^{-1}, se atribuyen al estiramiento $(\nu C - C)$ y vibración de flexión CCH en la prolina, estiramiento $(\nu C - C)$ y vibración de flexión CCH en la hidroxiprolina, al anillo del prolina, fenilalanina, amida III $\delta(NH)$, vibración de deformación $\delta(CH_2, CH_3)$ de la cadena aminoácida, amida I $(\nu\ C = O)$, estiramiento $\nu(CH_2, CH_3)$ (2881 y 2940 cm^{-1}), vibración del enlace O–H de la hidroxiprolina y N–H de las amidas en esqueletos protéicos respectivamente, características del colágeno tipo I (Chatzipanagis et al., 2016; France et al., 2014; Janko et al., 2010; Nguyen et al., 2012; Pezzotti et al., 2017; Unal y Akkus, 2015). A medida que aumenta la concentración de NTC, el material se dispersa menos en la matriz de COL, encontrándose agregaciones mayores para los recubrimientos COL/NTC 1.0 g/L y COL/NTC 1.5 g/L (Figura 48 (c1) y Figura 48 (d1)).

En los espectros micro-Raman de la Figura 49 (b1), (c1) y (d1), se aprecian los espectros de dos puntos P1 y P2, donde P2 es el punto con mayor agregación de NTC. Para ambos puntos se aprecia la banda de mayor intensidad para el colágeno ubicada a 2940 cm^{-1} del estiramiento $\nu(CH_2, CH_3)$ y otras no muy visibles en el rango de 800-1200 cm^{-1} debido a la baja intensidad, el resto del espectro es característico de los NTC. A diferencia de la matriz de PCL, no se encontró un punto en donde solo se encuentre el polímero, el COL coexiste con los NTC encontrando una

interacción entre los dos materiales. La presencia de las bandas de NTC y colágeno en el recubrimiento y el cambio en las intensidades confirma la interacción entre los dos materiales sin mayores cambios en las propiedades individuales (Park et al., 2014).

Figura 48.

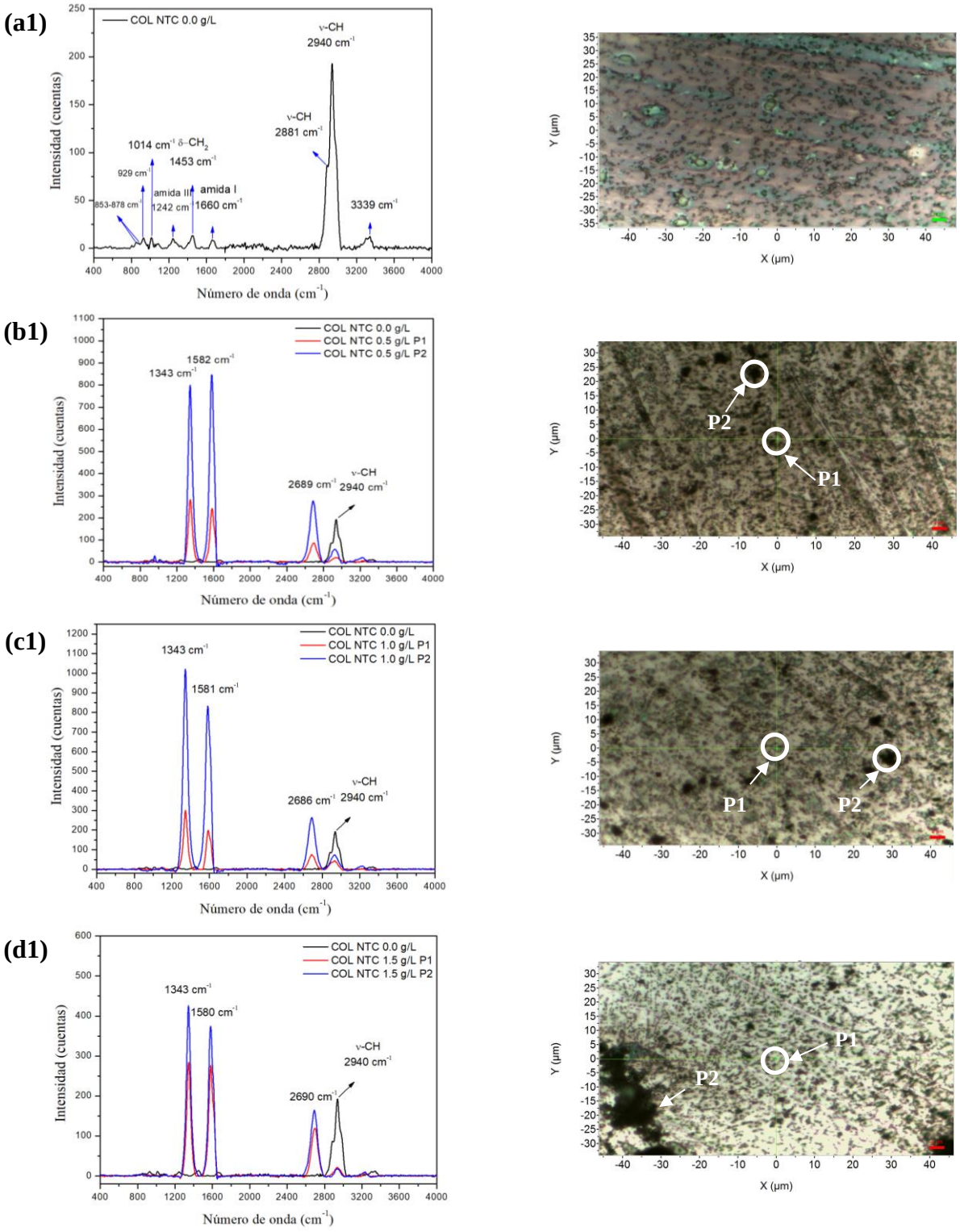
Micrografías SEM de recubrimientos (a1-a2) COL NTC 0.0 g/L, (b1-b2) COL NTC 0.5 g/L, (c1-c2) COL NTC 1.0 g/L y (d1-d2) COL NTC 1.5 g/L



Nota. La magnificación original fue de 50X para (a1, b1, c1, d1) y 5000X para (a2, b2, c2, d2).

Figura 49.

Espectros Raman de recubrimientos (a1) COL NTC 0.0 g/L, (b1) COL NTC 0.5 g/L, (c1) COL NTC 1.0 g/L y (d1) COL NTC 1.5 g/L y sus respectivas micrografías.



5.3.2 Evaluación química y morfológica de películas delgadas poliméricas reforzadas con FC/NTC

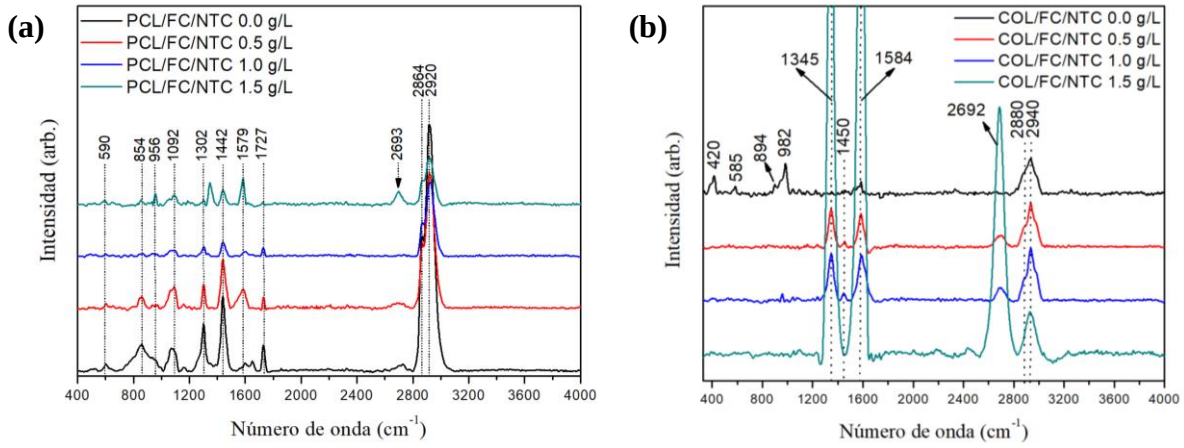
En la Figura 50 (a) se muestra el espectro Raman del recubrimiento compuesto de PCL/FC/NTC realizado por spin coating. Las bandas para el estiramiento asimétrico y simétrico de CH_2 están a 2920 cm^{-1} y 2864 cm^{-1} respectivamente para PCL. Las bandas a 1727 cm^{-1}, 1442 cm^{-1}, 1302 cm^{-1}, 1092 cm^{-1} y 854 cm^{-1}, se pueden atribuir al estiramiento ($\nu C{=}O$), flexión (δCH_2), vibración de aleteo (ωCH_2), estiramiento (νCOC) y estiramiento ($\nu C\text{-}COO$) de PCL respectivamente (Wesełucha-Birczyńska *et al.*, 2015). Estas bandas descritas anteriormente para PCL tienen mayor intensidad para la muestra PCL/FC/NTC 0.0 g/L, intensidad que disminuye a medida que aumenta la cantidad de nanotubos de carbono. Las bandas a 956 cm^{-1} y 590 cm^{-1} están relacionadas con el estiramiento ($\nu_1 P - O$) y la vibración del modo de flexión O–P–O (H) de los fosfatos de calcio respectivamente (Karampas y Kontoyannis, 2013; Pierre *et al.*, 2019; Sánchez-Enríquez y Reyes-Gasga, 2013; Švecová y Bartůněk, 2018; Xu *et al.*, 1999; Z.-L. Zhang *et al.*, 2014). La banda a 956 cm^{-1} también está relacionada con el estiramiento ($\nu C\text{-}COO$) de PCL. Las bandas a 1343 cm^{-1} (banda D), 1579 cm^{-1} (banda G) y 2693 cm^{-1} (banda G') pueden atribuirse a nanotubos de carbono de paredes múltiples, principalmente visibles en el recubrimiento PCL/FC/NTC 1.5 g/L.

En la Figura 50 (b) se muestra el espectro Raman del recubrimiento compuesto de COL/FC/NTC. Como se describió anteriormente en el capítulo 4 para FC en ausencia de NTC, coexisten las fases brushita y monetita, las cuales se evidencian en el recubrimiento COL/FC/NTC 0.0 g/L con las bandas 420 cm^{-1}, 585 cm^{-1}, 894 cm^{-1} y 982 cm^{-1}. Tres bandas a 1450 cm^{-1}, 2880

cm^{-1} y 2940 cm^{-1}, son atribuidas a la vibración de deformación $\delta(CH_2, CH_3)$ y estiramiento $\nu(C-H)$ por la presencia del colágeno y las bandas características D, G y G' de los NTC en 1345 cm^{-1}, 1584 cm^{-1} y 2692 cm^{-1}. Así como para los recubrimientos de COL/NTC en el espectro Raman, en las superficies con FC es posible observar las bandas de vibración de cada uno de los compuestos que conforman del recubrimiento. Un aumento en las intensidades de las bandas D y G y G' de los nanotubos está asociada a la mayor presencia de NTC. Las interacciones colágeno y nanotubos de carbono pueden ocurrir a nivel micro, en donde un NTC puede incorporarse en una molécula de tropocolágeno o el péptido helicoidal envuelva al NTC, sin embargo, no se sabe exactamente cómo el nanotubo de carbono interactúa con las cadenas del colágeno (MacDonald et al., 2005).

Figura 50.

Espectro Raman de recubrimientos (a) PCL/FC/NTC y (b) COL/FC/NTC con diferentes concentraciones de nanotubos de carbono multipared

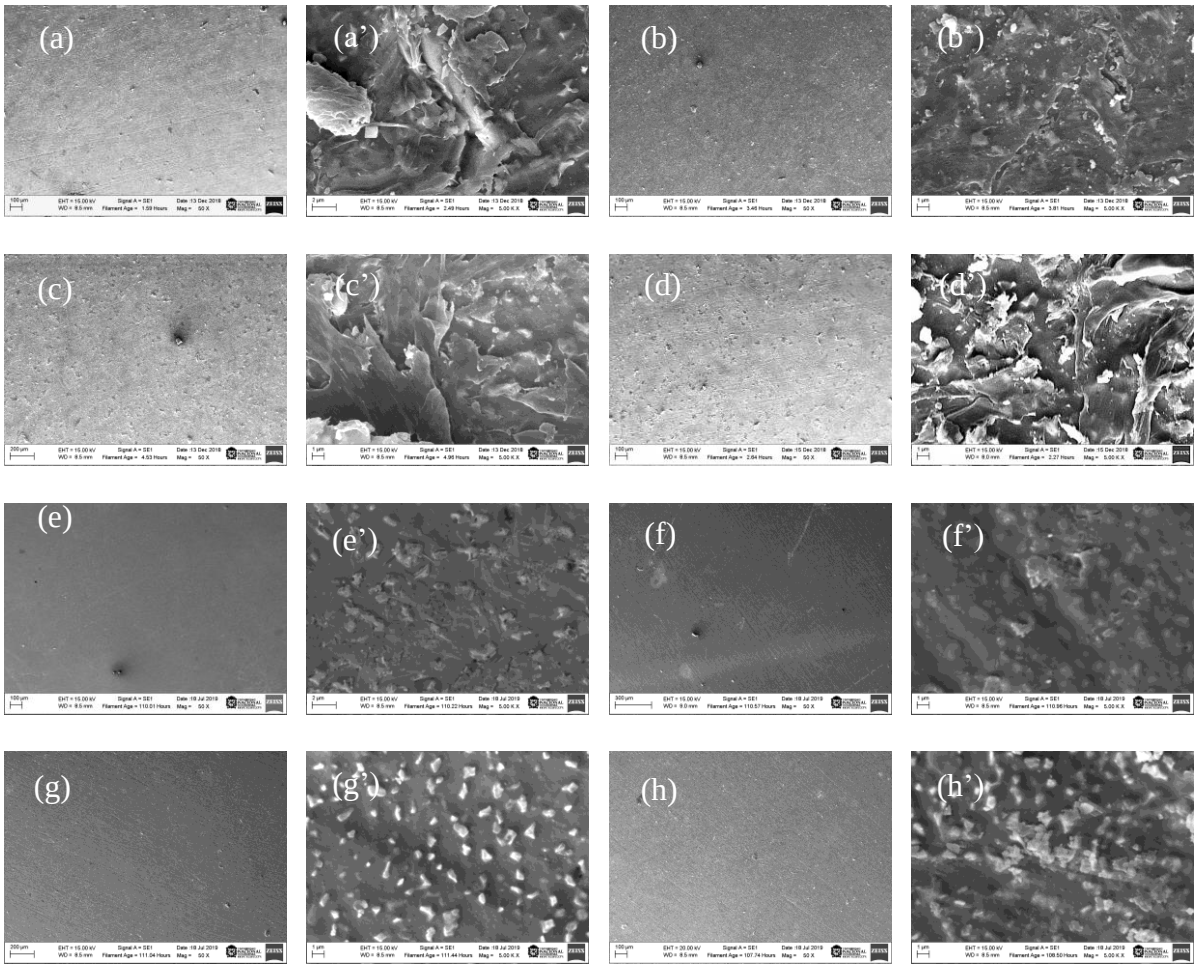


La Figura 51 muestra las micrografías SEM de los recubrimientos de fosfatos de calcio (FC) – nanotubos de carbono (NTC) en dos matrices poliméricas de PCL y COL (PCL/FC/NTC y

COL/FC/NTC). Con un aumento de 50X (Figura 51 a, b, c, d, e, f, g, h), se observan unos recubrimientos uniformes, especialmente para los recubrimientos con ausencia de nanotubos, sin embargo, con un aumento de 5000X (Figura 51 a', b', c', d', e', f', g', h'), se observaron aglomerados en las superficies, correspondientes a aglomerados de fosfatos de calcio y nanotubos de carbono con fosfatos de calcio que se hicieron evidentes en las superficies con la mayor cantidad de nanotubos (PCL/FC/NTC 1.5 g/L y COL/FC/NTC 1.5 g/L). Lo anterior es debido al hecho que a medida que aumenta la concentración de nanotubos la dispersión del material en polvo en la matriz polimérica se vuelve más difícil. Se observan las líneas de fuerza en las que el material fue depositado, debido a la velocidad usada en el spin coating, por lo que los recubrimientos no fueron homogéneos. No obstante, se debe evaluar la biocompatibilidad del material, ya que esta depende de la química del material, la energía superficial y la topografía de la superficie (Pan *et al.*, 2012).

Figura 51.

Micrografías SEM de recubrimientos (a, a') PCL FC NTC 0.0 g/L, (b, b') PCL FC NTC 0.5 g/L, (c, c') PCL FC NTC 1.0 g/L, (d, d') PCL FC NTC 1.5 g/L, (e, e') COL FC NTC 0.0 g/L, (f, f') COL FC NTC 0.5 g/L, (g, g') COL FC NTC 1.0 g/L y (h, h') COL FC NTC 1.5 g/L



Nota. La magnificación original fue de 50X para (a, b, c, d, e, f, g, h) y 5000X para (a', b', c', d', e', f', g', h').

5.3.3 Adherencia de las películas de PCL/NTC, PCL/FC/NTC, COL/NTC y COL/FC/NTC

La Figura 52 (a-d) muestra la variación de la fuerza de fricción (N) y la primera derivada de la fuerza de fricción vs la carga normal. La carga crítica Lc_3 (demarcada con círculos) fue de 13.51±2.05, 13.97±3.98, 15.29±0.84, 19.37±2.54, 21.84±0.50, 23.53±0.29, 25.14±0.51 y

31.72±2.77 N para PCL/NTC 0.0 g/L, 0.5 g/L, 1.0 g/L y 1.5 g/L; PCL/FC/NTC 0.0 g/L, 0.5 g/L, 1.0 g/L y 1.5 g/L respectivamente. Es claro el aumento en la carga normal a medida que aumenta la cantidad de nanotubos de carbono, a su vez, la adición de FC a la matriz polimérica de PCL aumenta el valor de Lc_3, mejorando la adhesión recubrimiento-sustrato significativamente.

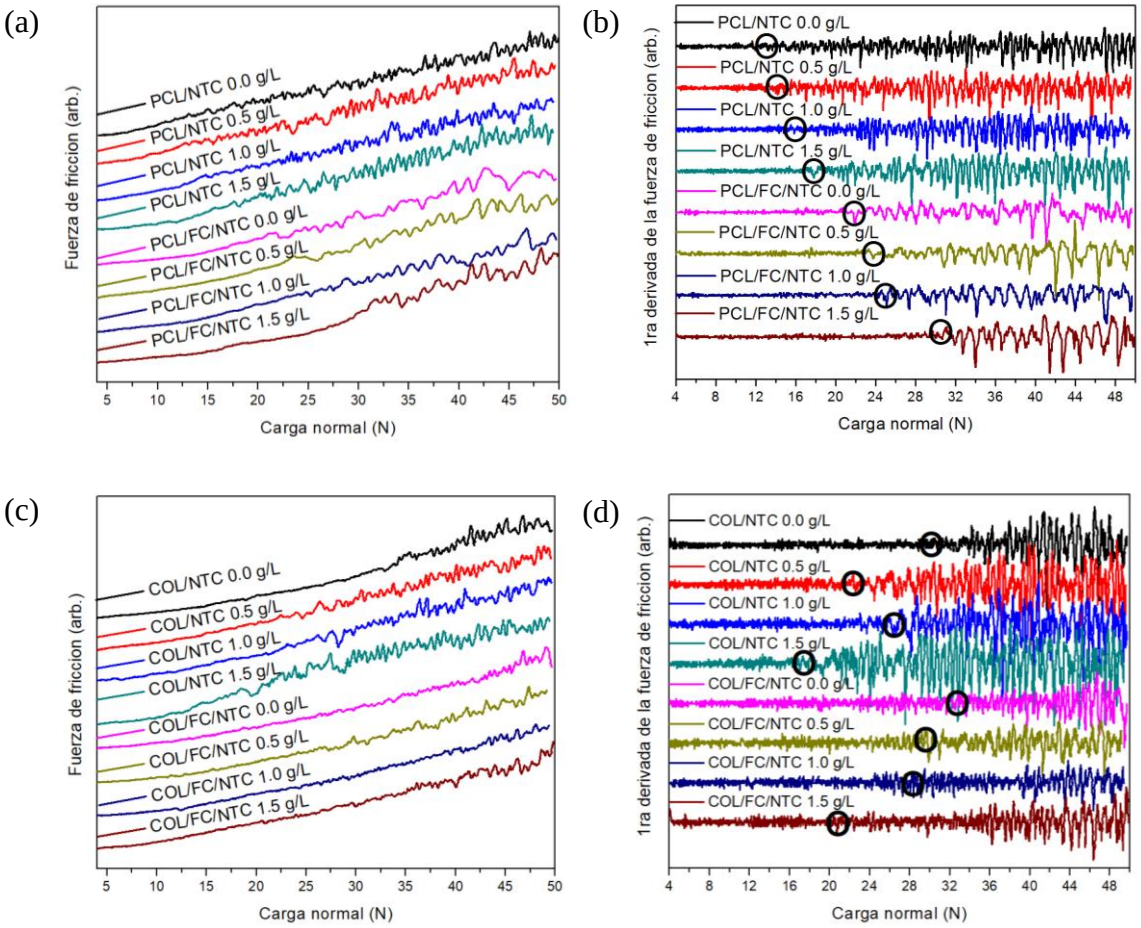
La carga crítica Lc_3 fue de 29.87±3.29, 22.00±1.81, 27.22±0.49, 16.25±2.12, 32.33±2.16, 29.93±0.19, 29.12±0.61, 20.41±0.31 para COL/NTC 0.0 g/L, 0.5 g/L, 1.0 g/L y 1.5 g/L; COL/FC/NTC 0.0 g/L, 0.5 g/L, 1.0 g/L y 1.5 g/L respectivamente. Al contrario de lo que sucede con la matriz de PCL, el valor de carga crítica no aumenta a medida que aumenta la concentración de NTC. En este caso, la adición de NTC desmejora la adhesión recubrimiento-sustrato, debido a que el tiempo usado para la dispersión de NTC y FC/NTC en la matriz de colágeno fue de 5 min, tiempo que no fue suficiente para dispersar todo el material cerámico en la matriz de COL; sin embargo, no fue posible usar un tiempo mayor de dispersión a alta frecuencia debido a que la proteína se podía desnaturalizar. Este corto tiempo de dispersión, permitió que aunque la solución fuera estable, existieran agregados de mayor tamaño en la solución polimérica, que al ser depositados sobre el sustrato de titanio a la velocidad del spin coating, salieran más fácilmente de la muestra, encontrándose recubrimientos más delgados como se puede observar en las microscopias electrónicas de barrido de la Figura 51 para COL/FC/NTC. Los recubrimientos que presentan menores valores de Lc_3 son los que contienen mayor concentración de nanotubos de carbono tanto para COL/NTC como para COL/FC/NTC.

En el apéndice A se presentan las figuras de la variación de la fuerza de fricción (N), primera derivada de la fuerza de fricción, coeficiente de fricción en términos de carga normal (N)

y distancia lateral (mm) de cada una de las condiciones evaluadas junto con las micrografías tomadas en el punto cercano de la delaminación total del recubrimiento. De acuerdo con las micrografías presentadas, la falla de todos los recubrimientos de debe al desprendimiento del material, dejando material a lado y lado de la marca de rayado (spalling failure) (Bellido-González et al., 1995). Los coeficientes de fricción muestran un estado fluctuante, de acuerdo con Tozar y Karahan, es debido a la irregularidad de la superficie a escala micro y nano (Tozar y Karahan, 2018). Valores altos en los coeficientes de fricción (CoF) en las etapas iniciales de medición, seguido por un decremento es atribuido a que al inicio los restos de desgaste superficial son arrastrados en la dirección del rayado (Mina et al., 2015). En cuanto a los valores presentados de los CoF, un valor entre 0.40 y 0.50 es encontrado en los puntos de carga critica Lc_3 para todos los casos, este resultado es similar al encontrado por Quirama *et al.*, para una aleación Ti6Al4V aplicando una carga de 1N (Quirama et al., 2017), mientras que al inicio de la prueba, los CoF mayores se encuentran en las muestras con mayor cantidad de NTC.

Figura 52.

Scratch test de recubrimientos poliméricos con FC y diferentes concentraciones de nanotubos de carbono multipared. (a) fuerza de fricción vs carga normal PCL/NTC y PCL/FC/NTC, (b) primera derivada de la fuerza de fricción vs carga normal PCL/NTC y PCL/FC/NTC, (c) fuerza de fricción vs carga normal COL/NTC y COL/FC/NTC y (d) primera derivada de la fuerza de fricción vs carga normal COL/NTC y COL/FC/NTC.



5.4 Conclusiones

Este capítulo informa sobre los aspectos de desarrollo y prueba de un recubrimiento compuesto de dos polímeros PCL y COL por separado, con fosfato de calcio (hidroxiapatita,

brushita y monetita) sintetizado a partir de un biomineral llamado otolito extraído de peces Teleosteos (Plagioscion Squamosissimus) y nanotubos de carbono multipared funcionalizados en diferentes concentraciones (0.5, 1.0 y 1.5 g/L). El recubrimiento se depositó sobre un material de osteosíntesis Ti6Al4V mediante spin coating y se realizaron pruebas funcionales.

Los resultados de FTIR, Raman y SEM demuestran colectivamente que los polvos resultantes de FC/NTC están bien reticulados con la matriz de polímero PCL y COL, destacando que, aunque existieran agregados en la presencia de nanotubos de carbono a la mayor concentración utilizada, hay una interacción polímero-polvos de FC/NTC. Así mismo, las cadenas de PCL y COL se ven afectadas por interacciones de tipo químico y físico, por la aparición de enlaces covalentes entre polímero y NTC o la distorsión de la cadena polimérica por influencia de los nanotubos de carbono multipared en ausencia de fosfatos de calcio.

Con respecto a las pruebas de scratch, se observó que un aumento de los NTC produce un aumento en la carga crítica Lc_3 a la que existe la delaminación completa del recubrimiento de PCL, lo que muestra una fuerte indicación de una adhesión mejorada al sustrato con un valor mínimo de 13.51 N para PCL/NTC 0.0 g/L a 31.72 N para PCL/FC/NTC 1.5 g/L. Mientras que, para la matriz de COL, la dispersión no completa del material cerámico afectó la adhesión del recubrimiento al sustrato, no obstante, se logró mejorar los valores de carga crítica de 29.87 N para COL/NTC 0.0 g/L a 32.33 N para COL/FC/NTC 0.0 g/L y 29.93 N para COL/FC/NTC 0.5 g/L.

A partir de los resultados mostrados en este capítulo, se concluyó que los recubrimientos recientemente desarrollados compuestos por policaprolactona, fosfatos de calcio y nanotubos de

carbono; colágeno, fosfatos de calcio y nanotubos de carbono, pueden ser un material potencialmente futuro para su uso en la regeneración y el tratamiento de enfermedades óseas.

6 Características eléctricas y topográficas de recubrimientos de cerámicos cálcicos, policaprolactona y colágeno reforzado con NTC multipared

6.1 Introducción

Los complejos procesos celulares que se dan cuando los materiales están en contacto con tejido vivo, como el proceso de adhesión celular, dependen de las propiedades superficiales de los biomateriales. Muchos estudios se centran solo en cambiar la arquitectura de los materiales variando la rugosidad. Otras variables como topografía, composición química, propiedades mecánicas, potencial, carga, mojabilidad, etc., se encuentran interconectadas (Metwally y Stachewicz, 2019), por lo cual, dar un concepto amplio de una superficie con base en el estudio de una o dos variables es arriesgado. Una de las propiedades superficiales que se ha investigado es la relación entre la respuesta mecánica y eléctrica, conocida también como efecto piezoeléctrico. Gran parte de los materiales investigados para sensores, actuadores, producción de energía y en biología, presentan características electromecánicas en dominios de tamaño nanométrico. Por esta razón, nuevas técnicas se han desarrollado para evaluar propiedades de los materiales a nanoescala. Dentro de esas técnicas se encuentran la microscopia de fuerza piezoeléctrica (PFM) o microscopia de fuerza electrostática de contacto dinámico (DC-EFM por sus siglas en inglés), esta técnica es

microscopia de fuerza atómica en modo de contacto con una punta conductora eléctricamente cargada capaz de detectar desplazamientos a nanoescala en respuesta a estímulos eléctricos (da Cunha Rodrigues et al., 2015; Newcomb et al., 2019). El alcance de las aplicaciones de PFM se expanden a los materiales híbridos orgánicos – inorgánicos (Seol et al., 2017b). Esta técnica usa un voltaje de oscilación adicional aplicado a la punta conductora del AFM, en donde las deformaciones inducidas por voltaje producen vibraciones periódicas de la superficie de la muestra, las cuales son transmitidas a la punta. Las oscilaciones del cantiléver son leídas con la ayuda de un amplificador de bloqueo. PFM se aplica generalmente para observar los patrones de dominio ferroeléctricos, dado que la ferroelectricidad implica piezoelectricidad, el patron de dominio se puede visualizar por su deformación piezomecánica bajo la aplicación de un campo eléctrico (respuesta piezomecánica de un dominio). Con esta técnica es posible obtener la amplitud (deformaciones) y fase (polarización) como función de un voltaje aplicado para evaluar las características físicas superficiales del material en estudio. PFM puede medir dos componentes de piezorespuesta, en plano (LPFM, lateral piezoresponse force microscopy) y fuera del plano (VPFM, vertical piezoresponse force microscopy). Los movimientos del cantiléver pueden ser de deflexión (VPFM) o de torsión y pandeo (LPFM). Al medir de forma simultánea la señal vertical y lateral, el vector PFM puede ser usado para determinar la dirección final de polarización a un nivel nanométrico. En muestras con orientaciones cristalográficas arbitrarias, la aplicación de voltaje a la punta del AFM resultará en desplazamientos sobre y fuera del plano. (D Denning et al., 2016; Newcomb et al., 2019; Soergel, 2011).

En materiales como la hidroxiapatita se ha estudiado que, sometiendo muestras a polarización eléctrica, se estimula en mayor proporción el crecimiento de apatita ósea in vitro e in

vivo (Nakamura et al., 2004). Películas delgadas de HA nanocristalina muestran efecto piezoeléctrico, en donde se da la polarización espontánea rerversible de naturaleza ferroeléctrica (Lang et al., 2013). Un estudio de Rajesh *et al*., demostró que existe un efecto piezoeléctrico de películas realizadas por spin coating de nanocompuestos de hidroxiapatita con óxido de grafeno reducido sobre sustratos de silicio. Encontraron mediante ensayos PFM que la polarización del compuesto está fuertemente influenciada por la distribución de la HA y los grupos presentes en el óxido de grafeno reducido (Rajesh et al., 2017). Otros estudios como el de Stapleton *et al*., y Pal *et al*., investigaron piezorespuesta de materiales biológicos como cristales de lisozima (proteína lobular que se encuentra abundantemente en las claras de huevo de gallina, así como en las secreciones de mamíferos) y uñas humanas mediante la técnica de PFM, evaluando los cambios de amplitud y fase con cambios en el voltaje DC aplicado (Pal et al., 2013; Stapleton et al., 2018).

También existen otras técnicas usando AFM como microscopia de barrido de sonda Kelvin (SKPM por sus siglas en inglés). SKPM es una técnica de no contacto que mide los potenciales superficiales locales en una resolución de ~ 10 nm. Técnicas como SKPM son cada vez mas populares para caracterizar aspectos físicos de películas delgadas orgánicas como el transporte de carga en transistores poliméricos. SKPM sondea el potencial electroquímico de la muestra bajo una punta del AFM, lo que es equivalente a medir la diferencia de potencial entre la punta y la muestra (Charrier et al., 2008). Cuando la punta del cantiléver se encuentra cerca de la superficie del material, una fuerza electrostática se genera causada por la diferencia entre los niveles de energía de Fermi. Dicha fuerza electrostática causa la deflexión del cantiléver el cual es monitoreado por un láser y un detector (Metwally y Stachewicz, 2019). Se usaron las técnicas PFM y SKPM para medir características eléctricas de las superficies ceramicas y poliméricas sin

y con nanotubos de carbono multipared. Se llevó a cabo mediciones en un solo ángulo del cantiléver (0°) donde se midió el desplazamiento fuera del plano. El objetivo de este capítulo fue evaluar las diferencias eléctricas superficiales de las películas cuando se agregan refuerzos como los nanotubos de carbono funcionalizados al ser expuestas a diferentes voltajes DC. Aunque la técnica PFM se usa para evaluar la piezorespuesta en los materiales ferroeléctricos y piezoeléctricos, ésta fue útil para determinar los cambios en los dominios de polarización y cambios de amplitud como respuesta a la aplicación de un campo eléctrico.

6.2 Metodología

Con el fin de caracterizar la topografía, la rugosidad y características eléctricas de las diferentes superficies propuestas (potencial de superficie local y piezorespuesta), se usó el microscopio de fuerza atómica (AFM) en diferentes modos según se describe a continuación:

Se midió la deformación mecánica como respuesta al voltaje aplicado por el efecto piezoeléctrico inverso por piezorespuesta de fuerza atómica. Esta medición se llevó a cabo con un microscopio de fuerza atómica (NX10, Park Systems) en el modo de operación de microscopia de fuerzas electrostáticas. Antes de los ensayos, el equipo se calibró con una película de PTZ (Zr/Ti de composición 25/75) con 10% p de PbO, unas dimensiones de 0.7 mm X 0.7 mm y un espesor de 150 nm. Se empleó una punta conductora NCSTAu (Park Systems), cubierta con Au, con una constante de fuerza de 7.4 N/m, 10 nm de diámetro y una frecuencia de resonancia de 160 kHz. Se llevó a cabo el ensayo de microscopia de fuerza electrostática de contacto dinámico (DC-EFM modo contacto o PFM). Con este ensayo fue posible encontrar imágenes de fase y amplitud como respuesta al voltaje aplicado en la punta del AFM en mapeos de 5 X 5 µm con un escaneo de 0.4,

0.6 y 0.8 Hz para los recubrimientos de los cerámicos FC y poliméricos (PCL y COL) respectivamente, una constante de tiempo de 1 ms, una frecuencia de 17 kHz, una distancia inicial de 120 nm de la punta a la muestra, un voltaje de la muestra de 0V, un voltaje de la punta del AFM AC constante de 3V y una variación en el voltaje DC de la punta de -10 V, -5 V, 0 V, +5 V y +10 V fue aplicado. Los análisis de la piezorespuesta se llevaron a cabo con el software XEI de Park Systems versión 4.3.0.

También se llevó a cabo el ensayo de microscopia de barrido de sonda Kelvin (SKPM en modo no contacto) para evaluar el potencial de superficie local. Se realizaron mapeos de 10 X 10 µm con un escaneo de 1 Hz y una distancia entre la punta del AFM y la muestra ente 8 – 12 nm. Se encontró el perfil de rugosidad y la topografía mediante AFM modo no contacto.

6.3 Resultados

6.3.1 Potencial de superficie local y rugosidad de recubrimientos cerámicos y poliméricos modificados con NTC

Mediante SKPM se estimó el potencial de superficie local. En la Figura 53, Figura 54 y Figura 55 se muestran las micrografías y los perfiles del potencial de superficie local de los diferentes recubrimientos cerámicos y poliméricos. En la Tabla 7, se presentan los valores de potencial de superficie local medio y rugosidad media aritmética. Se calculó el valor promedio y la desviación estándar realizando mediciones por duplicado. La topografía 3D y el perfil de rugosidad se muestran en el apéndice B.

El cambio en el potencial superficial puede modificar la adsorción de biomoléculas permitiendo que se inicie o no el proceso de adhesión de proteínas y por ende el proceso de adhesión celular, ya que está también relacionado con la mojabilidad. En la actualidad varios métodos se aplican para modificar el potencial de superficie como aplicación de un campo eléctrico externo, modificación por plasma, haz de iones, irradiación con electrones entre otros (Metwally y Stachewicz, 2019; Truchly et al., 2013). En este trabajo se midió el potencial de superficie local medio sin aplicación de ningún campo externo con el objetivo de observar los cambios en el potencial superficial con el uso de nanotubos de carbono con y sin funcionalizar en películas cerámicas y poliméricas.

De acuerdo con los resultados de SKPM y para las superficies cerámicas, se encuentra una alta variabilidad en el potencial superficial especialmente para los recubrimientos FC/NTC 0.0 g/L y FC/NTC 1.5 g/L. Dos situaciones se presentan, la primera es la no homogeneidad de las superficies y la alta porosidad tal como se evidenció en el capítulo 3 y la segunda son los valores altos de rugosidad como se aprecia en la Tabla 7. El recubrimiento FC/NTC 1.0 g/L tiene potenciales de superficie negativos, mientras que para el recubrimiento FC/NTC 0.5 g/L los potenciales superficiales son positivos. Con los recubrimientos sin la presencia de NTC y con la mayor concentración de NTC, los potenciales fluctúan entre valores positivos y negativos, lo que puede ser favorable, ya que cuando el potencial de superficie fluctúa en rangos micrométricos de forma positiva y negativa, modifica también el patrón de mojabilidad, encontrando un amplio rango de ángulos de contacto, favoreciendo la adsorción de proteínas específicas (Truchly et al., 2013).

Para los recubrimientos PCL/NTC, hay una tendencia a la disminución del potencial de superficie a la agregación de NTC, igualmente sucede con los recubrimientos COL/NTC. La presencia de mayor cantidad de NTC y por ende mayor presencia de grupos funcionales como el ion hidroxilo (capítulo 5) hace que disminuya el potencial de superficie. Mientras que, la presencia de FC en los recubrimientos poliméricos hace que fluctúe ese potencial. No obstante, para PCL/FC/NTC y COL/FC/NTC, los potenciales de superficie local son positivos, tanto en el perfil como el potencial de superficie local medio. Las superficies cargadas positivamente influyen significativamente en la proliferación y propagación celular, especialmente en las primeras etapas de la interacción célula-material, adhesión al sustrato, aplanamiento, propagación y formación de adherencias focales celulares, en donde las fuerzas electrostáticas juegan un papel importante en el enlace de la superficie y el inicio de las adherencias focales iniciales (Chang y Wang, 2011; Metwally y Stachewicz, 2019). En un estudio de Metwally *et al*., el potencial superficial de fibras de PCL producidas por electrospinning medido por SKPM fue de 145 mV. Los resultados mostraron un incremento en la adhesión, proliferación y formación de filopodia (explicado en más detalle en el capítulo 8) de osteoblastos debido al alto valor en el potencial de superficie (Metwally et al., 2018).

Figura 53.

Micrografía AFM y perfil de potencial de superficie local de recubrimientos de FC/NTC

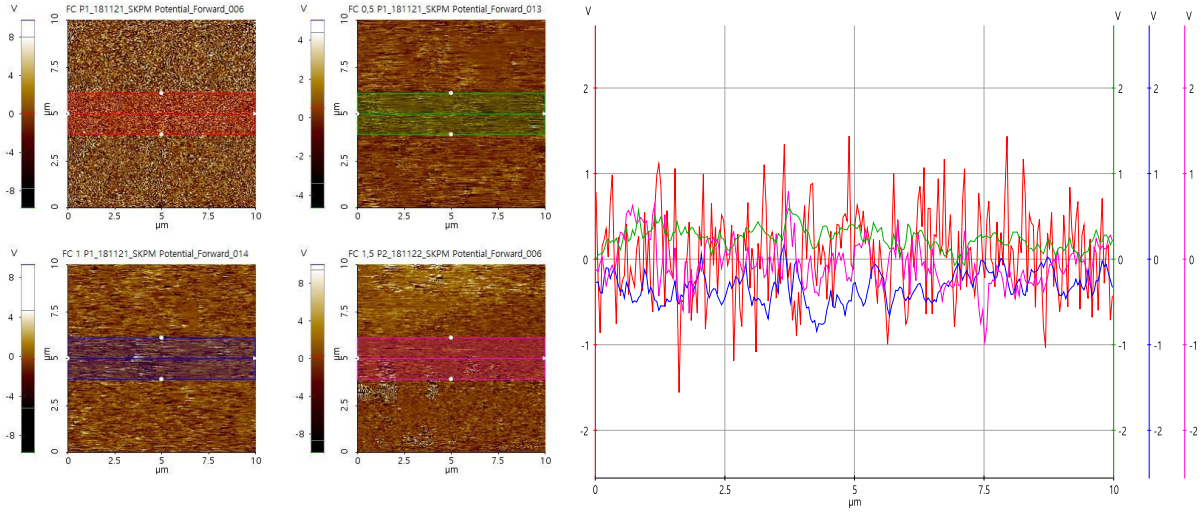
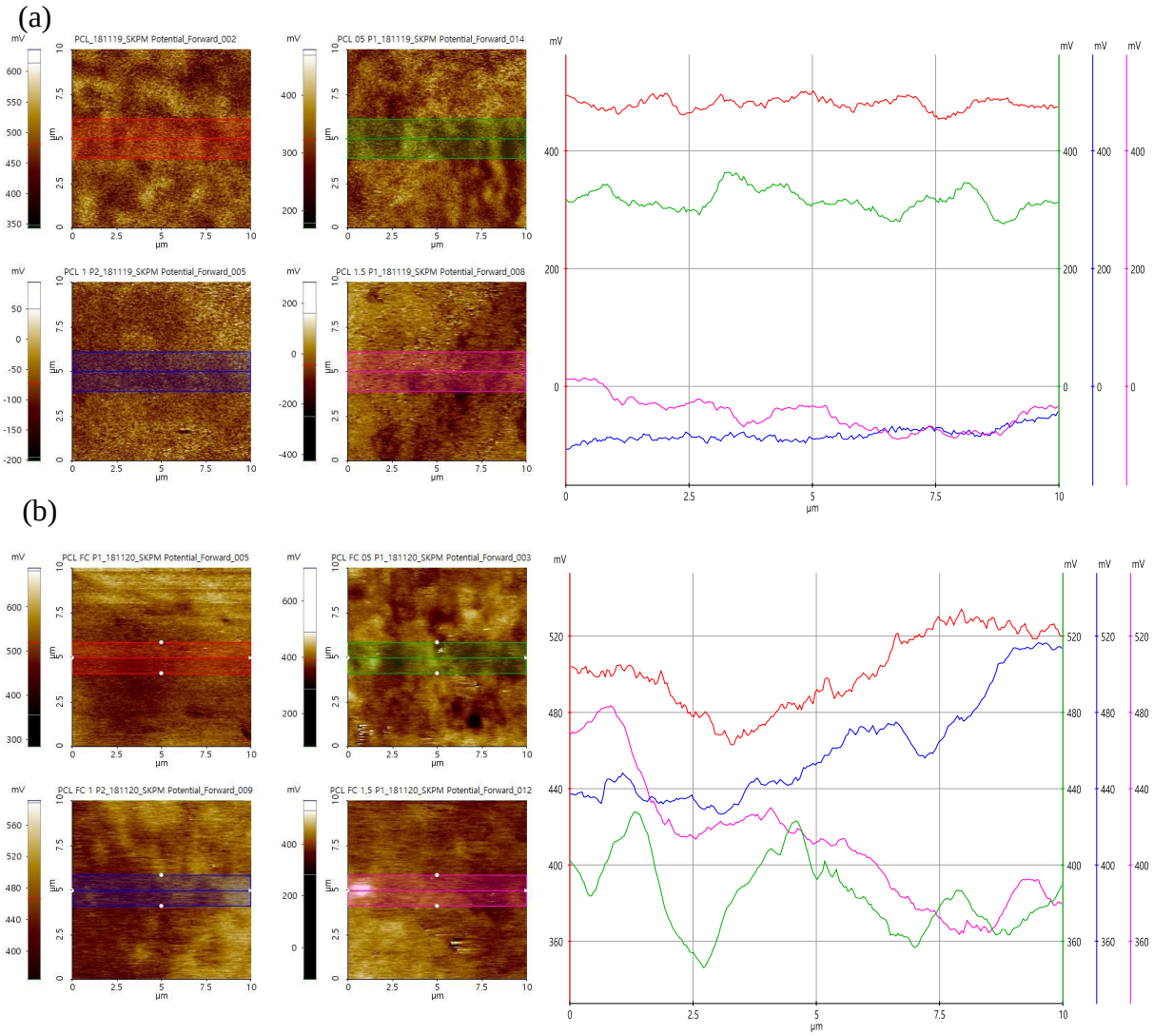


Figura 54.

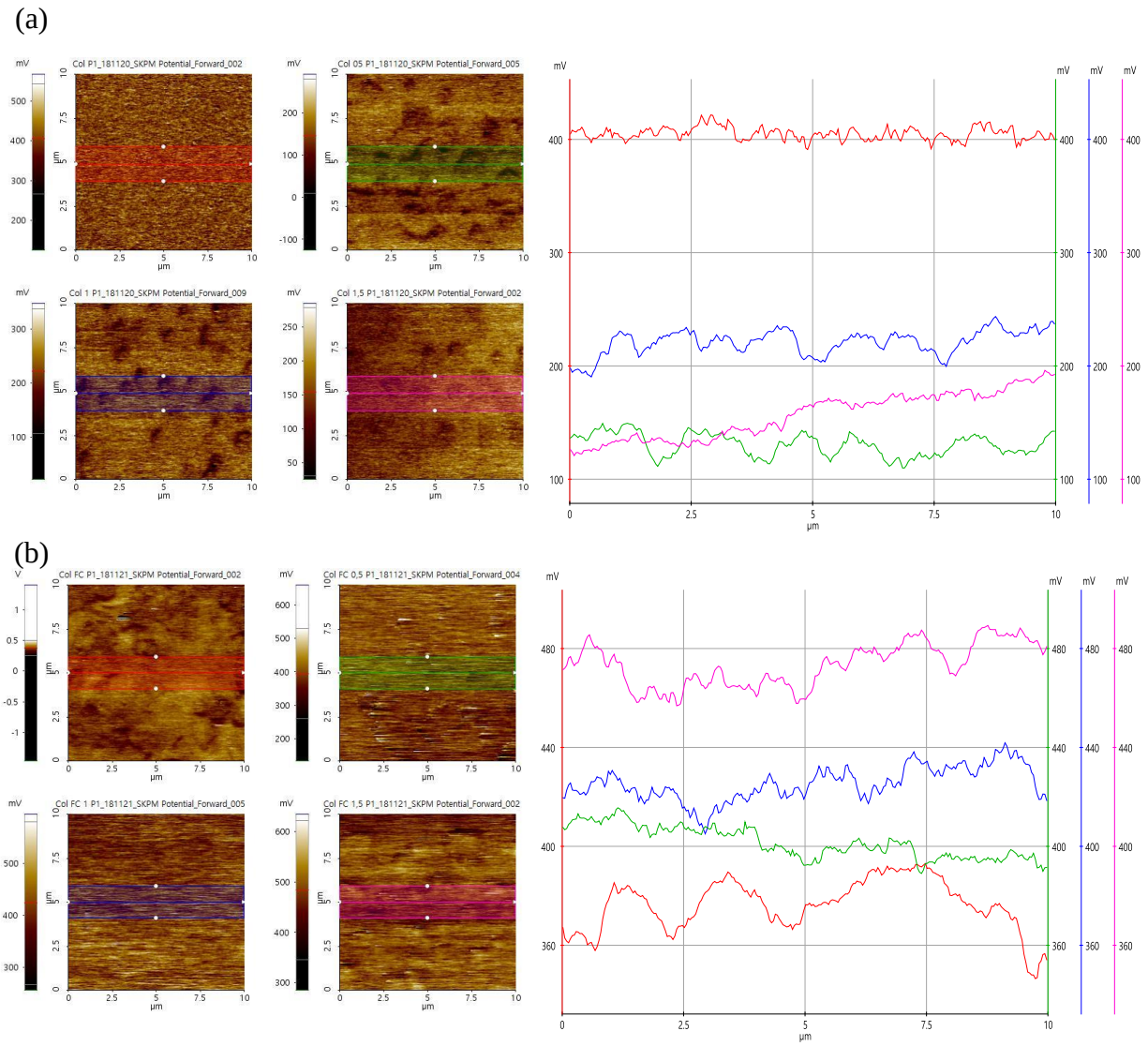
Micrografías AFM y perfil de potencial de superficie local. (a) PCL/NTC y (b) PCL/FC/NTC



Nota. Nanotubos de carbono en concentraciones de 0.0 g/L, 0.5 g/L, 1.0 g/L y 1.5 g/L.

Figura 55.

Micrografías AFM y perfil de potencial de superficie local. (a) COL/NTC y (b) COL/FC/NTC



Nota. Nanotubos de carbono en concentraciones de 0.0 g/L, 0.5 g/L, 1.0 g/L y 1.5 g/L.

En cuanto a la rugosidad media aritmética, otro factor que modifica el comportamiento célula – sustrato, dependiendo de la escala de irregularidades del material, la superficie se divide en macrorugosa (100 µm – milímetros), microrugosa (100 nm – 100 µm) y nanorugosa (menos de 100 nm). La respuesta celular a la rugosidad depende del tipo de célula. Además, los cambios a

nivel nano/micro en la rugosidad de las superficies causan cambios en la energía superficial y la mojabilidad. En forma general, para células largas como neuronas u osteoblastos, superficies macrorugosas pueden funcionar (Chang y Wang, 2011; Tandom et al., 2018). Las superficies cerámicas y poliméricas desarrolladas estuvieron en el rango de micro y nano- rugosidad, encontrando las superficies cerámicas como las de mayor rugosidad. Existen variaciones significativas en los valores de rugosidad de las superficies de matriz poliméricas, esto es debido a la distribución y dispersión de los polvos FC/NTC en los polímeros y la agregación de los NTC entre sí.

Tabla 7.

Potenciales de superficie local medio y rugosidades Ra de los recubrimientos cerámicos y poliméricos.

Muestra	Potencial de superficie local medio (mV)	Rugosidad media aritmética Ra (nm)
Ti6Al4V	192.5 ± 75.66	29.00 ± 4.24
FC/NTC 0.0 g/L	167.5 ± 84.15	323.50 ± 10.61
FC/NTC 0.5 g/L	265.5 ± 40.31	458.50 ± 26.16
FC/NTC 1.0 g/L	-283.5 ± 74.25	517.50 ± 92.63
FC/NTC 1.5 g/L	-152.5 ± 84.15	332.50 ± 17.68
PCL/NTC 0.0 g/L	472.06 ± 10.65	23.75 ± 11.77
PCL/NTC 0.5 g/L	313.95 ± 2.29	136.85 ± 20.15
PCL/NTC 1.0 g/L	-82.61 ± 0.78	242.70 ± 78.06
PCL/NTC 1.5 g/L	-57.94 ± 17.05	181.45 ± 7.85
PCL/FC/NTC 0.0 g/L	483.79 ± 26.22	62.10 ± 16.41
PCL/FC/NTC 0.5 g/L	382.14 ± 2.29	98.65 ± 14.49
PCL/FC/NTC 1.0 g/L	454.31 ± 8.99	112.35 ± 32.17
PCL/FC/NTC 1.5 g/L	403.83 ± 12.54	107.60 ± 28.28
COL/NTC 0.0 g/L	402.28 ± 1.86	71.63 ± 7.74
COL/NTC 0.5 g/L	165.26 ± 23.00	83.40 ± 0.71
COL/NTC 1.0 g/L	202.21 ± 24.73	72.45 ± 7.14
COL/NTC 1.5 g/L	131.05 ± 36.28	80.95 ± 10.96
COL/FC/NTC 0.0 g/L	374.00 ± 4.24	91.50 ± 11.88
COL/FC/NTC 0.5 g/L	386.87 ± 21.36	116.95 ± 4.03
COL/FC/NTC 1.0 g/L	389.27 ± 46.93	121.30 ± 2.55
COL/FC/NTC 1.5 g/L	471.80 ± 4.06	84.85 ± 14.64

6.3.2 Piezorespuesta de fuerza atómica de recubrimientos cerámicos y poliméricos modificados con NTC

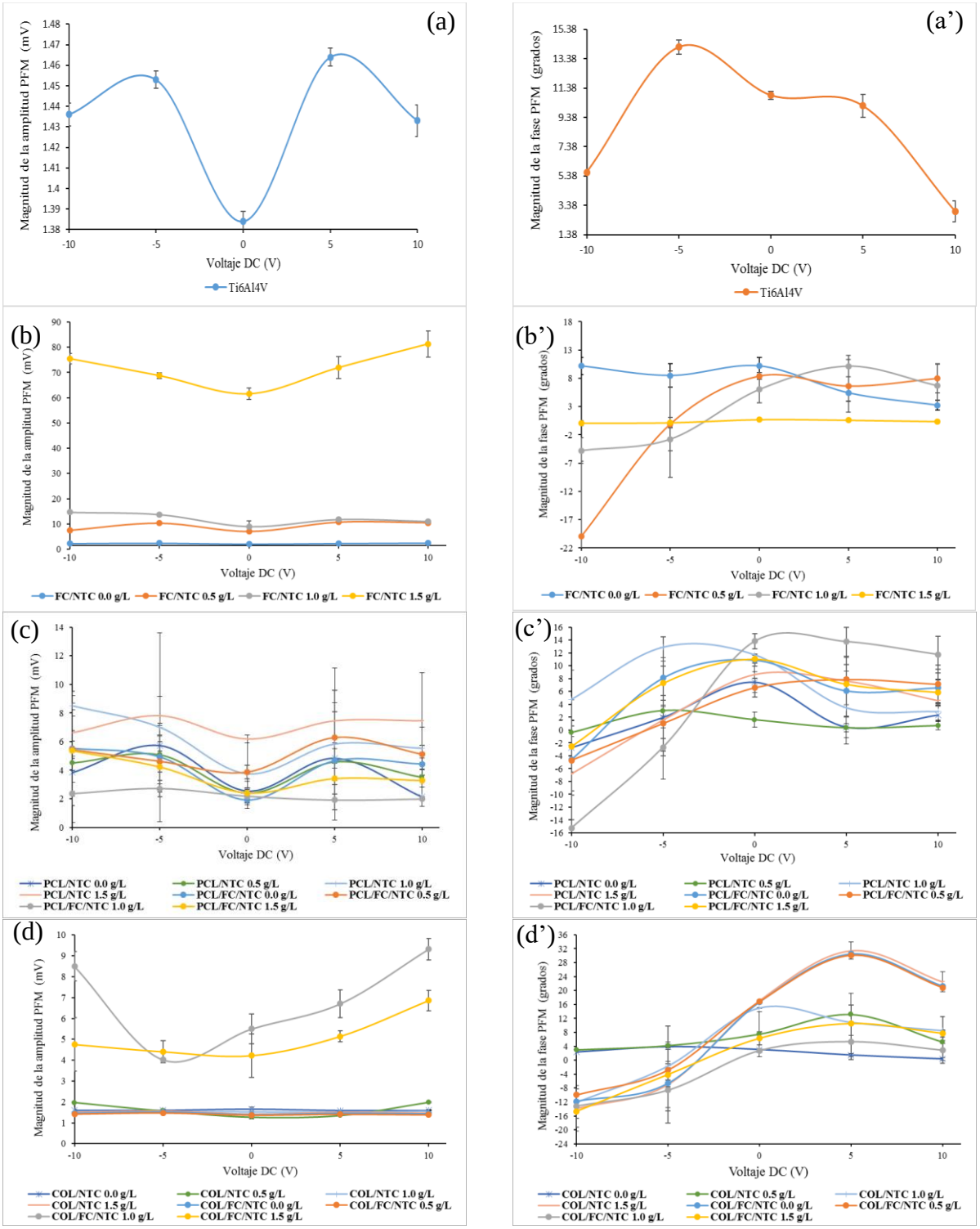
Las medidas de la amplitud (mv) y de la fase (grados) se tomaron como el valor promedio de toda la superficie recorrida por la punta AFM (5 X 5 µm) mediante el software XEI para cada uno de los cinco voltajes medidos. En la Figura 56, se muestra la variación de la amplitud y la fase con respecto a la variación del voltaje DC aplicado en la punta del AFM, tanto para el sustrato (Ti6Al4V) como para los diferentes recubrimientos. La fase obtenida de la técnica PFM indica la polaridad del coeficiente piezoeléctrico del material a la aplicación de un voltaje mientras que la amplitud PFM vs voltaje corresponde a la amplitud de deformación. La variación en la amplitud es el cambio de la deformación bajo un campo externo, lo cual es una característica piezoeléctrica (Sharma et al., 2016). Las curvas obtenidas de la amplitud muestran que con el cambio del potencial aplicado hay una variación en la amplitud de deformación. Los rangos en los cuales varía la amplitud (magnitud de la amplitud) es totalmente diferente unas superficies de otras, mostrando la menor amplitud para el sustrato Ti6Al4V (Figura 56 a). Dentro de las curvas representadas de la magnitud de la amplitud PFM vs voltaje DC, se pueden destacar tres superficies con los mayores valores en la magnitud de la amplitud: FC/NTC/1.5 g/L; COL/FC/NTC 1.0 g/L y COL/FC/NTC 1.5 g/L. En un estudio de Minary-Jolandan y Yu, se midió por la técnica PFM la amplitud de una fibra de colágeno tipo I de 80 nm de diámetro de tendón de bovino versus voltaje aplicado de 0 a 5 V. Los resultados mostraron que la amplitud de deformación aumenta linealmente con el aumento de la señal de voltaje aplicado, reflejando la naturaleza piezoeléctrica de la fibrilla de colágeno. La pendiente calculada fue de 44 µV/V (Minary-Jolandan y Yu, 2009). Comparando, por ejemplo, con las superficies de COL/FC/NTC 1.0 g/L y COL/FC/NTC 1.5 g/L, la amplitud de

deformación aumenta linealmente tomando el voltaje positivo aplicado (0, 5 y 10 V), estas superficies muestran resultados de 382.5 µV/V y 263.6 µV/V respectivamente.

Se observa que la magnitud de la fase también cambia con la aplicación de un voltaje externo DC. Sin embargo, existen superficies en los que esos cambios son muy leves, como la superficie del material base Ti6Al4V, indicando que el material no se polariza. Otras superficies como FC/NTC 1.5 g/L, en donde la curva promedio de la fase parece indicar que no existe polarización, pero en zonas menores a una micra se observan cambios de fase significativos mayores a 40° (COL/FC/NTC 0.5 g/L), indicando que el eje polar se encuentra alineado con una orientación específica (Jiang et al., 2017). Lo anterior se describe y se puede observar con mayor detalle más adelante en la Figura 58.

Figura 56.

Variación de la amplitud y la fase PFM con respecto al voltaje DC de las superficies (a, a') Ti6Al4V, (b, b') FC/NTC, (c, c') PCL/NTC con y sin FC y (d, d') COL/NTC con y sin FC.



La deformación total de una película o material está dada por efectos piezoeléctricos, factores de electrostricción, efectos térmicos y presión aplicada mediante las siguientes Ecuaciones (Sharma et al., 2016):

$$S = S_{piezoeléctrico} + S_{electrostricción} + S_{térmico} + S_{presión} \quad (20)$$

$$S = d_{33}E - QE^2 + \lambda\Delta T + e_{33}\sigma_{33} \quad (21)$$

Donde d_{33} corresponde al efecto piezoeléctrico, E es el campo eléctrico, Q es el coeficiente de electrostricción, λ es el coeficiente de expansión térmica, ΔT es el cambio en la temperatura, e_{33} es el coeficiente elástico y σ_{33} es la presión. Debido a que los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente y presión constante, se eliminan términos de la Ecuación 21 quedando la siguiente expresión:

$$S = d_{33}E - QE^2 \quad (22)$$

El coeficiente de electrostricción tiene un valor muy pequeño, mucho menor a cero, la deformación se puede dar mediante la Ecuación 23. También lo describen Zhao *et al*, donde la vibración de la amplitud A_f (nm) es igual a la señal de deflexión vertical del cantiléver V_f (mV) por una constante de calibración de la sensibilidad del fotodetector δ (nm/V), la expresión de la deformación es la presentada en la Ecuación 24 (Zhao et al., 2004).

$$S = d_{33}E \quad (23)$$

$$A_f = V_f\delta = d_{33}E \quad (24)$$

La constante de calibración del fotodetector es tomada como 20 nm/V, parámetros tomados en la calibración de la punta y E es la amplitud del voltaje AC aplicado (3 V). Para dar un valor del coeficiente piezoeléctrico, con los valores estimados anteriormente y el valor de la amplitud promedio para cada voltaje aplicado DC (0 V, 5 V y 10 V), se calculó la pendiente d_{33} (pm/V). En la Figura 57 se muestra la linealización de los datos y las ecuaciones correspondientes para el cálculo del coeficiente piezoeléctrico. Aunque los materiales en teoría no son ferroeléctricos, se quiso calcular el coeficiente d_{33} para evidenciar una piezorespuesta en algunos de los recubrimientos planteados. En la Tabla 8 se relaciona el coeficiente piezoeléctrico.

Es posible observar con la Figura 57 y los valores de d_{33} que solo cinco superficies tienen un coeficiente de piezoelectricidad significativo. Debido a que la medición PFM se da en espacios nanométricos, la respuesta no es lineal cuando las películas no son homogéneas. Es el caso de las películas PCL/NTC (específicamente PCL/FC/NTC 0.0 g/L), en donde la continuidad no se da debido a la baja dispersión de los NTC en el medio ácido tal como se explicó en el capítulo 5. Por otra parte, tres recubrimientos de FC exhiben un comportamiento piezoeléctrico del orden de 1.38, 1.396 y 13.18 pm/V para FC/NTC 0.5 g/L, FC/NTC 1.0 g/L y FC/NTC 1.5 g/L respectivamente. Dos de estos FC están relacionados con la presencia de hidroxiapatita carbonatada (capítulo 3), lo cual es muy interesante ya que, de acuerdo con el trabajo de Lang *et al*., el recubrimiento de hidroxiapatita nanocristalina sobre una hoja de silicio depositado por sol gel mostró un comportamiento piezoeléctrico. La explicación de este comportamiento radica en que los granos esféricos y no esféricos de tamaño nanométrico tienen una fuerte tendencia de orientarse a lo largo del eje cristalográfico c, lo que ocasiona que los iones OH^- se ubiquen dentro de los canales de los triángulos de calcio embebidos en un medio dieléctrico que consiste en iones calcio y fosfato que

pueden contrapolarizar el campo interno. En otras palabras, los iones hidroxilo se ordenan ferroeléctricamente a lo largo del eje c con la aplicación de un voltaje externo, lo que ocasiona que estas estructuras tengan un comportamiento piezoeléctrico (Chiatti et al., 2012; Lang et al., 2013; Rajesh et al., 2017). Un valor de 8 pm/V es encontrado para el coeficiente d_{33} en el estudio de Lang *et al*., lo cual es menor al máximo valor encontrado de 13.18 pm/V, la presencia de estructuras carbonosas como nanotubos de carbono o grafeno con grupos oxigenados pueden aportar una respuesta piezoeléctrica (da Cunha Rodrigues et al., 2015). Una característica de las mediciones PFM es la linealidad de los desplazamientos de amplitud vs el voltaje aplicado, lo cual confirma la naturaleza de la señal de piezorespuesta (Lang et al., 2013; Minary-Jolandan y Yu, 2009).

Como ya es sabido, la piezoelectricidad en el hueso es explicada principalmente a la orientación de las fibras de colágeno, en donde el coeficiente d_{15}, relativo a una deformación en plano se encuentra alrededor de 2 pC/N (Tandom et al., 2018). Un recubrimiento de colágeno que contiene colágeno tipo I disuelto en medio ácido y que no contiene fibras no exhibe un comportamiento de piezoelectricidad relativo a d_{33}, tal como se evidencia en la Tabla 8. No obstante, dos comportamientos resaltan, debido a que el coeficiente de piezoelectricidad es mayor a 1 pm/V, los cuales corresponden a los recubrimientos COL/FC/NTC 1.0 g/L y 1.5 g/L. La presencia de fosfato de calcio y nanotubos de carbono a altas concentraciones mejora este coeficiente. Este valor de d_{33} es superior al encontrado para otros materiales naturales como aorta de cerdo a escala nanométrica d_{33} = 1 pm/V (Yuanming Liu et al., 2012), o a tendondes de rata con un valor de d_{33} = 0.89 pm/V (Denise Denning et al., 2017). Para el caso de los recubrimientos con PCL, ninguna superficie fue tomada en cuenta como superficies con piezorespuesta, el ajuste

a una linealidad es muy lejano. Los coeficientes d_{33} fueron calculados con la pendiente de la amplitud PFM (pm) vs voltaje aplicado DC para efectos de comparación de las diferentes superficies; sin embargo, es importante aclarar que la explicación de la piezorespuesta de las diferentes superficies está dada por la respuesta de amplitud de deformación (mv) y la polarización (fase).

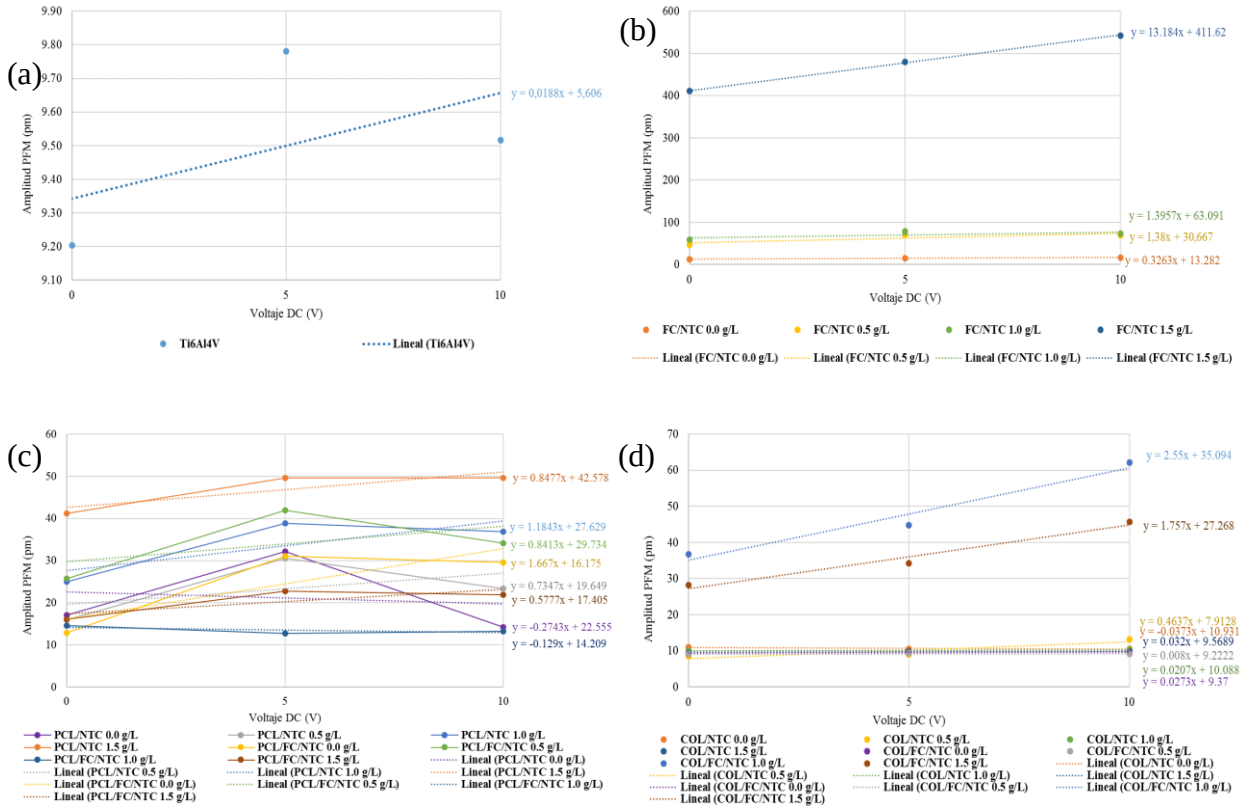
Tabla 8.

Coeficientes piezoeléctricos de Ti6Al4V y recubrimientos cerámicos y poliméricos.

Muestra	d_{33} (pm/V)
Ti6Al4V	0.019
FC/NTC 0.0 g/L	0.326
FC/NTC 0.5 g/L	1.380
FC/NTC 1.0 g/L	1.396
FC/NTC 1.5 g/L	13.18
PCL/NTC 0.0 g/L	0.274
PCL/NTC 0.5 g/L	0.734
PCL/NTC 1.0 g/L	1.184
PCL/NTC 1.5 g/L	0.847
PCL/FC/NTC 0.0 g/L	1.667
PCL/FC/NTC 0.5 g/L	0.841
PCL/FC/NTC 1.0 g/L	0.129
PCL/FC/NTC 1.5 g/L	0.577
COL/NTC 0.0 g/L	0.037
COL/NTC 0.5 g/L	0.464
COL/NTC 1.0 g/L	0.021
COL/NTC 1.5 g/L	0.019
COL/FC/NTC 0.0 g/L	0.027
COL/FC/NTC 0.5 g/L	0.008
COL/FC/NTC 1.0 g/L	2.550
COL/FC/NTC 1.5 g/L	1.757

Figura 57.

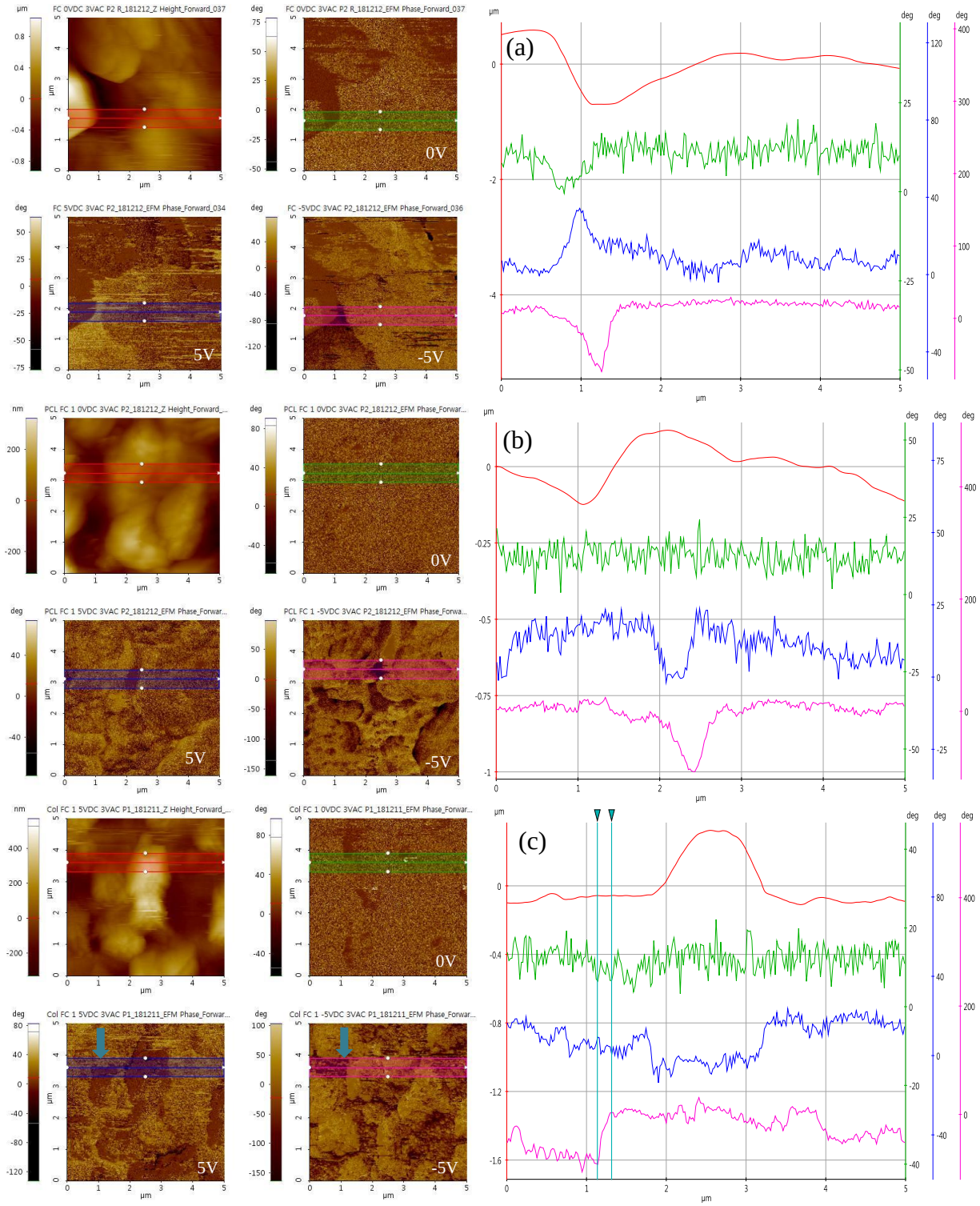
Amplitud PFM (pm) vs voltaje aplicado DC de las superficies (a) Ti6Al4V, (b) FC/NTC, (c) PCL/NTC con y sin FC y (d) COL/NTC con y sin FC.



Para entender el efecto del cambio de voltaje en la polarización de las superficies, se escogieron como ejemplo las superficies correspondientes a los recubrimientos con un cambio de fase significativo mostrado en la Figura 56. Estas son: FC/NTC 0.0 g/L, PCL/FC/NTC 1.0 g/L y COL/FC/NTC 1.0 g/L a voltajes aplicados de -5V, 0V y +5V. En la Figura 58 es posible observar regiones de contraste oscuras y claras lo cual significa la presencia de dominios polares (Pal *et al*., 2013) o una diferencia de dirección en el vector de polarización. Los dominios con una inversión en la señal de fase de 180° tienen direcciones de polarización en plano opuestas, mientras que las regiones que muestran un cambio de fase menor a 180° presentan direcciones de polarización en plano y fuera del plano (Newcomb et al., 2019; Pal et al., 2013; Soergel, 2011).

Figura 58.

Topografía, imágenes PFM de fase a 0V, fase a 5V, fase a -5V y perfiles de fase de los recubrimientos (a) FC/NTC 0.0 g/L, (b) PCL/FC/NTC 1.0 g/L y (c) COL/FC/NTC 1.0 g/L.



En los perfiles de fase de la Figura 58, existen regiones menores a 1 µm en donde el cambio de fase mayor es de 93.65° (Figura 58 c, flechas azules), estas inversiones de la polaridad no superan los 180°, lo cual es característico de materiales ferroeléctricos. Esto sugiere la presencia de dominios polares a una escala sub-micrométrica (Pal et al., 2013).

A 0V DC no hay una respuesta en la fase, mientras que con la aplicación de +5V y -5V se observan las regiones de contraste oscuras y claras. Se puede establecer que, la presencia de varios componentes en el recubrimiento permite obtener esas inversiones de polaridad, que se atribuyen especialmente a la presencia de fosfato de calcio y el ordenamiento de los iones hidroxilo en la dirección del campo eléctrico aplicado. Dicha polarización es positiva para el material, ya que se considera que la polarización está vinculada con el crecimiento óseo (Lang et al., 2013).

6.4 Conclusiones

Se encontró que el potencial superficial local evaluado por la técnica SKPM varía significativamente, y que esta variación depende de la distribución y dispersión de nanotubos de carbono funcionalizados con fosfatos de calcio en las matrices poliméricas PCL y COL. Así como también la rugosidad aritmética de las superficies. Para las superficies cerámicas se encontraron potenciales de superficie tanto positivos como negativos y fluctuantes en rangos micrométricos, lo que puede ser favorable en el último caso para la adsorción de proteínas en ensayos in vitro.

Se evaluó la piezorespuesta de superficies cerámicas y poliméricas en la presencia de nanotubos de carbono multipared funcionalizados, mediante la respuesta de la amplitud de

deformación y la fase aplicando la técnica PFM. Esta evaluación permitió encontrar diferencias eléctricas de las superficies bajo la aplicación de un campo externo. Los coeficientes de piezoelectricidad d_{33} calculados a partir de la amplitud de deformación, demostraron que las superficies con mayor piezorespuesta son las que corresponden a FC/NTC 0.5 g/L, FC/NTC 1.0 g/L, FC/NTC 1.5 g/L, COL/FC/NTC 1.0 g/L y COL/FC/NTC 1.5 g/L.

Algunas superficies demostraron amplia polarización con la aplicación de un campo externo, con valores de ángulos de fase hasta de 93.65° para el caso de COL/FC/NTC 1.0 g/L, indicando la presencia de dominios polares a una escala sub-micrométrica. Para los recubrimientos cerámicos, la polarización es debida a la presencia de los iones hidroxilo que se ordenan ferroeléctricamente a lo largo del eje c con la aplicación de un voltaje externo, lo que ocasiona que estas estructuras tengan un comportamiento piezoeléctrico.

7 Evaluación EQCM de recubrimientos de cerámicos cálcicos, policaprolactona y colágeno, reforzados con NTC multipared

7.1 Introducción

Los procesos de adhesión y extensión celular son parámetros que definen si una superficie de un biomaterial soporta la integración del tejido. Una herramienta no invasiva desarrollada últimamente para monitorear estos procesos en tiempo real es la microbalanza de cristal de cuarzo

QCM (Ishay et al., 2015; Modin et al., 2006). La QCM es un sistema de detección acústica basada en un cristal piezoeléctrico que puede establecer una oscilación por un campo externo. Electrodos metálicos son depositados en la cara opuesta del cristal de cuarzo donde puede ir la película delgada (J. Y. Chen et al., 2018). Debido a las propiedades piezoeléctricas y la orientación cristalina de los cristales de cuarzo (AT-cut), la aplicación de un voltaje entre los electrodos de cristal del sensor resulta en la producción de un estrés mecánico interno que se propaga a través del cristal. Los desplazamientos debido al estrés mecánico ocurren en las caras del cristal haciendo que el dispositivo sea sensible a las pertubaciones de la superficie (Stanford Research Systems, 2018).

La QCM es ampliamente usada para monitorear cambios en la frecuencia y en la resistencia de una película delgada depositada en el cristal piezoeléctrico y calcular el cambio en la masa de las películas en las fases de vacío, gas y líquido. En esta última fase, es posible monitorear procesos de adhesión celular e interacciones en el sistema célula – superficie (Ishay et al., 2015). En el proceso de adhesión la frecuencia de resonancia del cristal piezoeléctrico usualmente decrece como resultado de la acumulación de la masa celular sobre la superficie del sensor (J. Y. Chen et al., 2018). La microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo (EQCM) es un sistema en donde se acopla la técnica QCM con mediciones electroquímicas por medio de la técnica de espectroscopia de impedancia electroquímica EIS, en donde, el holder de la QCM junto con el oscilador es el electrodo de trabajo en una celda electroquímica (Marx, 2007). EIS es una técnica atractiva para analizar interacciones en la interfaz de un líquido y un sólido, basado en la perturbación del sistema en equilibrio por una señal de excitación sinosoidal de pequeña amplitud. El estudio de la impedancia de células cultivadas sobre superficies de estudio permite la

caracterización del sistema en términos de resistencia, estructura de la matriz extracelular (MEC) y la estructura de la interfase (Bouafsoun et al., 2007). Adicionalmente, a partir de los datos de impedancia es posible obtener el espectro de la permitividad dieléctrica con respecto a la variación de la frecuencia, lo cual permite la identificación de diferentes mecanismos en el comportamiento de las células y los materiales biológicos (Ciuchi et al., 2010).

En este capítulo, se usó la técnica EQCM para evaluar el proceso de adhesión de células HOS y las propiedades eléctricas de la interfase del sistema células-superficie de recubrimientos cerámicos de fosfatos de calcio con nanotubos de carbono multipared y recubrimientos poliméricos de policaprolactona y colágeno con NTC y NTC funcionalizados con FC. Se usaron los datos de impedancia para obtener los espectros de la permitividad relativa y la conductividad del sistema célula-recubrimiento. Se encontró que la técnica EQCM es una herramienta robusta para identificar los cambios eléctricos y físicos en el proceso de adhesión celular. El análisis de las propiedades de las capas de material biológico formado en las diferentes superficies propuestas permitió dilucidar cuáles superficies fueron más afines a las células HOS. Además, se observó que las primeras dos horas de contacto del material biológico con los recubrimientos es vital y que es posible mediante EQCM evaluar el comportamiento de las células a medida que el tiempo transcurre.

7.2 Metodología

Para realizar ensayos con la microbalanza de cristal de cuarzo, es necesario realizar los recubrimientos sobre cristales de Ti/Au. Para las superficies cerámicas, se llevó a cabo el proceso

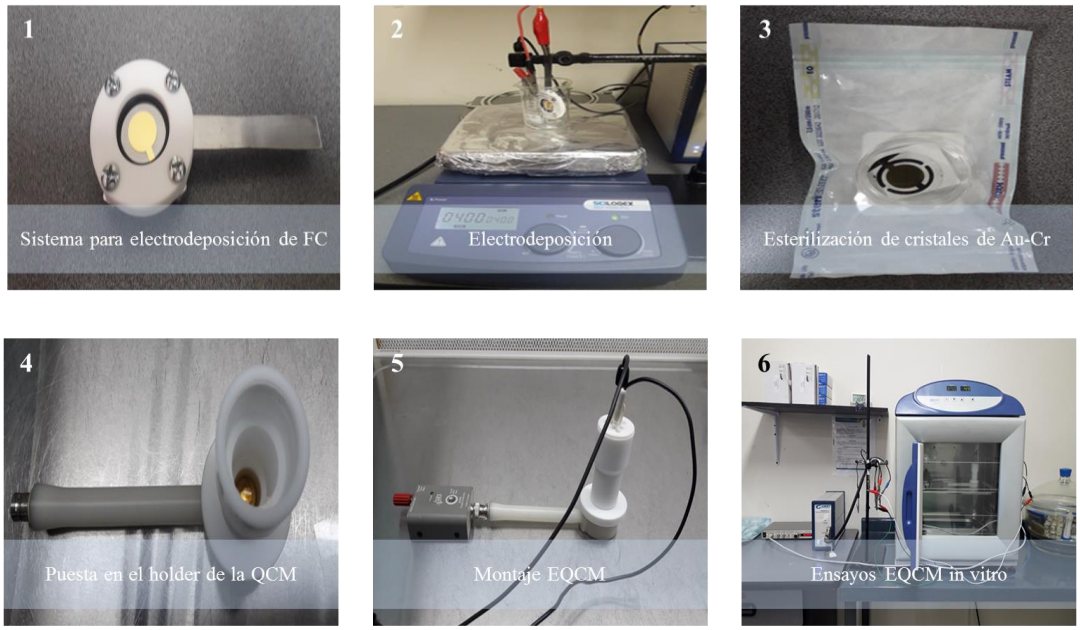
de electrodeposición y para las superficies poliméricas se empleó la técnica de spin-coating. En la Figura 59 se muestra la metodología de seis pasos que se llevó a cabo para los ensayos EQCM de los recubrimientos de FC/NTC con células de osteosarcoma humano (HOS, ATCC CRL-1543). Se usaron cristales de Ti/Au de 1 pulgada de diámetro, con una frecuencia de resonancia de 5 MHz. Pasos 1 y 2: Sistema para electrodeposición con una malla de platino como cátodo, agitación a 400 rpm, 3600 s y un voltaje aplicado de -1.6 V vs electrodo de calomel saturado (SCE). Paso 3: esterilización de los recubrimientos con una corriente de óxido de etileno durante 4 h. Pasos 4 y 5: montaje del cristal en el holder de la microbalanza de cristal de cuarzo y disposición de la celda de medición con un alambre de platino como cátodo, un electrodo de calomel como electrodo de referencia y células HOS en una concentración de $1.5X10^4$ cel/ml en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (hiSFB) y penicilina/estreptomicina y paso 6: ensayos EQCM en una incubadora marca MMM-Group en atmósfera de 5% de CO_2 y 95% de humedad a 37 °C. Todo el montaje anterior se llevó a cabo dentro de una cámara de bioseguridad. Como método de esterilización de los componentes de la celda, se usó autoclave a 121°C durante 15 min y una hora de luz UV. Como método de esterilización de los electrodos de platino y SCE se usó lavado en PBS estéril y 1 hora de luz UV.

Los parámetros empleados para las mediciones de impedancia fueron: barrido de frecuencia de 0,1 MHz a 0,01 Hz, siete puntos por década, una amplitud de 10 mV, voltaje DC 0 mV y un tiempo de estabilización potencial de 300 s. Para las mediciones de voltametría cíclica, se realizó un barrido de potencial de -1V a 1V con respecto al electrodo de referencia SCE, velocidad de barrido 20 mV/s, amplitud de 1 mV, corriente máxima de 100 mA y 2 ciclos a un tiempo de 48 h de cultivo celular. Las mediciones de impedancia se llevaron a cabo en tres tiempos,

2 h, 24 h y 48 h. Los cambios de frecuencia y resistencia se monitorearon mediante la microbalanza de cristal de cuarzo QCM200 SRS (Stanford Research Systems) con interfaz de RS-232 para recolección de datos conectada al potenciostato GAMRY 600 a tiempos de 0 h, 24 h y 48 h de cultivo celular. Para los recubrimientos poliméricos con PCL y COL, se llevó a cabo el procedimiento de spin coating sobre los cristales. El software Echem Analyst Gamry Instruments Inc. versión 6.3.0.3 fue usado para analizar los datos de impedancia.

Figura 59.

Metodología de 6 pasos para realizar ensayos EQCM de recubrimientos de FC/NTC in vitro



Una forma mas sencilla de presentar la Ecuación 5 de Sauerbrey, donde se relaciona el cambio de la masa por unidad de área a una superficie del electrodo de la QCM frente a un cambio observado en la frecuencia de oscilación del cristal es la Ecuación 25.

$$\Delta f = -C_f . \Delta m \quad (25)$$

Donde Δf = cambio de la frecuencia observada en Hz, Δm = cambio en la masa por unidad de área (g/cm^2), C_f = el factor de sensibilidad del cristal (56.6 Hz μg^{-1} cm^2 o 17.7 ng Hz^{-1} cm^{-2} para un cristal de 5 MHz de frecuencia de resonancia). La relación de Sauerbrey llega a ser inválida cuando el material adherido es blando y se encuentra sumergido en un medio líquido. Una película viscosa o blanda sobre un cristal da como resultado un cambio en la frecuencia adicional a la de la masa agregada por la presencia del solvente acoplado a la película. Sin embargo, la ecuación de Sauerbrey se puede utilizar en determinadas condiciones, donde los cambios viscoelásticos no presentan una variación significativa. La Ecuación 25 es válida asumiendo un comportamiento de capa rígida sobre la superficie del cristal (J. Y. Chen et al., 2018; Gryte et al., 1993; Stanford Research Systems, 2018).

Bajo condiciones de carga de líquido, la Ecuación de Sauerbrey es modificada por la Ecuación 26 propuesta por Kanazawa, la cual depende de la viscosidad y de la densidad del líquido (Etchenique, 1998; Kao et al., 2009). Donde ρ_L y η_L son la densidad y la viscosidad del líquido respectivamente, ρ_q y μ_q son la densidad y el módulo de cizalladura del cristal de cuarzo respectivamente.

$$\Delta f = -\frac{{f_0}^{3/2}\sqrt{\rho_L \eta_L}}{\sqrt{\pi \rho_q \mu_q}} \quad (26)$$

Para evaluar si los cambios viscoelásticos son significativos o no, se acude a la descripción de la tangente de pérdida (tan(α)), la cual es una propiedad de la viscolelasticidad, definida como

el radio entre el módulo viscoso o de pérdida $G''(\omega)$ y el módulo elástico o de almacenamiento $G'(\omega)$, está asociada con la capacidad de amortiguación de un material viscoelástico (Ecuación 27) (Amador et al., 2012).

$$\tan(\alpha) = \frac{G''(\omega)}{G'(\omega)} \tag{27}$$

En un material rígido, $G''\rightarrow 0$ y $\alpha\rightarrow 0$ de modo que no hay pérdida de energía al perturbar el material, mientras que en un líquido newtoniano $G'\rightarrow 0$ y $\alpha\rightarrow\infty$ de modo que la energía no puede recuperarse elásticamente. Por otro lado, un modelo que describe el comportamiento de un cristal de cuarzo con una de sus caras en contacto con otro material es el modelo mecano-eléctrico que usa los parámetros mecánicos y piezoeléctricos del cristal de cuarzo (Etchenique, 1998; Patel et al., 2000).

$$Z_f = R + j\omega L_f \tag{28}$$

$$\Delta X_L = \omega.\Delta L_f \tag{29}$$

$$\Delta f \approx -f_0\left(\Delta L_f / 2L_q\right) \tag{30}$$

$$\tan(\alpha) = \omega.\Delta L_f/\Delta R = \Delta X_L/\Delta R \tag{31}$$

Donde: Z_f es la impedancia equivalente debida al cristal de cuarzo y la impedancia equivalente total, R es la resistencia que corresponde a la disipación de la energía de oscilación, ω es la frecuencia angular, L_f es la inductancia que corresponde al componente inercial de la oscilación, la cual está relacionada con la masa desplazada durante la vibración, L_q es la inductancia del cristal de cuarzo (30 mH para un cristal de 5MHz) y f_0 es la frecuencia de

resonancia natural o fundamental 5MHz. El circuito equivalente del resonador es una inductancia en serie con una capacitancia, el circuito de Butterworth-Van Dyke (BVD) contempla las pérdidas viscosas y la capacidad parásita de las conexiones agregando una resistencia y una capacitancia inicial C_0. Este último elemento se cancela mediante el método incorporado en la QCM200 por un dial. La cancelación de la capacitancia es esencial para mediciones con líquidos (Etchenique, 1998; Stanford Research Systems, 2018). Con las ecuaciones anteriores, y los datos obtenidos de la QCM ($\Delta R, \Delta f$), se encontró la tangente de pérdidas. Esto permitió definir si la masa adherida sobre el cristal y los recubrimientos se comporta como masa rígida o como un material viscoso.

7.3 Resultados

7.3.1 Evaluación microgravimétrica de FC, PCL y COL con y sin NTC multipared

Δf provee información acerca del proceso dinámico de adhesión, y las primeras horas de contacto de una superficie de un biomaterial con el material biológico, son decisivas. El proceso de adhesión celular consta principalmente de tres etapas. En la etapa inicial, la célula se adhiere en un sustrato para formar un enlace físico débil a la superficie. En la siguiente etapa, la célula se aplana y comienza a extender su membrana sobre la superficie del sustrato y por último se da la etapa de propagación celular (J. Y. Chen et al., 2018).

En el Apéndice C, se muestra Δf, Δm y ΔR vs tiempo para todos los recubrimientos en tiempos de 0 h, 24 h y 48 h, los cambios más drásticos se evidencian para las mediciones de 0 a 2 h, allí se observa una tendencia para los recubrimientos cerámicos. A 0 h la frecuencia tiende a

disminuir, mientras que, a 24 y 48 h de cultivo celular, la frecuencia tiende a estar constante. Por consiguiente, la masa aumenta de 0 a 2 h de medición y la resistencia tiende a aumentar también. Para los recubrimientos PCL/NTC (0.0, 0.5, 1.0 y 1.5 g/L), Δf tiende a disminuir en las primeras 2 h de medición, por el contrario, en los recubrimientos de PCL/FC/NTC, COL/NTC y COL/FC/NTC, Δf aumenta en la primera medición. No obstante, en los recubrimientos de colágeno con y sin fosfatos de calcio, incluyendo sólo COL (COL/NTC 0.0 g/L) a 24 h y 48 h hay una disminución de la frecuencia y un aumento en el cambio de masa, indicativo de la acumulación de la masa sobre la superficie del cristal como resultado de la adhesión y extensión celular. Este planteamiento sugiere que, la primera etapa de adhesión celular depende del tiempo y es mediada por el tipo de superficie.

Para observar mejor este planteamiento, se comparan las superficies FC/NTC, PCL/NTC, PCL/FC/NTC, COL/NTC y COL/FC/NTC para cada tiempo de medición. Así, en la Figura 60, Figura 61 y Figura 62, se muestran los cambios de frecuencia en las primeras 2 h de medición para todas las superficies propuestas. Es posible observar para el cristal desnudo que el cambio de frecuencia permanece casi constante con respecto al tiempo. Para las superficies cerámicas, el comportamiento de Δf vs tiempo decrece en las películas con NTC. Un cambio drástico de Δf se produce en el recubrimiento FC/NTC 0.0 g/L, en donde la frecuencia oscila entre valores muy altos y bajos. Este comportamiento radica principalmente en el desprendimiento del recubrimiento (pérdida de masa considerable, ver Apéndice C), como consecuencia de la baja adherencia del recubrimiento al sustrato, impidiendo la correcta adherencia de las células. Las demás superficies cerámicas tienen una disminución de la frecuencia con respecto al tiempo, con aumentos de masa hasta de 1 mg/cm^2 en los ensayos de 0 a 2 h. A 24 h la frecuencia aumenta con el tiempo para la

muestra FC/NTC 1.5 g/L (Figura 60 b) y a 48 h Δf disminuye (Figura 60 c). Estos aumentos y decensos de frecuencia vs tiempo indican una reorganización de las células en el proceso de adhesión, ya que, este proceso es complicado porque intervienen muchos pasos sucesivos que incluyen el contacto de las células con la superficie, secreción de la matriz extracelular (MEC), reorganización del citoesqueleto, conexión de la MEC por medio de las integrinas (glucoproteínas que participan en la unión de células con la MEC), propagación y migración celular (Saitakis y Gizeli, 2012). La adhesión celular fue posible probarla mediante ensayos SEM de células HOS cultivadas por 48 h sobre las diferentes superficies propuestas, lo cual se analiza en detalle en el capítulo 8.

Para las superficies PCL/NTC (Figura 61) hay una tendencia a la disminución de la frecuencia con el tiempo exceptuando el recubrimiento PCL/NTC 1.5 g/L. El comportamiento donde en los primeros minutos Δf disminuye, pero luego hay un aumento, es el que presentan los recubrimientos PCL/FC/NTC, esto puede ser explicado porque al inicio la superficie es cubierta por el medio de cultivo, existiendo un aumento de masa (< 1 μg/cm^2) debido a la adsorción de proteínas y agua, seguido, la superficie es cubierta por células lo cual se da en un tiempo de 0 a aproximadamente 4 min. Continuo hay un aumento de frecuencia que puede indicar reordenamientos estructurales espontáneos de las proteínas subyacentes con liberación de agua (t = 25 min). Luego existe una etapa de cierta estabilidad de Δf que se describe como la etapa de extensión celular (Tymchenko et al., 2012). Esta última etapa tiene una ligera disminución de frecuencia evidenciando una etapa de adhesión-extensión celular. No obstante, este comportamiento se mantiene a 24 y 48 h, debido probablemente a reordenamientos continuos del

citoesqueleto, desprendimiento de células que no se adhirieron correctamente y liberación de material al medio de cultivo.

En la Figura 62 (a) y (d), se muestran los comportamientos de los recubrimientos COL/NTC y COL/FC/NTC con células de osteosarcoma humano y medio de cultivo. Para estas superficies, el aumento de frecuencia es constante durante las primeras 2 h de medición, sin embargo, con los resultados obtenidos a 24 y 48 h de cultivo celular (Figura 62 (b), (c), (e) y (f)), el cambio en la frecuencia es pequeño comparado con la medición de 0 a 2 h y su tendencia es a la disminución (exceptuando COL/NTC 1.5 g/L), evidenciando que una vez la célula es capaz de adherirse, ésta mantiene extendiéndose sobre la superficie.

Típicamente la respuesta Δf depende del tiempo y exhibe un perfil sigmoidal, que consiste en una fase de retraso en donde la célula se deposita y forma enlaces débiles, una fase de registro y una fase final en la cual se presenta el aplanamiento o extensión de la membrana celular y a su vez conexión de la MEC con las integrinas, la cual se adhiere a la superficie del material (J. Y. Chen *et al*., 2018). Este comportamiento típico se observa claramente en los recubrimientos PCL/FC/NTC, COL/NTC y COL/FC/NTC de 0 a 2 h de medición.

Figura 60.

Respuesta de ΔF (Hz) vs tiempo (s) del proceso de adhesión celular de células HOS sobre cristal de cuarzo para recubrimientos FC/NTC (a) 0h, (b) 24h y (c) 48h

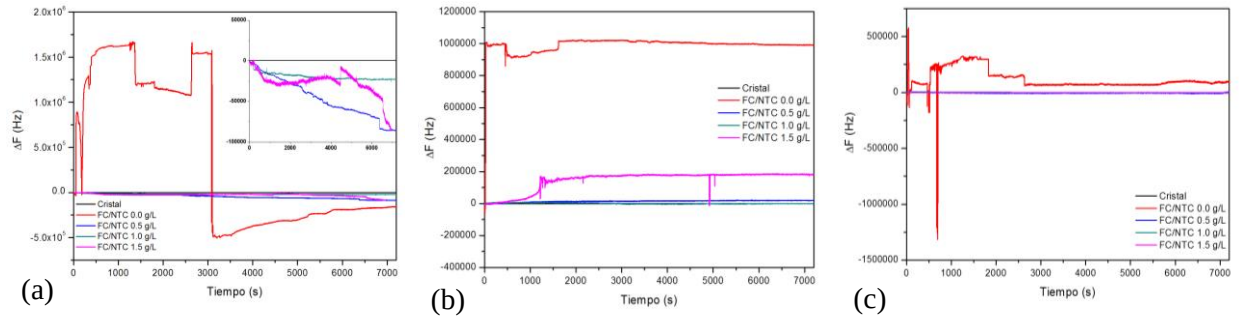


Figura 61.

Respuesta de ΔF (Hz) vs tiempo (s) del proceso de adhesión celular de células HOS sobre cristal de cuarzo para recubrimientos PCL/NTC a (a) 0h, (b) 24h y (c) 48h y recubrimientos PCL/FC/NTC a (d) 0h, (e) 24h y (f) 48h

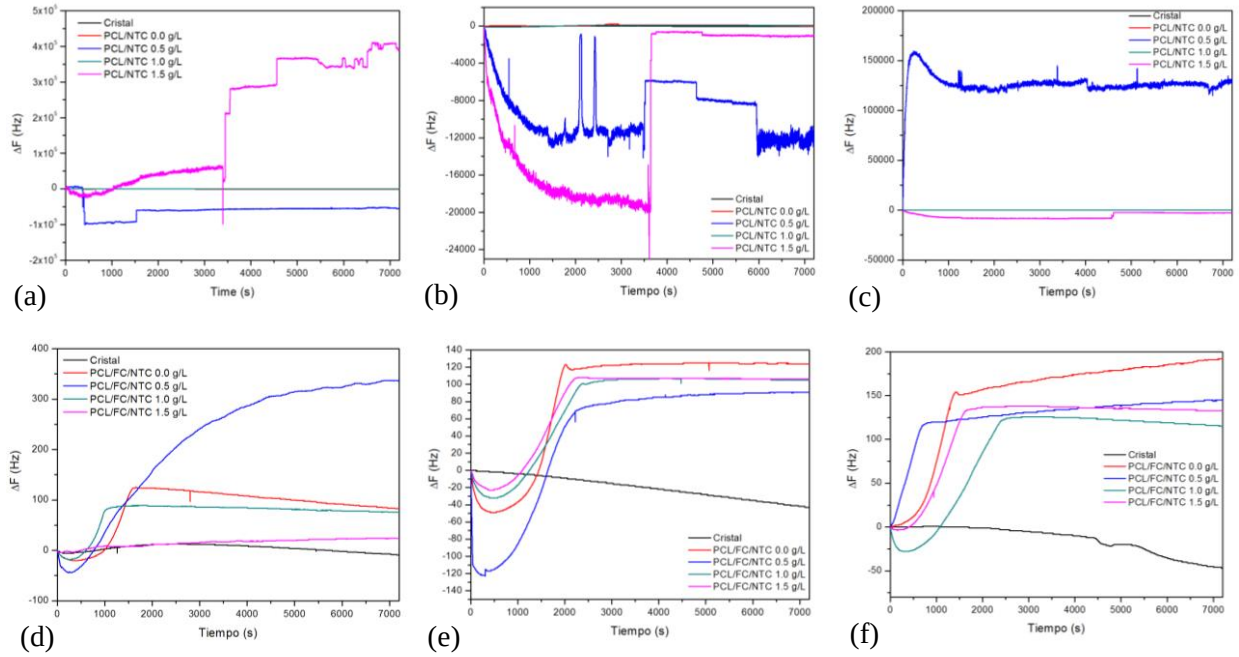
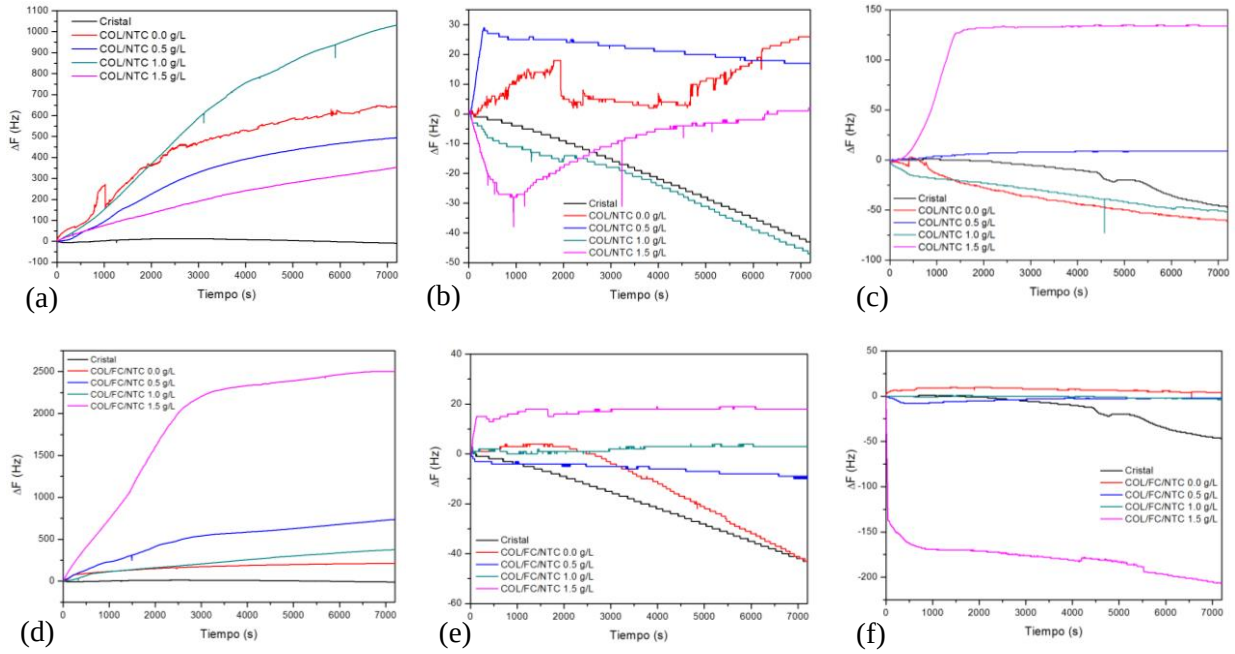


Figura 62.

Respuesta de ΔF (Hz) vs tiempo (s) del proceso de adhesión celular de células HOS sobre cristal de cuarzo para recubrimientos COL/NTC a (a) 0h, (b) 24h y (c) 48h y recubrimientos COL/FC/NTC a (d) 0h, (e) 24h y (f) 48h



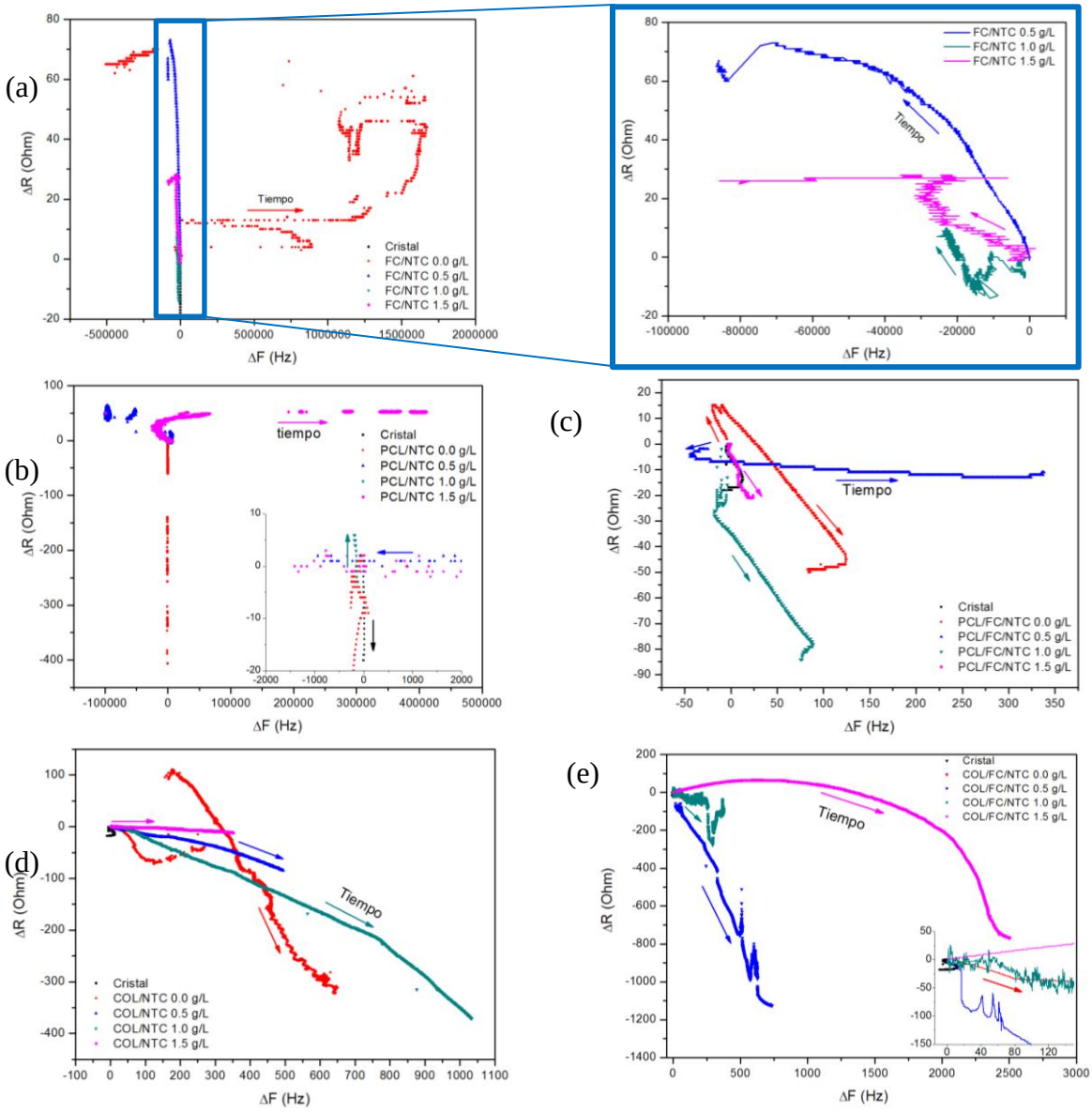
Una forma de interpretar los comportamientos viscoelásticos o de masa rígida de las células adheridas son los diagramas ΔR vs Δf. Un diagrama con $\Delta R = 0$ con desplazamientos linealmente decrecientes de Δf, describe un comportamiento de masa elástica pura adherida, mientras que un decrecimiento en Δf con aumento de ΔR (disipación de energía) describe un comportamiento viscoso, o un cambio de viscosidad y densidad en el líquido adyacente a la superficie del sensor, provocando un cambio tanto en frecuencia como en resistencia en presencia o ausencia de masa (Fohlerová et al., 2007; Marx, 2003).

De acuerdo con lo mostrado en la Figura 63, los cambios en ΔR vs Δf evidencian que la masa adherida a la superficie no puede ser tratada como masa rígida adsorbida ni como material enteramente viscoso, es una combinación de ambos comportamientos (Fohlerová et al., 2007), tal

como se aprecia en el recubrimiento FC/NTC 1.5 g/L. Un comportamiento fuera de lo descrito anteriormente es el que se presenta en los recubrimientos PCL/NTC 0.0 g/L y 1.0 g/L, en donde el cambio en R es significativo frente a un cambio en la frecuencia casi constante. Fredikkson *et al*., asumen este comportamiento a que la frecuencia es proporcional al área de contacto por las células que puede ser muy pequeña, atribuído a células esféricas no extendidas en la superficie (Fredriksson et al., 1998).

Figura 63.

Respuesta de ΔR (Ohm) vs ΔF (Hz) del proceso de adhesión celular de t_i = 0 h a t_f = 2 h de células HOS sobre cristal de cuarzo, recubrimientos cerámicos y poliméricos: a) recubrimientos FC/NTC, b) recubrimientos PCL/NTC, c) recubrimientos PCL/FC/NTC, d) recubrimientos COL/NTC y e) recubrimientos COL/FC/NTC.



Por último, se calculó la tangente de pérdida α(radianes) para todos los tiempos de ensayo (0h, 24h y 48h) para comprobar la rigidez o cambios viscoelásticos de la masa adherida sobre el sensor de la microbalanza de cristal de cuarzo (ver Tabla 9). Aunque los valores de la tangente de

pérdida cambian durante las 2 h de medición en cada ensayo (porque dependen del cambio de frecuencia y el cambio de resistencia), estos valores no tienden a cero, lo que indica que el comportamiento de la masa adherida no es completamente rígido, como se concluyó con el análisis de la Figura 63. La respuesta de la frecuencia y resistencia de resonancia no sólo se debe a los cambios de masa sobre el sensor como consecuencia de la sedimentación de células, sino a los cambios en las propiedades viscoelásticas en la masa adherida (medio + células) como resultado de los procesos de adhesión celular. Gelves usó la Ecuación de Kanazawa para relacionar el cambio de viscosidad de la masa adherida sobre los recubrimientos frente al cristal de cuarzo desnudo (Ecuación 32). Concluyó que esta relación se hace más pequeña en los recubrimientos de mayor presencia celular, debido a que los efectos viscosos disminuyen porque las células forman una capa continua más rígida sobre el recubrimiento (Gelves Jerez, 2012).

$$\frac{\Delta f_i}{\Delta f_c} = \frac{-f_0^{3/2}\left(\frac{\rho_{Li}\eta_{Li}}{\pi\rho_q\mu_q}\right)^{1/2}}{-f_0^{3/2}\left(\frac{\rho_{Lc}\eta_{Lc}}{\pi\rho_q\mu_q}\right)^{1/2}} = \frac{(\rho_{Li}\eta_{Li})^{1/2}}{(\rho_{Lc}\eta_{Lc})^{1/2}} \quad (32)$$

Donde Δf_i y Δf_c es el cambio de frecuencia de cada uno de los recubrimientos y el cambio de frecuencia en el cristal de cuarzo a 48 h respectivamente. En la Tabla 9 se observa esta relación, la cual es menor para los recubrimientos con fosfato de calcio si se trata de matrices poliméricas y para los recubrimientos cerámicos FC/NTC 0.5 y 1.5 g/L.

Tabla 9.

Tangente de pérdida de los recubrimientos cerámicos y poliméricos a 0h, 24h y 48h de cultivo celular.

Muestra	α(radianes) 0h	α(radianes) 24h	α(radianes) 48h	$\frac{\Delta f_i}{\Delta f_c}$
Cristal de cuarzo	-0.186	1.526	-1.349	-
FC/NTC 0.0 g/L	1.567	-1.570	-1.566	2013,10
FC/NTC 0.5 g/L	1.569	-1.568	1.522	19,148
FC/NTC 1.0 g/L	1.570	1.559	-1.559	51,808
FC/NTC 1.5 g/L	1.570	-1.569	1.486	1,319
PCL/NTC 0.0 g/L	-0.837	-0.305	1.262	2,468
PCL/NTC 0.5 g/L	1.566	-1.567	-1.567	2722,53
PCL/NTC 1.0 g/L	1.494	0.191	1.237	3,085
PCL/NTC 1.5 g/L	-1.570	-0.460	-1.515	59,978
PCL/FC/NTC 0.0 g/L	0.569	0.929	0.864	4,085
PCL/FC/NTC 0.5 g/L	1.484	0.191	1.237	3,085
PCL/FC/NTC 1.0 g/L	0.329	0.723	1.158	2,446
PCL/FC/NTC 1.5 g/L	0.426	0.762	0.758	2,829
COL/NTC 0.0 g/L	0.649	0.952	-1.091	1,297
COL/NTC 0.5 g/L	1.144	0.361	0.361	0,191
COL/NTC 1.0 g/L	0.810	-0.976	-1.519	1,106
COL/NTC 1.5 g/L	1.481	0.247	0.915	2,851
COL/FC/NTC 0.0 g/L	0.886	1.509	0.186	0,085
COL/FC/NTC 0.5 g/L	0.242	-0.401	-0.094	0,042
COL/FC/NTC 1.0 g/L	0.992	0.160	0.646	0,085
COL/FC/NTC 1.5 g/L	0.882	0.482	1.494	4,404

7.3.2 Evaluación electroquímica de FC, PCL y COL con y sin NTC multipared

Con el análisis de la impedancia de células de osteosarcoma humano HOS cultivadas sobre los diferentes recubrimientos propuestos en el rango de frecuencia de 100 kHz a 0.01 Hz, las propiedades eléctricas del sistema en términos de resistividad y capacitancia pueden ser determinadas. En la Figura 64 se presentan los espectros correspondientes a los diagramas de Nyquist de los recubrimientos cerámicos, poliméricos y compuestos con diferentes concentraciones de nanotubos de carbono y células HOS a 48 h de cultivo. De acuerdo con la teoría EIS, de alta a media frecuencia se encuentran los procesos que se llevan a cabo en la interfase

medio de cultivo-células, relacionados también con las biomoléculas de adsorción presentes sobre el recubrimiento. De medias a bajas frecuencias se detectan los procesos de transferencia de carga y masa de la interfase biomoléculas de adsorción-recubrimiento y a bajas frecuencias se encuentra la interfase recubrimiento-sustrato.

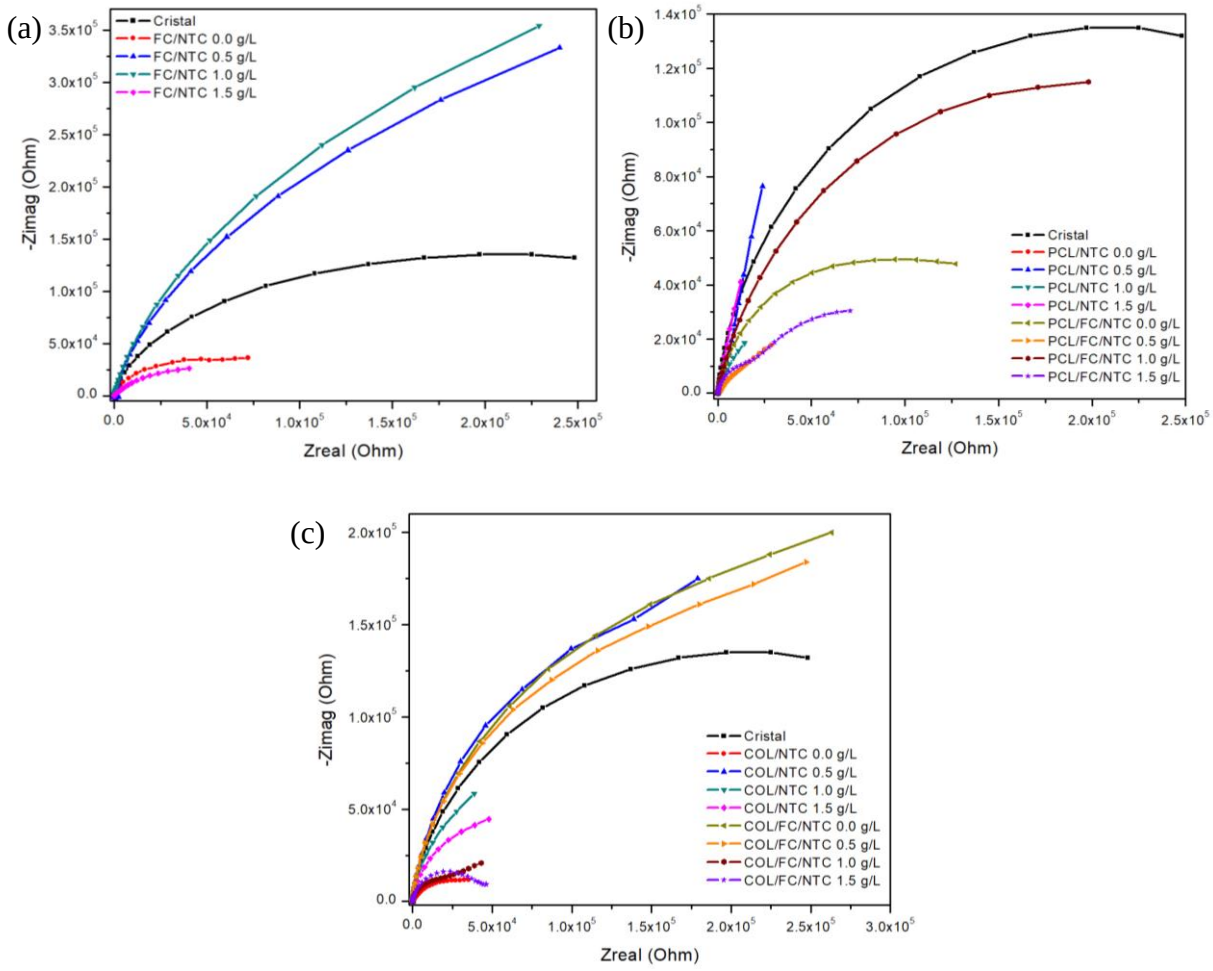
En los espectros de Nyquist se observa un semicírculo parcial atribuido a una superficie conductiva. Este semicírculo es menor para algunos recubrimientos comparado con el comportamiento del cristal de cuarzo sin recubrimiento y células HOS, lo que sugiere que las células presentes son capaces de adherirse y formar una fina película junto con las proteínas de adsorción cubriendo la superficie de la muestra completamente, disminuyendo el valor de la impedancia y mejorando la protección a la corrosión del sustrato (Bueno-Vera et al., 2015). En este sentido, los recubrimientos poliméricos de PCL con la presencia de NTC funcionalizados con FC, tuvieron mejores comportamientos en cuanto a los valores máximos de impedancia frente a los recubrimientos PCL/NTC. En cuanto a los recubrimientos de colágeno, los recubrimientos con las más altas concentraciones de NTC (COL/NTC 1.0 y 1.5 g/L y COL/FC/NTC 1.0 y 1.5 g/L), obtuvieron menores valores de impedancia, lo que implica una menor resistencia a la degradación, cuando son expuestos a resonancia mecánica con la QCM y en presencia de medio de cultivo + células HOS.

En el apéndice D, se presentan los espectros de Bode y de Nyquist para todos los recubrimientos a 0h, 24h y 48h de cultivo celular. Allí se observa que la respuesta electroquímica en ángulos de fase de frecuencias medias a bajas está entre -80° y -60° en más del 80% de las superficies, que, de acuerdo con García-Alonso et al., estos valores de ángulos de fase indican la

presencia de células y la adhesión celular a través de las biomoléculas de adsorción que forma la MEC sobre el recubrimiento (García-Alonso et al., 2009). Los ángulos de fase a bajas frecuencias tienden a aumentar hasta valores de -20°, identificando procesos de control mixto de transferencia de carga y de masa. Las superficies que mayor valor de ángulo de fase mostraron en frecuencias medias a bajas fueron las correspondientes a los recubrimientos PCL/FC/NTC 0.5 y 1.5 g/L. Por otra parte, el incremento del módulo de impedancia no lineal en el barrido de frecuencias (100 kHz – 0,01Hz) indica la presencia de más de una constante de tiempo (τ=RC) relacionadas con las interfaces células, capa de adsorción de biomoléculas y el recubrimiento. Con respecto a los diagramas de Nyquist mostrados en el apéndice D, en donde se comparan los tiempos de cultivo (0 h, 24 h y 48 h) para cada recubrimiento, existe una tendencia a la disminución de la impedancia para las superficies que contienen polímero (PCL y COL), FC y NTC, debido probablemente a la formación de una capa contínua de biomoléculas y células en toda la superficie del material compuesto.

Figura 64.

Diagramas de Nyquist de los recubrimientos (a) FC/NTC, (b) PCL/NTC, PCL/FC/NTC y (c) COL/NTC, COL/FC/NTC a 48 h de cultivo celular

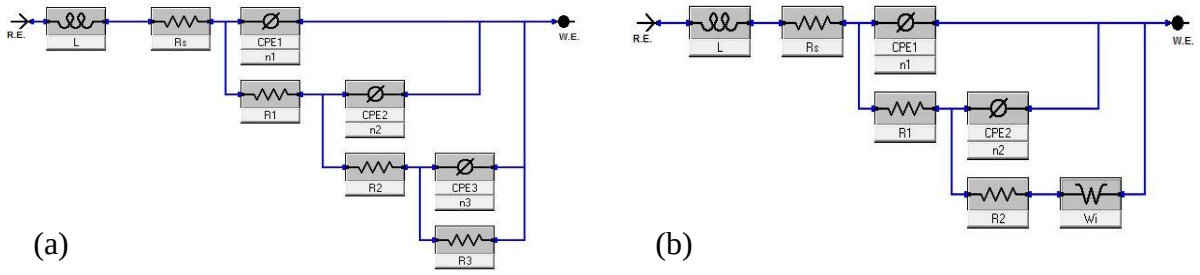


Con la simulación realizada en el software Echem Analyst Gamry Instruments y mediante circuitos equivalentes se ajustaron los datos obtenidos de impedancia de los ensayos EQCM, los cuales se aprecian en la Figura 65 a y b para los procesos sin y con difusión respectivamente. Donde L es la inductancia atribuída a las conexiones del potenciostato a la celda QCM ubicada dentro de la incubadora, Rs es la resistencia a la solución, CPE1 y R1 son el elemento de fase constante y resistencia correspondiente a la interfase células – biomoléculas de adsorción, CPE2

y R2 son el elemento de fase constante y resistencia correspondiente a la interfase biomoléculas adsorbidas-recubrimiento, CPE3 y R3 son el elemento de fase constante y resistencia correspondiente a la interfase recubrimiento-sustrato y W es la impedancia de Warburg asociada a la difusión de biomoléculas en la interfase recubrimiento-capa de proteínas (PCL/NTC, PCL/FC/NTC 0.5 g/L, COL/FC/NTC 1.0 y 1.5 g/L). Para el caso del cristal de cuarzo sin recubrimento CPE1 y R1 están relacionadas con la matriz extracelular en la interfase medio de cultivo-células, CPE2 y R2 están relacionadas con la interfase células- capa de biomoléculas y CPE3 y R3 se asocian a la interfase capa de biomoléculas-superficie del cristal. Así mismo, en la Tabla D1 del apéndice D, se presentan los datos de la simulación de los circuitos equivalentes. Estudios de otros autores han encontrado valores de la resistencia a la polarización Rp de 1E+05 a 1E+08 Ohm.cm^2 en ensayos con y sin cultivo celular (Bueno-Vera et al., 2015), lo que se traduce en R3 para el circuito de la Figura 65 a) o R2 para el circuito de la Figura 65 b), que para el caso de los recubrimientos propuestos se encuentra en el rango de 1.3E+03 a 5.9E+13 Ohm.cm^2. Estos valores de resistencia se asocian a la resistencia a la corrosión de la aleación de titanio. El recubrimiento que mayor Rp obtuvo fue COL/FC/NTC 0.0 g/L.

Figura 65.

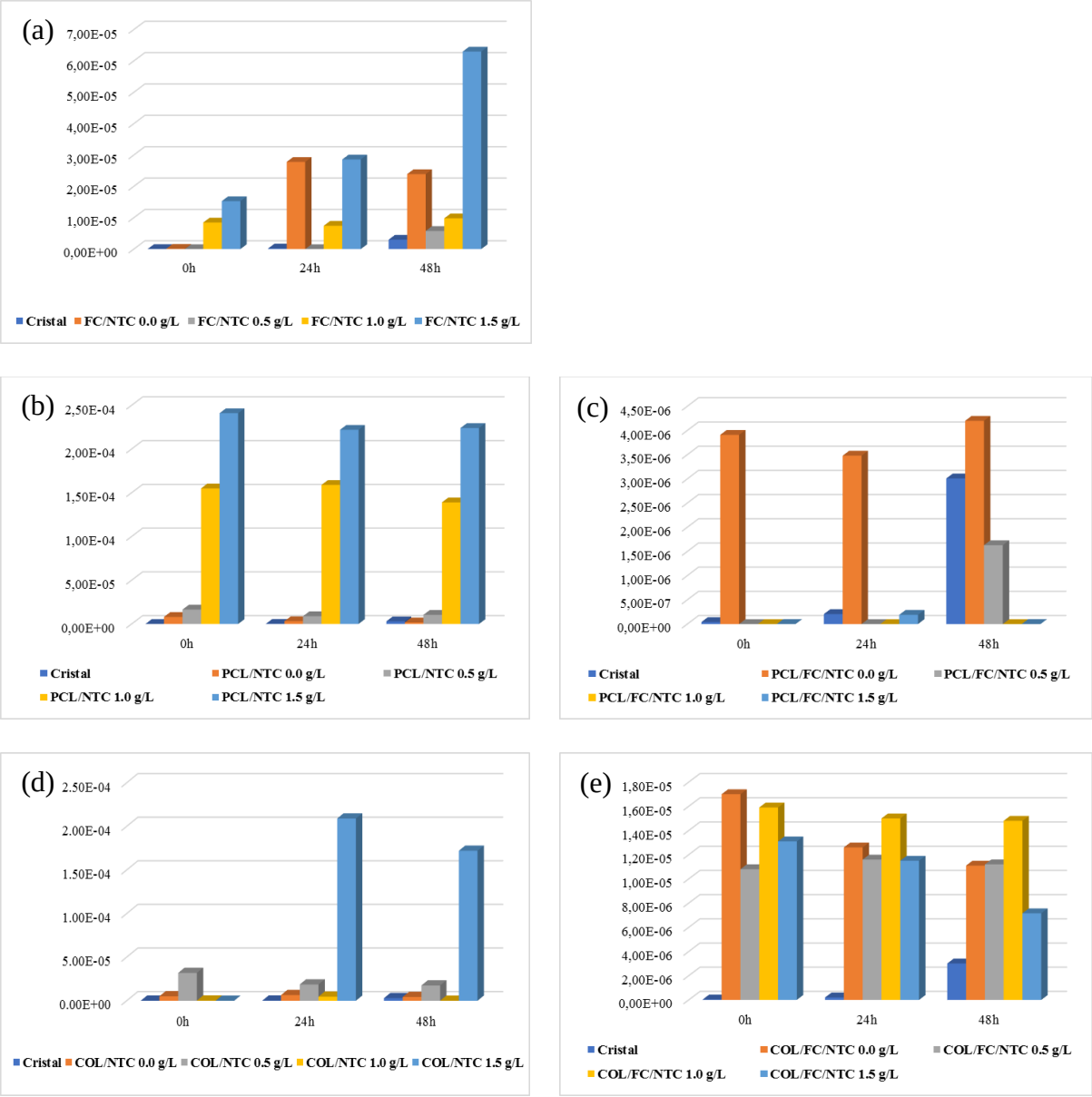
Circuitos equivalentes usados para el ajuste de los datos experimentales de impedancia de células HOS en contacto con los diferentes recubrimientos, (a) sin difusión y (b) con difusión.



También es posible evidenciar cambios en los valores de la capacitancia CPE1 relacionada con las interfases en donde intervienen las células. Mediante un diagrama de barras se comparan los valores de las capacitancias para todos los sistemas a 48 h de cultivo celular (ver Figura 66). Es posible identificar para los recubrimientos cerámicos que las superficies correspondientes a FC/NTC 0.5 y 1.5 g/L obtuvieron mayores CPE1. Para las superficies poliméricas con nanotubos de carbono, las superficies con las concentraciones mayores de NTC tuvieron mayores valores de CPE1, para los recubrimientos compuestos (polímero-FC-NTC), las superficies PCL/FC/NTC 0.0 g/L y todas las superficies de colágeno, obtuvieron altos valores de capacitancia. Estos resultados indican que los cambios electroquímicos ocurren en respuesta de la adherencia celular y los procesos que se dan en la superficie del recubrimiento. Dichos resultados fue posible contrastarlos con los ensayos biológicos descritos en el capítulo 8.

Figura 66.

Capacitancia celular (F/cm^2) vs tiempo de cultivo celular (h) para los recubrimientos (a) FC/NTC, (b) PCL/NTC, (c) PCL/FC/NTC, (d) COL/NTC y (e) COL/FC/NTC.



Se usó la Ecuación 1 para calcular la conductividad σ' y la Ecuación 33 para calcular la permitividad relativa, la cual es la parte real de la permitividad compleja. Esto permite determinar la integridad de las membranas celulares adheridas a los diferentes recubrimientos.

$$\varepsilon' = \frac{C}{(1+\omega^2 C^2 R^2)*\varepsilon_0} \quad (33)$$

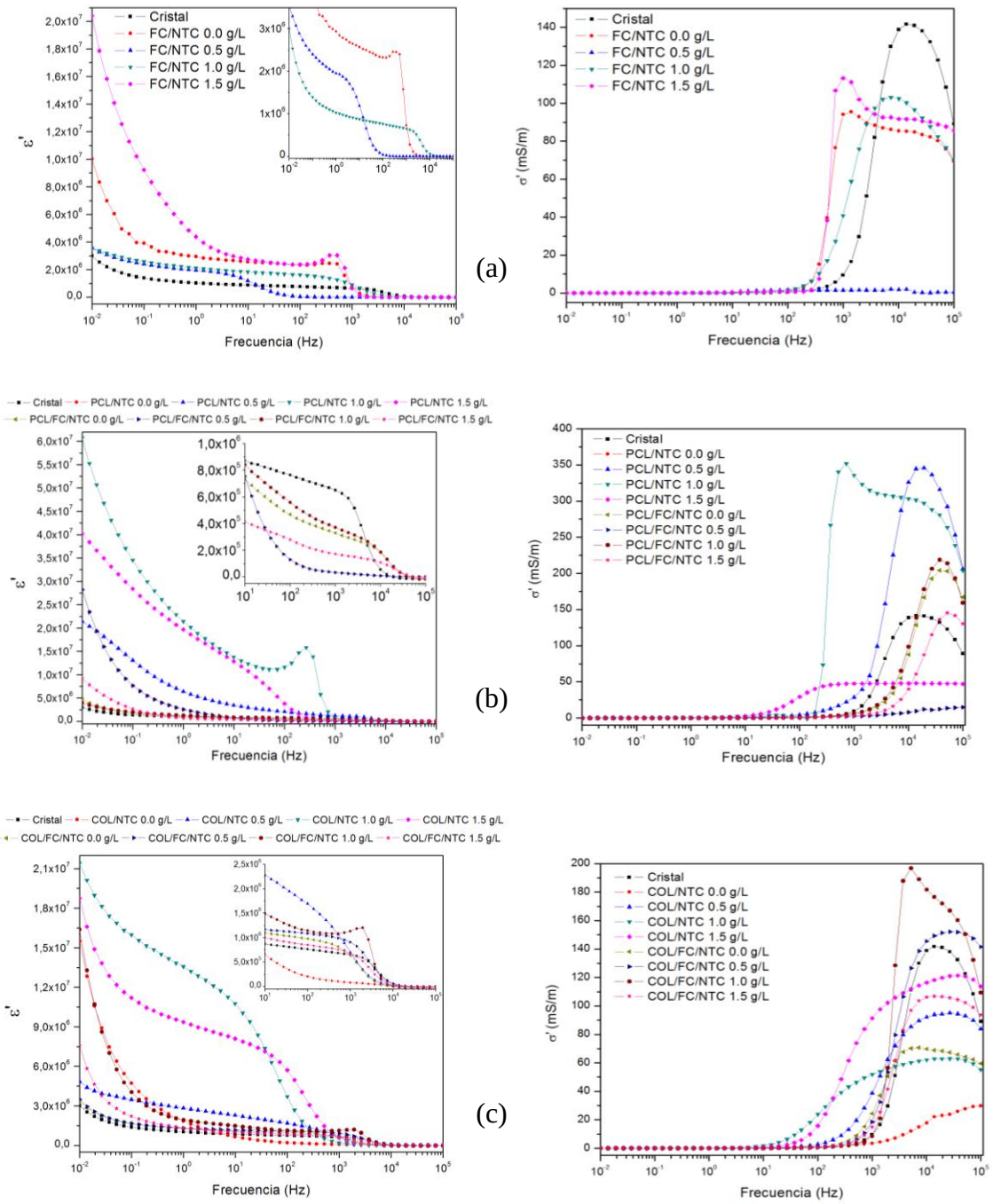
Donde $\omega = 2\pi f$ es la frecuencia angular, $C = 1/\omega Z''$ es la capacitancia, $R = Z'$ es la resistencia y $\varepsilon_0 = 8{,}854E-12\ F/m$ es la permitividad del vacío. Con respecto a los valores encontrados de impedancia, se calcularon los valores de la permitividad relativa al barrido de frecuencia de 0,01 Hz a 0,1 MHz. Se identificaron dos dispersiones α y β asociadas a la interfase de los tejidos y a la polarización de la membrana celular, proteínas y otras biomoléculas en los rangos de frecuencia de 0,01 Hz a 100 Hz y 100 Hz a 0,1 MHz respectivamente. En la Figura 67 se presentan los diagramas de permitividad relativa y conductividad de los diferentes sistemas.

A bajas frecuencias la conductividad es muy baja porque la corriente pasa a través de las células, mientras que, a altas frecuencias, la capacitancia de la membrana deja pasar la corriente alterna. El efecto de membrana desaparece y la corriente fluye a todas partes según la conductividad iónica local (Grimnes y Grottem, 2008), por lo que la conductividad aumenta. La curva de la conductividad describe el comportamiento de un material biológico en el barrido de frecuencias. La disminución de la conductividad a altas frecuencias se debe a los valores negativos de la impedancia imaginaria en el diagrama de Nyquist (lo cual se representó por una inductancia en los modelos de los circuitos equivalentes). Una mayor presencia celular puede indicar mayor conductividad, aunque como el flujo de corriente pasa tanto por los medios intra y extracelular a

altas frecuencias, el tejido muerto vs el tejido normal no es diferenciable. Sin embargo, el recubrimiento cerámico FC/NTC 0.5 g/L presenta mayor conductividad, lo cual es correspondiente con la disminución de la impedancia en el diagrama de Nyquist (ver Figura 64). La conductividad de los recubrimientos poliméricos de PCL es mayor que la del cristal con excepción de PCL/NTC 1.5 g/L y PCL/FC/NTC 0.5 g/L, mientras que, para los recubrimientos poliméricos de COL, sólo dos recubrimientos se encuentran por encima del cristal, estos son COL/FC/NTC 0.5 y 1.0 g/L. Por lo cual, se concluye que el análisis de la conductividad no permite identificar si el medio biológico que se encuentra sobre la superficie de los recubrimientos es tejido normal o isquémico. No obstante, los recubrimientos poliméricos con FC y NTC presentan valores altos de conductividad ~200 mS/m con excepción del recubrimiento PCL/FC/NTC 0.5 g/L.

Figura 67.

Permitividad relativa y conductividad a 48 h de cultivo celular en los recubrimientos (a) FC/NTC, (b) PCL/NTC, PCL/FC/NTC y (c) COL/NTC, COL/FC/NTC



Por otra parte, a medida que la frecuencia aumenta, la permitividad es disminuida, presentando las dos dispersiones α y β, con especial atención sobre los recubrimientos PCL/FC/NTC 0.5 y COL/NTC 0.0 g/L ya que no presentan la dispesión β. La permitividad a baja frecuencia es del orden de $10^6 – 10^7$ y es debida a fenómenos de difusión iónica de los iones que envuelven la membrana celular (Casas Piedrafita, 1998). Los valores de permitividad para tejido adiposo y hueso son del orden de 10^7 a bajas frecuencias, lo cual concuerda con los valores de permitividad mostrados en la Figura 67 (Grimnes y Grottem, 2008).

La Figura 68 muestra los voltagramas de células HOS cultivadas sobre los diferentes recubrimientos a 48 h de incubación, en donde se evidencian los picos de corriente catódica y anódica. La respuesta en corriente es el resultado de procesos faradáicos y no faradáicos que ocurren en el electrodo de trabajo, por lo que las reacciones redox y cambios en la composición iónica derivados de los procesos celulares dan lugar a la transferencia de electrones en la interfase de células vivas (El-Said et al., 2009).

De acuerdo con Jia *et al*., con la técnica voltametría cíclica es posible monitorear el crecimiento de células osteoblásticas, estudiando específicamente los picos de corriente que se dan en la zona de las reacciones redox. En el estudio de Jia *et al*, se realizaron voltametrías de células MG-63 a diferentes tiempos de cultivo de 15 a 90 h, en donde a 45 h el pico de corriente anódica empieza a disminuir, debido a que los nutientes no son renovados y esto influye en la viabilidad celular (Jia et al., 2009). Otro estudio como el de Martin *et al*., muestra que, en la presencia de células de bacteria, aparecen los picos de corriente negativos. La variación (aumento) en los picos de corriente se relacionó con la facilidad en la transferencia de electrones microbianos durante el

crecimiento hasta un tiempo aproximadamente 40 horas, en donde empieza a disminuir el valor de los picos de corriente, fenómeno atribuido a la disminución de las fuentes de carbono y energía para las bacterias (Martin et al., 2018). Se presentan en la Tabla 10 los picos de corriente anódica (Ia) y catódica (Ic) con sus respectivos potenciales, los cuales se calcularon con la ayuda del software Echem Analyst Gamry Instruments.

Figura 68.

Voltametría cíclica a 48 h de cultivo celular en los recubrimientos (a) FC/NTC, (b) PCL/NTC, PCL/FC/NTC y (c) COL/NTC, COL/FC/NTC

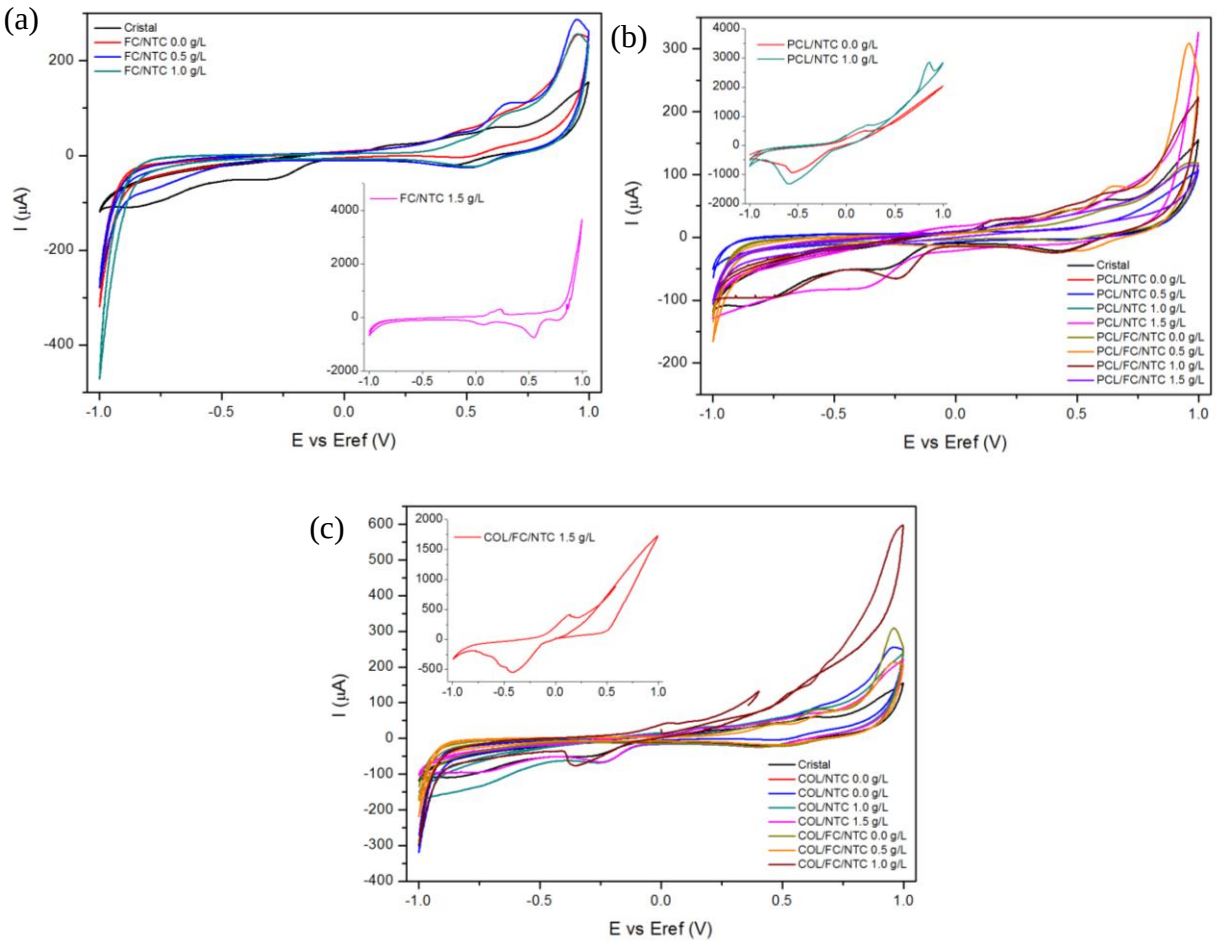


Tabla 10.

Picos de corriente y voltaje para los diferentes sistemas recubrimientos – células HOS a 48 h de cultivo celular

Muestra	Ic (µA)	Ec (V)	Ia (µA)	Ea (V)
Cristal de cuarzo	61.8	498.6	-68.3	-439.3
FC/NTC 0.0 g/L	85.5	520.1	-14.6	510.9
FC/NTC 0.5 g/L	84.8	509.6	-25.6	501.7
FC/NTC 1.0 g/L	90.7	666.7	-21.6	512.7
FC/NTC 1.5 g/L	437.3	269.7	-750.1	551.4
PCL/NTC 0.0 g/L	484.5	187.0	-945.2	560.9
PCL/NTC 0.5 g/L	18.9	121.8	-14.9	-95.74
PCL/NTC 1.0 g/L	2845	854.1	-1333	-549.6
PCL/NTC 1.5 g/L	-	-	-79.4	-365.8
PCL/FC/NTC 0.0 g/L	-	-	-3.7	439.9
PCL/FC/NTC 0.5 g/L	81.4	637.8	-24.6	481.1
PCL/FC/NTC 1.0 g/L	71.7	617.5	-65.1	-228.8
PCL/FC/NTC 1.5 g/L	-	-	-	-
COL/NTC 0.0 g/L	-	-	-	-
COL/NTC 0.5 g/L	42.3	464.9	-25.4	-783.9
COL/NTC 1.0 g/L	-	-	-69.1	-234.2
COL/NTC 1.5 g/L	71.7	617.5	-66.8	-237.8
COL/FC/NTC 0.0 g/L	88.5	689.4	-7.7	-338.5
COL/FC/NTC 0.5 g/L	62.1	668.5	-27.5	-766.9
COL/FC/NTC 1.0 g/L	-	-	-76.2	-350.4
COL/FC/NTC 1.5 g/L	412.4	135.1	-549.9	-417.4

Se observa con los datos presentados en la Tabla 10, que los picos de corriente anódica aumentan y disminuyen dependiendo del tipo de recubrimiento. Así, para los recubrimientos cerámicos, el pico más alto encontrado es para el recubrimiento FC/NTC 1.5 g/L, lo que es correspondiente con el mayor valor de permitividad y conductividad. Los demás recubrimientos cerámicos se encuentran por debajo del valor de Ia para el cristal en ausencia de recubrimiento. Con respecto a las superficies que contienen polímeros-nanotubos de carbono y polímeros-FC-NTC, las superficies que presentaron los mayores picos de Ia fueron COL/NTC 1.0 y 1.5 g/L y COL/FC/NTC 1.0 y 1.5 g/L.

De acuerdo con los resultados mostrados, la disminución del pico de corriente anódica puede indicar que hay una cantidad significativa de células en suspensión, lo que hace que la señal se debilite y el pico de corriente puede desaparecer por completo. No obstante, durante el ensayo, no hubo cambio de medio de cultivo, por lo que el pico anódico también puede depender de la densidad y viabilidad celular. Adicionalmente, algunas superficies no tienen picos de corriente catódica y para las demás superficies la relación de los picos Ia/Ic $\neq$ 1, lo cual indica que las reacciones que se dan sobre el electrodo de trabajo son irreversibles (El-Said et al., 2009).

7.4 Conclusiones

Se encontró que Δf depende del tiempo y exhibe un perfil sigmoidal especialmente en los recubrimientos PCL/FC/NTC, COL/NTC y COL/FC/NTC en las primeras dos horas de medición. Estos cambios de frecuencia se encuentran relacionados con los procesos de adhesión de células sobre las superficies, indicando que existe diferencia significativa en el comportamiento de películas cerámicas de alta rugosidad, con películas poliméricas de PCL y COL.

Por medio de los diagramas ΔR vs Δf y el cálculo de la tangente de pérdida se demostró que la masa adherida a la superficie no puede ser tratada como masa rígida adsorbida ni como material enteramente viscoso, es una combinación de ambos comportamientos en donde los cambios tanto en la frecuencia como en la resistencia de resonancia se deben a los cambios de la densidad y viscosidad del fluido adyacente a la superficie como resultado de los procesos celulares que conllevan a una adhesión celular.

Con la técnica espectroscopia de impedancia electroquímica es posible monitorear los procesos de adhesión celular y de biomoléculas que ocurren en la interfase recubrimiento-medio de cultivo y células HOS. A medida que aumenta el tiempo de cultivo celular, hay una tendencia a la disminución de la impedancia. Esta tendencia es más pronunciada en los recubrimientos de material compuesto (polímero–fosfatos de calcio–nanotubos de carbono) con ángulos de fase de frecuencias medias a bajas está entre -80° y -60° que indica la presencia de células y la adhesión a través de las biomoléculas de adsorción sobre la superficie del recubrimiento, debido a la formación de una capa contínua de biomoléculas y células en toda la superficie del material compuesto.

8 Biocompatibilidad de recubrimientos de cerámicos cálcicos, policaprolactona y colágeno, reforzados con NTC multipared

8.1 Introducción

Mejorar la biocompatibilidad de las superficies de implantes metálicos ha sido uno de los temas principales en los investigadores de la ciencia de los biomateriales. Un biomaterial debe tener las características ideales para permanecer en los sistemas vivos, ser biológicamente sostenible y biocompatible (que no cause una reacción tóxica, fisiológica o inmunológica adversa). Los ensayos *in vitro* permiten identificar si la superficie del implante es o no un material propicio para la adhesión, proliferación y diferenciación celular. La rugosidad y la topografía son algunas

de las propiedades superficiales de un biomaterial que afectan el comportamiento celular, la cual juega un papel importante en la osteointegración (Park *et al.*, 2014). Igualmente, otros factores como mecanismos específicos de estimulación (efectos de carga, efectos electromagnéticos, etc.), pueden modificar la respuesta de las células óseas (W. Wang et al., 2019). Se ha observado que algunos de los nanomateriales a base de carbono promueven la comunicación célula - célula y la actividad celular; las excelentes propiedades eléctricas hacen de estos materiales buenos candidatos para fabricar biomateriales electro-activos. Las aplicaciones de los nanotubos de carbono (NTC) en medicina, biología y ciencias de los materiales es amplia. Han sido utilizados como biosensores, en pruebas inmunológicas y moleculares, en reacciones enzimáticas y en sistemas liberadores de fármacos en algunas enfermedades como cáncer y enfermedades infecciosas. Inducen la proliferación y diferenciación de neuronas y osteoblastos y tal como se ha discutido en este trabajo, los NTC debido a sus propiedades eléctricas y mecánicas pueden mejorar la respuesta eléctrica de andamios o recubrimientos y ser usados en materiales compuestos.

Una de las primeras etapas en la evaluación de nuevos biomateriales para ser utilizados en clínica, son los ensayos preclínicos. Estos ensayos están orientados a evaluar la toxicidad (la química directa de los biomateriales, las reacciones inflamatorias o la respuesta inmune al biomaterial) y la eficacia de los materiales en modelos *in vitro* (en diferentes líneas celulares) e *in vivo* (en algunos animales de experimentación). A nivel celular, se pueden determinar algunos parámetros como son la toxicidad de los materiales en células de mamífero, la adhesión de las células en los materiales, la capacidad de producción de algunas enzimas implicadas en osteointegración (como por ejemplo la fosfatasa alcalina).

La evaluación de la toxicidad de los materiales (en este caso materiales con NTC) es importante. Paralelo al beneficio potencial de los NTC en medicina y aumento de su producción, algunos autores han demostrado el potencial tóxico a nivel celular y en modelos animales. Aunque no hay un consenso en los reportes de citoxicidad de los NTC, esta depende de las diversas propiedades fisicoquímicas de los NTC tales como longitud, diámetro, área superficial, tendencia a la aglomeración, pureza (i.e. que no estén contaminado con metales como Fe, Ni, Mo y Co), concentración y dosis (Costa et al., 2016; Lanone et al., 2013; Ying Liu et al., 2013). Por ejemplo, se ha encontrado que los NTC de pared simple hidroxilados son más tóxicos, debido a que se distribuyen más rápidamente en el cuerpo depositándose en el hueso por largos periodos de tiempo, que los NTC de pared simple tratados con ácido, los cuales contrariamente pueden ser internalizados por las células localizándose en los lisosomas y el citoplasma (menos tóxicos). Los NTC largos (en forma de aguja), o mayores de 800 nm de longitud están relacionados con toxicidad ya que inducen un mayor grado de inflamación (aumento de citoquinas proinflamatorias como IL-1), formación de granulomas y de daño a nivel del ADN que los NTC más cortos (Ying Liu et al., 2013). Los NTC con alto grado aglomeración también han sido relacionados con toxicidad debido a la rigidez de los aglomerados que forman (Francis y Devasena, 2018). Con relación a los NTC de pared simple y de paredes múltiples, algunos estudios muestran que los de pared simple son más tóxicos.

Para determinar la toxicidad existen diversos métodos *in vitro* que miden y cuantifican de una manera relativamente fácil y rápida, la toxicidad de los biomateriales; siendo muy valiosos y convenientes en la evaluación inicial de la biocompatibilidad esperada de nuevos materiales. Como ejemplos se tiene el ensayo del lactato deshidrogenasa (LDH) que mide la integridad de la

membrana celular, el ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) que mide la función mitocondrial y los marcadores inmunoquímicos para la apoptosis y la necrosis. El ensayo de citotoxicidad MTT con células de tipo óseo fue el utilizado en este trabajo. Este método determina el producto de la reducción del MTT (un colorante amarillo de tetrazolio) a cristales de formazán (de color púrpura) la cual es catalizada por deshidrogenasas mitocondriales presentes en las células vivas. El formazán resultante (el cual será directamente proporcional al número de células vivas) se cuantifica espectrofotométricamente a 550 nm después de la disolución en dimetilsulfóxido (DMSO). A continuación, se escriben algunos estudios en donde este ensayo fue utilizado.

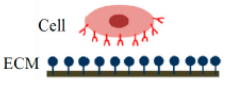
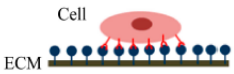
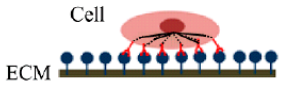
Gholami *et al*., encontraron una baja citotoxicidad de compuestos de fosfatos de calcio, NTC- multipared (concentraciones hasta 0.05 g/L) y albúmina de suero bovino en fibroblastos humanos, indicativo que hubo efecto en la proliferación celular y una mayor actividad metabólica de los fibroblastos (Gholami et al., 2013). Mokabber *et al*., usando el ensayo XTT (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida), el cual es un ensayo similar al MTT, estudiaron la actividad de células SaOs sobre recubrimientos de Ca-P realizados por electrodeposición sobre titanio encontrando que la morfología de las diferentes muestras afectaba la viabilidad y la adhesión celular (Mokabber et al., 2019). Trakoolwannach *et al*., demostraron en películas de PCL y PCL/HA con diferentes concentraciones de HA, que la viabilidad de las células disminuía a los 7 días de cultivo, sin embargo, a los 10 días la viabilidad vuelve a aumentar en todas las películas. No obstante, ninguna de las películas fue citotóxica (Trakoolwannachai et al., 2019). Hudecki et al., diseñaron recubrimientos de PCL y NTC por electro spinning sobre titanio, y realizando ensayos de MTT demostraron que la agregación de NTC favoreció la viabilidad

celular de fibroblastos dérmicos humanos (Hudecki et al., 2019). Park et al., y Valverde et al., evaluaron películas de colágeno y NTC (en concentraciones máximo de 20 µg y 6% en peso respectivamente) con células de tipo osteoblástico, mostrando que ninguna de las superficies fue citotóxica (Park et al., 2014; Valverde et al., 2016).

Cuando una célula está en contacto con un biomaterial la adhesión de las células al material o el desprendimiento de las células adheridas puede ocurrir. La adhesión celular debe tenerse en cuenta (medirse) para determinar la biocompatibilidad (interrelaciones entre un biomaterial y su entorno) de los materiales. Las células se adhieren a las superficies a través de diversas moléculas (i.e. fibronectina, colágeno, laminina, vitronectina) utilizando receptores celulares llamados integrinas. El proceso de adhesión celular estática *in vitro* se caracteriza por tres etapas (Tabla 11): fijación de la célula a su sustrato (etapa inicial), aplanamiento, unión y la organización del esqueleto de actina con la formación de adhesión focal entre la célula y su sustrato (Khalili y Ahmad, 2015).

Tabla 11.

Etapas del proceso de adhesión celular in vitro

Cell Adhesion Phases	Phase I	Phase II	Phase III
Schematic diagram of cell adhesion			
Schematic diagram of the transformation of cell shape	Initial attachment	Flattening	Fully spreading and structural organization
Cell adhesion intervension	Electrostatic interaction	Integrin bonding	Focal adhesion
Adhesion stages	Sedimentation	Cell attachment	Cell spreading and stable adhesion

Nota. Tomada de (Khalili y Ahmad, 2015).

Se han aplicado diversas técnicas para medir la adhesión celular en muchos campos de estudio con el fin de comprender las vías de señalización celular, estudios de biomateriales para sensores implantables, reemplazo artificial de huesos y dientes, el desarrollo de tejido en un chip y órgano en un chip en la ingeniería de tejidos, los efectos de los tratamientos bioquímicos y los estímulos ambientales a la adhesión celular, el potencial de los tratamientos farmacológicos, el estudio de metástasis del cáncer y la determinación de las propiedades de adhesión de las células normales y cancerosas.

La medición de fosfatasa alcalina es otro de los ensayos que se usa muy a menudo en el área de los biomateriales. La fosfatasa alcalina (ALP) es una proteína no colagenosa y marcador de diferenciación temprana del hueso. La expresión de ALP en osteoblastos está relacionada con el proceso de calcificación de la matriz extracelular (MEC) (Lobo et al., 2013). Dentro de los estudios más representativos que involucran los materiales evaluados en este trabajo, se encuentran los de Lee et al., en donde evaluaron películas de fosfato de calcio con diferentes rugosidades sintetizados sobre una superficie de poliestireno usando células de osteosarcoma HOS. Una mayor concentración de la proteína se encontró a 3 semanas de evaluación con una superficie de rugosidad promedio de 20 nm (W.-K. Lee et al., 2009). También Lobo et al., evidenció que la respuesta de osteoblastos humanos (hOB) sobre recubrimientos realizados por electrodeposición de nano hidroxiapatita (HA) con nanotubos de carbono multipared muestran mayor actividad de ALP que los NTC multipared en ausencia de HA. Por su parte, células HOS demostraron ser capaces de obtener valores medibles de ALP a 8 y 20 días de cultivo en los estudios de Ko et al., y Takitoh et al., respectivamente. En donde se evaluó la expresión de ALP en muestras de titanio y en geles de colágeno (Ko et al., 2007; Takitoh et al., 2010). Ensayos complementarios como

fluorescencia usando marcadores celulares específicos y microscopia electrónica de barrido se llevan a cabo para dilucidar la morfología del núcleo y de la célula completa e identificar ciertas alteraciones morfológicas y adherencia celular a la superficie estudiada (Gonçalves et al., 2016; Subramani et al., 2016; W. Wang et al., 2019).

Por otro lado, células diversas se usan en ensayos in vitro. Las más comunes en el campo de la ortopedia y los implantes son las células óseas de ratón precursoras de osteoblastos capaces de diferenciarse a osteoblastos y osteocitos (MC3T3-E1), fibroblastos humanos, células primarias de osteoblastos (hOB) o células osteoblásticas fetales humanas (hFOB). No obstante, otras líneas celulares se han probado para determinar el comportamiento de los materiales como las células de osteosarcoma humano líneas HOS, MG63 y SaOs-2. Pues, aunque son células derivadas de cáncer de hueso, la respuesta en proliferación y diferenciación son similares a las células hOB, de acuerdo con el estudio de Chen *et al*., en donde las líneas celulares HOS y hOB muestran patrones similares de proliferación y fosfatasa alcalina durante la etapa de diferenciación celular (F.-P. Chen et al., 2006).

En este capítulo se muestran los resultados de ensayos de citotoxicidad por MTT, actividad de células HOS por medio de la medición de fosfatasa alcalina, observación del cambio en la morfología del núcleo celular por ensayo de fluorescencia usando el marcador Hoechst 33342, y adherencia celular por microscopia electrónica de barrido, sobre todos los recubrimientos desarrollados a lo largo de este trabajo doctoral, como lo son los recubrimientos de fosfatos de calcio, policaprolactona y colágeno en la presencia de diferentes concentraciones de nanotubos de carbono multipared purificados y modificados superficialmente, funcionalizados con fosfatos de

calcio con precursor natural otolitos de pez. Estos diferentes ensayos permitieron identificar cuáles superficies tuvieron mejores comportamientos frente a la adherencia, proliferación y diferenciación de células HOS a diferentes tiempos de cultivo.

8.2 Metodología

El presente fue un estudio de tipo experimental en donde se evaluaron 4 grupos identificados como grupo control, grupo cerámicos, grupo polimérico PCL y grupo polimérico COL. Se llevaron a cabo pruebas de reducción de MTT, ALP, fluorescencia y SEM a recubrimientos con tres concentraciones diferentes de NTC y en ausencia de NTC, exceptuando el grupo control en presencia de células de osteosarcoma humano (HOS).

8.2.1 Materiales

Se evaluaron recubrimientos cerámicos y poliméricos con y sin nanotubos de carbono multipared purificados y funcionalizados con fosfatos de calcio, los cuales se encuentran descritos en la Tabla 12. Como método de esterilización para los recubrimientos, se usó una corriente de óxido de etileno durante 4 h.

8.2.2 Cultivo celular

Se usó la línea celular de osteosarcoma humano (HOS, ATCC CRL-1543), la cual se mantuvo mediante pases seriados en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino

fetal inactivado por calor (hiSFB) y penicilina/estreptomicina, en atmósfera de 5% de CO_2 y 95% de humedad a 37 ºC. Para el subcultivo, las células se separaron de la superficie del frasco usando una solución de tripsina (0.25 % p/v) - EDTA (0.53 mM) durante 10 min a 37 °C, se lavaron con medio de cultivo, se centrifugaron y se re-suspendieron con medio fresco.

Tabla 12.

Tipos de superficies expuestas a los ensayos in vitro.

Grupo	Descripción	Denotación	Método de preparación
Control	Sin sustrato	Control	---
	Sustrato desnudo	Ti6Al4V	Decapado
Cerámicos	Fosfatos de calcio tipo brushita, monetita e hidroxiapatita carbonatada	FC/NTC 0.0 g/L FC/NTC 0.5 g/L FC/NTC 1.0 g/L FC/NTC 1.5 g/L	Electrodeposición
Polimérico PCL	Policaprolactona disuelta en ácido acético glacial y NTC	PCL/NTC 0.0 g/L PCL/NTC 0.5 g/L PCL/NTC 1.0 g/L PCL/NTC 1.5 g/L	Spin-Coating
	Policaprolactona disuelta en ácido acético glacial y NTC funcionalizados con FC	PCL/FC/NTC 0.0 g/L PCL/FC/NTC 0.5 g/L PCL/FC/NTC 1.0 g/L PCL/FC/NTC 1.5 g/L	
Polimérico COL	Colágeno tipo I disuelto en ácido acético 0.5M y NTC	COL/NTC 0.0 g/L COL/NTC 0.5 g/L COL/NTC 1.0 g/L COL/NTC 1.5 g/L	
	Colágeno tipo I disuelto en ácido acético 0.5M y NTC funcionalizados con FC	COL/FC/NTC 0.0 g/L COL/FC/NTC 0.5 g/L COL/FC/NTC 1.0 g/L COL/FC/NTC 1.5 g/L	

8.2.3 Pruebas de toxicidad

Las pruebas de toxicidad se llevaron a cabo con el fin de conocer el porcentaje de viabilidad celular de la línea celular HOS sobre los diferentes recubrimientos propuestos. Cada una de las muestras

(ver Tabla 12) se dejó en una placa de fondo plano de 24 pozos que contenía 1 mL de RPMI-1640-10% de hiSFB a 37 °C. Después de 30 días, los sobrenadantes fueron recogidos y almacenados a -20 °C antes de su uso. Se incubaron células HOS (5 x 10^4 células/mL) con diluciones en serie de cada sobrenadante o medio solo durante 72 h. La toxicidad celular se evaluó mediante una prueba colorimétrica MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) y el porcentaje de viabilidad celular se calculó mediante la fórmula: Viabilidad celular (%) = OD promedio en el grupo de estudio/OD promedio en el grupo de control x 100%, donde OD es la densidad óptica medida a 550 nm en un lector de microplacas Synergy H1 (BioTeK). Los resultados se presentan en porcentaje de viabilidad celular, usando triplicado por cada condición a evaluar (n = 3). Como control se realizó el análisis de las células en medio de cultivo con ausencia de recubrimiento.

8.2.4 Determinación de fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina (ALP), es un marcador de diferenciación temprana del hueso y es utilizada para evaluar la actividad celular de los osteoblastos (Shim et al., 2017). ALP libera fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos. Si la fosfatasa alcalina disminuye, puede ser un indicador de muerte celular. La fosfatasa alcalina hidroliza la sal disódica de fosfato de p-nitrofenilo (p-NPP) o p-nitrofenilfosfato para formar el cromógeno amarillo p-nitrofenol. Cada una de las superficies a evaluar se dispuso en una placa de 24 pozos de fondo plano y se cubrieron con células HOS (1,5x10^4 células/mL), se cultivaron a 5% de CO_2 y 95% de humedad a 37 °C. Las células de control se dejaron sin muestras recubiertas. Después de 7 y 15 días de incubación, se retiró y se recogió el medio celular. Además, los lisados celulares se obtuvieron mediante tratamiento con Triton X-100 durante 10 min. El medio eliminado y los lisados se centrifugaron a

3000 rpm y los sobrenadantes se almacenaron a -20 ° C hasta su uso. La concentración de ALP se determinó usando un kit BioSystems (ALP-AMP 2-Amino-2-Metil-1-Propanol Buffer COD 11598). Brevemente, los sobrenadantes se incubaron con una sal disódica de fosfato de p-nitrofenilo 0.1M (p-NPP) y las placas se leyeron a 405 nm en un software de lector de microplacas Synergy H1 (BioTeK) Gen5 V3.03v. La concentración de ALP (U/L) se calcula utilizando la siguiente fórmula: (ΔA / min) X ((VtX10 ^ 6) / (ε X l X Vs)) = U/L, donde ΔA/min es el promedio diferencia de absorbancia por minuto (3 min), ε la absorbancia molar de 4-nitrofenol a 405 nm es 18450, l es la trayectoria de la luz (1 cm), el volumen de reacción total Vt es de 1,02 mL y el volumen de muestra Vs es de 0,02 mL.

8.2.5 Adhesión y morfología celular

Se colocaron células HOS ($1,5x10^4$ células/mL) en las muestras con recubrimientos y se incubaron durante 96 h. Las células permanecieron con 2 μg/mL de cloroaluminio ftalocianina durante 4 h (para citoplasma) y 0,5 mg/ml de Hoechst 33342 durante 10 min (para núcleo). Las células se lavaron 2 veces con PBS neutro y se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 10 min. Después de lavar 3 veces más, las superficies de las muestras se cubrieron con glicerina tamponada (10 μL) y se cubrieron de la luz hasta visualización. Las muestras se examinaron en un microscopio de fluorescencia Olympus BX43F usando el filtro UV2A con el software CellSens Standard 1.18. Todas las pruebas se realizaron por duplicado.

La morfología celular se observó mediante SEM a un tiempo de 48 h de cultivo de células HOS en una concentración de $1,5x10^4$ células/ml. Las células fueron fijadas con 2.5% de

glutaraldehído a 4°C toda la noche y deshidratadas con soluciones de etanol absoluto de 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80 y 99,99 % cada 10 min, repitiendo dos veces más a 99,99%. Luego se cubrieron con oro en un equipo Quorum Q1SORES en vacío durante 100 s. Las imágenes SEM se tomaron en un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 650, electrones secundarios y retrodispersados, con un voltaje de aceleración de 20 kV.

8.2.6 Análisis estadístico

Se aplicó el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) para determinar las diferencias entre los grupos utilizados en los experimentos de citotoxicidad y ALP. Luego, se usó la prueba de Tukey-Kramer para determinar las diferencias estadísticas al comparar dos grupos. Las diferencias estadísticas se consideraron en $^{*}p<0.05$ y $^{**}p<0.01$.

8.3 Resultados

8.3.1 Toxicidad de los recubrimientos FC/NTC, PCL/NTC, PCL/FC/NTC, COL/NTC y COL/FC/NTC

Los resultados de citotoxicidad de las células HOS en reacción con los sobrenadantes de los diferentes recubrimientos desarrollados en esta tesis se muestran en la Figura 69. De acuerdo con ISO 10993-5: 2009 (Evaluación biológica de dispositivos médicos - Parte 5: Pruebas de citotoxicidad in vitro), si la viabilidad celular se reduce a menos del 70% del control, las muestras tienen potencial citotóxico. En la Figura 69, Figura 70 y Figura 71 se presentan los resultados de

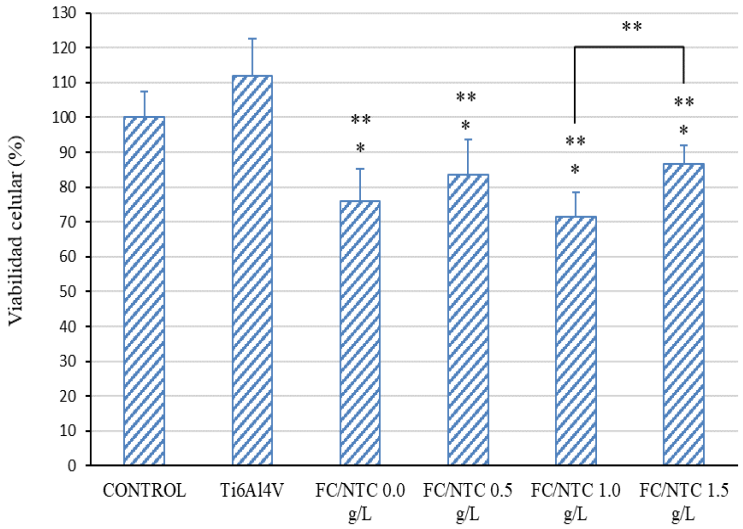
toxicidad para todos los grupos. En forma general, los recubrimientos no fueron citotóxicos para las células HOS. Haciendo referencia al valor promedio, de 21 superficies diferentes dos obtuvieron porcentajes de viabilidad celular cercanos al 70%, los cuales fueron COL/NTC 0.0 g/L y COL/FC/NTC 0.0 g/L.

Para los recubrimientos FC/NTC (Figura 69), se encontraron valores promedio de viabilidad celular de 75.95±9.26, 83.64±9.96, 71.44±7.18 y 86.53±5.53 %. Aunque no hay una tendencia marcada, los resultados están relacionados con el tipo de fosfato encontrado en los recubrimientos realizados por electrodeposición. Los porcentajes más altos de viabilidad celular se presentan para los recubrimientos FC/NTC 0.5 y 1.5 g/L, asociados con los fosfatos de calcio brushita + HA carbonatada, como se describe en el capítulo 4. La diferencia de estos dos recubrimientos es la presencia de HA y no de monetita, la cual puede ser una variable que modifique el porcentaje de viabilidad celular. Aquí, lo interesante para observar es que el aumento de la concentración de nanotubos de carbono no altera significativamente la toxicidad celular. Todos los grupos tienen diferencias significativas con respecto al control $p<0.05$ y $p<0.01$.

De acuerdo con Yilmaz *et al*., la hidroxiapatita a nivel nanométrico tiene alta habilidad de enlazar factores de crecimiento que estimulan la adhesión y la proliferación. En un ensayo con HA y óxido de grafeno (GO), células fibroblásticas fueron afectadas negativamente por la presencia del óxido de grafeno, mas no por la presencia de HA. Sin embargo, esta afectación depende de la concentración del GO utilizado, donde a baja concentración (0.1 – 0.5 µg/mL) se ha demostrado que promueve la proliferación de osteoblastos (Tanurat y Sirivisoot, 2015; Yılmaz et al., 2019).

Figura 69.

Viabilidad celular de cultivo de células HOS en sobrenadantes de recubrimientos FC y FC/NTC



Nota. Los datos representan la media ± desviación estándar para n=3, *p<0.05 y **p<0.01 comparadas con el control (prueba estadística de Tukey-Kramer comparación por pares).

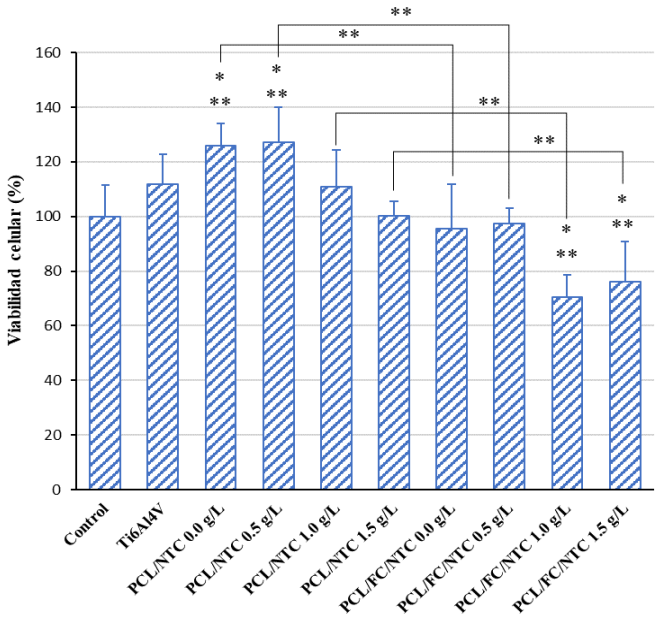
Se encontró un valor promedio de 111.95±10.73, 125.83±8.37, 127.31±12.78, 110.09±13.26, 100.09±5.41, 95.47±16.47, 97.43±5.66, 70.64±8.08 y 76.24±14.49 % para Ti6Al4V, PCL/NTC 0.0 g/L, PCL/NTC 0.5 g/L , PCL/NTC 1.0 g/L , PCL/NTC 1.5 g/L, PCL/FC/NTC 0.0 g/L, PCL/FC/NTC 0.5 g/L, PCL/FC/NTC 1.0 g/L y PCL/FC/NTC 1.5 g/L respectivamente (Figura 70). Se observa una disminución considerable para las muestras con la mayor cantidad de nanotubos de carbono y presencia de FC ($p<0.05$ y $p<0.01$), lo que sugiere que las altas concentraciones de nanotubos de carbono inhibieron la proliferación celular. Ahora bien, como se describió anteriormente, puede existir también un efecto inhibitorio por la adición de FC, ya que, al agregar FC, la viabilidad celular pasa de 125.83±8.37 para PCL a 95.47±16.47 para PCL/FC/NTC 0.0 g/L. Además, la prueba MTT se llevó a cabo durante 30 días, durante este tiempo es probable que parte del recubrimiento se haya desprendido y que estos productos disueltos en

los sobrenadantes reduzcan la viabilidad celular. Se ha encontrado en otros estudios valores altos de viabilidad celular en matrices de PCL con baja concentración de NTC multipared (Mattioli *et al.*, 2012), y que a medida que aumenta el tiempo de exposición, hay una disminución en la viabilidad celular con aumentos en la concentración de NTC multipared (Gholami *et al.*, 2013). Se encontraron diferencias significativas entre el control y dos muestras con mayor porcentaje de viabilidad celular y dos muestras con menor porcentaje de viabilidad celular. Las comparaciones entre pares de grupos arrojaron diferencias significativas entre los recubrimientos realizados con las mismas concentraciones de nanotubos de carbono con y sin fosfato de calcio, lo que indica que existe una inhibición de la proliferación celular por la agregación del fosfato de calcio que a su vez tiene efecto cuando la concentración de nanotubos de carbono aumenta a 1.0 y 1.5 g/L. No obstante, cabe aclarar que ninguna de las superficies tiene un valor por debajo del 70% de viabilidad, tomando como base el valor promedio.

Duarte *et al*., obtuvo andamios de PCL, β-TCP y dexametasona usando CO_2 como agente espumante, obteniendo sobrenadantes solo de 24 h para ensayo MTT. Hallaron que hay una disminución en la viabilidad celular de ~130% para PCL a ~122% para PCL/β-TCP y ~99% para PCL/β-TCP/5% dexametasona, concluyendo que, aunque la viabilidad celular cambie, las superficies no afectan la actividad metabólica de las células osteoblásticas L929 (R. M. Duarte et al., 2018).

Figura 70.

Viabilidad celular de cultivo de células HOS en sobrenadantes de recubrimientos PCL/NTC y PCL/FC/NTC



Nota. Los datos representan la media ± desviación estándar para n=3, *p<0.05 y **p<0.01 comparadas con el control (prueba estadística de Tukey-Kramer comparación por pares).

En la Figura 71 se muestran los resultados del ensayo MTT en los recubrimientos de COL/NTC y COL/FC/NTC. Los recubrimientos con menor porcentaje de viabilidad celular fueron los correspondientes a COL/NTC 0.0 g/L y COL/FC/NTC 0.0 g/L, con valores de 69.89±8.94% y 64.47±11.13% respectivamente. Con estos resultados se evidencia que estos recubrimientos tienen citotoxicidad leve sobre las células HOS. La causa probable de este comportamiento es que, en los 30 días de exposición al medio de cultivo, hubo una degradación del recubrimiento, por lo que hubo un aumento de la concentración de colágeno en el medio, lo cual se ve reflejado en la disminución del porcentaje de viabilidad celular. El colágeno tiene una degradación rápida en medios biológicos (Fernandes et al., 2011). Lo anterior, fue visto en varios estudios, como el

estudio de Grønlien *et al.*, en donde al aumentar la concentración de colágeno de tendón de pavo de 0.5 a 3 mg/ml en esponjas, hubo una disminución del porcentaje de viabilidad en fibroblastos, o como el estudio de Fernandes *et al.*, en donde al agregar colágeno bovino tipo I a un andamio de quitosano, se disminuye la viabilidad de osteoblastos. Así mismo, lo demostró también Jeong *et al.*, que al aumentar la concentración de colágeno extraído de peces de 10 a 200 µg/mL, se disminuyó el porcentaje de viabilidad de osteoblastos con una alta desviación estándar (Fernandes et al., 2011; Grønlien et al., 2019; Jeong et al., 2013).

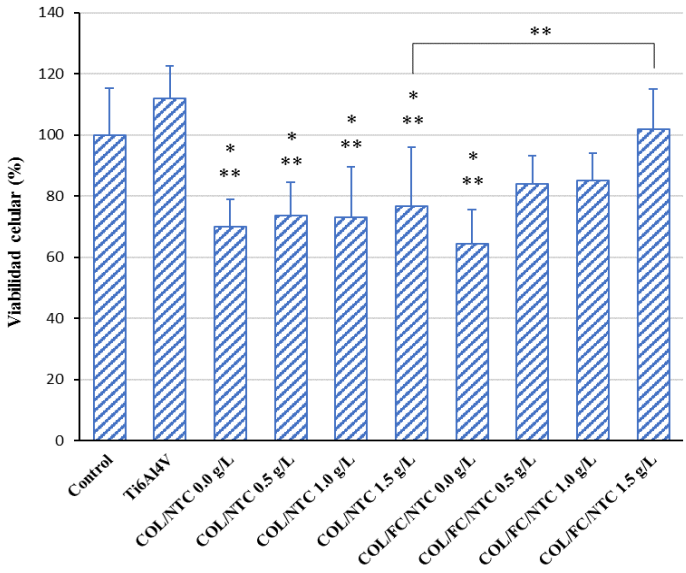
La presencia de nanotubos de carbono en el recubrimiento de colágeno mejora levemente la viabilidad celular en ausencia de FC, además, este aumento se ve más acentuado en la presencia de FC. Al contrario de lo que sucede con los recubrimientos de PCL, la presencia de NTC y FC en el recubrimiento de colágeno aumenta significativamente la viabilidad celular en un ~30%. Estas observaciones concuerdan con los estudios presentados por Park *et al*., y MacDonald *et al*., en donde la presencia de nanotubos de carbono en cantidades máximas de 20 µg y 2.0% en peso, aumenta la viabilidad celular de células tipo osteoblástico y células de músculo de ratón respectivamente (MacDonald et al., 2005; Park et al., 2014). Todos los grupos con porcentajes de viabilidad de células HOS por debajo del 80% tienen diferencia significativa ($p<0.05$ y $p<0.01$) frente al control, mientras que los grupos con y sin fosfatos que presentaron diferencia significativa ($p<0.01$) son el par COL/NTC 1.5 g/L y COL/FC/NTC 1.5 g/L.

Por otro lado, el tipo de fosfato de calcio en estos recubrimientos parece no afectar la viabilidad celular. En el estudio de Valverde *et al*., se evaluó un andamio 3D de colágeno tipo I sin y con nanotubos de carbono multipared y agregado de trióxido mineral (MTA), se concluyó

que no está claro qué efectos tienen MTA y los NTC en la proliferación de osteoblastos. Parece que los NTC pueden interferir de alguna manera que no es clara con los ensayos de proliferación que los investigadores realizaron (Valverde et al., 2016).

Figura 71.

Viabilidad celular de cultivo de células HOS en sobrenadantes de recubrimientos COL/NTC y COL/FC/NTC



Nota. Los datos representan la media ± desviación estándar para n=3, *p<0.05 y **p<0.01 comparadas con el control (prueba estadística de Tukey-Kramer comparación por pares).

Por último, con respecto al ensayo de citotoxicidad, las superficies cerámicas que tuvieron mejor respuesta fueron FC/NTC 0.5 g/L y FC/NTC 1.5 g/L, y las superficies poliméricas fueron PCL/NTC 0.0 g/L, PCL/NTC 0.5 g/L, COL/FC/NTC 1.0 g/L y COL/FC/NTC 1.5 g/L. No obstante, los recubrimientos que superaron el porcentaje de viabilidad del control fueron PCL/NTC 0.0 g/L, PCL/NTC 0.5 g/L, PCL/NTC 1.0 g/L y COL/FC/NTC 1.5 g/L., mientras que los

recubrimientos que superaron la superficie de Ti6Al4V fueron PCL/NTC 0.0 g/L, PCL/NTC 0.5 g/L.

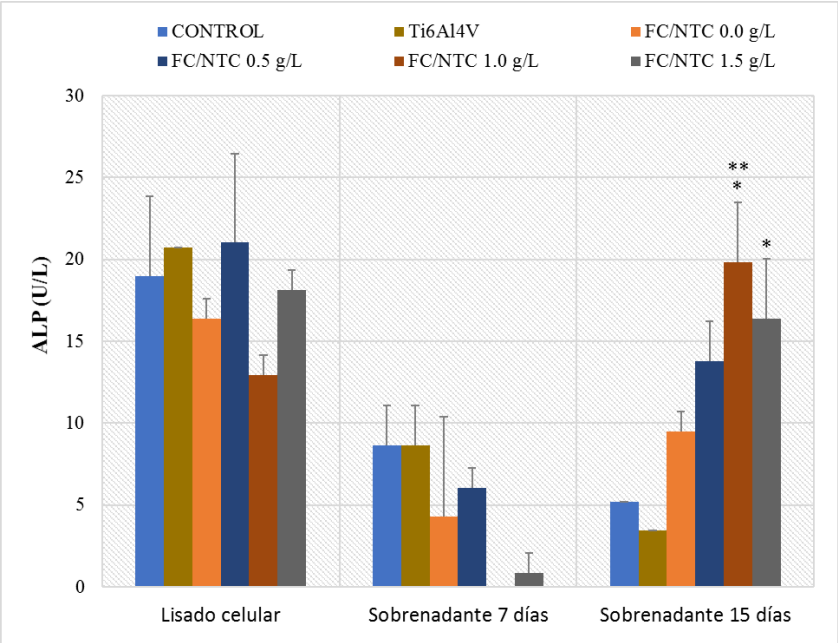
8.3.2 Medición de fosfatasa alcalina en recubrimientos FC/NTC, PCL/NTC, PCL/FC/NTC, COL/NTC y COL/FC/NTC con células HOS

El ensayo de actividad de fosfatasa alcalina se usó como marcador bioquímico para determinar la diferenciación de células de osteosarcoma humano tanto en el lisado celular como en los sobrenadantes los días 7 y 15. En la Figura 72 se muestran los resultados de la medición de fosfatasa alcalina en recubrimientos de FC realizados por electrodeposición. Se encontró en el sobrenadante de 7 días, que la producción de fosfatasa alcalina no es significativa, ninguna superficie tiene diferencias significativas frente al control. Mientras que, en el sobrenadante a 15 días dos de las superficies tienen diferencias significativas frente al control (FC/NTC 1.0 y 1.5 g/L). En un estudio de Chen *et al*., se estableció que las células HOS tienen un estado de rápida proliferación de los días 5-15. En esta etapa, puede existir un decrecimiento en la expresión de ALP y posteriormente aumenta durante la maduración de la matriz (F.-P. Chen et al., 2006). Sin embargo, esto ocurre cuando se compara solo el comportamiento de la célula sobre controles. De acuerdo con Mokabber *et al*., la morfología de recubrimientos de FC electrodepositados por pulsos no afecta la expresión de ALP en células de osteosarcoma (SaOs), mientras que la viabilidad celular si (Mokabber et al., 2019). Es decir, que depende del tipo de superficie que se esté evaluando donde muchas variables pueden modificar el comportamiento de las células, como lo son cambios morfológicos, rugosidad, cristalinidad, composición química, propiedades mecánicas entre otras.

La medición en el lisado celular indica la actividad bioquímica de las células HOS que quedan en la superficie de los recubrimientos al cabo de 15 días de cultivo. Este comportamiento difiere de los sobrenadantes, debido a que la expresión de ALP medida es la expresada en la membrana celular (Hernández-Gil et al., 2006). En el lisado celular a 15 días de cultivo, las superficies evaluadas con fosfatos de calcio no muestran diferencias significativas frente al control, resaltando que las superficies con mayor ALP son las correspondientes a los recubrimientos FC/NTC 0.5 g/L y FC/NTC 1.5 g/L, las cuales están asociados a una mayor viabilidad celular.

Figura 72.

Producción de ALP de células HOS en lisado celular y sobrenadantes de recubrimientos FC/NTC

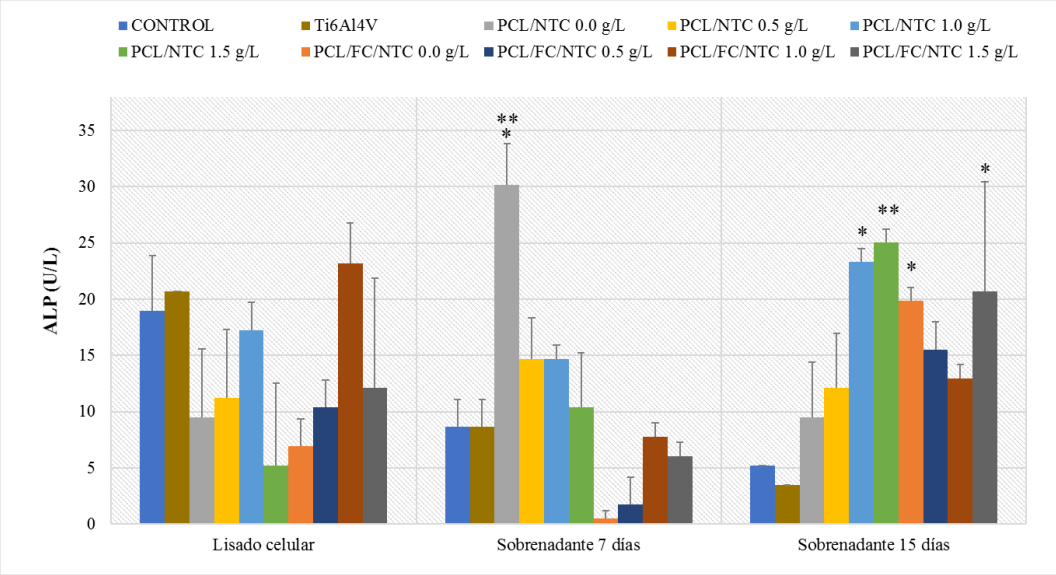


Nota. Los datos representan la media ± desviación estándar para n=2, *p<0.05 y **p<0.01 comparadas con el control (prueba estadística de Tukey-Kramer comparación por pares).

De la misma manera como se evaluó la viabilidad celular, la expresión de fosfatasa alcalina se evaluó en los recubrimientos de PCL/NTC y PCL/FC/NTC. Los resultados son apreciables en la Figura 73. Comparando los sobrenadantes en los recubrimientos PCL/NTC, hay una disminución en la producción de ALP del día 7 al día 15 para PCL/NTC 0.0 g/L y PCL/NTC 0.5 g/L, asociado con las superficies de mayor viabilidad celular. Por otro lado, en los recubrimientos PCL/NTC 1.0 g/L, PCL/NTC 1.5 g/L y PCL/FC/NTC (0.0, 0.5, 1.0, 1.5 g/L), hay un aumento en la producción de ALP, asociado a valores de menor viabilidad, donde una baja tasa de proliferación probablemente se deba a que las células comienzan una etapa de diferenciación ósea (Wongsupa et al., 2017).

Figura 73.

Producción de ALP de células HOS en lisado celular y sobrenadantes de recubrimientos PCL/NTC y PCL/FC/NTC



Nota. Los datos representan la media ± desviación estándar para n=2, *p<0.05 y **p<0.01 comparadas con el control (prueba estadística de Tukey-Kramer comparación por pares).

En la Figura 73 se aprecian diferencias significativas en los sobrenadantes con mayor actividad de ALP en comparación con el control ($p<0.05$). No obstante, valores altos de ALP tanto en el sobrenadante a 7 días para PCL/NTC 0.0 g/L como en el lisado celular para PCL/FC/NTC 1.0 g/L, no están relacionados con el número de células, ya que puede deberse a una proliferación o diferenciación celular alterada (Klammert et al., 2009). Por esta razón, se llevaron a cabo ensayos de fluorescencia y adhesión de células a otros tiempos, para evaluar de mejor manera el comportamiento de células HOS en este tipo de recubrimientos. Adicionalmente, no existen diferencias significativas en los recubrimientos de PCL ($p>0.05$), infiriendo que la expresión de ALP de células HOS hacia el polímero es mediada en mayor proporción por la presencia de PCL, siendo modificada levemente por la presencia de NTC y FC en las concentraciones usadas en este estudio. Este resultado es coherente con los expresados por Wang *et al*., donde se evaluaron andamios de PCL con NTC y grafeno en concentraciones de 1 y 3% en peso. Los investigadores encontraron que la expresión de ALP es baja en los andamios con las dos concentraciones de NTC, y PCL en ausencia de NTC y no tienen diferencias significativas entre sí, mientras que, con el uso de grafeno, los andamios producen mayor ALP, probablemente porque el grafeno presenta un área superficial mayor que los NTC mostrando diferentes efectos en la adsorción de proteínas, proliferación y diferenciación celular (W. Wang et al., 2019). Otro estudio realizado por Lee *et al*., muestra que la expresión de ALP en matrices poliméricas de PCL con y sin fósforo negro (BP, alótropo del fósforo blanco cuando este se trata a altas presiones), no tienen diferencias significativas evaluados a los días 1, 7, 14 y 21, y que la presencia del BP aumenta ligeramente la expresión de ALP de células osteoblásticas MC3T3-E1 (Y. B. Lee et al., 2019).

Para los recubrimientos COL/NTC y COL/FC/NTC (Figura 74), los resultados evidencian que no se encontró expresión de ALP en el sobrenadante a 7 días de cultivo celular en la mayoría

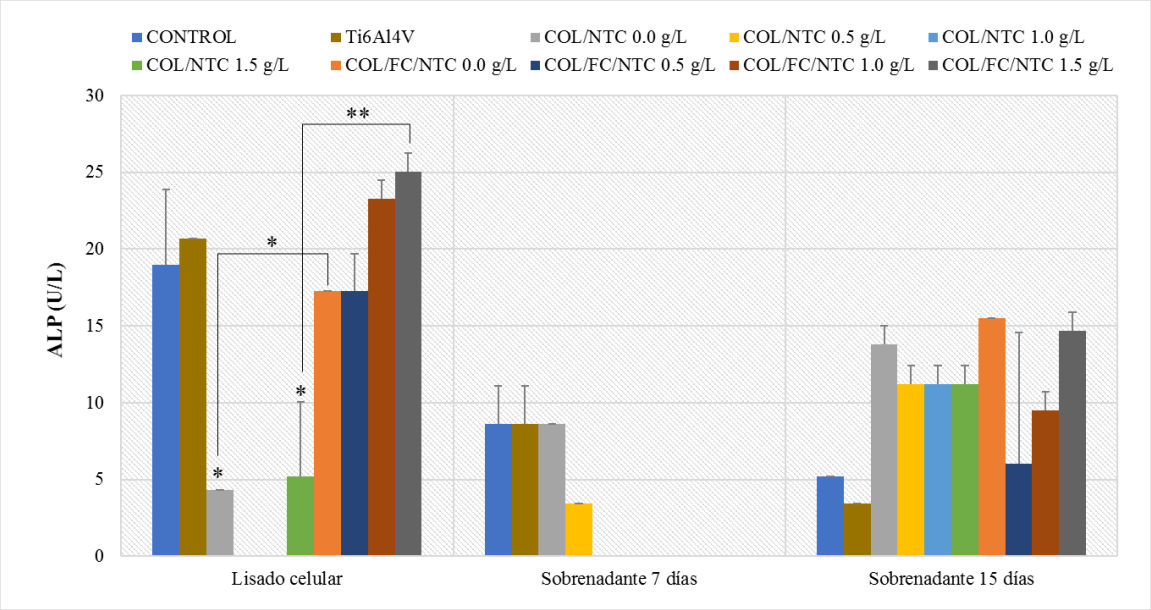
de los recubrimientos, así como tampoco en el lisado celular para los recubrimientos COL/NTC 0.5 g/L y COL/NTC 1.0 g/L. La baja o nula producción de ALP tanto en el sobrenadante como en el lisado celular puede deberse a una baja tasa de proliferación, tal como se aprecia en la Figura 71. A mayor cantidad de NTC y en la presencia de FC existe una mayor viabilidad celular. A 15 días en el sobrenadante, la producción de fosfatasa alcalina es baja y no hay diferencias significativas entre los recubrimientos, mientras que, en el lisado celular si hay diferencias significativas entre los recubrimientos COL/NTC y los respectivos COL/FC/NTC, infiriendo que hay una respuesta positiva en ALP de las células HOS en contacto con superficies de colágeno que contengan nanotubos de carbono multipared funcionalizados con FC. Los estudios de Park *et al* y Tsai *et al*., demuestran que la actividad de ALP aumenta con el incremento de NTC multipared en colágeno hasta en una concentración de 20 µg y con la incorporación de hidroxiapatita respectivamente (Park et al., 2014; Tsai et al., 2008). Otras investigaciones han encontrado que la producción de ALP en recubrimientos de colágeno realizados por pulverización electrostática sobre titanio es casi nula hasta en 14 días de evaluación y en esponjas de colágeno tipo I es menor que con la adición de nanotubos de carbono, probablemente porque el colágeno es no conductor y está establecido que los osteoblastos bajo estímulos eléctricos pueden acelerar el proceso de biomineralización (Bosco et al., 2014; Hirata et al., 2009).

Observando los resultados de ALP en las diferentes superficies (FC/NTC, PCL/NTC, PCL/FC/NTC, COL/NTC y COL/FC/NTC), se pudo establecer que existen diferencias entre los resultados mostrados por los lisados celulares y los sobrenadantes. Una mejor correlación se pudo observar con los lisados celulares y la respuesta en viabilidad celular, ya que la expresión de

fosfatasa alcalina en los lisados celulares es la expresada en la membrana de las células que se encuentran adheridas en la superficie de los recubrimientos al cabo de 15 días.

Figura 74.

Producción de ALP de células HOS en lisado celular y sobrenadantes de recubrimientos COL/NTC y COL/FC/NTC



Nota. Los datos representan la media ± desviación estándar para n=2, *p<0.05 y **p<0.01 comparadas con el control (prueba estadística de Tukey-Kramer comparación por pares).

8.3.3 Adhesión de células HOS por fluorescencia y SEM en recubrimientos FC/NTC, PCL/NTC, PCL/FC/NTC, COL/NTC y COL/FC/NTC

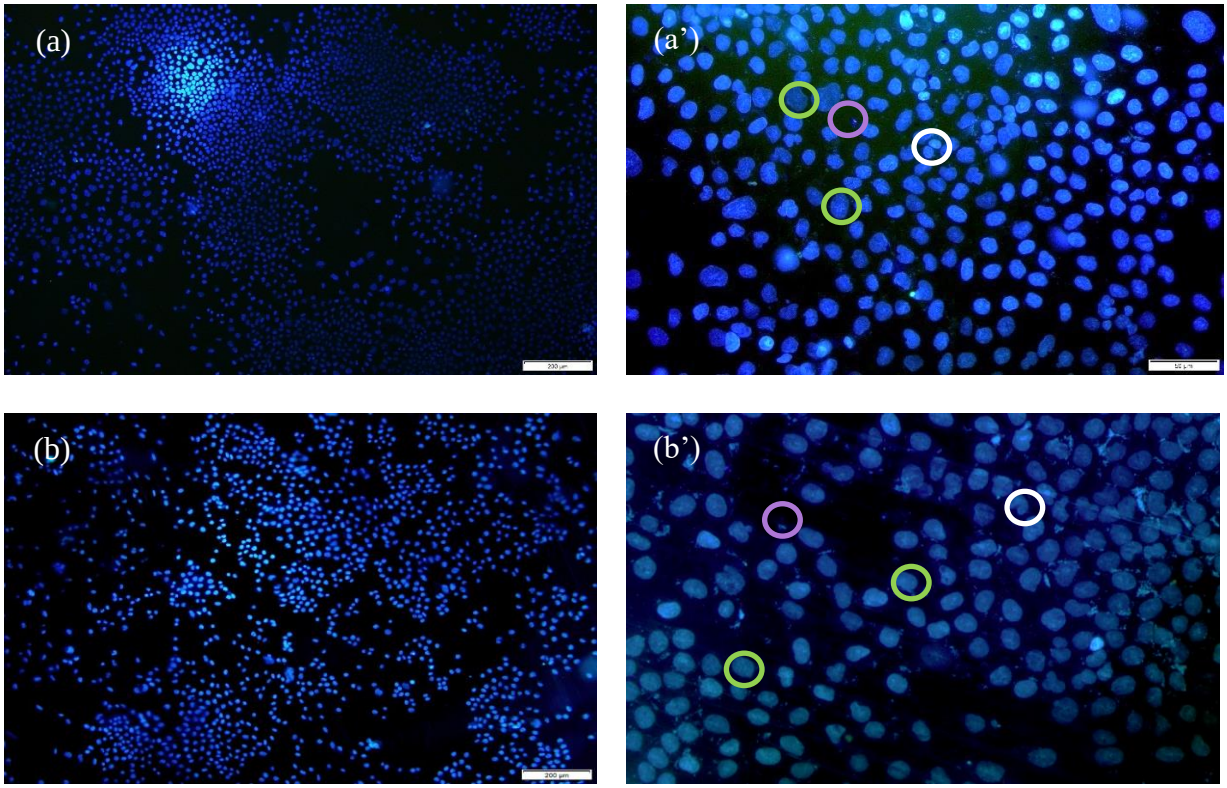
A 96 h de cultivo celular, las células HOS fueron manchadas con Hoechst 33342 y sus núcleos fueron observados bajo microscopio. Con el ensayo de fluorescencia es posible apreciar el área ocupada por los núcleos de las células (micrografías a 10X con barra de escala de 200 µm) tanto en el control como en los diferentes recubrimientos y la superficie de Ti6Al4V. Con un

aumento de 40X, se puede observar de mejor manera la morfología de los núcleos, lo que indica si el crecimiento celular es normal o anormal. La Figura 75 muestra los resultados de la prueba de fluorescencia para el control y la superficie de Ti6Al4V y la Figura 76 muestra los resultados de fluorescencia para los recubrimientos desarrollados por electrodeposición de FC y FC/NTC. Tanto para el control como para la superficie de Ti6Al4V en ausencia de recubrimiento, se observan núcleos normales, indicativos de células adheridas a la superficie, así mismo, el área cubierta por células es considerable (Figura 75 a, a', b, b'). Para los recubrimientos FC/NTC 0.0, 0.5 y 1.0 g/L (Figura 76 a, a', b, b', c, c'), se observan células apoptóticas (círculo rojo) diferenciadas por una fuerte mancha azul (X. Xu et al., 2013), menor cantidad de células y aparición de micronúcleos (círculo púrpura) probablemente formados por una inhibición del proceso de mitosis por roturas de las cadenas de ADN (Harding et al., 2017), lo que produce una morfología celular de núcleo diferente.

Para los recubrimientos FC/NTC 1.5 g/L (Figura 76 d, d'), se encuentran núcleos más redondeados, sin presencia de micronúcleos y con aparente ausencia de apoptosis, similares al control. Esto se debe probablemente a que los NTC usados en la mayor concentración (1.5 g/L) en el recubrimiento, ayudaron a la estabilización de los fosfatos de calcio en términos de menor liberación al medio de cultivo, donde los NTC le confieren buena adherencia al sustrato. Así mismo, se relaciona con mayores valores en la viabilidad celular y en la producción de fosfatasa alcalina.

Figura 75.

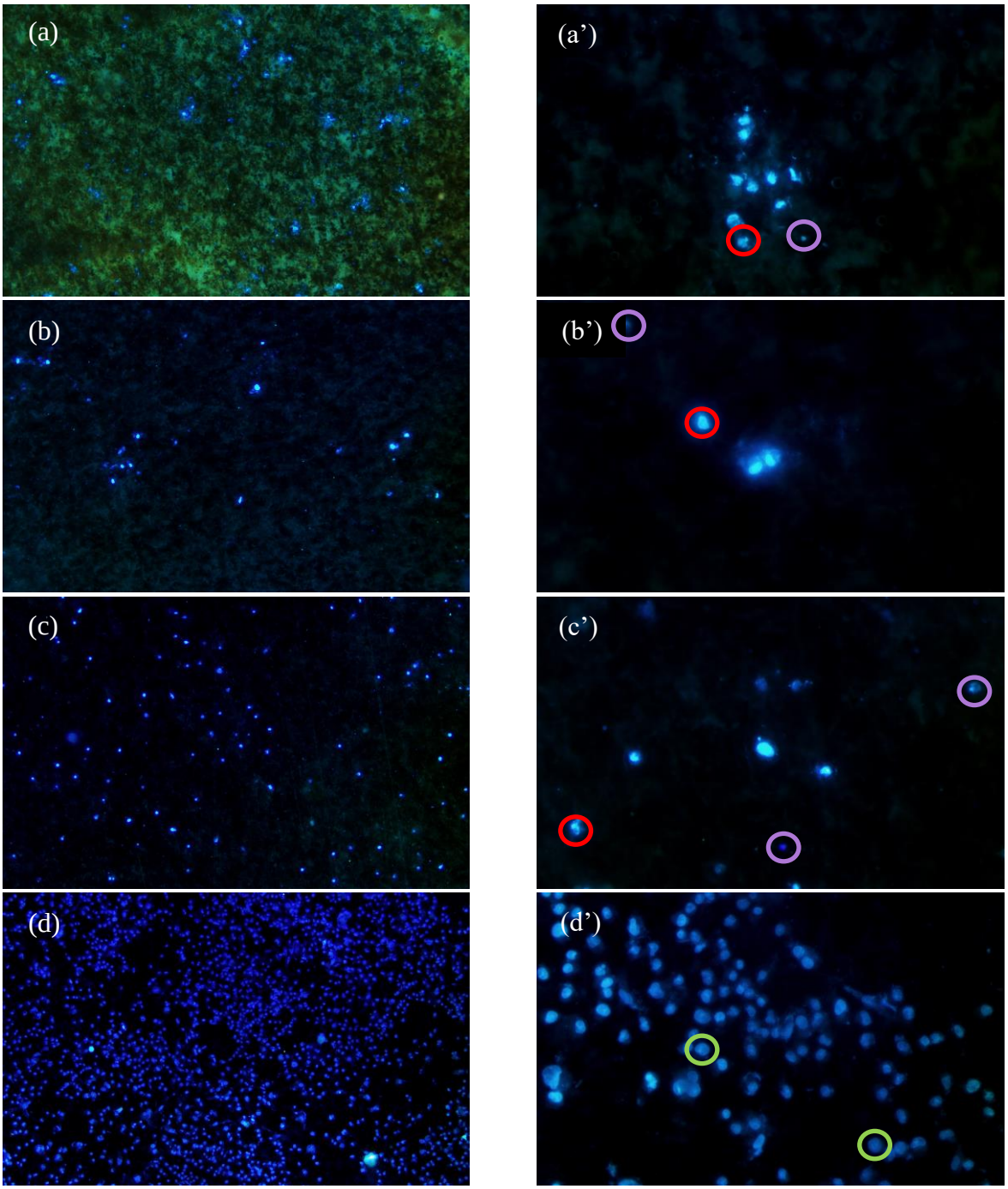
Micrografías de fluorescencia de células HOS a 96 h de cultivo (a, a') control y (b, b') Ti6Al4V



Nota. La magnificación original fue de 10X para (a y b) y 40 X para (a' y b'). Círculos blancos: células mitóticas, círculos verdes: células vivas extendidas, círculos rojos: apoptosis temprana, círculos púrpuras: micronúcleos.

Figura 76.

Micrografías de fluorescencia de células HOS a 96 h de cultivo sobre recubrimientos (a, a') FC/NTC 0.0 g/L, (b, b') FC/NTC 0.5 g/L, (c, c') FC/NTC 1.0 g/L y (d, d') FC/NTC 1.5 g/L

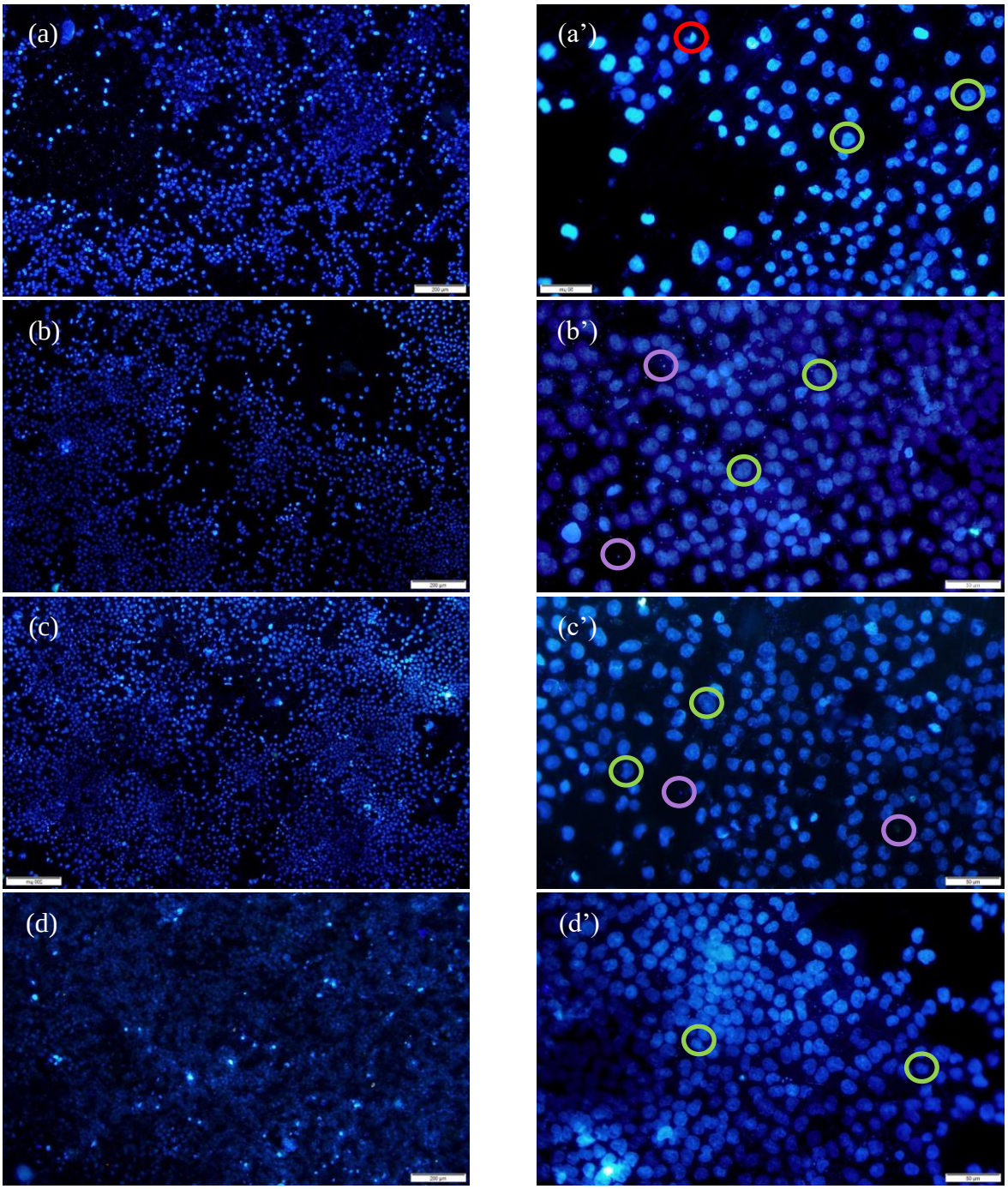


Nota. La magnificación original fue de 10X para (a, b, c y d) y 40 X para (a', b', c' y d'). Círculos blancos: células mitóticas, círculos verdes: células vivas extendidas, círculos rojos: apoptosis temprana, círculos púrpuras: micronúcleos.

Para los recubrimientos PCL, PCL/NTC y PCL/FC/NTC, es evidente que las muestras recubiertas contienen un mayor número de células en comparación con las no recubiertas (muestras de control), lo que indica que la modificación de la superficie por recubrimiento fue favorable al crecimiento celular (Figura 77). Sin embargo, células en la etapa temprana de apoptosis se observaron en los recubrimientos PCL en ausencia de NTC y PCL/FC/NTC con las mayores concentraciones de nanotubos (1.0 y 1.5 g/L) además, se encontraron micronúcleos, mientras que las células en mitosis se observaron en el control y en los recubrimientos PCL/FC/NTC 0.0, 0.5 y 1.0 g/L (Figura 78 a', b', c'). En todos los recubrimientos fue posible observar núcleos de células extendidas en la superficie, sin núcleos condensados y fragmentados. Sin embargo, también se encontró tinciones intensas de cromatina (material cromosómico, ADN unido a proteínas) y núcleos fragmentados, que son características morfológicas típicas de una célula apoptótica (Gough y Downes, 2001; Gu y He, 2012; Q. Xu et al., 2011). Lo anterior se relaciona con los recubrimientos que presentaron la menor viabilidad celular (PCL/FC/NTC 1.0 y 1.5 g/L), ya que como se mencionó anteriormente, en este tipo de recubrimientos de PCL, la viabilidad celular disminuye con aumentos en la concentración de NTC.

Figura 77.

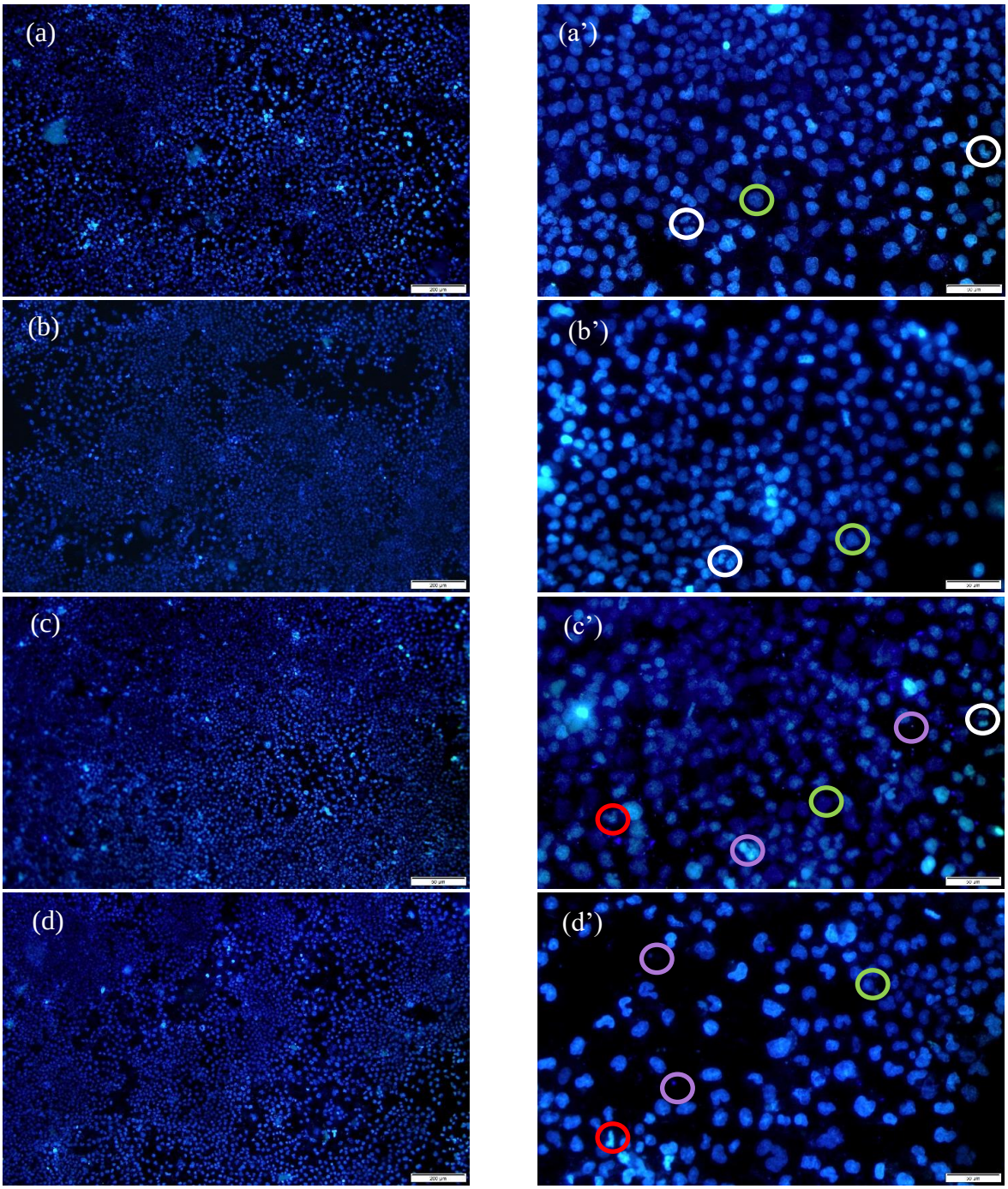
Micrografías de fluorescencia de con células HOS a 96 h de cultivo sobre recubrimientos (a, a') PCL/NTC 0.0 g/L, (b, b') PCL/NTC 0.5 g/L, (c, c') PCL/NTC 1.0 g/L y (d, d') PCL/NTC 1.5 g/L



Nota. Barra de escala 200 µm para (a, b, c y d) y 50 µm para (a', b', c' y d'). Círculos blancos: células mitóticas, círculos verdes: células vivas extendidas, círculos rojos: apoptosis temprana, círculos púrpuras: micronúcleos.

Figura 78.

Micrografías de fluorescencia de recubrimientos de células HOS a 96 h de cultivo sobre recubrimientos (a, a') PCL/FC/NTC 0.0 g/L, (b, b') PCL/FC/NTC 0.5 g/L, (c, c') PCL/FC/NTC 1.0 g/L y (d, d') PCL/FC/NTC 1.5 g/L



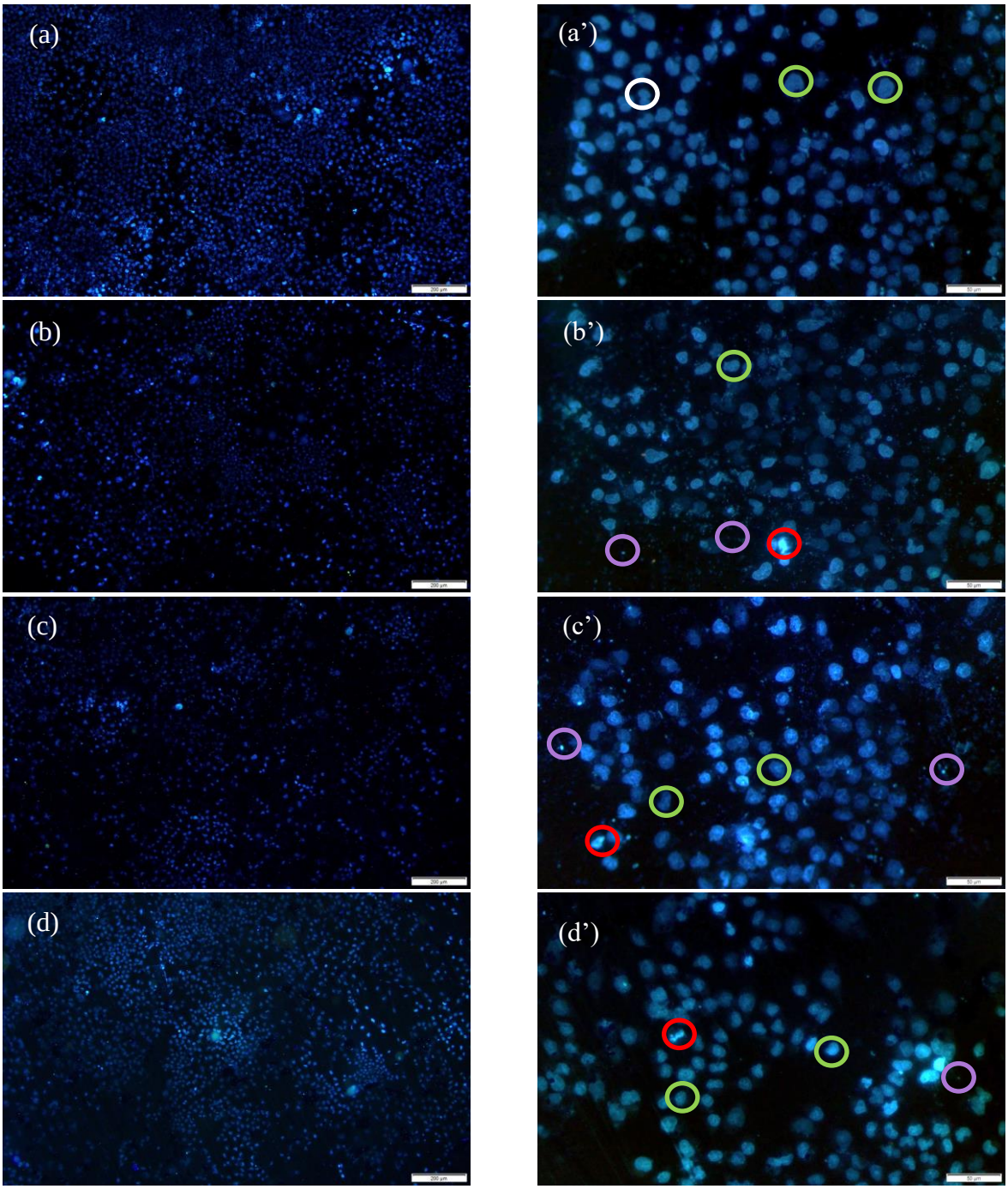
Nota. Barra de escala 200 µm para (a, b, c y d) y 50 µm para (a', b', c' y d'). Círculos blancos: células mitóticas, círculos verdes: células vivas extendidas, círculos rojos: apoptosis temprana, círculos púrpuras: micronúcleos.

A diferencia de los recubrimientos de policaprolactona, para los recubrimientos de COL, COL/NTC, COL/FC/NTC (Figura 79 y Figura 80 respectivamente), hay una mejora en cuanto al área ocupada por núcleos de células HOS marcadas con Hoechst a medida que al recubrimiento se le agregan los polvos de fosfato de calcio con y sin NTC. Se observan células en apoptosis para los recubrimientos COL/NTC, así como la presencia de micronúcleos. Para los recubrimientos COL/FC/NTC se observan núcleos de células normales adheridas a la superficie y micronúcleos. La mayor confluencia celular se observa para los recubrimientos COL/FC/NTC 0.5 y 1.0 g/L.

En todas las superficies se evidencian micronúcleos, indicando que la superficie inhibe el proceso de mitosis de algunas células, incluyendo el control (Figura 75 a'), no obstante, la mayoría de las células son capaces de replicarse y adherirse a la superficie de los recubrimientos, especialmente COL/FC/NTC. Estos resultados son consistentes con los presentados en el porcentaje de viabilidad celular y en la producción de fosfatasa alcalina, en donde, los mayores valores son para los recubrimientos que contienen colágeno, fosfatos de calcio y nanotubos de carbono.

Figura 79.

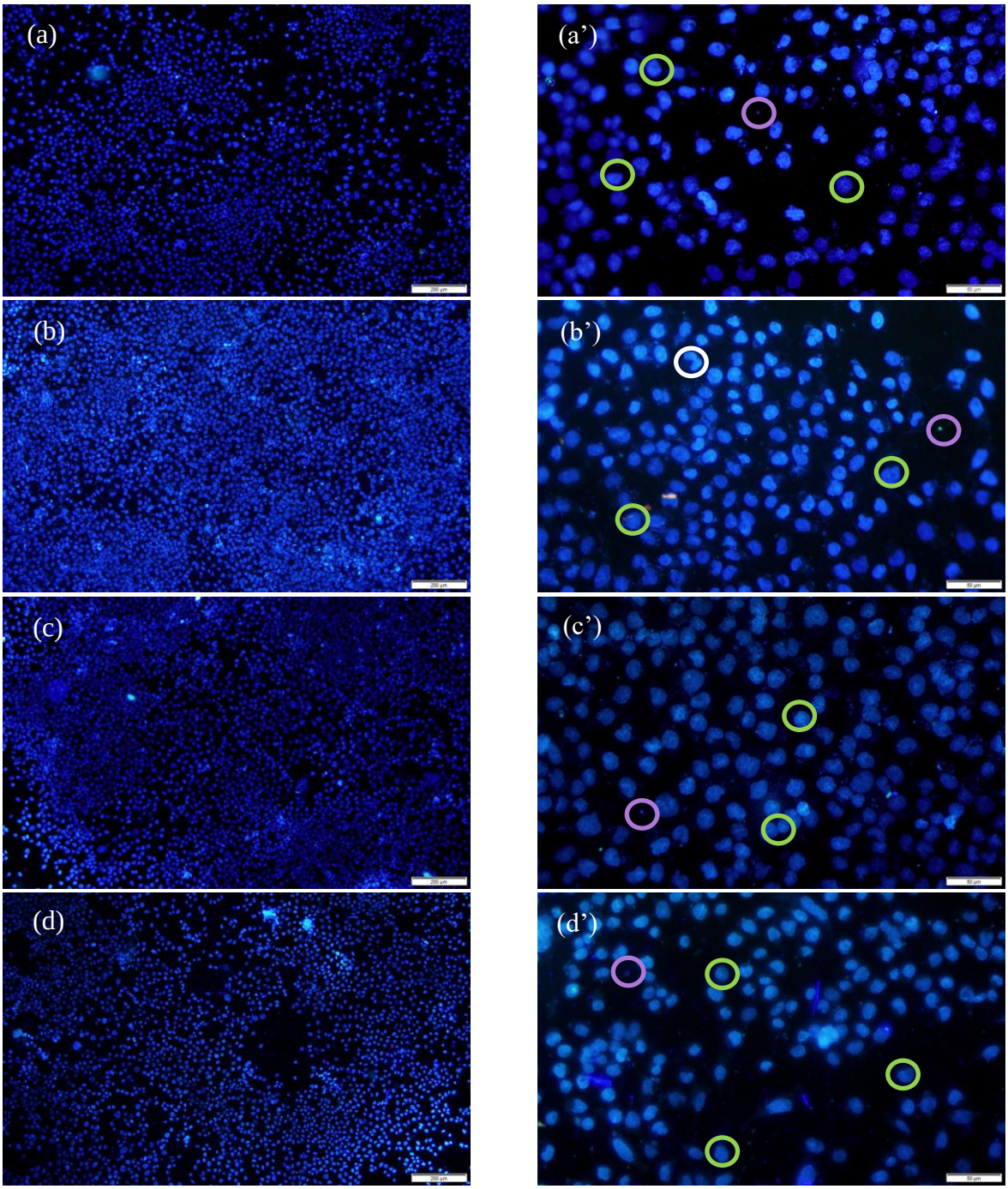
Micrografías de fluorescencia de células HOS a 96 h de cultivo sobre recubrimientos (a, a') COL/NTC 0.0 g/L, (b, b') COL/NTC 0.5 g/L, (c, c') COL/NTC 1.0 g/L y (d, d') COL/NTC 1.5 g/L



Nota. Barra de escala 200 µm para (a, b, c y d) y 50 µm para (a', b', c' y d'). Círculos blancos: células mitóticas, círculos verdes: células vivas extendidas, círculos rojos: apoptosis temprana, círculos púrpuras: micronúcleos.

Figura 80.

Micrografías de fluorescencia de células HOS a 96 h de cultivo sobre recubrimientos (a, a') COL/FC/NTC 0.0 g/L, (b, b') COL/FC/NTC 0.5 g/L, (c, c') COL/FC/NTC 1.0 g/L y (d, d') COL/FC/NTC 1.5 g/L.



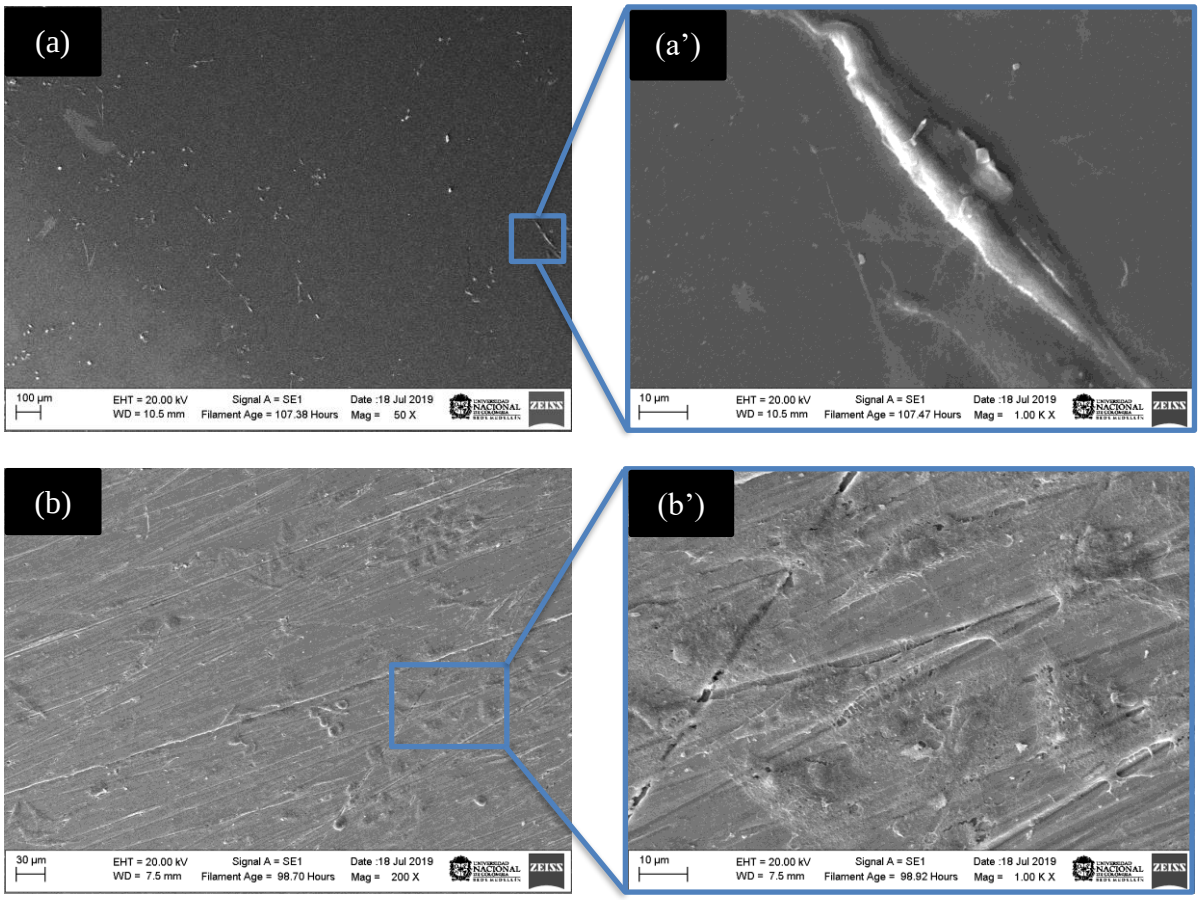
Nota. Barra de escala 200 µm para (a, b, c y d) y 50 µm para (a', b', c' y d'). Círculos blancos: células mitóticas, círculos verdes: células vivas extendidas, círculos rojos: apoptosis temprana, círculos púrpuras: micronúcleos.

De la Figura 81 a la Figura 86 se muestran las micrografías SEM de células osteoblásticas HOS a dos magnificaciones diferentes sobre los recubrimientos realizados. Como control, las células HOS fueron crecidas en láminas de vidrio para observar mejor su morfología. Como blanco, se usó una muestra de Ti6Al4V preparada mecánicamente con papel de carburo de silicio y decapada de acuerdo con la norma ASTM E407-07 (ASTM International, 2015a). Todas las superficies se esterilizaron con óxido de etileno por 4 h. En la Figura 81 (a, a') se muestra el control a 48 h de cultivo. Se evidencia que las células se están adhiriendo y apenas extendiendo en la superficie, pero no tienen todavía forma poligonal, forma típica de una célula HOS adherida. A las 48 h de cultivo, las células de control no están tan extendidas, pero es posible observar extensiones citoplasmáticas delgadas o filopodia (D. Liu et al., 2010). Además, muy poca área está cubierta por células. En el blanco (Figura 81 b, b'), se observan formas poligonales de células HOS adheridas a la superficie de la aleación de titanio, así como mayor área cubierta por las mismas. Se puede observar que existe contacto célula – célula formando una capa celular con proyecciones citoplasmáticas o filopodia (Takitoh et al., 2010; G. Wu et al., 2018). Para los recubrimientos FC/NTC 0.0 g/L y FC/NTC 0.5 g/L (Figura 82 a' y b') se aprecian células HOS más alargadas, en menor cantidad que para el blanco y el contacto célula – célula es menos evidente. Para FC/NTC 1.0 g/L (Figura 82 c, c'), se aprecian núcleos celulares sin extensiones citoplasmáticas, caso contrario para el recubrimiento FC/NTC 1.5 g/L (Figura 82 d, d'), en donde se muestran células bien adheridas, extendidas y aplanadas, con un contacto más cercano con la superficie, lo cual indica que ésta última superficie es más afín con células HOS, parámetro muy importante, especialmente en la fase inicial de la interacción célula – recubrimiento y la capacidad de adhesión celular en esta etapa, modificará la habilidad de las células en la proliferación y diferenciación (Ko et al., 2007).

La adherencia de las células osteoblásticas sobre biomateriales está mediada por proteínas de la matriz extracelular MEC (bronectina, vitronectina y colágeno tipo I), las cuales son sintetizadas por los mismos osteoblastos. Estas proteínas pueden enlazase a la superficie de los materiales por medio de enlaces puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas o fuerzas de Van der Waals. Seguido los osteoblastos se conectan a las proteínas por medio de integrinas. Aquí se inicia la etapa de extensión, proliferación, diferenciación y formación de hueso (Anselme, 2000; S. Chen et al., 2018; Ko et al., 2007). Por lo cual, si las superficies no mantienen ese contacto con las proteínas de la MEC, los osteoblastos no iniciarán su etapa de adhesión, y por consiguiente la proliferación y diferenciación se verán afectadas. Basado en el entendimiento del mecanismo de adhesión de células osteoblásticas en superficies de biomateriales, es preciso mencionar que no solo el cambio en rugosidad y química de la superficie modificará la adhesión celular, sino otras variables como el potencial de superficie y la piezorespuesta del material intervendrán en la adhesión de proteínas.

Figura 81.

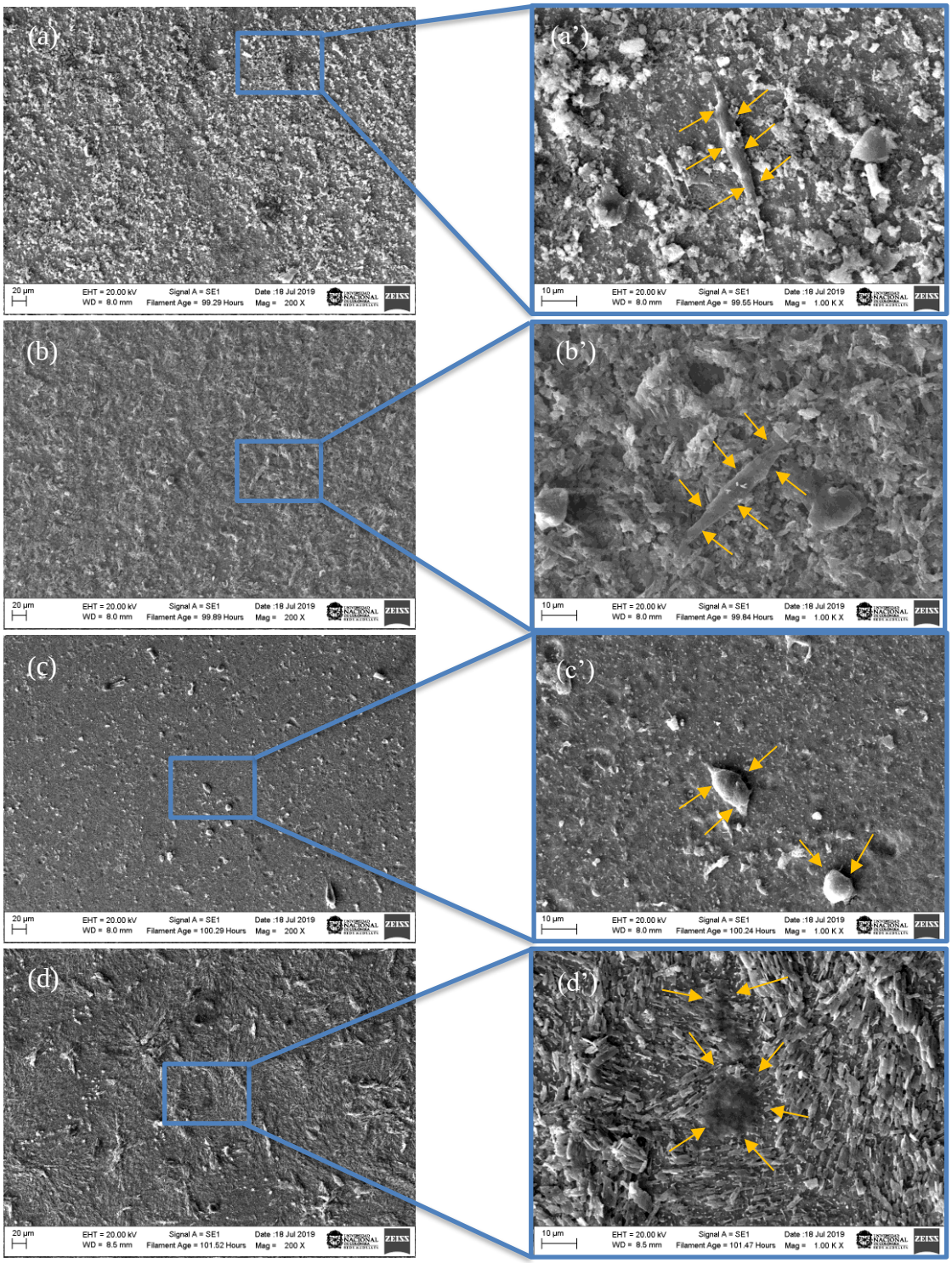
Micrografías SEM de células HOS a 48 h de cultivo sobre recubrimientos (a, a') control y (b, b') Ti6Al4V



Nota. La magnificación original fue de 50X para (a), 200X para (b) y 1000X para (a', b').

Figura 82.

Micrografías SEM de células HOS a 48 h de cultivo sobre recubrimientos (a, a') FC/NTC 0.0 g/L, (b, b') FC/NTC 0.5 g/L, (c, c') FC/NTC 1.0 g/L y (d, d') FC/NTC 1.5 g/L



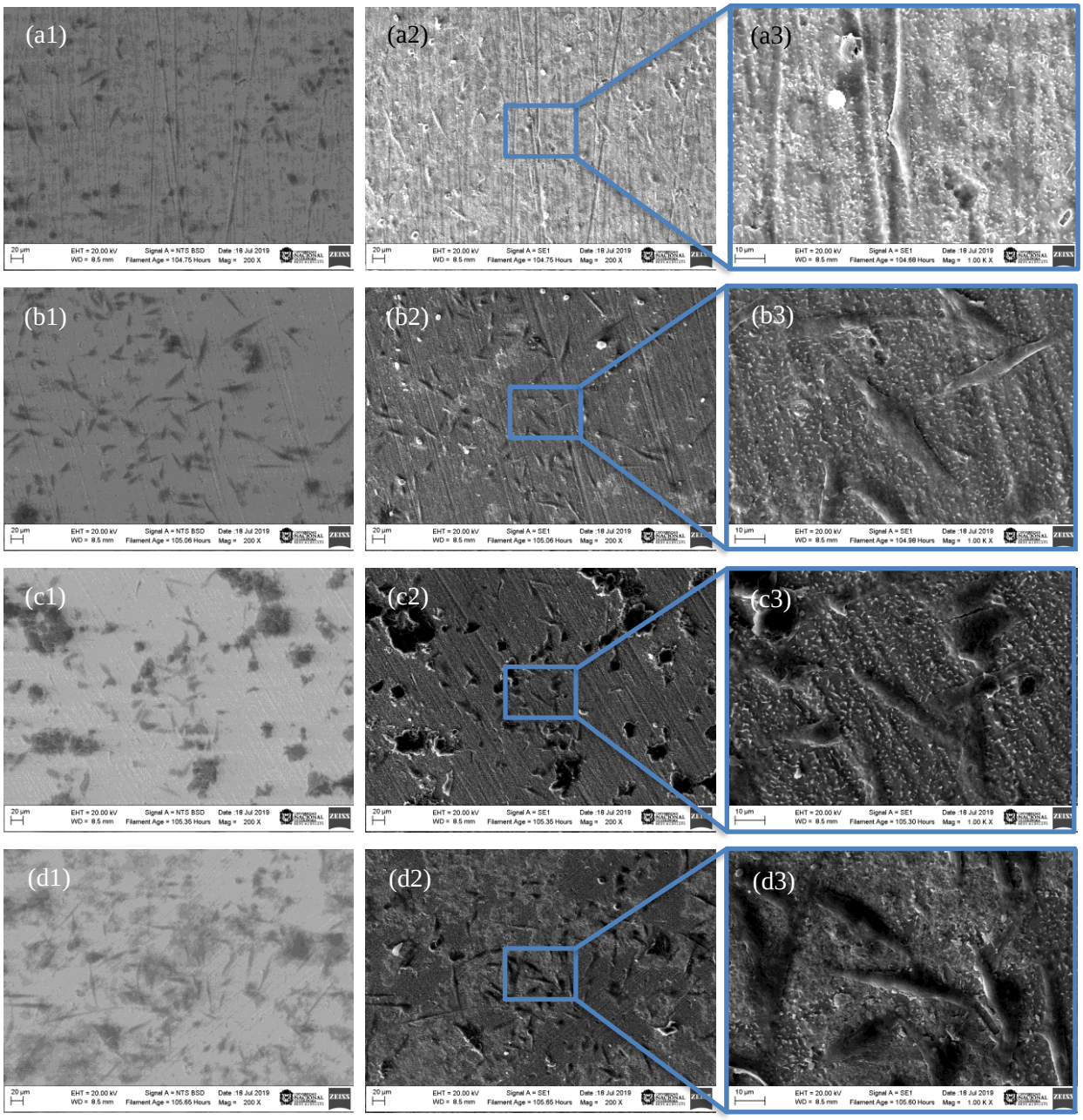
Nota. La magnificación original fue de 200X para (a, b, c y d) y 1000X para (a', b', c' y d').

Las micrografías SEM de los recubrimientos PCL/NTC y PCL/FC/NTC se aprecian en la Figura 83 y Figura 84. Es posible observar en todos los recubrimientos células HOS adheridas a las diferentes superficies con extensiones citoplasmáticas, algunas más que otras. Se observa una célula muy alargada para el recubrimiento con ausencia de NTC (Figura 83 a1, a2, a3), muy similar al control. A medida que aumenta la concentración de NTC tanto en la presencia de FC como en ausencia de este, se observa una superficie mayormente cubierta, especialmente para los recubrimientos que contienen mayor concentración de nanotubos de carbono y las células adquieren una morfología poligonal. La compatibilidad relativa de las superficies puede deberse a la presencia de NTC y a la naturaleza del fosfato de calcio en presencia de una concentración de NTC de 1.0 g/L y 1.5 g/L. En un estudio de Warowicka *et al*., se observó por SEM la adherencia de fibroblastos humanos gingivales sobre matrices alineadas de nanotubos de carbono multipared. Los autores demostraron que las células tienen un contacto muy cercano con los NTC mostrando filopodia, lo cual indica la baja toxicidad de estas matrices (Warowicka et al., 2016). Es interesante observar en la muestra PCL/NTC 1.5 g/L (Figura 83 d2, d3), una interacción cercana entre los NTC y las células HOS, mayor parte de la muestra contiene células HOS adheridas especialmente en los espacios ocupados por los NTC. Así mismo, Gonçalves *et al*., encontró que células osteoblásticas MG63 se adhieren muy bien sobre andamios 3D de PCL, HA y NTC (0 a 10% en peso). El número de células adheridas, con morfología típica elongada y extensiones citoplasmáticas, fue mayor para los andamios que contenían la mayor concentración de NTC a 6 días de cultivo celular (Gonçalves et al., 2016). Lo mismo se observa en la Figura 84 c1 y d1, las cuales son micrografías SEM tomadas con electrones retrodispersados y en las cuales se puede evidenciar a 200X y en contraste, el área ocupada por células HOS sobre los recubrimientos que contienen PCL, FC y NTC en concentraciones 1.0 y 1.5 g/L. Adicionalmente, se observa en los

recubrimientos PCL/NTC (Figura 83 b1, c1, d1) que las células de osteosarcoma HOS ocupan una considerable área y su morfología es muy similar, no obstante, se presentan células con mayor proyección citoplasmática para PCL/NTC 1.5 g/L. La presencia de nanotubos de carbono puede modificar la carga superficial, la cual mejora la adsorción de proteínas de la MEC y por consiguiente la adhesión celular (Gonçalves et al., 2016; Hirata et al., 2010).

Figura 83.

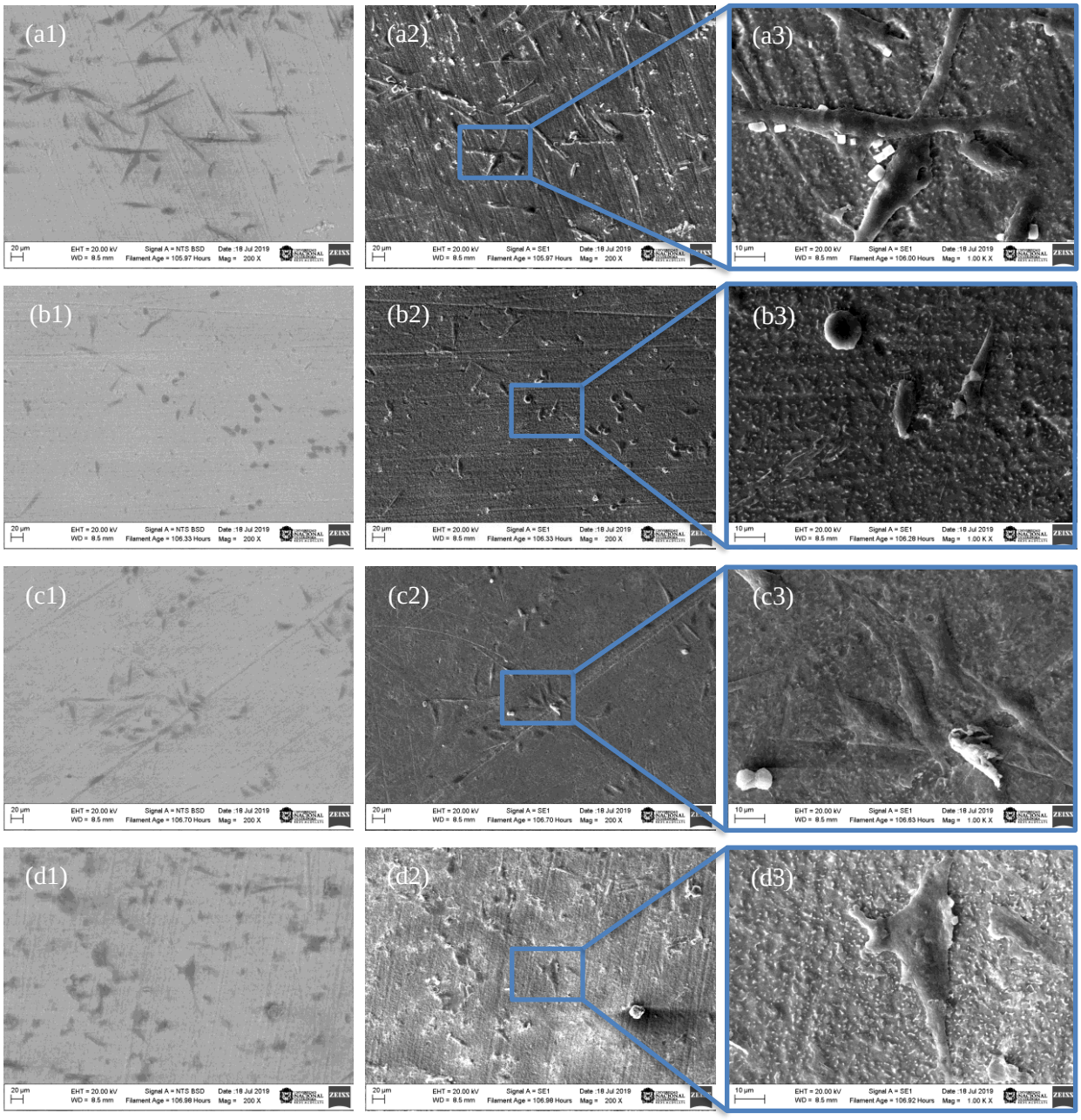
Micrografías SEM de células HOS a 48 h de cultivo sobre recubrimientos (a1, a2, a3) PCL/NTC 0.0 g/L, (b1, b2, b3) PCL/NTC 0.5 g/L, (c1, c2, c3) PCL/NTC 1.0 g/L y (d1, d2, d3) PCL/NTC 1.5 g/L



Nota. La magnificación original fue de 200X para (a1, a2, b1, b2, c1, c2 y d1, d2) y 2000X para (a3, b3, c3 y d3).

Figura 84.

Micrografías SEM de células HOS a 48 h de cultivo sobre recubrimientos (a1, a2, a3) PCL/FC/NTC 0.0 g/L, (b1, b2, b3) PCL/FC/NTC 0.5 g/L, (c1, c2, c3) PCL/FC/NTC 1.0 g/L y (d1, d2, d3) PCL/FC/NTC 1.5 g/L



Nota. La magnificación original fue de 200X para (a1, a2, b1, b2, c1, c2 y d1, d2) y 2000X para (a3, b3, c3 y d3).

La morfología de las células HOS sobre los recubrimientos COL, COL/NTC y COL/FC/NTC realizados por spin coating se muestra en la Figura 85 y Figura 86. A 24 h de cultivo, se evidencia

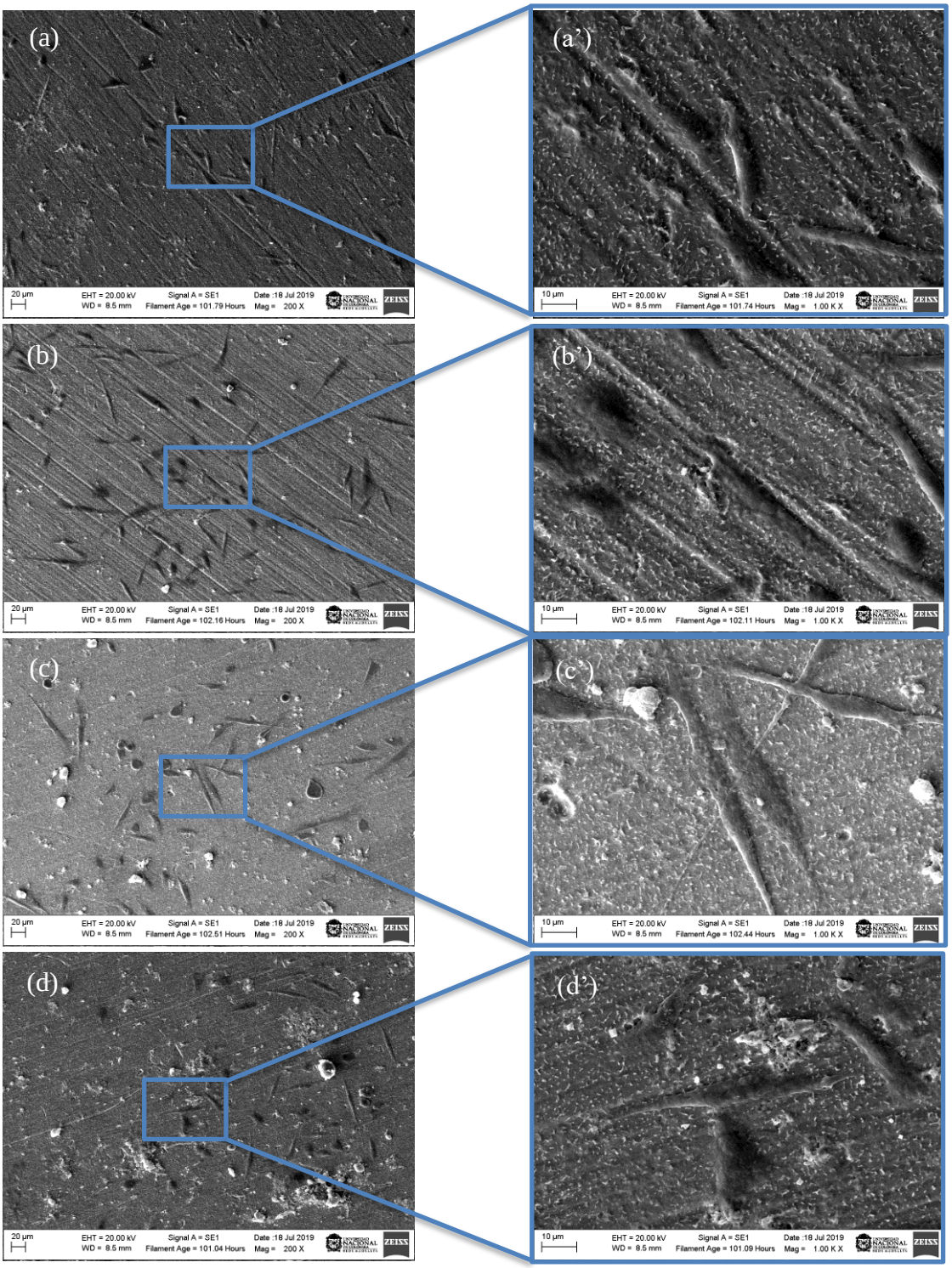
que, al agregar FC y NTC a la matriz de colágeno, aumenta el número de células adheridas. La morfología de las células es similar en todas las superficies, con formas poligonales, alargadas y con extensiones citoplasmáticas. Sin embargo, existen algunas diferencias como el caso del recubrimiento COL/NTC 1.0 g/L, en donde algunas células se encuentran extendidas y adheridas a la superficie, mientras que, otras no tienen extensiones citoplasmáticas. No obstante, es posible que, a 48 h de cultivo algunas células se adhieran más que otras. Otras superficies demuestran que se tiene mayor contacto entre la superficie y las células HOS como el caso COL/FC/NTC 1.5 g/L (Figura 86 d, d') y otras superficies no tanto como COL/FC/NTC 0.0 g/L (Figura 86 e, e'), probablemente porque la interacción célula-célula es ligeramente más fuerte que célula-sustrato (Takitoh et al., 2010). Estos resultados son consistentes con los observados en producción de fosfatasa alcalina y adhesión por fluorescencia, donde a 15 días de cultivo, las células de mayor producción de ALP fueron las correspondientes a las matrices de COL que contenían los polvos de FC/NTC, así mismo, las de mayor numero de núcleos celulares presentes en la muestra a 96 h de cultivo son para las mismas superficies COL/FC/NTC.

Otros estudios han confirmado la adherencia de células de ostesarcoma humano (Saos2) en andamios 3D de colágeno y nanotubos de carbono multipared, donde los mejores resultados se encuentran en los andamios de COL y NTC (Hirata et al., 2010). Park *et al*., reporta que células osteoblásticas MC3T3-E1, se adhieren a recubrimientos de colágeno y colágeno - nanotubos de carbono multipared sobre titanio, con mejores resultados para los recubrimientos con NTC con porcentaje máximo de 20 µg (Park et al., 2014). Mao *et al*., mostraron que condrocitos articulares bovinos son interiorizados sin afectación por solución de colágeno – nanotubos de carbono de pared simple y que los NTC permanecen estables sin ninguna afectación por 6 días. (Mao et al.,

2013). No obstante, los recubrimientos desarrollados con presencia de FC tienen mejores resultados que los de COL/NTC, lo que indica que, para las matrices de COL, además de NTC, agregar FC es beneficioso desde el punto de vista del comportamiento de adhesión de células HOS.

Figura 85.

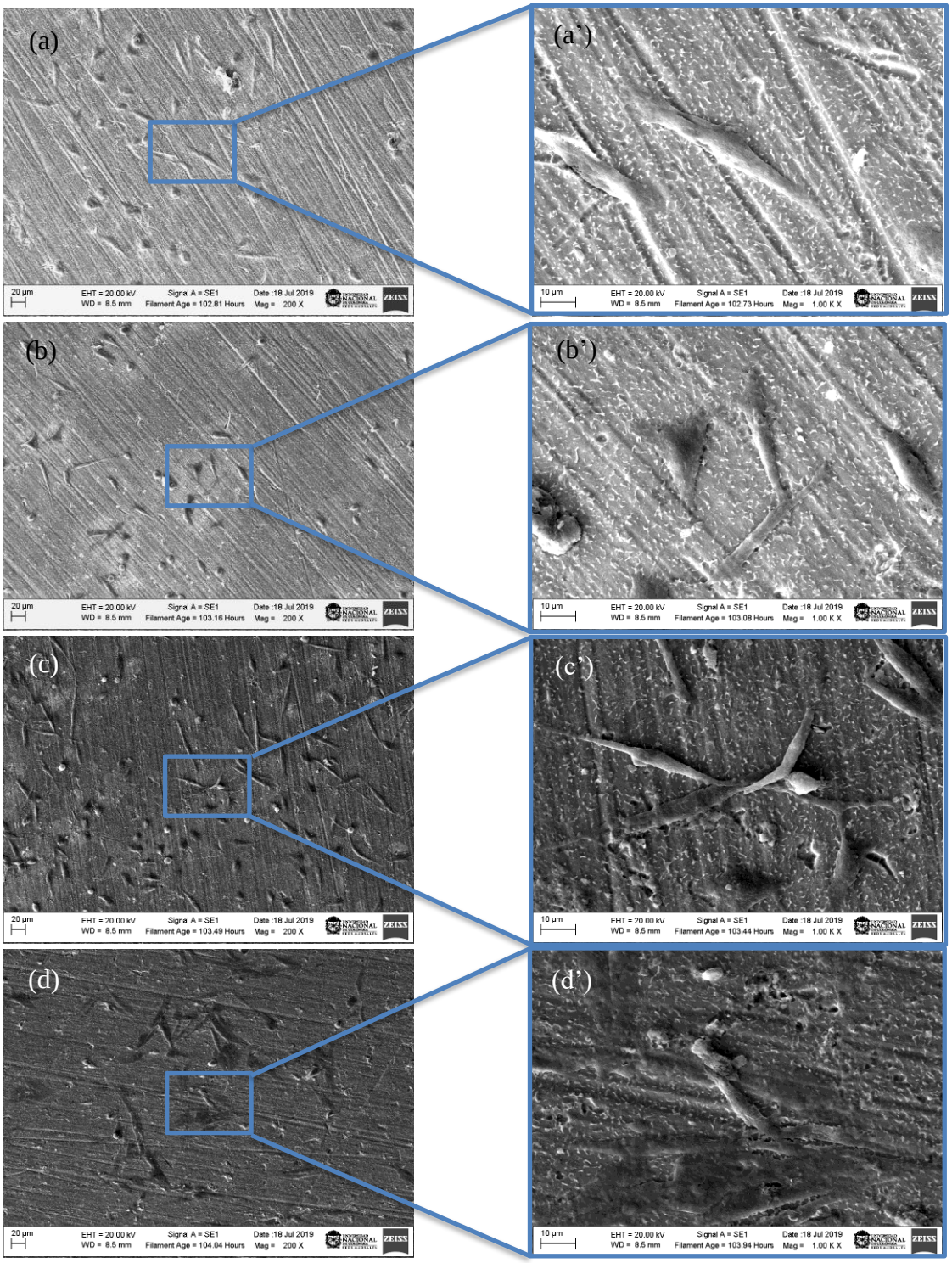
Micrografías SEM de células HOS a 48 h de cultivo sobre recubrimientos (a, a') COL/NTC 0.0 g/L, (b, b') COL/NTC 0.5 g/L, (c, c') COL/NTC 1.0 g/L y (d, d') COL/NTC 1.5 g/L



Nota. La magnificación original fue de 200X para (a, b, c, y d) y 2000X para (a', b', c' y d').

Figura 86.

Micrografías SEM de células HOS a 48 h de cultivo sobre recubrimientos (a, a') COL/FC/NTC 0.0 g/L, (b, b') COL/FC/NTC 0.5 g/L, (c, c') COL/FC/NTC 1.0 g/L y (d, d') COL/FC/NTC 1.5 g/L



Nota. La magnificación original fue de 200X para (a, b, c, y d) y 2000X para (a', b', c' y d').

Tal como se describió en el capítulo 6, cuando la superficie es polimérica (sin la presencia de FC), los nanotubos de carbono disminuyen el potencial de superficie local. Los resultados de adhesión celular se ven mejorados en la presencia de las mayores concentraciones de NTC, lo cual puede ser explicado desde el punto de vista del punto isoeléctrico (Ip) de las proteínas de adhesión. Superficies cargadas positivamente mejoran la adsorción de proteínas con Ip<5.5, mientras que superficies cargadas negativamente mejoran la adsorción de proteínas con Ip>5.5 (Metwally y Stachewicz, 2019). Proteínas como la fibronectina tienen un Ip de 5.6 – 6.1 y el colágeno tiene un Ip de 9. Esto explica por qué cuando se aumenta la concentración de nanotubos de carbono, las células se adhieren, aun cuando la viabilidad celular es disminuida. Cuando se agregan los nanotubos de carbono funcionalizados con FC, este potencial de superficie aumenta. No obstante, la célula es capaz de adherirse porque otros aspectos son mejorados como la química de la superficie, el aumento de la rugosidad y el aumento de la adherencia del recubrimiento al sustrato.

Estos resultados también son posibles relacionarlos con los resultados mostrados en el capítulo 7, en donde los recubrimientos polímero-NTC con altos valores de corriente anódica son PCL/NTC 0.0, 1.0 y 1.5 g/L y COL/NTC 1.0 y 1.5 g/L y con los valores más altos de permitividad relativa son: PCL/NTC 1.0 y 1.5 g/L y COL/NTC 1.0 y 1.5 g/L. También es posible observar células adheridas y extendidas a 48 horas de cultivo celular, cuando son superficies con valores de capacitancia alta, como PCL/NTC 1.0, PCL/NTC 1.5 g/L y COL/NTC 1.5 g/L.

Por otro lado, y haciendo un comparativo de los resultados observados en el blanco (Ti6Al4V sin recubrimiento), se encuentra una superficie con una viabilidad celular por encima del control (111.95±10.73), con un valor de ALP en el lisado celular muy cercano al control,

núcleos celulares normales y presencia de micronúcleos (al igual que el control), células adheridas con formas poligonales y extensiones citoplasmáticas. Estos resultados son los esperados en una superficie biocompatible y ampliamente estudiada como lo es la aleación de Ti6Al4V; sin embargo, los problemas observados de corrosión y baja recuperación de los pacientes en procedimientos complejos, hace que se busquen materiales que puedan tener un contacto directo con el hueso durante la fase de sanación y el proceso de osteointegración sea optimizado. Por lo cual, los recubrimientos pueden mejorar el proceso de adhesión celular, generar una barrera anticorrosiva, acelerar los procesos de interacción biológica y optimizar el enlace entre la aleación y el recubrimiento (Saraiva Matos y Pinheiro Pinto, 2019). Además, se conoce que el proceso de implantación normalmente induce a una reducción del pH, esta reducción inicia la disolución del implante metálico o la superficie de cualquier recubrimiento. Una liberación por ejemplo de iones Ca y P puede interactuar con las células y tejido circundante y reprecipitar en apatitas o compuestos con colágeno (Su et al., 2019).

Con respecto a lo anterior, varios recubrimientos propuestos mostraron una respuesta favorable frente al comportamiento de células HOS, por ejemplo, los recubrimientos PCL/NTC y PCL/FC/NTC (con contenido de NTC hasta 0.5 g/L), tuvieron porcentajes de viabilidad celular cercanas al control y al blanco, así mismo, superficies como COL/FC/NTC (con alto contenido de NTC). Los resultados de fosfatasa alcalina en los lisados celulares mostraron valores de ALP en las superficies cerámicas, poliméricas PCL/NTC, PCL/FC/NTC y COL/FC/NTC sin diferencia estadística frente al control y al blanco. Una mayor producción de fosfatasa alcalina se observó en recubrimientos de COL/FC/NTC (con alto contenido de NTC). Se observaron superficies con áreas

mayormente cubiertas de núcleos de células HOS como PCL/FC/NTC y COL/FC/NTC y células con formas poligonales y extensiones citoplasmáticas como PCL/NTC y COL/FC/NTC.

Evaluando los procesos de adhesión observados por EQCM frente a los resultados mostrados en este capítulo, se puede evidenciar que los recubrimientos que presentaron valores de ALP cercanos al control y al blanco, tienen valores bajos de relación $\Delta f_i/\Delta f_c$ (cambio de frecuencia de cada uno de los recubrimientos sobre el cambio de frecuencia en el cristal de cuarzo a 48 h), lo cual se relaciona con mayor presencia celular. Estos recubrimientos (FC/NTC 1.5 g/L, PCL/FC/NTC 1.0 g/L y COL/FC/NTC 0.0, 0.5, 1.0, 1.5 g/L) tienen buena confluencia celular representados por el área ocupada por núcleos de células HOS y células adheridas sobre la superficie con extensiones citoplasmáticas observadas por SEM a 48 horas de cultivo. Adicionalmente, recubrimientos como COL/FC/NTC, presentan un perfil sigmoidal en el cambio en la frecuencia medida por QCM en las primeras horas de contacto, lo cual se relaciona con los procesos de adhesión de células sobre las superficies.

8.4 Conclusiones

Se usaron satisfactoriamente las técnicas de MTT, ALP, fluorescencia y SEM para describir el comportamiento en proliferación, adherencia y diferenciación de células HOS sobre superficies de FC, FC/NTC, PCL, PCL/NTC, PCL/FC/NTC, COL, COL/NTC, COL/FC/NTC, Ti6Al4V y control. Se encontró que las células HOS son capaces de adherirse y proliferar en superficies con concentraciones de nanotubos de carbono multipared hasta de 1.5 g/L.

Los ensayos in vitro de bioactividad por fosfatasa alcalina con células HOS muestran que los valores de ALP se benefician con tiempos de evaluación más largos. Así mismo, analizando la cantidad de ALP en el sobrenadante, se concluye que la adición de nanotubos de carbono purificados y funcionalizados no desfavorece esta variable. Los recubrimientos correspondientes a FC/NTC 0.5 y 1.5 g/L; PCL/NTC 1.0 g/L; PCL/FC/NTC 1.0 g/L; COL/FC/NTC 1.0 y 1.5 g/L presentaron los valores más altos de ALP en los lisados celulares. El recubrimiento que presentó los valores más bajos de % de viabilidad celular es el recubrimiento de colágeno en ausencia de NTC.

Con los ensayos planteados, se logró evidenciar las etapas de adhesión, proliferación y diferenciación sobre los recubrimientos a diferentes tiempos de cultivo. A partir de estos resultados, se concluyó que los recubrimientos recientemente desarrollados compuestos por polímeros PCL y COL, fosfatos de calcio y nanotubos de carbono, pueden ser recubrimientos potencialmente futuros para su uso en la regeneración ósea. Dichas superficies son preferencialmente compuestas por PCL/FC/NTC 0.0 y 1.0 g/L; COL/FC/NTC 0.5, 1.0 y 1.5 g/L.

9 Conclusiones generales

Este trabajo de tesis doctoral intentó abarcar el estudio de la interacción célula de osteosarcoma humano – recubrimientos cerámicos y poliméricos propuestos, desde varios puntos de vista de composición química, propiedades eléctricas superficiales, rugosidad, adherencia de los recubrimientos, electroquímica, resonancia mecánica (QCM) y estudios de biocompatibilidad.

Se logró la funcionalización de nanotubos de carbono multipared con fosfatos de calcio de tamaño nanométrico tipo brushita, monetita e hidroxiapatita carbonatada preparados a partir de otolitos de Corvina de Rio. Los resultados de las técnicas FTIR, DRX, Espectroscopia Raman, SEM-EDS y TEM, demuestran que existe una interacción química entre los nanotubos de carbono con grupos carboxílicos y los precursores de los fosfatos de calcio, dicha interacción hace que éste cambie su relación Ca/P, cambiando su estructura a diferentes formas de fosfatos de calcio.

A partir de NTC purificados y los precursores de FC, se llevaron a cabo recubrimientos cerámicos tipo FC/NTC por electrodeposición, en donde se encontró una dependencia del tipo de fosfato de calcio y la concentración de NTC con el potencial de superficie, la piezorespuesta, $\Delta f_i/\Delta f_c$, la viabilidad y la adhesión celular. Así, los recubrimientos que contienen hidroxiapatita carbonatada no cristalina presentan un comportamiento de piezorespuesta con potenciales de superficie que tienden a valores más negativos con el aumento de la concentración de NTC, $\Delta f_i/\Delta f_c$ menores y mayores porcentajes en la viabilidad celular.

Las superficies poliméricas se ven afectadas por interacciones de tipo químico (enlaces entre polímero y NTC) y físico (distorsión de la cadena polimérica), por la influencia de los nanotubos de carbono. Para los recubrimientos PCL/NTC, el aumento en la concentración de NTC disminuye el potencial de superficie local y aumenta la rugosidad, mostrando una disminución en la viabilidad celular, la cual se ve también afectada por la adición de FC. Sin embargo, los recubrimientos no se consideraron citotóxicos tomando como valor el promedio de los datos obtenidos. Adicionalmente, se encontró la presencia de células adheridas y extendidas vistas por SEM y un área cubierta significativa vista por la técnica de fluorescencia, lo cual se relaciona con altos valores de capacitancia celular y permitividad relativa, como es el caso de los recubrimientos PCL/NTC 1.0 y 1.5 g/L.

Para el caso de los recubrimientos con colágeno, la adición de nanotubos de carbono resultó en una disminución del potencial de superficie local y aumento en la rugosidad, encontrando porcentajes de viabilidad celular levemente mejores que el recubrimiento de solo COL. No obstante, la producción de fosfatasa alcalina muestra valores bajos o nulos a 15 días en el lisado celular. La adición de NTC/FC a la matriz de colágeno, aumentó significativamente la viabilidad celular (69.89% a 101.97%), aumentó la producción de fosfatasa alcalina, inclusive a valores superiores al control y a la aleación de Ti6Al4V (recubrimientos de COL/FC/NTC 1.0 y 1.5 g/L), altos valores de pico de corriente anódica representados por la presencia de células adheridas con extensiones citoplasmáticas.

A partir de los análisis de las diferentes técnicas de caracterización, los recubrimientos desarrollados compuestos por policaprolactona, fosfatos de calcio y nanotubos de carbono;

colágeno, fosfatos de calcio y nanotubos de carbono mostraron buenos resultados en cuanto a la adherencia celular y estado morfológico de los núcleos de células HOS cultivadas a 48 y 96 h, especialmente para las superficies correspondientes a PCL/FC/NTC 0.0 y 1.0 g/L; COL/FC/NTC 1.0 y 1.5 g/L.

Los resultados de los procesos de adhesión por EQCM frente a los resultados encontrados en los ensayos biológicos para los recubrimientos de material compuesto (polímero-NTC/FC), revelan que el cambio en la frecuencia medida por QCM muestra un perfil sigmoidal en las primeras horas de contacto del recubrimiento, lo cual se relaciona con los cambios en la densidad y viscosidad del medio adyacente a la superficie como resultado de los procesos celulares que conllevan a una adhesión celular. Además, estos recubrimientos muestran picos de corriente anódica significativos, como es el caso de las superficies de PCL/FC/NTC 1.0 g/L, COL/FC/NTC 1.0 y 1.5 g/L, y valores de ALP en el lisado celular que están por encima del control y del blanco (Ti6Al4V).

Para dar respuesta a la hipótesis planteada al inicio de esta investigación, se encuentra que los recubrimientos poliméricos tipo COL con nanotubos de carbono en concentraciones de 1.0 g/L y 1.5 g/L funcionalizados con fosfatos de calcio, al ser sometidos a resonancia mecánica, generan gradientes de carga eléctrica expresada en términos de pico de corriente anódica, por la mayor presencia de células osteoblásticas. Estos gradientes de carga eléctrica se deben a que las superficies muestran una piezorespuesta, ya que, al ser expuestas a gradientes de potencial, exhiben valores significativos en la magnitud de la amplitud de deformación PFM y la polarización, por el ordenamiento de los iones hidroxilo a lo largo del eje c presentes en los fosfatos

de calcio y la presencia de dominios polares a una escala sub-micrométrica. Lo anterior se relaciona con superficies con una alta adhesión celular, en donde se observan células adheridas y extendidas sobre la superficie, al mismo tiempo que se observa una buena confluencia celular vista por fluorescencia y valores más altos que el control y Ti6Al4V de fosfatasa alcalina. Además de los recubrimientos poliméricos de colágeno, esta hipótesis se amplía a recubrimientos cerámicos que evidencian piezorespuesta, especialmente al recubrimiento FC/NTC 1.5 g/L, por lo cual se acepta la hipótesis para los recubrimientos ya mencionados, ya que los recubrimientos con PCL/FC/NTC no muestran piezorespuesta. Un recubrimiento desarrollado con colágeno, fosfato de calcio y NTC, es una superficie biomimética al hueso, por lo que este desarrollo puede ser un primer acercamiento a la explicación (mediante diferentes técnicas) de que la remodelación celular es atribuida a la piezoelectricidad, tal como se supone sucede en el hueso, y puede ser un material promisorio para la regeneración y el tratamiento de enfermedades óseas.

10 Recomendaciones

Se recomienda escoger un tipo de FC para que sea evaluado como material de refuerzo junto con los NTC en una matriz polimérica, ya que el cambio del FC dificulta el análisis conjunto de todas las variables de respuesta escogidas. Adicionalmente, se recomienda llevar a cabo estudios en modelo animal, para comprobar la eficacia del material visto como promisorio en esta tesis doctoral.

Realizar el ensayo de scratch test en húmedo o un ensayo de wear test en fluidos fisiológicos simulados, podría aportar en el estudio de la adherencia de recubrimientos como los desarrollados en esta tesis sobre material de osteosíntesis y degradación del recubrimiento en condiciones fisiológicas simuladas.

Se recomienda llevar a cabo ensayos de fosfatasa alcalina a mayores tiempos de evaluación, junto con los ensayos de adherencia a los mimos tiempos, de esta manera se puede correlacionar de mejor manera estas variables de estudio. Así mismo, evaluar los picos de corriente anódica y ensayos de proliferación celular a varios tiempos de cultivo, para monitorear el crecimiento celular con respecto al tiempo.

Por último, se recomienda llevar a cabo estudios con otras proteínas implicadas en la síntesis y mineralización de la matriz ósea como la osteocalcina. De esta manera, es posible

comparar los resultados con los de fosfatasa alcalina, evaluando las diferencias en las desviaciones estándar y la correlación con otros ensayos como MTT o fluorescencia.

11 Apropiación social del conocimiento

A partir de los resultados encontrados, esta investigación logró la publicación de 6 artículos: 1 en revista indexada por Colciencias año 2019 categoría A1, 1 en revista indexada por Colciencias año 2018 categoría B, 2 en revistas indexadas por Colciencias año 2017 en categoría B, y 2 en revistas indexadas por Colciencias en categoría A2 (2017), así mismo, se participó en 5 eventos científicos internacionales. Además, se contribuyó con la codirección de 1 tesis de maestría en ingeniería de materiales y 3 tesis de pregrado en ingeniería química.

Artículos publicados:

- Nerly D. Montañez, Heider Carreño, Patricia Escobar, Hugo A. Estupiñán, Darío Y. Peña, Saurav Goel y Jose L. Endrino. Functional evaluation and testing of a newly developed Teleost's Fish Otolith derived biocomposite coating for healthcare. *Scientific Reports*, Vol 10:258, 2020.

- Montañez N, Herrera P, López M, Carreño H, Estupiñan H, García S, Peña D. (2019). Electrochemical and bioactive evaluation of polycaprolactone/multi-walled carbon nanotubes coatings on titanium alloy. *Journal of Physics: Conference Series (JPCS)*, vol. 1386, 012010.

- Montañez N, Estupiñan H, García S, Peña D. (2018). Fabrication and characterization of novel biphasic calcium phosphate and nano-size hydroxyapatite derived from fish otoliths in different composition ratios. *Chemical Engineering Transactions*, vol. 64, 307-312.

- Sierra D, Montañez N, Blanco S, Peña D. (2018). Electrochemical Stability of HAP-CNT/Ti6Al4V in Cell Culture Media. *Chemical Engineering Transactions*, vol. 64, 163-168.

- Montañez N, Sandoval A, Estupiñan H, Peña D. (2017). A novel biphasic calcium phosphate derived from fish otoliths. *Journal of Physics: Conference Series (JPCS)*, vol. 935, 012037.

- Sierra D, Sandoval A, Montañez N, Peña D. (2017). The Effect of pulsed current electrodeposition parameters of calcium phosphates coating on Ti6Al4V ELI. *Journal of Physics: Conference Series (JPCS)*, vol. 935, 012032.

Participación en eventos científicos internacionales:

- X Congreso Internacional de Materiales – CIM 2019. Functionalization of multi-walled carbon nanotubes and their application in PCL-chitosan polymer coatings for biomedical applications: chemical and cytotoxic evaluation. Póster.

- XXVII International Materials Research Congress – IMRC 2019. Polycaprolactone - multiwalled carbon nanotubes coating for biomedical applications: physicochemical and biocompatibility evaluation. Póster.

- 5th International Meeting for Researchers in Materials y Plasma Technology – IMRMPT 2019. Electrochemical and bioactive evaluation of polycaprolactone/ multi-walled carbon nanotubes coatings on Ti6Al4V. Póster.

- 6th International conference on industrial biotechnology – IBIC 2018. Fabrication and characterization of novel biphasic calcium phosphate and nano-size hydroxyapatite derived from fish otoliths in different composition ratios. Póster.

- 4th International Meeting for Researchers in Materials y Plasma Technology – IMRMPT 2017. A novel biphasic calcium phosphate derived from fish otoliths. Póster, premio al mejor Póster.

Referencias Bibliográficas

Abarrategui, A. (2008). *Estudio del quitosano como biomaterial portador de rhBMP-2: Desarrollo y caracterización y aplicabilidad en regeneración del tejido óseo* [Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid]. http://euchis.org/wp-content/uploads/2014/12/T30747.pdf

Ahmed, R., Fekry, A., y Farghali, R. (2013). A study of calcium carbonate/multiwalled-carbon nanotubes/chitosan composite coatings on Ti–6Al–4V alloy for orthopedic implants. *Applied Surface Science*, *258P*, 309–316. https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.08.056

Ahn, A., y Grodzinsky, A. (2009). Relevance of collagen piezoelectricity to "Wolff's Law": A critical review. *Medical Engineering y Physics*, *43*, 733–741. https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2009.02.006

Albrektsson, T., y Johansson, C. (2001). Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal*, *10*, S96–S101. https://doi.org/10.1007/ s005860100282

Amador, C., Urban, M. W., Chen, S., y Greenleaf, J. F. (2012). Loss tangent and complex modulus estimated by acoustic radiation force creep and shear wave dispersion. *Physics in Medicine and Biology*, *57*(5), 1263–1282. https://doi.org/10.1088/0031-9155/57/5/1263

Anselme, K. (2000). Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, *21*(7), 667–681. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00242-2

Arul, S., y Vijayalakshmi, U. (2019). Synthesis and characterization of hydroxyapatite/carboxylic acid functionalized MWCNTS composites and its triple layer coatings for biomedical

applications. *Ceramics International*, *45*(1), 69–81. https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.09.135

Assali, M. (2012). *Nanotubos de carbono biocompatibles: Síntesis y aplicaciones en biomedicina* [Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla]. https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/46744/R_T.PROV19.pdf?sequence=-1yisAllowed=y

ASTM International. (2012). *Standard practice for direct contact cell culture evaluation of materials for medical devices*. https://doi.org/10.1520/F0813-07R12

ASTM International. (2013). *Standard Test Method for Evaluation of Scratch Resistance of Polymeric Coatings and Plastics Using an Instrumented Scratch Machine*. https://doi.org/10.1520/D7027-13

ASTM International. (2014). *Standard Specification forTitanium-6Aluminum-4Vanadium Alloy Castings for Surgical Implants (UNS R56406)*. https://doi.org/10.1520/F1108-14

ASTM International. (2015a). *Practice for Microetching Metals and Alloys*. ASTM International. https://doi.org/10.1520/E0407-07R15E01

ASTM International. (2015b). *Standard Test Method for Adhesion Strength and Mechanical Failure Modes of Ceramic Coatings by Quantitative Single Point Scratch Testing*. https://doi.org/10.1520/C1624-05R15

Barabás, R., Katona, G., Sára, E., Diudea, M., Szentes, A., Zsirka, B., Kovács, J., Kékedy-Nagy, L., y Czikó, M. (2015). Preparation and characterization of carboxyl functionalized multiwall carbon nanotubes–hydroxyapatite composites. *Ceramics International*, *41*, 12717–12727. https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.06.104

Becerra, J., Andrades, J., Santamaría, J., Cifuentes, M., y Guerardo, E. (2001). Regeneración ósea, terapia celular e ingeniería tisular. *Medicina Clínica*, *116*, 23–34. https://doi.org/10.1016/S0025-7753(01)71706-X

Behera, R. R., Das, A., Pamu, D., Pandey, L. M., y Sankar, M. R. (2018). Mechano-tribological properties and in vitro bioactivity of biphasic calcium phosphate coating on Ti-6Al-4V. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *86*, 143–157. https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.06.020

Bellido-González, V., Stefanopoulos, N., y Deguilhen, F. (1995). Friction monitored scratch adhesion testing. *Surface and Coatings Technology*, *74–75*, 884–889. https://doi.org/10.1016/0257-8972(95)08315-4

Bhattacharya, K., Torres, F., El-Sayed, R., y Fadeel, B. (2013). Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: Focus on pulmonary inflammation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *65*, 2087–2097. https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.05.012

Bhushan, B. (2010). *Springer Handbook of Nanotechnology* (3rd ed). Springer.

Blackwood, D. J., y Seah, K. H. W. (2009). Electrochemical cathodic deposition of hydroxyapatite: Improvements in adhesion and crystallinity. *Materials Science and Engineering: C*, *29*(4), 1233–1238. https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.10.015

Bori, G., Kelly, M., Kendoff, D., Klement, M., Llopis, R., Manning, L., Parvizi, J., Petrie, M., Sandiford, N., y Stockley, I. (2019). Hip and Knee Section, Treatment, Prosthesis Factors: Proceedings of International Consensus on othopedic Infections. *The Journal of Arthroplasty*, *34*, S453–S457. https://doi.org/10.1016/j.arth.2018.09.030

Bosco, R., Leeuwenburgh, S. C. G., Jansen, J. A., y van den Beucken, J. J. J. P. (2014). Configurational effects of collagen/ALP coatings on enzyme immobilization and surface mineralization. *Applied Surface Science*, *311*, 292–299. https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.05.057

Bouafsoun, A., Helali, S., Mebarek, S., Zeiller, C., Prigent, A.-F., Othmane, A., Kerkeni, A., Jaffrézic-Renault, N., y Ponsonnet, L. (2007). Electrical probing of endothelial cell behaviour on a fibronectin/polystyrene/thiol/gold electrode by Faradaic electrochemical impedance spectroscopy (EIS). *Bioelectrochemistry*, *70*(2), 401–407. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2006.05.012

Brubaker, M., Roshko, A., Blanchard, P., Harvey, T., y Sanford, N. (2016). Spontaneous growth of GaN nanowire nuclei on N- and Al-polar AlN: A piezoresponse force microscopy study of crystallographic polarity. *Materials Science in Semiconductor Processing*, *55*, 67–71. http://dx.doi.org/10.1016/j.mssp.2016.02.016

Bueno-Vera, J. A., Torres-Zapata, I., Sundaram, P. A., Diffoot-Carlo, N., y Vega-Olivencia, C. A. (2015). Electrochemical characterization of MC3T3-E1 cells cultured on γTiAl and Ti–6Al–4V alloys. *Bioelectrochemistry*, *106*, 316–327. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2015.06.012

Cai, Q., Mao, J., Li, X., y Yang, X. (2014). Macroporous and nanofibrous PLLA scaffolds reinforced with calcium phosphate-coated multiwalled carbon nanotubes. *Materials Letters*, *128*, 238–241. https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.04.164

Campana, S. (1999). Chemistry and composition of fish otoliths: Pathways, mechanisms and applications. *Marine Ecology Progress Series*, *188*, 263–297. https://doi.org/10.3354/meps188263

Casas Piedrafita, O. (1998). *Contribución a la obtención de imágenes paramétricas en tomografía de impedancia eléctrica para la caracterización de tejidos biológicos* [Tesis Doctoral, Universidad Polotécnica de Catalunya]. https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6344/02JOcp02de06.pdf?sequence=2yisAllowed=y

Catauro, M., Bollino, F., Renella, R., y Papale, F. (2015). Sol–gel synthesis of SiO2–CaO–P2O5 glasses: Influence of the heat treatment on their bioactivity and biocompatibility. *Ceramics International*, *41*, 12578–12588. http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.046

Cesur, S., y Kahraman, T. (2016). Printing properties of polycaprolactone composite films. *Progress in Organic Coatings*, *98*, 10–13. https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2016.04.022

Chakoli, A. N., He, J. M., y Huang, Y. D. (2018). Collagen/aminated MWCNTs nanocomposites for biomedical applications. *Materials Today Communications*, *15*, 128–133. https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2018.03.003

Chakraborty, R., Sengupta, S., Saha, P., Das, K., y Das, S. (2016). Synthesis of calcium hydrogen phosphate and hydroxyapatite coating on SS316 substrate through pulsed electrodeposition. *Materials Science and Engineering: C*, *69*, 875–883. https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.044

Chang, H.-I., y Wang, Y. (2011). Cell Responses to Surface and Architecture of Tissue Engineering Scaffolds. En D. Eberli (Ed.), *Regenerative Medicine and Tissue Engineering—Cells and Biomaterials*. InTech. https://doi.org/10.5772/21983

Charrier, D. S. H., Kemerink, M., Smalbrugge, B. E., de Vries, T., y Janssen, R. A. J. (2008). Real versus Measured Surface Potentials in Scanning Kelvin Probe Microscopy. *ACS Nano*, *2*(4), 622–626. https://doi.org/10.1021/nn700190t

Chatzipanagis, K., Baumann, C. G., Sandri, M., Sprio, S., Tampieri, A., y Kröger, R. (2016). In situ mechanical and molecular investigations of collagen/apatite biomimetic composites combining Raman spectroscopy and stress-strain analysis. *Acta Biomaterialia*, *46*, 278–285. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.09.028

Chen, F.-P., Hsu, T., Hu, C.-H., Wang, W.-D., Wang, K.-C., y Teng, L.-F. (2006). Expression of Estrogen Receptors Alfa and Beta mRNA and Alkaline Phosphatase in the Differentiation of Osteoblasts from Elderly Postmenopausal Women: Comparison with Osteoblasts from Osteosarcoma Cell Lines. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, *45*(4), 307–312. https://doi.org/10.1016/S1028-4559(09)60248-5

Chen, J. Y., Penn, L. S., y Xi, J. (2018). Quartz crystal microbalance: Sensing cell-substrate adhesion and beyond. *Biosensors and Bioelectronics*, *99*, 593–602. https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.032

Chen, J.-H., Liu, C., You, L., y Simmons, C. (2010). Boning up on Wolff's Law: Mechanical regulation of the cells that make and maintain bone. *Journal of Biomechanics*, *43*, 108–118. https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.09.016

Chen, S., Guo, Y., Liu, R., Wu, S., Fang, J., Huang, B., Li, Z., Chen, Z., y Chen, Z. (2018). Tuning surface properties of bone biomaterials to manipulate osteoblastic cell adhesion and the signaling pathways for the enhancement of early osseointegration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *164*, 58–69. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.01.022

Chetibi, L., Achour, A., Peszke, J., Hamana, D., y Achour, S. (2014). Hydroxyapatite growth on multiwall carbon nanotubes grown on titanium fibers from a titanium sheet. *Journal of Material Science*, *49*, 621–632. https://doi.org/10.1007/s10853-013-7742-6

Chew, K., Low, K., Hussein, S., McPhail, D., Gerhardt, L., Roether, J., y Boccaccini, A. (2011). Reinforcement of calcium phosphate cement with multi-walled carbon nanotubes and bovine serum albumin for injectable bone substitute applications. *Journal of the mehanical behaviour of biomedical materials*, *4*, 331–339. https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2010.10.013

Chiatti, F., Corno, M., y Ugliengo, P. (2012). Stability of the Dipolar (001) Surface of Hydroxyapatite. *The Journal of Physical Chemistry C*, *116*(10), 6108–6114. https://doi.org/10.1021/jp212595d

Ciuchi, I., Curecheriu, L., Ciomaga, C., Sandu, A., y Mitoseriu, L. (2010). Impedance Spectroscopy characterization of bone tissues. *Journal of Advanced Research in Physics*, *1*(1), 1–5. http://stoner.phys.uaic.ro/jarp/index.php?journal=jarpypage=articleyop=viewypath%5B%5D=8

Clavijo, D., Alfonso, J., Cardozo, C., Casadiego, C., y Perea, A. (2010). Hacia una nueva generación de biomateriales. Primera parte. *Revista Colombiana de Ortopedia y Traumatología*, *24*, 168–177.

Costa, P. M., Bourgognon, M., Wang, J. T.-W., y Al-Jamal, K. T. (2016). Functionalized carbon nanotubes: From intracellular uptake and cell-related toxicity to systemic brain delivery. *Journal of Controlled Release*, 20.

da Cunha Rodrigues, G., Zelenovskiy, P., Romanyuk, K., Luchkin, S., Kopelevich, Y., y Kholkin, A. (2015). Strong piezoelectricity in single-layer graphene deposited on SiO2 grating substrates. *Nature Communications*, *6*(1), 7572. https://doi.org/10.1038/ncomms8572

Dalmônico, G. M. L., Silva, D. F., Franczak, P. F., Camargo, N. H. A., y Rodríguez, M. A. (2015). Elaboration biphasic calcium phosphate nanostructured powders. *Boletín de La Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, *54*(1), 37–43. https://doi.org/10.1016/j.bsecv.2015.02.006

Datsyuk, V., Kalyva, M., Papagelis, K., Parthenios, J., Tasis, D., Siokou, A., Kallitsis, I., y Galiotis, C. (2008). Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes. *Carbon*, *46*, 833–840. https://doi.org/10.1016/j.carbon.2008.02.012

Dean, D., Ramanathan, D., Mahado, D., y Sundararajan, R. (2008). Electrical impedance spectroscopy study of biological tissues. *Journal of Electrostatics*, *66*, 165–177. https://doi.org/10.1016/j.elstat.2007.11.005

Degens, E., Deuser, W., y Hardrich, R. (1969). Molecular structure and composition of fish otoliths. *Marine Biology*, *2*, 105–113. https://doi.org/10.1007/BF00347005

Denning, D, Guyonnet, J., y Rodriguez, B. (2016). Applications of piezoresponse force microscopy in materials research: From inorganic ferroelectrics to biopiezoelectrics and

beyond. *International Materials Reviews*, *61*(1), 46–70. http://dx.doi.org/10.1179/1743280415Y.0000000013

Denning, Denise, Kilpatrick, J. I., Fukada, E., Zhang, N., Habelitz, S., Fertala, A., Gilchrist, M. D., Zhang, Y., Tofail, S. A. M., y Rodriguez, B. J. (2017). Piezoelectric Tensor of Collagen Fibrils Determined at the Nanoscale. *ACS Biomaterials Science y Engineering*, *3*(6), 929–935. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b00183

Departamento Administrativo Nacional de Estadística DANE. (2018). *Proyecciones de población*. Recuperado 19 de enero de 2019, de Censo Nacional de Población y Vivienda 2018 - Colombia. https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/demografia-y-poblacion/proyecciones-de-poblacion

Ding, C., Du, J., Cao, Y., Yue, C., y Cheng, B. (2019). Effects of the aspect ratio of multi-walled carbon nanotubes on the structure and properties of regenerated collagen fibers. *International Journal of Biological Macromolecules*, *126*, 595–602. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.144

Duarte, R. M., Correia-Pinto, J., Reis, R. L., y Duarte, A. R. C. (2018). Subcritical carbon dioxide foaming of polycaprolactone for bone tissue regeneration. *The Journal of Supercritical Fluids*, *140*, 1–10. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.05.019

Duarte, V., y Cerrolaza, M. (2013). Modelado piezoeléctrico del hueso por el método de los elementos de contorno. *Revista de la Facultad de Ingeniería Universidad Central de Venezuela*, *28*, 131–142. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttextypid=S0798-40652013000400014ylng=esytlng=es.

Ebrahimi, M., y Botelho, M. (2017). Biphasic calcium phosphates (BCP) of hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP) as bone substitutes: Importance of physicochemical characterizations in biomaterials studies. *Data in Brief*, *10*, 93–97. http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2016.11.080

Ebrahimi, M., Botelho, M., y Dorozhkin, S. (2017). Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP): Concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research. *Materials Science and Engineering C*, *71*, 1293–1312. http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.039

Echavarría, A. (2003). Una perspectiva de los biomateriales vista desde un diseño específico: La prótesis total de cadera. *Revista Facultad de Ingeniería*, *30*, 95–108. http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/ingenieria/article/view/327317

Eftekhari, A. (2008). *Nanostructured Materials in Electrochemistry*. Wiley-VCH.

El-Said, W. A., Yea, C.-H., Kim, H., Oh, B.-K., y Choi, J.-W. (2009). Cell-based chip for the detection of anticancer effect on HeLa cells using cyclic voltammetry. *Biosensors and Bioelectronics*, *24*(5), 1259–1265. https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.07.037

Enderle, J., Blanchard, S., y Bronzino, J. (2005). *Introduction to biomedical engineering* (Second Edition). Elsevier Academic Press.

Ergun, C., Evis, Z., Webster, T., y Sahin, F. (2011). Synthesis and microstructural characterization of nano-size calcium phosphates with different stoichiometry. *Ceramics International*, *37*, 971–977. https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2010.11.004

Etchenique, R. (1998). *Aplicaciones analíticas de la balanza de cristal de cuarzo: Microgravimetría y microrreología* [Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires]. http://www.neuro.qi.fcen.uba.ar/tesisrober.pdf

Farnoush, H., Aghazadeh Mohandesi, J., y Çimenoğlu, H. (2015). Micro-scratch and corrosion behavior of functionally graded HA-TiO2 nanostructured composite coatings fabricated by electrophoretic deposition. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *46*, 31–40. https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.02.021

Fathi, M. H., Hanifi, A., y Mortazavi, V. (2008). Preparation and bioactivity evaluation of bone-like hydroxyapatite nanopowder. *Journal of Materials Processing Technology*, *202*, 536–542. https://doi.org/10.1016/j.jmatprotec.2007.10.004

Fernandes, L. L., Resende, C. X., Tavares, D. S., Soares, G. A., Castro, L. O., y Granjeiro, J. M. (2011). Cytocompatibility of chitosan and collagen-chitosan scaffolds for tissue engineering. *Polímeros*, *21*(1), 1–6. https://doi.org/10.1590/S0104-14282011005000008

Fohlerová, Z., Skládal, P., y Turánek, J. (2007). Adhesion of eukaryotic cell lines on the gold surface modified with extracellular matrix proteins monitored by the piezoelectric sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, *22*(9–10), 1896–1901. https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.08.015

Fornell, J., Feng, Y. P., Pellicer, E., Suriñach, S., Baró, M. D., y Sort, J. (2017). Mechanical behaviour of brushite and hydroxyapatite coatings electrodeposited on newly developed FeMnSiPd alloys. *Journal of Alloys and Compounds*, *729*, 231–239. https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2017.09.187

France, C. A. M., Thomas, D. B., Doney, C. R., y Madden, O. (2014). FT-Raman spectroscopy as a method for screening collagen diagenesis in bone. *Journal of Archaeological Science*, *42*, 346–355. https://doi.org/10.1016/j.jas.2013.11.020

Francis, A. P., y Devasena, T. (2018). Toxicity of carbon nanotubes: A review. *Toxicology and Industrial Health*, *34*(3), 200–210. https://doi.org/10.1177/0748233717747472

Fredriksson, C., Khilman, S., Kasemo, B., y Steel, D. M. (1998). In vitro real-time characterization of cell attachment and spreading. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *9*(12), 785–788. https://doi.org/10.1023/A:1008927624337

Fukada, E. (1968). Piezoelectricity in polymers and biological materials. *Ultrasonics*, *6*, 229–234. https://doi.org/10.1016/0041-624X(68)90132-7

Fukada, E. (1995). Piezoelectricity of biopolymers. *Biorheology*, *6*, 593–609. https://doi.org/10.1016/0006-355X(95)00039-C

Fukada, Eiichi, y Yasuda, I. (1957). On the piezoelectric effect of bone. *Journal of the physical society of Japan*, *12*, 1158–1162. https://doi.org/10.1143/JPSJ.12.1158

Gao, C., Yang, B., Hu, H., Liu, J., Shuai, C., y Peng, S. (2013). Enhanced sintering ability of biphasic calcium phosphate by polymers usedfor bone scaffold fabrication. *Materials Science and Engineering C*, *33*, 3802–3810. http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2013.05.017

García-Alonso, M. C., Saldaña, L., Alonso, C., Barranco, V., Muñoz-Morris, M. A., y Escudero, M. L. (2009). In situ cell culture monitoring on a Ti–6Al–4V surface by electrochemical techniques. *Acta Biomaterialia*, *5*, 1374–1384. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.11.020

Garrido, C., Lobo, S., Turíbio, F., y LeGeros, R. (2011). Biphasic Calcium Phosphate Bioceramics for Orthopaedic Reconstructions: Clinical Outcomes. *International Journal of Biomaterials, 2011*, 1–9. https://doi.org/10.1155/2011/129727

Gauldie, R. (1993). Polymorphic Crystalline Structure of Fish Otoliths. *Journal of Morphology*, *218*, 1–28. https://doi.org/10.1002/jmor.1052180102

Gelves Jerez, M. (2012). *Análisis microgravimétrico y bioquímico de la compatibilidad de osteoblastos sobre materiales poliméricos de PLGA funcionalizados* [Tesis de Maestría]. Universidad Industrial de Santander.

Gholami, F., Zein, S. H. S., Gerhardt, L.-C., Low, K. L., Tan, S. H., McPhail, D. S., Grover, L. M., y Boccaccini, A. R. (2013). Cytocompatibility, bioactivity and mechanical strength of calcium phosphate cement reinforced with multi-walled carbon nanotubes and bovine serum albumin. *Ceramics International*, *39*(5), 4975–4983. https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.11.094

Gill, F., Ginebra, M., y Planell, J. (1999). Metales y aleaciones para la substitución de tejidos duros. *Biomecánica*, *7*, 73–78. https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/5451/article10.pdf;sequence=1

Gindl-Altmutter, W., Köhnke, J., Unterweger, C., Gierlinger, N., Keckes, J., Zalesak, J., y Rojas, O. (2019). Lignin-based multiwall carbon nanotubes. *Composites Part A*, *121*, 175–179. https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2019.03.026

Gittings, J., Bowen, C., Dent, A., Turner, I., y Baxt, F. (2009). Electrical characterization of hydroxyapatite-based biocerámicos. *Acta Biomaterialia*, *5*, 743–754. https://doi.org/doi:10.1016/j.actbio.2008.08.012

Giuseppa, V., Bertuccio, M. P., Iannazzo, D., Piperno, A., Pistone, A., y Di Pïetro, A. (2015). Toxicological assessment of multi-walled carbon nanotubes on A549 human lung epithelial cells. *Toxicology in Vitro*, *29*, 352–362. http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2014.12.004

Gonçalves, E. M., Oliveira, F. J., Silva, R. F., Neto, M. A., Fernandes, M. H., Amaral, M., Vallet-Regí, M., y Vila, M. (2016). Three-dimensional printed PCL-hydroxyapatite scaffolds filled with CNTs for bone cell growth stimulation. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, *104*(6), 1210–1219. https://doi.org/10.1002/jbm.b.33432

Gough, J. E., y Downes, S. (2001). Osteoblast cell death on methacrylate polymers involves apoptosis. *Journal of Biomedical Materials Research*, *57*(4), 497–505. https://doi.org/10.1002/1097-4636(20011215)57:4<497::AID-JBM1195>3.0.CO;2-U

Grandfield, K., Sun, F., FitzPatrick, M., Cheong, M., y Zhitomirsky, I. (2009). Electrophoretic deposition of polymer-carbon nanotube–hydroxyapatite composites. *Surface and Coatings Technology*, *203*(10–11), 1481–1487. https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2008.11.022

Grimnes, S., y Grottem, O. (2008). *Bioimpedance and bioelectricity basics* (Second Edition). Elsevier.

Grønlien, K. G., Pedersen, M. E., Sanden, K. W., Høst, V., Karlsen, J., y Tønnesen, H. H. (2019). Collagen from Turkey (Meleagris gallopavo) tendon: A promising sustainable biomaterial for pharmaceutical use. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, *13*, 100166. https://doi.org/10.1016/j.scp.2019.100166

Gryte, D. M., Ward, M. D., y Hu, W. S. (1993). Real-time measurement of anchorage-dependent cell adhesion using a quartz crystal microbalance. *Biotechnology Progress*, *9*(1), 105–108. https://doi.org/10.1021/bp00019a016

Gu, S., y He, J. (2012). Daphnoretin Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Osteosarcoma (HOS) Cells. *Molecules*, *17*(1), 598–612. https://doi.org/10.3390/molecules17010598

H Schwan. (1994). Electrical properties of tissues and cell suspensions: Mechanism and models. *Engineering in Medicine and Biology Society*, *1*, 70–71. https://doi.org/10.1109/IEMBS.1994.412155

Habraken, W., Habibovic, P., Epple, M., y Bohner, M. (2016). Calcium phosphates in biomedical applications: Materials for the future? *Materials Today*, *19*(2), 69–87. http://dx.doi.org/10.1016/ j.mattod.2015.10.008

Halperin, C., Mutchnik, S., Agronin, A., Urenski, P., Salai, M., y Rosenman, G. (2004). Piezoelectric effect in human bones studied in nanometer scale. *Nano Letters*, *4*(7), 1253–1253. https://doi.org/10.1021/nl049453i

Hao, L., y Lawrence, J. (2005). *Laser surface treatment of bio-implant material*. John Wiley y Sons Ltd.

Harding, S. M., Benci, J. L., Irianto, J., Discher, D. E., Minn, A. J., y Greenberg, R. A. (2017). Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei. *Nature*, *548*(7668), 466–470. https://doi.org/10.1038/nature23470

Harrison, B., y Atala, A. (2007). Carbon nanotube applications for tissue engineering. *Biomaterials*, *28*, 344–353. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.07.044

Harutyunyan, A., Pradhan, B., Sumanasekera, G., Korobko, E., y Kuznetsov, A. (2002). Carbon nanotubes for medical applications. *European Cells and Materials*, *3*, 84–87. https://pdfs.semanticscholar.org/4c14/87a871cce8e4c288a4fd1afb69683f98b576.pdf

Hatem, A., Lin, J., Wei, R., Torres, R. D., Laurindo, C., y Soares, P. (2017). Tribocorrosion behavior of DLC-coated Ti-6Al-4V alloy deposited by PIID and PEMS + PIID techniques for biomedical applications. *Surface and Coatings Technology*, *332*, 223–232. https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2017.07.004

Heileman, K., Daoud, J., y Tabrizian, M. (2013). Dielectric spectroscopy as a viable biosensing tool for cell and tissue characterization and analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, *49*, 348–359. https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.04.017

Hernández-Gil, I. F.-T., Gracia, M. A. A., y Jerez, B. (2006). Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, *11*(1), 47–51. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttextypid=S1698-69462006000100011ylng=esytlng=es

Hin, T. S. (2004). *Engineering Materials for Biomedical Applications*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.

Hirata, E., Uo, M., Nodasaka, Y., Takita, H., Ushijima, N., Akasaka, T., Watari, F., y Yokoyama, A. (2010). 3D collagen scaffolds coated with multiwalled carbon nanotubes: Initial cell attachment to internal surface. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, *93B*(2), 544–550. https://doi.org/10.1002/jbm.b.31613

Hirata, E., Uo, M., Takita, H., Akasaka, T., Watari, F., y Yokoyama, A. (2009). Development of a 3D collagen scaffold coated with multiwalled carbon nanotubes. *Journal of Biomedical*

Materials Research Part B: Applied Biomaterials, *90B*(2), 629–634. https://doi.org/10.1002/jbm.b.31327

Hovde, K., Kohler, A., y Afseth, N. (2016). Model-based pre-processing in Raman spectroscopy of biological samples. *Journal of Raman Spectroscopy*, *47*, 643–650. https://doi.org/10.1002/jrs.4886

Hu, R., Lin, C., Shi, H., y Wang, H. (2009). Electrochemical deposition mechanism of calcium phosphate coating in dilute Ca–P electrolyte system. *Materials Chemistry and Physics*, *115*(2–3), 718–723. https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2009.02.022

Hudecki, A., Łyko-Morawska, D., Likus, W., Skonieczna, M., Markowski, J., Wilk, R., Kolano-Burian, A., Maziarz, W., Adamska, J., y Łos, M. J. (2019). Composite Nanofibers Containing Multiwall Carbon Nanotubes as Biodegradable Membranes in Reconstructive Medicine. *Nanomaterials*, *9*(1), 63. https://doi.org/10.3390/nano9010063

International Organization for Standardization. (2009). *Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. http://nhiso.com/wp-content/uploads/2018/05/ISO-10993-5-2009.pdf

International Osteoporosis Foundation. (2019). *Osteoporosis—Incidence and burden*. Facts and Statistics. Recuperado 15 de agosto de 2019, de Facts and Statistics: https://www.iofbonehealth.org/facts-statistics#category-14

Ishay, R. B., Kapp-Barnea, Y., Grigoriantz, I., Teblum, E., y Lellouche, J.-P. (2015). Real time acoustic profiling of a live cancerous cell monolayer using QCM. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *215*, 373–381. https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.03.091

Ismail, F., Willows, A., Khurana, M., Tomlins, P. E., James, S., Mikhalovsky, S., y Vadgana, P. (2008). A test method to monitor in vitro storage and degradation effects on a skin substitute. *Medical Engineering y Physics*, *30*, 640–646. https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2007.07.007

Izquierdo, J., y Kranz, C. (2016). Electrochemical techniques for investigating redox active macromolecules. *European Polymer Journal*, *83*, 428–449. http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.05.016

Janko, M., Davydovskaya, P., Bauer, M., Zink, A., y Stark, R. W. (2010). Anisotropic Raman scattering in collagen bundles. *Optics Letters*, *35*(16), 2765. https://doi.org/10.1364/OL.35.002765

Jeong, H.-S., Venkatesan, J., y Kim, S.-K. (2013). Isolation and characterization of collagen from marine fish (Thunnus obesus). *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *18*(6), 1185–1191. https://doi.org/10.1007/s12257-013-0316-2

Jia, X., Tan, L., Xie, Q., Zhang, Y., y Yao, S. (2008). Quartz crystal microbalance and electrochemical cytosensing on a chitosan/multiwalled carbon nanotubes/Au electrode. *Sensors and Actuators B*, *134*, 273–280. 10.1016/j.snb.2008.04.043

Jia, X., Zhou, Y., Tan, L., Xie, Q., Tang, H., Ma, M., y Yao, S. (2009). Hydroxyapitite-multiwalled carbon nanotubes nanocomposite for adhesion and electrochemical study of human osteoblast-like cells (MG-63). *Electrochimica Acta*, *54*(13), 3611–3617. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2009.01.031

Jiang, P., Yan, F., Nasr Esfahani, E., Xie, S., Zou, D., Liu, X., Zheng, H., y Li, J. (2017). Electromechanical Coupling of Murine Lung Tissues Probed by Piezoresponse Force

Microscopy. *ACS Biomaterials Science y Engineering*, *3*(8), 1827–1835. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b00107

Jiménez, P. (2011). *Materiales nanoestructurados basados en polianilina, nanotubos de carbono y grafeno* [Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza]. http://digital.csic.es/bitstream/10261/33993/1/TESIS%20PABLO%20JIMENEZ%20MANERO.pdf

Jing, Q., Law, J. Y., Tan, L. P., Silberschmidt, V. V., Li, L., y Dong, Z. (2015). Preparation, characterization and properties of polycaprolactone diol-functionalized multi-walled carbon nanotube/thermoplastic polyurethane composite. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, *70*, 8–15. https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2014.10.028

Jolivet, A., Bardeau, J.-F., Fablet, R., Paulet, Y.-M., y Pontual, H. (2013). How do the organic and mineral fractions drive the opacity of fish otoliths? Insights using Raman microspectrometry. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *70*, 711–719. https://doi.org/dx.doi.org/10.1139/cjfas-2012-0298

Kang, Y., Wang, Q., Liu, Y.-C., Wu, T., Chen, Q., y Guan, W.-J. (2008). Dynamic Mechanism of Collagen-like Peptide Encapsulated into Carbon Nanotubes. *The Journal of Physical Chemistry B*, *112*(15), 4801–4807. https://doi.org/10.1021/jp711392g

Kao, P., Allara, D., y Tadigadapa, S. (2009). Characterization of viscoelastic properties of adsorbed biomolecules and biomolecular assemblies with high frequency micromachined quartz resonators. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *142*(2), 406–411. https://doi.org/10.1016/j.snb.2009.01.046

Karampas, I. A., y Kontoyannis, C. G. (2013). Characterization of calcium phosphates mixtures. *Vibrational Spectroscopy*, *64*, 126–133. https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2012.11.003

Kazanci, M., Fratzl, P., Klaushofer, K., y Paschalis, E. P. (2006). Complementary Information on In Vitro Conversion of Amorphous (Precursor) Calcium Phosphate to Hydroxyapatite from Raman Microspectroscopy and Wide-Angle X-Ray Scattering. *Calcified Tissue International*, *79*(5), 354–359. https://doi.org/10.1007/s00223-006-0011-9

Khalili, A., y Ahmad, M. (2015). A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(8), 18149–18184. https://doi.org/10.3390/ijms160818149

Khalili, V., Khalil, J., Xia, W., Parsa, A., Frenzel, J., Somsen, C., y Eggeler, G. (2016). Preparing hydroxyapatite-silicon composite suspensions with homogeneous distribution of multi-walled carbon nano-tubes for electrophoretic coating of NiTi bone implant and their effect on the surface morphology. *Applied Surface Science*, *366*, 158–165. http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.01.053

Khan, A. F., Awais, M., Khan, A. S., Tabassum, S., Chaudhry, A. A., y Rehman, I. U. (2013). Raman spectroscopy of natural bone and synthetic apatites. *Applied Spectroscopy Reviews*, *48*, 329–355. http://dx.doi.org/10.1080/05704928.2012.721107

Khanal, S., Mahfuz, H., Rondinone, A., y 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://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.11.030

Kim, D.-H., Chun, H. H., Lee, J. D., y Yoon, S.-Y. (2014). Evaluation of phase transformation behavior in biphasic calcium phosphate with controlled spherical micro granule architecture. *Ceramics International*, *40*, 5145–5155. http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.10.064

Klammert, U., Reuther, T., Jahn, C., Kraski, B., Kübler, A. C., y Gbureck, U. (2009). Cytocompatibility of brushite and monetite cell culture scaffolds made by three-dimensional powder printing. *Acta Biomaterialia*, *5*(2), 727–734. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.08.019

Ko, H.-C., Han, J.-S., Bächle, M., Jang, J.-H., Shin, S.-W., y Kim, D.-J. (2007). Initial osteoblast-like cell response to pure titanium and zirconia/alumina ceramics. *Dental Materials*, *23*(11), 1349–1355. https://doi.org/10.1016/j.dental.2006.11.023

Kumta, P., Sfeir, C., Lee, D.-H., Olton, D., y Choi, D. (2005). Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: Novel synthesis and characterization. *Acta Biomaterialia*, *1*, 65–83. https://doi.org/doi:10.1016/j.actbio.2004.09.008

Kurtz, S. (2012). *PEEK Biomaterials Handbook.* Elsevier Science.

Kutz, M. (2009). *Biomedical Engineering and Design Handbook* (Vol. 1). Mc Graw Hill.

Kwok, C., Wong, P., Cheng, F., y Man, H. (2009). Characterization and corrosion behavior of hydroxyapatite coatings on Ti6Al4V fabricated by electrophoretic deposition. *Applied Surface Science*, *255*, 6736–6744.

Lang, S. B., Tofail, S. A. M., Kholkin, A. L., Wojtaś, M., Gregor, M., Gandhi, A. A., Wang, Y., Bauer, S., Krause, M., y Plecenik, A. (2013). Ferroelectric Polarization in Nanocrystalline

Hydroxyapatite Thin Films on Silicon. *Scientific Reports*, *3*(1), 2215–2221. https://doi.org/10.1038/srep02215

Lanone, S., Andujar, P., Kermanizadeh, A., y Boczkowski, J. (2013). Determinants of carbon nanotube toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *65*(15), 2063–2069. https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.019

Lawal, A. T. (2016). Synthesis and utilization of carbon nanotubes for fabrication of electrochemical biosensors. *Materials Research Bulletin*, *73*, 308–350. https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2015.08.037

Leal, C., Martinez, D., Más, B., Alves, O., y Duek, E. (2016). Influence of purified multiwalled carbon nanotubes on the mechanical and morphological behavior in poly (L-lactic acid) matrix. *Journal of mechanical behavior of biomedical materials*, *59*, 547–560. http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.03.016

Lee, K., Choe, H., Kim, B., y Ko, Y. (2010). The Biocompatibility of HA Thin Films Deposition on Anodized Titanium Alloys. *Surface y Coatings Technology*, *205*(1), S267–S270. https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2010.08.015

Lee, W.-K., Lee, S.-M., y 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. https://doi.org/10.1016/j.jiec.2009.09.044

Lee, Y. B., Song, S.-J., Shin, Y. C., Jung, Y. J., Kim, B., Kang, M. S., Kwon, I. K., Hyon, S.-H., Lee, H. U., Jung, S.-H., Lim, D., y Han, D.-W. (2019). Ternary nanofiber matrices composed of PCL/black phosphorus/collagen to enhance osteodifferentiation. *Journal of*

Industrial and Engineering Chemistry, *In press, corrected proof.*, S1226086X19303429. https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.06.055

Leeuwenburg, S., Jansen, J., Malda, J., Dhert, W., Rouwkema, J., Blitterswijk, C., y Kirkpatrick, J. (2008). Trends in biomaterials reserach: An analysis of the scientific programme of the World Biomaterials Congress. *Biomaterials*, *29*, 3047–3052. https://doi.org/doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.032

Lertcumfu, N., Jaita, P., Manotham, S., Jarupoom, P., Eitssayeam, S., Pengpat, K., y Rujijanagul, G. (2016). Properties of calcium phosphates ceramic composites derived from natural materials. *Ceramics International*, *42*(9), 10638–10644. https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.03.162

Li, H., Song, X., Li, B., Kang, J., Liang, C., Wang, H., Zhenyang, Y., y Qiao, Z. (2017). Carbon nanotube-reinforced mesoporous hydroxyapatite composites with excellent mechanical and biological properties for bone replacement material application. *Materials Science and Engineering C*, *77*, 1078–1087. http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.048

Li, H., Zhao, Q., Li, B., Kang, J., Yu, Z., Li, Y., Song, X., Liang, C., y Wang, H. (2016). Fabrication and properties of carbon nanotube-reinforced hydroxyapatite composites by a double in situ synthesis process. *Carbon*, *101*, 159–167. https://doi.org/10.1016/j.carbon.2016.01.086

Li, X., Lan, J., Ai, M., Guo, Y., Cai, Q., y Yang, X. (2014). Biomineralization on polymer-coated multi-walled carbon nanotubes with different surface functional groups. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *123*, 753–761. http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.10.026

Liu, D., Yi, C., Zhang, D., Zhang, J., y Yang, M. (2010). Inhibition of Proliferation and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells by Carboxylated Carbon Nanotubes. *ACS Nano*, *4*(4), 2185–2195. https://doi.org/10.1021/nn901479w

Liu, S., Li, H., Su, Y., Guo, Q., y 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. https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.060

Liu, Ying, Zhao, Y., Sun, B., y Chen, C. (2013). Understanding the Toxicity of Carbon Nanotubes. *Accounts of Chemical Research*, *46*(3), 702–713. https://doi.org/10.1021/ar300028m

Liu, Yuanming, Zhang, Y., Chow, M.-J., Chen, Q. N., y Li, J. (2012). Biological Ferroelectricity Uncovered in Aortic Walls by Piezoresponse Force Microscopy. *Physical Review Letters*, *108*(7), 078103. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.108.078103

Lobo, A. O., Siqueira, I. A. W. B., das Neves, M. F., Marciano, F. R., Corat, E. J., y Corat, M. A. F. (2013). In vitro and in vivo studies of a novel nanohydroxyapatite/superhydrophilic vertically aligned carbon nanotube nanocomposites. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *24*(7), 1723–1732. https://doi.org/10.1007/s10856-013-4929-y

Logesh, M., Marimuthu, A., y Ballamurugan, A. M. (2019). Fabrication of graphene incorporated biphasic calcium phosphate composite and evaluation of impact of graphene in the in-vitro biomineralization process. *Materials Chemistry and Physics*, *232*, 75–81. https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2019.04.049

MacDonald, R. A., Laurenzi, B. F., Viswanathan, G., Ajayan, P. M., y Stegemann, J. P. (2005). Collagen-carbon nanotube composite materials as scaffolds in tissue engineering. *Journal*

of Biomedical Materials Research Part A, *74A*(3), 489–496. https://doi.org/10.1002/jbm.a.30386

Mao, H., Kawazoe, N., y Chen, G. (2013). Uptake and intracellular distribution of collagen-functionalized single-walled carbon nanotubes. *Biomaterials*, *34*(10), 2472–2479. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.002

Marques, C. F., Olhero, S., Abrantes, J. C. C., Marote, A., Ferreira, S., Vieira, S. I., y Ferreira, J. M. F. (2017). Biocompatibility and antimicrobial activity of biphasic calcium phosphate powders doped with metal ions for regenerative medicine. *Ceramics International*, *43*(17), 15719–15728. https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.08.133

Martin, A. L., Satjaritanun, P., Shimpalee, S., Devivo, B. A., Weidner, J., Greenway, S., Henson, J. M., y Turick, C. E. (2018). In-situ electrochemical analysis of microbial activity. *AMB Express*, *8*(1), 162. https://doi.org/10.1186/s13568-018-0692-2

Marx, K. A. (2003). Quartz Crystal Microbalance: A Useful Tool for Studying Thin Polymer Films and Complex Biomolecular Systems at the Solution−Surface Interface. *Biomacromolecules*, *4*(5), 1099–1120. https://doi.org/10.1021/bm020116i

Marx, K. A. (2007). The Quartz Crystal Microbalance and the Electrochemical QCM: Applications to Studies of Thin Polymer Films, Electron Transfer Systems, Biological Macromolecules, Biosensors, and Cells. En C. Steinem y A. Janshoff (Eds.), *Piezoelectric Sensors* (Vol. 5, pp. 371–424). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/5346_033

Mattews, M., Khalid, M., Ratnam, C., Chee, C., Rashmi, W., y Hoque, M. (2016). Sono-synthesis of nanohydroxyapatite: Effects of process parameters. *Ceramics International*, *42*, 6263–6272. http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.01.009

Mattioli, M., Vozzi, G., Whulanza, Y., Seggiani, M., Fantauzzi, V., Orsini, G., y Arti Ahluwalia. (2012). Tuning polycaprolactone–carbon nanotube composites for bone tissue engineering scaffolds. *Materials Science and Engineering C*, *32*, 152–159. https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.10.010

McEntire, B., Bal, B., Rahaman, M., Chevalier, J., y Pezzotti, G. (2015). Ceramics and ceramic coatings in orthopaedics. *Journal of the European Ceramic Society*, *35*, 4327–4369. http://dx.doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2015.07.034

Medvecky, L., Sopcak, T., Durisin, J., y Briancin, J. (2011). Nanohydroxyapatite prepared from non-toxic organic Ca2+ compounds by precipitation in aqueous solution. *Materials Letters*, *65*(23–24), 3566–3569. https://doi.org/10.1016/j.matlet.2011.07.096

Metwally, S., Karbowniczek, J., Szewczyk, P., Marzec, M., Gruszczynski, A., Bernasik, A., y Stachewicz, U. (2018). Single-Step Approach to Tailor Surface Chemistry and Potential on Electrospun PCL Fibers for Tissue Engineering Application. *Advanced Materials Interfaces*, *1801211*, 1–12. https://doi.org/10.1002/admi.201801211

Metwally, S., y Stachewicz, U. (2019). Surface potential and charges impact on cell responses on biomaterials interfaces for medical applications. *Materials Science and Engineering: C*, *104*, 109883. https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109883

Mina, A., Caicedo, J. C., y Aperador, W. (2015). Study of dynamical properties in β-TCP/CH layers. *Rev. Mex. Fis.*, 13.

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttextypid=S0035-001X2015000200010ylng=esytlng=en.

Minary-Jolandan, M., y Yu, M.-F. (2009). Nanoscale characterization of isolated individual type I collagen fibrils: Polarization and piezoelectricity. *Nanotechnology*, *20*(8), 085706. https://doi.org/10.1088/0957-4484/20/8/085706

Modin, C., Stranne, A.-L., Foss, M., Duch, M., Justesen, J., Chevallier, J., Hemmersam, A., Pedersen, F., y Besenbacher, F. (2006). QCM-D studies of attachment and differential spreading of pre-osteoblastic cells on Ta and Cr surfaces. *Biomaterials*, *27*, 1346–1354. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.09.022

Mokabber, T., Lu, L. Q., van Rijn, P., Vakis, A. I., y Pei, Y. T. (2018). Crystal growth mechanism of calcium phosphate coatings on titanium by electrochemical deposition. *Surface and Coatings Technology*, *334*, 526–535. https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2017.12.011

Mokabber, T., Zhou, Q., Vakis, A. I., van Rijn, P., y Pei, Y. T. (2019). Mechanical and biological properties of electrodeposited calcium phosphate coatings. *Materials Science and Engineering: C*, *100*, 475–484. https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.020

Montañez, N. D., Carreño, H., Escobar, P., Estupiñán, H. A., Peña, D. Y., Goel, S., y Endrino, J. L. (2020). Functional evaluation and testing of a newly developed Teleost's Fish Otolith derived biocomposite coating for healthcare. *Scientific Reports*, *10*(1), 258. https://doi.org/10.1038/s41598-019-57128-w

Montañez, N. D., Estupiñan, H. A., García, S. J., y Peña, D. Y. (2018). Fabrication and Characterization of Novel Biphasic Calcium Phosphate and Nanosized Hydroxyapatite

Derived from Fish Otoliths in Different Composition Ratios. *Chemical Engineering Transactions*, *64*, 307–312. https://doi.org/10.3303/CET1864052

Montañez-Supelano, N. D., Herrera-Ardila, P. A., López-Lozada, M. J., Carreño, H., García-Vergara, S. J., Estupiñan-Durán, H. A., y Peña-Ballesteros, D. Y. (2019). Electrochemical and bioactive evaluation of polycaprolactone/ multi-walled carbon nanotubes coatings on titanium alloy. *Journal of Physics: Conference Series*, *1386*, 012010. https://doi.org/10.1088/1742-6596/1386/1/012010

Montañez-Supelano, N. D., Sandoval-Amador, A., Estupiñan-Durán, H. A., y Peña-Ballesteros, D. Y. (2017). A novel biphasic calcium phosphate derived from fish otoliths. *Journal of Physics: Conference Series*, *935*, 012037. https://doi.org/10.1088/1742-6596/935/1/012037

Mulcahy, S., Killingley, J., Phleger, C., y Berger, W. (1979). Isotopie composition of otoliths from a benthopelagic fish, Coryphaenoides aero/epis, Macrouridae: Gadiformes. *Oceanologica Acta*, *2*(4), 423–428. https://pdfs.semanticscholar.org/7e24/9c81d0799122505846722b2d215328418106.pdf

Musto, P., Russo, P., Cimino, F., Acierno, D., Lupó, G., y Carlo Petraca. (2015). Dielectric behavior of biopolymer based composites containing milti wall carbon nanotubes: Effect of filler content and aspect ratio. *European Polymer Journal*, *64*, 170–178. http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.01.010

Nakamura, S., Kobayashi, T., y Yamashita, K. (2004). Numerical osteobonding evaluation of electrically polarized hydroxyapatite ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research*, *68A*(1), 90–94. https://doi.org/10.1002/jbm.a.10124

Nawrotek, K., Tylman, M., Rudnicka, K., Gatkowska, J., y Balcerzak, J. (2016). Tubular electrodeposition of chitosan–carbon nanotube implants enriched with calcium ions. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *60*, 256–266. https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.02.012

Neelgund, G. M., Olurode, K., Luo, Z., y Oki, A. (2011). A simple and rapid method to graft hydroxyapatite on carbon nanotubes. *Materials Science and Engineering: C*, *31*(7), 1477–1481. https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.06.001

Newcomb, C., Pascual, G., Kim, B., y Lee, K. (2019). *Piezoelectric Force Microscopy: Capacitor Cerámico SMD*. http://es.parkafm.com/images/appnote/Piezoelectric-Force-Microscopy_Multilayered-Ceramic-Capacitor_19_SP.pdf

Ngiam, M., Liao, S., Patil, A., Cheng, Z., Chan, C., y Ramakrishna, S. (2009). The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering. *Bone*, *45*(1), 4–16. https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.03.674

Nguyen, T. T., Gobinet, C., Feru, J., -Pasco, S. B., Manfait, M., y Piot, O. (2012). Characterization of Type I and IV Collagens by Raman Microspectroscopy: Identification of Spectral Markers of the Dermo-Epidermal Junction. *Spectroscopy: An International Journal*, *27*, 421–427. https://doi.org/10.1155/2012/686183

Núñez, D., Benito, A., González, R., Aragón, J., Arenal, R., y Maser, W. (2014). Integration and bioactivity of hydroxyapatite grown on carbon nanotubes and graphene oxide. *Carbon*, *79*, 590–604. http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2014.08.020

Obarzanek, M., Elbs, Y., Lizundia, E., Diener, L., Sarasua, J., y Bruinink, A. (2014). From implantation to degradation—Are poly (L-lactide)/multiwall carbon nanotube composite materials really cytocompatible? *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *10*, 1041–1051. https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.12.012

Ormsby, R., McNally, T., O'Hare, P., Burke, G., Mitchell, C., y Dunne, N. (2012). Fatigue and biocompatibility properties of a poly(methyl methacrylate) bone cement with multi-walled carbon nanotubes. *Acta Biomaterialia*, *8*, 1201–1212. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.10.010

Osorio, A. G., Silveira, I. C., Bueno, V. L., y Bergmann, C. P. (2008). H2SO4/HNO3/HCl-Functionalization and its effect on dispersion of carbon nanotubes in aqueous media. *Applied Surface Science*, *255*, 2485–2489. https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2008.07.144

Oyefusi, A., Olanipekun, O., Neelgund, G., Peterson, D., Stone, J., Williams, E., Carson, L., Regisford, G., y 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://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2014.04.004

Ozan, S., Lin, J., Li, Y., Ipek, R., y Wen, C. (2015). Development of Ti–Nb–Zr alloys with high elastic admissible strain for temporary orthopedic devices. *Acta Biomaterialia*, *20*, 176–187. http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2015.03.023

Padilla, S., Román, J., Sánchez, S., y Regí, V. (2006). Hydroxiapatite/SiO2-CaO-P2O5 glass materials: In vitro bioactivity and biocompatibility. *Acta Biomaterialia*, *2*, 331–342. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2006.01.006

Pal, M., Guo, R., y Bhalla, A. (2013). Biological ferroelectricity in human nail samples using Piezoresponse Force Microscopy. *Materials Research Innovations*, *17*(7), 442–447. https://doi.org/10.1179/1433075X13Y.0000000122

Pan, L., Pei, X., He, R., Wan, Q., y Wang, J. (2012). Multiwall carbon nanotubes/polycaprolactone composites for bone tissue engineering application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *93*, 226–234. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.01.011

Papageorgiou, D. G., Roumeli, E., Terzopoulou, Z., Tsanaktsis, V., Chrissafis, K., y Bikiaris, D. (2015). Polycaprolactone/multi-wall carbon nanotube nanocomposites prepared by in situ ring opening polymerization: Decomposition profiling using thermogravimetric analysis and analytical pyrolysis–gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, *115*, 125–131. https://doi.org/10.1016/j.jaap.2015.07.007

Park, J. E., Park, I.-S., Neupane, M. P., Bae, T.-S., y Lee, M.-H. (2014). Effects of a carbon nanotube-collagen coating on a titanium surface on osteoblast growth. *Applied Surface Science*, *292*, 828–836. https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.12.058

Patel, R., Zhou, R., Zinszer, K., Josse, F., y Cernosek, R. (2000). Real-Time Detection of Organic Compounds in Liquid Environments Using Polymer-Coated Thickness Shear Mode Quartz Resonators. *Analytical Chemistry*, *72*(20), 4888–4898. https://doi.org/10.1021/ac0003955

Pattanaik, S. (2005). X-ray diffraction, XAFS and scanning electron microscopy study of otolith of a crevalle jack fish (caranx hippos). *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, *229*, 367–374. https://doi.org/10.1016/j.nimb.2004.12.133

Pethig, R., y Douglas, B. K. (1987). The passive electrical properties of biological systems: Their significance in physiology, biophysics and biotechnology. *Physics in Medicine y Biology*, *32*(8), 933–970. https://doi.org/10.1088/0031-9155/32/8/001

Petricca, S., Marra, K., y Kumta, P. (2006). Chemical synthesis of poly(lactic-co-glycolic acid)/hydroxiapatite composites for orthopedic applications. *Acta Biomaterialia*, *2*, 277–286. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2005.12.004

Pezzotti, G., Rondinella, A., Marin, E., Zhu, W., Aldini, N. N., Ulian, G., y Valdrè, G. (2017). Raman spectroscopic investigation on the molecular structure of apatite and collagen in osteoporotic cortical bone. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *65*, 264–273. https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.08.030

Pierre, C., Bertrand, G., Rey, C., Benhamou, O., y Combes, C. (2019). Calcium phosphate coatings elaborated by the soaking process on titanium dental implants: Surface preparation, processing and physical–chemical characterization. *Dental Materials*, *35*(2), e25–e35. https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.10.005

Poinern, G. E., Brundavanam, R. K., Mondinos, N., y Jiang, Z.-T. (2009). Synthesis and characterisation of nanohydroxyapatite using an ultrasound assisted method. *Ultrasonics Sonochemistry*, *16*(4), 469–474. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.01.007

Prodana, M., Duta, M., Ionita, D., Bojin, D., Stan, M., Dinischiotu, A., y Ioana Demetrescu. (2015). A new complex ceramic coating with carbon nanotubes, hydroxyapatite and TiO2 nanotubes on Ti surface for biomedical applications. *Ceramics International*, *41*, 6318–6325. http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.01.060

Punetha, V. D., Rana, S., Yoo, H. J., Chaurasia, A., McLeskey, J. T., Ramasamy, M. S., Sahoo, N. G., y Cho, J. W. (2017). Functionalization of carbon nanomaterials for advanced polymer nanocomposites: A comparison study between CNT and graphene. *Progress in Polymer Science*, *67*, 1–47. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2016.12.010

Quirama, A., Echavarría, A. M., Meza, J. M., Osorio, J., y Bejarano G, G. (2017). Improvement of the mechanical behavior of the calcium phosphate coatings deposited onto Ti 6 Al 4 V alloy using an intermediate TiN/TiO 2 bilayer. *Vacuum*, *146*, 22–30. https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2017.09.024

Rajesh, A., Sairam, T. N., Sahoo, P. K., Kamruddin, M., y Mangamma, G. (2017). PFM studies of hydroxyapatite-reduced graphene oxide nanocomposite. *Ferroelectrics*, *519*(1), 164–169. https://doi.org/10.1080/00150193.2017.1361252

Rakngarm, A., y Mutoh, Y. (2009). Electrochemical depositions of calcium phosphate film on commercial pure titanium and Ti–6Al–4V in two types of electrolyte at room temperature. *Materials Science and Engineering: C*, *29*(1), 275–283. https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.06.028

Ratner, B., Hoffman, A., Schoen, F., y Lemons, J. (1996). *Biomaterial science: An introduction to materials in medicine*. Academic press.

Ravarian, R., Moztarzadeh, F., Solati, M., Rabiee, S., Khoshakhlagh, P., y Tahriri, M. (2010). Synthesis, characterization and bioactivity investigation of bioglass/hydroxyapatite composite. *Ceramics International*, *36*, 291–297. https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2009.09.016

Rebelo, S. L. H., Guedes, A., Szefczyk, M. E., Pereira, A. M., Araújo, J. P., y Freire, C. (2016). Progress in the Raman spectra analysis of covalently functionalized multiwalled carbon nanotubes: Unraveling disorder in graphitic materials. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *18*(18), 12784–12796. https://doi.org/10.1039/C5CP06519D

Ribeiro, C., Sencada, V., Correia, D., y Méndez, S. (2015). Piezoelectric polymers as biomaterials for tissue engineering applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *136*, 46–55. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.08.043

Ribeiro, H., da Silva, W. M., Neves, J. C., Calado, H. D. R., Paniago, R., Seara, L. M., Mercês Camarano, D. das, y Silva, G. G. (2015). Multifunctional nanocomposites based on tetraethylenepentamine-modified graphene oxide/epoxy. *Polymer Testing*, *43*, 182–192. https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2015.03.010

Ron, A., Shur, I., Daniel, R., Raj, R., Fishelson, N., Croitoru, N., Benayahu, D., y Shacham, Y. (2010). Dielectric screening of early differentiation patterns in mesenchymal stem cells. *Bioelectrochemistry*, *78*, 161–172. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.09.008

Sahithi, K., Swetha, M., Ramasamy, K., Srinivasan, N., y Selvamurugan, N. (2010). Polymeric composites containing carbon nanotubes for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, *46*(3), 281–283. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.01.006

Sahoo, N., Rana, S., Cho, J., Li, L., y Chan, S. (2010). Polymer nanocomposites based on functionalized carbon nanotubes. *Progress in Polymer Science*, *35*, 837–867. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.03.002

Saitakis, M., y Gizeli, E. (2012). Acoustic sensors as a biophysical tool for probing cell attachment and cell/surface interactions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *69*(3), 357–371. https://doi.org/10.1007/s00018-011-0854-8

Sajid, M., Jamshaid, U., Jamshaid, T., Zafar, N., Fessi, H., y Elaissari, A. (2016). Carbon nanotubes from synthesis to in vivo biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, *501*, 278–299. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.01.064

Sánchez-Enríquez, J., y Reyes-Gasga, J. (2013). Obtaining Ca(H2PO4)2·H2O, monocalcium phosphate monohydrate, via monetite from brushite by using sonication. *Ultrasonics Sonochemistry*, *20*(3), 948–954. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.10.019

Santos, T., Rodrigues, S. A., Oliveira, C., Filho, L. X., Melo, G. C. de, Albuquerque-Junior, R. L. C., y Santos, J. C. (2013). Avaliação histológica da biocompatibilidade de otólitos Cynoscion acoupaem ratos. *Interfaces Científicas - Saúde a Ambiente*, *1*, 71–78. https://doi.org/10.17564/2316-3798.2013v1n2p71-78

Saraiva Matos, R., y Pinheiro Pinto, E. (2019). *Bioactive coatings on the Ti-6Al-4V alloy for biomedical application: A brief review*. 11.

Saveleva, M. S., Ivanov, A. N., Kurtukova, M. O., Atkin, V. S., Ivanova, A. G., Lyubun, G. P., Martyukova, A. V., Cherevko, E. I., Sargsyan, A. K., Fedonnikov, A. S., Norkin, I. A., Skirtach, A. G., Gorin, D. A., y Parakhonskiy, B. V. (2018). Hybrid PCL/CaCO3 scaffolds with capabilities of carrying biologically active molecules: Synthesis, loading and in vivo applications. *Materials Science and Engineering: C*, *85*, 57–67. https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.12.019

Schmid, T., y Dariz, P. (2015). Shedding light onto the spectra of lime: Raman and luminescence bands of CaO, Ca(OH) $_2$ and CaCO $_3$: Raman and luminescence bands of CaO, Ca(OH) $_2$ and CaCO $_3$. *Journal of Raman Spectroscopy*, *46*(1), 141–146. https://doi.org/10.1002/jrs.4622

Seol, D., Kim, B., y Kim, Y. (2017). Non-piezoelectric effects in piezoresponse force microscopy. *Current Applied Physics*, *17*(5), 661–674. https://doi.org/10.1016/j.cap.2016.12.012

Sequeda, L., Díaz, J., Gutiérrez, S., Perdomo, S., y Gómez, O. (2012). Obtención de hidroxiapatita sintética por tres métodos diferentes y su caracterización para ser utilizada como sustituto óseo. *Revista Colombiana de Ciencias Químicas Farmacéuticas*, *41*(1), 50–66. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttextypid=S0034-74182012000100004ylng=enytlng=es.

Sharma, M., Srinivas, V., Madras, G., y Bose, S. (2016). Outstanding dielectric constant and piezoelectric coefficient in electrospun nanofiber mats of PVDF containing silver decorated multiwall carbon nanotubes: Assessing through piezoresponse force microscopy. *RSC Advances*, *6*(8), 6251–6258. https://doi.org/10.1039/C5RA25671B

Sheikh, Z., Zhang, Y. L., Grover, L., Merle, G. E., Tamimi, F., y Barralet, J. (2015). In vitro degradation and in vivo resorption of dicalcium phosphate cement based grafts. *Acta Biomaterialia*, *26*, 338–346. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.08.031

Sheikh, Z., Zhang, Y. L., Tamimi, F., y Barralet, J. (2017). Effect of processing conditions of dicalcium phosphate cements on graft resorption and bone formation. *Acta Biomaterialia*, *53*, 526–535. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.02.022

Shim, K., Kim, S., Yun, Y., Jeon, D., Kim, H., Park, K., y Song, H. (2017). Surface Immobilization of biphasic calcium phosphate nanoparticles on 3D printed poly(caprolactone) scaffolds enhances osteogenesis and bone tissue regeneration. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, *55*, 101–109. http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2017.06.033

Shojai, M., Mohammad, K., Ehsan, D., y Jamshidi, A. (2013). Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomaterialia*, *9*, 7591–7621. http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.012

Sidane, D., Rammal, H., Beljebbar, A., Gangloff, S., Chicot, D., Velard, F., Khireddine, H., Montagne, A., y Kerdjoudj, H. (2017). Biocompatibility of sol-gel hydroxyapatite-titania composite and bilayer coatings. *Materials Science and Engineering C*, *72*, 650–658. http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.129

Soergel, E. (2011). Piezoresponse force microscopy (PFM). *Journal of Physics D: Applied Physics*, *44*(46), 464003. https://doi.org/10.1088/0022-3727/44/46/464003

Spitalsky, Z., Tasis, D., Papagelis, K., y Costas, G. (2010). Carbon nanotube–polymer composites: Chemistry, processing, mechanical and electrical properties. *Progress in Polymer Science*, *35*, 357–401. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.09.003

Srinivasarao, Y., Gopinathan, A., Nandakumar, K., y Sabu, T. (2016). Structural and optical properties of functionalized multi-walled carbon nanotubes. *Materials Science in Semiconductor Processing*, *41*, 491–496. http://dx.doi.org/10.1016/j.mssp.2015.10.022

Stanford Research Systems. (2018, junio). *QCM200 Quartz Crystal Microbalance Digital Controller*. Thinksrs. https://www.thinksrs.com/downloads/pdfs/manuals/QCM200m.pdf

Stapleton, A., Ivanov, M. S., Noor, M. R., Silien, C., Gandhi, A. A., Soulimane, T., Kholkin, A. L., y Tofail, S. A. M. (2018). Converse piezoelectricity and ferroelectricity in crystals of lysozyme protein revealed by piezoresponse force microscopy. *Ferroelectrics*, *525*(1), 135–145. https://doi.org/10.1080/00150193.2018.1432825

Su, Y., Cockerill, I., Zheng, Y., Tang, L., Qin, Y.-X., y Zhu, D. (2019). Biofunctionalization of metallic implants by calcium phosphate coatings. *Bioactive Materials*, *4*, 196–206. https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2019.05.001

Subramani, K., Pandruvada, S. N., Puleo, D. A., Hartsfield, J. K., y Huja, S. S. (2016). In vitro evaluation of osteoblast responses to carbon nanotube-coated titanium surfaces. *Progress in Orthodontics*, *17*(1), 23. https://doi.org/10.1186/s40510-016-0136-y

Švecová, M., y Bartůněk, V. (2018). Facile synthesis of monetite nanoparticles from basic raw materials. *Ceramics International*, *44*(13), 16079–16082. https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.05.187

Takitoh, T., Kato, Y., Nakasu, A., Tadokoro, M., Bessho, M., Hirose, M., Ohgushi, H., Mori, H., y Hara, M. (2010). In vitro osteogenic differentiation of HOS cells on two types of collagen gels. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *110*(4), 471–478. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.04.009

Tamimi, F., Nihouannen, D. L., Eimar, H., Sheikh, Z., Komarova, S., y Barralet, J. (2012). The effect of autoclaving on the physical and biological properties of dicalcium phosphate dihydrate bioceramics: Brushite vs. monetite. *Acta Biomaterialia*, *8*(8), 3161–3169. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.04.025

Tamimi, F., Sheikh, Z., y Barralet, J. (2012). Dicalcium phosphate cements: Brushite and monetite. *Acta Biomaterialia*, *8*(2), 474–487. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.08.005

Tandom, B., Blaker, J., y Cartmell, S. (2018). Piezoelectric materials as stimulatory biomedical materials and scaffolds for bone repair. *Acta Biomaterialia*, *73*, 1–20. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.04.026

Tanurat, P., y Sirivisoot, S. (2015). *Osteoblast proliferation on graphene oxide eletrodeposited on anodized titanium*. 1–5. https://doi.org/10.1109/BMEiCON.2015.7399572

Telega, J., y Wojnar, R. (2002). Piezoelectric effects in biological tissues. *Journal of Theoretical and Applied Mechanics*, *3*, 723–759. http://yadda.icm.edu.pl/baztech/element/bwmeta1.element.baztech-article-BWM2-0014-0010

Thi, L. (2018). Characterization of multi-walled carbon nanotubes functionalized by a mixture of HNO3/H2SO4. *Diamond y Related Materials*, *89*, 43–51. https://doi.org/10.1016/j.diamond.2018.08.008

Titorenkova, R., Dyulgerova, E., Petkova, V., y Ilieva, R. (2019). Carbonation and dehydroxylation of apatite during high energy milling of biphasic Ca-phosphate ceramics. *Ceramics International*, *45*(6), 7025–7033. https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.12.204

Tognarini, I., Sorace, S., Zonefrati, R., Galli, G., Gozzini, A., Carbonel, S., Zappoli, G., Carossino, A. M., Tanini, A., Mavilia, C., Azzari, C., Sbaiz, F., Facchini, A., Capanna, R., y Brandi, M. L. (2008). In vitro differentiation of human mesenchymal stem cells on Ti6Al4V surfaces. *Biomaterials*, *29*, 809–824. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.10.043

Tohse, H., Saruwatari, K., Kogure, T., Nagasawa, H., y Takagi, Y. (2009). Control of Polymorphism and Morphology of Calcium Carbonate Crystals by a Matrix Protein Aggregate in Fish Otoliths. *Crystal growth y design*, *9*, 4897–4901. https://doi.org/10.1021/cg900685

Toledano, M., Toledano-Osorio, M., Guerado, E., Caso, E., Aguilera, F. S., y Osorio, R. (2018). Biochemical assessment of nanostructures in human trabecular bone: Proposal of a Raman microspectroscopy based measurements protocol. *Injury*, *49*, S11–S21. https://doi.org/10.1016/j.injury.2018.07.034

Tozar, A., y Karahan, İ. H. (2018). A comprehensive study on electrophoretic deposition of a novel type of collagen and hexagonal boron nitride reinforced hydroxyapatite/chitosan biocomposite coating. *Applied Surface Science*, *452*, 322–336. https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.04.241

Trakoolwannachai, V., Kheolamai, P., y Ummartyotin, S. (2019). Characterization of hydroxyapatite from eggshell waste and polycaprolactone (PCL) composite for scaffold material. *Composites Part B: Engineering*, *173*, 106974. https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2019.106974

Tran, P., Zhang, L., y Webster, T. (2009). Carbon nanofibers and carbon nanotubes in regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *61*, 1097–1114. https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.010

Truchly, M., Plecenik, T., Secianska, K., Gregor, M., Zahoran, M., Vargova, M., Mikula, M., Grancic, B., Plesch, G., Tofail, S. A. M., Peter, K., y Plecenik, A. (2013). Surface potential patterning of hydroxyapatite films by focused electron beam: Influence of the electron

energy. *Applied Surface Science*, *269*, 184–187. http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.10.004

Tsai, S.-W., Hsu, F.-Y., y Chen, P.-L. (2008). Beads of collagen–nanohydroxyapatite composites prepared by a biomimetic process and the effects of their surface texture on cellular behavior in MG63 osteoblast-like cells. *Acta Biomaterialia*, *4*(5), 1332–1341. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.03.015

Türk, S., Altınsoy, I., Çelebi Efe, G., Ipek, M., Özacar, M., y Bindal, C. (2018). 3D porous collagen/functionalized multiwalled carbon nanotube/chitosan/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science y Engineering C*, *92*, 757–768. https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.07.020

Türk, S., Altınsoy, I., ÇelebiEfe, G., Ipek, M., Özacar, M., y Bindal, C. (2018). Biomimetric coating of monophasic brushite on Ti6Al4V in new m-5xSBF. *Surface and Coatings Technology*, *351*, 1–10. https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2018.07.067

Tymchenko, N., Nilebäck, E., Voinova, M. V., Gold, J., Kasemo, B., y Svedhem, S. (2012). Reversible Changes in Cell Morphology due to Cytoskeletal Rearrangements Measured in Real-Time by QCM-D. *Biointerphases*, *7*(1), 43. https://doi.org/10.1007/s13758-012-0043-9

Unal, M., y Akkus, O. (2015). Raman spectral classification of mineral- and collagen-bound water's associations to elastic and post-yield mechanical properties of cortical bone. *Bone*, *81*, 315–326. https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.07.024

Ursini, C., Cavallo, D., Fresegna, A. M., Ciervo, A., Maiello, R., Buresti, G., Casciardi, S., Tombilini, F., Bellucci, S., y Iavicoli, S. (2012). Comparative cyto-genotoxicity assessment

of functionalized and pristine multiwalled carbon nanotubes on human lung epithelial cells. *Toxicology in Vitro*, *26*, 831–840. http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2012.05.001

Ustundag, C. (2016). Fabrication of porous hydroxyapatite-carbon nanotubes composite. *Materials Science and Engineering C*, *167*, 89–92. http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2015.12.135

Valverde, T. M., Castro, E. G., Cardoso, M. H. S., Martins-Júnior, P. A., Souza, L. M. O., Silva, P. P., Ladeira, L. O., y Kitten, G. T. (2016). A novel 3D bone-mimetic scaffold composed of collagen/MTA/MWCNT modulates cell migration and osteogenesis. *Life Sciences*, *162*, 115–124. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.08.003

Wang, M.-C., Shin, W. J., Hung, I. M., Chen, H. T., Hon, M. H., y Huang, H. H. (2015). Characterization of calcium phosphate apatite with variable Ca/P ratios sintered at low temperature. *Ceramics International*, *41*, 1223–1233. http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.09.051

Wang, P., Su, J., Gong, L., Shen, M., Ruths, M., y Sun, H. (2015). Numerical simulation and experimental study of resonance characteristics of QCM-P devices operating in liquid and their application in biological detection. *Sensors and Actuators B*, *220*, 1320–1327. http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2015.07.024

Wang, W., Huang, B., Byun, J. J., y Bártolo, P. (2019). Assessment of PCL/carbon material scaffolds for bone regeneration. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *93*, 52–60. https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.01.020

Warowicka, A., Maciejewska, B. M., Litowczenko, J., Kościński, M., Baranowka-Korczyc, A., Jasiurkowska-Delaporte, M., Koziol, K. K., y Jurga, S. (2016). MWCNT based matrices

as a platform for adhesion and growth of cells. *Composites Science and Technology*, *136*, 29–38. https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2016.09.026

Wesełucha-Birczyńska, A., Świętek, M., Sołtysiak, E., Galiński, P., Płachta, Ł., Piekara, K., y Błażewicz, M. (2015). Raman spectroscopy and the material study of nanocomposite membranes from poly(ε-caprolactone) with biocompatibility testing in osteoblast-like cells. *The Analyst*, *140*(7), 2311–2320. https://doi.org/10.1039/C4AN02284J

Wojtas, M., Hołubowicz, R., Poznar, M., Maciejewska, M., Ożyhar, A., y Dobryszycki, P. (2015). Calcium Ion Binding Properties and the Effect of Phosphorylation on the Intrinsically Disordered Starmaker Protein. *Biochemistry*, *54*, 6525–6534. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00933

Wojtas, M., Wozcyrz, M., Ozyhar, A., y Dobryszycki, P. (2012). Phosphorylation of Intrinsically Disordered Starmaker Protein Increases its Ability to Control the Formation of Calcium Carbonate Crystals. *Crystal growth y design*, *12*, 158–168. https://doi.org/dx.doi.org/10.1021/cg200905f

Wongsupa, N., Nuntanaranont, T., Kamolmattayakul, S., y Thuaksuban, N. (2017). Biological characteristic effects of human dental pulp stem cells on poly-ε-caprolactone-biphasic calcium phosphate fabricated scaffolds using modified melt stretching and multilayer deposition. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *28*(2), 1–11. https://doi.org/10.1007/s10856-016-5833-z

Wu, C., Zichun, W., Wang, L., Williams, P., y Huang, J. (2012). Sustainable processing of waste plastics to produce high yield hydrogenrich synthesis gas and high quality carbon nanotubes. *RSC Advances*, *2*, 4045–4047. https://doi.org/10.1039/c2ra20261a

Wu, G., Deng, X., Song, J., y Chen, F. (2018). Enhanced biological properties of biomimetic apatite fabricated polycaprolactone/chitosan nanofibrous bio-composite for tendon and ligament regeneration. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *178*, 27–32. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.10.011

Wu, T.-M., y Chen, E.-C. (2006). Crystallization behavior of poly(ε-caprolactone)/multiwalled carbon nanotube composites. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, *44*(3), 598–606. https://doi.org/10.1002/polb.20722

Xiao, J., Herng, T. S., Ding, J., y Zeng, K. (2017). Polarization rotation in copper doped zinc oxide (ZnO:Cu) thin films studied by Piezoresponse Force Microscopy (PFM) techniques. *Acta Materialia*, *123*, 394–403. http://dx.doi.org/10.1016/j.actamat.2016.10.051

Xiao, Y., Gong, T., y Zhou, S. (2010). The functionalization of multi-walled carbon nanotubes by in situ deposition of hydroxyapatite. *Biomaterials*, *31*, 5182–5190. https://doi.org/doi:10.1016/j.biomaterials.2010.03.012

Xie, J., Riley, C., y Chittur, K. (2001). Effect of albumin on brushite transformation to hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research*, *57*(3), 357–365. https://doi.org/10.1002/1097-4636(20011205)57:3<357::AID-JBM1178>3.0.CO;2-1

Xu, J., Butler, I. S., y 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. https://doi.org/10.1016/S1386-1425(99)00090-6

Xu, Q., Li, Z., Peng, H., Sun, Z., Cheng, R., Ye, Z., y Li, W. (2011). Artesunate inhibits growth and induces apoptosis in human osteosarcoma HOS cell line in vitro and in vivo. *Journal*

of Zhejiang University SCIENCE B, *12*(4), 247–255. https://doi.org/10.1631/jzus.B1000373

Xu, X., Wang, B., y Xu, Y. (2013). Expression of lysyl oxidase in human osteosarcoma and its clinical significance: A tumor suppressive role of LOX in human osteosarcoma cells. *International Journal of Oncology*, *43*(5), 1578–1586. https://doi.org/10.3892/ijo.2013.2067

Ya, B., Zhou, B., Yang, H., Huang, B., Jia, F., y Zhang, X. (2015). Microstructure and mechanical properties of in situ casting TiC/Ti6Al4V composites through adding multi-walled carbon nanotubes. *Journal of Alloys and Compounds*, *637*, 456–460. http://dx.doi.org/10.1016/j.jallcom.2015.03.044

Yadav, P., Srivastava, A., Yadav, M., Kripal, R., Singh, V., Lee, D., y Lee, J.-H. (2019). Synthesis and dielectric characterization of polycarbonate/multi-wall carbon nanotubes nanocomposite. *Arabian Journal of Chemistry*, *12*, 440–446. http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.10.015

Yan, L., Li, S., Du, F., Lv, W., Zhang, N., y Chen, X. (2012). Mineralogical and geochemical study of carp otoliths from Baiyangdian Lake and Miyun Water Reservoir in China. *African Journal of Biotechnology*, *11*(26), 6847–6856. https://doi.org/10.5897/AJB11.2575

Yang, Y., Michalczyk, C., Singer, F., Virtanen, S., y Boccaccini, A. R. (2015). In vitro study of polycaprolactone/bioactive glass composite coatings on corrosion and bioactivity of pure Mg. *Applied Surface Science*, *355*, 832–841. https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.07.053

Yıldırım, S., Demirtaş, T., Dinçer, C., Yıldız, N., y Karakeçili, A. (2018). Preparation of polycaprolactone/graphene oxide scaffolds: A green route combining supercritial CO2

technology and porogen leaching. *The Journal of Supercritical Fluids*, *133*, 156–162. http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2017.10.009

Yılmaz, E., Çakıroğlu, B., Gökçe, A., Findik, F., Gulsoy, H. O., Gulsoy, N., Mutlu, Ö., y Özacar, M. (2019). Novel hydroxyapatite/graphene oxide/collagen bioactive composite coating on Ti16Nb alloys by electrodeposition. *Materials Science and Engineering: C*, *101*, 292–305. https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.078

Zhang, Y., Chen, L., Zeng, J., Zhou, K., y Zhang, D. (2014). Aligned porous barium titanate/hydroxyapatite composites with high piezoelectric coefficients for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*, *39*, 143–149. https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.02.022

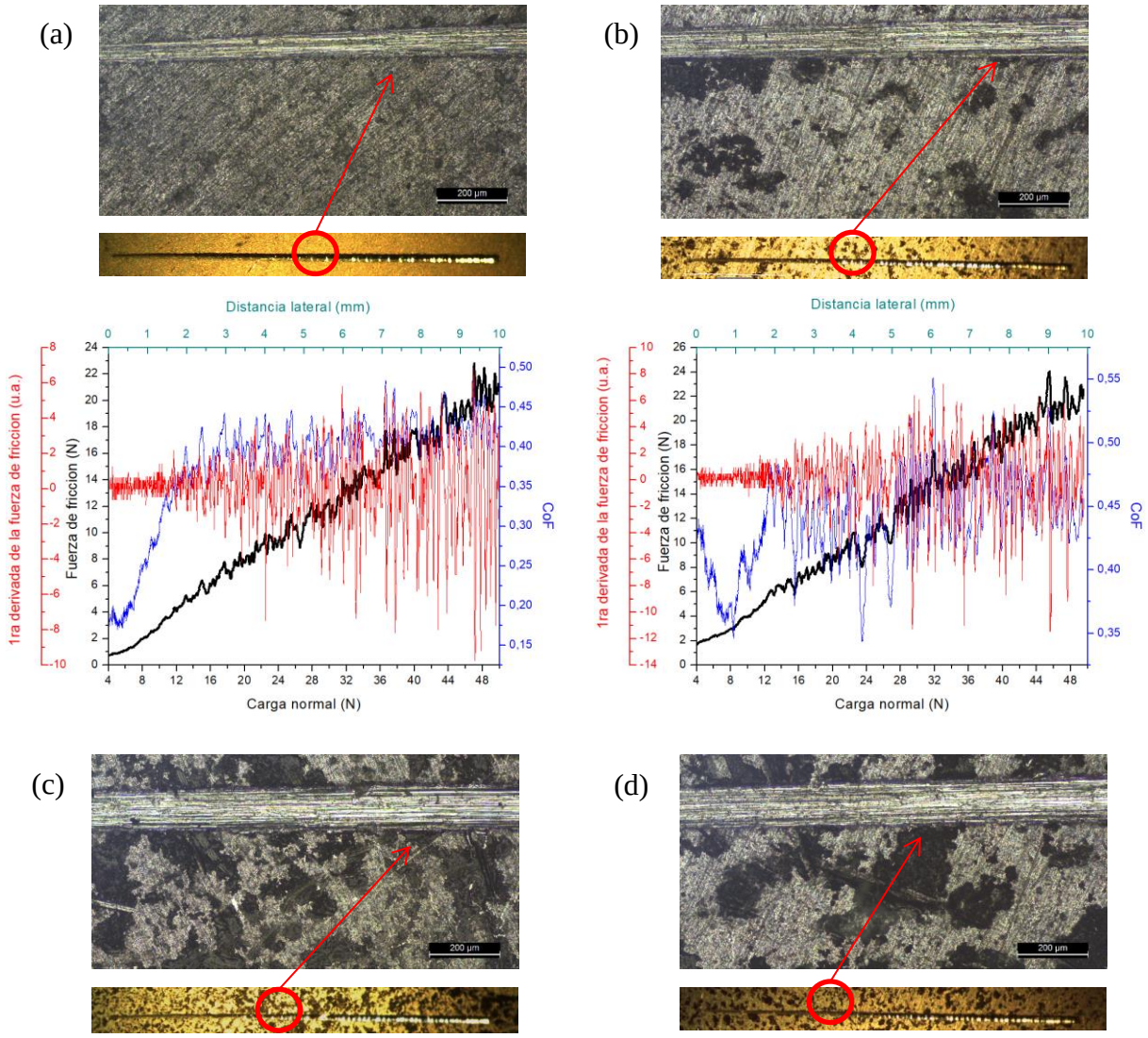
Zhang, Z.-L., Chen, X.-R., Bian, S., Huang, J., Zhang, T.-L., y Wang, K. (2014). Identification of dicalcium phosphate dihydrate deposited during osteoblast mineralization in vitro. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *131*, 109–114. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.11.006

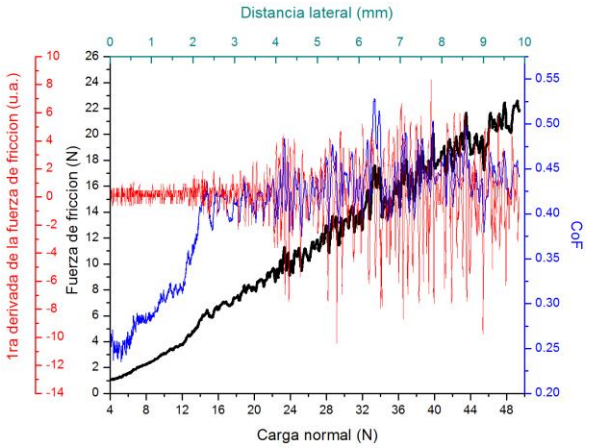
Zhao, M.-H., Wang, Z.-L., y Mao, S. X. (2004). Piezoelectric Characterization of Individual Zinc Oxide Nanobelt Probed by Piezoresponse Force Microscope. *Nano Letters*, *4*(4), 587–590. https://doi.org/10.1021/nl035198a

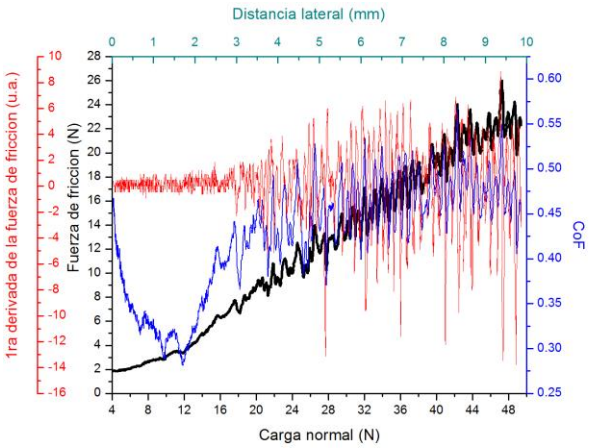
Zhu, C., Li, K., Wong, H., Tong, W., Kwok, K., y Tjong, S. (2013). Novel polypropylene biocomposites reinforced with carbon nanotubes and hydroxyapatite nanorods for bone replacements. *Materials Science and Engineering C*, *33*, 1380–1388. http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2012.12.039

Apéndices

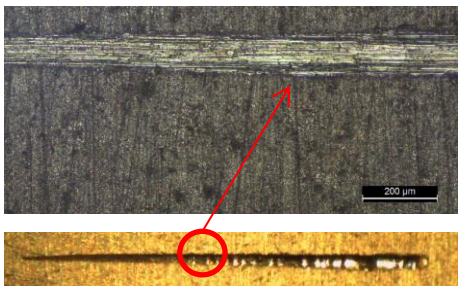
Apéndice A. Scratch test y micrografías de rayado de los recubrimientos PCL/NTC, PCL/FC/NTC, COL/NTC y COL/FC/NTC.



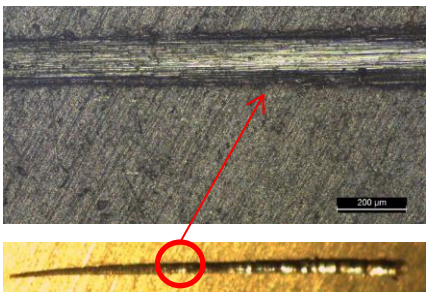

Distancia lateral (mm)
1ra derivada de la fuerza de friccion (u.a.)
Fuerza de friccion (N)
CoF
Carga normal (N)

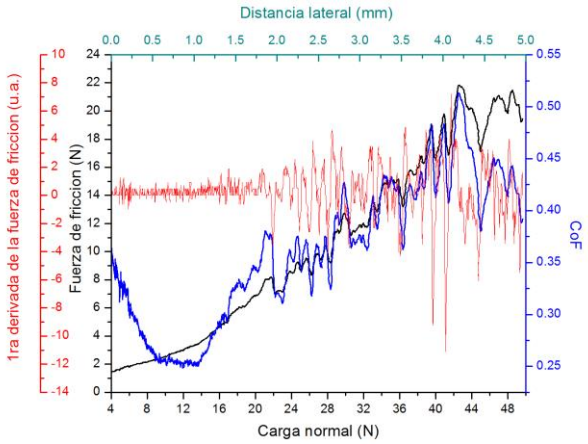

Distancia lateral (mm)
1ra derivada de la fuerza de friccion (u.a.)
Fuerza de friccion (N)
CoF
Carga normal (N)

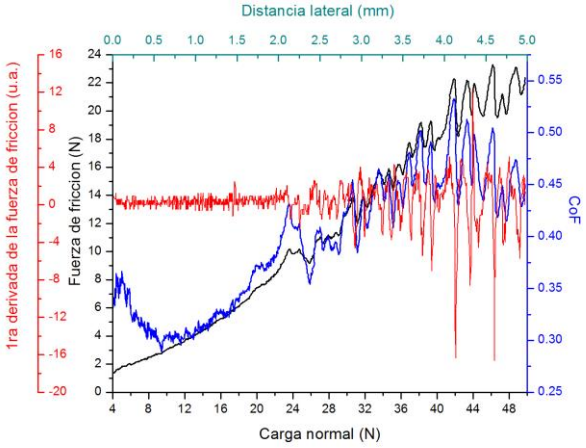
(e)


200 µm

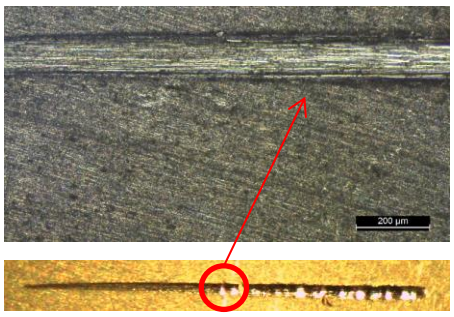
(f)


200 µm

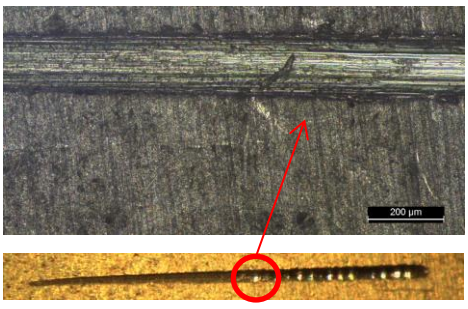

Distancia lateral (mm)
1ra derivada de la fuerza de friccion (u.a.)
Fuerza de friccion (N)
CoF
Carga normal (N)

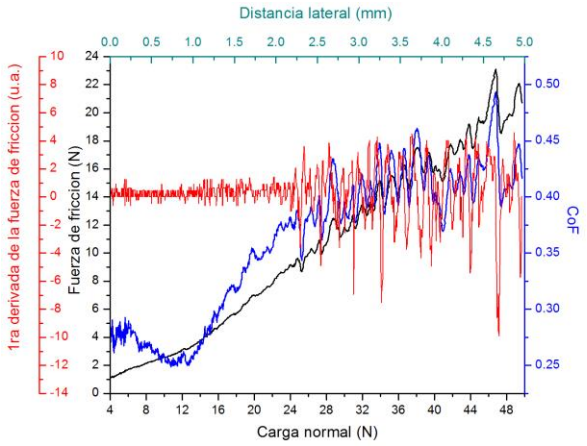

Distancia lateral (mm)
1ra derivada de la fuerza de friccion (u.a.)
Fuerza de friccion (N)
CoF
Carga normal (N)

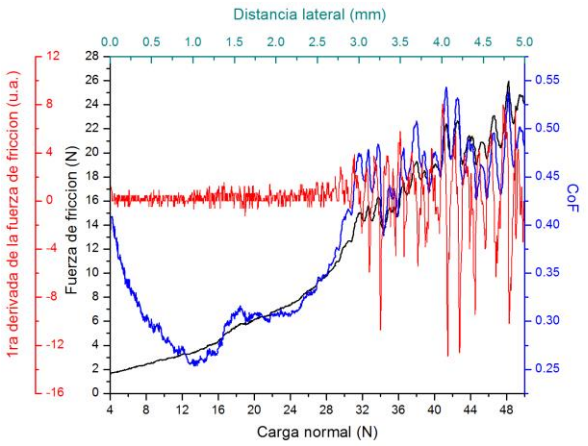
(g)


200 µm

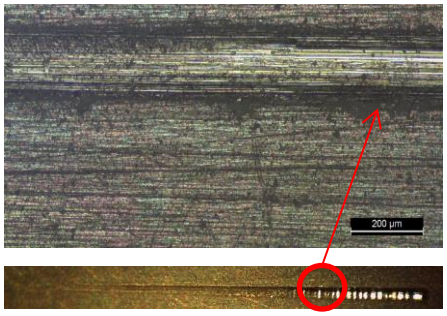
(h)


200 µm

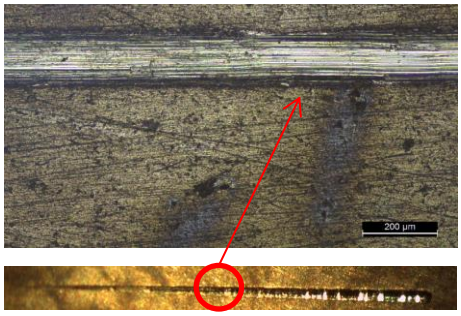

Distancia lateral (mm)
1ra derivada de la fuerza de friccion (u.a.)
Fuerza de friccion (N)
CoF
Carga normal (N)

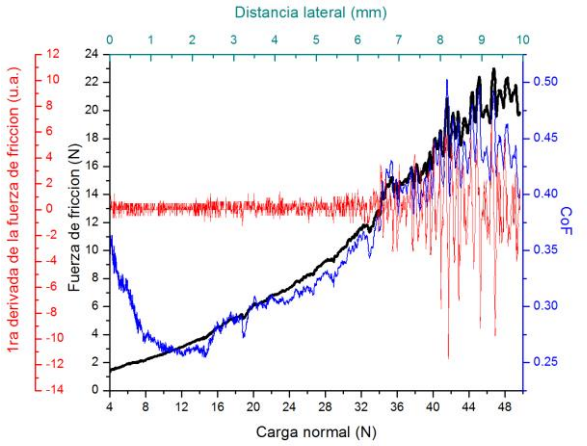

Distancia lateral (mm)
1ra derivada de la fuerza de friccion (u.a.)
Fuerza de friccion (N)
CoF
Carga normal (N)

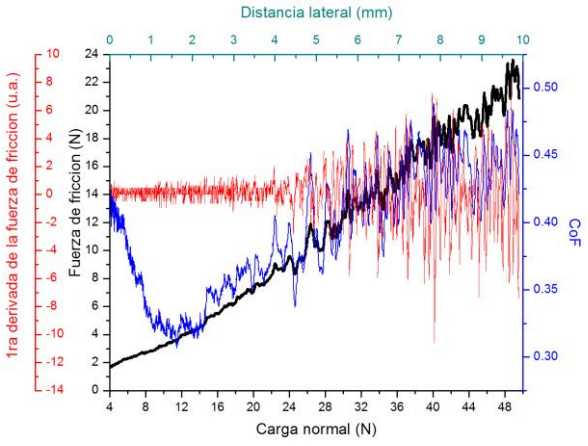
(i)


200 µm

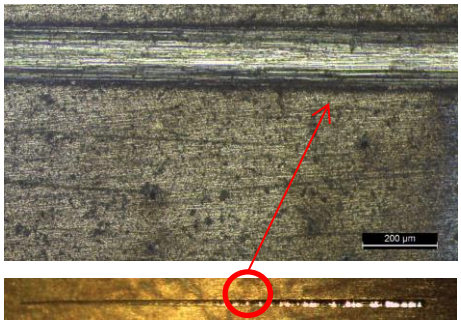
(j)


200 µm

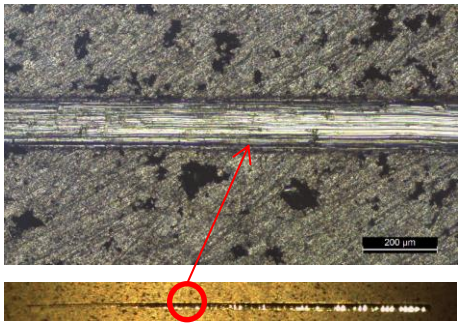

Distancia lateral (mm)
1ra derivada de la fuerza de friccion (u.a.)
Fuerza de friccion (N)
CoF
Carga normal (N)

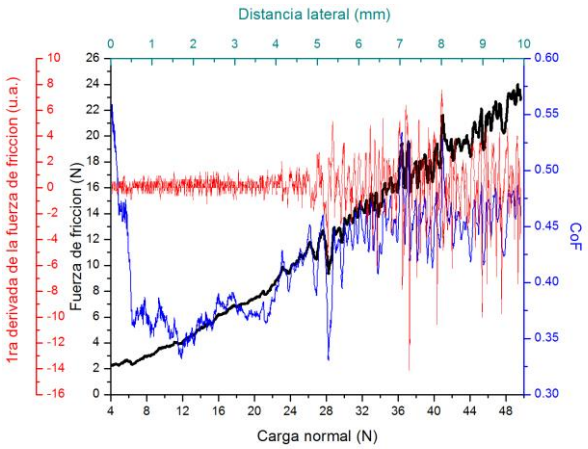

Distancia lateral (mm)
1ra derivada de la fuerza de friccion (u.a.)
Fuerza de friccion (N)
CoF
Carga normal (N)

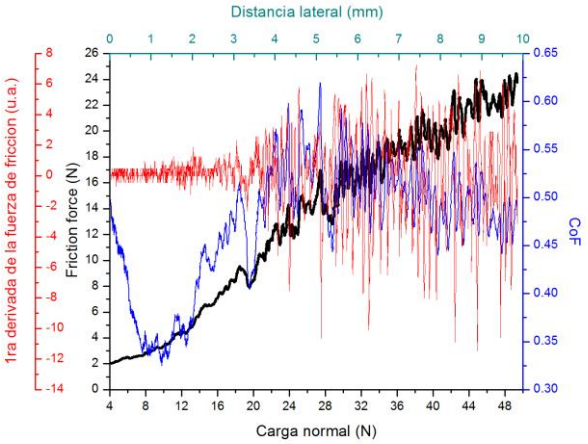
(k)


200 µm

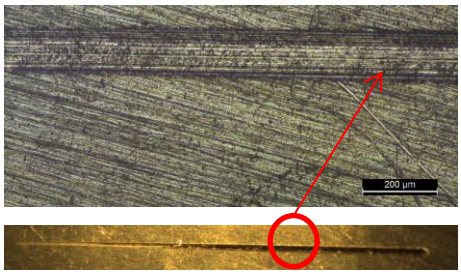
(l)


200 µm

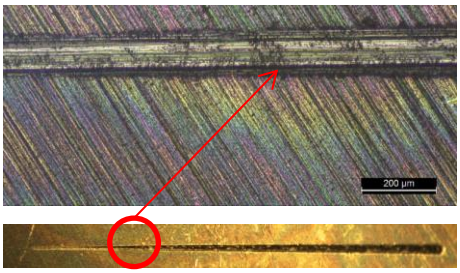

Distancia lateral (mm)
1ra derivada de la fuerza de friccion (u.a.)
Fuerza de friccion (N)
CoF
Carga normal (N)

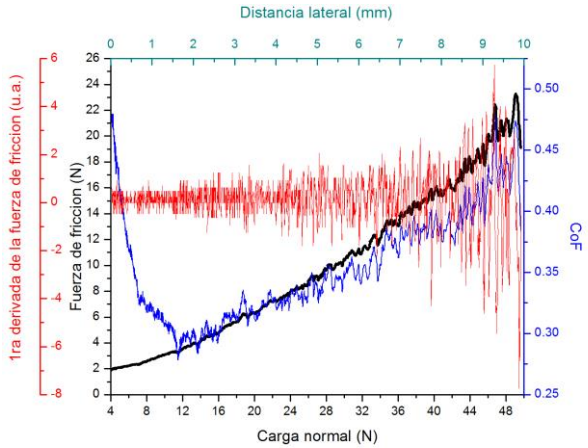

Distancia lateral (mm)
1ra derivada de la fuerza de friccion (u.a.)
Friction force (N)
CoF
Carga normal (N)

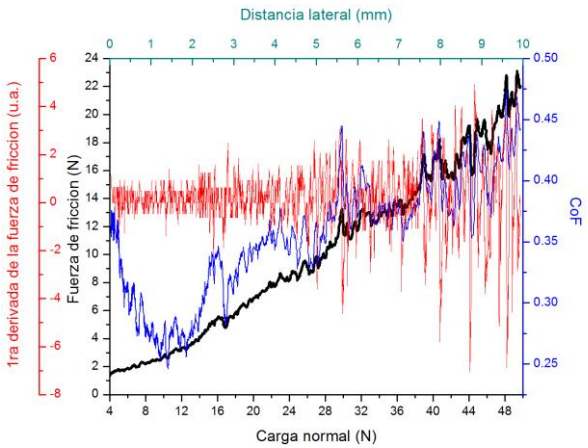
(m)


200 µm

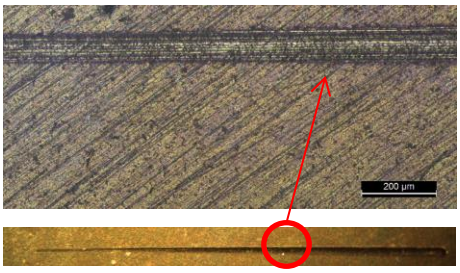
(n)


200 µm

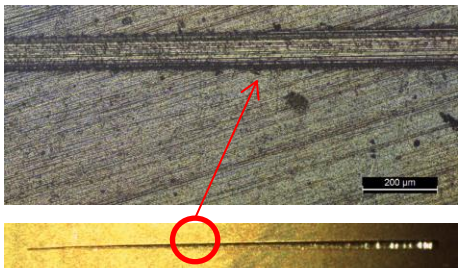

Distancia lateral (mm)
1ra derivada de la fuerza de friccion (u.a.)
Fuerza de friccion (N)
CoF
Carga normal (N)

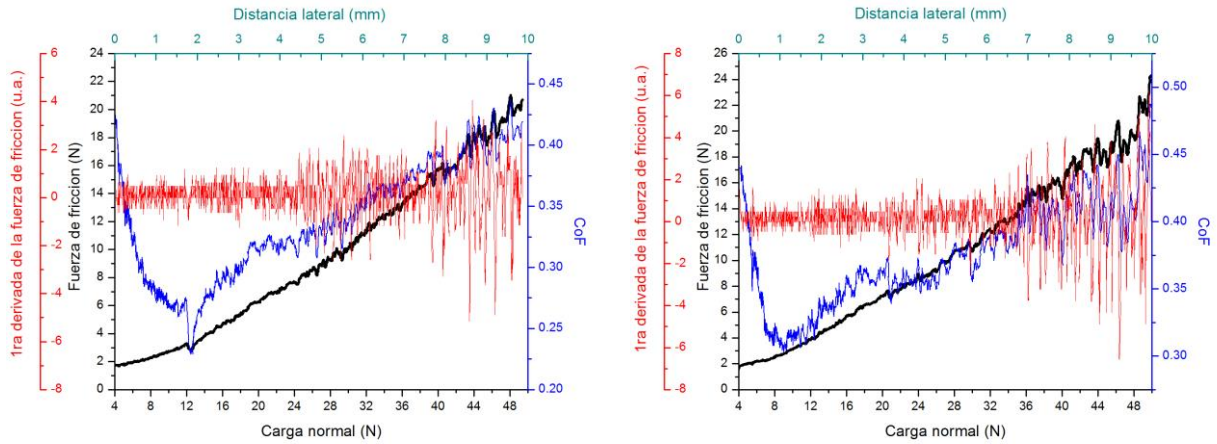

Distancia lateral (mm)
1ra derivada de la fuerza de friccion (u.a.)
Fuerza de friccion (N)
CoF
Carga normal (N)

(o)


200 µm

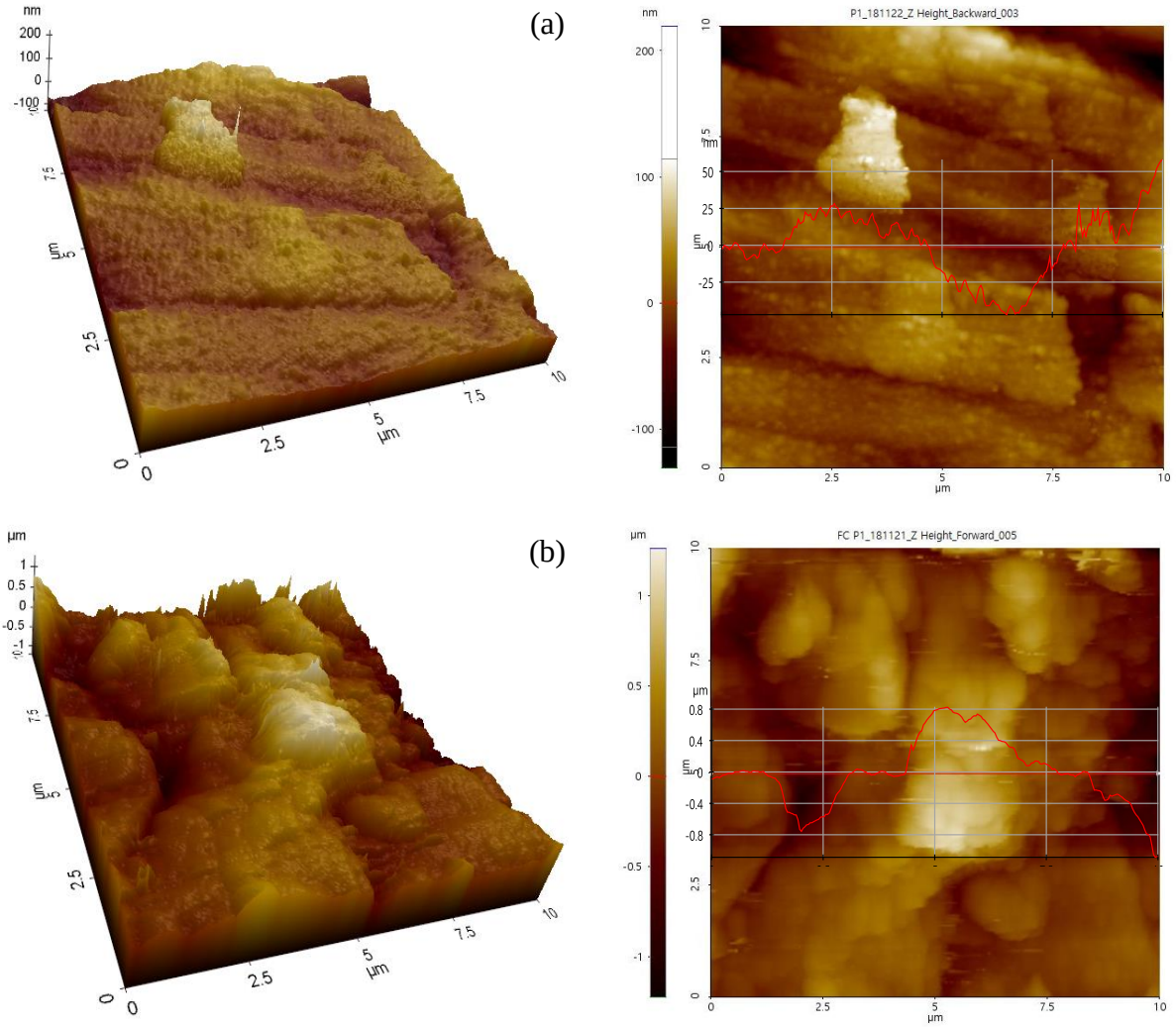
(p)

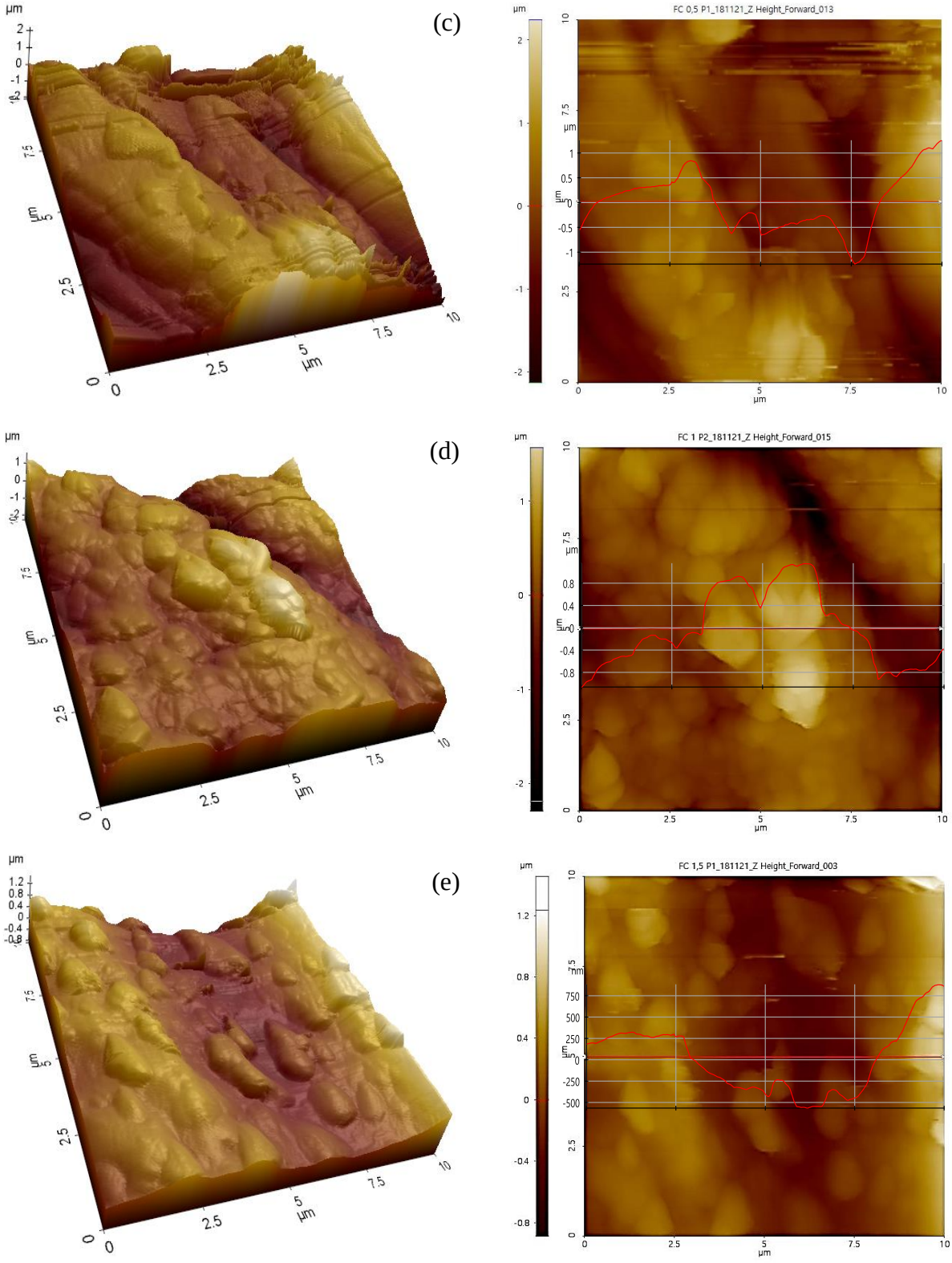

200 µm



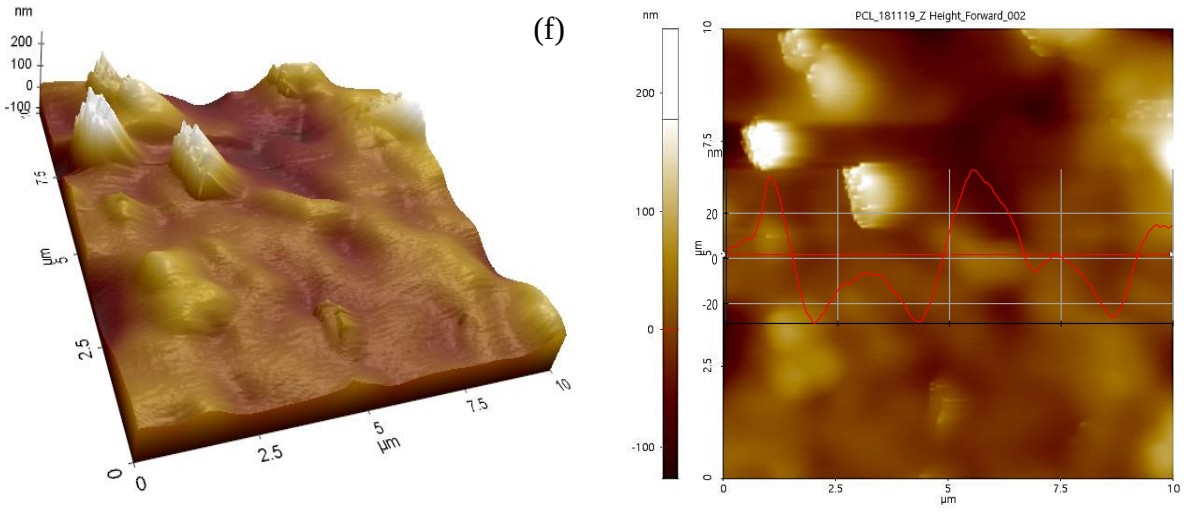
Scratch test de recubrimientos de PCL/NTC, PCL/FC/NTC, COL/NTC, COL/FC/NTC con diferentes concentraciones de nanotubos de carbono multipared. Variación de la fuerza de fricción, primera derivada de la fuerza de fricción, coeficiente de fricción vs distancia de rayado y carga normal (4 a 50 N). Imágenes de microscopio óptico del rayado, (a) PCL/NTC 0.0 g/L, (b) PCL/NTC 0.5 g/L, (c) PCL/NTC 1.0 g/L, (d) PCL/NTC 1.5 g/L, (e) PCL/FC/NTC 0.0 g/L, (f) PCL/FC/NTC 0.5 g/L, (g) PCL/FC/NTC 1.0 g/L, (h) PCL/FC/NTC 1.5 g/L, (i) COL/NTC 0.0 g/L, (j) COL/NTC 0.5 g/L, (k) COL/NTC 1.0 g/L, (l) COL/NTC 1.5 g/L, (m) COL/FC/NTC 0.0 g/L, (n) COL/FC/NTC 0.5 g/L, (o) COL/FC/NTC 1.0 g/L y (p) COL/FC/NTC 1.5 g/L. Barra de escala = 200 µm para (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p).

Apéndice B. Topografía 3D y perfil de rugosidad de Ti6Al4V y de los recubrimientos FC/NTC, PCL/NTC, PCL/FC/NTC, COL/NTC y COL/FC/NTC.

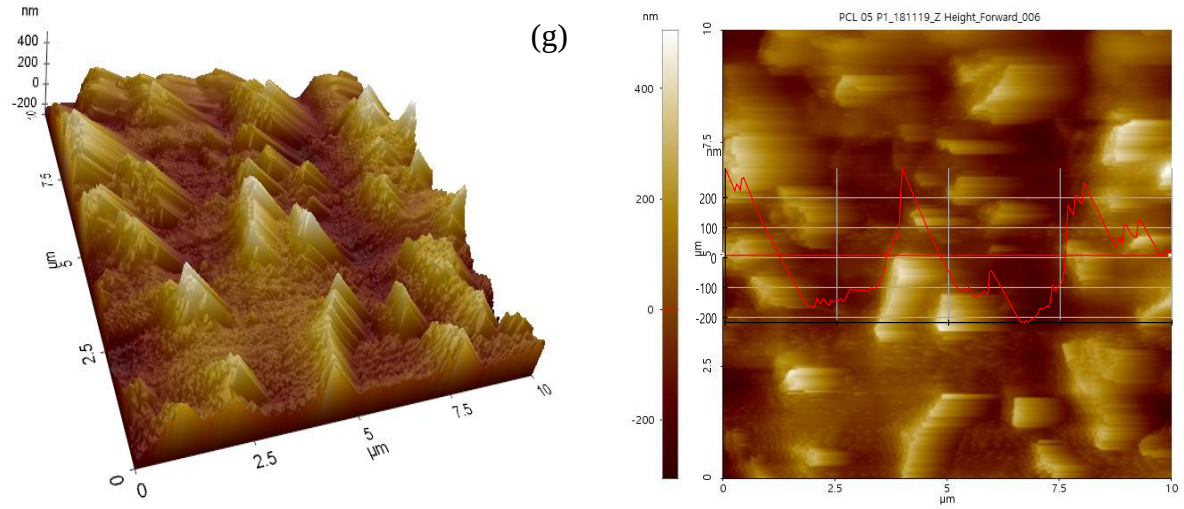



(c)
(d)
(e)
FC 0,5 P1_181121_Z Height_Forward_013
FC 1 P2_181121_Z Height_Forward_015
FC 1,5 P1_181121_Z Height_Forward_003
µm

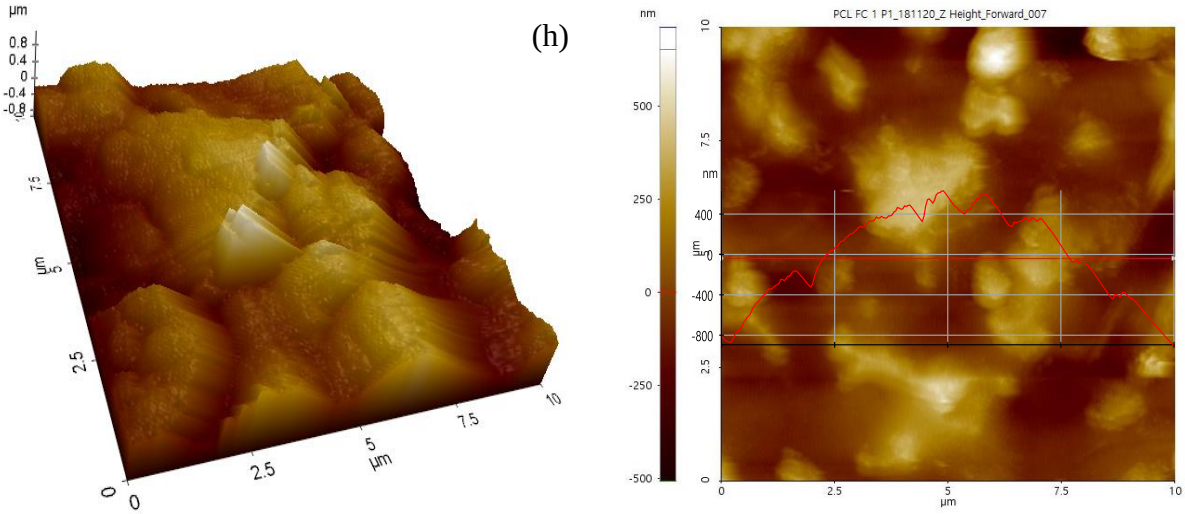
(f)

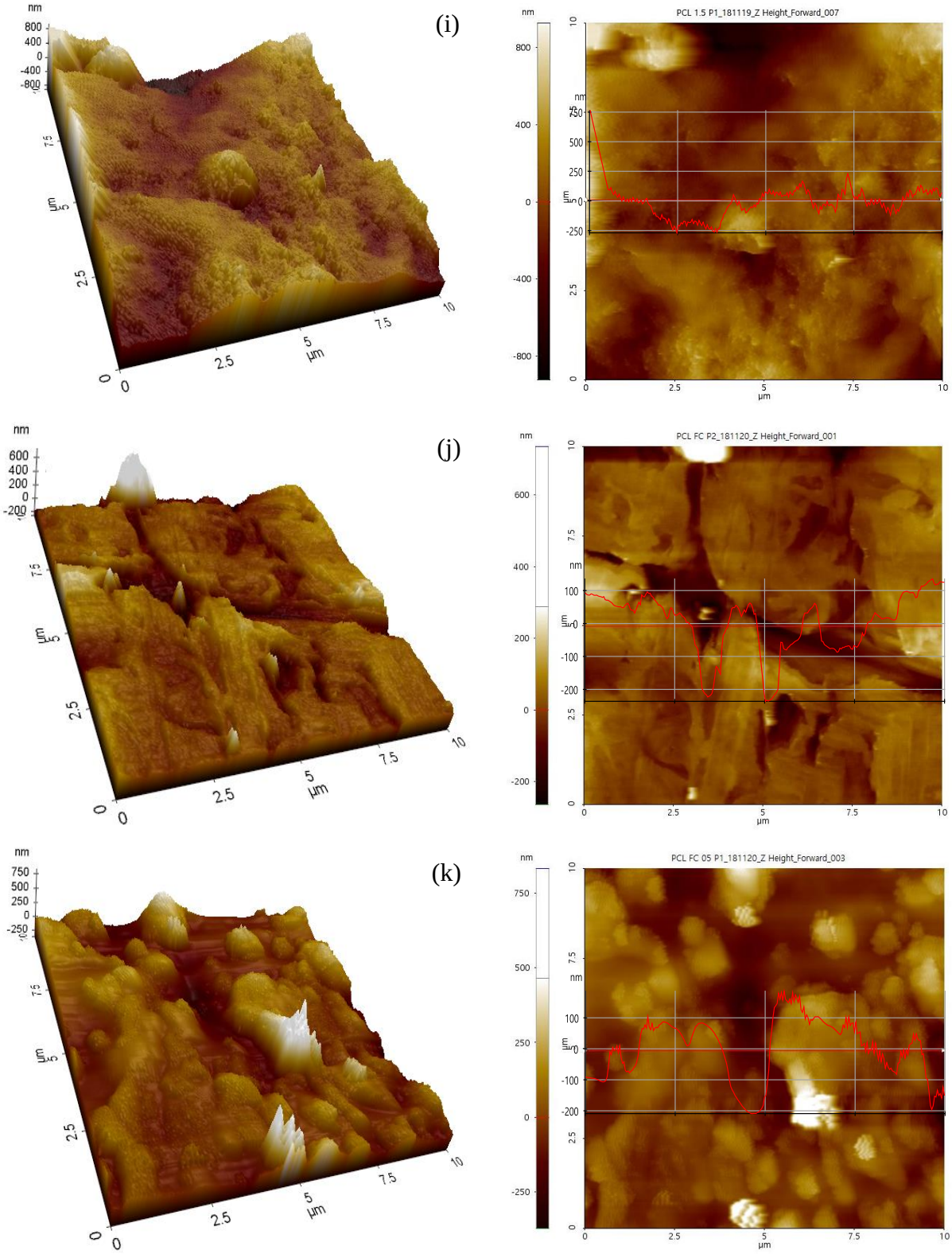

nm
200
100
0
-100
µm
0
2.5
5
7.5
10
PCL_181119_Z Height_Forward_002
nm
20
0
-20
µm

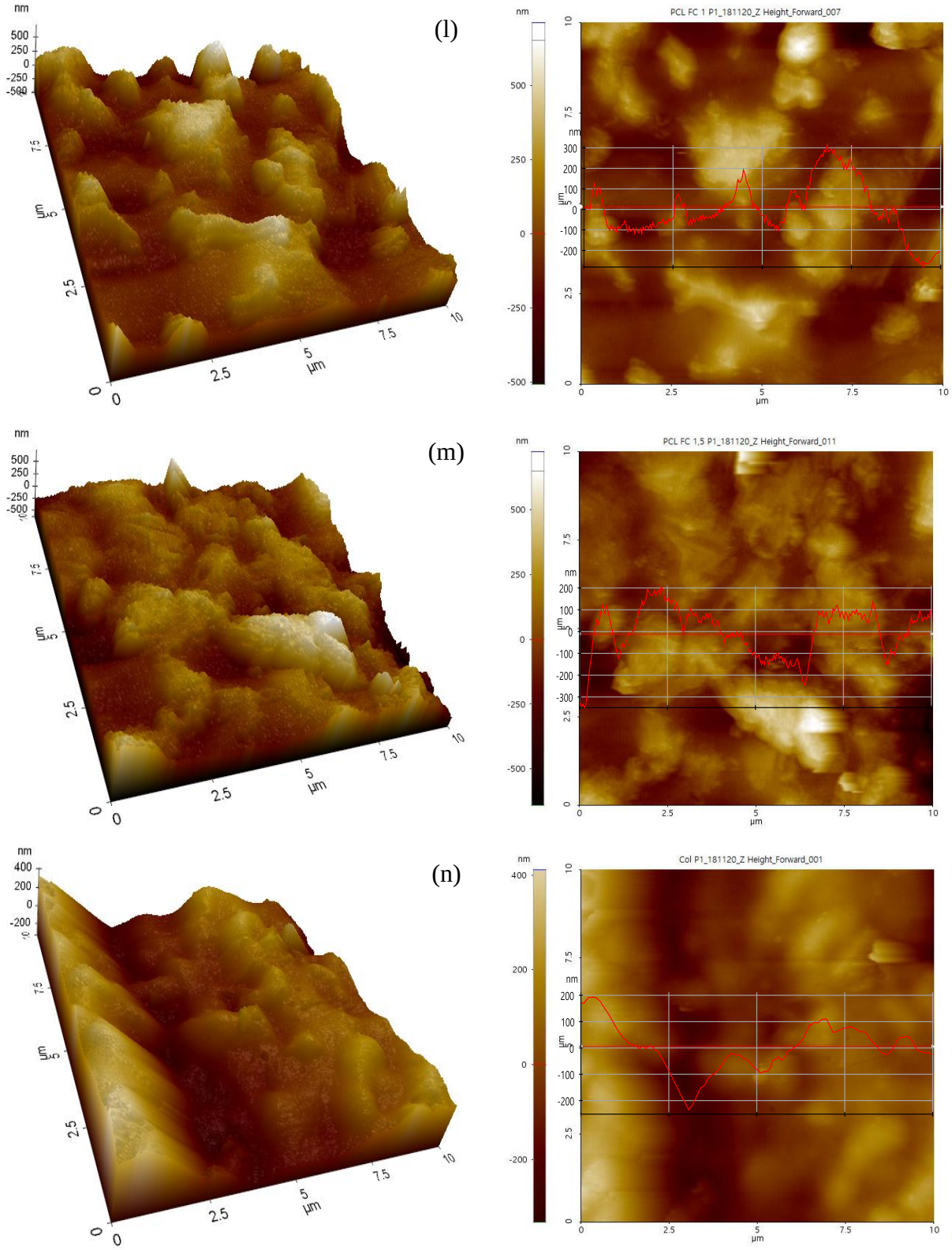
(g)

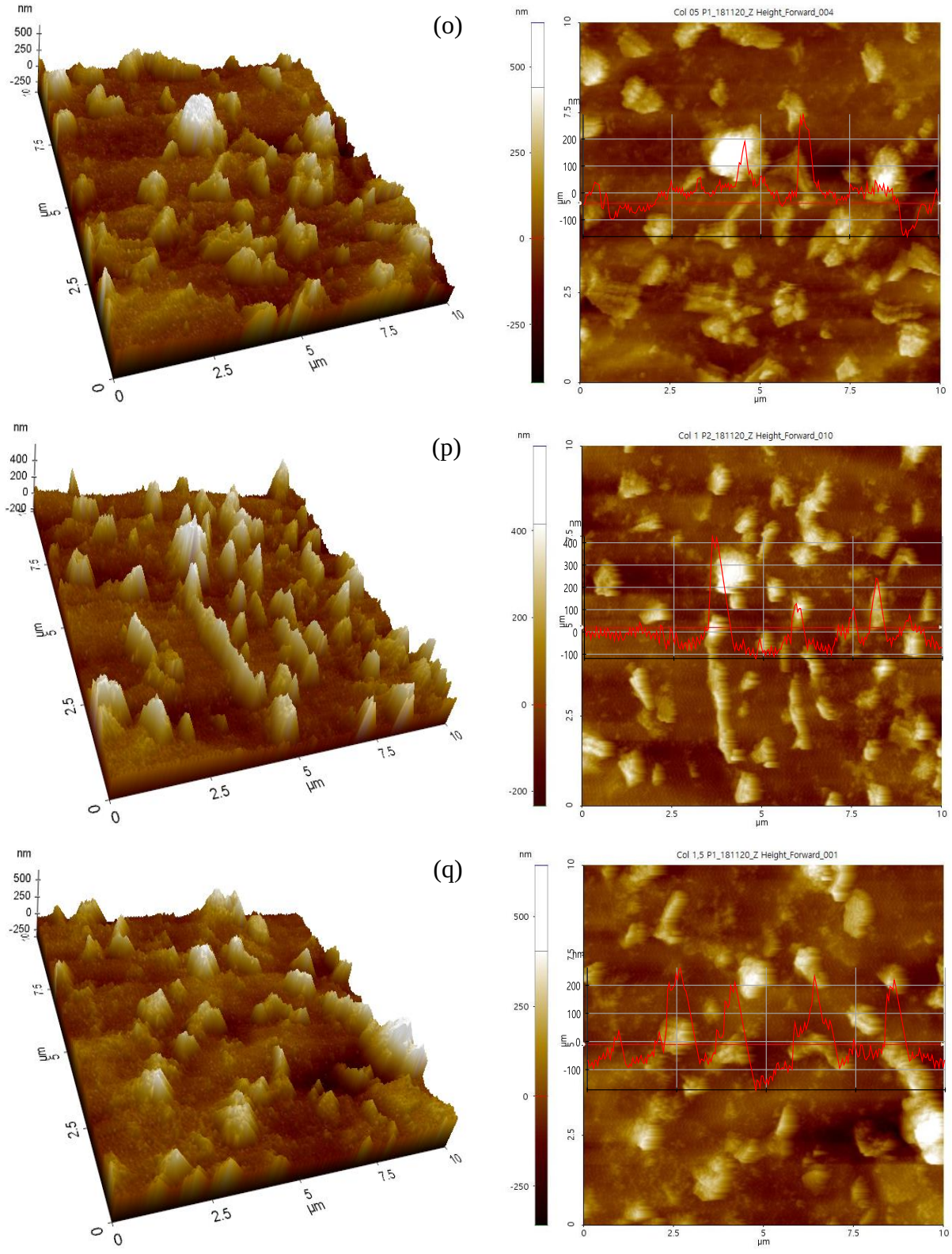

nm
400
200
0
-200
µm
0
2.5
5
7.5
10
PCL 05 P1_181119_Z Height_Forward_006
nm
200
100
0
-100
-200
µm

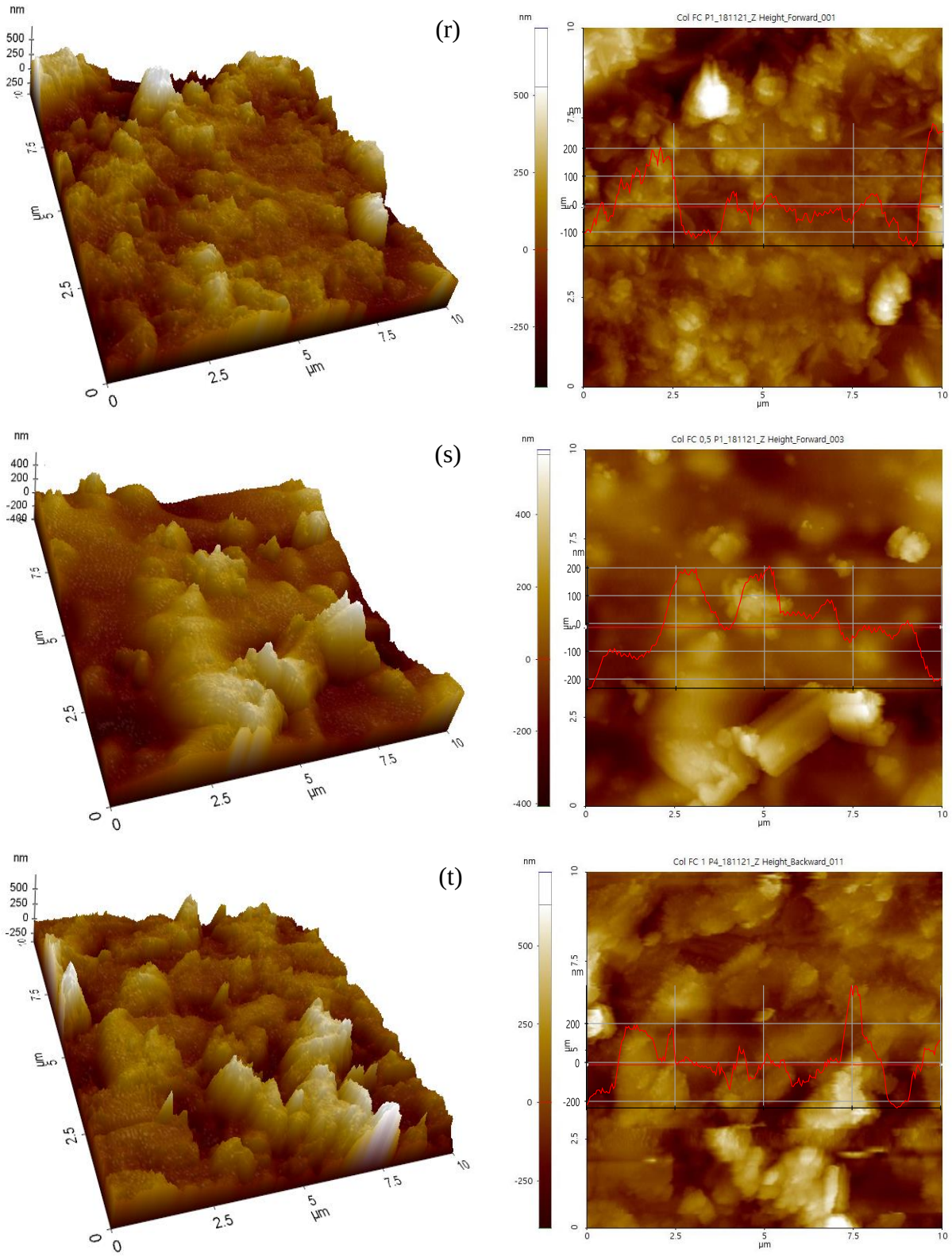
(h)

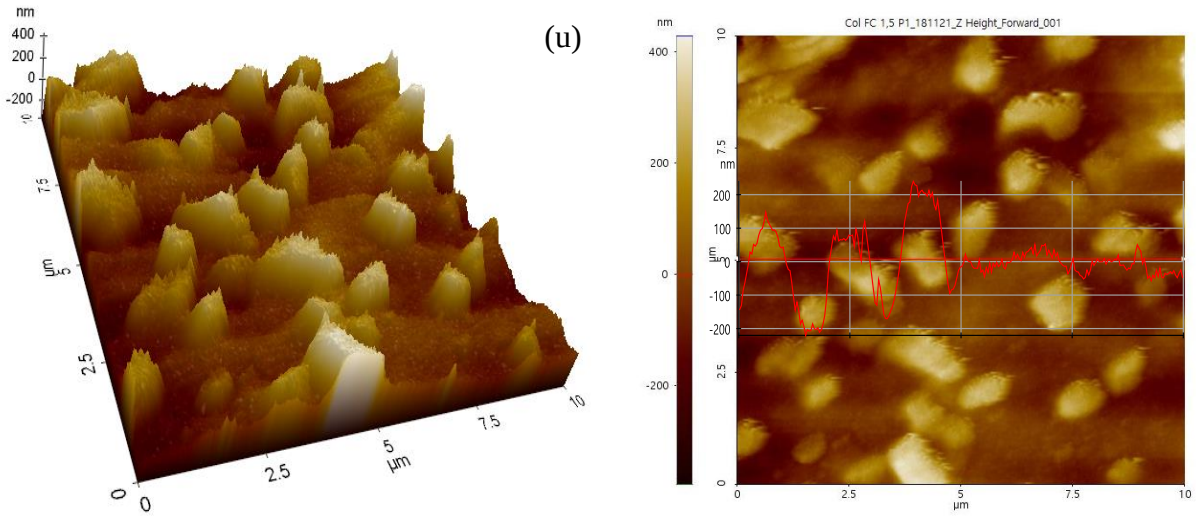

µm
0.8
0.4
0
-0.4
-0.8
0
2.5
5
7.5
10
PCL FC 1 P1_181120_Z Height_Forward_007
nm
500
250
0
-250
-500
400
0
-400
-800
µm


(i)
(j)
(k)
PCL 1.5 P1_181119_Z Height_Forward_007
PCL FC P2_181120_Z Height_Forward_001
PCL FC 05 P1_181120_Z Height_Forward_003
nm
µm


(l)
(m)
(n)
PCL FC 1 P1_181120_Z Height_Forward_007
PCL FC 1,5 P1_181120_Z Height_Forward_011
Col P1_181120_Z Height_Forward_001
nm
µm

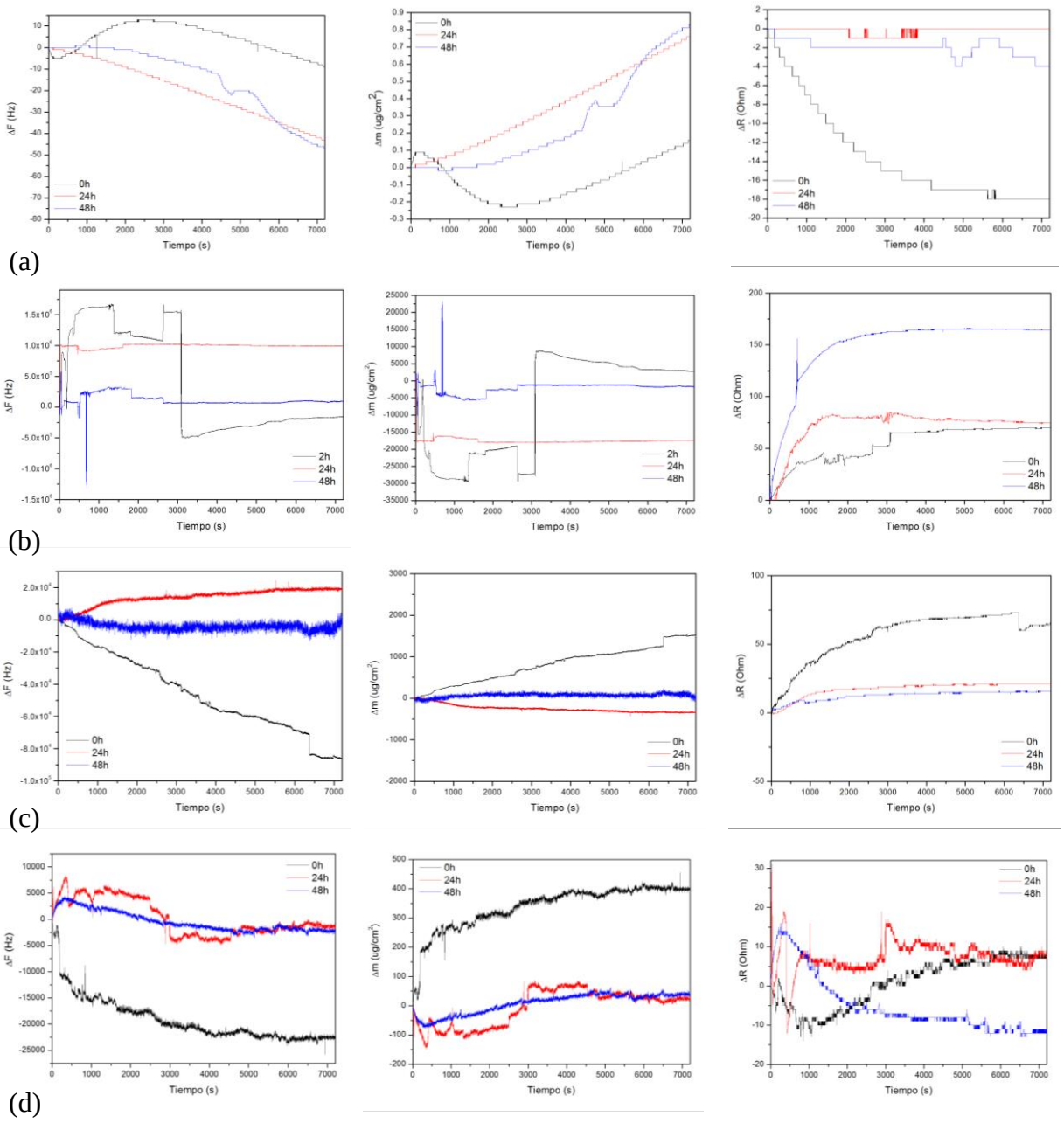

(o)
(p)
(q)
nm
µm
Col 05 P1_181120_Z Height_Forward_004
Col 1 P2_181120_Z Height_Forward_010
Col 1,5 P1_181120_Z Height_Forward_001

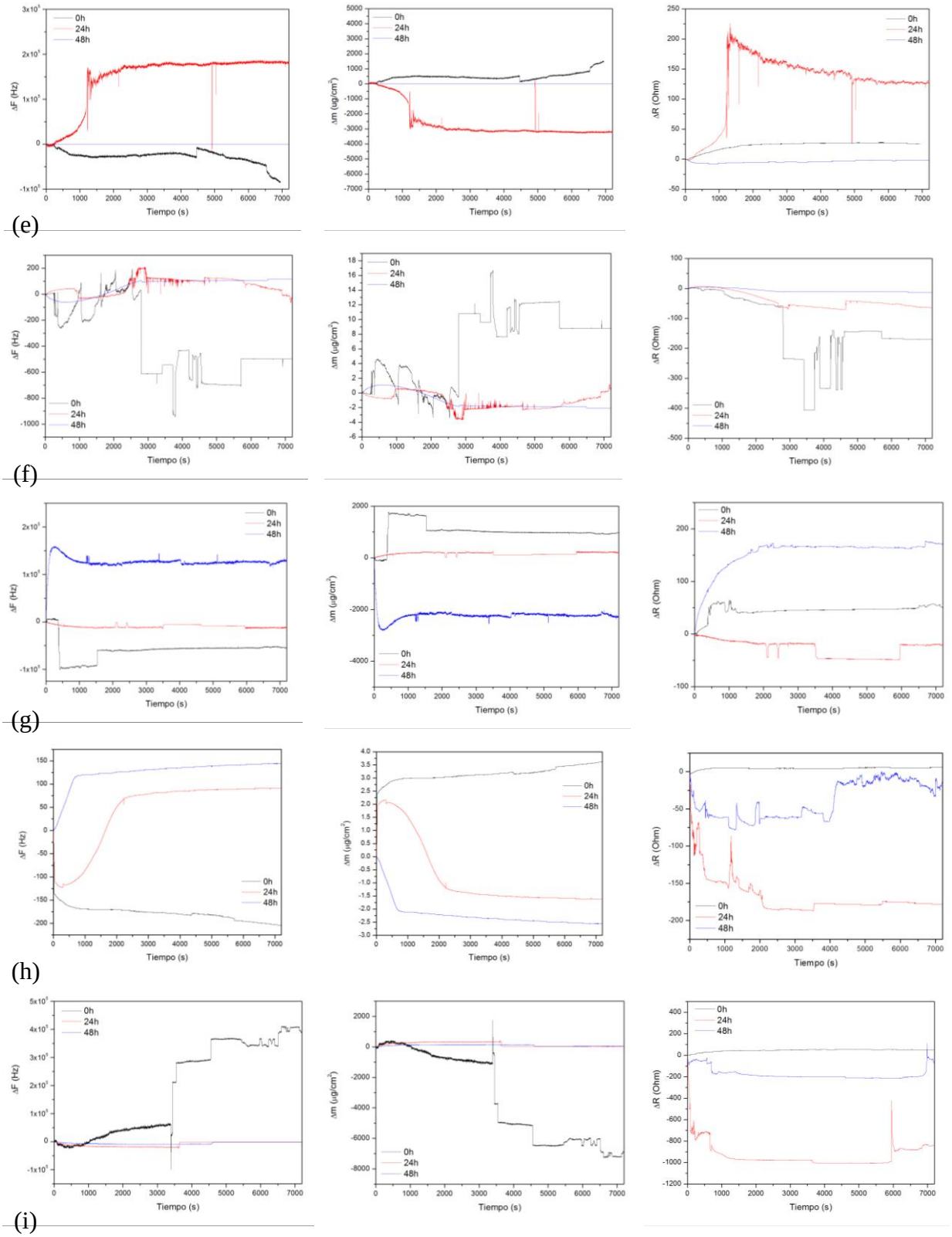

(r)
(s)
(t)
nm
µm
Col FC P1_181121_Z Height_Forward_001
Col FC 0,5 P1_181121_Z Height_Forward_003
Col FC 1 P4_181121_Z Height_Backward_011

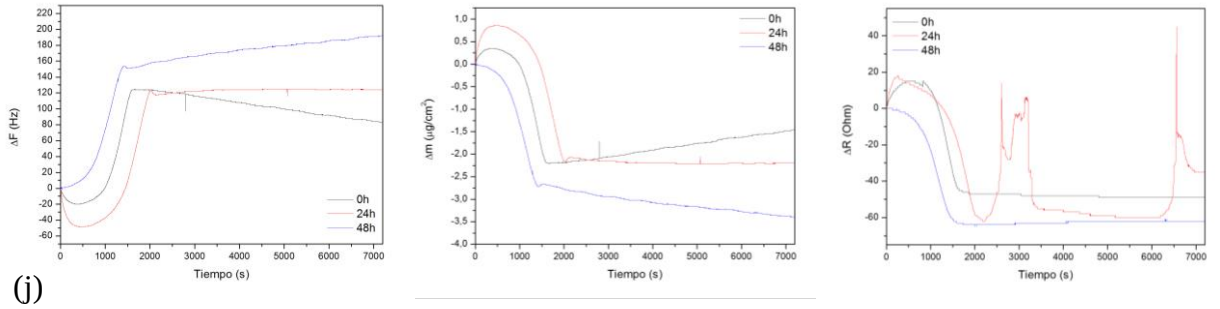


Topografía 3D y perfil de rugosidad de Ti6Al4V y recubrimientos cerámicos y poliméricos. Los valores de la rugosidad media aritmética fueron calculados con el área total de la micrografía. El perfil de rugosidad se estimó con una línea roja mostrada en la imágen. (a) Ti6Al4V, (b) FC/NTC 0.0 g/L, (c) FC/NTC 0.5 g/L, (d) FC/NTC 1.0 g/L, (e) FC/NTC 1.5 g/L, (f) PCL/NTC 0.0 g/L, (g) PCL/NTC 0.5 g/L, (h) PCL/NTC 1.0 g/L, (i) PCL/NTC 1.5 g/L, (j) PCL/FC/NTC 0.0 g/L, (k) PCL/FC/NTC 0.5 g/L, (l) PCL/FC/NTC 1.0 g/L, (m) PCL/FC/NTC 1.5 g/L, (n) COL/NTC 0.0 g/L, (o) COL/NTC 0.5 g/L, (p) COL/NTC 1.0 g/L, (q) COL/NTC 1.5 g/L, (r) COL/FC/NTC 0.0 g/L, (s) COL/FC/NTC 0.5 g/L, (t) COL/FC/NTC 1.0 g/L y (u) COL/FC/NTC 1.5 g/L.

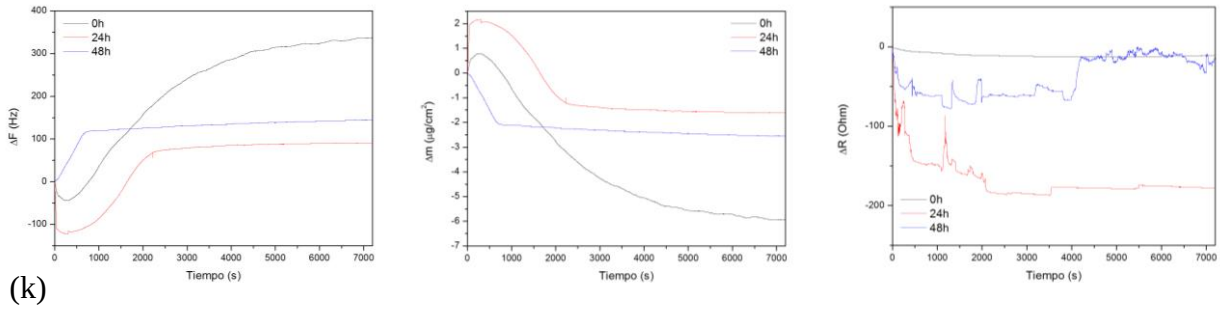
Apéndice C. Cambio en la frecuencia, masa y resistencia en un cristal de cuarzo y recubrimientos cerámicos y poliméricos a 0, 24 y 48 h



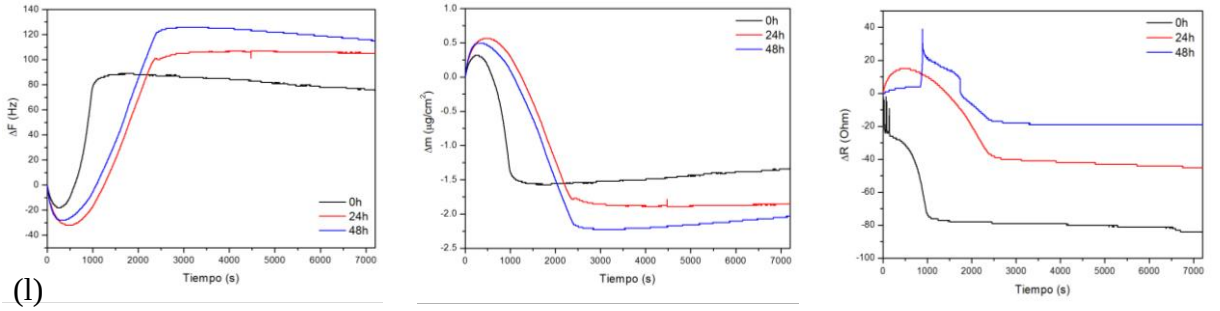

0h
24h
48h
ΔF (Hz)
Δm (μg/cm²)
ΔR (Ohm)
Tiempo (s)
(e)
(f)
(g)
(h)
(i)


ΔF (Hz)
Δm (μg/cm²)
ΔR (Ohm)
Tiempo (s)
0h
24h
48h

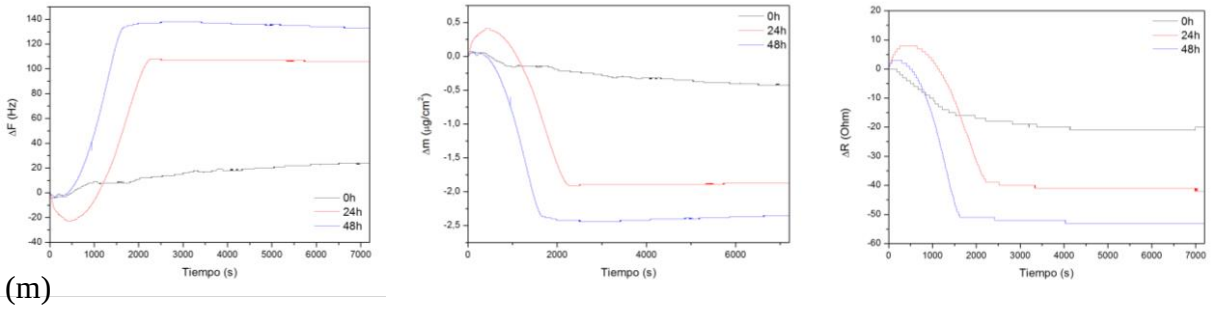
(j)


ΔF (Hz)
Δm (μg/cm²)
ΔR (Ohm)
Tiempo (s)
0h
24h
48h

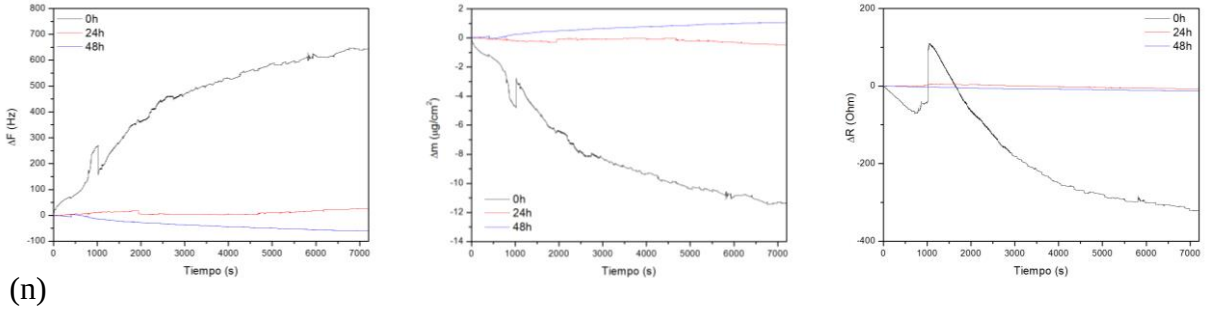
(k)


ΔF (Hz)
Δm (μg/cm²)
ΔR (Ohm)
Tiempo (s)
0h
24h
48h

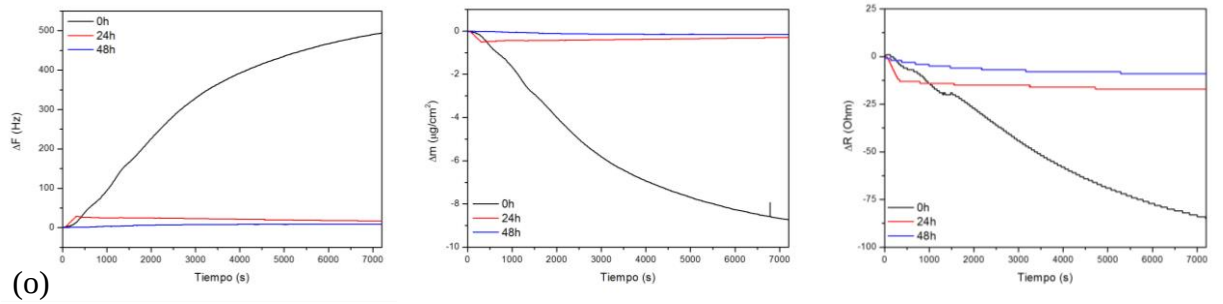
(l)


ΔF (Hz)
Δm (μg/cm²)
ΔR (Ohm)
Tiempo (s)
0h
24h
48h

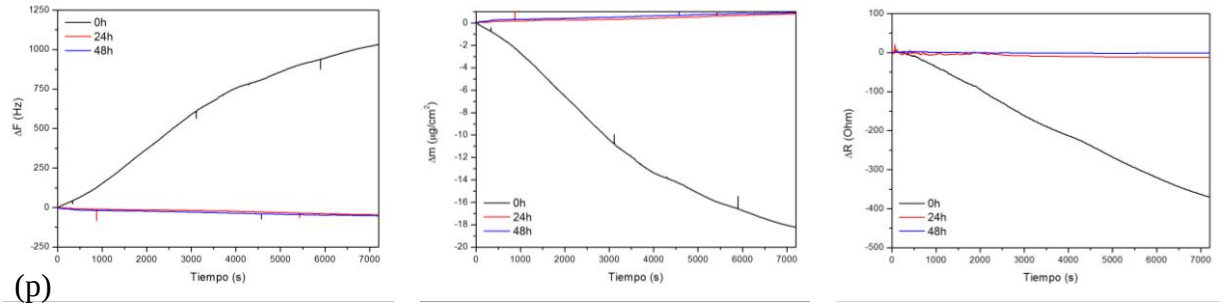
(m)


ΔF (Hz)
Δm (μg/cm²)
ΔR (Ohm)
Tiempo (s)
0h
24h
48h

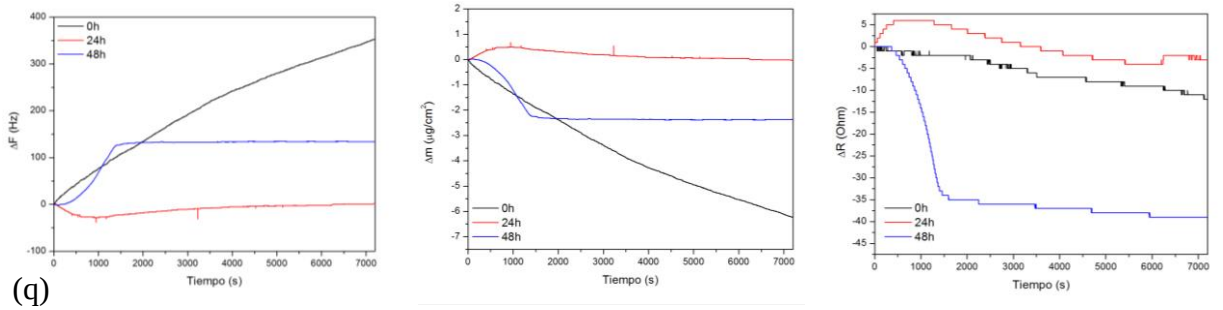
(n)


0h
24h
48h
ΔF (Hz)
Δm (μg/cm²)
ΔR (Ohm)
Tiempo (s)

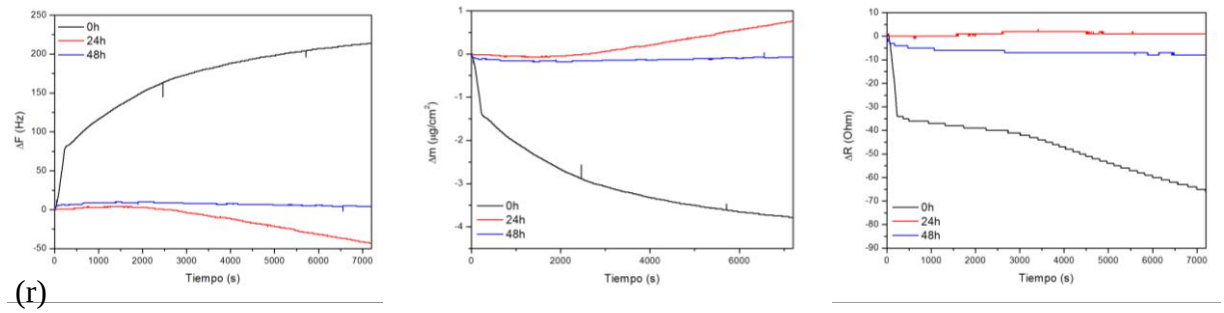
(o)


0h
24h
48h
ΔF (Hz)
Δm (μg/cm²)
ΔR (Ohm)
Tiempo (s)

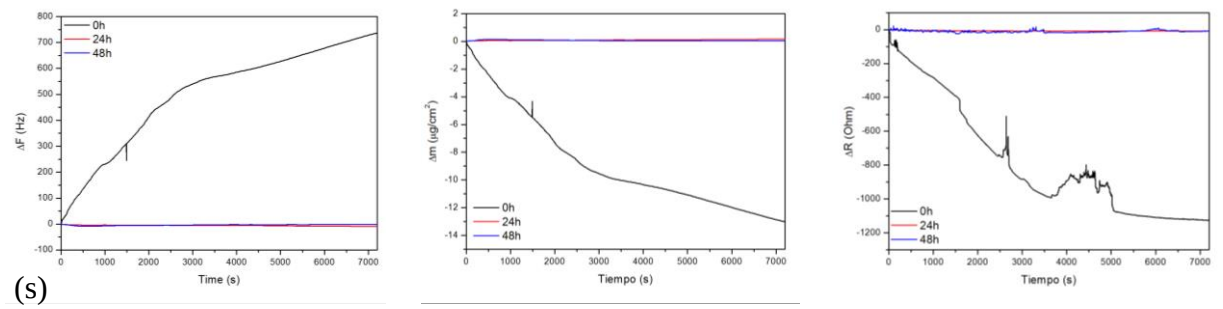
(p)


0h
24h
48h
ΔF (Hz)
Δm (μg/cm²)
ΔR (Ohm)
Tiempo (s)

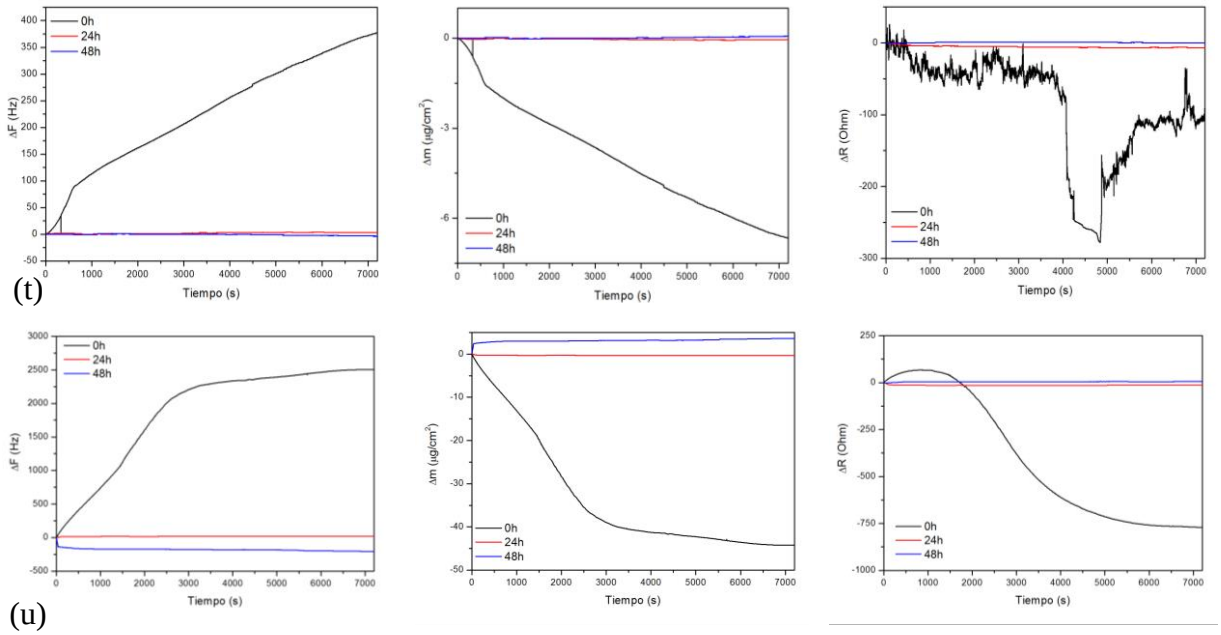
(q)


0h
24h
48h
ΔF (Hz)
Δm (μg/cm²)
ΔR (Ohm)
Tiempo (s)

(r)

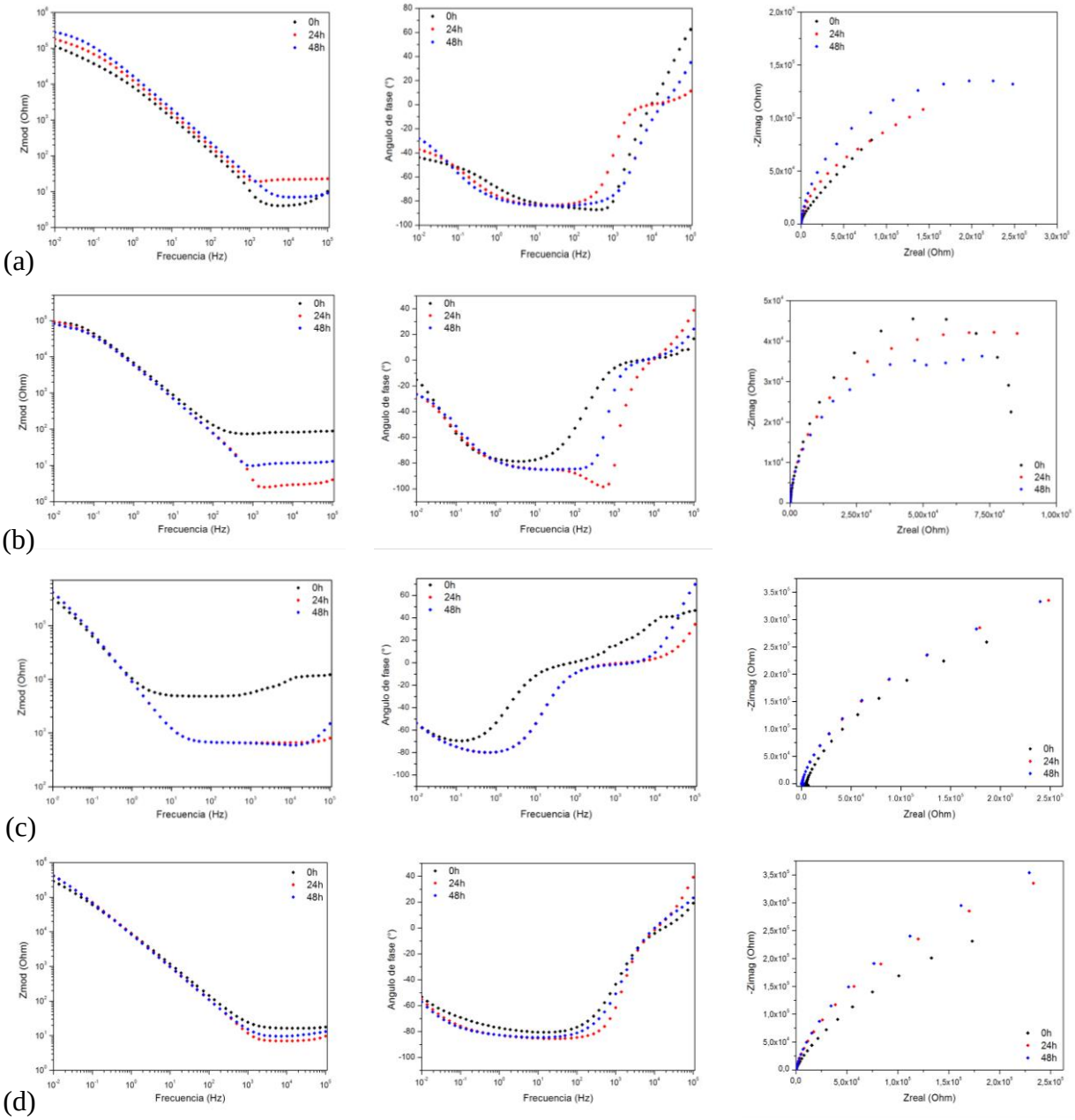

0h
24h
48h
ΔF (Hz)
Δm (μg/cm²)
ΔR (Ohm)
Time (s)
Tiempo (s)

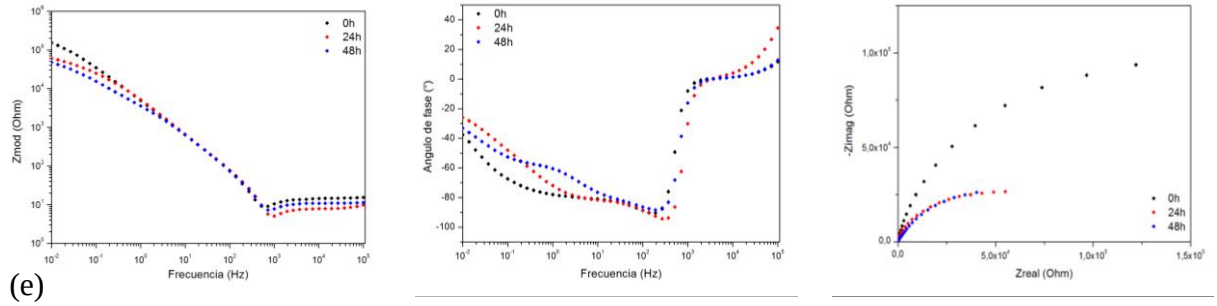
(s)



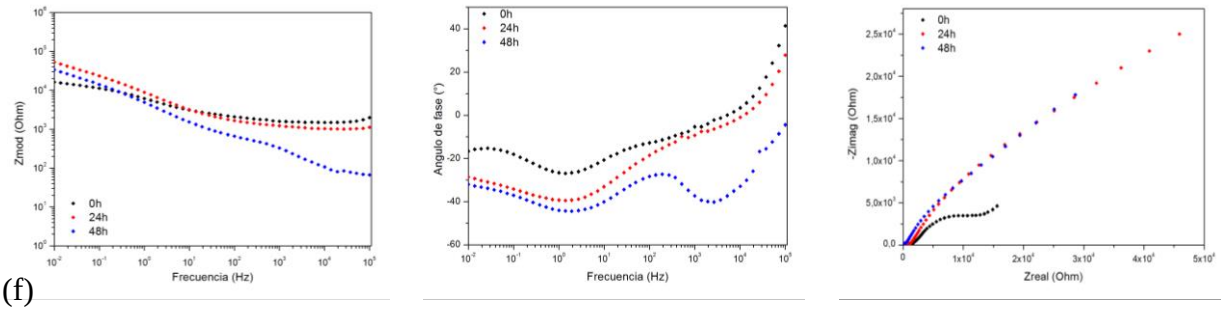
Cambio en la frecuencia, masa y resistencia en un cristal de cuarzo y recubrimientos cerámicos y poliméricos a 0, 24 y 48 h de medición en la presencia de células HOS en una concentración de 15000 cel/ml. (a) Cristal de cuarzo, (b) FC/NTC 0.0 g/L, (c) FC/NTC 0.5 g/L, (d) FC/NTC 1.0 g/L, (e) FC/NTC 1.5 g/L, (f) PCL/NTC 0.0 g/L, (g) PCL/NTC 0.5 g/L, (h) PCL/NTC 1.0 g/L, (i) PCL/NTC 1.5 g/L, (j) PCL/FC/NTC 0.0 g/L, (k) PCL/FC/NTC 0.5 g/L, (l) PCL/FC/NTC 1.0 g/L, (m) PCL/FC/NTC 1.5 g/L, (n) COL/NTC 0.0 g/L, (o) COL/NTC 0.5 g/L, (p) COL/NTC 1.0 g/L, (q) COL/NTC 1.5 g/L, (r) COL/FC/NTC 0.0 g/L, (s) COL/FC/NTC 0.5 g/L, (t) COL/FC/NTC 1.0 g/L y (u) COL/FC/NTC 1.5 g/L.

Apéndice D. Diagramas de Bode, Nyquist y parámetros de los circuitos equivalentes eléctricos

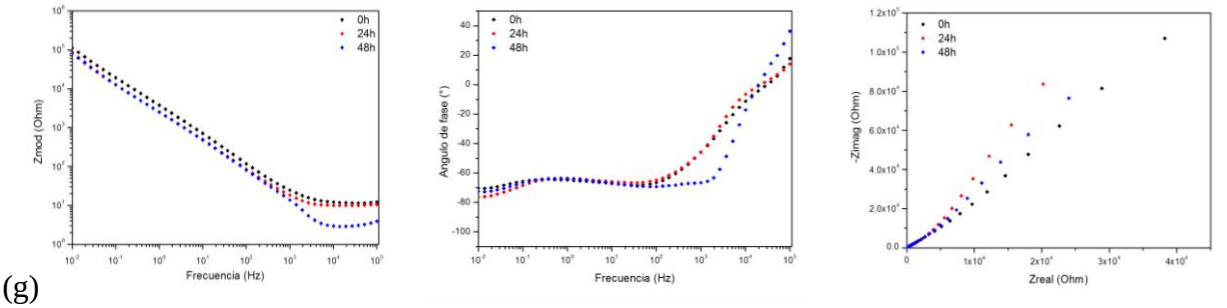



Zmod (Ohm)
Frecuencia (Hz)
Angulo de fase (°)
-Zimag (Ohm)
Zreal (Ohm)
0h
24h
48h

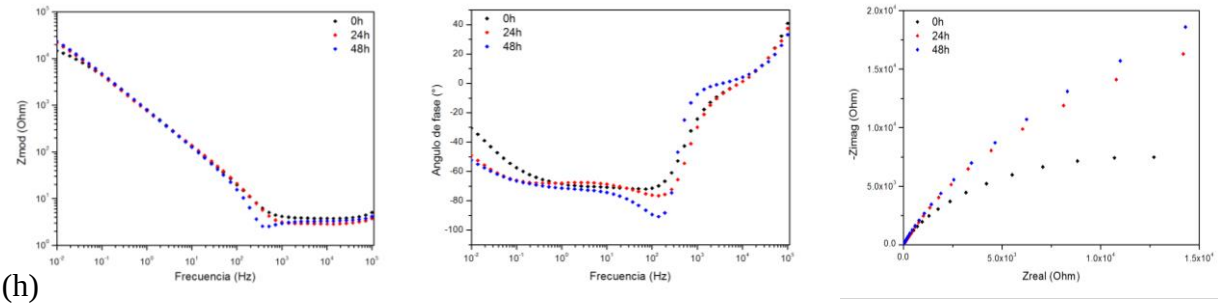
(e)


Zmod (Ohm)
Frecuencia (Hz)
Angulo de fase (°)
-Zimag (Ohm)
Zreal (Ohm)
0h
24h
48h

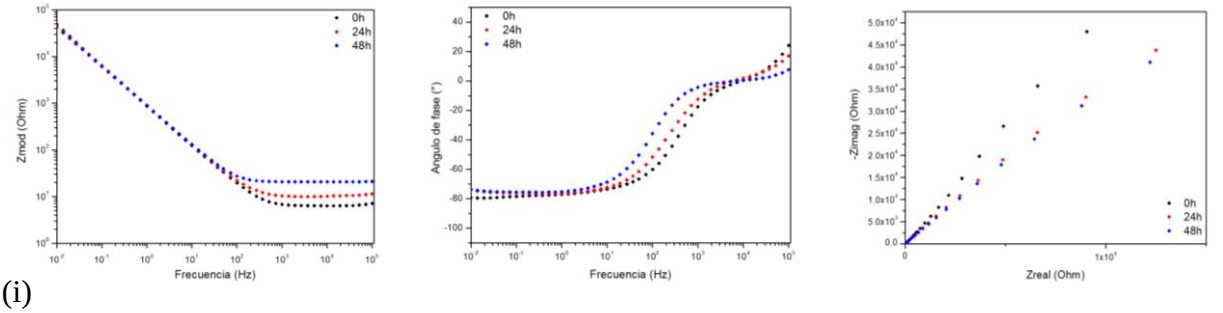
(f)


Zmod (Ohm)
Frecuencia (Hz)
Angulo de fase (°)
-Zimag (Ohm)
Zreal (Ohm)
0h
24h
48h

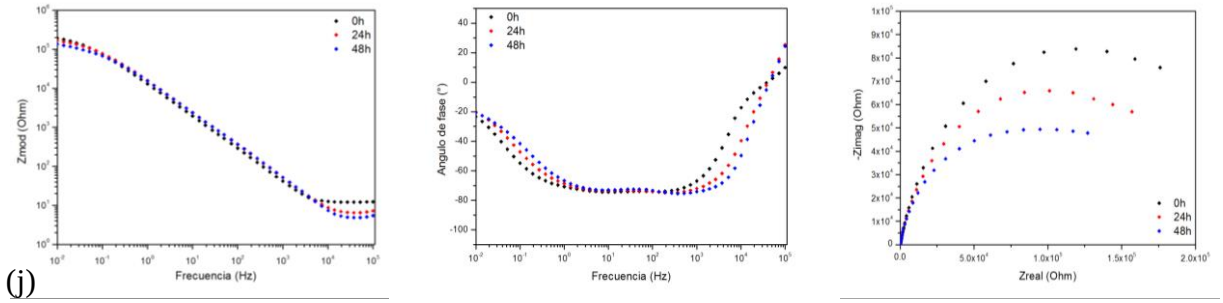
(g)


Zmod (Ohm)
Frecuencia (Hz)
Angulo de fase (°)
-Zimag (Ohm)
Zreal (Ohm)
0h
24h
48h

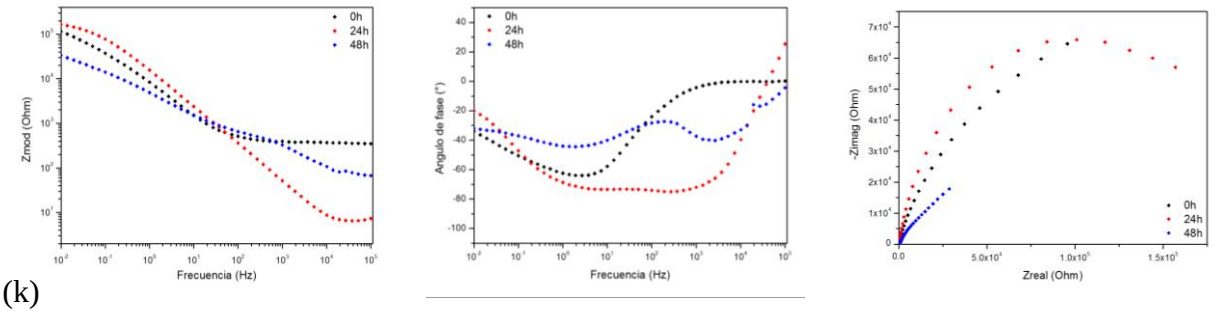
(h)


Zmod (Ohm)
Frecuencia (Hz)
Angulo de fase (°)
-Zimag (Ohm)
Zreal (Ohm)
0h
24h
48h

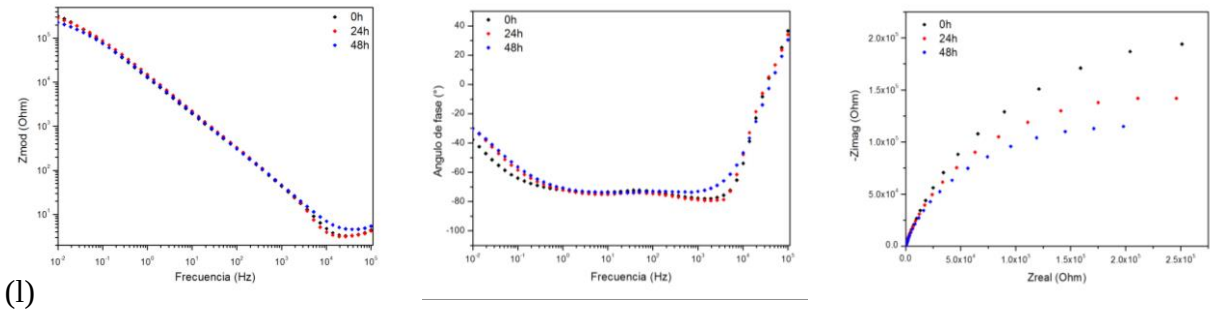
(i)


Zmod (Ohm)
Frecuencia (Hz)
Angulo de fase (°)
-Zmag (Ohm)
Zreal (Ohm)
0h
24h
48h

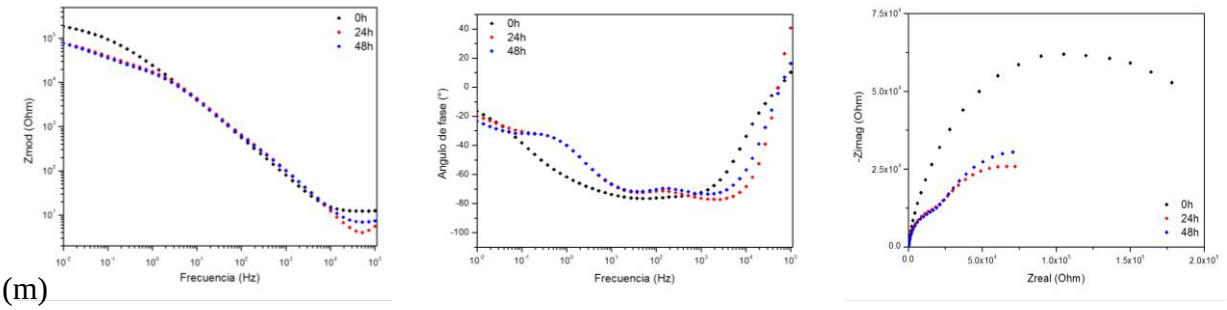
(j)


Zmod (Ohm)
Frecuencia (Hz)
Angulo de fase (°)
-Zmag (Ohm)
Zreal (Ohm)
0h
24h
48h

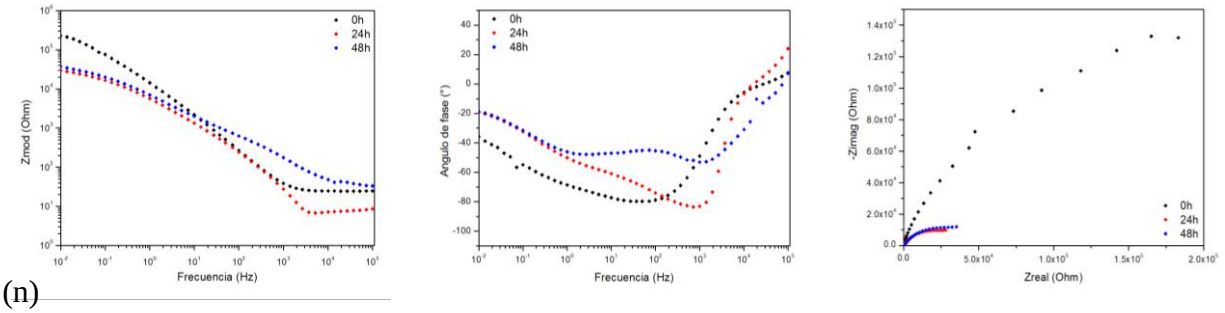
(k)


Zmod (Ohm)
Frecuencia (Hz)
Angulo de fase (°)
-Zmag (Ohm)
Zreal (Ohm)
0h
24h
48h

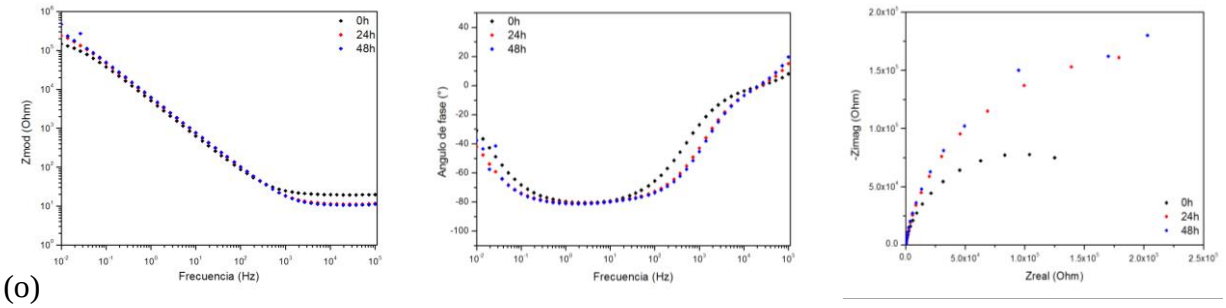
(l)


Zmod (Ohm)
Frecuencia (Hz)
Angulo de fase (°)
-Zmag (Ohm)
Zreal (Ohm)
0h
24h
48h

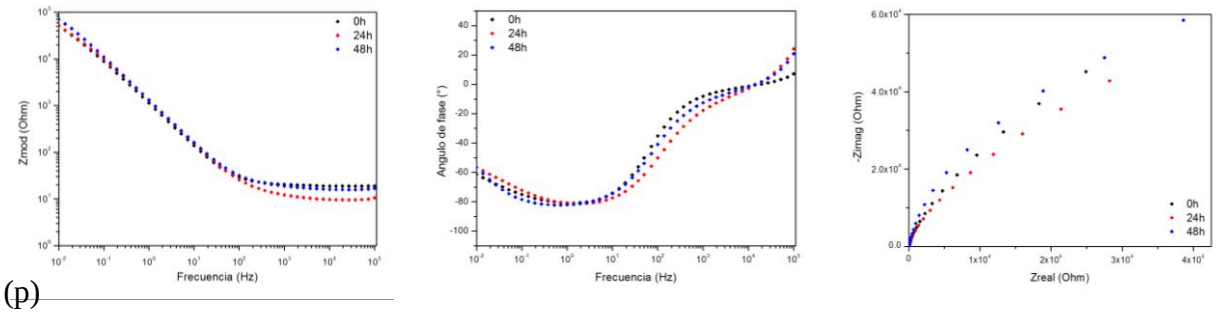
(m)


Zmod (Ohm)
Frecuencia (Hz)
Angulo de fase (°)
-Zmag (Ohm)
Zreal (Ohm)
0h
24h
48h

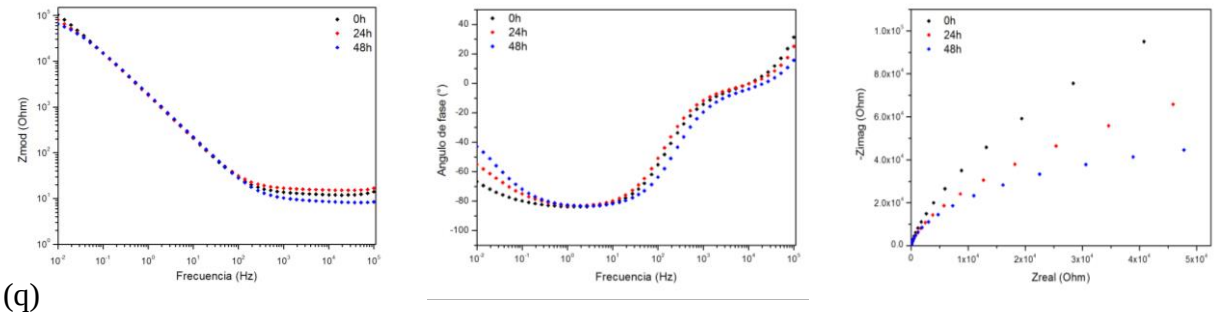
(n)


Zmod (Ohm)
Frecuencia (Hz)
Angulo de fase (°)
-Zmag (Ohm)
Zreal (Ohm)
0h
24h
48h

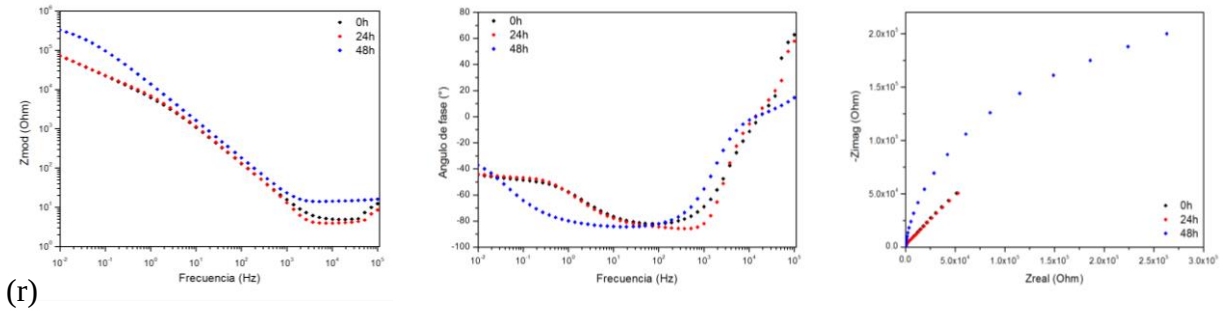
(o)


Zmod (Ohm)
Frecuencia (Hz)
Angulo de fase (°)
-Zmag (Ohm)
Zreal (Ohm)
0h
24h
48h

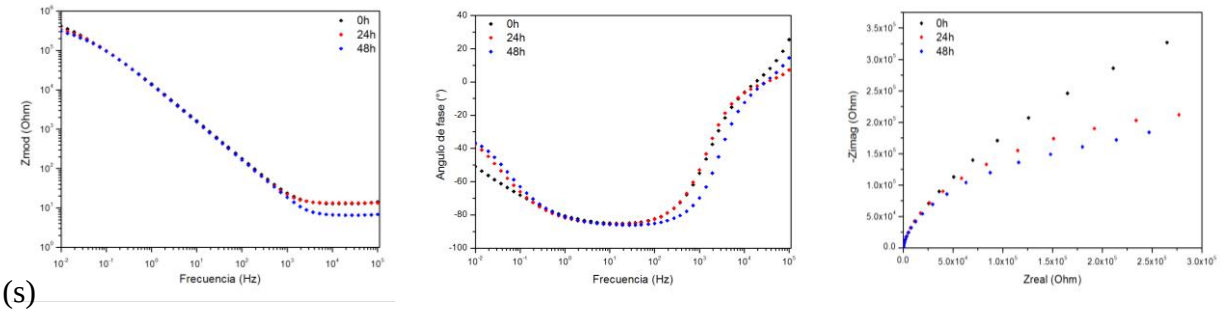
(p)


Zmod (Ohm)
Frecuencia (Hz)
Angulo de fase (°)
-Zmag (Ohm)
Zreal (Ohm)
0h
24h
48h

(q)


Zmod (Ohm)
Frecuencia (Hz)
Angulo de fase (°)
-Zmag (Ohm)
Zreal (Ohm)
0h
24h
48h

(r)


Zmod (Ohm)
Frecuencia (Hz)
Angulo de fase (°)
-Zmag (Ohm)
Zreal (Ohm)
0h
24h
48h

(s)

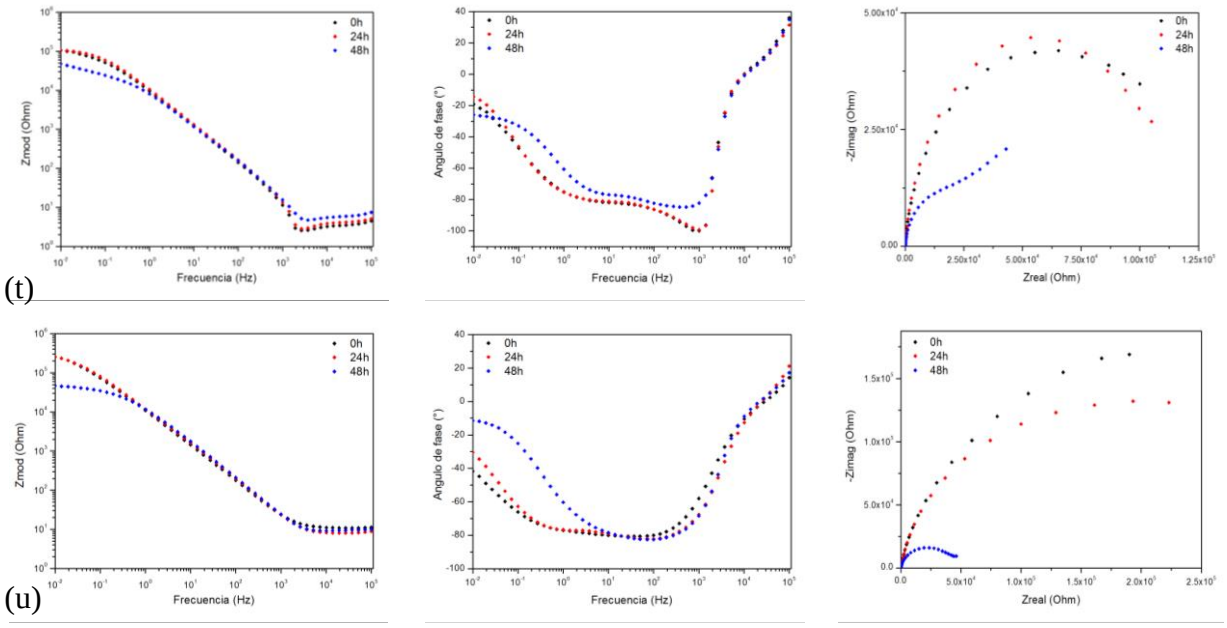


Diagrama de Bode (Zmod vs frecuencia; ángulo de fase vs frecuencia) y diagrama de Nyquist de recubrimientos cerámicos y poliméricos a 0, 24 y 48 h de medición en la presencia de células HOS en una concentración de 15000 cel/ml. (a) Cristal de cuarzo, (b) FC/NTC 0.0 g/L, (c) FC/NTC 0.5 g/L, (d) FC/NTC 1.0 g/L, (e) FC/NTC 1.5 g/L, (f) PCL/NTC 0.0 g/L, (g) PCL/NTC 0.5 g/L, (h) PCL/NTC 1.0 g/L, (i) PCL/NTC 1.5 g/L, (j) PCL/FC/NTC 0.0 g/L, (k) PCL/FC/NTC 0.5 g/L, (l) PCL/FC/NTC 1.0 g/L, (m) PCL/FC/NTC 1.5 g/L, (n) COL/NTC 0.0 g/L, (o) COL/NTC 0.5 g/L, (p) COL/NTC 1.0 g/L, (q) COL/NTC 1.5 g/L, (r) COL/FC/NTC 0.0 g/L, (s) COL/FC/NTC 0.5 g/L, (t) COL/FC/NTC 1.0 g/L y (u) COL/FC/NTC 1.5 g/L.

Tabla D1: Datos obtenidos a partir de simulación de los datos experimentales EIS correspondientes a las mediciones de células HOS en contacto con los diferentes recubrimientos. La primera, segunda y tercera fila corresponden a los ensayos llevados a cabo a 0, 24 y 48 h de cultivo respectivamente. Todas las unidades están dadas por cm^2.

Muestra	L (H)	Rs (Ohm)	CPE1 (F)	n1	R1 (Ohm)	CPE2 (F)	n2	R2 (Ohm)	CPE3 (F)	n3	W	R3 (Ohm)	Chi Squared
Cristal	1.55E-05	1.196	4.11E-08	0.10	2.698	1.36E-05	1.00	6.89E+03	2.92E-05	0.48	-	3.00E+06	0.01300
	8.42E-06	7.511	2.07E-07	0.10	12.74	9.62E-06	1.00	2.90E+03	1.12E-05	0.40	-	1.12E+06	0.00916
	9.26E-06	0.234	3.01E-06	0.22	6.664	6.32E-06	1.00	1.22E+03	4.53E-06	0.75	-	7.29E+05	0.00143
FC/NTC 0.0 g/L	3.59E-05	6.313	9.69E-08	0.71	72.08	1.50E-05	0.99	2.81E+03	1.38E-05	0.74	-	1.08E+05	0.00362
	4.68E-06	2.543	2.78E-05	1.00	2.600	2.71E-05	0.35	1.73E+04	4.15E-11	0.43	-	2.94E+05	0.06830
	9.26E-06	10.45	2.39E-05	1.00	2.261	3.94E-11	0.90	2.51E+04	3.44E-05	0.51	-	1.19E+05	0.01970
FC/NTC 0.5 g/L	1.03E-01	14.19	4.05E-14	0.50	616.2	3.87E-09	0.29	4.41E+03	2.47E-05	0.88	-	7.03E+05	0.01370
	7.16E-04	20.70	6.04E-10	0.23	622.0	4.40E-06	0.48	1.95E+04	1.74E-05	0.98	-	1.92E+06	0.00015

	2.30E-03	480.8	5.79E-06	0.16	195.8	1.58E-05	0.99	132.6	4.96E-10	0.60	-	1.36E+06	0.00150
FC/NTC 1.0 g/L	9.85E-06	15.08	8.49E-06	0.52	1.212	1.64E-05	0.94	127.2	3.41E-06	0.42	-	2.23E+06	0.00014
	1.04E-05	6.874	7.45E-06	0.63	1.42E-8	1.44E-05	1.00	8.94E-04	9.38E-06	0.15	-	1.53E+06	0.00262
	9.98E-06	10.04	9.82E-06	0.75	2.45E-8	1.28E-05	1.00	2.86E-07	4.45E-04	0.27	-	1.20E+06	0.00235
FC/NTC 1.5 g/L	5.97E-06	11.44	1.53E-05	0.48	3.64E-7	2.75E-05	1.00	1.45E-04	5.31E-03	0.44	-	4.47E+05	0.06410
	1.00E-05	6.266	2.86E-05	0.32	1.30E-9	2.71E-05	1.00	7.28E-04	4.36E-02	0.63	-	2.05E+05	0.07070
	4.84E-06	8.970	6.30E-05	0.41	7.86E-7	2.61E-05	1.00	8.23E-04	9.11E-05	0.58	-	2.60E+06	0.05790
PCL/NTC 0.0 g/L	2.08E-03	60.99	8.05E-06	0.71	1.13E3	4.85E-05	0.62	1.11E+04	-	-	7.60E-04	-	0.00004
	8.55E-04	230.3	3.22E-06	0.73	398.5	3.73E-05	0.55	5.31E+04	-	-	1.18E-04	-	0.00011
	4.54E-06	66.50	1.83E-06	0.82	470.7	6.28E-05	0.61	2.76E+04	-	-	1.51E-04	-	0.00072
PCL/NTC 0.5 g/L	6.07E-06	11.39	1.65E-05	0.90	17.66	1.48E-04	0.57	5.41E+05	-	-	9.39E-05	-	0.00053
	4.60E-06	9.861	8.92E-06	0.99	1.89E-3	2.65E-04	0.58	4.50E+05	-	-	1.71E-04	-	0.00111
	4.28E-06	2.811	1.05E-05	1.00	1.48E-12	4.95E-04	0.54	5.18E+05	-	-	4.00E-04	-	0.00387
PCL/NTC 1.0 g/L	5.34E-06	3.599	1.55E-04	0.91	2.84E-10	2.69E-05	0.10	1.88E+04	-	-	1.57E-04	-	0.00504
	3.93E-06	2.685	1.59E-04	0.91	3.57E-10	1.06E-09	0.57	3.09E+04	-	-	1.61E-04	-	0.01680
	3.87E-06	2.837	1.39E-04	1.00	5.48E-14	3.43E-09	0.10	1.18E+04	-	-	1.62E-04	-	0.05430
PCL/NTC 1.5 g/L	4.89E-06	6.188	2.41E-04	0.85	5.12E-14	1.51E-09	0.11	1.35E+04	-	-	8.65E-06	-	0.00067
	5.98E-06	10.04	2.22E-04	0.86	6.26E-13	3.46E-11	0.07	8.15E+04	-	-	8.00E-06	-	0.00081
	4.68E-06	20.36	2.24E-04	0.87	9.75E-13	3.38E-12	0.08	1.15E+04	-	-	1.60E-05	-	0.00076
PCL/FC/ NTC 0.0 g/L	4.08E-06	11.90	3.91E-06	1.00	281.7	5.33E-06	0.85	1.77E+03	8.42E-06	0.67	-	2.44E+05	0.00042
	6.00E-06	6.432	3.48E-06	0.98	199.5	9.88E-07	1.00	643.2	1.07E-05	0.69	-	1.97E+05	0.00031
	4.81E-06	4.684	4.20E-06	0.96	0.743	9.05E-06	0.12	456.6	8.78E-06	0.76	-	4.26E+06	0.00069
PCL/FC/ NTC 0.5 g/L	4.26E-05	73.29	1.06E-12	0.46	0.176	1.42E-05	0.27	323.6	2.34E-05	0.82	-	1.82E+06	0.00062
	7.48E-06	0.002	2.24E-11	0.24	0.017	6.68E-06	0.59	6.492	8.60E-06	0.88	-	2.10E+05	0.00168
	-	67.32	1.63E-06	0.83	458	6.34E-05	0.60	2.82E+04	-	-	1.52E-04	-	0.00077
PCL/FC/ NTC 1.0 g/L	6.45E-06	2.472	1.09E-11	0.06	8.36E-10	1.58E-05	0.85	1.19E-07	8.64E-07	0.55	-	4.48E+05	0.02000
	5.23E-06	2.950	4.59E-13	0.01	8.29E-09	3.36E-06	1.00	2.08E-10	1.21E-05	0.71	-	4.42E+05	0.00142
	5.69E-06	4.271	8.42E-13	0.28	1.62E-07	1.66E-06	1.00	1.72E-10	1.57E-05	0.77	-	3.07E+05	0.00153
PCL/FC/ NTC 1.5 g/L	6.16E-06	11.37	1.07E-09	0.87	5.68E+3	11.4E-06	0.89	75.8E+03	42.2E-06	0.88	-	1.24E+05	0.00117
	9.04E-06	3.133	1.91E-07	0.86	16.3E+3	45.6E-06	0.87	22.2E+03	13.2E-07	0.86	-	5.84E+04	0.00473
	7.16E-06	5.698	2.01E-10	0.84	16.5E+3	65.8E-06	0.85	19.5E+03	13.4E-07	0.84	-	7.10E+04	0.00407
COL/NTC 0.0 g/L	5.73E-06	24.44	5.12E-06	1.00	1.29E-03	1.30E-05	0.61	1.16E+05	9.15E-07	0.75	-	3.78E+05	0.00418
	7.16E-06	6.728	6.52E-06	1.00	819.3	5.25E-05	0.58	1.55E-02	1.77E-16	0.01	-	3.74E+04	0.00360
	1.26E-05	33.14	4.31E-06	0.82	567.7	4.27E-05	0.57	1.58E-02	1.21E-16	0.09	-	4.69E+04	0.00359
COL/NTC 0.5 g/L	4.77E-06	19.25	3.19E-05	0.88	14.69	4.27E-06	0.97	512.2	2.06E-06	1.00	-	1.83E+05	0.00025
	5.06E-06	11.25	1.87E-05	0.94	64.41	3.54E-06	0.97	493.0	9.76E-06	0.79	-	3.83E+05	0.00004
	6.18E-06	10.53	1.75E-05	0.95	74.24	6.11E-06	0.91	1333	5.06E-06	0.85	-	4.13E+05	0.00889
COL/NTC 1.0 g/L	4.38E-06	5.689	1.17E-10	0.74	13.14	1.17E-04	0.92	1.756	1.76E-04	0.90	-	1.25E+05	0.00174
	7.07E-06	7.495	4.65E-06	0.64	1.940	2.02E-04	0.82	3.460	1.58E-04	0.89	-	1.00E+05	0.00288
	9.91E-06	13.66	5.80E-09	0.78	1.737	1.36E-03	0.58	9.335	1.41E-04	0.92	-	1.46E+05	0.00002
COL/NTC 1.5 g/L	1.17E-07	10.62	3.20E-10	0.50	1.204	1.53E-08	0.83	1.655	1.09E-08	0.93	-	3.10E+05	0.00163
	1.16E-07	13.57	2.09E-04	0.93	13.24	1.83E-08	0.95	193E+03	5.12E-04	0.19	-	2.04E+04	0.00112
	3.84E-07	8.019	1.72E-05	0.92	2.044	2.06E-08	0.96	16.3E+03	7.41E-08	0.67	-	1.01E+05	0.00200
COL/FC/ NTC 0.0 g/L	1.41E-05	4.777	1.70E-05	0.95	0.163	5.37E-05	0.50	5.03E+03	1.89E-11	0.28	-	4.82E+10	0.00546
	1.01E-05	3.767	1.26E-05	1.00	0.298	5.16E-05	0.48	3.35E+03	1.15E-10	0.13	-	1.27E+12	0.00873
	8.07E-06	14.02	1.11E-05	0.97	2.012	5.55E-06	0.29	5.9950	2.18E-08	0.23	-	4.10E+11	0.00254
COL/FC/ NTC 0.5 g/L	1.02E-05	12.73	1.08E-05	0.97	0.152	5.39E-06	0.40	0.0057	2.32E-11	0.10	-	1.62E+11	0.00009
	3.01E-06	13.10	1.16E-05	0.97	0.674	4.46E-06	0.33	0.0674	4.27E-14	0.23	-	1.59E+06	0.00018
	3.15E-06	6.442	1.12E-05	0.98	0.249	5.40E-06	0.31	2.0140	1.03E-13	0.26	-	1.79E+06	0.00053
COL/FC/ NTC 1.0 g/L	5.73E-06	2.720	1.59E-05	1.00	922.3	1.01E-05	0.30	1.88E+05	3.97E-04	0.22	-	1.30E+03	0.09010
	5.41E-06	3.121	1.50E-05	1.00	19.10	8.62E-11	0.94	6.65E+03	6.24E-10	0.95	-	8.51E+04	0.01000
	7.96E-06	4.887	1.48E-05	0.97	8.993	4.91E-09	0.95	1.52E+04	-	-	1.01E-04	-	0.03050
COL/FC/ NTC 1.5 g/L	4.71E-06	10.84	1.31E-05	0.78	5.04E-18	5.94E-06	1.00	3.94E+05	1.11E-04	1.00	-	8.49E+08	0.000156
	5.68E-06	7.948	1.15E-05	0.76	3.446	6.00E-06	0.10	3.45E+05	4.65E-04	0.99	-	2.77E+05	0.000655
	5.54E-06	9.179	7.16E-06	1.00	1004	1.16E-05	0.64	4.31E+04	-	-	4.94E-04	-	0.000822