



---

**Nuevo tratamiento de oxidación en aleaciones de NiTi  
para aplicaciones biomédicas. Caracterización  
superficial y respuesta biológica *in vitro***

---

**Alexandra Michiardi**

Memoria de Tesis presentada para optar al grado de Doctor por la  
Universitat Politècnica de Catalunya

Co-dirigida por  
Profesor Francisco Javier Gil Mur  
Dr. Conrado José Aparicio Bádenas

Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica  
E.T.S. d'Enginyeria Industrial de Barcelona  
Universitat Politècnica de Catalunya

Diciembre 2005

# **3** Caracterización y comparación topográfica y físico-química de las superficies de NiTi con y sin tratamiento de oxidación

---

<b>3.1</b>	<b>Objetivos</b>	<b>93</b>
<b>3.2</b>	<b>Introducción</b>	<b>94</b>
<b>3.3</b>	<b>Caracterización topográfica</b>	<b>95</b>
3.3.1	Topografía y respuesta celular: estado del arte	95
3.3.2	Materiales	96
3.3.3	Métodos	96
3.3.3.1	Microscopía electrónica de barrido (MEB)	96
3.3.3.2	Microscopía interferométrica en luz blanca	96
3.3.3.3	Estadística	100
3.3.4	Resultados	100
3.3.4.1	Parámetro Sa	100
3.3.4.2	Parámetro Sm	103
3.3.4.3	Parámetro Ssk	105
3.3.4.4	Parámetro Sku	107
3.3.4.5	Relación entre superficie real y aparente	109
3.3.4.6	Perfiles tridimensionales	110
3.3.5	Discusión	111
3.3.6	Conclusiones	112
<b>3.4</b>	<b>Determinación de la energía superficial</b>	<b>113</b>
3.4.1	Concepto de Energía Libre de Superficie	113
3.4.2	Energía libre de superficie y respuesta biológica: estado del arte	113
3.4.3	Materiales	115
3.4.4	Métodos	115

3.4.4.1 Medición del ángulo de contacto	115
3.4.4.2 Condiciones de ensayo	117
3.4.4.3 Estadística	119
3.4.5 Resultados	120
3.4.5.1 Ángulos de contacto con agua pura	120
3.4.5.2 Ángulos de contacto con diiodometano	122
3.4.5.3 Energías libres de superficie	125
3.4.6 Discusión	127
3.4.7 Conclusiones	130
<b>3.5 Caracterización del potencial zeta</b>	<b>131</b>
3.5.1 Definición del potencial zeta	131
3.5.2 Información aportada por las curvas de potencial zeta	131
3.5.3 Punto de carga cero y punto isoelectrico	132
3.5.4 Cargas superficiales electrostáticas y respuesta biológica: estado del arte	133
3.5.5 Materiales	134
3.5.6 Métodos	134
3.5.6.1 Potencial de flujo: principio básico	135
3.5.6.2 Condiciones de ensayo	137
3.5.7 Resultados	138
3.5.7.1 Superficies de NiTi no tratadas	138
3.5.7.2 Superficies de NiTi tratadas por OT	138
3.5.7.3 Superficies de Ti puro	138
3.5.8 Discusión	140
3.5.9 Conclusiones	142

### **3.1 Objetivos**

Ya que las características físico-químicas de la superficie de un biomaterial son también factores determinantes en la aceptación biológica del implante en el organismo, es primordial estudiarlas exhaustivamente.

Por esta razón, la topografía, la energía superficial y las cargas electrostáticas de las superficies de NiTi no tratado (NT) y de las superficies del NiTi tratado por oxidación térmica (OT) se estudian con detalle en el presente capítulo.

Los objetivos del presente capítulo son:

1. Caracterizar la rugosidad y topografía de las superficies de NiTi NT y de las superficies de NiTi OT.
2. Determinar la influencia de OT sobre la rugosidad y la topografía de las superficies de NiTi en comparación con el material no tratado.
3. Estudiar la influencia de la composición química de las aleaciones NiTi sobre la rugosidad y la topografía de las superficies de NiTi NT y de las superficies de NiTi OT.
4. Caracterizar la energía superficial de las superficies de NiTi NT y de las superficies de NiTi OT.
5. Determinar la influencia de OT sobre la energía superficial de las aleaciones NiTi en comparación con el material no tratado.
6. Estudiar la influencia de la composición química de las aleaciones de NiTi sobre la energía superficial de las superficies de NiTi NT y de las superficies de NiTi OT.
7. Caracterizar el potencial zeta de las superficies de NiTi NT y de las superficies de NiTi OT.
8. Determinar la influencia de OT sobre el potencial zeta de las aleaciones de NiTi en comparación con el material no tratado.

### 3.2 Introducción

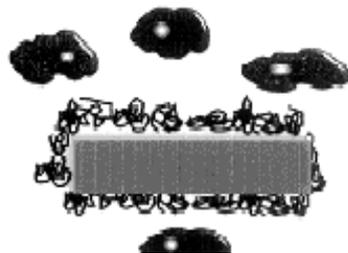
Las primeras interacciones entre la superficie del biomaterial y el entorno biológico ocurren apenas algunos segundos después de su implantación en el cuerpo, y se hacen con las proteínas presentes en el medio fisiológico. Es sólo después de esta primera etapa cuando los neutrofilos y los macrófagos (las células que intervienen en primera instancia en todos los procesos de inflamación) llegan a la superficie del material. Estas células desencadenan entonces un complejo proceso biológico de cascadas de señalización. Este proceso constituye la respuesta biológica que, en función de las células reclutadas posteriormente, llegará a la aceptación del biomaterial en el tejido, o a su rechazo (*figura 3.1*).



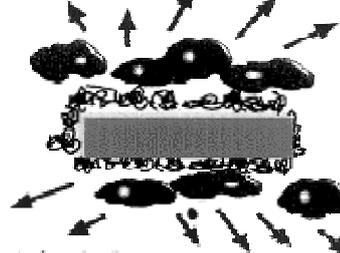
**Etapa 1**  
t = 0: implantación del material



**Etapa 2**  
t = 1 min: el material adsorbe una capa de proteínas



**Etapa 3**  
t = desde 1h hasta 1 día:  
los neutrofilos y los macrófagos  
interrogan el biomaterial



**Etapa 4**  
t = desde 1 día hasta 5 días:  
las células fusionan para formar  
células gigantes, y secretan  
citoquinas

**Figura 3.1:** Representación esquemática de las sucesivas etapas que tienen lugar durante la respuesta biológica, después de la implantación de un biomaterial en el cuerpo (adaptado de [Cra02]). Las citocinas emitidas en la Etapa 4 son las señales de reclutamiento de otros tipos de células específicas., La respuesta biológica está en función del tipo de células reclutadas.

Por una parte, la naturaleza de la monocapa de proteínas adsorbida en la superficie del material constituye el factor clave de esta respuesta celular [Ans00]; [Hew94]; [Tas86].

Las células dependen de proteínas específicas para adherirse y comunicarse. En particular, los osteoblastos necesitan interacciones específicas con la superficie del biomaterial para poder

expresar un fenotipo diferenciado. Estas interacciones dependen de la cantidad, naturaleza y conformación de las proteínas adsorbidas en la superficie del material.

Por otra parte, las características superficiales del material, como la composición química o la energía superficial, determinan la naturaleza de la adsorción proteica, y particularmente la orientación y conformación de las proteínas adsorbidas [Pkb88]; [Pzt90]. Además, las características físico-químicas como las cargas superficiales y/o la energía superficial del material, así como su topografía, pueden influenciar indirectamente (a través de la capa proteica) y/o directamente el comportamiento celular.

### **3.3 Caracterización topográfica**

#### **3.3.1 Topografía y respuesta celular: estado del arte**

Numerosos trabajos evidenciaron la influencia de la rugosidad y de la topografía sobre la respuesta celular [Ccb95]; [Htr96]; [Mgw93]; [Tmj97].

Se observó en la mayoría de los estudios que cuando se aumenta la rugosidad (parámetro Ra), la proliferación de las células osteoblásticas humanas disminuye [Abn00], favoreciendo la diferenciación. Sin embargo, se demostró que la sensibilidad de las células osteogénicas para la rugosidad del sustrato varía en función de su madurez: cuanto más madura es la célula, menos sensible es a la rugosidad [Lbs00]. De esta manera, la tendencia hacia un fenotipo más diferenciado al aumentar la rugosidad puede llegar a un aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina (definición detallada en el capítulo 6) en algunos casos [Bld01] [Wcl05b], y siempre a un incremento de la producción de osteocalcina (definición detallada en el capítulo 6) [Agp02]; [Ans00].

Sin embargo, se observó una mejor proliferación de osteoblastos primarios de rata sobre las superficies de NiTi más rugosas [Wcl05b]. Según los autores, este resultado contradictorio con la mayoría de los trabajos se podría justificar por el uso de osteoblastos primarios en el estudio, los cuales presentan un grado de diferenciación distinto a otros tipos de osteoblastos de línea.

Por otra parte, otros autores insisten en que la organización y la morfología de la rugosidad es un factor más importante que la amplitud de la misma (Ra). En este sentido, Bigerelle et al. [Abi05]; [Bad02] desarrollaron un nuevo parámetro para caracterizar la organización de la rugosidad.

Además, se demostró que a mayor rugosidad, mayor fuerza de adhesión tenían las células con el sustrato, teniendo una influencia también sobre la morfología celular [Smd96].

Finalmente, la rugosidad afecta la producción de factores de regulación locales por las células. Se demostró, por ejemplo, que los MG63 respondían a un aumento de la rugosidad por un

aumento de la secreción de prostaglandinas [Ksh96], incluyendo las PGE<sub>2</sub>, y el factor TGF-β<sub>1</sub> (*Transforming Growth Factor*), en su forma latente [Ksh96]; [Slc01]. El efecto del PGE<sub>2</sub> depende de su concentración: puede tanto estimular la actividad de la fosfatasa alcalina y la producción de osteocalcina, como inhibir las funciones de los osteoblastos y activar la resorción ósea, si está presente a más altas concentraciones. En cuanto al TGF-β<sub>1</sub>, cuando está activado por los osteoclastos [Oms89], inhibe la proliferación de los osteoblastos [Sbo88], avanzando de esta manera su diferenciación [Bks92].

En el caso del NiTi rugoso, se observó que un incremento del parámetro Ra de 156 nm a 362 nm implica un aumento de la producción de TGF-β<sub>1</sub> por parte de las células osteoblásticas de osteosarcoma de rata (ROS-17/2.8), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas [Kkr02].

### 3.3.2 Materiales

Se estudiaron superficies de distintas aleaciones de NiTi (Ale1, Ale2, Ale3, Ale12, Ale27, Ale28, *tabla 1.2*) no tratadas (NT), pulidas y lavadas según la metodología detallada en el apartado 1.5.5, y tratadas con OT, en las condiciones determinadas en el capítulo 2. También, se analizaron superficies de Ti comercialmente puro preparadas de la misma manera que las aleaciones de NiTi no tratadas.

Se analizaron dos muestras de cada grupo en tres ubicaciones diferentes por cada muestra.

### 3.3.3 Métodos

#### 3.3.3.1 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Se observaron las superficies de distintas muestras de NiTi NT y de NiTi OT por MEB antes de caracterizarlas por interferometría. Esta observación cualitativa de la topografía se llevó a cabo para evaluar la idoneidad del uso de la interferometría como método de cuantificación de la rugosidad.

#### 3.3.3.2 Microscopía interferométrica en luz blanca

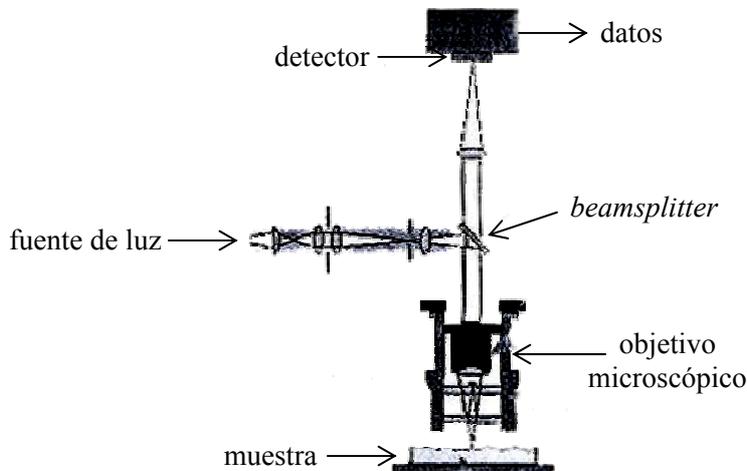
La cuantificación de la rugosidad y de la topografía de las superficies de NiTi, según el tratamiento superficial, se llevó a cabo por microscopía interferométrica en luz blanca (MI).

El método MI es un método sin contacto con las superficies a analizar, que permite obtener tanto perfiles bidimensionales como imágenes tridimensionales, con gran resolución vertical y lateral.

Esta técnica sólo permite caracterizar un área pequeña con un máximo de  $500 \mu\text{m}^2$ , por lo que se necesitan varias medidas de la misma muestra para obtener un perfil representativo de la misma. También, en función de las superficies analizadas, pueden aparecer efectos ópticos (artefactos) que pueden llevar a imprecisiones en la medición. Por esta razón, tal y como se ha comentado previamente, la observación de las superficies por MEB es conveniente como paso previo a la cuantificación por MI.

### 3.3.3.2.1 Principios básicos de la técnica

La técnica de MI se basa en el principio de interferencia de dos ondas de luz que interactúan. Una de ellas está reflejada por la superficie a analizar, y la otra por una superficie de referencia propia al sistema (*figura 3.2*). La confrontación de estas dos ondas resulta en la producción de franjas de interferencias, cuyas formas están relacionadas con la topografía de la superficie analizada.



**Figura 3.2:** Representación esquemática de un interferómetro [adaptado del manual de utilización del interferómetro Wyko NT1100].

Los dos modos principales de medición existentes son el modo PSI (*Phase Shifting Interferometry*) y el modo VSI (*Vertical Scanning Interferometry*). La elección de uno de estos dos modos se hace en función de la rugosidad de las muestras. Para superficies muy lisas (diferencia de altura máxima entre el pico más alto y el valle más profundo de 150 nm), se selecciona el modo PSI de manera preferencial, mientras que para muestras más rugosas se usa el modo VSI.

Las mediciones de las superficies de NiTi analizadas en el presente trabajo se hicieron utilizando el modo VSI. Así pues, a continuación, se explicará brevemente el principio de este modo.

En modo VSI, se emplea luz blanca por su baja longitud de coherencia. Esta particularidad de la luz blanca permite obtener el mayor contraste de franjas de interferencia en el punto de mejor enfoque. Además, este contraste se pierde rápidamente con sólo cambiar mínimamente el enfoque.

Basado en este principio, el sistema óptico interno y el objetivo de magnificación efectúan un barrido vertical a una velocidad controlada, mientras el detector va recogiendo, para cada punto de la superficie analizada, el plano de mayor contraste. De esta manera se construye una imagen tridimensional de la superficie analizada (figura 3.3).

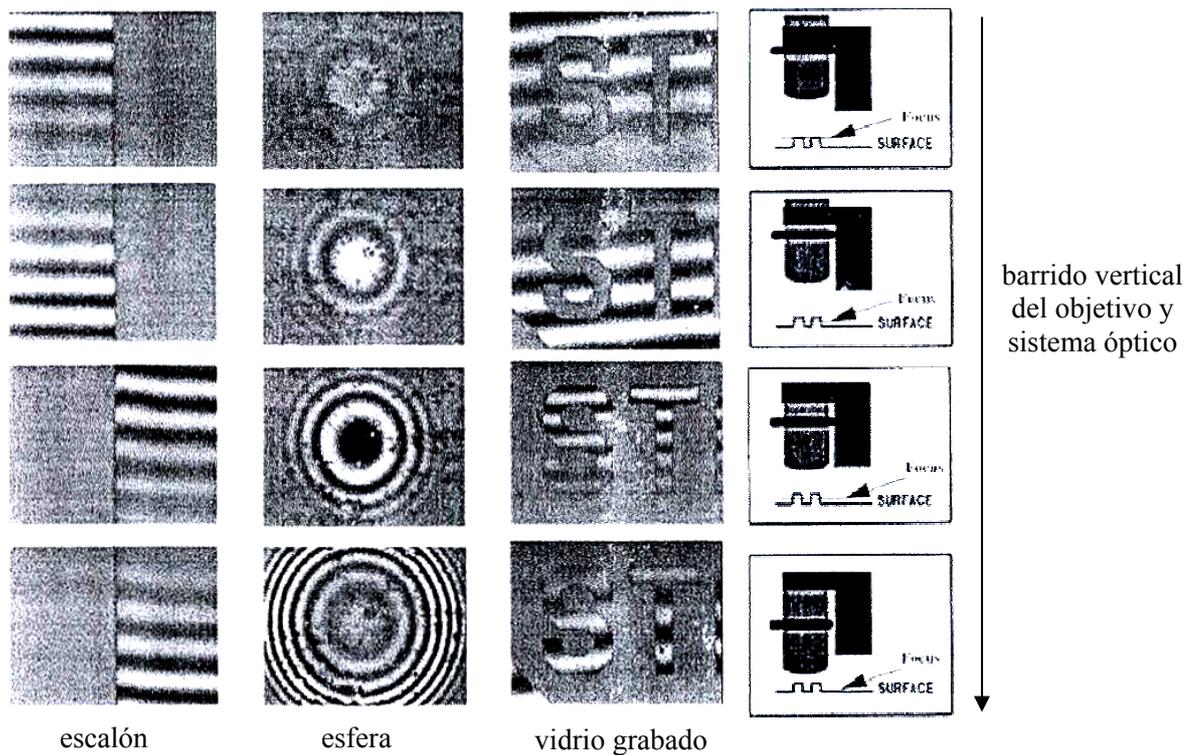


Figura 3.3: Progresión de las franjas de interferencias sobre superficies de distintas topografías.

### 3.3.3.2.2 Condiciones de ensayo

Las mediciones topográficas se llevaron a cabo con un interferómetro WYKO®, modelo NT 1100 (Veeco Metrology Group), de resolución vertical inferior al nanómetro y de resolución lateral de unos 400 nanómetros.

El área de las superficies analizadas fue de  $124 \times 94 \mu\text{m}^2$ .

El software utilizado para la explotación y el análisis de los datos fue WYKO® Vision32™ (Veeco Metrology Group). Se aplicó a los resultados 3D, en todos los casos, una corrección por la inclinación de las superficies, pero no se filtraron los perfiles obtenidos.

Se obtuvieron seis perfiles tridimensionales de cada tipo de superficie.

### 3.3.3.2.3 Parámetros medidos

A partir de los perfiles tridimensionales obtenidos se calcularon una gran cantidad de diferentes parámetros descriptivos de la rugosidad y la topografía. Sin embargo, después de un análisis preliminar de los datos, se eligió presentar los resultados aquellos que aportan una información relevante sobre la topografía de las superficies, y que permiten distinguir entre las superficies OT y las superficies NT.

Estos parámetros son el parámetro de altura  $S_a$ , el parámetro funcional de volumen  $S_m$ , y los parámetros “estadísticos”  $S_{sk}$  y  $S_{ku}$ , de acuerdo con las definiciones de las normas ISO 4287-1997 y/o ASME B46.1-1995.

El parámetro  $S_a$ , en un sistema tridimensional, es el equivalente del  $R_a$  del sistema bidimensional. Representa la desviación aritmética media del perfil y es uno de los parámetros más comúnmente utilizado como parámetro de rugosidad. El parámetro  $S_m$ , o de “volumen superficial del material”, expresado en  $\text{mm}^3/\text{mm}^2$ , es la cantidad de material contenida en los picos superficiales, desde el punto más alto hasta 10% más adentro del material. Es un parámetro útil en tribología porque puede dar una idea de la cantidad de material inicialmente disponible para soportar una carga. Los parámetros  $S_{sk}$  y  $S_{ku}$  están relacionados con la función de distribución de amplitud (ADF) de la superficie. Esta función ADF, con una forma característica de campana, informa sobre la probabilidad que tiene el perfil de una superficie de tener una altura  $z$  en cualquiera posición  $x$ . El parámetro  $S_{sk}$ , conocido como *skewness*, es una medida de la asimetría de la función ADF. En función de su signo, puede indicar si la superficie tiene más poros ( $S_{sk} < 0$ ), o más bien picos ( $S_{sk} > 0$ ). En cuanto al parámetro  $S_{ku}$ , o kurtosis, está relacionado con la uniformidad de la función ADF. Una distribución normal da una kurtosis de 3. Ambos parámetros son sin dimensión.

También se calculó la relación que existe entre la superficie real (tomando en cuenta la topografía) y la superficie aparente (área analizada),  $I_r/I_a$ . Los valores obtenidos servirán en los capítulos siguientes para la normalización de aquellos resultados que incluyen en su cálculo el área de la muestra.

### 3.3.3.3 Estadística

Para evaluar si las diferencias entre los valores medios obtenidos en cada caso son estadísticamente significativas, se han calculado las tablas ANOVA de un factor y se ha aplicado el test de comparaciones múltiples de Fisher o de Tukey, dependiendo del caso. Se empleó el test de Tukey, en lugar del de Fisher, para la comparación de varios grupos de muestras cuando las muestras eran de diferentes tamaños. En ambos casos, se eligió como valor de significación  $p < 0.05$ . En los casos en que los resultados obtenidos por el método de multicomparación estaban en el límite de significación, se aplicó el test de t-student sólo entre dos grupos de valores, siempre con un valor de significación  $p < 0.05$ . Estos tests se llevaron a cabo con la ayuda del software Minitab™ Release 13.1.

## 3.3.4 Resultados

### 3.3.4.1 Parámetro $S_a$

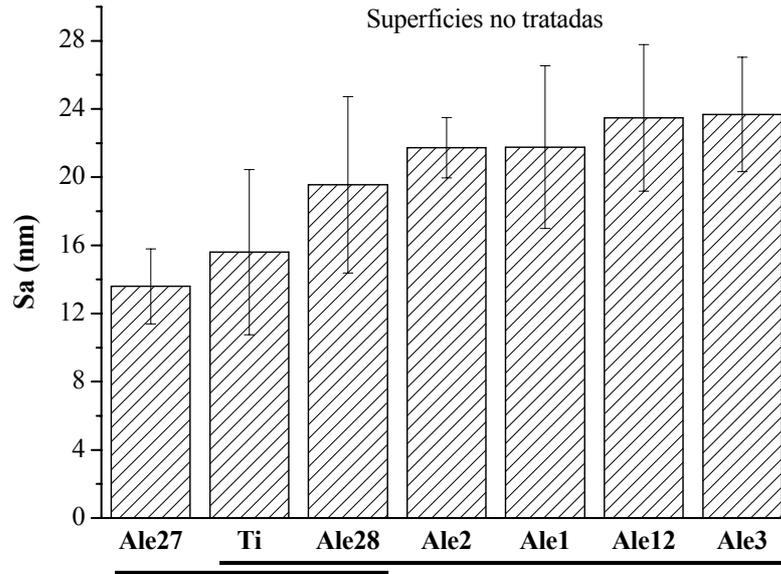
En la *tabla 3.1* se resumen todos los valores de rugosidad obtenidos para las distintas superficies estudiadas.

La comparación de los valores de  $S_a$  de las superficies NT en función de la composición de las aleaciones de NiTi muestra que no existen ninguna diferencia estadísticamente significativas entre las aleaciones de NiTi de fase martensítica (*figura 3.4*). Sin embargo, la aleación Ale27, de fase austenítica, muestra un valor de  $S_a$  significativamente menor a todas las demás, excepto a la Ale28 y al Ti. El Ti puro no presenta diferencias estadísticamente significativas con ninguna de las superficies de NiTi.

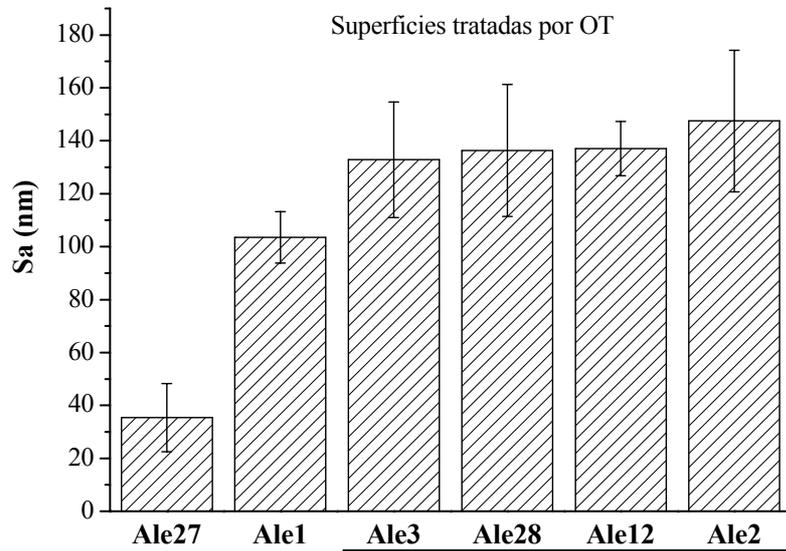
Si se comparan los valores de  $S_a$  obtenidos de las superficies después del tratamiento OT, se observan que todas las superficies de las aleaciones NiTi de fase martensíticas son significativamente más rugosas que la Ale27, de fase austenítica (*figura 3.5*). Y, el valor de  $S_a$  de la superficie de la Ale1 es significativamente menor comparado con las otras aleaciones martensíticas.

**Tabla 3.1.** Resumen de los valores ( $\pm$ desviación estándar) de los parámetros topográficos obtenidos para las distintas superficies estudiadas, de NiTi y de Ti puro. Las aleaciones están ordenadas de menor a mayor contenido en Ni.

	Sa (nm)		Sm ( $\text{mm}^3/\text{mm}^2$ )		Sku		Ssk	
	NT	OT	NT	OT	NT	OT	NT	OT
<b>Ti</b>	15.6 $\pm$ 4.8	-	41.3 $\pm$ 10.3	-	4.5 $\pm$ 0.7	-	-0.4 $\pm$ 0.7	-
<b>Ale1</b>	21.8 $\pm$ 4.8	103.5 $\pm$ 9.7	155.8 $\pm$ 44	186 $\pm$ 50.7	11.1 $\pm$ 4.8	3.1 $\pm$ 0.2	-0.6 $\pm$ 0.4	0.05 $\pm$ 0.1
<b>Ale2</b>	21.6 $\pm$ 1.8	147.5 $\pm$ 26.7	188.5 $\pm$ 35.1	208.9 $\pm$ 47.3	21.3 $\pm$ 13.9	3.02 $\pm$ 0.6	-1.4 $\pm$ 0.7	0.1 $\pm$ 0.2
<b>Ale12</b>	23.5 $\pm$ 7.8	137 $\pm$ 10.3	176.7 $\pm$ 31.4	207.1 $\pm$ 36.9	11.8 $\pm$ 3	2.96 $\pm$ 0.2	-0.7 $\pm$ 0.5	0.04 $\pm$ 0.2
<b>Ale3</b>	23.7 $\pm$ 3.35	132.9 $\pm$ 21.9	248.1 $\pm$ 61.3	206.3 $\pm$ 43.5	44.5 $\pm$ 30	3.04 $\pm$ 0.3	-2.7 $\pm$ 1.6	-0.1 $\pm$ 0.2
<b>Ale28</b>	19.5 $\pm$ 5.2	136.3 $\pm$ 24.9	52.8 $\pm$ 22.5	190.4 $\pm$ 27.5	5 $\pm$ 2	2.9 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.5	0.07 $\pm$ 0.2
<b>Ale27</b>	13.6 $\pm$ 2.2	35.4 $\pm$ 12.6	53.2 $\pm$ 19.1	200 $\pm$ 16.4	4.1 $\pm$ 1	7.4 $\pm$ 3.5	0.3 $\pm$ 1	-0.3 $\pm$ 0.2

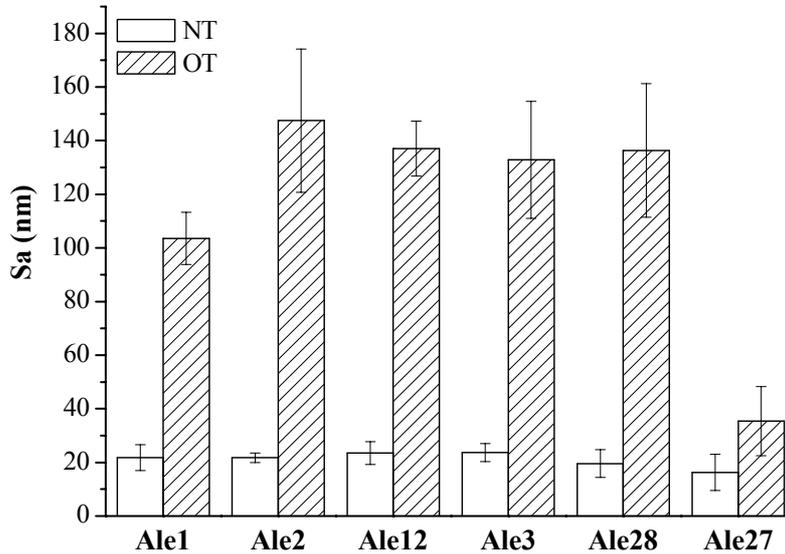


**Figura 3.4:** Comparación del parámetro Sa en función de la superficie. Se comparan en esta gráfica todas las superficies de NiTi NT y el Ti puro. Los grupos unidos con una misma barra horizontal no tienen diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 3.5:** Comparación del parámetro Sa en función de la superficie. Se comparan en esta gráfica todas las superficies de NiTi OT. Los grupos unidos con una misma barra horizontal no tienen diferencias estadísticamente significativas.

Finalmente, los resultados muestran que el tratamiento OT tiene una influencia significativa sobre la rugosidad en todas las superficies de NiTi tratadas, incluidas las Ale27. En todos los casos, el parámetro Sa es significativamente mayor después del tratamiento (*figura 3.6*).



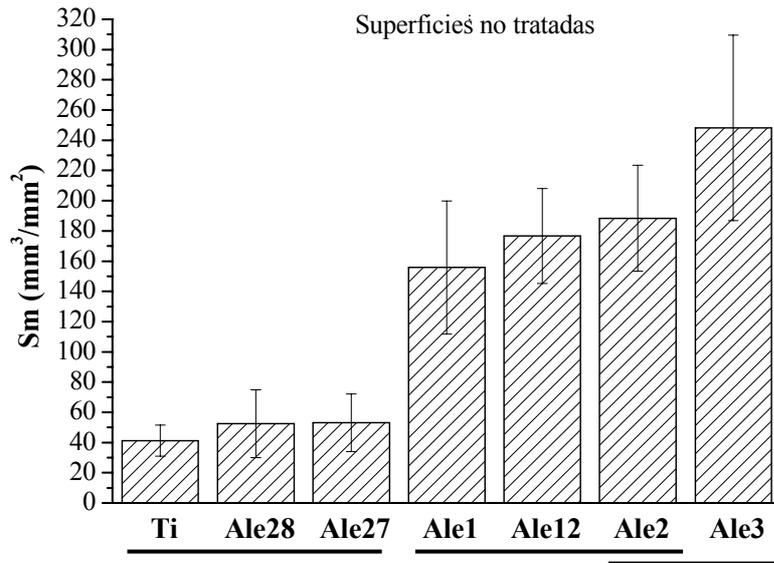
**Figura 3.6:** Influencia del tratamiento térmico OT sobre el parámetro Sa de todas las superficies de NiTi estudiadas. Para cada muestra, las diferencias entre las superficies NT y OT son estadísticamente significativas. Las aleaciones están ordenadas de menor a mayor contenido en Ni (tabla 1.4).

#### 3.3.4.2 Parámetro Sm

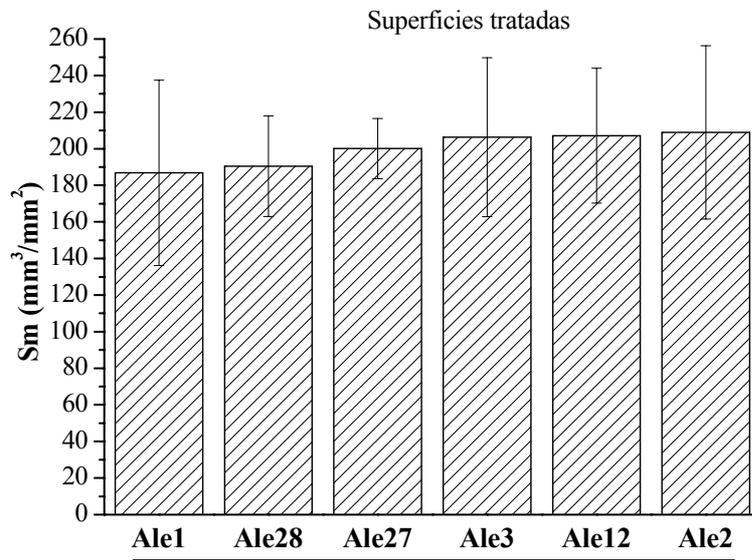
La comparación de los valores de Sm obtenidos para las distintas superficies NT muestran que el Ti, la Ale28 y la Ale27 presentan valores de Sm significativamente menores a las demás aleaciones (*figura 3.7*). Además, las Ale1 y Ale12 también muestran diferencias estadísticamente significativas con las Ale3, con valores menores de Sm (*tabla 3.1*).

Después del tratamiento OT, no se obtuvo ninguna diferencia estadísticamente significativa entre las aleaciones de NiTi (*figura 3.8*).

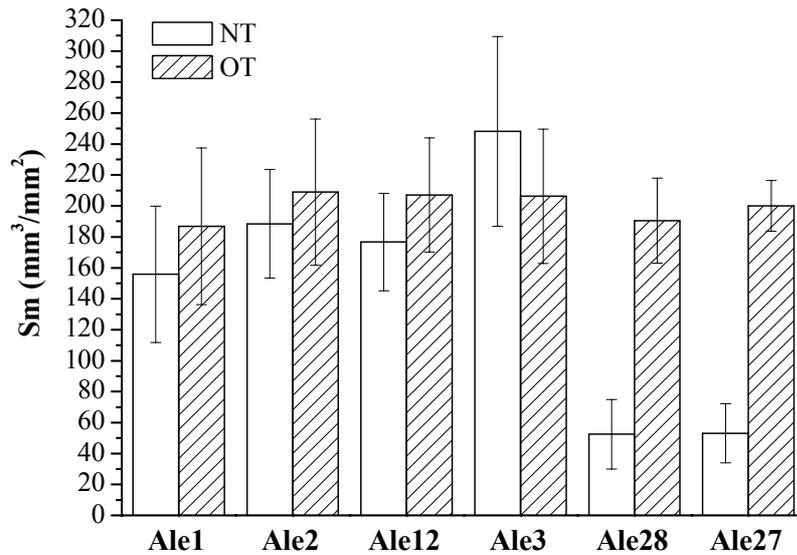
La influencia del tratamiento OT es diferente en función de la aleación de NiTi. En el caso de las aleaciones Ale27 y Ale28, únicas aleaciones dentro de las estudiadas que contienen fase austenítica, las superficies OT tienen valores de Sm estadísticamente mayores a las superficies NT. Sin embargo, para las demás aleaciones, no existe ninguna diferencia entre las superficies NT y OT (*figura 3.9*).



**Figura 3.7:** Comparación del parámetro  $S_m$  en función de la superficie. Se comparan en esta gráfica todas las superficies de NiTi NT y el Ti puro. Los grupos unidos con una misma barra horizontal no tienen diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 3.8:** Comparación del parámetro  $S_m$  en función de la superficie. Se comparan en esta gráfica todas las superficies de NiTi OT. Los grupos unidos con una misma barra horizontal no tienen diferencias estadísticamente significativas.



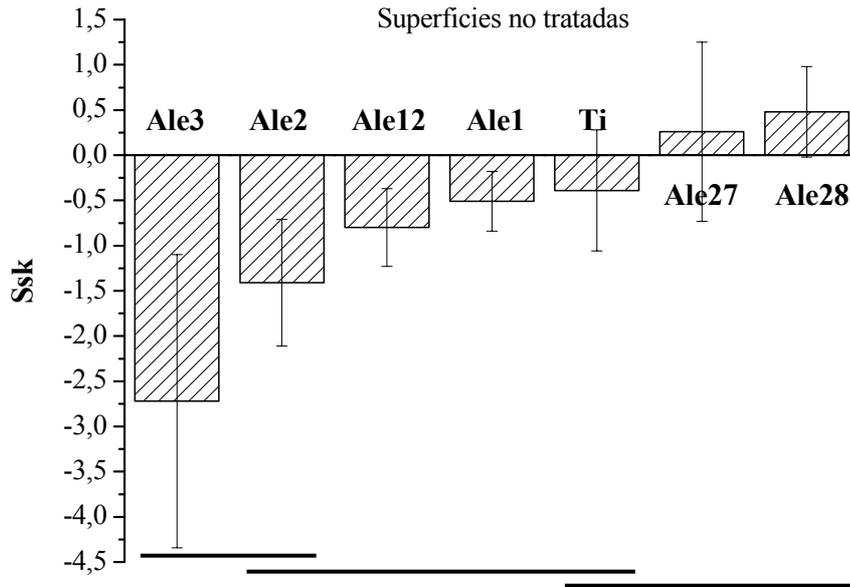
**Figura 3.9:** Influencia del tratamiento térmico OT sobre el parámetro Sm de todas las superficies de NiTi estudiadas. Sólo se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las superficies NT y OT en las superficies Ale27 y Ale28. Estas aleaciones contienen fase austenítica a temperatura ambiente (tabla 1.2). Las aleaciones están ordenadas de menor a mayor contenido en Ni (tabla 1.4).

#### 3.3.4.3 Parámetro Ssk

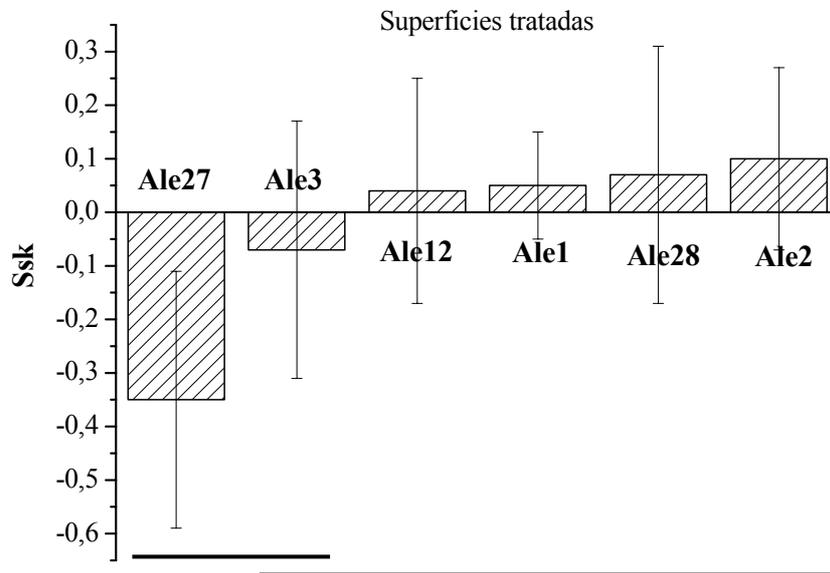
Todas las superficies NT estudiadas presentan un valor de Ssk negativo, excepto las superficies de las aleaciones Ale28 y Ale27 (figura 3.10). Es decir que, en general, las superficies de fase martensítica presentan una morfología con presencia preferencial de poros en lugar de picos.

El valor obtenido de Ssk para las superficies de la Ale3 es significativamente menor a todas las demás superficies, excepto la Ale2. Y las superficies de Ale27 y Ale28 presentan un valor de Ssk significativamente mayor a todas las otras aleaciones de NiTi, pero no del Ti puro (tabla 3.1).

En oposición a los resultados de las superficies NT, las superficies tratadas por OT presentan valores de Ssk ligeramente positivos, excepto las superficies de la Ale27 y Ale3 (figura 3.11). Además, las diferencias entre la Ale27 y las demás superficies son estadísticamente significativas, excepto respecto a la Ale3 (tabla 3.1).



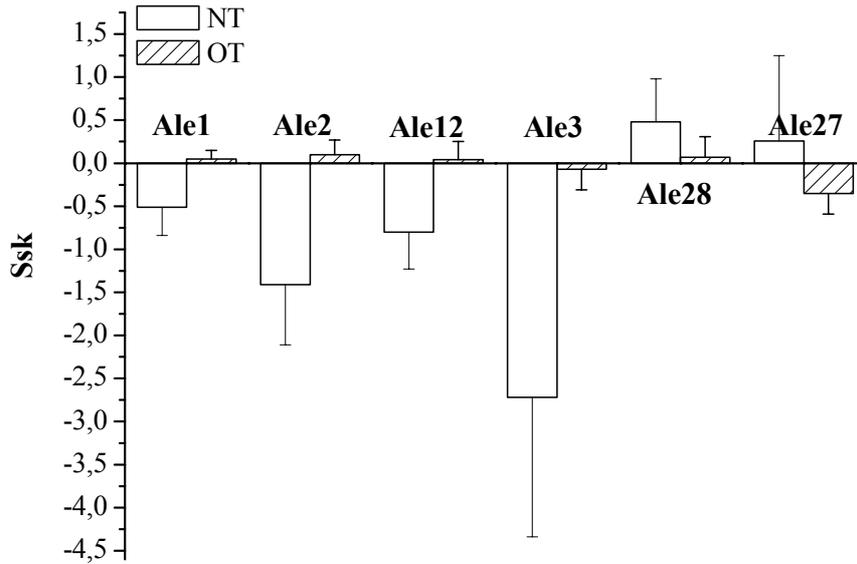
**Figura 3.10:** Comparación del parámetro Ssk en función de la superficie. Se comparan en esta gráfica todas las superficies de NiTi NT, y el Ti puro. Los grupos unidos con una misma barra horizontal no tienen diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 3.11:** Comparación del parámetro Ssk en función de la superficie. Se comparan en esta gráfica todas las superficies de NiTi OT. Los grupos unidos con una misma barra horizontal no tienen diferencias estadísticamente significativas.

El tratamiento térmico tiene una influencia sobre el valor del parámetro Ssk. La tendencia general observada es que las superficies NT presentan una skewness negativa (presencia preferente de poros), mientras que las superficies tratadas por OT presentan una skewness ligeramente positivas (presencia preferente de picos), con excepción de la aleación Ale27, de fase austenítica, para la cual la tendencia es opuesta (*figura 3.12*).

La influencia del tratamiento OT es significativa para todas las aleaciones, excepto la Ale27 y la Ale28 (*tabla 3.1*).



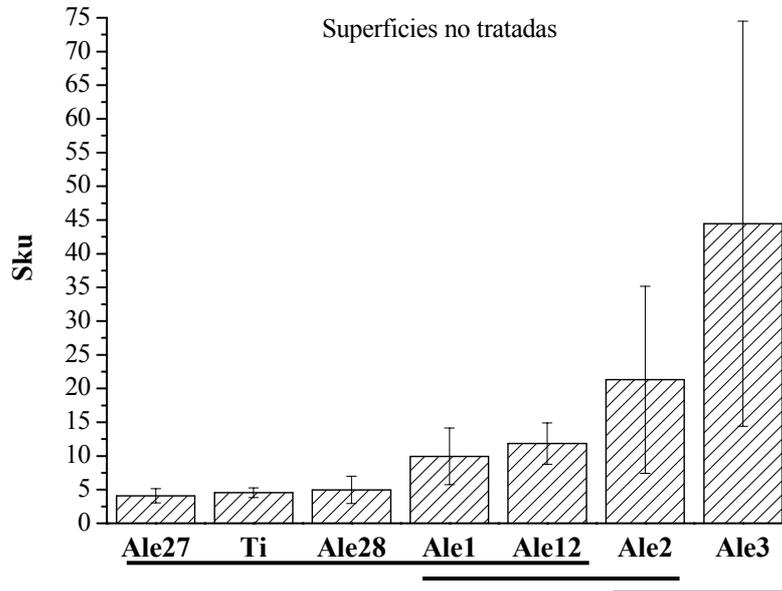
**Figura 3.12:** Influencia del tratamiento OT sobre los valores del parámetro Ssk de todas las superficies de NiTi estudiadas. Para todas las superficies, excepto la Ale27 y la Ale28, las diferencias entre las muestras NT y OT son estadísticamente significativas. Las aleaciones están ordenadas de menor a mayor contenido en Ni (*tabla 1.4*).

#### 3.3.4.4 Parámetro Sku

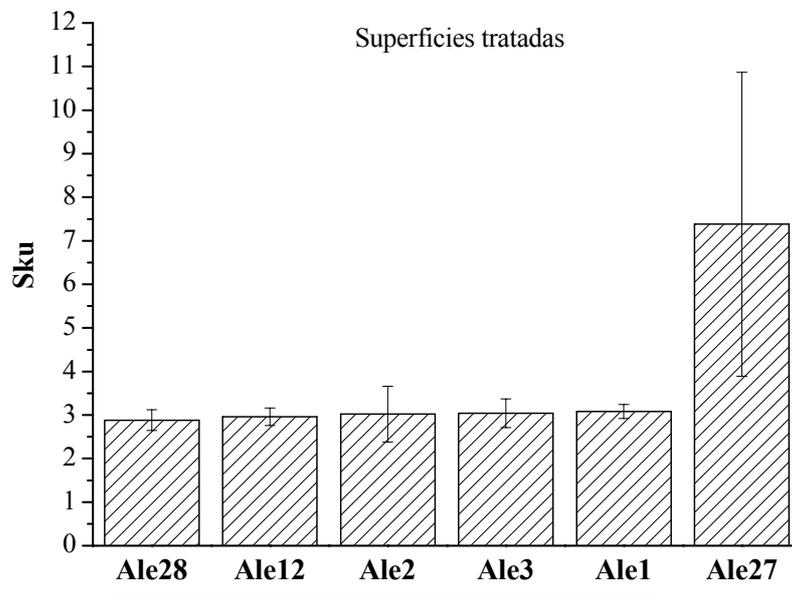
La comparación de los valores de kurtosis obtenidos para las superficies de las aleaciones NiTi NT y del Ti muestra que las superficies de la Ale3 presentan una kurtosis significativamente mayor a todas las demás superficies, excepto la Ale2 (*figura 3.13*). Los resultados de las superficies de la Ale2 y Ale3 presentan grandes desviaciones estándares. Además, la Ale2 tiene una kurtosis significativamente mayor a la de Ale27, Ale28 y Ti (*tabla 3.1*).

Si se comparan los valores de la kurtosis obtenidos después del tratamiento térmico OT, se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre todas las aleaciones de NiTi de fase martensítica (*figura 3.14*): todas presentan un valor de kurtosis cercano a 3.

La kurtosis de las superficies de la Ale27, de fase austenítica, es significativamente mayor respecto a todas las demás superficies, con un valor superior a 7 (tabla 3.1).

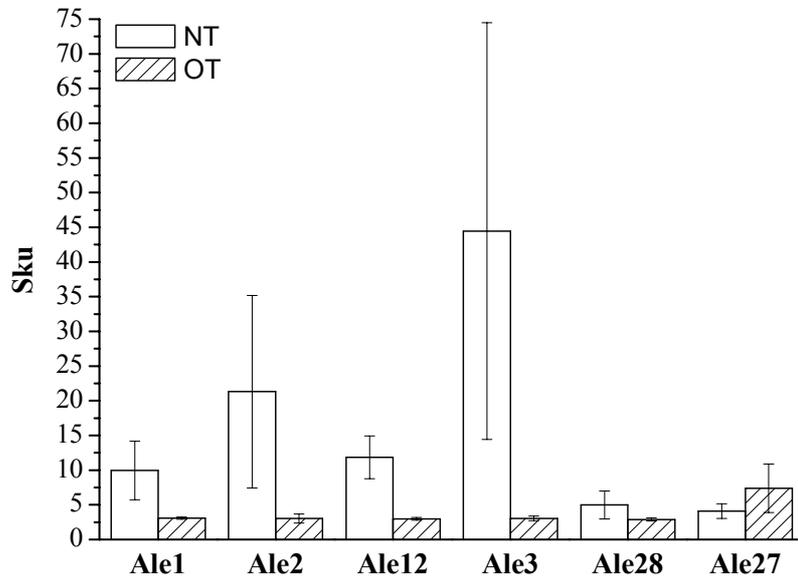


**Figura 3.13:** Comparación del parámetro Sku en función de la superficie. Se comparan en esta gráfica todas las superficies de NiTi NT y el Ti puro. Los grupos unidos con una misma barra horizontal no tienen diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 3.14:** Comparación del parámetro Sku en función de la superficie. Se comparan en esta gráfica todas las superficies de NiTi OT. Los grupos unidos con una misma barra horizontal no tienen diferencias estadísticamente significativas.

El tratamiento OT disminuye significativamente el valor de la kurtosis de todas las superficies de NiTi de fase martensítica (*figura 3.15*). Sin embargo, la influencia del tratamiento OT para la Ale27 no es tan clara. En este caso, la kurtosis de las superficies tratadas por OT es ligeramente mayor, pero no significativamente, a la kurtosis de las superficies no tratadas (*tabla 3.1*).



**Figura 3.15:** Influencia del tratamiento OT sobre los valores del parámetro Sku de todas las superficies de NiTi estudiadas. Para todas las superficies, excepto la Ale27, las diferencias entre las muestras NT y OT son estadísticamente significativas. Las aleaciones están ordenadas de menor a mayor contenido en Ni (*tabla 1.4*).

#### 3.3.4.5 Relación entre superficie real y aparente

Los perfiles tridimensionales obtenidos permitieron calcular la relación ( $I_r/I_a$ ) entre la superficie real (tomando en cuenta la topografía) y la superficie aparente (área nominal analizada) de todos los materiales estudiados.

Los resultados muestran que para todas las aleaciones de NiTi no tratadas, y el Ti puro, esta relación es igual a 1. Es decir que todas las superficies son lisas, al menos hasta el nivel de precisión de la técnica empleada.

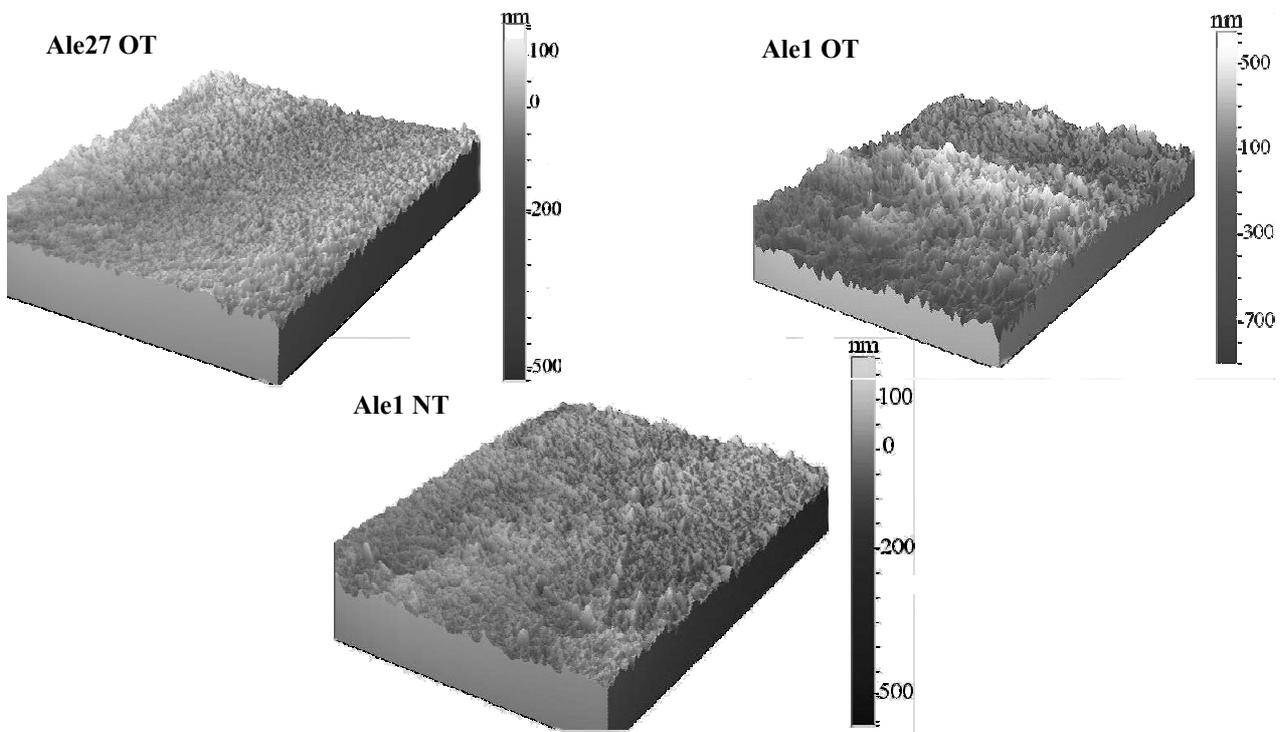
En cambio, todas las superficies de NiTi martensíticas tratadas por OT presentan una superficie real mayor a la superficie aparente, con un incremento generalizado del 1%, excepto para la Ale12, que es del 2% (*tabla 3.2*). La superficie real de la Ale27, de fase austenítica, no cambió con el tratamiento térmico OT.

**Tabla 3.2:** Valores promedios de la relación entre superficie real y superficie aparente ( $I_r/I_a$ ) en función del material y de su tratamiento superficial (NT o OT). Aleaciones clasificadas de menor a mayor contenido en Ni.

Superficies	$I_r/I_a$ ( $\pm$ desviación estándar)	
	NT	OT
Ti	1.00 $\pm$ 0.00	-
Ale1	1.00 $\pm$ 0.00	1.01 $\pm$ 0.00
Ale2	1.00 $\pm$ 0.00	1.01 $\pm$ 0.00
Ale12	1.00 $\pm$ 0.00	1.02 $\pm$ 0.01
Ale3	1.00 $\pm$ 0.00	1.01 $\pm$ 0.00
Ale28	1.00 $\pm$ 0.00	1.01 $\pm$ 0.01
Ale27	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00

### 3.3.4.6 Perfiles tridimensionales

Se obtuvieron imágenes en tres dimensiones de cada una de las superficies analizadas. La observación de estas imágenes (*figura 3.16*) evidencia el hecho de que las superficies de NiTi OT martensíticas son más rugosas que las superficies NT, teniendo también diferencias significativas con la Ale27 OT, de fase austenítica.



**Figura 3.16:** Perfiles 3D (94.6X124.4  $\mu\text{m}$ ) representativos de superficies de las aleaciones de NiTi Ale1NT y OT y Ale27OT.

### 3.3.5 Discusión

El incremento significativo del parámetro  $S_a$  después del tratamiento OT, cualquiera que sea la fase y la composición del NiTi, indica un crecimiento heterogéneo del óxido, es decir, según una dirección cristalográfica específica o nucleado preferencialmente en algún punto del óxido original. Además, el parámetro  $S_a$  para la Ale27 OT (fase austenítica) es menor comparado con las demás aleaciones (martensíticas). Teniendo en cuenta, de acuerdo con los resultados del capítulo 2, que el espesor del óxido formado sobre las superficies de fase austenítica es mayor que el de las fases martensíticas, estos resultados corroboran el hecho de que existe una diferencia cristalográfica del óxido formado, en función de la fase.

El incremento de rugosidad debido al tratamiento OT podría tener una influencia sobre la respuesta biológica. Diversos trabajos [Bbk98]; [Bsl99] demostraron claramente que superficies de Ti microrugosas pueden alterar la expresión fenotípica y el comportamiento de las células, disminuyendo su proliferación y favoreciendo su diferenciación. Sin embargo, estos resultados no se pueden extrapolar al presente trabajo porque los resultados se obtuvieron con valores de  $R_a$  en el orden micrométrico. Otros estudios [Lta96], en los cuales la  $R_a$  del Ti es del orden nanométrico, muestran que la formación del hueso está favorecida con un incremento de la rugosidad (117 nm) en combinación con un mayor espesor de óxido. Además, estudios recientes [Wcl05] compararon dos superficies de NiTi con valores de  $R_a$  de 0,15 y 0,07  $\mu\text{m}$ , es decir cercanos a los valores de  $S_a$  obtenidos en la presente tesis doctoral, mostrando un incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina al segundo y cuarto día de cultivo de células osteoblásticas embrionarias para la superficie más rugosa, a pesar de que las diferencias ya no son estadísticamente significativas al séptimo día. En consecuencia, las superficies de NiTi OT podrían ser candidatos interesantes para favorecer la diferenciación celular, en comparación con las superficies NT.

Todos los parámetros topográficos estudiados de las superficies NT varían en función de la aleación. En consecuencia, a pesar de seguir la misma metodología en la preparación superficial de las aleaciones de NiTi, y particularmente en el pulido, la topografía depende de la fase del material, e incluso de su composición (*tabla 1.2*). Esto se debe probablemente a una diferencia de dureza, relacionada con la  $M_s$ , entre las distintas composiciones y fases del NiTi. Las aleaciones Ale27 y Ale28 son las dos únicas aleaciones, dentro de las que se estudiaron, que contienen fase austenítica a temperatura ambiente, y en consecuencia deberían ser las más duras [Psm05]. Su comportamiento para los parámetros  $S_m$ ,  $S_{sk}$  y  $S_{ku}$  es similar entre ellas, y muy distinto al de las demás aleaciones martensíticas (*figuras 3.7, 3.10 y 3.13*).

Además, la kurtosis ( $Sk_u$ ) de todas las superficies de NiTi OT martensíticas es cercana a 3, indicando una homogeneidad en la altura de los picos que no existía para las superficies NT. Esto podría tener una influencia positiva en el desgaste del material, siempre que el óxido sea, como mínimo, tan duro como el sustrato de NiTi. Dado el fino espesor del óxido que recubre las superficies de NiTi OT (unos 60 nm, conforme a los resultados del capítulo 2), sólo se podría, y con dificultad, caracterizar su dureza por nanoindentación. Lo cual se podría llevar a cabo en futuros estudios. Por otra parte, los valores de  $S_m$  de las superficies OT, con fase austenítica, son significativamente mayores que las NT, lo cual podría tener una influencia positiva sobre las propiedades tribológicas de estos materiales, de acuerdo con la definición del parámetro  $S_m$  detallada anteriormente. Sin embargo, no se esperaría ninguna influencia en el caso de las demás aleaciones martensíticas.

### **3.3.6 Conclusiones**

- Las rugosidades de todas las superficies estudiadas, NiTi NT, NiTi OT y Ti, están en el orden nanométrico.
- Las superficies OT del NiTi con fase austenítica presentan un valor de  $S_a$  significativamente menor que si es con fase martensítica.
- El tratamiento térmico OT tiene una influencia significativa sobre la topografía de las superficies de NiTi, tanto de fase martensítica como de fase austenítica, aumentando su rugosidad en altura y homogeneizando las diferencias topográficas de forma entre las distintas aleaciones.
- La marcada diferencia en los resultados y tendencias en los diferentes parámetros topográficos estudiados para la aleación de fase austenítica, en comparación con todas las aleaciones de fase martensítica, refuerza las conclusiones del capítulo 2, según las cuales el óxido formado en las superficies del material NiTi OT es distinto en función de la fase.

### 3.4 Determinación de la energía superficial

#### 3.4.1 Concepto de Energía Libre de Superficie

Crear una nueva superficie en un sólido supone romper enlaces atómicos, y dejar los átomos externos sin el número de enlaces necesarios para minimizar la energía del sistema. Consecuentemente, la superficie de un sólido es un lugar altamente energético donde los átomos tienden a reordenarse o a reaccionar con el medio exterior.

Este fenómeno está a la base del concepto de Energía Libre de Superficie (ELS) que representa la cantidad de energía necesaria para crear una nueva superficie y se expresa en  $J/m^2$ . Sin embargo, también se utilizan las unidades de medida N/m, sobre todo en el caso de los líquidos, para los cuales es posible hablar de tensión superficial para traducir la idea de “fuerza de contracción” que actúa perpendicularmente a la superficie y hacia el interior, y que tiende a disminuir el área de la interfaz. Es esta misma fuerza la que hace que una gota de líquido, en ausencia de otras fuerzas, sea esférica porque es la forma que a volumen constante permite minimizar el área de la interfase.

Cada tipo de superficie tiene un valor de ELS específico, que, según su magnitud, indica si es muy reactiva o no, es decir si es capaz de interactuar o reaccionar fácilmente con su entorno. Más alto es el valor de ELS de un material, y más reactivo es.

#### 3.4.2 Energía libre de superficie y respuesta biológica: estado del arte

Los fenómenos bioadhesivos, tales como la adsorción proteica, la adhesión celular y bacteriana, o la integración de un dispositivo biomédico en un tejido, son todos caracterizados por la formación de una nueva interfase entre el sistema biológico y el material implantado. Las leyes termodinámicas que gobiernan las interacciones entre moléculas y átomos implican que la creación de esta nueva interfase conlleve un balance energético favorable. En consecuencia, el estudio y la cuantificación de las energías libres interfaciales involucradas en estos fenómenos bioadhesivos podrían ser útiles en el desarrollo de una herramienta potente de predicción del comportamiento biológico de un biomaterial. En esta observación radica la importancia de la caracterización energética de las superficies de materiales para aplicaciones biomédicas.

Por esta razón, numerosos trabajos de la literatura intentaron estudiar las posibles correlaciones entre los valores de la energía libre superficial de los materiales estudiados y la respuesta biológica, generalmente *in vitro*. Estos trabajos se centran en general en el estudio de la

adsorción proteica y/o la consiguiente adhesión celular, ya que son los dos fenómenos que determinan la aceptación o rechazo biológico de un material implantado, tal y como se comentó en la introducción de este capítulo. En función del fenómeno biológico estudiado, se pueden sacar distintas conclusiones. A pesar de que las observaciones varían ampliamente de un estudio al otro, se pueden hacer algunas generalizaciones.

Por una parte, varios autores [Azn87]; [Dbs97]; [Jil82]; [Mdm02]; [Prj03] afirmaron que el carácter hidrofóbico de una superficie favorece en general la adsorción proteica. Esto podría ser debido a que el desplazamiento de las moléculas de agua en la superficie de un material hidrofílico representa una sustancial barrera energética para la adsorción de proteínas [Hno94]; [Ngi00]. Sin embargo, este comportamiento no es universal y depende de la proteína [Ela95]; [Wcl05]. El fibrinógeno y la fibronectina son dos ejemplos de proteínas que prefieren las superficies hidrofóbicas [Agr94]; [Azn87], a pesar de que la fibronectina es también capaz de adsorberse en superficies hidrofílicas [Azn87]; [Gfe82]; [Jil82]; También es el caso de la vitronectina, que es una proteína adhesiva capaz de competir por los sitios de adsorción de las superficies hidrofílicas [Fco91]; [Mtd00]; [Sbu94]. En general, la adsorción proteica sobre superficies hidrofílicas ocurre cuando las interacciones electrostáticas y los cambios conformacionales de la proteína proveen la fuerza motriz necesaria. De esta manera, algunas proteínas muestran una gran dependencia con la carga de la superficie [Ela95].

Por otra parte, los resultados relativos a la adhesión celular o bacteriana son en general opuestos a la tendencia observada para el comportamiento proteico. Es decir, que la adhesión celular está favorecida en superficies hidrofílicas [Agr94]; [Dmg98]; [Las03], [Tio00]; [Wht98]; [Wht00]; [Ysb02], a pesar de que también se ha observado lo contrario en el caso de células provenientes de tejidos embrionarios de pollo (explantes vasculares y de córnea) en contacto con PMMA [Lwl97]. En primera instancia, esta tendencia podría parecer contradictoria con los resultados proteicos, ya que existe una relación directa entre la presencia de proteínas adhesivas y una buena adhesión celular. Sin embargo, se comentó anteriormente que tanto la vitronectina como la fibronectina (dos proteínas adhesivas que es sabido que tienen un papel importante en el proceso de adhesión celular) son capaces de adsorberse también sobre superficies hidrofílicas. Además, se ha observado que después de la adsorción proteica, la superficie se vuelve más hidrofílica, por una disminución de la componente apolar (de Liftshitz Van der Walls), lo cual mejora también la adhesión celular [Lwl97]. Finalmente, se demostró que las funciones adhesivas de la fibronectina disminuían cuando se adsorbía sobre superficies hidrofóbicas, mientras se conservaban sobre superficies hidrofílicas [Azn87]; [Gfe82]; [Jil82], lo cual podría explicar también la mejora de la adhesión celular cuanto más hidrofílica es una superficie.

La mayoría, casi la totalidad, de los trabajos comentados anteriormente determinan los valores de energías superficiales mediante estudios de mojabilidad y mediciones de ángulos de contacto.

En consecuencia, tal y como sugieren Morra y Cassinelli [Moc97], la confusión provocada por la confrontación de distintas conclusiones en función de los autores podría radicar en que no existe ninguna teoría satisfactoria, basada en estudios de mojabilidad, que permita cuantificar de una manera correcta la energía superficial.

Además, en la mayoría de los casos, se habla de hidrofiliidad o hidrofobicidad sin basarse en ningún criterio numérico preciso, sino con sólo la comparación entre los distintos materiales del estudio. Sin embargo, este criterio cuantitativo, que coloca el límite entre superficie hidrofílica y superficie hidrofóbica, existe. En general, según la definición de Vogler [Vog98], se debería hablar de hidrofiliidad para ángulos de contacto menores a 65°. También, en relación con la energía libre superficial, se consideran superficies de baja energía superficial aquellas que presentan valores inferiores a 50 mN/m [Hno94].

### 3.4.3 Materiales

Se estudiaron superficies de distintas aleaciones de NiTi (Ale1, Ale2, Ale3, Ale12, Ale27, Ale28, *tabla 1.2*) no tratadas (NT), pulidas y lavadas según la metodología detallada en el apartado 1.5.5, y tratadas por oxidación térmica (OT, capítulo 2). También, se analizaron superficies de Ti comercialmente puro preparadas de la misma manera que las aleaciones de NiTi NT.

Tres muestras de cada grupo fueron analizadas como mínimo. Para cada uno de los grupos estudiados se llevaron a cabo entre 10 y 50 medidas.

### 3.4.4 Métodos

#### 3.4.4.1 Medición del ángulo de contacto

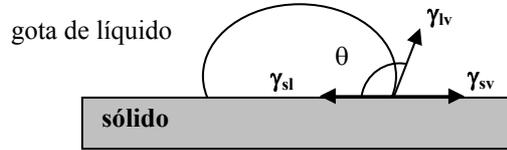
##### 3.4.4.1.1 Principio básico de la técnica

Existen varias técnicas experimentales para determinar la Energía Libre de Superficie (ELS) de un sólido. La que se utilizó en este trabajo se basa en la medición del ángulo  $\theta$  que forma una gota de un determinado líquido depositada sobre un sólido (*figura 3.17*), y se conoce como la técnica del ángulo de contacto, y particularmente el método de la gota sesil.

Basada en consideraciones termodinámicas, la relación entre el ángulo de contacto  $\theta$  y la tensión superficial del líquido sobre el sólido es dada por la ecuación de Young:

$$\gamma_{sv} = \gamma_{sl} + \gamma_{lv} \times \cos \theta \quad \text{ecuación 3.4.1}$$

donde  $\theta$ ,  $\gamma_{sv}$ ,  $\gamma_{sl}$ ,  $\gamma_{lv}$  representan el ángulo de contacto y las tensiones de las interfases sólido/vapor, sólido/líquido y líquido/vapor, respectivamente.



**Figura 3.17:** Representación esquemática de las tres tensiones interfaciales que intervienen en el equilibrio termodinámico de una gota de líquido depositada sobre un sólido. El ángulo de contacto  $\theta$  es el formado por  $\gamma_{sl}$  y  $\gamma_{lv}$ .  $\gamma_{sv}$ ,  $\gamma_{sl}$  y  $\gamma_{lv}$  son respectivamente las tensiones de las interfases sólido/vapor, sólido/líquido y líquido/vapor.

#### 3.4.4.1.2 Cálculo de la Energía Libre de Superficie (ELS) y de sus distintas componentes.

Sólo dos de las cuatro variables de la ecuación 3.4.1 pueden ser determinadas por mediciones experimentales directas: el ángulo de contacto  $\theta$  y la tensión interfacial  $\gamma_{lv}$ , que generalmente equivale a la tensión superficial intrínseca del líquido  $\gamma_L$ .

En consecuencia, el cálculo de la ELS del sólido requiere el establecimiento de otra ecuación que relacione la tensión interfacial  $\gamma_{sl}$  con las otras variables. Sin embargo, no existe acuerdo general sobre la manera más correcta de determinar la ELS a partir de los valores de ángulos de contacto.

Hoy en día, existen tres teorías distintas con cierta implantación, de las cuales proceden tres ecuaciones diferentes para el cálculo de la ELS del sólido  $\gamma_s$  (equivalente a  $\gamma_{sv}$ ), y que han sido utilizadas sistemáticamente en varios trabajos [Lw197]; [Prj03].

Sin embargo, cada una de estas teorías se basa en una descripción física de las interacciones entre los componentes de la materia completamente distinta. No son generalizaciones, ni refinamientos del mismo concepto, sino que son incompatibles.

Estas teorías son conocidas como:

- 1) la teoría de Neumann. Para la aplicación de esta teoría sólo es necesario la determinación del ángulo de contacto con un único líquido.
- 2) la teoría basada en la separación de las interacciones físicas entre interacciones dispersivas (fuerzas de London) e interacciones polares (es decir interacciones entre dipolos

permanentes). En este caso, es necesaria la determinación del ángulo de contacto con al menos dos líquidos.

Una de las ecuaciones derivadas de esta teoría y que se suele aplicar, es la ecuación de Owens y Wendt.

$$\gamma_L(1 + \cos \theta) = 2 \left( (\gamma_L^d \gamma_S^d)^{1/2} + (\gamma_L^p \gamma_S^p)^{1/2} \right) \quad \text{ecuación 3.4.2}$$

donde los superíndices d y p representan las componentes dispersivas y polares de la ELS respectivamente. La ELS global es la suma de estas dos componentes.

3) la teoría que considera que las interacciones no dispersivas (o “polares”) son debidas a interacciones del tipo ácido-base según la definición de Lewis (aceptor o donador de electrones respectivamente). En este último caso, las mediciones de ángulo de contacto se tienen que llevar a cabo con un mínimo de tres líquidos distintos.

La relación de Good Van Oss (*ecuación 3.4.3*), basada en esta teoría, incluye términos debidos a fuerzas de Liftshitz Van der Walls (todas las interacciones inducidas por la presencia de dipolos, incluyendo las fuerzas dispersivas de London), y términos debidos a interacciones ácido-base según Lewis.

$$\gamma_L(1 + \cos \theta) = 2 \left( (\gamma_L^{LW} \gamma_S^{LW})^{1/2} + (\gamma_L^+ \gamma_S^+)^{1/2} + (\gamma_L^- \gamma_S^-)^{1/2} \right) \quad \text{ecuación 3.4.3}$$

donde los superíndices LW, + y – representan las componentes de Liftshitz Van der Walls y de las interacciones ácido (aceptor de electrones) y base (donador de electrones), respectivamente.

Sin embargo, algunos trabajos [Moc97] demostraron que no existe ninguna descripción satisfactoria de la relación entre el ángulo de contacto y la ELS. Es decir que ninguna de las tres teorías expuestas anteriormente permite cuantificar de manera satisfactoria la ELS en el caso de sistemas en que existen interacciones adicionales a las de Liftshitz Van der Walls.

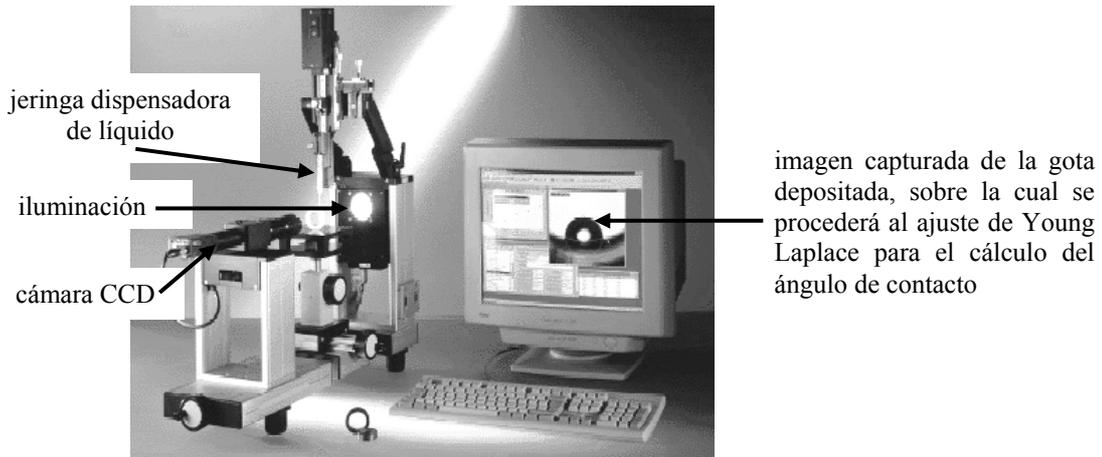
#### 3.4.4.2 Condiciones de ensayo

Se llevaron a cabo mediciones de ángulos de contacto estático por el método de la gota sesil, utilizando el equipo Contact Angle System OCA15 plus (Dataphysics). Este equipo permite depositar una gota de un determinado líquido sobre un sustrato, captar y grabar una imagen de video mediante un sistema cámara CCD-ordenador, y calcular el ángulo de contacto mediante el software SCA20, asociado al sistema (*figura 3.18*).

En este trabajo, el valor del ángulo de contacto se obtiene mediante el ajuste del contorno de la gota con la ecuación de Young Laplace que relaciona la tensión interfacial del líquido con la

forma de la gota. Para proceder a este ajuste, se tiene que comprobar que las gotas obtenidas son simétricas en el plano de análisis.

Es fundamental proceder a la determinación de los ángulos de contacto de manera metódica y meticulosa, aplicando un protocolo preciso preestablecido. De lo contrario, los resultados obtenidos pueden carecer de reproducibilidad.



**Figura 3.18:** Fotografía de los distintos elementos que componen el sistema de medición de ángulos de contacto (Contact Angle System OCA15, Dataphysics) utilizado. Sistema de dispensación del líquido, sistema de iluminación para obtener un buen contraste de imagen, cámara CCD para captar la imagen de la gota y ordenador implementado con un programa específico para calcular el ángulo de contacto a partir de la imagen grabada.

En consecuencia, se tienen que controlar las variables de temperatura, volumen de la gota dispensada, velocidad de dispensación, tiempo de realización de la medida, evaporación del líquido y limpieza de la superficie en cada medición, ya que todas pueden tener una influencia en los resultados obtenidos.

En este trabajo, se realizaron las medidas dispensando 3  $\mu\text{l}$  de líquido por gota, a una velocidad de 1  $\mu\text{l/s}$ . El experimento se llevó siempre a cabo a 25°C (habitación con temperatura controlada) y dentro de una cámara saturada en vapor del líquido dispensado para evitar su evaporación. Las superficies de los materiales estudiados se sonicaron durante 15 minutos en un baño de acetona, seguido de dos baños de 10 minutos con agua ultrapura de calidad MilliQ® (Millipore™). Entre cada etapa, las superficies se secaron con un flujo de nitrógeno seco.

Además de realizar medidas con agua ultrapura de calidad MilliQ®, también se utilizó el diiodometano (líquido apolar) para las superficies de la Ale1 y Ale12 (fase martensítica), de la

Ale27 (fase austenítica) y del Ti puro. Para la dispensación de ambos líquidos, se usaron jeringas Hamilton de capacidad 500  $\mu\text{l}$ , una para cada líquido.

El contorno de la gota se ajustó con la ayuda del software inmediatamente después de la dispensación de la gota. Los valores de los ángulos de contacto obtenidos de esta manera, y con los dos líquidos, se usaron para la determinación de la ELS aplicando la ecuación de Owens y Wendt (ecuación 3.4.2). Se obtuvieron así las componentes de la ELS debidas a las interacciones dispersivas ( $\gamma^d$ ) y polares ( $\gamma^p$ ), para cada superficie.

Los valores  $\gamma^d$  y  $\gamma^p$  del agua pura y del diiodometano se obtuvieron de la base de datos del propio programa SCA20, y provienen de valores de la literatura (tabla 3.3).

**Tabla 3.3:** Valores de las dos componentes polares y dispersivas de la tensión superficial de los dos líquidos utilizados en el estudio.

Líquido	Componente dispersiva	Componente polar
	( $\gamma^d$ , en mN/m)	( $\gamma^p$ , en mN/m)
Agua pura	21,8	51
Diiodometano	50,8	0

#### 3.4.4.3 Estadística

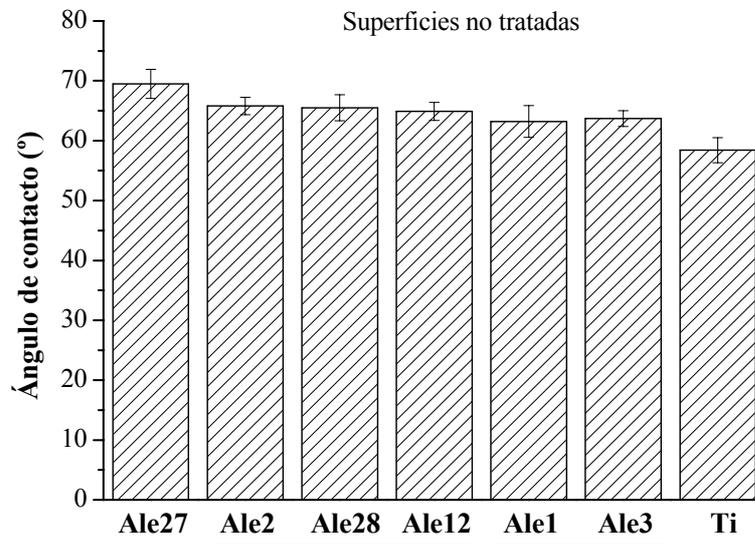
Para evaluar si las diferencias entre los valores medios obtenidos en cada caso son estadísticamente significativas, se han calculado las tablas ANOVA de un factor y se ha aplicado el test de comparaciones múltiples de Fisher o de Tukey, dependiendo del caso. Se empleó el test de Tukey, en lugar del de Fisher, para la comparación de varios grupos de muestras cuando las muestras eran de diferentes tamaños. En ambos casos, se eligió como valor de significación  $p < 0.05$ . En los casos en que los resultados obtenidos por el método de multicomparación estaban en el límite de significación, se aplicó el test de t-student sólo entre dos grupos de valores, siempre con un valor de significación  $p < 0.05$ . Estos tests se llevaron a cabo con la ayuda del software Minitab™ Release 13.1.

### 3.4.5 Resultados

#### 3.4.5.1 Ángulos de contacto con agua pura

Los resultados obtenidos sobre las superficies de NiTi NT muestran que el ángulo de contacto con las superficies de la Ale27, de fase austenítica, es estadísticamente mayor que el de las demás superficies martensíticas y del Ti (*figura 3.19*). También, el Ti es significativamente más hidrofílico (ángulo de contacto menor) que todas las superficies de NiTi. Además, la Ale1 y Ale3 dan valores de ángulos significativamente menor que las demás aleaciones martensíticas (*tabla 3.4*).

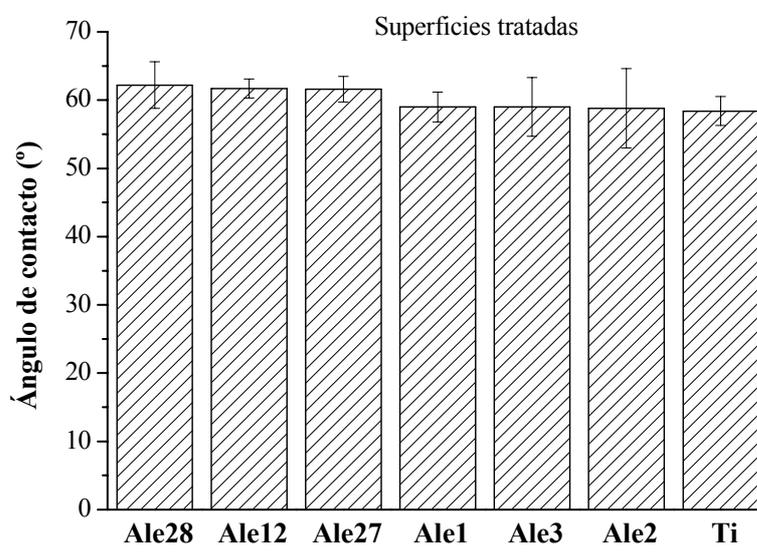
Después del tratamiento OT, las diferencias entre los distintos tipos de superficies son menos evidentes (*tabla 3.4*). En este caso, existen dos grupos diferentes dentro de los cuales no existen diferencias estadísticas, pero que entre ellos sí son estadísticamente diferentes. El grupo de las superficies de la Ale28 y Ale12, de fase martensítica, y de la Ale27, de fase austenítica, presenta un valor de ángulo de contacto mayor que el grupo de las demás aleaciones martensíticas y el Ti puro (*figura 3.20*).



**Figura 3.19:** Valores de los ángulos de contacto obtenidos con agua pura sobre las distintas superficies de NiTi NT y de Ti puro. Los grupos unidos con una misma barra horizontal no tienen diferencias estadísticamente significativas.

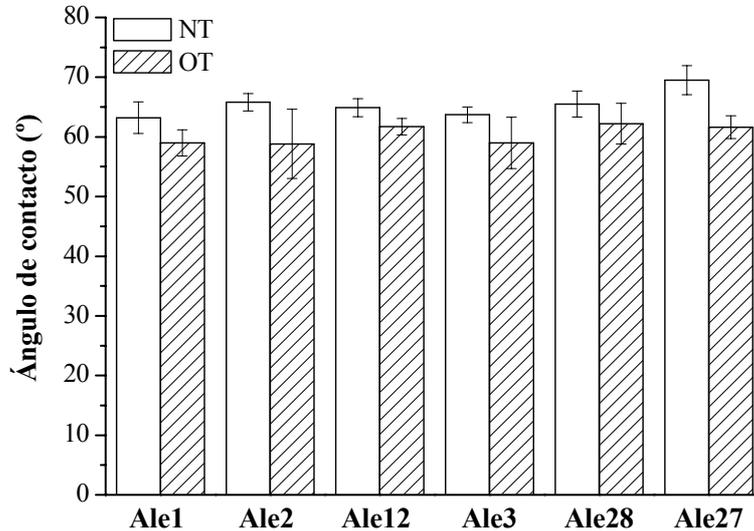
**Tabla 3.4:** Resumen de los valores de ángulos de contacto ( $AC \pm$  desviación estándar) obtenidos con agua pura para las distintas superficies estudiadas de NiTi NT y OT, y de Ti puro. Aleaciones clasificadas de menor a mayor contenido en Ni.

Aleación	NT	OT
	AC (°)	AC (°)
Ti	$58.4 \pm 2.1$	-
Ale1	$63.2 \pm 2.6$	$59 \pm 2.2$
Ale2	$65.8 \pm 1.5$	$58.8 \pm 5.8$
Ale12	$64.9 \pm 1.5$	$61.7 \pm 1.4$
Ale3	$63.7 \pm 1.3$	$59 \pm 4.3$
Ale28	$65.5 \pm 2.2$	$62.2 \pm 3.4$
Ale27	$69.5 \pm 2.4$	$61.6 \pm 1.9$



**Figura 3.20:** Valores de los ángulos de contacto obtenidos con agua pura sobre las distintas superficies de NiTi OT y de Ti puro. Los grupos unidos con una misma barra horizontal no tienen diferencias estadísticamente significativas.

El tratamiento OT aumenta el carácter hidrofílico (disminución del ángulo de contacto) de las superficies en todas las aleaciones de NiTi estudiadas, comparado con las superficies NT, de manera estadísticamente significativa, a pesar de obtener algunas desviaciones estándares de elevado valor (figura 3.21).



**Figura 3.21:** Influencia del tratamiento de oxidación sobre los valores de ángulo de contacto obtenidos con agua para las distintas superficies estudiadas de NiTi. Para todas las aleaciones estudiadas, los valores en las superficies OT fueron menores que en las NT, con diferencias estadísticamente significativas. Las aleaciones están ordenadas de menor a mayor contenido en Ni (tabla 1.4).

#### 3.4.5.2 Ángulos de contacto con diiodometano

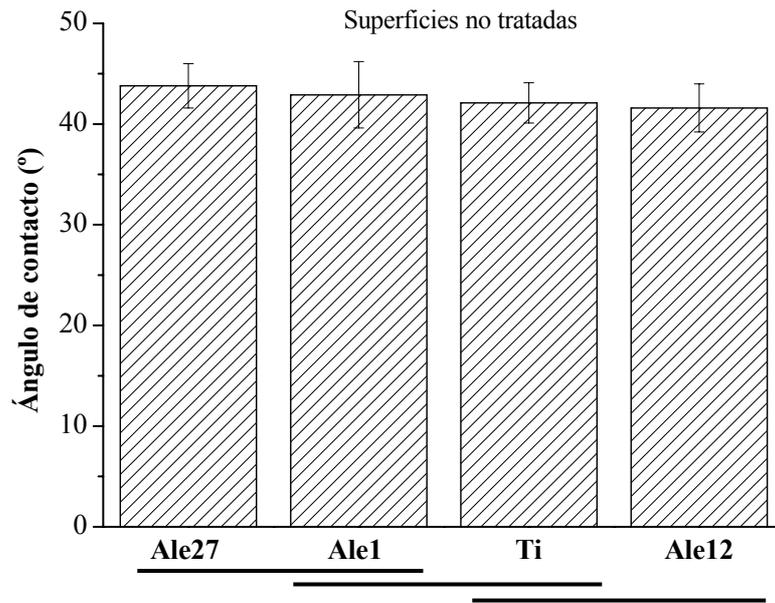
Los resultados obtenidos con el diiodometano (tabla 3.5) para las superficies NT muestran que existen diferencias estadísticamente significativas entre la Ale27, y la Ale12 y el Ti; y entre la Ale1 y la Ale12 (figura 3.22).

**Tabla 3.5:** Resumen de los valores de ángulos de contacto ( $AC \pm$  desviación estándar) obtenidos con diiodometano para las distintas superficies estudiadas de NiTi no tratadas (NT) y oxidadas (OT), y de Ti puro. Las aleaciones están ordenadas de menor a mayor contenido en Ni.

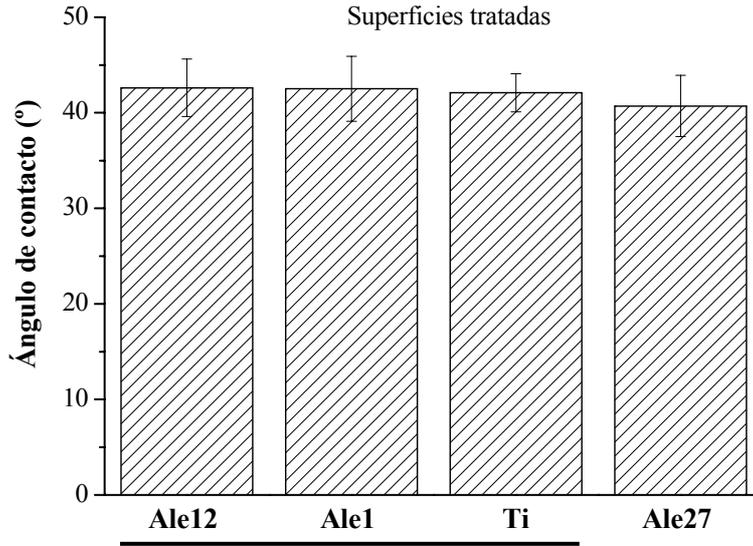
Aleación	NT	OT
	AC (°)	AC (°)
Ti	$42.1 \pm 2$	
Ale1	$42.9 \pm 3.3$	$42.5 \pm 3.4$
Ale12	$41.6 \pm 2.4$	$42.6 \pm 3$
Ale27	$43.8 \pm 2.2$	$40.7 \pm 3.2$

En cuanto a los resultados obtenidos para las superficies OT, sólo se observa que la Ale27 presenta unos valores de ángulos de contacto estadísticamente menores que las demás superficies (*figura 3.23*).

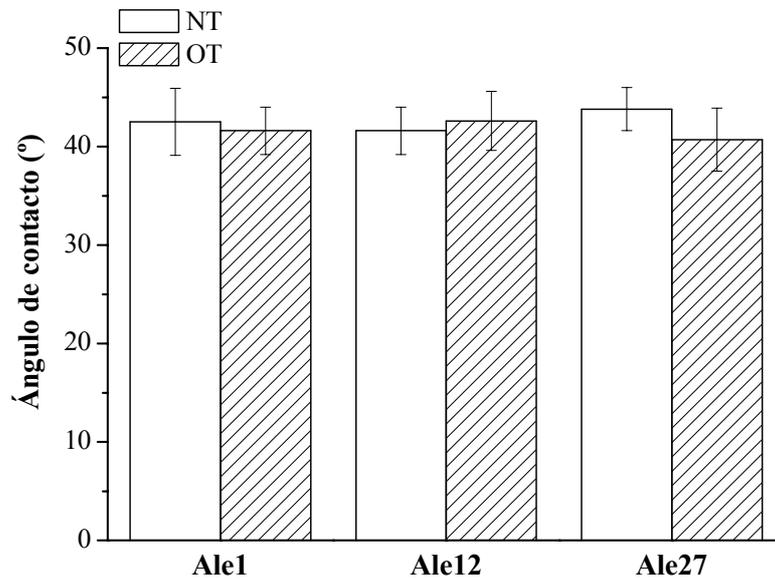
El tratamiento OT sólo tiene una influencia sobre el valor de ángulo de contacto obtenido para las superficies de la Ale27, disminuyendo significativamente él mismo comparado con las superficies NT (*figura 3.24*).



**Figura 3.22:** Valores de los ángulos de contacto obtenidos con diiodometano sobre las distintas superficies de NiTi NT estudiadas y de Ti puro. Los grupos unidos con una misma barra horizontal no tienen diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 3.23:** Valores de los ángulos de contacto obtenidos con diiodometano sobre las distintas superficies de NiTi OT estudiadas y de Ti puro. Los grupos unidos con una misma barra horizontal no tienen diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 3.24:** Influencia del tratamiento de oxidación sobre los valores de ángulo de contacto obtenidos con diiodometano para las distintas superficies estudiadas de NiTi. Sólo las superficies de Ale27 presentan diferencias estadísticamente significativas entre OT y NT. Las aleaciones están ordenadas de menor a mayor contenido en Ni (tabla 1.4).

### 3.4.5.3 Energías libres de superficie

Los valores de energías superficiales totales ( $\gamma_t$ ), así como las componentes polares ( $\gamma^p$ ) y dispersivas ( $\gamma^d$ ) según el modelo de Owens y Wendt (*ecuación 3.4.2*), muestran que dominan las interacciones dispersivas, tanto para las superficies NT como para las superficies OT y el Ti puro (*tabla 3.6*).

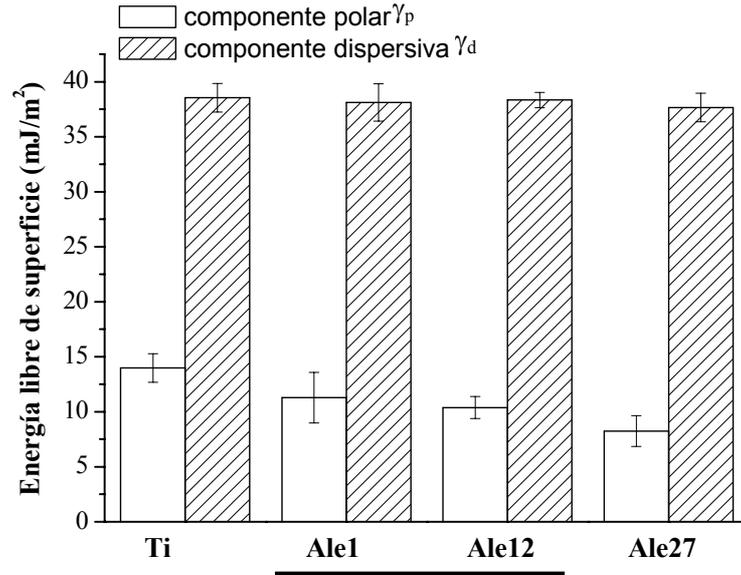
**Tabla 3.6:** Valores de la energía libre de superficie total  $\gamma_b$  y de sus dos componentes polar  $\gamma^p$  y dispersiva  $\gamma^d$ , en función del material y del tratamiento superficial.

Superficie	NT			OT		
	$\gamma^p$	$\gamma^d$	$\gamma_t$	$\gamma^p$	$\gamma^d$	$\gamma_t$
Ale1	11.3 ± 2.3	38.1 ± 1.7	49.4 ± 2.3	13.3 ± 1.8	38.8 ± 1.4	52.1 ± 1.9
Ale12	10.4 ± 1	38.3 ± 0.7	48.7 ± 0.9	12.8 ± 1.4	38.3 ± 0.8	51.1 ± 1.7
Ale27	8.2 ± 1.4	37.7 ± 1.3	45.9 ± 1.6	11.8 ± 0.7	39.3 ± 1.1	51.1 ± 1.1
Ti	14 ± 1.3	38.5 ± 1.5	52.5 ± 1	-	-	-

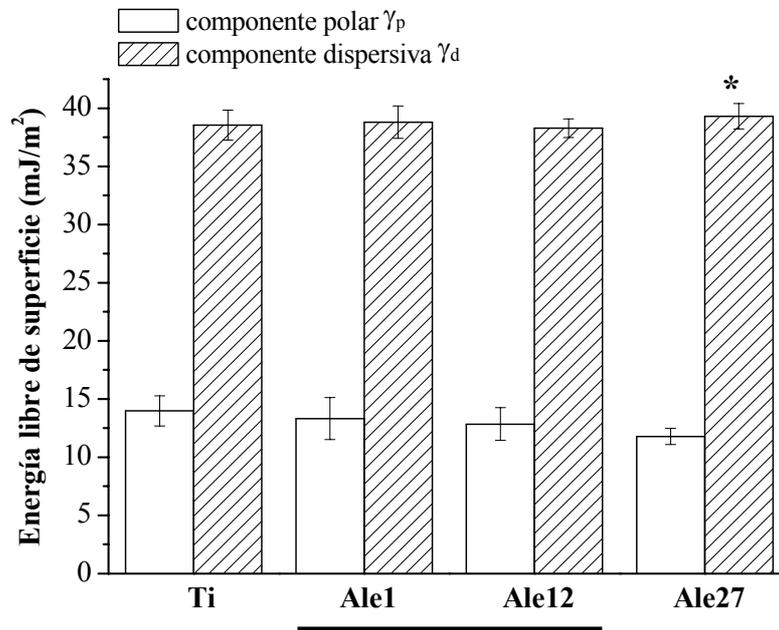
La comparación estadística de los valores  $\gamma^p$ ,  $\gamma^d$  y  $\gamma_t$  de las superficies NT y de Ti puro demuestra que las diferencias observadas para los valores de  $\gamma_t$  son debidas exclusivamente a una diferencia en las componentes polares  $\gamma^p$  (*figura 3.25*). Es decir que no existen diferencias estadísticas entre las distintas componentes dispersivas, pero sí que las superficies NT de la Ale27 presentan un valor de  $\gamma^p$  significativamente menor, mientras el Ti presenta un valor significativamente mayor a las demás aleaciones. Esto resulta en una diferencia significativa en los valores de  $\gamma^t$ , que sigue la misma tendencia que  $\gamma^p$ .

Después del tratamiento OT, la tendencia observada en los valores  $\gamma^p$  es la misma que para las superficies NT. Es decir que la componente polar de la energía superficial de la Ale27 es significativamente menor comparado con las demás superficies, y la del Ti es significativamente mayor (*figura 3.26*). Sin embargo, en este caso se observa también una diferencia, con significación estadística, en los valores  $\gamma^d$ , con la componente dispersiva de la Ale27 mayor a todas las demás (*tabla 3.6*).

En consecuencia, la tendencia observada en los valores de energía total  $\gamma^t$  es que las Ale27, de fase austenítica, y la Ale12, de fase martensítica, presentan valores estadísticamente menores a los valores de la Ale1 y del Ti puro.

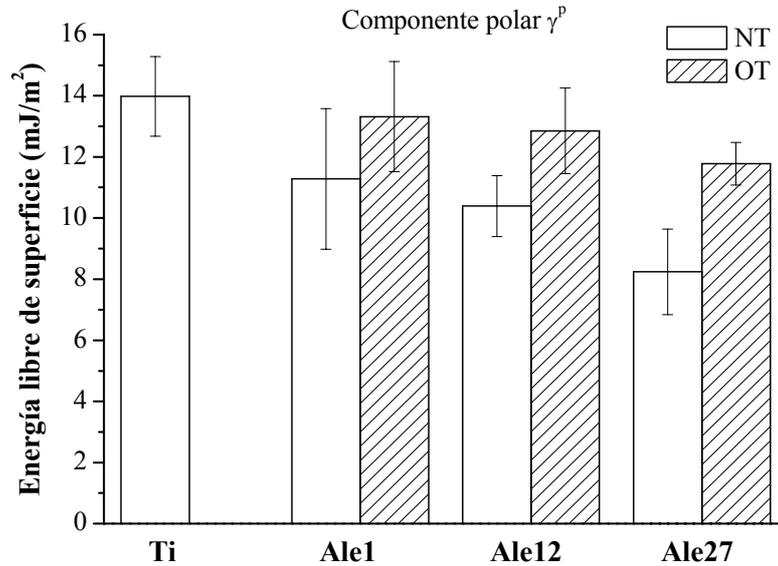


**Figura 3.25:** Descomposición de las energías libres superficiales de las distintas superficies NT estudiadas en sus respectivas componentes polares y dispersivas (según el modelo de Owens y Wendt). Las barras horizontales son relativas a las componentes polares, y unen los grupos que no tienen diferencias estadísticamente significativas. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las componentes dispersivas de las distintas superficies estudiadas.



**Figura 3.26:** Descomposición de las energías libres superficiales de las distintas superficies OT estudiadas en sus respectivas componentes polares y dispersivas (según el modelo de Owens y Wendt). Las estrellas \* marcan las diferencias estadísticamente significativas que existen entre las componentes dispersivas. Las barras horizontales son relativas a las componentes polares, y unen las muestras que no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

El tratamiento OT tiene una influencia, sobre todo, sobre las componentes polares de las energías de superficie, y para todos los tipos de superficies estudiados, incrementándolas de manera estadísticamente significativa comparado con las superficies NT, y acercándolas al valor obtenido para el Ti puro (figura 3.27). Este incremento en los valores de las componentes polares justifica también al incremento del valor de las energías superficiales totales.



**Figura 3.27:** Influencia del tratamiento OT sobre los valores de las componentes polares de las energías superficiales de las distintas superficies estudiadas. En todas las superficies estudiadas, los valores para las superficies OT son mayores que para las NT, con diferencias estadísticamente significativas. Las aleaciones están ordenadas de menor a mayor contenido en Ni (tabla 1.4).

### 3.4.6 Discusión

Los resultados obtenidos con agua pura de los valores de ángulos de contacto de las superficies de NiTi NT están en acuerdo con los datos encontrados en la bibliografía [Apg03]; [Los01]; [Prj03] con pequeñas variaciones. Estas variaciones pueden ser debidas a la preparación superficial y al método de determinación del ángulo de contacto que no son los mismos en todos los casos.

El incremento de rugosidad en un mismo tipo de superficie tiende a reforzar su carácter hidrofílico o hidrofóbico, en función de si el ángulo inicial es menor o mayor a 90°, respectivamente [Sos96]. En el presente trabajo, las superficies de NiTi NT presentan valores de ángulo de contacto menores a 90°, y las superficies OT dan valores menores de ángulos de contacto, con lo cual, el incremento de Sa con el tratamiento OT (apartado 3.3) podría ser, en

parte, responsable del incremento del carácter hidrofílico de las superficies NiTi. Por esta razón, las tendencias observadas indican que la diferencia de rugosidad que existe entre las distintas superficies podría influir en el ángulo de contacto con el agua.

Los resultados indican también que la naturaleza de la fase (martensítica o austenítica) del NiTi influye sobre los valores del ángulo de contacto. Para las superficies NT, la aleación Ale27, de fase austenítica, presenta valores significativamente mayores de ángulo de contacto que las demás aleaciones martensíticas y que el Ti puro. También existen diferencias estadísticamente significativas entre las distintas aleaciones de fase martensítica, pero sin ninguna relación clara con su composición o  $M_s$ . En consecuencia, se puede considerar que la composición química de la aleación NiTi no tiene ninguna influencia sobre los valores de ángulos de contacto.

Después del tratamiento OT, todas las superficies son ligeramente más hidrofílicas comparado con las superficies NT. Esto se podría deber, en parte, a la formación de grupos hidroxilos en la superficie del material, debido a la parcial hidrólisis del óxido que recubre las superficies por el vapor de agua atmosférico. La cantidad de grupos OH formados, determinada por el ajuste del pico O1s obtenido por XPS, es mayor en el caso de las superficies OT comparado con las superficies NT (*tabla 3.7*), para las fases martensíticas.

Se puede suponer que esta tendencia es también verdad en el caso de la Ale27, de fase austenítica, pero no se dispone de los datos relativos a las superficies NT. Las diferencias entre la Ale27 OT y las demás aleaciones martensíticas OT, y el Ti y las demás superficies de NiTi OT, también se ven reflejadas en la concentración de grupos hidroxilos de cada tipo de superficie. Asimismo, se determinó que las superficies de la Ale27OT tienen menos grupos OH que las demás, mientras el Ti puro tiene más (*tabla 3.7*). Esto podría explicar las diferencias en las componentes polares de las distintas aleaciones.

El tratamiento OT iguala prácticamente todos los valores de ángulos de contacto de las superficies de NiTi martensíticas entre ellas y con el Ti puro (*figura 3.20*), corroborando el hecho de que el óxido formado es muy similar al óxido que recubre naturalmente el Ti puro. Además, el carácter más hidrofóbico de la Ale27 OT, de fase austenítica, se podría deber a la menor cantidad de grupos OH que hay en su superficie, y también corrobora las conclusiones del capítulo 2, según las cuales el óxido formado por OT es distinto en función de la fase del material NiTi. Además, la Ale28 OT, que también contiene restos de austenita a temperatura ambiente, sigue la misma tendencia que la Ale27 OT.

**Tabla 3.7:** Contribución en la señal total O1s de los distintos picos relativos al oxígeno en función del tratamiento de superficie, en el caso de la Ale31 y de la Ale1, de fase martensítica, (tabla 1.2), y del Ti puro. Estos resultados se obtuvieron al ajustar el pico O1s del ciclo1 de cada superficie, con un parámetro  $\chi^2$  inferior a 2 (apartado 2.4.1.4).

Superficie	Energía de enlace (eV)	%	(OH)/(TiO <sub>2</sub> )
Ti	TiO <sub>2</sub>	531	57,2
	OH	532,1	31
	C=O, C-O	533,9	11,8
Ale31 NT	TiO <sub>2</sub>	530	67,7
	OH	531,4	24,7
	C=O, C-O	532,9	7,6
Ale31 OT	TiO <sub>2</sub>	529,7	60,1
	OH	531,2	29,2
	C=O, C-O	532,9	10,7
Ale1 OT	TiO <sub>2</sub>	529,8	63,6
	OH	531,4	32,4
	C=O, C-O	532,8	4
Ale27 OT	TiO <sub>2</sub>	529,8	89,1
	OH	531,2	10,9
	C=O, C-O		

La determinación de las componentes polares y dispersivas de las energías superficiales indica que todas las superficies tienen un carácter dominante dispersivo, pero que la diferencia entre las superficies de NiTi NT y OT es debido principalmente a un incremento de la componente polar para las superficies OT. En consecuencia, si los valores de energía superficial influyen sobre la respuesta biológica, las diferencias en el carácter polar de las superficies estudiadas serán, en este caso, responsables de las diferencias observadas.

El hecho que el tratamiento OT conlleve que las superficies de NiTi tengan un carácter energético muy similar al de la superficie de Ti puro, también se ve reflejado en los valores de las componentes polares y totales de las distintas superficies, con las aleaciones OT de fase martensítica con carácter más cercano al Ti que al de las de fase austenítica.

Finalmente, tanto los valores de ángulos de contacto obtenidos con agua pura como los valores de energías superficiales de todas las superficies estudiadas se sitúan alrededor del límite teórico que separa las superficies hidrofílicas de las superficies hidrofóbicas, tal y como se ha comentado en el estado del arte de este apartado. Por ello, sólo basándose en consideraciones

energéticas, será difícil apoyarse sobre los resultados de la bibliografía para prever o justificar el comportamiento biológico de estas superficies.

### **3.4.7 Conclusiones**

- Todas las superficies estudiadas, tanto las superficies de NiTi NT y OT, como las superficies de Ti puro tienen un carácter mayoritariamente dispersivo.
- La fase (martensítica o austenítica) del NiTi tiene una influencia más importante sobre la energía superficial que la composición química. Las superficies de NiTi de fase austenítica, NT y OT, son más hidrofóbicas que las superficies de NiTi de fase martensítica.
- El tratamiento OT incrementa el carácter hidrofílico de las superficies de NiTi, cualesquiera sean su fase o composición química. Este incremento se explica por los cambios en la componente polar de la energía superficial.
- El tratamiento OT permite la formación de un óxido superficial muy similar energéticamente al óxido que recubre de forma natural al Ti puro.

## 3.5 Caracterización del potencial zeta

### 3.5.1 Definición del potencial zeta

La mayoría de las interfases en solución acuosa están cargadas eléctricamente. Esta carga puede provenir de la asociación o disociación de enlaces covalentes entre grupos de la superficie, y/o de la adsorción específica de iones de bajo peso molecular presentes en la solución acuosa [Hno94].

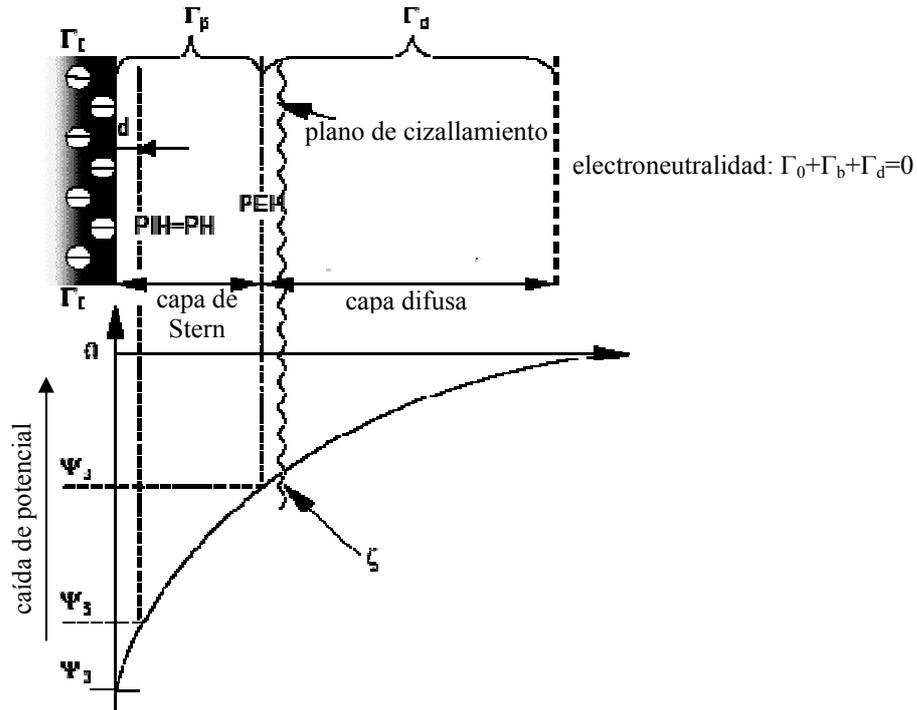
Bajo condiciones de equilibrio, la electroneutralidad exige que la carga de la superficie sólida esté compensada por la carga neta de la solución adyacente a ella. De esta manera, se forma una doble capa eléctrica en la interfase superficie sólida/solución acuosa. Existen varios modelos teóricos para modelizar esta doble capa eléctrica. Sin embargo, el modelo de Stern es el más ampliamente aplicado ya que se obtienen los mejores resultados en los casos en los cuales la adsorción específica de iones es importante.

En este modelo existe una zona interna de la doble capa, donde actúan principalmente las fuerzas de adsorción, y que se comporta como una doble capa rígida. Y existe otra zona más externa donde se forma una doble capa difusa en la cual los iones no están empaquetados en un plano fijo, sino que se distribuyen más en el espacio (*figura 3.28*). En el límite entre la doble capa rígida y la doble capa difusa se define el llamado plano de deslizamiento. Este plano es el límite entre la carga fija del sólido y las cargas móviles en la fase líquida. La configuración de esta doble capa eléctrica permite definir una densidad superficial de carga y un potencial eléctrico en el plano de deslizamiento. Por definición, este potencial eléctrico se llama potencial zeta ( $\zeta$ ).

### 3.5.2 Información aportada por las curvas de potencial zeta

Mientras que la carga superficial y el potencial superficial asociado no se pueden medir, es posible determinar experimentalmente el potencial  $\zeta$ , que depende de la concentración iónica del electrolito. Si la fuerza iónica de la solución es baja, el potencial  $\zeta$  es una buena aproximación del potencial de superficie.

De esta manera, el potencial  $\zeta$  aporta una información relativa a las características y comportamiento eléctrico de la superficie del material estudiado, y de los iones interactuando con la superficie.



**Figura 3.28:** Representación esquemática de la doble capa eléctrica formada en la superficie de un sólido en contacto con una solución acuosa, según el modelo de Stern. PIH: plano interno de Helmholtz, donde ocurre una adsorción específica, y PEH: plano externo de Helmholtz, en el cual hay una adsorción no específica de los iones de la solución. El potencial en el plano de cizallamiento, o potencial  $\zeta$ , se aproxima mucho al potencial en el PEH.

### 3.5.3 Punto de carga cero y punto isoeléctrico

Los dos posibles mecanismos comentados anteriormente, y que llevan a la formación de las cargas superficiales, explican cualitativamente la dependencia de estas cargas con el pH, y la existencia de un pH al cual la carga neta es nula. Este pH se llama punto isoeléctrico (IEP) o punto de carga cero (ZPC). A pesar de que parece que se pueden usar ambos términos de manera indistinta, existe una diferencia entre ambos. El término ZPC se utiliza en los casos de ausencia de sales en el electrolito, es decir, cuando los únicos iones presentes son los llamados iones determinantes de potencial (en general  $H^+$  y  $OH^-$ ), como por ejemplo en el caso de una determinación por titración potenciométrica. Mientras que el término de IEP se utiliza cuando ocurre una adsorción específica (afinidad química para la superficie) de los iones del electrolito, como puede ser el caso de algunas determinaciones electrocinéticas [Kos97].

### 3.5.4 Cargas superficiales electrostáticas y respuesta biológica: estado del arte

Tal y como se comentó anteriormente, la mayoría de las interfases están cargadas eléctricamente en medio acuoso. Como las membranas celulares llevan una carga negativa, y en función de su punto isoeléctrico, una proteína lleva también una carga global específica a un determinado pH, es de esperar que las interacciones electrostáticas jueguen un papel en la respuesta biológica de un material implantado.

En varios trabajos se observó que el comportamiento celular era diferente sobre superficies cargadas positivamente o negativamente. La conclusión general de estos estudios es que la adhesión de las células está favorecida sobre las superficies cargadas positivamente [Htr96]; [Qsk98]; [Srd98], a pesar de que también se vio que las superficies negativas son adecuadas para las células osteoblásticas [Llk97]; [Qsk98]. Sin embargo, algunos trabajos [Qsk98] demostraron que las cargas positivas pueden impedir el estiramiento y la diferenciación de las células, dificultando la motilidad de las mismas, por culpa de una fuerza de adhesión demasiado grande entre ellas y la superficie.

En el caso de las proteínas, también es razonable pensar que se atraen mutuamente las cargas de signo opuesto. Se observó un proceso de adsorción proteica controlado por las interacciones electrostáticas, durante el cual casi sólo se adsorben proteínas de carga global opuesta a la carga de la superficie [Rmg05]. Sin embargo, la situación puede ser más compleja dentro de una solución acuosa ya que las cargas de una proteína están parcialmente apantalladas por las moléculas de agua que la hidrata, y están compensadas por la presencia de pequeños iones presentes en la solución. Finalmente, a pesar de que no ha surgido nunca la existencia de una carga óptima, siendo adecuadas las superficies de ambas cargas tanto para la adsorción proteica como para la adhesión celular, es interesante destacar que dos de los mejores materiales para la osteointegración, el titanio y la hidroxiapatita, tienen una carga superficial negativa a pH fisiológico [Hkk02]; [Khk03]. Además, en estos estudios, se ha sugerido que la formación *in vitro* de apatita sobre superficies bioactivas de Ti es debida a interacciones electrostáticas, y es posible gracias a la presencia de cargas negativas sobre la superficie del Ti bioactivo [Hkk02]; [Khk03].

La caracterización del potencial zeta de las superficies de los biomateriales es relativamente novedosa. Además, en la mayoría de los casos, no es posible hacer mediciones con soluciones coloidales, como por ejemplo mediante electroforesis. Estos métodos son los que se solían usar para determinar el punto isoeléctrico de las partículas de óxido. Los valores referenciados en la literatura son casi exclusivamente obtenidos a partir de materiales en polvo. Por estos motivos, existe muy poca bibliografía sobre valores de potencial zeta de superficies sólidas de biomateriales. Existen trabajos que estudian la variación del potencial zeta de superficies de Ti

bioactivo, a medida que se forma una capa de apatita en su superficie [Hkk02]; [Khk03]. En estos trabajos miden la movilidad electroforética de las partículas de poliestireno de carga superficial nula, que están en solución junto con las muestras de Ti, y que está relacionada con la carga superficial de las muestras metálicas. Otros estudios [Rzs02] miden el potencial zeta de superficies de Ti6Al4V y de TiO<sub>2</sub> mediante la técnica de potencial de flujo, obteniendo valores de punto isoeléctrico alrededor de 4.4. Hasta donde sabemos, no se encuentra ningún dato de IEP o potencia zeta de superficies de NiTi en la literatura.

### 3.5.5 Materiales

Las mediciones se llevaron a cabo por técnicos especializados en la empresa Anton Paar, fabricante austríaco de uno de estos equipos. Sin embargo, por limitaciones impuestas por Anton Paar, sólo se pudieron medir tres materiales diferentes.

Los resultados obtenidos demostraron que la técnica empleada era adecuada y permitía obtener fácilmente las curvas del potencial zeta de las superficies metálicas analizadas.

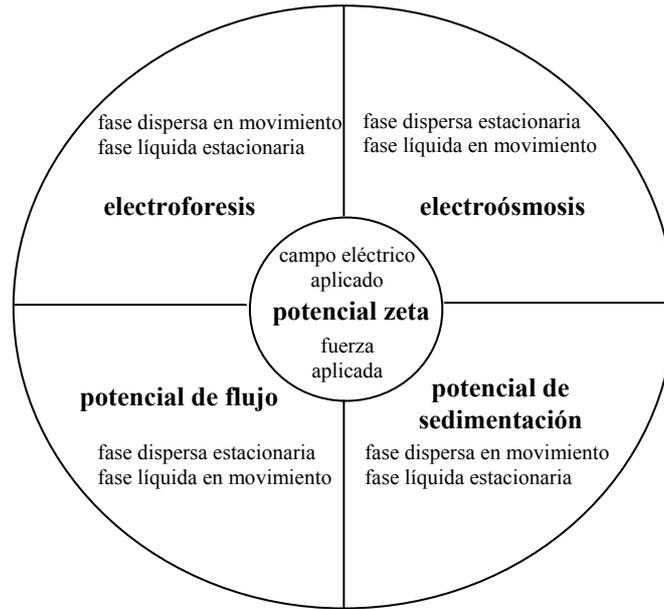
Sin embargo, posteriormente a estos análisis, no hubo una nueva oportunidad de repetir las mediciones, imposibilitando la confirmación del estudio.

En consecuencia, las mediciones llevadas a cabo fueron obtenidas para superficies de la aleación Ale1 (*tabla 1.2*), tratadas por OT y NT, y para superficies de Ti puro. Se analizaron cuatro superficies de cada grupo, en dos medidas independientes.

### 3.5.6 Métodos

Existen cuatro métodos electrocinéticos distintos para la determinación experimental del potencial zeta y del punto isoeléctrico: la electroforesis, la electroósmosis, el potencial de sedimentación y el potencial de flujo. Estos cuatro métodos se pueden clasificar en dos grupos, según si se basan en la aplicación de un campo eléctrico o en la aplicación de una fuerza, para poner en movimiento la fase líquida o la fase sólida (*figura 3.29*).

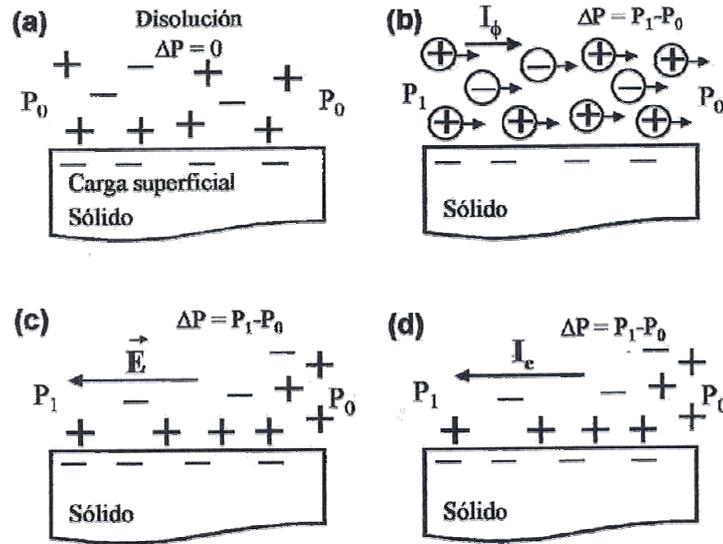
En el caso de los materiales metálicos estudiados en el presente trabajo, el único método adecuado para determinar el potencial zeta es el potencial de flujo. Los otros tres métodos necesitan que el material analizado este en polvo o en partículas muy finas (soluciones coloidales), o que este material sea una membrana (permeable), lo que no era posible para el material NiTi estudiado.



**Figura 3.29:** Clasificación de las distintas técnicas de determinación experimental del potencial zeta, en función de si se aplica un campo eléctrico (electroforesis y electroósmosis) o una fuerza (potencial de flujo y potencial de sedimentación) para provocar el movimiento de la fase líquida (potencial de flujo y electroósmosis) o de la fase sólida (electroforesis y potencial de sedimentación) [adaptado de Mcf04].

### 3.5.6.1 Potencial de flujo: principio básico

El potencial eléctrico que se mide entre los extremos de un canal sólido ocupado con una fase líquida, cuando ésta se mueve respecto a la fase sólida, al aplicar una diferencia de presión hidráulica, es el potencial de flujo. Este potencial se genera debido a la presencia de la doble capa difusa en la interfase sólido/líquido. Tomando el ejemplo de un sólido cargado negativamente, la parte difusa de la doble capa eléctrica está enriquecida de contraiones (figura 3.30 a). Al aplicar una diferencia de presión ( $\Delta P$ ) se produce un flujo de líquido que arrastra el exceso de carga positiva hacia el extremo del canal. De esta manera, aparece una corriente eléctrica debida al flujo ( $I_\phi$ ) (Figura 3.30 b). La acumulación de cargas en el extremo del canal hace que aparezca un campo eléctrico ( $E$ ) (Figura 3.30 c), que a su vez induce una corriente de conducción en sentido opuesto ( $I_c$ ) (figura 3.30 d). El estado estacionario se alcanza cuando las corrientes de flujo y de conducción tienen el mismo valor. Esto permite obtener una relación entre la diferencia de potencial medida y el potencial zeta.



**Figura 3.30:** Representación esquemática de los fenómenos electroquímicos que se desarrollan durante una medida de potencial zeta con la técnica de potencial de flujo (adaptado de [Aca00]).

Experimentalmente, sólo se puede acceder al potencial de flujo, mientras que el potencial zeta es el que contiene la información de la interfaz. En consecuencia, es fundamental establecer una relación entre estos dos potenciales para obtener las propiedades superficiales del sólido.

La teoría aplicada en este trabajo para el cálculo del potencial  $\zeta$  se conoce como teoría de Fairbrother-Mastin, y relaciona el valor del potencial  $\zeta$  con el potencial de flujo según la ecuación 3.5.1.

$$\zeta = \frac{dU}{dp} \times \frac{\eta}{\varepsilon \times \varepsilon_0} \times \kappa \quad \text{ecuación 3.5.1}$$

donde U es el potencial de flujo, p es la diferencia de presión aplicada,  $\eta$  es la viscosidad del electrolito,  $\varepsilon$  es la constante dieléctrica del electrolito,  $\varepsilon_0$  es la permitividad del vacío, y  $\kappa$  es la conductividad del electrolito que está relacionada con la geometría de la muestra por la ecuación 3.5.2.

$$R \times \kappa = \frac{L}{Q} \quad \text{ecuación 3.5.2}$$

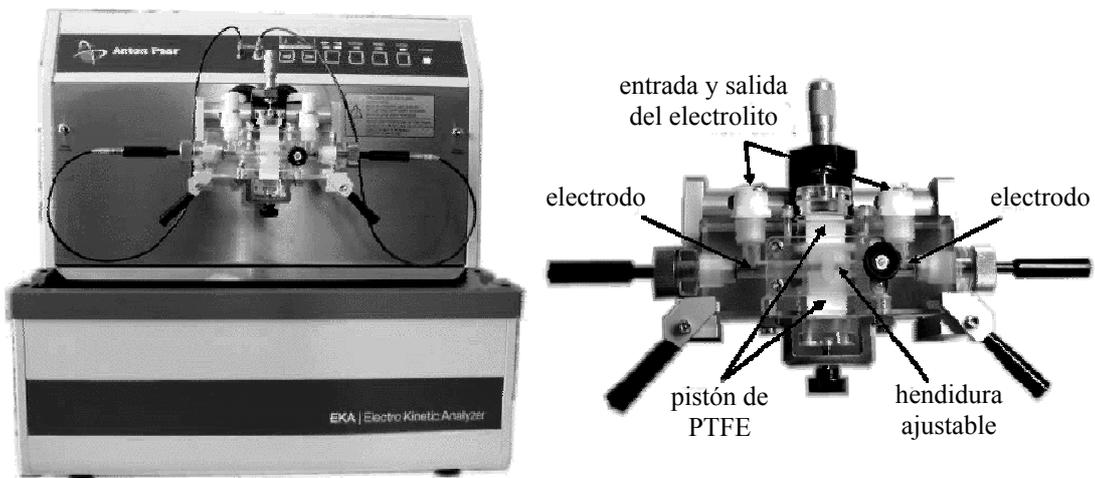
donde R es la resistencia de la celda, L es la longitud de la muestra y Q la sección transversal.

Además, para los materiales conductores que producen un exceso de conductividad tangencial a la superficie cargada comparado con la conductividad del electrolito, es conveniente tomar en cuenta la conductividad de este material y aplicar una corrección a los valores de potencial  $\zeta$  obtenidos. En estos casos, existe una diferencia entre el potencial medido o potencial aparente, y el potencial real o corregido por el factor de conductividad.

### 3.5.6.2 Condiciones de ensayo

Las mediciones se llevaron a cabo con el equipo EKA Electrokinetic Analyzer (Anton Paar GMBH) equipado con una celda rectangular. Esta celda está recién patentada (Patente alemana DE 43 45 152 C2) y está a punto de comercializarse bajo el nombre de “stamp cell”. Esta celda permite medir el potencial zeta de superficies sólidas pequeñas de cualquier forma.

Se colocaron dos pares de discos metálicos frente a frente (pegados con celo de doble cara en la extremidad de cada pistón de PTFE), y paralelos, para construir un canal en el interior de la celda (*figura 3.31*).



**Figura 3.31:** EKA ElectroKinetic Analyzer (izquierda) montado con la “stamp cell” (derecha), específica para pequeñas superficies planas.

Posteriormente, se enjuagaron los discos durante 15 minutos con una solución de cloruro de potasio (KCl) al  $10^{-4}$  M, utilizada como electrolito de base.

La dependencia del potencial zeta con el pH fue investigada en el rango de pH entre 3 y 9, utilizando una solución de ácido clorhídrico (HCl) al 0.1 M como solución de titración. Se ajustó primero el pH del electrolito a 9, mediante NaOH a 0.1M. A posteriori, la titración se hizo automáticamente gracias al software de control VisioLab.

Antes de cada medida, todo el sistema de medición se enjuagó con la solución electrolítica adecuada con el objetivo de establecer un equilibrio electroquímico en la superficie de las muestras. Para cada medición, se realizaron cuatro rampas de presión (dos en cada sentido), con un máximo de 600 mbar. Los potenciales zeta de las superficies se calcularon a partir del promedio de estas mediciones.

Hay que destacar que los resultados presentados representan el potencial  $\zeta$  aparente de las superficies, ya que no se tomó en cuenta la conductividad de los materiales en los cálculos.

### 3.5.7 Resultados

#### 3.5.7.1 Superficies de NiTi no tratadas

La curva de potencial zeta obtenida para las superficies de la Ale1 no tratadas (NT) presenta un descenso continuo de potencial zeta negativo desde pH=9 hasta el punto isoeléctrico situado alrededor de pH=3.5-3.8 (*figura 3.32*).

#### 3.5.7.2 Superficies de NiTi tratadas por OT

El potencial zeta de las superficies tratadas por oxidación térmica (OT) presenta una diferencia significativa comparando con el potencial zeta de las superficies NT. A pesar de que ambos tipos de superficies tienen el punto isoeléctrico alrededor de pH=3.5, el potencial zeta de las superficies OT en el rango alcalino es significativamente más negativo. Además, la curva de las superficies OT presenta una estabilización del potencial a pH mayor a 7 (*figura 3.33*).

#### 3.5.7.3 Superficies de Ti puro

Por debajo de 5, el potencial zeta disminuye de manera ligeramente más rápida para el Ti que para el NiTi OT, resultando en un valor del punto isoeléctrico cercano a pH 3.8-4 (*figura 3.34*). En el rango de pH de 5 a 9.5, la curva de potencial zeta de superficies de Ti puro concuerda con la curva de potencial zeta de las superficies de NiTi OT (*figura 3.35*).

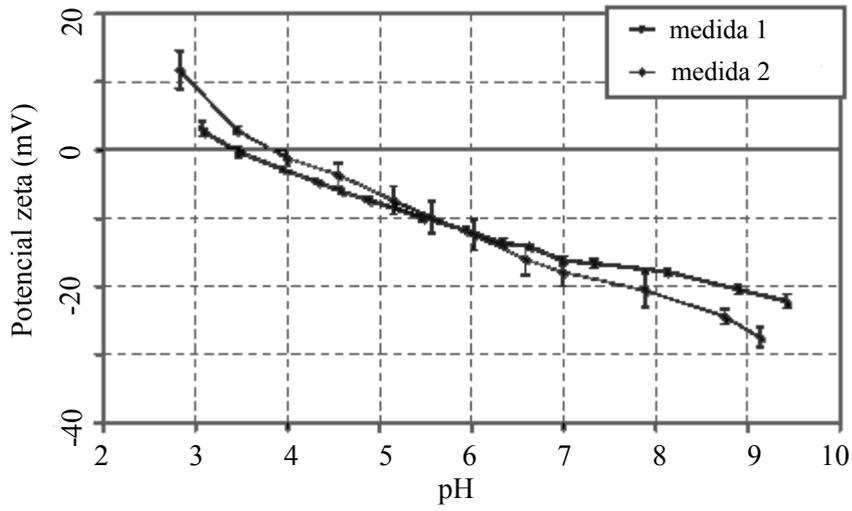


Figura 3.32: Potencial zeta de superficies de NiTi (Ale1) NT en función del pH.

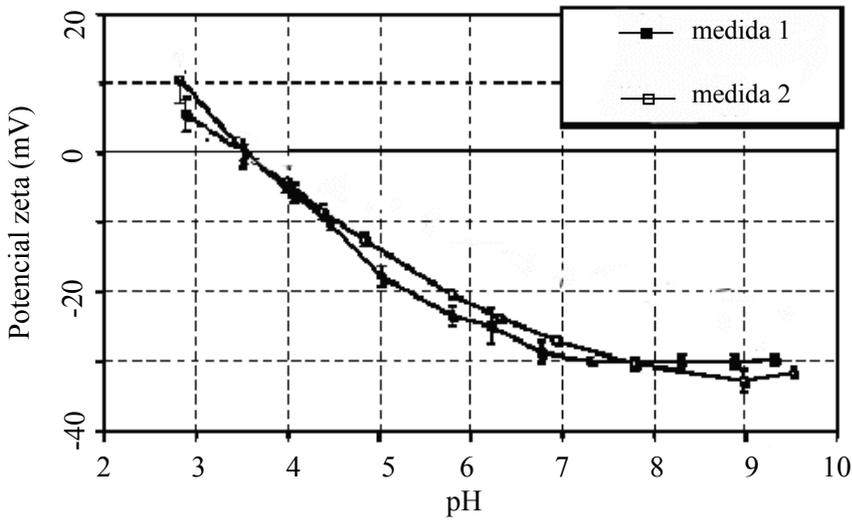


Figura 3.33: Potencial zeta de superficies de NiTi (Ale1) OT en función del pH.

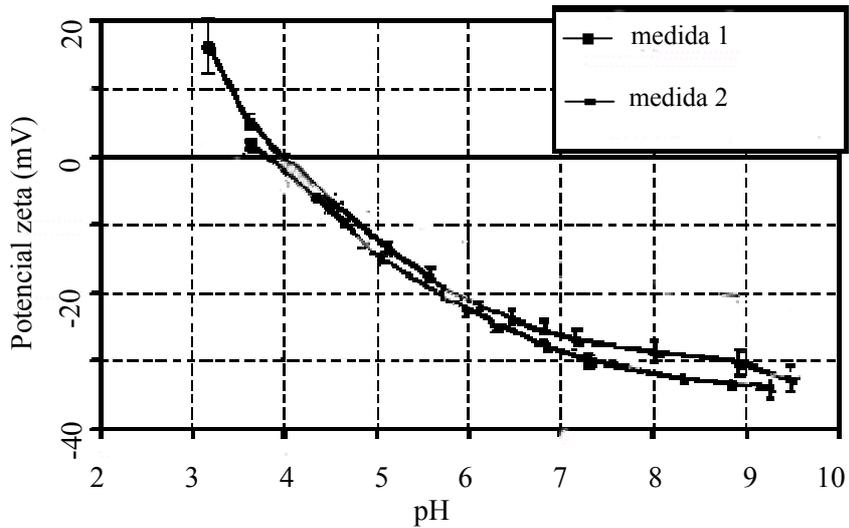
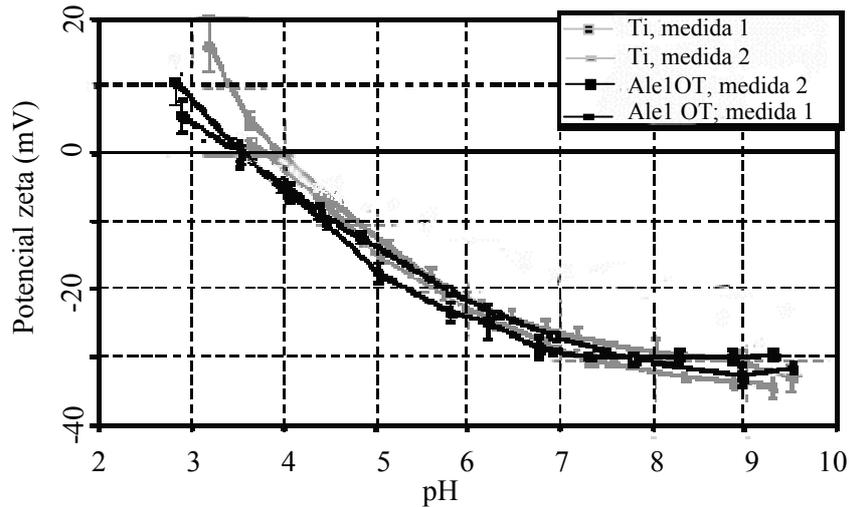


Figura 3.34: Potencial zeta de superficies de Ti puro en función del pH.



**Figura 3.35:** Comparación del potencial zeta en función del pH de las superficies de NiTi OT y de Ti puro. Las curvas coinciden en el rango de pH 5-9.5.

### 3.5.8 Discusión

Las curvas de potencial zeta obtenidas para las superficies de NiTi NT muestran un potencial continuamente más negativo al desplazarse el pH hacia valores más alcalinos, lo cual indica que las cargas negativas superficiales son debidas a la adsorción de los aniones del electrolito. En cambio, la estabilización del potencial observada en las curvas de potencial zeta de las superficies de NiTi OT, así como del Ti puro, indica que las cargas superficiales son, a partir de pH 7, debidas a la disociación de los grupos ácidos superficiales. Esto podría ser debido a que el óxido superficial formado por el tratamiento térmico de oxidación se hidroliza parcialmente cuando está en contacto con una solución acuosa. Lo cual resulta en la formación de grupos hidroxilos ácidos en la superficie del material. Estos grupos hidroxilos ácidos se van disociando en el electrolito, dejando cargas negativas en la superficie. Son estas cargas que contribuyen al valor del potencial zeta obtenido. En consecuencia, a pH fisiológico (generalmente pH 7.4), las cargas electrostáticas presentes en la superficie del material dependerán de la presencia y de la cantidad de los grupos hidroxilos ácidos disponibles para disociarse. Por lo tanto, es de esperar que en función de la composición química del NiTi (o fase), las curvas de potencial zeta varíen ligeramente, ya que la cantidad de grupos OH ácidos superficiales de las aleaciones de NiTi OT varía en función de la aleación (*tabla 3.7*).

El comportamiento del Ti puro es más similar al comportamiento de las superficies de NiTi OT. Esto podría explicarse por la formación de un  $\text{TiO}_2$  estequiométrico casi libre de Ni en las superficies de NiTi OT, tal como se observó en el capítulo 2. Este óxido es probablemente muy similar al óxido nativo que recubre las superficies de Ti puro expuesto al aire. En consecuencia,

se podría esperar un comportamiento biológico de las superficies de NiTi OT similar al Ti puro, y por lo tanto una mejora de la biocompatibilidad de este material comparado con las superficies NT. Además, también podría indicar que las superficies tratadas por OT son buenos candidatos para el desarrollo de superficies bioactivas, tal y como se comentó en la introducción.

El punto isoeléctrico de las superficies de NiTi (3,5-3,8) es ligeramente inferior al valor obtenido para las superficies de Ti puro (3,8-4). A pesar de que algunos autores [Par65]; [Rzs02] obtienen diferencias en los valores del punto isoeléctrico en función de la cristalografía del TiO<sub>2</sub> (rutilo, anatasa o otra), Kosmulski [Kos02] realizó una recolección exhaustiva de todos los resultados publicados entre 1966 y 1999, y concluyó que el potencial zeta es independiente del tipo de óxido. La diferencia observada entre los IEP del NiTi y del Ti es, en consecuencia, probablemente no debida a la naturaleza cristalográfica del TiO<sub>2</sub>. Podría ser debida a la presencia del Ni en la superficie del NiTi. Sin embargo, los valores de la literatura dan valores de IEP para los óxidos de Ni cerca de 11 [Par65], lo cual tendría que desplazar el valor del IEP del NiTi a valores superiores, y no inferiores, comparado con el Ti puro.

Además, a partir de los datos analizados [Kos97], se recomienda usar un valor de punto isoeléctrico para el TiO<sub>2</sub> de 5.9. Sin embargo, la revisión bibliográfica tomada en cuenta excluye aquellos resultados obtenidos en electrolitos no inertes. Es decir, que el valor recomendado de 5.9 se obtiene en los casos para los cuales no hay adsorción de los iones del electrolito en la superficie del material. En el presente trabajo, se vio que el potencial zeta negativo se debía mayoritariamente a la adsorción de aniones del electrolito. Esto podría explicar la obtención del punto isoeléctrico más cercano a 4 que a 6. De todos modos, el rango de valores de los puntos isoeléctricos recopilados por Kosmulski va desde 2 hasta 7.5. Así que el valor obtenido en el presente estudio está en acuerdo con los datos de la literatura. Además, otros autores han medido los potenciales  $\zeta$  de distintos tipos de óxidos TiO<sub>2</sub> en las mismas condiciones que en el trabajo de la presente tesis, e incluso con el mismo equipo EKA, sin corrección de conductividad, y obtuvieron valores de punto isoeléctrico cercano a 4.4 [Rzs02].

Estos resultados, a pesar de que son preliminares y obtenidos a partir de pocas medidas, son pues una indicación de la tendencia de los valores para las superficies de NiTi.

### **3.5.9 Conclusiones**

- A pH 7.4 (pH fisiológico), las superficies del NiTi OT presentan propiedades electrostáticas similares a las superficies de Ti puro, pero con un potencial zeta más negativo que las superficies de NiTi NT.
- A pH fisiológico, la presencia de cargas negativas en las superficies estudiadas es debida a dos mecanismos diferentes. En el caso de las superficies OT y del Ti puro, las cargas negativas aparecen por la disociación de grupos hidroxilos, mientras que en el caso de las superficies de NiTi NT, el mecanismo determinante es la adsorción específica de aniones presentes en el electrolito.
- De acuerdo con estos resultados, se refuerza la conclusión de que el tratamiento OT, desarrollado en el capítulo 2, permite la formación de un óxido en la superficie de las aleaciones de NiTi muy parecido al óxido que recubre naturalmente la superficie del Ti puro.