Modificación de la Superficie del Titanio para Mejorar su Biocompatibilidad mediante la Aplicación de Técnicas de Recubrimiento con Aminas

E. Aragundy (1) V. Salas (2) F. Torres (3)
Instituto de Ciencias Químicas y Ambientales (1)(2)
Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)
Campus Gustavo Galindo, Km 30.5 vía Perimetral
Apartado 09-01-5863. Guayaquil-Ecuador
eriprara@espol.edu.ec (1)verdesal@espol.edu.ec (2)

Director de Tesis (3) Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) (3), Ing. Químico, ftorres@espol.edu.ec (3)

Resumen

El titanio por sus propiedades de biocompatibilidad es utilizado en muchos implantes quirúrgicos. Una vez que este reposa en el organismo se debe evitar la liberación de iones a los tejidos circundantes y al mismo tiempo que se mantenga fijo. Para esto, se decidió injertar una amina a la superficie del metal para poder enlazarlo con las proteínas del cuerpo, utilizando dos técnicas de recubrimiento: Electroinjerto y Autoensamblaje. En la primera técnica se usaron parámetros de voltametría cíclica, variándose solventes y tipos de electrolitos. En autoensamblaje se escogió dos tipos de deposiciones, la silanización y deposición en dopamina. Además se hizo estudios de estabilidad simulando un ambiente fisiológico con una solución de PBS y la interacción de la amina con un biopolímero para simular las proteínas del cuerpo que se atan a la superficie del titanio. Se realizó diferentes técnicas de caracterización, como SEM, AFM, EDS, etc., para conocer la modificación la superficie del titanio. La técnica que logró mejores resultados fue la de autoensamblaje.

Palabras Claves: *Titanio, implantes, aminas, electroinjerto, autoensamblaje.*

Abstract

Titanium for biocompatibility properties are used in many surgical implants. When this rest on the human body, it must prevent the release of ions into the surrounding tissue and to remains fixed. For this it was decided to graft the amine to the metal surface to bind with proteins in the body, using two coating techniques: Electrografting and Self-Assembly. In the first technique used cyclic voltammetry parameters, various solvents and types of electrolytes. In self-assembly was chosen two types of depositions, silanization and deposition of dopamine. Besides stability studies were made simulating a physiological environment with a solution of PBS and the interaction of the amine with a biopolymer to simulate the body's proteins that bind to the surface of titanium. We performed several characterization techniques such as SEM, AFM, EDS, etc., to prove the surface modification of titanium. The technique achieves better results was the self-assembly.

Keywords: *Titanium, implants, amine. electrografting, self-assembly.*

1. Introducción

Los recubrimientos orgánicos tienen una gran importancia en el campo industrial y hoy en día en el campo de la biomedicina. Las sustancias farmacológicamente diseñadas para ser incorporadas o implementadas en un ser vivo son conocidas como biomateriales, los mismos pueden ser cerámicas, macromoléculas naturales como los biopolímeros, polímeros sintéticos, metales y materiales compuestos. Estas sustancias deben ser biocompatibles y para ello se necesita que sean químicamente estables, que no reaccionen con el medio circundante, que no se degraden con el tiempo, no sean tóxicas, que no sean cancerígenas y que presenten gran resistencia mecánica.

Metales como el acero inoxidable, el titanio y sus aleaciones son los más utilizados como materiales para implantes gracias a su resistencia mecánica y a su resistencia a la corrosión.

El gran problema que se presenta en este tipo de implantes son los posibles daños que se generan por la liberación de iones en el organismo y además por su falta de oseointegración. De aquí nace la necesidad de recubrir los implantes metálicos con polímeros que mejoren su biocompatibilidad, de modo que se aprovechan las ventajas de los metales y a la vez la del recubrimiento de polímero.

El titanio es un material que cumple con las características de biocompatibilidad, sin embargo, existe la posibilidad de mejorarlas con la aplicación de algún recubrimiento de tipo orgánico, este recubrimiento puede ser un polímero que tenga un grupo amino en su estructura para que este grupo funcional sirva de enganche para que las moléculas del organismo puedan reconocer de mejor modo el implante y no lo rechacen.

Para depositar estos polímeros orgánicos sobre superficies metálicas se han realizado algunos experimentos utilizando diferentes técnicas, ya que la interacción metal-tejido depende íntimamente del tratamiento que se le dé a la superficie del implante.

La técnica de electroinjerto se ha utilizado hasta ahora para recubrir superficies conductoras y semiconductoras depositando una fina capa de película orgánica sobre los mismos mediante la aplicación de potencial para la etapa de injerto del polímero a dicha superficie, sin embargo, en el campo de implantes de titanio, pocas han sido las investigaciones de la utilización de esta técnica con la finalidad de mejorar la biocompatibilidad del titanio.

La técnica de autoensamblaje se ha utilizado para depositar distintos tipos de aminas sobre superficies, la cual es una técnica de recubrimiento que ensambla moléculas sin la orientación o gestión de una fuente externa. Se la utiliza en muchos sistemas biológicos para el ensamble de varias moléculas y estructuras, en ella las reacciones ocurren espontáneamente. La técnica que presenta mejores resultados es la de silanización, la cual consiste en la deposición de alcoxisilanos sobre superficies oxidadas. La deposición de dopamina sobre un substrato metálico también es una técnica de autoensamblaje que se utiliza para recubrir superficies metálicas.

2. Trabajo Experimental

Para modificar la superficie del titanio se utilizaron dos técnicas, la de electroinjerto y la de autoensamblaje. Se trató de recubrir la superficie con tres monómeros distintos, cuya característica en común fue el grupo amino que poseen en su estructura.

2.1. Electroinjerto

Esta técnica electroquímica sirve para injertar un monómero a una superficie polarizada catódicamente, para ello se necesita suministrar un potencial negativo a una celda electroquímica utilizando un potenciostato convencional para aplicar la técnica de voltametría cíclica.

Dichos electrodos de trabajo necesitaron de un tratamiento para ser utilizados, las placas de titanio puro eran utilizadas como electrodo de trabajo, por ello era necesario la desoxidación de su superficie dejando la placa sumergida por dos minutos en una solución de HF (1% v/v)|HNO_3 (10% v/v), el electrodo de referencia utilizado fue el de calomel, el cual fue escogido por ser un electrodo universal, de potencial constante y conocido, y además se necesito de una malla de platino, la misma que es utilizada como electrodo auxiliar por ser un metal inerte. En este caso particular el potenciostato sirvió para aplicar potencial negativo entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia, de modo que cualquier cambio que se diera en la respuesta de potencial vs corriente se debiera al electrodo de trabajo, para no alterar el potencial constante del electrodo de referencia, el flujo de electrones se los hacía pasar por el electrodo auxiliar para evitar que el electrodo euxiliar se polarice.

Además de los electrodos, la celda electroquímca necesitaba una solución, la cual estaba conformada por el monómero a ser injertado, los electrolitos y el solvente. Era necesario que esta solución se encuentre libre de oxígeno, para ello se la purgaba con gas nitrógeno por 20 minutos.

El monómero utilizado fue el aminoetil metacrilato conocido también como AEMA, el cual fue escogido porque en su estructura contenía el grupo amino necesario y además el doble enlace C=C que es requisito fundamental para que el substrato negativo (debido a su polarización catódica) pueda atacar al carbono menos sustituido y tomar su enlace injertando el monómero en su superficie.

Cuando los electrodos y la solución estaban listos, se conectó los electrodos al potenciostato modelo 263A Princeton Applied Resarch, y mediante el programa M270 se introdujo los diferentes parámetros requeridos para que se pueda aplicar la técnica de voltametría cíclica. Los diferentes parámetros que se variaban en la técnica de voltametría fueron la velocidad de escaneo, los límites de potencial y el número de ciclos. Una vez ejecutado el proceso de aplicación de potencial en el programa, se exportaron los datos y mediante un programa de cálculo se procedió al análisis de los datos.

2.2. Autoensamblaje

Para la aplicación de esta técnica se necesitaba de un tratamiento químico a la superficie del titanio comercial, tanto para la silanización como para la deposición de dopamina.

Se utilizó titanio comercial el cual al estar expuesto al ambiente contenía impurezas, se limpiaba con un desengrasante, en este caso ciclohexano por 10 minutos en un baño ultrasónico, para remover elementos extraños en la superficie debido a la adsorción de hidrocarburos.

El siguiente paso fue desoxidar, ya que el titanio al estar en estado puro se oxida fácilmente en presencia del aire del entorno, se usó ácido para remover la capa de óxido impuro y todos los contaminantes que no se pudieron eliminar en el paso anterior. El ácido clorhídrico 10N no debilitaba la superficie del titanio y disolvía las sales del titanio. Es posible que quedaran restos de iones cloro en la superficie para esto utilizábamos agua doblemente destilada durante 30 minutos en un baño ultrasónico, obteniendo una superficie con enlaces de grupos hidroxilos.

Debido a que necesitábamos que el titanio fuera biocompatible, se recurría a una oxidación intencional a la superficie limpia del titanio, el método utilizado es el menos agresivo, es una mezcla de $NH_4/H_20_2/H_20$ durante veinte minutos en baño maría a 80°C. Finalmente, teníamos una superficie con mayor cantidad de enlaces de grupos hidroxilos.

Se utilizaron dos métodos para injertar una amina para mejorar la adhesión del implante a un sistema fisiológico: la silanización y la deposición de dopamina.

En la silanización, un alcoxisilano se hidroliza liberando alcoholes y produciendo una molécula de aminosilanol, otra molécula de aminosilanol se condensa mediante sus grupos hidroxilo liberando agua y formando una oligomerización de las moléculas de aminosilanol. El tercer grupo alcoxido hidrolizado va a orientar sus enlaces de hidrógeno hacia los grupos hidroxilo del titanio, formando enlaces de hidrógeno. Finalmente, se forma un enlace covalente con la superficie del titanio y se libera agua. Cabe recalcar, que por cada átomo de silicio se obtiene un grupo silanol libre que reacciona con la siguiente capa de silanos, y es así como se mejora la adhesión por las redes de polímeros que se crean.

En el método de la deposición de dopamina, aun la comunidad científica no conoce como es su mecanismo de reacción, se intuye que al tener un anillo bencénico con una amina en un extremo y los enlaces hidroxilo en el otro, se condensan con los enlaces hidroxilo de la superficie del titanio para enlazarse a éste y liberando agua, y es posible que a su vez esta molécula de agua interactué nuevamente con la dopamina que se encuentra injertada al titanio formando una dopamina libre.

Los mecanismos de reacción de la silanización y deposición de dopamina se presentan en la figura 1 y figura 2 respectivamente.

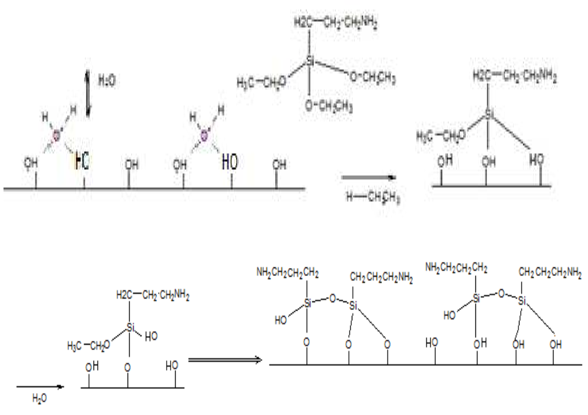


Figura 1. Mecanismo de reacción de la silanización

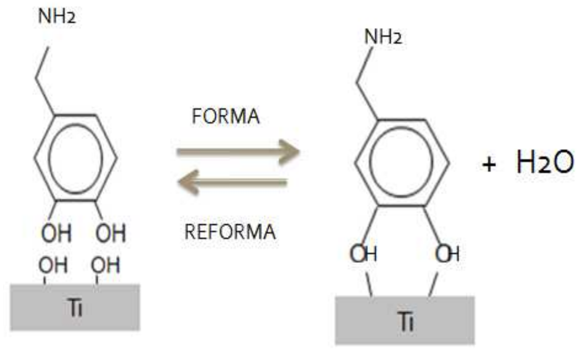


Figura 2. Mecanismo de reacción de la deposición de la dopamina

3. Resultados

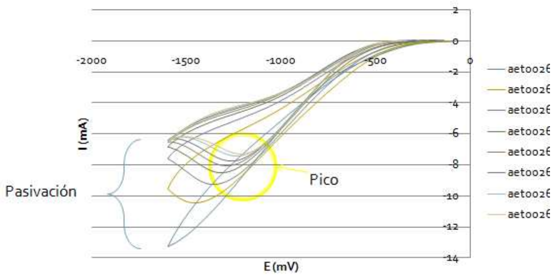
Para obtener los diferentes resultados del presente trabajo se utilizaron técnicas como la voltametría cíclica (VC)[1], para conocer la existencia de actividad química en la superficie del titanio mediante el análisis de sus voltamogramas, microscopía electrónica de barrido (SEM) para obtener imágenes con mucha magnificación de la superficie del titanio, microscopía de fuerza atómica (AFM) para obtener imágenes de la topografía de la superficie y la rugosidad de la misma, espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDAX) para conocer los distintos compuestos presentes en la superficie, la medición del ángulo de contacto estático para conocer la mojabilidad de la superficie, es decir, si la misma era hidrofílica o hidrofóbicas, la técnica de elipsometría (Ell) para conocer los espesores de las capas depositadas sobre la superficie del titanio y la espectroscopía de masas por ionización por electroespray.

3.1. Resultados de electroinjerto

Los resultados presentados en la técnica de electroinjerto no demostraron un buen recubrimiento de la superficie después de haber sido modificada con esta técnica.

Los diferentes voltamogramas que se obtuvieron demostraron presencia de actividad química en la superficie del titanio, sin embargo al observar las imágenes obtenidas con el microscopio electrónico de barrido y el microscopio de fuerza atómica resultó que aquellas superficies que fueron modificadas con las soluciones que contenían el monómero AEMA comparadas con las que no contenían dicho monómero no presentaron mayor diferencia, es decir, no se vio diferencia en sus topografías ni en sus rugosidades.

1 Las siglas que aparecen entre paréntesis corresponden al nombre de las técnicas en inglés.



- **Figura 3.** Voltamograma cíclico registrado en solución acuosa que contiene monómero AEMA, entre Vca y -1.6 V. velocidad de barrido 20 mV/s. AET0026A

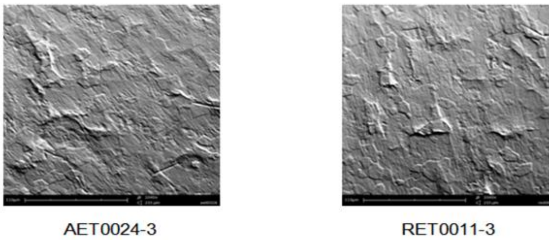


Figura 4. Imágenes de superficie modificada en solución con AEMA (AET0024-3) y en solución sin AEMA (RET0011-3) obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

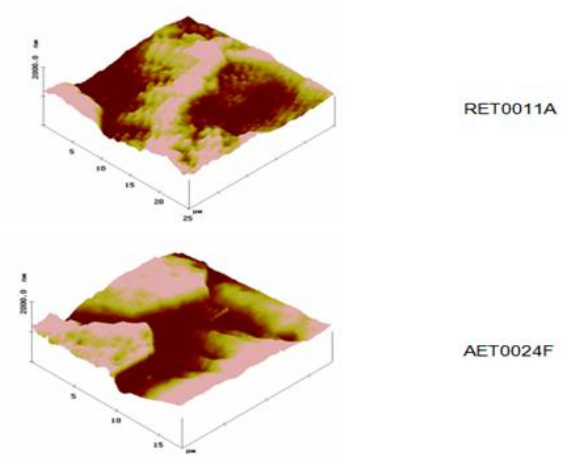


Figura 5. Imágenes de superficie modificada en solución con AEMA (AET0024-F) y en solución sin AEMA (RET0011-A) obtenidas por microscopía de fuerza atómica.

3.2 Resultados de Autoensamblaje

El titanio comercial presentó en su superficie ciertas estrías y una rugosidad de 52 nm debido a la adsorción de hidrocarburos en la superficie. Cuando fue sometido a pre tratamiento, se observó una superficie con una mayor cantidad de estrías pero con ciertas zonas de rugosidad, una vez que esta superficie se oxidó intencionalmente se obtuvo una rugosidad uniforme en toda la región, por los enlaces de grupos hidroxilos. Además el titanio comercial presentó mayor ángulo de contacto pero la superficie se volvió más hidrofílica cuando ocurrió la oxidación.

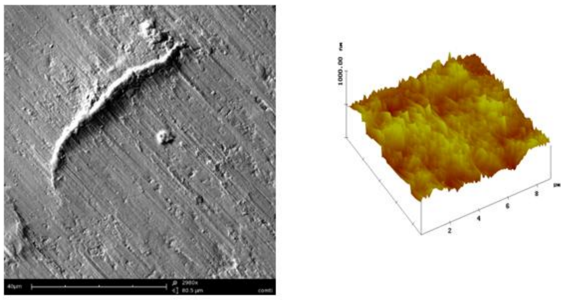


Figura 6. Imágenes de Titanio comercial, antes de ser sometido a tratamiento químico, SEM y AFM

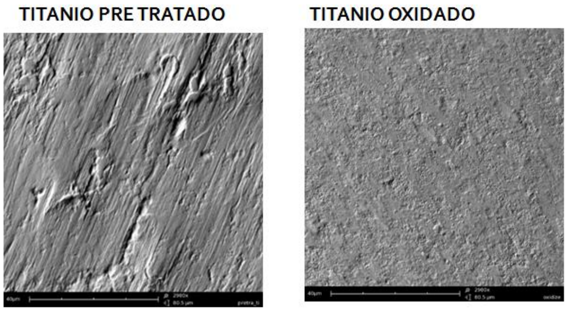


Figura 7. Imágenes de Titanio pretratado y oxidado obtenidas por SEM

En la silanización, se utilizó dos concentraciones de APTES de uno y cinco por ciento, con dos tiempos de reacción, de una y veinticuatro horas. En las imágenes de microscopia de barrido electrónica, se observaron aglomeraciones de las moléculas de APTES en la superficie del titanio. En una concentración baja, se pudo analizar que se encontraron depositadas en una sola área, pero al aumentar el tiempo de reacción no solo aumentaron las aglomeraciones sino que estas se encontraron en toda la superficie y uniformemente. Lo mismo ocurrió en las mediciones del ángulo de contacto, donde a mayor tiempo de reacción el ángulo de contacto aumenta el ángulo de contacto, es decir menos hidrofílicas. La rugosidad aumentó a medida que el tiempo de reacción aumentaba.

Cuando aumentamos la concentración a cinco por ciento, se observó mayor cantidad de aglomeraciones distribuidas en toda la superficie, pero se mantuvo la tendencia de los tiempos de reacción, que a menor tiempo estas aglomeraciones se encontraron localizadas en una sola región mientras que a mayor tiempo de reacción se encontraron uniformemente distribuidas en toda la superficie.

Al aumentar la concentración la superficie se volvió más hidrofílica, pero se mantuvo la tendencia de que a mayor tiempo de reacción mayor fue el ángulo de contacto. En un análisis de la composición, se obtuvo que a mayor concentración mayor cantidad de silicio se encontraba en la superficie y a la vez aumentó el porcentaje de carbono y oxigeno debido a la presencia de APTES, pero el porcentaje de titanio disminuyó, ya que existía una capa de siloxano recubriendo la superficie.

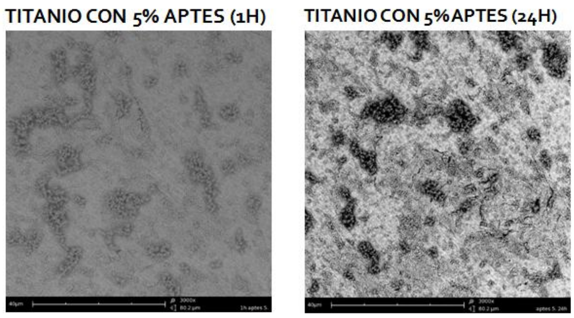


Figura 8. Imágenes de Titanio con 5% APTES 1 hora y 24 horas, obtenidas por SEM

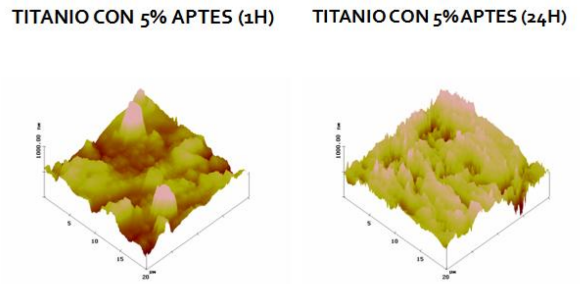


Figura 9. Imágenes de Titanio con 5% APTES 1 hora y 24 horas, obtenidas por AFM

En la deposición de dopamina, se mantuvo la concentración pero se varió los tiempos de reacción de tres y veinticuatro horas, no se visualizó la misma representación de aglomerados como en la silanización debido que la dopamina depositó una capa bien fina y homogénea en la superficie, es por esto que se hicieron análisis de rugosidad, y a mayor tiempo de reacción la superficie tuvo mayor rugosidad. Esto indica que existió un mejor recubrimiento de la amina en la superficie. En las mediciones del ángulo de contacto a mayor tiempo de reacción la superficie aumenta la mojabilidad de la superficie. En los análisis de composición, se obtuvo que a mayor tiempo de reacción mejor fue el recubrimiento ya que disminuyó el porcentaje de titanio y aumentó el porcentaje de carbono.

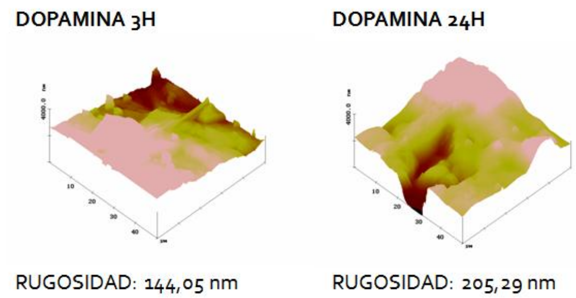


Figura 10. Imágenes de Titanio con dopamina 3 horas y 24 horas, obtenidas por AFM

Se hicieron ensayos de estabilidad con un biopolímero en este caso, gelatina que es una proteína que simuló ser parte del cuerpo humano y además incubaciones en PBS para simular una solución fisiológica. Esto se hizo para analizar cómo reaccionaban ambos métodos para mejorar la biocompatibilidad.

En el caso de la silanización se observó que las múltiples capas de APTES se entrecruzaban con la gelatina, y la rugosidad de la superficie aumenta. La mejor representación fue en 5% APTES con 24 horas de reacción. En la deposición de dopamina, su recubrimiento en gelatina fue muy fina, y a mayor tiempo de reacción tenía interactuaba mejor.

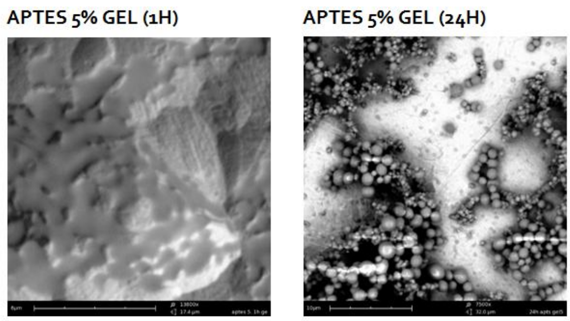


Figura 11. Imágenes de Titanio con 5% APTES 1 hora y 24 horas en incubación de 1 y 24 horas en gelatina, obtenidas por SEM

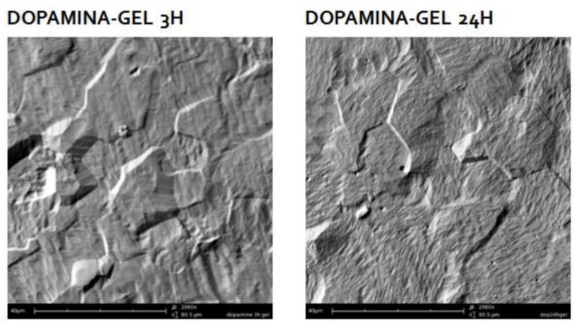


Figura 12. Imágenes de Titanio con dopamina en gelatina en incubación de 3 y 24 horas en gelatina, obtenidas por SEM

En incubaciones en PBS las superficies del titanio tendieron a ser más hidrofílicas, aunque en la oligomerización de los aminosilanoles tuvieron mayor ángulo de contacto debido a que los siloxanos crearon una capa de impenetrabilidad. Mientras que en la dopamina se observaron mejores resultados de estabilidad.

4. Conclusiones

En la silanización, a mayor tiempo de reacción, mayor es el ángulo de contacto y se presenta un aumento de la rugosidad de la superficie, debido a la presencia de siloxanos, por los aglomerados. Esto también ocurre al aumentar la concentración.

En la deposición de dopamina, a mayor tiempo de reacción mejor es el recubrimiento de la superficie.

Los parámetros utilizados en este trabajo con la técnica de electrografting no presentaron buenos resultados para recubrir la superficie del titanio.

De las tres técnicas utilizadas, la deposición de dopamina ofrece mejores resultados en cuanto al recubrimiento del substrato de titanio.

5. Agradecimientos

Los experimentos del presente trabajo fueron realizados en la Universidad de Gante en la ciudad de gante en Bélgica en el Laboratorio de Físico-Química del Departamento de Química Inorgánica bajo el cargo de la Dra. Katrien Strubbe y en el Laboratorio de Química Orgánica bajo la supervisión de la Dra. Els Vanderleyden.

6. Referencias

[1] Ratner B., Bryant S Biomaterials, Where We Have Been.., Annual Reviews of Biomedical, 2004, pp. 41-75.

[2] Nascimento C, Biomaterials Applied to the Bone Healing Process.., Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, 2007., pp. 839-846.

[3] Palacin S., Bureau C., Charlier J., Deniau G Molecule-to-Metal Bonds: Electrografting Polymers on Conducting Surfaces.. 2004, ChemPhysChem, pp. 1468-1481.

[4] Lecayon G., Bouziem Y., Le Gressus C.Grafting and Grwing Mechanism of Polymerised Organic Films onto Metallic Surfaces., Chemical Physics Letters, 1982, pp. 506-509.

[5] Gabriel S., Jerome R., Jerome C.Cathodic electrografting of acrylics: From fundamentals to functional coatings, Progress in Polymer Science, 2010pp. 113-140.

[6] Baute N., Teyssie P., Mertens M. Electrografting of Acrylic and Methacrylic Monomers onto metals: Influence of the realtive polarity and donor-acceptor properties of the monomer and the solvents., Eur. J. Inor. Chem, 1998, pp. 1711-1720.

[7] De Gligio E., Cometa S., Sabbatini L. Electrosynthesis and analytical characterization of PMMA coatings on titanium substrates as barriers against ion release. Anal Bioanal Chem, 2004,, pp. 626-633.

[8] Lou X., Jerome C.Electrografting of performed aliphatic polyesters onto metallic surfaces., Langmuir, 2002, pp. 2785-8.

[9] Youngblood, John A. Howarter And Jeffrey P Optimization of Silica Silanization by 3-Aminopropyltriethoxysilane.., School of Materials Engineering, 2006, pp. 11142-11143.

[10] Van Vlierberghe Sandra, Cell-Inactive Biopolymer-Based Hydrogels Designed For Tissue Engineering., Ghent University, 2009, Pp. 12-16.

[11] Vanderleyden, Els Comparative Study of Silanisation Reactions.., Surface Science, 2006, pp. 262-263.

[12] Goldsteins, J. Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis. New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.