



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORA EN QUÍMICA

NANO-CERIA EN LA REGENERACIÓN
DE TEJIDO ÓSEO

Anabela Noel Gravina

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2016

Universidad Nacional del Sur

TESIS DOCTORAL

Anabela Noel Gravina

2016

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora en Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Química de la Universidad Nacional del Sur durante el período comprendido entre el 10 de Julio de 2012 y el 18 de Mayo de 2016, bajo la dirección de la Profesora Doctora Paula Verónica Messina, del área de Fisicoquímica.

18 de Mayo de 2016

Anabela Noel Gravina



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/...../....., mereciendo la calificación de(.....)

AGRADECIMIENTOS

Deseo manifestar, en primer lugar, el sincero agradecimiento a mi directora Paula Messina por estos años de formación, por sus comentarios certeros, por su presencia en cada paso del desarrollo de este trabajo, por su ejemplo y por haberme transmitido su vocación por la investigación.

También quiero expresar mi reconocimiento a la Universidad Nacional del Sur, a su Departamento de Química y al Instituto de Química del Sur por haberme permitido llevar a cabo este doctorado y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por el apoyo económico brindado para la concreción de este trabajo.

Destaco y agradezco enormemente a Noelia y Javier por tantas charlas, risas y momentos de reflexión que enriquecieron todos los aspectos de mi trabajo y alegraron el día a día. Agradezco también la amabilidad y la paciencia del doctor Marcos Fernández Leyes por atender mis inquietudes en reiteradas ocasiones.

Un particular agradecimiento a mis amigas Vanesa, Carla y Brenda por ser mi pilar durante tantos años, por su apoyo constante y por mantener esta amistad eternamente joven. A Luciano, por haberme alentado a elegir esta profesión que tantas satisfacciones me ha dado y por tener la palabra justa, en los momentos más necesarios.

Dedico estas últimas líneas para agradecer a mi familia por su incondicional apoyo personal durante todos los días de estos años. A mis padres, por haber respetado todas mis decisiones incluso aquellas que pasaban por encima de sus miedos; a mi hermano Yago, Yanina y mis dos sobrinos, por ser mi mayor fuente de alegría; y a mis abuelos, Juan, Ricardo, Perla y Susy (especialmente a ellas) por consentirme infinitamente.

RESUMEN

En la ciencia de los biomateriales empleados en la regeneración de tejido óseo es esencial desarrollar dispositivos implantables que sean tanto biocompatibles como bioactivos. Además, es sabido que la presencia de especies reactivas de oxígeno que conducen al estrés oxidativo celular y, consecuentemente al retardo en el tiempo de curación de la herida en el sitio de implantación, puede controlarse usando nanopartículas de dióxido de cerio (CeO_2) o *nanocería* –capaces de alterar su estado de oxidación (de III a IV). En base a estos dos hechos, la presente propuesta se enfoca al diseño de materiales aplicables a la construcción de implantes de tejido óseo basados en dióxido de titanio (TiO_2) modificados con nanocería. El dióxido de titanio es un material generalmente reconocido como biocompatible cuando está presente en la superficie de implantes metálicos de titanio, por lo cual representa un elemento de partida conveniente para el desarrollo de estos nuevos materiales. La presencia de nanocería permitiría controlar la producción de especies reactivas de oxígeno favoreciendo el crecimiento de nuevo hueso y la biointegración del implante.

Para la síntesis de los materiales se emplearon sistemas de microemulsiones agua/butanol/CTAB/heptano como agentes directores de estructura, utilizando isopropóxido de titanio y tripentanoato de cerio como precursores inorgánicos de Ti y Ce, respectivamente. La incorporación del Ce se realizó de dos maneras: disolviendo la sal en el cosurfactante o como nanopartículas de CeO_2 suspendidas en la fase oleosa de la microemulsión. Luego de estudiar y optimizar las condiciones de síntesis, se obtuvieron tres materiales: A (TiO_2), B (Ce-TiO_2) y C ($\text{CeO}_2\text{-TiO}_2$). Asimismo, y como parte del proceso de optimización de las condiciones de síntesis, se evaluó una serie de materiales con contenido creciente de cerio, que se ha dado en llamar $B_1\text{-}B_8$, por sus condiciones de síntesis análogas a la del material B. Por sus particularidades morfológicas y de almacenamiento de oxígeno, también se dedica una parte de este trabajo de investigación al estudio de sus propiedades.

Se estudiaron las propiedades texturales y químicas, lo cual incluye la determinación del tamaño de partículas, el grado de hidrofobicidad, la estructura cristalina, la topografía y tamaños de poro. La capacidad de un material para integrarse con el tejido óseo fue evaluada examinando la interacción con una proteína plasmática modelo, albúmina, y la habilidad del mismo para inducir la formación de hidroxiapatita (HAp) sobre su superficie cuando es sumergido en suero fisiológico simulado, que es una solución cuya concentración de iones es comparable a la del plasma sanguíneo. Como resultado de este ensayo pudo observarse que los materiales A, B y C son capaces de inducir la formación sobre su superficie de una capa de cristales de fosfatos de calcio cuya relación Ca/P es comparable con la de HAp estequiométrica.

Debido a que gran parte del daño tisular provocado durante el proceso de implantación es atribuido a la presencia de radicales NO^\bullet y $\text{O}_2^{\bullet-}$ que son liberados, en condiciones fisiológicas, por macrófagos activados y neutrófilos, resultó interesante evaluar la capacidad de los materiales aquí presentados para eliminar estas especies reactivas de oxígeno. *In vivo*, la reacción de estos radicales conduce a la formación de peroxinitrito (ONOO^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), dos moléculas con alto poder oxidante y, por lo tanto, citotóxicas. Se realizaron ensayos de degradación de estas especies reactivas, observándose que los materiales A, B y C son capaces de acelerar la descomposición de ONOO^- ; y que B es capaz de descomponer H_2O_2 en presencia de aniones fosfato mediante dos mecanismos diferentes que son dependientes de la concentración.

La biocompatibilidad de los materiales, esto es, su capacidad para interactuar con tejidos vivos sin causar toxicidad o reacciones fisiológicas negativas, es una característica que también fue estudiada en el transcurso de esta tesis. Para ello se realizaron estudios de viabilidad y morfología celular utilizando cultivo primario de osteoblastos de calvaria de rata y una línea celular de fibroblastos de ratón (L929). En ambos casos no se observaron diferencias significativas en la viabilidad luego de 24, 48 y 72 horas de incubación en presencia de los materiales ni tampoco cambios morfológicos en los osteoblastos. El estudio con fibroblastos arrojó algunas diferencias entre los materiales respecto de la supervivencia y la capacidad de adhesión luego de 24 horas de incubación, poniéndose de manifiesto la existencia de una potencial incompatibilidad biológica del material C.

Finalmente se evaluó el efecto citoprotector frente al estrés oxidativo inducido por H_2O_2 , con particular hincapié en el material B, debido a sus propiedades bioactivas, biocompatibles y óxido reductoras. El estudio se realizó utilizando fibroblastos de ratón (L929) como modelo celular, observándose un claro aumento en la supervivencia de aquellas células tratadas con B respecto de las células sin tratar y de las tratadas con el material sin cerio (TiO_2). Se observó también que el efecto citoprotector es concentración dependiente.

De este trabajo se destaca el desarrollo de un material basado en dióxido de titanio y dopado con cerio (material B, Ce-TiO_2), obtenido a través de un método sencillo. Este material combina características morfológicas, topográficas y químicas apropiadas que lo convierten en un candidato potencial para su uso en implantes por su capacidad para promover su osteointegración y al mismo tiempo, de proteger al tejido circundante frente al estrés oxidativo producto del proceso de inserción quirúrgico.

ABSTRACT

In the science of biomaterials used in bone tissue regeneration it is essential to develop implantable devices that are both biocompatible and bioactive. It is also known that the presence of reactive oxygen species (ROS) leading to cellular oxidative stress at the site of implantation and the consequent wound healing delay, can be controlled using cerium dioxide (CeO_2) nanoparticles, *nanoceria* –that are able to alter their oxidation state (from III to IV). Based on these two facts, this proposal focuses on the design of materials applicable towards the construction of bone tissue implants based on titanium dioxide (TiO_2) modified with nanoceria. Titanium dioxide is generally regarded as biocompatible when it is present on the surface of metallic titanium implants. Therefore, it represents a suitable starting element for the development of these new materials. The presence of nanoceria would allow controlling the production of reactive oxygen species favoring newly bone formation and the bio-integration of the implant.

For the synthesis of the materials, microemulsion based on water/CTAB/butanol/heptane system were used as structuring agents, using titanium isopropoxide and cerium tripentanoate as inorganic precursors of Ti and Ce, respectively. The incorporation of cerium was performed in two ways: either by dissolving the salt in the co-surfactant or by suspended CeO_2 nanoparticles in the oleic phase of the microemulsion. After studying and optimizing the synthesis conditions, three materials were obtained: A (TiO_2), B (Ce-TiO_2) and C ($\text{CeO}_2\text{-TiO}_2$). Also, as part of the process of optimization of the synthesis conditions, a series of materials was evaluated with increasing content of cerium, which has been called B₁-B₈, because their synthesis conditions were similar to those applied to obtain material B. Due to their morphological and oxygen storage features, a part of this research is also dedicated to the study of their properties.

Regarding the materials A, B and C, textural and chemical properties were studied, including the determination of particle size, hydrophobicity, crystal structure, topography and pore sizes. The ability of a material to integrate with bone tissue was evaluated by examining the interaction with a model of plasmatic protein, albumin, and also the ability to induce the formation of hydroxyapatite (HAp) on its surface when it is immersed in simulated body fluid that is a solution which its ion concentration is comparable to that of blood plasma. As a result of this trial it could be observed that materials A, B and C are able to induce the formation of a layer of calcium phosphate crystals and their Ca/P ratio is comparable to that of stoichiometric HAp.

Due to a great extent of the tissue damage caused during the implantation process is attributed to the presence of radicals NO^\bullet and $\text{O}_2^{\bullet-}$, which are released by activated macrophages

and neutrophils under physiological conditions, it was interesting that test the ability of materials presented here to eliminate these reactive oxygen species. *In vivo*, the reaction of these radicals leads to the formation of peroxynitrite (ONOO^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2), two highly oxidant molecules; therefore, cytotoxic. Degradation assays for these ROS were carried out, observing that materials A, B and C are able to accelerate the decomposition of ONOO^- ; B, on the other hand, is also able to decompose H_2O_2 in presence of phosphate anions by two different mechanisms that are concentration-dependent.

The biocompatibility of these materials, this is, their ability to interact with living tissues without causing toxicity or adverse physiological reactions, is a feature that was also studied during this research. These experiments involved the evaluation of viability and cell morphology of two cellular models: primary culture of pre-osteoblasts from rat calvaria and a cell line of mouse fibroblasts (L929). In both cases no significant differences in viability or morphological changes were observed in pre-osteoblasts after 24, 48 and 72 hours of incubation in presence of the materials. The study with fibroblasts showed some differences between materials in terms of rate of survival and their adhesion ability after 24 hours of incubation, demonstrating the existence of a potential biological incompatibility of material C.

Finally the cytoprotective effect against oxidative stress induced by H_2O_2 was evaluated, with particular emphasis on material B, due to its bioactive, biocompatible and redox properties. The study was performed using mouse fibroblast (L929) as cell model, showing a visible increase in the survival rate of those cells treated with material B when compared to untreated cells and/or cells treated with the material without cerium (TiO_2). It was noted that the cytoprotective effect is also concentration-dependent.

From this work it stands out the development of a novel material based on titanium dioxide and doped with cerium (material B, Ce-TiO_2), obtained through a simple method. This material combines suitable morphological, topographic and chemical characteristics that make it a potential candidate for bone implant due to its ability to promote osseointegration while protecting the surrounding tissue against oxidative stress resulting from the process of surgical insertion.

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	<i>bobine serum albumin</i> , albúmina de suero bovina
CaP	fosfato de calcio
Ce(Val) ₃	tripentanoato de cerio
CeO ₂	óxido de cerio, ceria
C ₁₆ TAB	bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> , medio de cultivo eagle modificado de Dulbecco
ECM	<i>extracellular matrix</i> , matriz extracelular
et al.	<i>et alia</i> , y otros
FWHM	<i>full width at half-maximum</i> , ancho a media altura
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
HAp	hidroxiapatita
NIR	<i>near-infrared region</i> , región del infrarrojo cercano
NPs	nanopartículas
ONOO ⁻	peroxinitrito
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , solución salina regulada por fosfatos
PCS	<i>photon correlation spectroscopy</i> , espectroscopía de correlación de fotones
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , especies reactivas de oxígeno
SBF	<i>simulated body fluid</i> , suero fisiológico simulado
SEM	<i>scanning electron microscopy</i> , microscopía electrónica de barrido
TEM	<i>transmission electron microscopy</i> , microscopía electrónica de transmisión
TiO ₂	óxido de titanio, titania
TTIP	isopropóxido de titanio
XRD	<i>powder X-ray diffraction</i> , difracción de rayos X de polvos

ÍNDICE

Prefacio	IV
Agradecimientos	V
Resumen	VI
Abstract	VIII
Lista de abreviaturas	X
Capítulo 1: Introducción	1
1.1. Consideraciones iniciales	2
1.2. Tejido óseo: generalidades	2
1.2.1. Estructura y función	2
1.2.2. Organización jerárquica y composición	3
1.2.3. Formación, remodelación ósea y componentes celulares	6
1.3. Tejido óseo e implantes	9
1.3.1. Regeneración ósea alrededor de los implantes	9
1.3.2. Rol del estrés oxidativo en la fisiopatología ósea	11
1.4. Biomateriales	13
1.4.1. Osteoinducción, osteoconducción, y osteogénesis	13
1.4.2. Implantes óseos basados en titanio	14
1.4.2.1. TiO ₂ en implantes óseos	15
1.4.3. Importancia biológica del óxido de cerio y su participación en la reducción del estrés oxidativo	16
1.5. Síntesis de materiales nanoestructurados utilizando microemulsiones	19
1.5.1. Anfifilos: generalidades	20
1.5.2. Anfifilos: autoagregación	20
1.5.3. Agregados micelares	21
1.5.4. Microemulsiones	22

1.5.4.1. Generalidades	22
1.5.4.2. Micelas inversas hinchadas como nanoreactores	23
1.5.5. Estrategias de síntesis	25
1.5.6. Proceso de intercambio entre micelas	27
1.6. Consideraciones finales	28
1.7. Bibliografía	29
Capítulo 2: Objetivos	41
Capítulo 3: Síntesis de los materiales basados en TiO₂.....	43
3.1. Introducción	44
3.2. Materiales y métodos	45
3.2.1. Reactivos	45
3.2.2. Instrumental	46
3.2.3. Determinación del tamaño de las gotitas de la microemulsión C	46
3.2.4. Análisis semicuantitativo de fases cristalinas	47
3.3. Síntesis	48
3.3.1. Síntesis de nanopartículas de CeO ₂	51
3.3.2. Síntesis de los materiales A, B y C	51
3.3.3. Síntesis de los materiales B ₁ - B ₈	53
3.4. Tratamientos térmicos para la síntesis de los materiales	54
3.4.1. Efecto del tratamiento hidrotérmico	54
3.4.2. Efecto de la temperatura de calcinación	55
3.5. Conclusiones	59
3.6. Bibliografía	60
Capítulo 4: Caracterización fisicoquímica de los materiales basados en TiO₂.....	62
4.1. Introducción	63

4.2. Materiales y métodos	65
4.2.1. Instrumental	65
4.2.2. Evaluación de los parámetros de rugosidad	66
4.2.3. Análisis cristalino	69
4.3. Resultados y discusión	70
4.3.1. Materiales A, B y C	70
4.3.1.1. Morfología	70
4.3.1.2. Estructura cristalina y composición elemental	74
4.3.1.3. Rugosidad	77
4.3.1.4. Tamaño de partículas y superficie específica	79
4.3.1.5. Hidrofilicidad	81
4.3.2. Materiales B ₁ -B ₈	82
4.3.2.1. Composición elemental	82
4.3.2.2. Morfología	84
4.3.2.3. Estructura cristalina de estructuras tipo fullereno inorgánico	88
4.3.2.4. Propiedades ópticas	98
4.4. Conclusiones	99
4.5. Bibliografía	100
Capítulo 5: Bioactividad y adsorción de proteínas	106
5.1. Introducción	107
5.2. Materiales y métodos	111
5.2.1. Reactivos	111
5.2.2. Instrumental	112
5.2.3. Ensayo de adsorción de albúmina	112
5.2.4. Ensayo de bioactividad	113
5.2.5. Ensayo de bioactividad en presencia de albúmina	114
5.2.6. Análisis estadístico	115

5.3. Resultados y discusión	115
5.3.1. Bioactividad	115
5.3.2. Adsorción de albúmina	121
5.3.3. Bioactividad en presencia de albúmina	123
5.4. Conclusiones	129
5.5. Bibliografía	130
Capítulo 6: Degradación de peroxinitrito	134
6.1. Introducción	135
6.2. Materiales y métodos	137
6.2.1. Reactivos	137
6.2.2. Instrumental	137
6.2.3. Síntesis de peroxinitrito	137
6.2.4. Estudios de degradación	139
6.2.5. Cinética de la degradación de peroxinitrito	140
6.3. Resultados y discusión	141
6.4. Conclusiones	147
6.5. Bibliografía	147
Capítulo 7: Biocompatibilidad	150
7.1. Introducción	151
7.2. Materiales y métodos	153
7.2.1. Reactivos	153
7.2.2. Instrumental	153
7.2.3. Cultivo celular de fibroblastos	154
7.2.4. Aislamiento de pre-osteoblastos y cultivo celular	154
7.2.5. Preparación de los materiales para el ensayo de citotoxicidad	155
7.2.6. Ensayos de citotoxicidad	155

7.2.6.1. Citotoxicidad frente a fibroblastos de ratón L929	155
7.2.6.2. Citotoxicidad frente a pre-osteoblastos de calvaria de rata	156
7.2.7. Ensayos de viabilidad celular	157
7.2.7.1. Ensayo de PrestoBlue	157
7.2.7.2. Ensayo de Azul de Tripano	158
7.2.8. Determinación de la morfología celular de L929 e interacción con los materiales .	159
7.2.9. Determinación de la morfología celular de pre-osteoblastos e interacción con los materiales	159
7.2.10. Análisis estadístico	159
7.3. Resultados y Discusión	160
7.3.1. Viabilidad de fibroblastos: Efecto de la concentración del material	160
7.3.2. Morfología de fibroblastos	163
7.3.3. Viabilidad y morfología de fibroblastos: Efecto de la concentración de cerio	167
7.3.4. Viabilidad y morfología de pre-osteoblastos: Efecto del material y material + HAp.	169
7.4. Conclusiones	172
7.5. Bibliografía	173
Capítulo 8: Citoprotección frente a peróxido de hidrógeno	176
8.1. Introducción	177
8.2. Materiales y métodos	181
8.2.1. Reactivos	181
8.2.2. Instrumental	181
8.2.3. Cultivo celular	182
8.2.4. Preparación de los materiales para el ensayo de citoprotección	182
8.2.5. Determinación de la potencia citotóxica del peróxido de hidrógeno	182
8.2.6. Determinación del efecto citoprotector de los materiales frente a peróxido de hidrógeno	184
8.2.7. Determinación de la eliminación de H ₂ O ₂ mediada por el material B (Ce-TiO ₂)	185

8.2.8.Cálculo de la viabilidad teórica	186
8.3. Resultados y discusión	187
8.3.1.Viabilidad de fibroblastos en respuesta al estrés oxidativo: determinación de las concentraciones letales efectivas de peróxido de hidrógeno	187
8.3.2.Viabilidad de fibroblastos en respuesta al estrés oxidativo: Determinación del efecto citoprotector de los materiales A y B frente a peróxido de hidrógeno	188
8.3.3.Determinación de la actividad depuradora de H ₂ O ₂ mediada por el material B	191
8.3.4.Determinación de la viabilidad teórica de los fibroblastos de ratón	196
8.4. Conclusiones	198
8.5. Bibliografía	198
Capítulo 9: Conclusiones generales y perspectivas	202
Capítulo 10: Producción científica	206
10.1. Publicaciones en revistas internacionales con referato	207
10.2. Presentaciones en reuniones científicas	207

Capítulo 1

Introducción

1.1. Consideraciones iniciales

El presente capítulo se plantea como un marco teórico que explicará someramente ciertos conceptos claves que son necesarios para entender los objetivos y experimentos realizados en este trabajo de investigación. Ha de mencionarse que todos los fenómenos fisiológicos descritos en esta sección están orientados al entendimiento de la interacción entre el tejido óseo y los biomateriales implantables.

1.2. Tejido óseo: generalidades

1.2.1. Estructura y función

El sistema óseo, a menudo considerado una estructura de soporte estática, es un órgano dinámico que cumple muchas funciones, incluyendo [1]–[5]:

- soporte estructural para el corazón, pulmones y médula espinal;
- protección mecánica para el cerebro, el útero y otros órganos internos;
- sitio de anclaje para los músculos, permitiendo así el movimiento de las extremidades;
- reservorio mineral de calcio y fósforo;
- defensa contra la acidosis;

- trampa para algunos minerales peligrosos, tales como el plomo.

La estructura de los huesos está sujeta a remodelaciones constantes en respuesta al entorno cambiante en el que se encuentran[3]. De hecho, la tasa de reemplazo es tan alta, que en 4 años, el esqueleto de una persona joven será completamente nuevo si se lo compara con su esqueleto al día de hoy[1]. Los huesos pueden reaccionar y responder ante estímulos ambientales: pueden crecer o encogerse, pueden fortalecerse si es necesario y, cuando se rompen, son capaces de regenerarse sin dejar cicatriz[1], una propiedad que muy pocos órganos comparten.

El cuerpo humano posee 206 huesos aunque algunos autores afirman que hay 213[5]; esta discrepancia se debe a que la cantidad de determinados huesos (costillas y vértebras por ejemplo) puede variar entre individuos. Debido a la versatilidad en sus funciones, los huesos poseen tamaños muy disímiles, desde pequeños osículos auditivos que son responsables de la transmisión mecánica de ondas sonoras hacia los órganos sensitivos, hasta huesos grandes de hasta 60 centímetros, como el fémur, que es lo suficientemente fuerte como para soportar 30 veces el peso corporal de una persona[6]. La razón detrás de que el mismo órgano sea capaz de ejecutar funciones tan diversas se halla en la existencia de una organización jerárquica bien definida. Es por ello que se dedicará la sección siguiente a desarrollar este aspecto del tejido.

1.2.2. Organización jerárquica y composición

La mayoría de los huesos posee una corteza densa y muy organizada, el “hueso cortical”, y un interior poroso formado por delgadas trabéculas de cuya estructura deriva su nombre, “hueso esponjoso o trabecular”[4], [5], y que es responsable de proveer soporte adicional al extremo de los huesos que soportan peso, figura 1.1. El espacio inter-trabecular, además, está ocupado por la médula ósea, un tejido altamente versátil que contiene células madre pluripotenciales que dan origen a todas las células sanguíneas. La relación de hueso cortical/hueso esponjoso varía pero en adultos generalmente se halla en proporción 80:20[5].

En términos de arquitectura, el hueso posee una estructura jerárquica organizada en 7 niveles[7], figura 1.2. La unidad microscópica primaria del hueso se conoce como “osteona” (200-250 μm de diámetro) y es una red cilíndrica de hueso concéntrico formada alrededor de un paquete de nervios y vasos sanguíneos que viajan longitudinalmente por un túnel óseo denominado “canal de Havers”[1], [5]. Estos canales están interconectados oblicuamente por “canales de Volkmann”, creando así una red o plexo neurovascular[1]. Cada osteona está separada de su vecina por una línea de cemento que la aísla y que además podría servir para evitar la propagación de grietas en el hueso[1]. Estas osteonas están orientadas específicamente a lo largo del eje longitudinal de las zonas que soportan la mayor carga en el hueso cortical para actuar como soporte estructural. En el hueso

trabecular, por su parte, estas osteonas se organizan de manera diferente, formando placas y rodillos interconectados, de organización dinámica y donde cada trabécula está cuidadosamente orientada para soportar tensiones en las zonas que toleran el mayor estrés mecánico[8]. Dispersas entre las osteonas se encuentran las lagunas y canalículos que albergan y conectan un tipo de células denominadas “osteocitos” que son, como se explicará más adelante, esenciales en la regulación ósea.

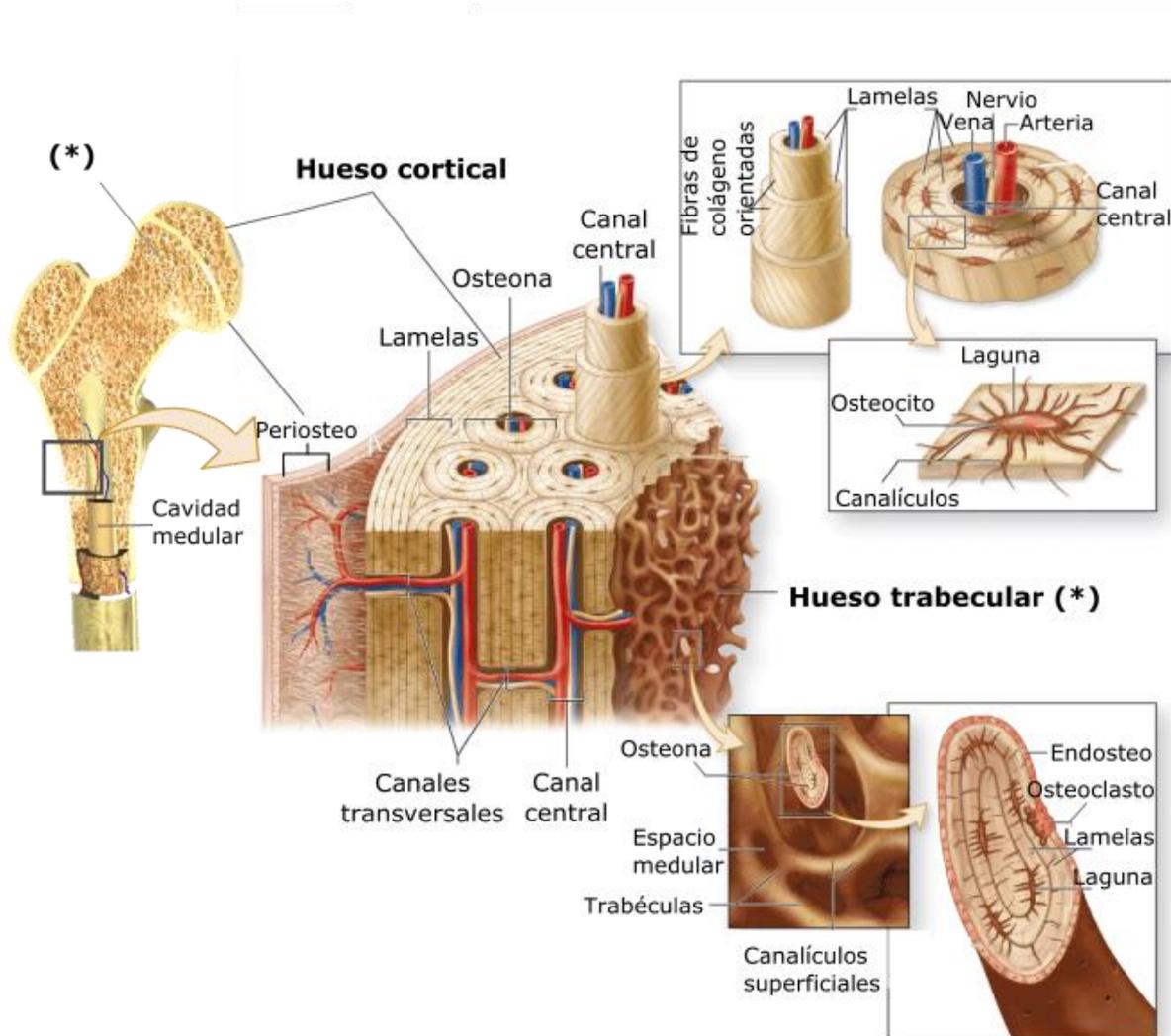


Figura 1.1: Anatomía ósea. Esquema adaptado de [9] y [10].

Una inspección más profunda de la microestructura ósea revela que las capas concéntricas que conforman una osteona, denominadas “lamelas” (3-7 μm de ancho), están formadas por fibrillas de colágeno mineralizadas[11]. Estas fibrillas rara vez se encuentran aisladas y casi siempre están asociadas entre sí adoptando diferentes conformaciones, que generalmente se alinean a lo largo del eje mayor, como se muestra en la figura 1.3.

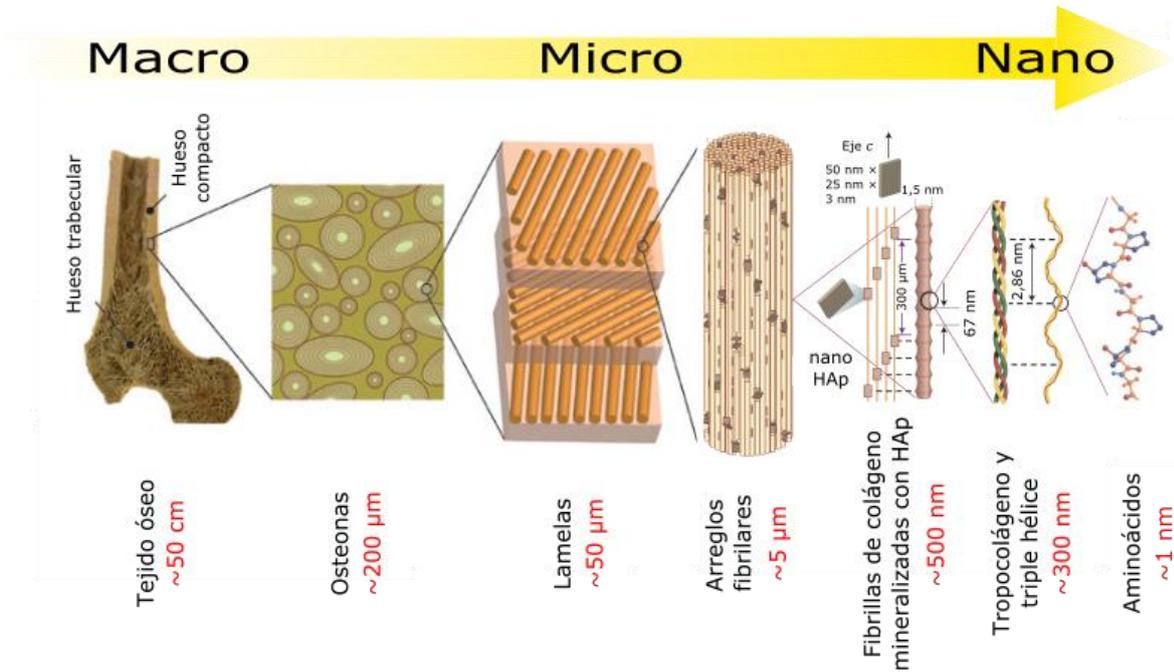


Figura 1.2: Organización jerárquica del hueso en sus 7 niveles.

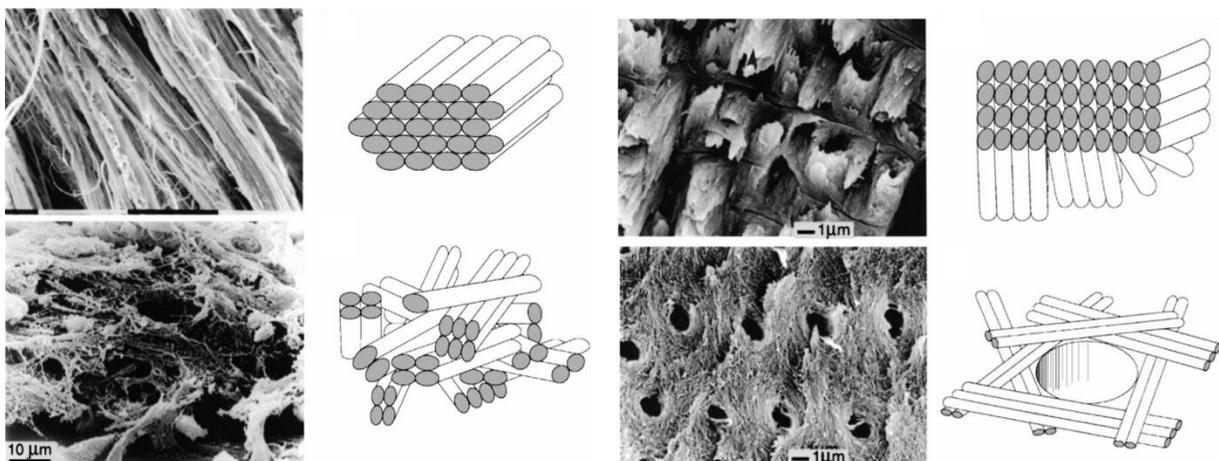


Figura 1.3: Diferentes conformaciones de fibrillas de colágeno mineralizado. Imagen reproducida de la publicación de Weiner y Wagner[7].

El nivel inferior de esta organización jerárquica corresponde a los componentes moleculares. En términos químicos, el tejido óseo está conformado por componentes tanto flexibles como rígidos: la matriz extracelular (*extracellular matrix*, ECM) está conformada por colágeno tipo I, proteoglicanos y otras proteínas no colágenas junto con factores de crecimiento y proteínas morfogénicas óseas; embebida en esta matriz flexible, se deposita la fase mineral (responsable de la rigidez estructural) que está compuesta principalmente por hidroxiapatita (HAp), de fórmula $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$, con pequeñas cantidades de carbonato, magnesio, fosfato ácido, flúor, sodio, potasio, bario y ausencia parcial de hidroxilos[12]. Comparados con los cristales geológicos, los de HAp biológica (por su tamaño y pobre cristalización) son más solubles, permitiendo así su participación en el metabolismo

mineral[5]. Los cristales de HAp tienen forma de discos aplanados y son considerados unos de los cristales biológicos más pequeños (30-50 nm de longitud y 20-25 nm de ancho). Es posible también encontrar cristales de hidroxiapatita biológica en forma de agujas, aunque los discos son la especie predominante según estudios recientes[13]. A lo largo de los capítulos de este trabajo se hará mención frecuente de este mineral, que será identificado simplemente como hidroxiapatita o HAp para facilitar la lectura, sin embargo, a menos que se aclare específicamente que se está discutiendo sobre la HAp estequiométrica, ha de considerarse que se está hablando de la apatita biológica pobremente cristalizada y deficiente en calcio y oxhidrilos. En total, el hueso está compuesto por un 50-70 % de fase mineral, 20-40% de matriz orgánica, 5-10% de agua y menos de 3% de lípidos[5].

En función de los requerimientos mecánicos y biológicos, cada nivel jerárquico tendrá mayor o menor preponderancia en su desarrollo, dando lugar a estructuras cuyo arreglo y orientación serán responsables de la anisotropía del hueso[14]. Por ejemplo, los aspectos nanométricos (el tipo de colágeno, sus entrecruzamientos, la estequiometría de la HAp) tienen un rol esencial en la adhesión celular y la mineralización superficial; por su parte, la porosidad que se halla en la escala micrométrica facilita la migración celular y la vascularización; mientras que la organización macroscópica (osteonas, lamelas) aporta la anisotropía mecánica[15].

1.2.3. Formación, remodelación ósea y componentes celulares

El hueso es un tejido dinámico capaz de regenerarse frente a lesiones y de adaptarse a las condiciones ambientales. Conviene, antes de comenzar a estudiar el proceso regeneración ósea frente a la inserción de un implante, tener una noción de los protagonistas celulares y los mecanismos involucrados en la formación y la remodelación ósea, ya que estos son los pilares sobre los cuales se funda la regeneración del tejido alrededor de un biomaterial.

Existen dos categorías de células óseas en función de su origen mesenquimal: osteoclastos por un lado, que son células gigantes multinucleadas derivadas de precursores mononucleados del linaje de macrófagos/monocitos; y osteoblastos, osteocitos y células de revestimiento óseo, diferenciadas a partir de células osteoprogenitoras. Todas estas células tienen funciones diferentes y actúan de manera concertada para mantener el tejido óseo bajo constante remodelación y permitirle adaptarse a las condiciones ambientales. A continuación, una breve descripción de sus características más sobresalientes:

- Osteoclastos: son las únicas células conocidas capaces de resorber el hueso[5]. Para ejercer su función, los osteoclastos se unen a péptidos de la matriz ósea vía integrinas ubicadas en su membrana celular formando compartimientos donde ocurre la resorción ósea. En esas condiciones secretan protones y enzimas proteolíticas, de manera tal que los protones acidifican el medio (el pH puede ser tan bajo como 4,5[16]) disolviendo la fase mineral,

mientras que las enzimas, tales como catepsina K, metaloproteinasa 9 y gelatinasa, entre otras, digieren los componentes proteicos óseos[17].

- Osteoblastos: son las células encargadas de sintetizar la matriz extracelular sobre superficies de hueso en formación y comprenden el 4-6 % de la población celular del hueso. Los precursores de osteoblastos (conocidos como pre-osteoblastos)[18] tienen forma aguada y dejan de proliferar cuando se diferencian a osteoblastos sobre la superficie del hueso en formación[19]. De forma cuboide y polarizada, estas células sintetizan los componentes proteicos y minerales de la matriz y lo secretan hacia la cara del hueso que se encuentra en desarrollo[20]. La población de osteoblastos es muy variada y expresa diferentes genes que podrían explicar la heterogeneidad de la microarquitectura trabecular en diferentes sitios esqueléticos y las variaciones regionales en la habilidad de los osteoblastos para responder a agentes utilizados en el tratamiento de enfermedades óseas[5].
- Osteocitos: representan el 90-95% del total de células óseas y son las más longevas, llegando a vivir hasta por 25 años[21]. Se originan al final de un ciclo de formación ósea, cuando una subpoblación de osteoblastos queda completamente rodeada de matriz extracelular en cuyo interior se diferencian a osteocitos. Estas células se alojan dentro de las lagunas, rodeados de matriz ósea mineralizada, y presentan una morfología dendrítica[22], cuyas proyecciones citoplasmáticas se extienden a lo largo de pequeños túneles que nacen en las lagunas, llamados canaliculos, y se conectan con proyecciones citoplasmáticas de otros osteocitos vecinos, osteoblastos y células del revestimiento óseo, facilitando así el transporte intercelular de moléculas de señalización, figura 1.1. A través de ese intrincado sistema lacunocanalicular, los osteocitos perciben presiones y cargas mecánicas, actuando así como mecanosensores y orquestadores de la remodelación ósea, mediante la regulación de la actividad de osteoblastos y osteoclastos; estas células también participan en el intercambio de minerales[23].
- Células del revestimiento óseo: éstas son osteoblastos quiescentes de aspecto aplanado que cubren la superficie del hueso, donde no están siendo llevados a cabo procesos de resorción ni de formación. Su función no está del todo clara, pero se ha demostrado que su presencia previene la interacción directa entre osteoclastos y la matriz extracelular en aquellos sitios donde no está previsto que ocurra la remodelación ósea[24]. Por su ubicación, se cree que también regulan el flujo de minerales desde y hacia la matriz extracelular ósea, actuando de alguna manera como una barrera hemato-ósea[25].

La remodelación ósea es el proceso por el cual el hueso es renovado para mantener su fortaleza, integridad estructural y la homeostasis mineral. Este fenómeno involucra la remoción

continua de sectores de hueso viejo, su reemplazo con matriz proteica recientemente formada y la subsiguiente mineralización que da lugar al hueso nuevo. La remodelación ósea es un proceso que comienza antes del nacimiento y continúa durante toda la vida[5]. Los sitios en los que ocurre este proceso pueden formarse aleatoriamente o en áreas que requieren reparación[26], sin embargo la concepción general es que se establecen de manera aleatoria.

El proceso de remodelación ocurre cuando monocitos mononucleares o macrófagos precursores de osteoclastos son reclutados desde la circulación hacia la superficie ósea, donde varios de ellos se fusionan en forma de pre-osteoclastos multinucleados[27] para formar una zona anular sellada en cuyo interior se producirá la resorción ósea. Esta fase de resorción dura de 2 a 4 semanas y finaliza con la apoptosis de los osteoclastos multinucleados.

La transición hacia la fase de formación ósea está acoplada a mecanismos de señalización que aún no están completamente elucidados y podría estar mediada por el gradiente de tensión mecánica en la laguna de resorción[28]–[30]. La formación ósea es un proceso más largo que dura de 4 a 6 meses y está a cargo de los osteoblastos.

La síntesis de la matriz ósea ocurre en dos grandes pasos y merece que nos detengamos un momento para entenderla: primero se deposita la matriz orgánica, mediante la secreción de colágeno (tipo I principalmente), proteínas no colágenas (osteocalcina, osteonectina, sialoproteínas óseas y osteopontina) y proteoglicanos; que luego se mineralizan. La mineralización, por su parte, aún tiene puntos que necesitan ser esclarecidos, sin embargo es posible elaborar una acepción general del proceso. Éste ocurre cuando vesículas de matriz extracelular de tamaño variable (30 a 200 nm) son liberadas desde la membrana apical de los osteoblastos hacia la matriz ósea recientemente formada, donde se unen a proteoglicanos y otros componentes orgánicos[31], [32]. Estas vesículas sirven de microambiente protegido en el cual la concentración de iones calcio y fósforo pueden aumentar lo suficientemente como para inducir la precipitación de los cristales de HAp que ocurre en los extremos de las fibras de colágeno tipo I[33], figura 1.2. La deposición de HAp es un proceso que será retomado y analizado con más profundidad en el capítulo 5. Al finalizar la formación ósea, aproximadamente 50-70% de los osteoblastos incurrirán en apoptosis mientras que las células restantes quedarán embebidas en la matriz mineralizada convertidas en osteocitos o en células del revestimiento óseo[5]. El resultado final de cada ciclo de remodelación ósea es la producción de una nueva osteona.

1.3. Tejido óseo e implantes

1.3.1. Regeneración ósea alrededor de los implantes

Cuando el implante es insertado en el organismo, la estabilidad primaria es proporcionada por la forma del mismo y su topografía. Esta es la razón, por ejemplo, por la cual los implantes dentales poseen forma de tornillo[34], [35]. La osteogénesis, el proceso por el cual se regenera el tejido alrededor del implante, puede ocurrir de dos maneras, denominadas distal o por contacto[36]. La osteogénesis por contacto se caracteriza por una formación de hueso que se inicia sobre la superficie misma del implante; en la osteogénesis distal, por otra parte, el hueso comienza a formarse sobre la superficie resorbida del hueso ya existente en la región aledaña al implante y comienza a aproximarse hacia él, hasta que eventualmente lo rodea completamente. En la mayoría de los casos, la regeneración ósea alrededor del implante ocurre mediante una combinación de estos dos mecanismos y la prevalencia de uno u otro determina que implante quede integrado o encapsulado por el tejido óseo[36]. Para comprender mejor los desafíos actuales que presenta el campo de la regeneración ósea, es conveniente tener una noción de los procesos que ocurren desde que el implante es insertado en el organismo hasta que éste se encuentra totalmente integrado. Es por ello que se dedicará una parte de esta sección a explicar estos eventos fisiológicos[37].

La regeneración ósea alrededor del implante no es muy diferente del proceso de reparación que ocurre luego de una fractura[38]. Este proceso restablece propiedades físicas y mecánicas del tejido dañado, devolviéndole sus funciones originales, y está influenciado por varios factores tanto sistémicos como locales. La regeneración tisular ocurre en 4 etapas: hemostasis (cuya duración comprende desde varios segundos a horas), inflamación (horas a días), reparación (días a semanas) y remodelado (semanas a meses), figura 1.4.

La primera fase, hemostasis, ocurre debido a que la intervención quirúrgica requerida para introducir el implante conduce a hemorragia proveniente del hueso y los tejidos blandos circundantes, por lo que la sangre es invariablemente el primer tejido en entrar en contacto con el implante. Esto desencadena una serie de procesos que incluyen deposición de proteínas, coagulación, inflamación y formación de tejido que están sensiblemente influenciados por la química superficial y la topografía del implante[39]. La cantidad, tipo y conformación de las proteínas adsorbidas al material determinarán la disponibilidad de ciertos péptidos bioactivos para que puedan interactuar con las células. La interacción entre los materiales y una proteína plasmática modelo será informada en el capítulo 5.

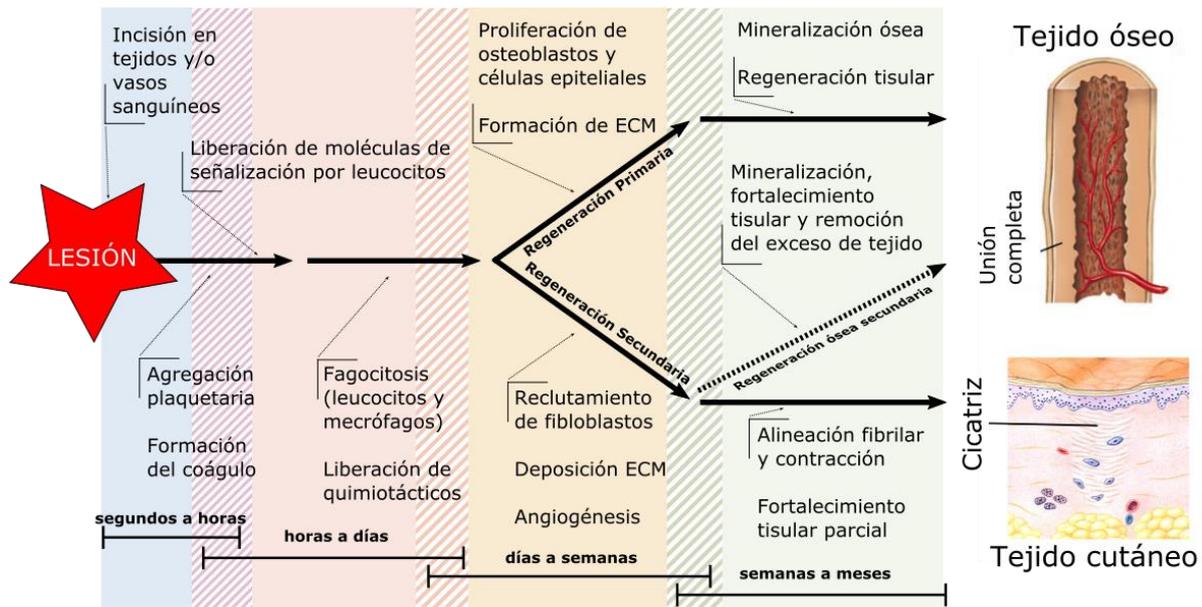


Figura 1.4: Resumen de la cascada de eventos presentes en la reparación tisular. Esquema modificado de la publicación de Stroncek y Reichert[40].

La etapa inflamatoria involucra la infiltración al tejido de células inflamatorias (macrófagos, monocitos, linfocitos y células polimorfonucleares) y fibroblastos para formar un tejido de granulación, favorecer el crecimiento de tejido vascular, y la migración de células mesenquimales. El uso de antiinflamatorios o medicamentos citotóxicos durante la primera semana puede alterar esta respuesta y perturbar la reparación ósea[41]. El caso opuesto, esto es, la progresión hacia estados de inflamación crónica, también es causa de reparación tisular deficiente[42]. De lo antedicho se desprende que el correcto desarrollo de la etapa inflamatoria es esencial para la integración exitosa del implante. Uno de los pilares de este trabajo de investigación radica en la posibilidad de actuar sobre el balance de óxido-reducción para favorecer el transcurso normal de este proceso. El capítulo 8 de esta tesis abordará con mayor profundidad la importancia de este proceso y su control sobre la supervivencia celular.

Durante la fase de reparación, los fibroblastos comienzan a depositar un estroma que ayuda a mantener el crecimiento vascular y hace las veces de andamiaje facilitador del movimiento para que tenga lugar el proceso de osificación[43]. Al mismo tiempo, osteoblastos maduros que se desplazan hacia la lesión, comienzan a sintetizar la matriz proteica y mineral en torno al sitio de reparación. La osificación en este punto es un proceso crítico ya que de ser deficiente, podría desarrollarse una unión fibrosa que conduciría a la desestabilización de la fijación del implante[44], [45].

Finalmente, la curación de la herida queda completa durante la etapa de remodelación, como se describió en la sección anterior, en la cual es hueso recupera su forma, estructura y fuerza mecánica.

1.3.2. Rol del estrés oxidativo en la fisiopatología ósea

El estrés oxidativo se caracteriza por presentar niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) que desbalancean el equilibrio de reducción-oxidación (redox) intracelular y está asociado con fisiopatologías omnipresentes en el cuerpo, tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares, artritis, diabetes y desórdenes neurológicos [46]–[49]. En el tejido óseo la producción excesiva de ROS está íntimamente ligada con la homeostasis mineral y contribuye a la remodelación ósea, promoviendo su resorción[34], [50]. Más aún, algunos estudios también pusieron de manifiesto la relación entre el estrés oxidativo y ciertas morbilidades entre las que se destacan la osteoporosis[51]–[53], tumores óseos[54], complicaciones óseas asociadas a la progresión de diabetes[55] y enfermedades inflamatorias articulares[56], [57].

Estas especies reactivas de oxígeno están principalmente representadas por el radical aniónico superóxido ($O_2^{\cdot -}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el peroxinitrito ($ONOO^-$) y el radical oxidrilo (OH^{\cdot})[58], [59]. Su producción está a cargo de varios sistemas enzimáticos, incluyendo NADPH oxidasa, citocromo P450, xantina oxidasa, monoamina oxidasa, ciclooxigenasa y lipooxigenasa[58], y puede ocurrir en varios sitios celulares, incluyendo la membrana plasmática, la mitocondria, el retículo endoplasmático y en el citoplasma. La mayor cantidad de ROS se produce en la mitocondria como producto de la transferencia de electrones desapareados provenientes de la cadena respiratoria al O_2 [60]. Esto resulta en la formación de $O_2^{\cdot -}$, que luego puede convertirse a H_2O_2 , o a $ONOO^-$ a través de diferentes mecanismos, figura 1.5.

Como se introdujo en la sección 1.3.1, la inserción de un implante en el organismo genera una herida cuya correcta cicatrización depende de un delicado balance entre los efectos positivos y deletéreos de ROS[59]. Las células inflamatorias, principalmente macrófagos y neutrófilos, se encuentran entre las primeras en entrar en contacto con la superficie del implante[61], [62] y su activación conduce a la producción de altas cantidades de estas especies reactivas. Estos eventos corresponden a la etapa inflamatoria de la regeneración tisular y, como se mencionó anteriormente, son necesarios para la correcta cicatrización de la herida. La respuesta equilibrada de ROS permite eliminar los restos de tejido necrosado, eliminar patógenos previniendo infecciones y estimular la correcta remodelación del tejido; una deficiencia en ROS resultaría en infecciones mientras que un exceso de ROS es capaz de destruir el estroma normal[63], [64]. Muchos autores han demostrado que la desregulación del proceso inflamatorio y su progresión hacia estados de inflamación crónica

con producción excesiva de ROS son una de las principales causas de aflojamiento aseptico del implante[42], [65], [66].

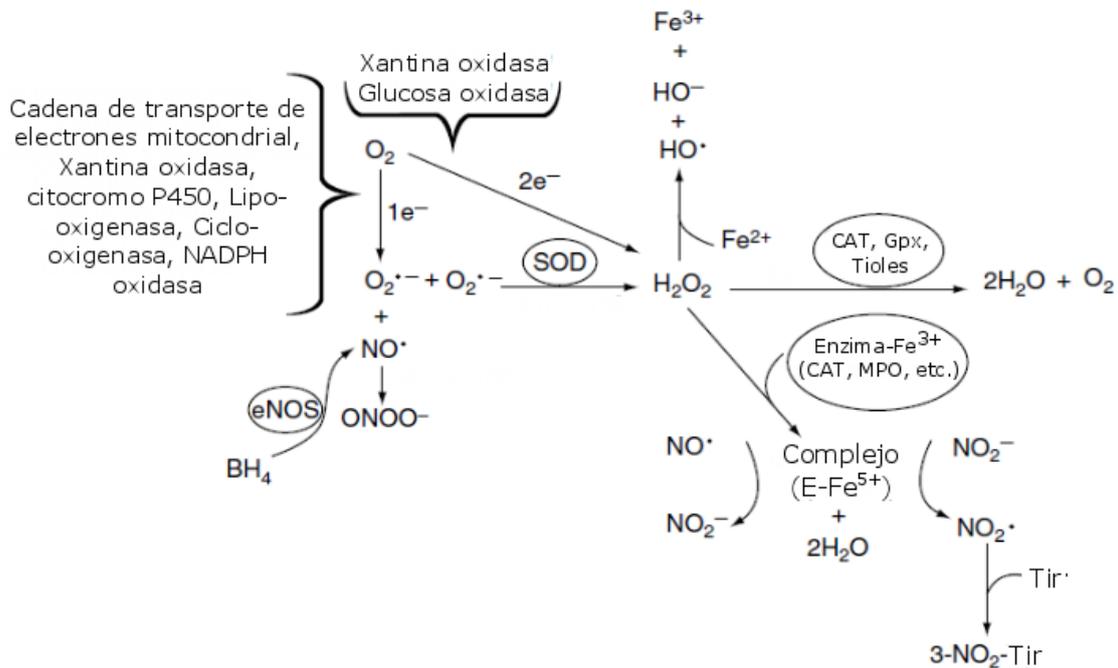


Figura 1.5: Mecanismos de generación y detoxificación de ROS. SOD: superóxido dismutasa; CAT: catalasa; Gpx; glutatión peroxidasa extracelular; MPO: mieloperoxidasa. Esquema adaptado de la publicación de Cai[58].

La excesiva producción de ROS en el tejido óseo no sólo afecta la etapa inflamatoria de la regeneración tisular, sino que también, como se anticipó en el inicio de esta sección, interviene en el proceso de remodelación ósea[67], favoreciendo la osteoclastogénesis y aumentando así el riesgo de fracturas. Más aún, altos niveles intracelulares de ROS inhiben la diferenciación celular de osteoblastos, tal y como lo demostraron Liu *et al.* en su estudio sobre el estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno y la supresión de la diferenciación en células madres mesenquimales de ratón[68].

Existen mecanismos intracelulares para contrarrestar el estrés oxidativo, que incluyen enzimas antioxidantes tales como catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa (figura 1.5), cuya función determina la respuesta celular frente a las ROS[58].

La biología de las células que sintetizan y que destruyen tejido óseo está delicadamente regulada por el metabolismo sistémico, de tal forma que constituyen un proceso en equilibrio dinámico en el que la tasa de destrucción se compensa con la de formación, con lo que, en condiciones normales, el hueso está sometido a una continua remodelación. Su homeostasis depende del mantenimiento de dicho equilibrio. La estrecha relación existente entre la falla en la

osteointegración de los implantes, las patologías óseas y el estrés oxidativo hace que, en la actualidad, la búsqueda y el diseño de nuevas estrategias antioxidantes para prevenir la pérdida de la integridad ósea, sea un tópico de interés creciente. Por lo expuesto hasta aquí es que este trabajo de investigación aborda la tarea de buscar una estrategia para combatir el estrés oxidativo desde el implante mismo.

1.4. Biomateriales

Se denominan sustitutos óseos a todos los tejidos o materiales que pueden ser empleados en el relleno de defectos del hueso, con el objetivo de promover la regeneración y reparación del tejido óseo. De acuerdo con esto, pueden reconocerse dos tipos fundamentales de sustitutos: los injertos óseos y los biomateriales[69].

Los injertos óseos corresponden a fragmentos de hueso que se pueden implantar en un área del esqueleto para restaurar el capital óseo perdido[69].

Los biomateriales, por definición, son “cualquier sustancia o combinación de sustancias, distintas de fármacos, sintéticos o de origen natural, que se puede utilizar para cualquier período de tiempo, que aumenta o sustituye parcial o totalmente cualquier tejido, órgano o función del cuerpo, con el fin de mantener o mejorar la calidad de vida del individuo”[70].

1.4.1. Osteoinducción, osteoconducción, y osteogénesis

Existen tres propiedades fisiológicas que son directamente afectadas por sustituto óseo y que deben satisfacerse si se pretende que el implante permanezca exitosamente integrado con el tejido. Estas propiedades son: osteoinducción, osteoconducción y osteogénesis[71].

La osteoinducción es la habilidad del implante para inducir la diferenciación de células madre a osteoblastos en un proceso que está asociado a la presencia de factores de crecimiento provistos por el sustituto. Los materiales osteoinductivos más exitosos en la actualidad son los q contienen proteínas morfogénicas óseas y matriz ósea desmineralizada.

La osteoconducción es la propiedad física del material para actuar como andamiaje para permitir la regeneración ósea. Esta propiedad implica el crecimiento de la neovascularización y la infiltración de células precursoras de la osteogénesis sobre el implante. Esta propiedad puede hallarse en auto y aloinjertos de hueso trabecular, matriz ósea desmineralizada, HAp, colágeno y otros fosfatos de calcio[69], [72].

La osteogénesis es la habilidad del sustituto para inducir la producción de hueso nuevo, y este proceso depende de la presencia de células osteoprogenitoras viables en el implante, que

participan en las etapas tempranas de la regeneración ósea para unir el sustituto con el tejido circundante. De esto deriva que la osteogénesis es una propiedad satisfecha únicamente por el hueso autólogo fresco que contenga células de médula ósea[45].

En la actualidad no existe un implante ortopédico sintético ideal y esto se debe, en gran medida, a que el hueso es un tejido multifuncional biológica y estructuralmente muy complejo. Como se mencionó en la sección 1.2.2, cada nivel en la organización estructural contribuye a la estabilidad mecánica y funcional del tejido; por lo tanto, es razonable asumir que para que un biomaterial implantable sea exitoso, éste debe ser diseñado tratando de imitar esta jerarquía. En términos globales, podría plantearse la obtención de estos materiales utilizando una estrategia desde abajo hacia arriba, comenzando en la nanoescala, y construyendo la estructura a medida que la escala aumenta.

1.4.2. Implantes óseos basados en titanio

A lo largo de la historia se han ensayado una gran variedad de materiales para ser empleados como sustitutos del hueso. Materiales tan diversos como marfil, madera, goma, acrílicos y Bakelita cuentan como ejemplos de ello[73]. Los metales, sin embargo, han ido ganando terreno y en la actualidad y son ampliamente utilizados en la fabricación de implantes óseos, tanto por su disponibilidad como por el éxito que tuvieron algunas aleaciones de metales nobles ya desde principios del siglo XX[74]. Entre ellos hay dos materiales que se destacan por la frecuencia con la que se emplean: los de titanio, que son los predominantes, y los de zirconio, que se eligen con una frecuencia considerablemente menor[37].

El titanio comúnmente se utiliza en sus formas de grado 4 o 5, debido a sus excelentes propiedades químicas y mecánicas (es liviano, posee excelente biocompatibilidad, es bastante rígido y altamente resistente a la corrosión[75]). Los de grado 4, comercialmente conocidos como titanio puro, tienen menos de 1 % de impurezas, tales como hierro y oxígeno y son los de mayor resistencia a la corrosión[75]. Los de grado 5, también conocidos como Ti-6Al-4V, son una aleación de titanio que incorpora 6 % de aluminio y 4 % de vanadio, obteniéndose un material de mayor fortaleza y resistencia a la fatiga que los de titanio puro[76]. Los implantes de zirconio están hechos de policristales tetragonales de zirconia estabilizados con ytria o zirconia parcialmente estabilizados por ytria[77], sin embargo estos no son tan frecuentes por su pobre osteointegración[78]. Si bien el concepto de osteointegración será retomado y analizado con mayor profundidad en el capítulo 5, es conveniente hacer aquí una breve introducción del mismo. En términos experimentales, la osteointegración se entiende como el contacto cercano entre el hueso y la superficie del implante en

secciones histológicas[79], clínicamente, esto se traduce en la estabilidad y anquilosis de un implante en el hueso[80].

En términos de propiedades mecánicas, el titanio tiene un módulo elástico relativamente bajo si se lo compara con el resto de los metales utilizados en ortopedia[81]. Su cercanía con el del hueso reduce problemas de estrés mecánico[82] debido a que las cargas de tensión se transfieren uniformemente entre el implante y el hueso, previniendo la resorción ósea que devendría en caso de existir períodos prolongados en ausencia de carga sobre el tejido[81]. Sin embargo, el fracaso de estos implantes ocurre por factores relacionados con una pobre osteointegración, ya sea producto del trauma por sobrecarga, micro-movilidad, inflamación excesiva luego de la inserción quirúrgica o, en menor medida, por infección en el tejido aledaño al biomaterial[83]–[85]. Debido a esto, el desafío actual que presenta el desarrollo de los materiales implantables basados en titanio es mejorar su anclaje con el tejido óseo[84].

Como se adelantó en la sección 1.3.1, la estructura superficial del biomaterial tiene una influencia muy significativa en la osteointegración del implante. De hecho, el éxito clínico de los implantes óseos basados en titanio está principalmente determinado por el desarrollo y las propiedades fisicoquímicas de la capa de dióxido de titanio (TiO_2) que se forma en su superficie y que actúa como interfase efectiva entre el tejido y el metal. Por lo tanto, si bien las propiedades del seno del biomaterial son responsables de las propiedades mecánicas del implante, es la naturaleza de esta cubierta de TiO_2 , ya sea desde su estructura cristalina hasta su topografía, la que determinará, en última instancia, la correcta unión con el tejido circundante.

1.4.2.1. TiO_2 en implantes óseos

Todos los implantes de titanio están cubiertos por una capa delgada protectora de TiO_2 [86]. Esta capa es el principal contacto implante-tejido y se presume que es la responsable de las excelentes propiedades de biocompatibilidad de estos materiales, debido a que le confiere un bajo nivel de conductividad electrónica[87], alta resistencia a la corrosión y estabilidad termodinámica a valores de pH fisiológicos[88].

Las corrientes actuales de investigación sugieren que la existencia de una superficie nanoestructurada en los implantes tiene efectos positivos sobre la osteointegración debido a que el área de contacto aumenta considerablemente y que la topografía puede ser modificada para simular el tejido nativo[89], [90]. Muchos estudios han demostrado que diferentes propiedades de los óxidos de titanio tienen efectos significativos en la respuesta biológica, es por ello que los andamiajes cerámicos basados en TiO_2 están emergiendo como candidatos prometedores para la regeneración

de tejido óseo. Nanotubos de TiO_2 , por ejemplo, en escala apropiada para la adhesión y diferenciación celular, pueden inducir la migración de osteoblastos y células madres mesenquimales y así reforzar las interacciones entre el implante y el tejido[91]–[93]. Andamiajes porosos de TiO_2 , por su parte, pueden promover la formación ósea alrededor del implante en un modelo animal de defecto cortical en conejos[94] y el crecimiento interno extensivo de tejido óseo cuando el andamiaje de TiO_2 es implantado en alvéolos de extracción de dientes en un modelo experimental de cerdos miniatura[95]. El TiO_2 en medicina regenerativa puede ser empleado en estado puro como andamiaje para promover la regeneración de tejido nativo en defectos óseos[94], [96] o como cubierta en implantes metálicos para mejorar su osteointegración[97], [98].

Debido a que todos los fenómenos fisiológicos tendientes a la osteointegración ocurren en la interfase entre el tejido y el biomaterial, uno de los pilares fundamentales de este trabajo de tesis es el estudio de las propiedades químicas y superficiales del TiO_2 y su influencia en la regeneración del tejido óseo.

1.4.3. Importancia biológica del óxido de cerio y su participación en la reducción del estrés oxidativo

El cerio (Ce) es un elemento de tierras raras que pertenece a la serie de los lantánidos y además es el más abundante de este grupo. En la naturaleza puede hallarse tanto como metal libre o como óxido, en cuya forma puede alternar entre dos estados de oxidación: ceroso (Ce(III)) y cérico (Ce(IV))[99]. El óxido de cerio (CeO_2), también llamado *ceria*, junto con su capacidad para alternar entre estados de oxidación, también es capaz de modificar el contenido de oxígeno en su composición, pudiendo variar entre CeO_2 y CeO_{2-x} (figura 1.6 b)); esta función es denominada capacidad de almacenamiento de oxígeno[100]. Debido a estas dos propiedades, la ceria, tanto en su forma pura como dopada con otros elementos, ha sido extensivamente utilizada en los campos de catálisis, electrónica, electroquímica, en celdas de combustible y en celdas solares[101]–[104].

Recientemente, el área de aplicaciones biomédicas ha dirigido su atención hacia las nanopartículas de óxido de cerio, también llamadas *nanoceria*, porque su capacidad para alterar sus estados de oxidación en función de las condiciones ambientales[105] es comparable a la de ciertos antioxidantes biológicos[106], [107], lo cual le conferiría el potencial para detoxificar radicales libres[108]. Actualmente existe evidencia comprobable de que la nanoceria es capaz de prevenir el daño celular causado por ROS[109] y radiación[110].

Para comenzar a entender el mecanismo por el cual nanoceria elimina radicales libres, es importante conocer la química redox de estas nanopartículas. Como se describe en la reacción (1.1),

el proceso de oxidación/reducción es reversible y puede ser catalizado en cualquiera de las dos direcciones por una gran variedad de especies radicalarias[108]:



El óxido de cerio cristaliza en una estructura cúbica de tipo fluorita (grupo espacial $Fm3ms$)[111], en la cual cada átomo de cerio está coordinado por 8 oxígenos equivalentes ubicados en las esquinas de un cubo (figura 1.6 a)). La capacidad depuradora de especies radicalarias está relacionada con la presencia de vacancias de oxígeno en la superficie del cristal, por lo tanto, tamaños de partícula nanométricos generan mayor cantidad de defectos no estequiétricos y, por lo tanto, aumentan la cantidad de portadores de carga (vacancias), facilitando la conversión entre Ce^{3+} y Ce^{4+} [112] (figura 1.6 b)).

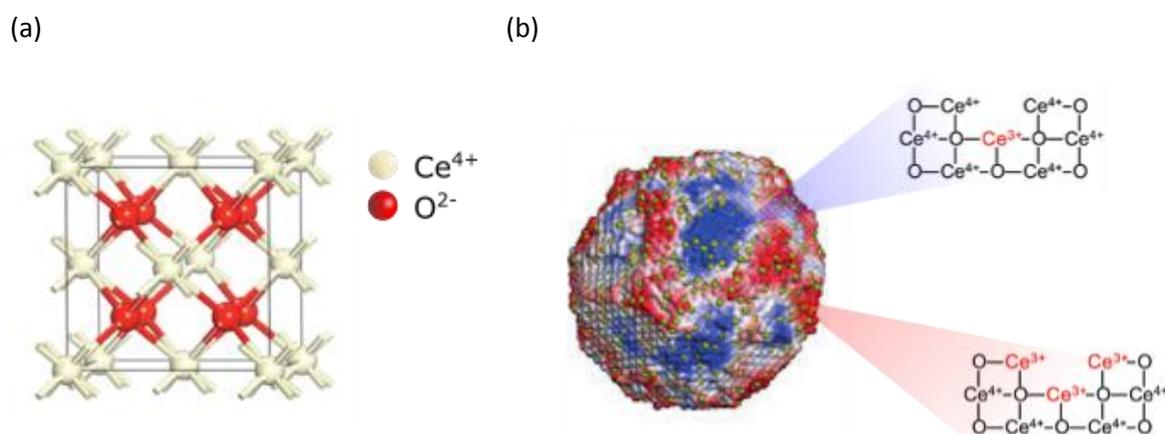


Figura 1.6: (a) Celda unidad de CeO_2 correspondiente al sistema cúbico centrado en las caras. (b) Nanopartícula esférica de CeO_2 y su “huella digital” de reactividad en términos de su capacidad de almacenamiento de oxígeno, las zonas coloreadas en rojo representan áreas de alta reactividad mientras que las azules corresponden con zonas de baja reactividad; las esferas amarillas en la NP representan iones Ce^{3+} . Imagen modificada de la publicación de Reed et al. [113].

Las vacancias se forman como resultado de la pérdida de átomos de oxígeno de la red cristalina y pueden ser ocupadas por oxígeno atómico que se mueve desde otras vacancias equivalentes permitiendo así la movilidad de estos átomos, siendo éste el fenómeno responsable de la rápida recuperación de los sitios vacantes superficiales del CeO_2 [114]. El número de vacancias de oxígeno en la red puede modificarse en función de las condiciones ambientales, y es afectado tanto por cambios en la presión parcial de oxígeno, temperatura y también por la presencia de radicales libres. Existen varios mecanismos propuesto para la degradación de ROS, como puede observarse en las reacciones (1.2), (1.3) y (1.4)[108], [115], [116].



Es importante destacar que las reacciones anteriores han sido simplificadas para representar el estado global; la química detrás de la degradación de especies radicalarias es más compleja y ocurre en una serie de pasos, como se esquematiza en la figura 1.7. El oxígeno molecular, por ejemplo, está sujeto a una serie de transformaciones a través de estados intermediarios tales como peróxido y superóxido antes de entrar, eventualmente, en la red cristalina de ceria en forma de anión O^{2-} [105]:

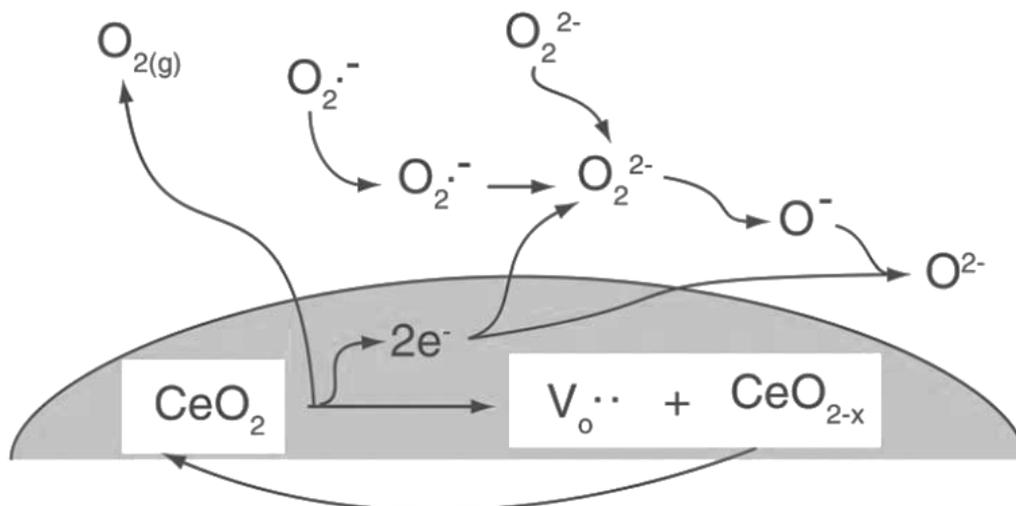


Figura 1.7: Mecanismo hipotético de eliminación de ROS en cercanías a la superficie de nanoceria. Las vacancias de oxígeno ($V_o^{\cdot\cdot}$) son sitios disponibles para la adsorción de radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y peróxido (O_2^{2-}). Estas vacancias metaestables también activan la transición de radicales a oxígeno (O^{2-}) que pueden migrar hacia el interior de la red cristalina del CeO_2 .

Los peróxidos, por su parte, se adhieren a la superficie de las nanoceria con mayor fuerza que el oxígeno molecular, por lo tanto, a través de la depuración de especies radicalarias o por adsorción de oxígeno en su superficie, las nanopartículas de óxido de cerio podrían regular la disponibilidad de oxígeno en el entorno celular[117]. A pesar de estos hechos, el mecanismo exacto por el cual las nanopartículas de CeO_2 pueden eliminar ROS en sistemas biológicos no está totalmente dilucidado y además difiere entre ROS[115]. Tsai *et al.* afirman que el mecanismo podría ser similar al observado en sistemas no biológicos, por lo que los radicales libres intracelulares actuarían como intermediarios en el intercambio superficial de oxígeno y que finalmente migrarían hacia vacancias de oxígeno presentes en las nanopartículas de CeO_2 [105].

Actualmente se sabe que estas nanopartículas pueden actuar imitando las enzimas biológicas catalasa[107] o superóxido dismutasa (SOD)[115], pudiendo oficiar como antioxidantes frente a varios tipos de ROS, incluyendo $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} , NO y $ONOO^-$ [107], [115], [118]. Estas propiedades, además, son óptimas a pH fisiológico, en tanto que a pH ácido, nanoceria se comporta como

oxidasa[118]. Como se mencionó en la sección 1.3.2, la presencia de ROS es un factor clave para modular la función celular ósea, afectando directamente la fisiología de la mineralización.

La manipulación del balance redox en estas células se ha planteado como una nueva estrategia en el diseño de terapias para el tratamiento de enfermedades óseas[119]. Más aún, muchas aleaciones de titanio producen partículas de corrosión y fallan por mecanismos generalmente relacionados con interacciones superficiales con el tejido óseo que exacerbaban la respuesta inflamatoria, provocando, en casos extremos, el aflojamiento aséptico del implante que requiere su remoción[84].

Estudios recientes han demostrado que andamiajes tridimensionales usando una espuma de vidrio bioactivo con nanocería incorporada en los poros mejoraron la diferenciación de osteoblastos e incrementaron la producción de colágeno de células madres mesenquimales en estudios realizados con cultivos celulares[117]. Otros autores demostraron que andamiajes de PLGA (*poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)*) cargados con nanocería eran capaces de promover una mayor proliferación de células madre mesenquimales comparados con PLGA cargado con TiO₂, sugiriendo que las propiedades antioxidantes del CeO₂ podrían tener un importante papel en la protección celular[120]. En lo respectivo a trastornos óseos, se ha demostrado también que la presencia del lantánido parece ser efectiva en el control de condiciones inflamatorias en patologías tales como artritis reumatoidea y osteoartritis[121].

Pese a toda esta interesante evidencia de su potencial citoprotector, la incorporación de este elemento en biomateriales pensados para la regeneración de tejido óseo está aún en sus albores[122]–[124], y es por ello que resulta interesante continuar investigando en este sentido. La incorporación de nanocería en la matriz de TiO₂ que se plantea en este trabajo de investigación pretende arrojar más luz sobre el impacto del CeO₂ y su potencial antioxidante en la regeneración del tejido óseo.

1.5. Síntesis de materiales nanoestructurados utilizando microemulsiones

Las síntesis de los materiales estudiados durante el desarrollo de este trabajo se realizaron empleando sistemas de microemulsiones como agentes directores de estructura. Para poder entender la dinámica de la síntesis y su influencia en las características finales de los materiales, es necesario introducir una serie de conceptos fundamentales que se describen en esta sección y que serán retomados a lo largo de los capítulos 3 y 4.

1.5.1. Anfifilos: generalidades

La palabra “anfifilo” fue acuñada por Paul Winsor a partir del prefijo griego “*amphi*”, de ambos lados o doblemente, y la raíz “*philos*”, que significa amigo de, para definir a las sustancias químicas que contienen dominios tanto hidrofílicos como hidrofóbicos[125]. La porción no polar (también denominada cola apolar) generalmente es una cadena hidrocarbonada de 10 a 20 átomos de carbono de longitud, en tanto que la porción hidrofílica, o cabeza polar, que contiene heteroátomos tales como O, S, N, P, los cuales aparecen en grupos funcionales como alcohol, tiol, éter, éster, ácido, sulfato, sulfonato, fosfato, amina, amida, entre otros[125]. Según la naturaleza química de su cabeza polar, pueden clasificarse en aniónicos, catiónicos, anfotéricos y no iónicos[126], como se describe en la figura 1.8.

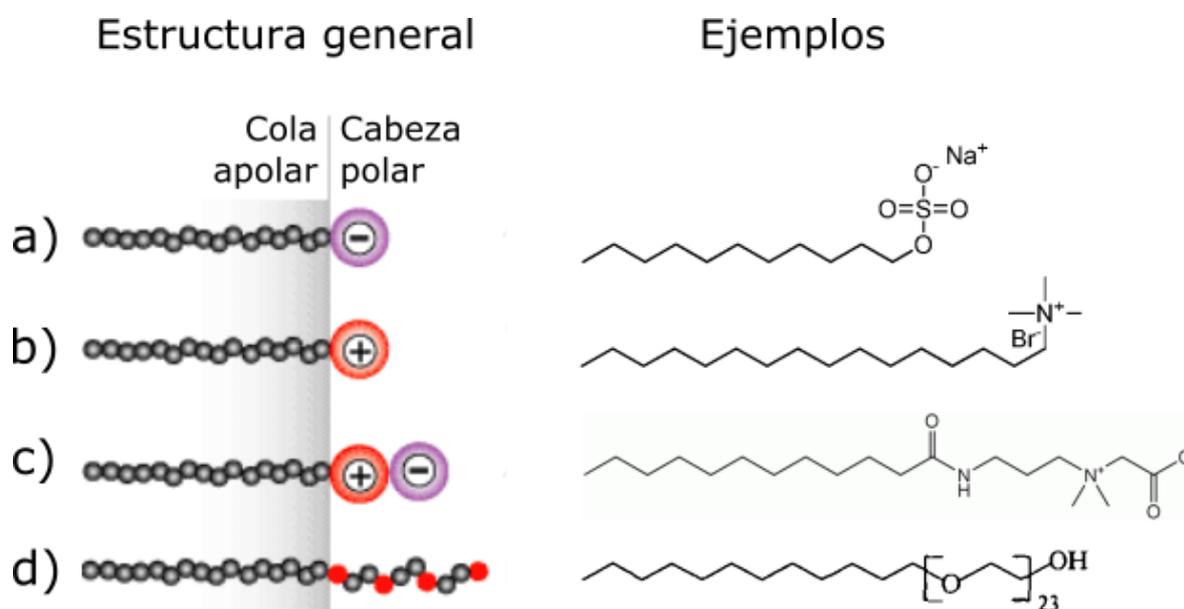


Figura 1.8: Clasificación general de anfifilos de acuerdo a la composición de la cabeza polar: **(a)** aniónicos (ejemplo: SDS, dodecil sulfato de sodio); **(b)** catiónicos (ejemplo: C₁₆TAB, bromuro de hexadecil trimetil amonio); **(c)** anfotéricos (ejemplo: cocamidopropil betaína); **(d)** no iónicos (ejemplo: Brij-35).

1.5.2. Anfifilos: autoagregación

Debido a su doble afinidad, estas moléculas no son totalmente solubles ni en solventes polares ni en solventes apolares, por lo que, para satisfacer ambos tipos de afinidades, el grupo polar debe estar solvatado por un solvente polar, mientras que el grupo apolar debe encontrarse en un solvente orgánico, o al menos, fuera del solvente polar[127]. Tales condiciones ocurren solamente en la frontera de dos fases. Se llamará superficie a la frontera entre una fase condensada y un gas, e interfase, a la frontera entre dos fases condensadas (líquido-líquido, líquido-sólido). Este es un concepto que se retomará en el capítulo 5 de este trabajo. Debido a que los anfifilos tienen una fuerte tendencia a migrar hacia una superficie o interfase, también se los denomina “surfactantes”,

como contracción de las palabras inglesas *surface active substances*[128], por lo tanto estas denominaciones (anfifilo y surfactante) serán empleadas, de aquí en más, como equivalentes.

Considerando el caso de anfifilos en soluciones acuosas, donde las moléculas de agua interactúan entre sí a través de puentes de hidrógeno, la presencia de grupos hidrocarbonados causa una distorsión de la estructura del solvente aumentando la energía libre del sistema[129]. El trabajo requerido para que el surfactante migre hacia la superficie es menor que el necesario para mantenerlo en el seno del líquido por lo que la migración del anfifilo a la superficie es un proceso espontáneo. En la interfase gas-líquido, se forma una monocapa orientada del surfactante en la que las colas apolares se ubican de cara a la superficie gaseosa mientras que las cabezas polares se orientan hacia abajo, en contacto con la fase acuosa[130]. Dependiendo de la estructura molecular del surfactante, este fenómeno de adsorción tiene lugar en un rango finito de concentraciones; cuando la concentración alcanza un valor definido como concentración micelar crítica (CMC), ocurre la autoagregación o micelización. En la CMC, la superficie se encuentra casi totalmente cubierta por la monocapa del surfactante, y para minimizar el aumento de la energía libre del sistema, los anfifilos comienzan a agregarse en el seno de la solución, en estructuras autoensambladas denominadas micelas[131]. Este concepto también se puede aplicar a interfases líquido-líquido.

1.5.3. Agregados micelares

En la formación de las micelas, las propiedades químicas del surfactante son determinantes. Como se describió en la sección anterior, cuando se dispersan en agua, los surfactantes se autoagregan dando lugar a una fase en equilibrio que depende de las interacciones intra e intermoleculares, y responde también a consideraciones entrópicas[132]. Los surfactantes son también capaces de autoagregarse en solventes apolares, en cuyo caso la orientación de las moléculas del surfactante es inversa a la adoptada en soluciones acuosas. Esta reorientación permite optimizar los requerimientos de solvatación del surfactante y además minimiza la energía libre del sistema. Finalmente, cuando los surfactantes son incorporados en mezclas inmiscibles de agua y aceite, las moléculas del surfactante pueden localizarse en la interfase agua/aceite, lo cual resulta termodinámicamente muy favorable. Como resultado de esta mezcla es posible obtener un gran número de fases que pueden estar estructuradas a escala macro o microscópica; el esquema que se presenta en la figura 1.9 muestra algunas de las estructuras autoensambladas que los surfactantes pueden formar en presencia de agua, aceite o mezclas de los tres.

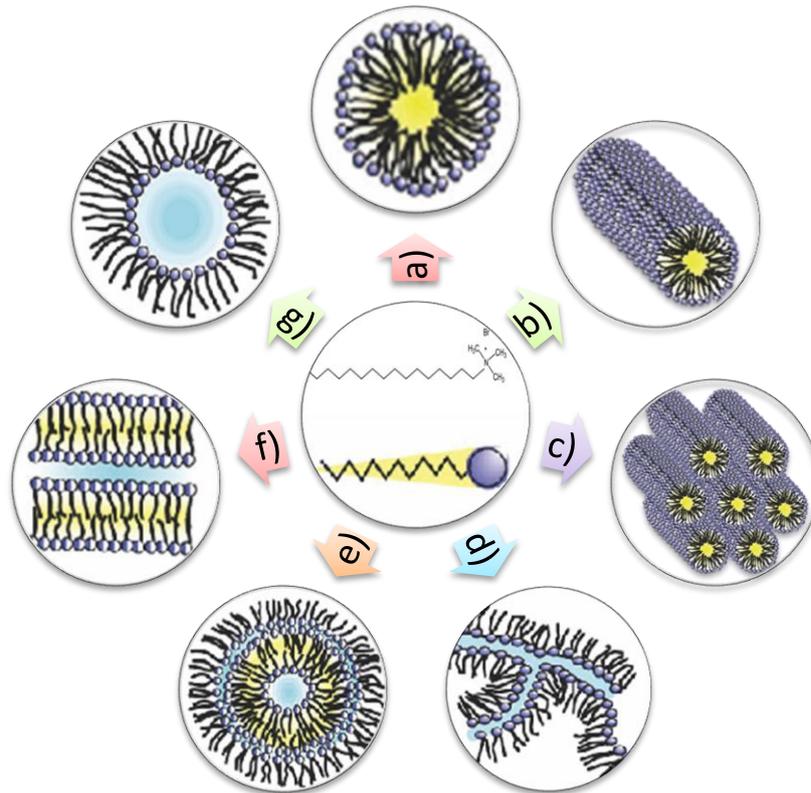


Figura 1.9: Representación esquemática de estructuras auto-ensambladas de surfactantes en una solución coloidal. Centro: surfactante de forma cónica ($C_{16}TAB$). **(a)** Micela normal. **(b)** Micela en forma de Rodillo. **(c)** Fase hexagonal. **(d)** Fase bicontinua. **(e)** Vesícula o liposoma. **(f)** Fase lamelar. **(g)** Micela inversa. Esquema adaptado de la publicación de Marie-Paule Pileni [133].

1.5.4. Microemulsiones

1.5.4.1. Generalidades

El concepto de microemulsión fue introducido en la década de 1940 por Hoar y Shulman quienes obtuvieron una solución monofásica transparente luego de titular una emulsión con hexanol[134]. Subsecuentemente, en 1959, Shulman *et al.* acuñaron el término “microemulsión”[135] que desde entonces ha sido definido y redefinido en muchas oportunidades. Para los propósitos de esta tesis, resulta conveniente emplear la definición provista por Danielsson y Lindman en 1981 que reza así “una microemulsión se define como un sistema de agua, aceite y anfifilo que es una solución líquida, monofásica, ópticamente isotrópica y termodinámicamente estable”[136].

En la práctica, las microemulsiones se diferencian de las emulsiones convencionales en que estas últimas, si bien poseen excelente estabilidad cinética, son termodinámicamente inestables y eventualmente sufren separación de fases; el aspecto es también distintivo, puesto que las emulsiones, al poseer tamaños de partícula mucho mayores, carecen de transparencia y se observan

turbias o lechosas. La siguiente tabla resume las características distintivas entre emulsiones y microemulsiones:

Tabla 1.1: Características de las microemulsiones[137][138].

Características	Emulsión	Microemulsión
Aspecto	Opaca	Transparente
Dispersión de la luz blanca	Si	Sólo en rango Tyndall
Tamaño de la gota	> 1 μm	< 0,1 μm
Formación	Homogenización	Espontánea
Estabilidad termodinámica	No	Si

La diferencia entre microemulsiones y macroemulsiones es evidente y no deja lugar a dudas. Sin embargo, el término micela inversa a menudo es utilizado como equivalente semántico para microemulsiones agua en aceite (W/O)[139]–[142]. Es conveniente en este punto hacer una aclaración, dado que presentan diferencias moleculares en términos de la geometría de las micelas en el primer caso y de las microgotas en el segundo. En primer lugar, los agregados micelares pueden formarse en una sola fase líquida, en tanto que las gotículas de una microemulsión requieren la existencia de una segunda fase líquida inmiscible[130]. De esto se desprende que los agregados micelares están simplemente formados por surfactantes autoensamblados, dispersos en el medio líquido[137], mientras que las gotículas en las microemulsiones presentan grandes núcleos líquidos rodeados por una capa de surfactantes que estabiliza la dispersión en un líquido inmiscible. El alto grado de hinchamiento presente en las gotículas de la microemulsión sólo puede ser obtenido con surfactantes adecuados y frecuentemente requieren de la presencia de co-surfactantes[143]. De acuerdo con lo explicado por Langevin[143], el término microemulsión se restringe a tamaños de gota suficientemente grandes como para que las propiedades físicas de la fase dispersa sean indistinguibles de aquellas correspondientes al líquido “a granel”; en tanto que si el interior de la gota es muy pequeño, ésta se denomina micela hinchada. Debido a que las micelas inversas pueden hincharse progresivamente por agregado de la fase dispersa, las propiedades de la fase confinada también evolucionan lentamente hacia aquellas propias del líquido a granel sin una transición bien definida. Puesto que en la literatura no se ofrece un consenso rígido para diferenciar estos sistemas, en este trabajo se adoptará por norma el hablar de microemulsiones cuando se describe al sistema en su totalidad y de micelas hinchadas cuando se hable de las microgotas en particular.

1.5.4.2. Micelas inversas hinchadas como nanoreactores

Para la síntesis de materiales nanoestructurados basados en TiO_2 cristalino, en los últimos años se han utilizado varias estrategias entre las que se pueden mencionar la precipitación química,

el método de sol-gel, la deposición química en fase vapor y la cristalización hidrotérmica[144]–[149]. Todos estos métodos comparten los inconvenientes de requerir agitación vigorosa, tiempos de maduración muy prolongados (que pueden extenderse hasta por meses) y dificultad para controlar la distribución y el tamaño de partículas. Recientemente, ha ganado injerencia la síntesis con microemulsiones, en particular aquella que emplea micelas inversas hinchadas (figura 1.9 g)), por presentarse como un método muy versátil y reproducible[150], [151]. Este método posee la ventaja de originar nanopartículas homogéneas y monodispersas para una gran variedad de metales, óxidos y calcogenuros[139]. Las reacciones ocurren en el núcleo acuoso de las microgotas que se encuentran dispersas en la fase oleosa y están estabilizadas por un surfactante. Las dimensiones de estos núcleos acuosos están en el orden de los nanómetros y por eso se los suele encontrar bajo la denominación de nanoreactores[139]. Además de homogeneizar la distribución de tamaño de las partículas, la otra ventaja de emplear esta metodología es que la morfología del producto puede controlarse voluntariamente ya que los surfactantes forman agregados de una gran variedad de estructuras que pueden ser usadas como moldes o plantillas dependiendo de la naturaleza química de los reactivos y de su localización dentro del diagrama de fases[152]. De esta manera, tamaño y morfología del producto pueden manipularse mediante una elección apropiada de la composición del sistema de microemulsiones[150]. Si bien se mencionó anteriormente que estos sistemas son termodinámicamente estables, las nanogotas son cinéticamente inestables y por ello permiten que ocurra un proceso de intercambio dinámico cuando estas gotas colisionan entre sí[153]. Estas propiedades tan singulares de las microemulsiones las convierten en reactores altamente efectivos para la síntesis de nanoestructuras inorgánicas con tamaño, forma, composición y arquitectura controlables. Las mayores desventajas asociadas con esta técnica radican en que hay un gran consumo de solventes orgánicos y el rendimiento de la síntesis de nano-polvos es muy bajo[154].

Una visión simplificada de la síntesis de partículas en micelas inversas considera que sus núcleos acuosos actúan como nanoreactores en los que se llevan a cabo las reacciones químicas y que el tamaño de los microcristales del producto está directamente determinado por el tamaño de estos núcleos[155]. Es posible controlar el tamaño de las micelas inversas mediante el ajuste del parámetro W , definido como la relación molar agua/surfactante: cuanto mayor sea este valor W , mayores serán los núcleos acuosos de las micelas y ergo, el de las partículas allí formadas; claramente, la misma relación se cumpliría en el orden inverso. Si bien esta correspondencia entre el tamaño de las nanopartículas sintetizadas y el parámetro W fue comprobada en varios experimentos, en los últimos tiempos ha sido cuestionada dado que un gran número de síntesis arroja partículas cuyos tamaños no pueden ser correlacionados con el de las micelas. Ante tal discrepancia, hoy en día se considera que el factor más importante que influencia la morfología y las

propiedades del producto final es la interacción dinámica entre las micelas y no su tamaño[156]. A propósito de esta cuestión, en el Capítulo 4 se presentará una discusión más profunda y validada con datos experimentales propios que responden a esta teoría.

En general, antes de proceder a la síntesis de nanopartículas en micelas inversas, deben identificarse aquellas formulaciones agua/surfactante/aceite que den origen a microemulsiones estables. En literatura puede encontrarse diagramas de fases para mezclas ternarias o cuaternarias (esto es, cuando un cosurfactante está presente en el sistema) que son útiles para este propósito[157], [158]. Sin embargo, el efecto de los reactivos y productos en la estabilidad de las microemulsiones debe ser tenido en cuenta ya que a veces limitan severamente la máxima concentración de reactivos que puede ser usada en reacciones de precipitación[139].

Existen varios surfactantes empleados en la formulación de microemulsiones para la síntesis de nanopartículas, tales como el surfactante aniónico de doble cadena 1,4-bis-(2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio (AOT), el surfactante no iónico Triton X-100 o el surfactante catiónico bromuro de hexadeciltrimetilamonio ($C_{16}TAB$), entre otros. Es de conocimiento popular que los surfactantes son capaces de generar estabilización estérica de las nanopartículas formadas en el interior de las micelas, así como también son capaces de modificar el microambiente de la reacción, ejerciendo así control sobre el crecimiento de las partículas[159]. La selección del surfactante apropiado para una determinada síntesis no puede ser tomada a la ligera y debe tenerse en cuenta, por ejemplo que éste sea químicamente inerte respecto de los demás componentes de la microemulsión o que los posibles contraiones de un surfactante iónico no afecten negativamente la reacción que se intenta llevar a cabo.

1.5.5. Estrategias de síntesis

Por lo mencionado en el apartado anterior, es posible afirmar que las microemulsiones proveen un ambiente de reacción flexible e ideal para la preparación de materiales nanoestructurados. Al usar microemulsiones como microreactores, el objetivo principal es llevar a cabo la reacción en el núcleo de la fase dispersa con el objetivo de imponer cierto control sobre el tamaño y forma de las partículas. Existen, por supuesto ciertas excepciones en las cuales la reacción se lleva a cabo en la fase continua, en cuyo caso las micelas son usadas como plantillas para obtener materiales con morfología específica[160]; este tipo de estrategia, si bien es muy interesante, responde a otras consideraciones y escapa a los objetivos de esta tesis, por lo que no será discutida aquí. Se describen, a continuación, los dos métodos empleados en la síntesis de materiales nanoestructurados en base a CeO_2 , TiO_2 , $Ce-TiO_2$ y CeO_2-TiO_2 utilizados en el desarrollo de la presente tesis.

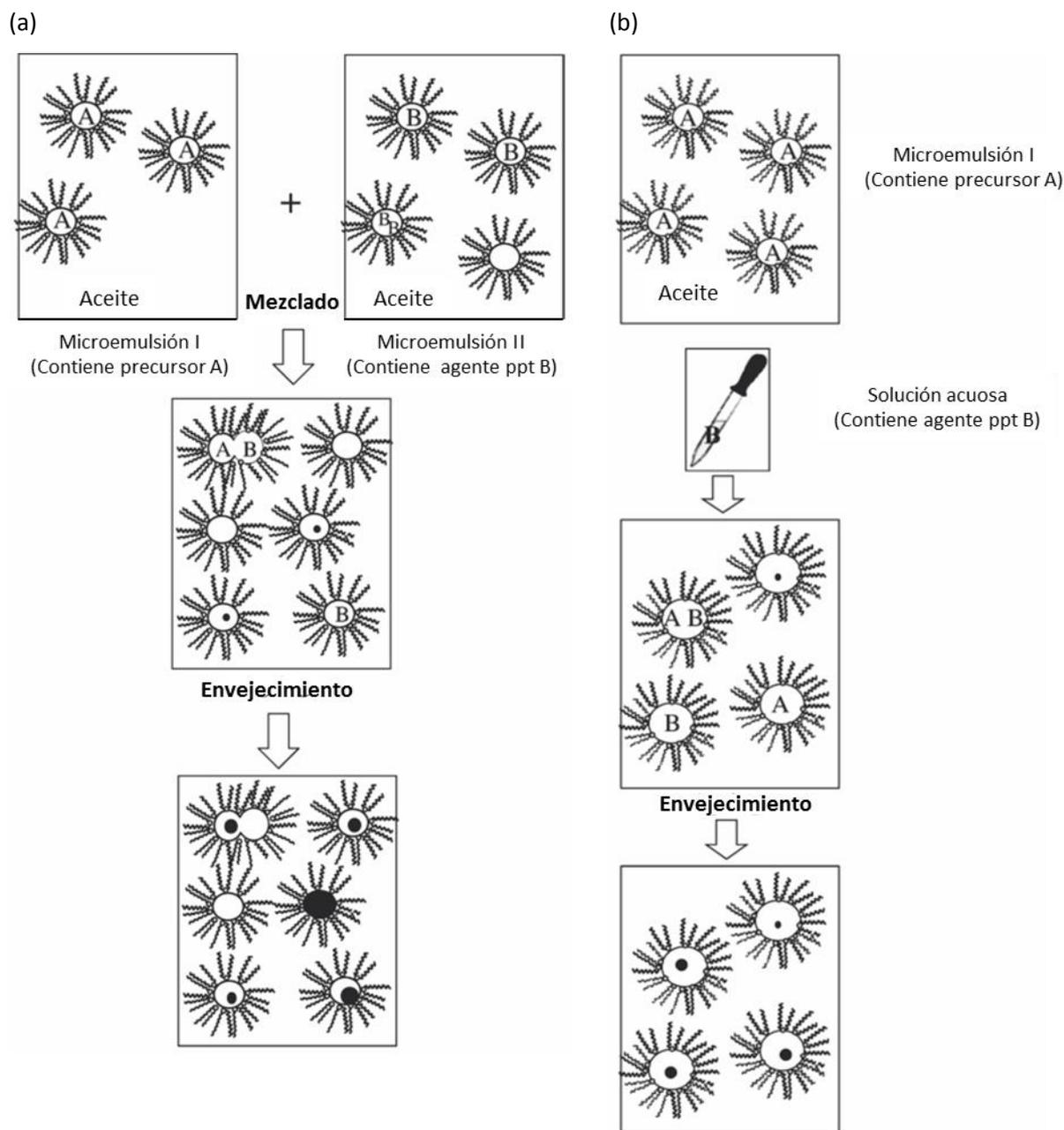


Figura 1.10: Ilustración esquemática de los métodos de la doble emulsión **(a)** y de la microemulsión simple **(b)** utilizados en la síntesis de nanopartículas. (Imagen modificada del artículo de Bumajdad et al.[159])

Para los fines de este trabajo doctoral, emplear con sistemas agua en aceite (w/o) es mucho más conveniente que usar sistemas aceite en agua (o/w) debido a la mínima o casi inexistente interacción electrostática entre gotas, y además, porque la mayoría de los precursores suelen ser solubles en agua. Teniendo en cuentas estas premisas, el primer método que se describirá aquí es ampliamente utilizado en la síntesis de nanopartículas de CeO_2 y se conoce como **método de la doble microemulsión**[159]; éste consiste en mezclar dos microemulsiones, una conteniendo el precursor (la entidad química que contiene el elemento de interés) y la otra conteniendo un agente

precipitante (que es un compuesto que reacciona con el precursor en la solución para formar un compuesto de muy baja solubilidad), como puede observarse en el esquema de la figura 1.10 a); en este método los dos reactantes A y B están solubilizados en los núcleos acuosos respectivos de cada microemulsión, luego de mezcladas, las gotas colisionan, coalescen para formar un dímero transitorio, intercambian su contenido acuoso y se disocian en dos nuevas gotas; este proceso ocurre de manera dinámica y continua.

La segunda estrategia, conocida como **método de la microemulsión simple**, consiste en agregar una fase acuosa conteniendo el agente precipitante a una microemulsión que ya contiene el precursor (figura 1.10 b)).

1.5.6. Proceso de intercambio entre micelas

El control de la cinética de la reacción es un paso crítico, especialmente cuando se trabaja con reactivos altamente hidrolizables (como es el caso del isopropóxido de titanio, como se discutirá más adelante, en el capítulo 3, sección 3.3.2); debido a esto, llevar a cabo las reacciones en el núcleo de la fase dispersa resulta ventajoso ya que la cinética es más lenta que si ocurriese en la fase continua, porque el paso determinante de la velocidad, en general, sería la difusión y fusión de las micelas y no la reacción en sí misma[153]. La difusión y fusión de las gotas es un proceso que depende de la rigidez de la película de surfactante[161], la cual está influenciada por muchos factores tales como la geometría de la molécula de surfactante, la penetración de la fase oleosa en la interfase y el uso de cosurfactantes, entre otros. La figura 1.11 describe dos mecanismos diferentes propuestos para el proceso de intercambio entre gotas de una microemulsión[159]. El primero es el denominado “mecanismo de canales de agua” en el que el intercambio ocurre a través de un canal temporal formado entre las dos gotas. El segundo es el “mecanismo de coalescencia de gotas” en el que el intercambio ocurre debido a la unión de dos gotas; a propósito de esto último, si la microemulsión está conformada por micelas inversas esféricas, cuando éstas se unen, al contrario de lo que ocurre con micelas directas, el tamaño de la gota aumenta linealmente con la cantidad de agua incorporada al sistema[133], pero su forma no cambia.

Si la velocidad de reacción para la formación de nanopartículas es un orden de magnitud más rápida que la del proceso de intercambio, entonces la cinética de la reacción estará gobernada por las propiedades del proceso de intercambio, tales como el mecanismo, el movimiento browniano de las gotas o la rigidez de la interfase. Por otro lado, cuando el proceso de intercambio es más rápido que la velocidad de reacción, la cinética estará gobernada por propiedades del ambiente local, tales como el pH, la polaridad, el contenido acuoso, el grado de ionización de los contraiones del surfactante, entre otros. Durante el proceso de precipitación, cuando las partículas producidas

alcancen un tamaño crítico, algunas moléculas de surfactante se adsorberán en la interfase sólido-líquido, generando un recubrimiento pelicular sobre la superficie de cada partícula que previene su aglomeración.

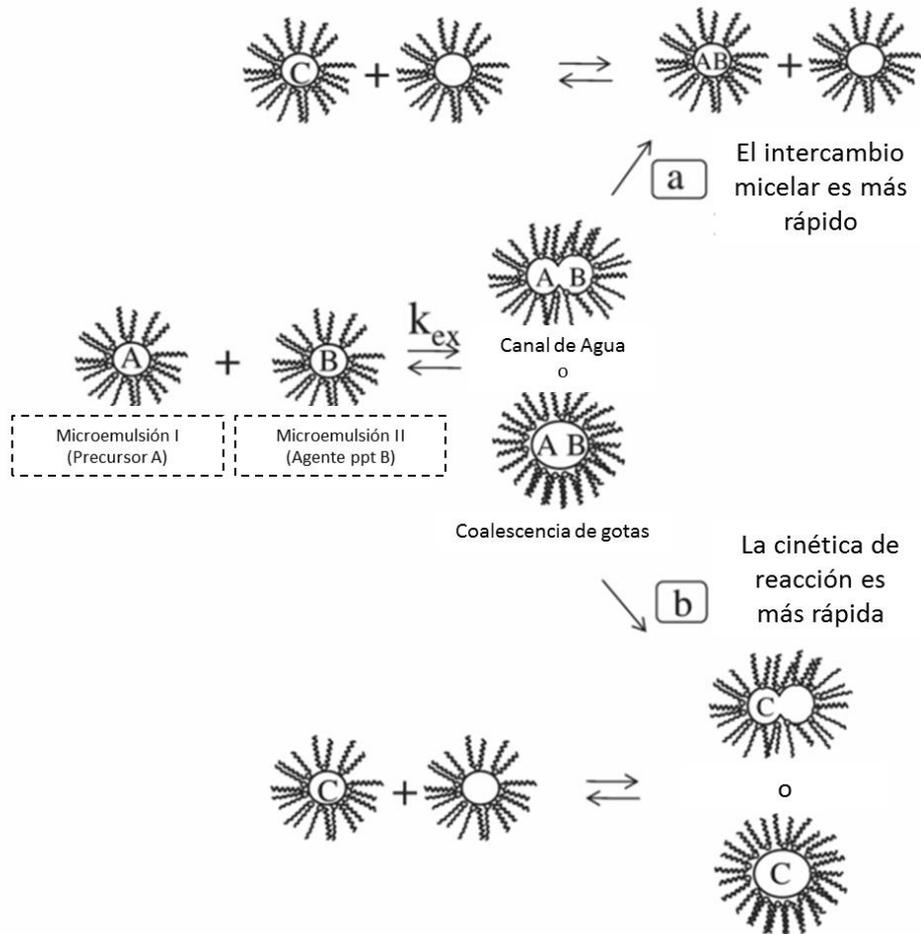


Figura 1.11: Esquema de los procesos de intercambio de gotas en microemulsiones. Se observan los mecanismos propuestos (canales de agua y coalescencia de gotas) y las dos condiciones limitantes: **(a)** el proceso de intercambio es más rápido que la velocidad de reacción y **(b)** la velocidad de reacción es más rápida que el proceso de intercambio. (Imagen modificada del artículo de Bumajdad et al.[159])

1.6. Consideraciones finales

Los siguientes capítulos estudiarán una serie de parámetros que son condicionantes para el éxito de los implantes óseos y dentales. En el capítulo 3 se detallará el proceso de síntesis de los materiales basados en TiO_2 , y en el capítulo 4 se resumirá el estudio de sus propiedades fisicoquímicas, cuyo conocimiento es necesario para entender los fenómenos químicos y biológicos que se abordarán en los capítulos siguientes. El capítulo 5 se concentrará en la interacción de los materiales con especies de interés biológico, para inferir si éstos podrían tener capacidad de osteoinducción y osteoconducción. El capítulo 6 avanzará hacia el estudio *in vitro* la capacidad para

degradar especies reactivas de oxígeno. Luego, en el capítulo 7, se presentará un ensayo exploratorio sobre biocompatibilidad, realizado a través de la evaluación de la morfología y supervivencia de dos modelos celulares en presencia de los materiales de interés. Por último, en capítulo 8, se verificará si la presencia de los materiales de interés es capaz de aumentar la supervivencia de un modelo celular frente al estrés oxidativo inducido por la presencia de ROS.

1.7. Bibliografía

- [1] T. A. Einhorn, R. J. O’Keefe, and J. A. Buckwalter, “Orthopaedic basic science,” *Found. Clin. Pract. Am. Acad. Orthop. Surg.*, 2007.
- [2] J. R. Lieberman, *AAOS comprehensive orthopaedic review*. American academy of orthopaedic surgeons, 2009.
- [3] L. G. Raisz and B. E. Kream, “Regulation of bone formation,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 309, no. 2, pp. 83–89, 1983.
- [4] H. Rosen, C. J. Rosen, and J. E. Mulder, “Bone physiology and biochemical markers of bone turnover,” *Up To Date*, 2004.
- [5] B. Clarke, “Normal bone anatomy and physiology,” *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 3 Suppl 3, pp. 131–139, 2008.
- [6] D. T. Reilly and A. H. Burstein, “The elastic and ultimate properties of compact bone tissue,” *J. Biomech.*, vol. 8, no. 6, pp. 393–405, 1975.
- [7] S. Weiner and H. D. Wagner, “The material bone: structure-mechanical function relations,” *Annu. Rev. Mater. Sci.*, vol. 28, no. 1, pp. 271–298, 1998.
- [8] I. Singh, “The architecture of cancellous bone,” *J. Anat.*, vol. 127, no. Pt 2, pp. 305–310, 1978.
- [9] E. N. Marieb and K. Hoehn, *Human anatomy & physiology*. Pearson Education, 2007.
- [10] R. O. Ritchie, “The conflicts between strength and toughness,” *Nat. Mater.*, vol. 10, no. 11, pp. 817–822, 2011.
- [11] P. G. Bullough, *Atlas of orthopedic pathology: with clinical and radiologic correlations*. Gower Med. Publ., 1992.
- [12] C. Rey, “Calcium phosphate biomaterials and bone mineral. Differences in composition, structures and properties,” *Biomaterials*, vol. 11, pp. 13–15, 1990.
- [13] C. Burger, H. Zhou, H. Wang, I. Sics, B. S. Hsiao, B. Chu, L. Graham, and M. J. Glimcher, “Lateral packing of mineral crystals in bone collagen fibrils,” *Biophys. J.*, vol. 95, no. 4, pp. 1985–1992, 2008.
- [14] J. Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, and P. Zioupos, “Mechanical properties and the hierarchical structure of bone,” *Med. Eng. Phys.*, vol. 20, no. 2, pp. 92–102, 1998.
- [15] J. R. Porter, T. T. Ruckh, and K. C. Popat, “Bone tissue engineering: a review in bone

- biomimetics and drug delivery strategies," *Biotechnol. Prog.*, vol. 25, no. 6, pp. 1539–1560, 2009.
- [16] I. A. Silver, R. J. Murrills, and D. J. Etherington, "Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts," *Exp. Cell Res.*, vol. 175, no. 2, pp. 266–276, 1988.
- [17] J. Delaissé, T. L. Andersen, M. T. Engsig, K. Henriksen, T. Troen, and L. Blavier, "Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities," *Microsc. Res. Tech.*, vol. 61, no. 6, pp. 504–513, 2003.
- [18] M. Capulli, R. Paone, and N. Rucci, "Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 561, pp. 3–12, 2014.
- [19] S. C. Marks and S. N. Popoff, "Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton," *Am. J. Anat.*, vol. 183, no. 1, pp. 1–44, 1988.
- [20] P. D. Damoulis and P. V Hauschka, "Nitric oxide acts in conjunction with proinflammatory cytokines to promote cell death in osteoblasts," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 12, no. 3, pp. 412–422, 1997.
- [21] T. A. Franz-Odenaal, B. K. Hall, and P. E. Witten, "Buried alive: how osteoblasts become osteocytes," *Dev. Dyn.*, vol. 235, no. 1, pp. 176–190, 2006.
- [22] R. Florencio-Silva, G. R. D. S. Sasso, E. Sasso-Cerri, M. J. Simões, and P. S. Cerri, "Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells," *Biomed Res. Int.*, pp. 1–17, 2015.
- [23] E. M. Aarden, E. H. Burger, and P. J. Nijweide, "Function of osteocytes in bone.," *J. Cell. Biochem.*, vol. 55, no. 3, pp. 287–299, 1994.
- [24] T. L. Andersen, T. E. Sondergaard, K. E. Skorzynska, F. Dagnaes-Hansen, T. L. Plesner, E. M. Hauge, T. Plesner, and J.-M. Delaisse, "A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone," *Am. J. Pathol.*, vol. 174, no. 1, pp. 239–247, 2009.
- [25] S. C. Miller, L. de Saint-Georges, B. M. Bowman, and W. S. Jee, "Bone lining cells: structure and function.," *Scanning Microsc.*, vol. 3, no. 3, pp. 951–953, 1989.
- [26] A. M. Parfitt, "Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression," *Bone*, vol. 30, no. 1, pp. 5–7, 2002.
- [27] G. D. Roodman, "Cell biology of the osteoclast," *Exp. Hematol.*, vol. 27, no. 8, pp. 1229–1241, 1999.
- [28] T. H. Smit and E. H. Burger, "Is BMU-coupling a strain-regulated phenomenon? A finite element analysis.," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 15, no. 2, pp. 301–307, 2000.
- [29] T. H. Smit, E. H. Burger, and J. M. Huyghe, "A case for strain-induced fluid flow as a regulator of BMU-coupling and osteonal alignment.," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 17, no. 11, pp. 2021–

- 2029, 2002.
- [30] T. J. Martin and N. A. Sims, "Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption.," *Trends Mol. Med.*, vol. 11, no. 2, pp. 76–81, 2005.
- [31] Y. Yoshiko, G. A. Candelieri, N. Maeda, and J. E. Aubin, "Osteoblast autonomous Pi regulation via Pit1 plays a role in bone mineralization," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 27, no. 12, pp. 4465–4474, 2007.
- [32] H. C. Anderson, "Matrix vesicles and calcification," *Curr. Rheumatol. Rep.*, vol. 5, no. 3, pp. 222–226, 2003.
- [33] G. Boivin and P. J. Meunier, "The degree of mineralization of bone tissue measured by computerized quantitative contact microradiography," *Calcif. Tissue Int.*, vol. 70, no. 6, pp. 503–511, 2002.
- [34] J.-H. Lee, V. Frias, K.-W. Lee, and R. F. Wright, "Effect of implant size and shape on implant success rates: a literature review," *J. Prosthet. Dent.*, vol. 94, no. 4, pp. 377–381, 2005.
- [35] J. Y. K. Kan, K. Rungcharassaeng, J. Kim, J. L. Lozada, and C. J. Goodacre, "Factors affecting the survival of implants placed in grafted maxillary sinuses: a clinical report," *J. Prosthet. Dent.*, vol. 87, no. 5, pp. 485–489, 2002.
- [36] J. E. Davies, "Understanding Peri-Implant Endosseous Healing," *J. Dent. Educ.*, vol. 67, no. 8, pp. 932–949, 2003.
- [37] R. Osman and M. Swain, "A Critical Review of Dental Implant Materials with an Emphasis on Titanium versus Zirconia," *Materials (Basel)*, vol. 8, no. 3, pp. 932–958, 2015.
- [38] B. Mckibbin, "The biology of fracture healing in long bones," in *J Bone Joint Surg Br*, 1978.
- [39] D. A. Puleo and A. Nanci, "Understanding and controlling the bone–implant interface," *Biomaterials*, vol. 20, no. 23, pp. 2311–2321, 1999.
- [40] J. D. Stroncek and W. M. Reichert, "Overview of wound healing in different tissue types," in *Indwelling neural implants: strategies for contending with the in vivo environment*, CRC Pres., W. Reichert, Ed. Boca Raton (FL): CRC Press Boca Raton, FL, USA, 2008.
- [41] A. T. Harder and Y. H. An, "The Mechanisms of the Inhibitory Effects of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs on Bone Healing: A Concise Review," *J. Clin. Pharmacol.*, vol. 43, no. 8, pp. 807–815, 2003.
- [42] A. G. Gristina, "Implant failure and the immuno-incompetent fibro-inflammatory zone.," *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 298, pp. 106–118, 1994.
- [43] L. F. Echeverri, M. A. Herrero, J. M. Lopez, and G. Oleaga, "Early Stages of Bone Fracture Healing: Formation of a Fibrin-Collagen Scaffold in the Fracture Hematoma," *Bull. Math. Biol.*, vol. 77, no. 1, pp. 156–183, 2014.
- [44] W. J. Sharrard, M. L. Sutcliffe, M. J. Robson, and A. G. Maceachern, "The treatment of fibrous

- non-union of fractures by pulsing electromagnetic stimulation," *J. Bone Jt. Surgery, Br. Vol.*, vol. 64, no. 2, pp. 189–193, 1982.
- [45] I. H. Kalfas, "Principles of bone healing," *Neurosurg. Focus*, vol. 10, no. 4, p. E1, 2001.
- [46] L. Pacher, J. S. Beckman, and L. Liaudet, "Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease," *Physiol Rev*, vol. 87, pp. 315–424, 2007.
- [47] T. Finkel and N. J. Holbrook, "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing," *Nature*, vol. 408, no. 6809, pp. 239–247, 2000.
- [48] T. S. Koskenkorva-Frank, G. Weiss, W. H. Koppenol, and S. Burckhardt, "The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress.," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 65, pp. 1174–94, 2013.
- [49] O. Yossepowitch, I. Pinchuk, U. Gur, A. Neumann, D. Lichtenberg, and J. Baniel, "Advanced but not localized prostate cancer is associated with increased oxidative stress," *J. Urol.*, vol. 178, no. 4, pp. 1238–1244, 2007.
- [50] H. Ha, H. B. Kwak, S. W. Lee, H. M. Jin, H.-H. H.-M. Kim, H.-H. H.-M. Kim, and Z. H. Lee, "Reactive oxygen species mediate RANK signaling in osteoclasts," *Exp. Cell Res.*, vol. 301, no. 2, pp. 119–127, 2004.
- [51] M. Almeida, L. Han, M. Martin-Millan, L. I. Plotkin, S. A. Stewart, P. K. Roberson, S. Kousteni, C. A. O'Brien, T. Bellido, and A. M. Parfitt, "Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 37, pp. 27285–27297, 2007.
- [52] S. Ozgocmen, H. Kaya, E. Fadillioglu, R. Aydogan, and Z. Yilmaz, "Role of antioxidant systems, lipid peroxidation, and nitric oxide in postmenopausal osteoporosis," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 295, no. 1–2, pp. 45–52, 2007.
- [53] S. Ozgocmen, H. Kaya, E. Fadillioglu, and Z. Yilmaz, "Effects of calcitonin, risedronate, and raloxifene on erythrocyte antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation, and nitric oxide in postmenopausal osteoporosis," *Arch. Med. Res.*, vol. 38, no. 2, pp. 196–205, 2007.
- [54] T. Magwere, S. S. Myatt, and S. A. Burchill, "Manipulation of oxidative stress to induce cell death in Ewing's sarcoma family of tumours," *Eur. J. Cancer*, vol. 44, no. 15, pp. 2276–2287, 2008.
- [55] Y. Hamada, S. Kitazawa, R. Kitazawa, H. Fujii, M. Kasuga, and M. Fukagawa, "Histomorphometric analysis of diabetic osteopenia in streptozotocin-induced diabetic mice: a possible role of oxidative stress," *Bone*, vol. 40, no. 5, pp. 1408–1414, 2007.
- [56] Y. Kabuyama, T. Kitamura, J. Yamaki, M. K. Homma, S. Kikuchi, and Y. Homma, "Involvement of thioredoxin reductase 1 in the regulation of redox balance and viability of rheumatoid

- synovial cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 367, no. 2, pp. 491–496, 2008.
- [57] J. Fay, D. Varoga, C. J. Wruck, B. Kurz, M. B. Goldring, and T. Pufe, "Reactive oxygen species induce expression of vascular endothelial growth factor in chondrocytes and human articular cartilage explants," *Arthritis Res Ther*, vol. 8, no. 6, p. R189, 2006.
- [58] H. Cai, "Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences," *Cardiovasc. Res.*, vol. 68, no. 1, pp. 26–36, 2005.
- [59] N. Bryan, H. Ahswini, N. Smart, Y. Bayon, S. Wohlert, and J. A. Hunt, "Reactive oxygen species (ROS) - A family of fate deciding molecules pivotal in constructive inflammation and wound healing," *Eur. Cells Mater.*, vol. 24, pp. 249–265, 2012.
- [60] B. Kadenbach, R. Ramzan, and S. Vogt, "Degenerative diseases, oxidative stress and cytochrome c oxidase function," *Trends Mol. Med.*, vol. 15, no. 4, pp. 139–147, 2009.
- [61] S. J. Leibovich and R. Ross, "The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum.," *Am. J. Pathol.*, vol. 78, no. 1, p. 71, 1975.
- [62] R. Ross and E. P. Benditt, "Wound healing and collagen formation I. Sequential changes in components of guinea pig skin wounds observed in the electron microscope," *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, vol. 11, no. 3, pp. 677–700, 1961.
- [63] T. Kurahashi and J. Fujii, "Roles of Antioxidative Enzymes in Wound Healing," *J. Dev. Biol.*, vol. 3, pp. 57–70, 2015.
- [64] M. Schäfer and S. Werner, "Oxidative stress in normal and impaired wound repair," *Pharmacol. Res.*, vol. 58, no. 2, pp. 165–171, 2008.
- [65] R. Tsaryk, M. Kalbacova, U. Hempel, D. Scharnweber, R. E. Unger, P. Dieter, C. J. Kirkpatrick, and K. Peters, "Response of human endothelial cells to oxidative stress on Ti6Al4V alloy," *Biomaterials*, vol. 28, no. 5, pp. 806–813, 2007.
- [66] M. Hukkanen, S. A. Corbett, J. Batten, Y. T. Konttinen, I. D. McCarthy, J. Maclouf, S. Santavirta, S. P. Hughes, and J. M. Polak, "Aseptic loosening of total hip replacement. Macrophage expression of inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2, together with peroxynitrite formation, as a possible mechanism for early prosthesis failure.," *J. Bone Joint Surg. Br.*, vol. 79, no. 3, pp. 467–474, 1997.
- [67] R. Hardy and M. S. Cooper, "Bone loss in inflammatory disorders," *J. Endocrinol.*, vol. 201, no. 3, pp. 309–320, 2009.
- [68] A.-L. Liu, Z.-M. Zhang, B.-F. Zhu, Z.-H. Liao, and Z. Liu, "Metallothionein protects bone marrow stromal cells against hydrogen peroxide-induced inhibition of osteoblastic differentiation," *Cell Biol. Int.*, vol. 28, no. 12, pp. 905–911, 2004.
- [69] T. W. Bauer and G. F. Muschler, "Bone Graft Materials: An Overview of the Basic Science.," *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 371, pp. 10–27, 2000.

- [70] J. Black, "The education of the biomaterialist: Report of a survey, 1980–81," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 16, no. 2, pp. 159–167, 1982.
- [71] D. J. Prolo, "Biology of bone fusion.," *Clin. Neurosurg.*, vol. 36, p. 135, 1990.
- [72] G. F. Muschler, J. M. Lane, and E. G. Dawson, "The biology of spinal fusion," in *Spinal Fusion*, Springer, 1990, pp. 9–21.
- [73] H. H. De Boer, "The History of Bone Grafts.," *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 226, pp. 292–298, 1988.
- [74] G. K. Smith, "Orthopaedic biomaterials," 1985.
- [75] L. Gaviria, J. P. Salcido, T. Guda, and J. L. Ong, "Current trends in dental implants," *J. Korean Assoc. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 40, no. 2, pp. 50–60, 2014.
- [76] L. Le Guehenec, A. Soueidan, P. Layrolle, and Y. Amouriq, "Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration.," *Dent. Mater.*, vol. 23, no. 7, pp. 844–854, 2007.
- [77] H. J. Wenz, J. Bartsch, S. Wolfart, and M. Kern, "Osseointegration and clinical success of zirconia dental implants: a systematic review.," *Int. J. Prosthodont.*, vol. 21, no. 1, pp. 27–36, 2008.
- [78] L. Itaya, "Implantology in General Dental Practice." Am Dental Educ Assoc, 2007.
- [79] T. Albrektsson and C. Johansson, "Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration," *Eur. Spine J.*, vol. 10, no. 2, pp. S96–S101, 2001.
- [80] T. Albrektsson and G. A. Zarb, "Current interpretations of the osseointegrated response: clinical significance.," *Int. J. Prosthodont.*, vol. 6, no. 2, pp. 95–105, 1993.
- [81] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. Lemons, "*Biomaterials science: an introduction to materials in medicine.*" Academic press, 2004.
- [82] J. Echeverría and J. Blanco, "Manual SEPA de Periodoncia y Terapéutica de Implantes: Fundamentos y guía práctica," *Madrid Médica Panam.*, pp. 286–287, 2005.
- [83] L. Actis, L. Gaviria, T. Guda, and J. L. Ong, "Antimicrobial surfaces for craniofacial implants: state of the art," *J. Korean Assoc. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 39, no. 2, pp. 43–54, 2013.
- [84] R. C. Petersen, "Titanium Implant Osseointegration Problems with Alternate Solutions Using Epoxy/Carbon-Fiber-Reinforced Composite," *Metals (Basel).*, vol. 4, no. 4, pp. 549–569, 2014.
- [85] N. J. Hickok and I. M. Shapiro, "Immobilized antibiotics to prevent orthopaedic implant infections," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, no. 12, pp. 1165–1176, 2012.
- [86] D. C. Smith, "Surface Characterization of Implant Materials: Biological Implications," in *Bone-Bio Material Interface*, University of Toronto Press, 1991, pp. 3–18.
- [87] H. Zitter and H. Plenk, "The electrochemical behavior of metallic implant materials as an indicator of their biocompatibility," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 21, no. 7, pp. 881–896, 1987.
- [88] R. J. Solar, S. R. Pollack, and E. Korostoff, "In vitro corrosion testing of titanium surgical

- implant alloys: an approach to understanding titanium release from implants,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 13, no. 2, pp. 217–250, 1979.
- [89] T. J. Webster and E. S. Ahn, “Nanostructured biomaterials for tissue engineering bone,” *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, vol. 103, no. June, pp. 275–308, 2006.
- [90] X. Li, L. Wang, Y. Fan, Q. Feng, F.-Z. Cui, and F. Watari, “Nanostructured scaffolds for bone tissue engineering,” *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 101A, no. 8, pp. 2424–2435, 2013.
- [91] J. Park, S. Bauer, K. A. Schlegel, F. W. Neukam, K. von der Mark, and P. Schmuki, “TiO₂ nanotube surfaces: 15 nm—an optimal length scale of surface topography for cell adhesion and differentiation,” *Small*, vol. 5, no. 6, pp. 666–671, 2009.
- [92] K. S. Brammer, S. Oh, C. J. Cobb, L. M. Bjursten, H. van der Heyde, and S. Jin, “Improved bone-forming functionality on diameter-controlled TiO₂ nanotube surface,” *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 8, pp. 3215–3223, 2009.
- [93] K. C. Popat, L. Leoni, C. A. Grimes, and T. A. Desai, “Influence of engineered titania nanotubular surfaces on bone cells,” *Biomaterials*, vol. 28, no. 21, pp. 3188–3197, 2007.
- [94] H. J. Haugen, M. Monjo, M. Rubert, A. Verket, S. P. Lyngstadaas, J. E. Ellingsen, H. J. Rønold, and J. C. Wohlfahrt, “Porous ceramic titanium dioxide scaffolds promote bone formation in rabbit peri-implant cortical defect model,” *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 2, pp. 5390–5399, 2013.
- [95] H. Tiainen, D. Wiedmer, and H. J. Haugen, “Processing of highly porous TiO₂ bone scaffolds with improved compressive strength,” *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 33, no. 1, pp. 15–24, 2013.
- [96] H. Tiainen, J. C. Wohlfahrt, A. Verket, S. P. Lyngstadaas, and H. J. Haugen, “Bone formation in TiO₂ bone scaffolds in extraction sockets of minipigs,” *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 6, pp. 2384–91, 2012.
- [97] D. V. Portan, A. a Kroustalli, D. D. Deligianni, and G. C. Papanicolaou, “On the biocompatibility between TiO₂ nanotubes layer and human osteoblasts,” *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 100, no. 10, pp. 2546–2553, 2012.
- [98] H. J. Rønold and J. E. Ellingsen, “Effect of micro-roughness produced by TiO₂ blasting-tensile testing of bone attachment by using coin-shaped implants,” *Biomaterials*, vol. 23, no. 21, pp. 4211–4219, 2002.
- [99] Z. Hu, S. Haneklaus, G. Sparovek, and E. Schnug, “Rare earth elements in soils,” *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, vol. 37, no. 9–10, pp. 1381–1420, 2006.
- [100] E. Aneggi, M. Boaro, C. De Leitenburg, G. Dolcetti, A. Trovarelli, C. de Leitenburg, G. Dolcetti, and A. Trovarelli, “Insights into the redox properties of ceria-based oxides and their implications in catalysis,” *J. Alloys Compd.*, vol. 408, pp. 1096–1102, 2006.
- [101] U. R. Pillai and S. Deevi, “Highly active gold-ceria catalyst for the room temperature oxidation of carbon monoxide,” *Appl. Catal. A Gen.*, vol. 299, pp. 266–273, 2006.

- [102] T. Matsui, M. Inaba, A. Mineshige, and Z. Ogumi, "Electrochemical properties of ceria-based oxides for use in intermediate-temperature SOFCs," *Solid State Ionics*, vol. 176, no. 7, pp. 647–654, 2005.
- [103] E. P. Murray, T. Tsai, and S. A. Barnett, "A direct-methane fuel cell with a ceria-based anode," *Nature*, vol. 400, no. 6745, pp. 649–651, 1999.
- [104] J. Zhang, W. Peng, Z. Chen, H. Chen, and L. Han, "Effect of cerium doping in the TiO₂ photoanode on the electron transport of dye-sensitized solar cells," *J. Phys. Chem. C*, vol. 116, no. 36, pp. 19182–19190, 2012.
- [105] Y.-Y. Tsai, J. Oca-Cossio, K. Agering, N. E. Simpson, M. A. Atkinson, C. H. Wasserfall, I. Constantinidis, and W. Sigmund, "Novel synthesis of cerium oxide nanoparticles for free radical scavenging," *Nanomedicine*, vol. 2, no. 3, pp. 325–332, Jun. 2007.
- [106] E. G. Heckert, A. S. Karakoti, S. Seal, and W. T. Self, "The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanoceria.," *Biomaterials*, vol. 29, no. 18, pp. 2705–9, 2008.
- [107] T. Pirmohamed, J. M. Dowding, S. Singh, B. Wasserman, E. Heckert, A. S. Karakoti, J. E. S. King, S. Seal, and W. T. Self, "Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity.," *Chem. Commun. (Camb)*, vol. 46, no. 16, pp. 2736–2738, 2010.
- [108] A. S. Karakoti, N. A. Monteiro-Riviere, R. Aggarwal, J. P. Davis, R. J. Narayan, W. T. Self, J. McGinnis, and S. Seal, "Nanoceria as antioxidant: synthesis and biomedical applications," *Jom*, vol. 60, no. 3, pp. 33–37, 2008.
- [109] J. Niu, K. Wang, and P. E. Kolattukudy, "Cerium oxide nanoparticles inhibits oxidative stress and nuclear factor- κ B activation in H9c2 cardiomyocytes exposed to cigarette smoke extract," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 338, no. 1, pp. 53–61, 2011.
- [110] J. Colon, L. Herrera, J. Smith, S. Patil, C. Komanski, P. Kupelian, S. Seal, D. W. Jenkins, and C. H. Baker, "Protection from radiation-induced pneumonitis using cerium oxide nanoparticles," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 5, no. 2, pp. 225–231, Jun. 2009.
- [111] A. Trovarelli, *Catalysis by ceria and related materials*, vol. 2. World Scientific, 2002.
- [112] S. Tsunekawa, R. Sahara, Y. Kawazoe, and K. Ishikawa, "Lattice relaxation of monosize CeO₂-x nanocrystalline particles," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 152, no. 1, pp. 53–56, 1999.
- [113] K. Reed, A. Cormack, A. Kulkarni, M. Mayton, D. Sayle, F. Klaessig, and B. Stadler, "Exploring the properties and applications of nanoceria: is there still plenty of room at the bottom?," *Environ. Sci. Nano*, vol. 1, no. 5, pp. 390–405, 2014.
- [114] F. Esch, S. Fabris, L. Zhou, T. Montini, C. Africh, P. Fornasiero, G. Comelli, and R. Rosei, "Electron localization determines defect formation on ceria substrates," *Science (80-.)*, vol. 309, no. 5735, pp. 752–755, 2005.
- [115] C. Korsvik, S. Patil, S. Seal, and W. T. Self, "Superoxide dismutase mimetic properties exhibited

- by vacancy engineered ceria nanoparticles,” *Chem. Commun.*, no. 10, pp. 1056–1058, Mar. 2007.
- [116] R. Qing, W. Sigmund, and R. Qing and Wolfgang Sigmund, “Redox Behavior of Ceria Nanoparticles,” *Recent Patents Mater. Sci.*, vol. 7, no. 1, pp. 37–49, Feb. 2014.
- [117] A. S. Karakoti, O. Tsigkou, S. Yue, P. D. Lee, M. M. Stevens, J. R. Jones, and S. Seal, “Rare earth oxides as nanoadditives in 3-D nanocomposite scaffolds for bone regeneration,” *J. Mater. Chem.*, vol. 20, no. 40, pp. 8912–8919, 2010.
- [118] A. Asati, S. Santra, C. Kaittanis, S. Nath, and J. M. Perez, “Oxidase-Like Activity of Polymer-Coated Cerium Oxide Nanoparticles,” *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 48, no. 13, pp. 2308–2312, 2009.
- [119] F. Wauquier, L. Leotoing, V. Coxam, J. Guicheux, and Y. Wittrant, “Oxidative stress in bone remodelling and disease,” *Trends Mol. Med.*, vol. 15, no. 10, pp. 468–477, 2009.
- [120] C. Mandoli, F. Pagliari, S. Pagliari, G. Forte, P. Di Nardo, S. Licoccia, and E. Traversa, “Stem cell aligned growth induced by CeO₂ nanoparticles in PLGA scaffolds with improved bioactivity for regenerative medicine,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 20, no. 10, pp. 1617–1624, May 2010.
- [121] S. P. Fricker, “The therapeutic application of lanthanides,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 35, no. 6, pp. 524–533, 2006.
- [122] M. P. Garcia, “Development and Characterization of Lanthanides Doped Hydroxyapatite Composites for Bone Tissue Application,” *Curr. Trends Glas. Ceram. Mater.*, no. January, pp. 87–115, 2013.
- [123] I. Akin and G. Goller, “Effect of CeO₂ addition on crystallization behavior, bioactivity and biocompatibility of potassium mica and fluorapatite based glass ceramics,” *J. Ceram. Soc. Japan*, vol. 117, no. 1367, pp. 787–792, 2009.
- [124] M. Zhu, J. Zhang, S. Zhao, and Y. Zhu, “Three-dimensional printing of cerium-incorporated mesoporous calcium-silicate scaffolds for bone repair,” *J. Mater. Sci.*, vol. 51, no. 2, pp. 836–844, 2015.
- [125] A. Jákli and A. Saupe, *One-and Two-Dimensional Fluids: Properties of smectic, lamellar and columnar liquid crystals*. CRC Press, 2006.
- [126] D. C. Cullum, “Surfactant types; classification, identification, separation,” in *Introduction to Surfactant Analysis*, Springer, 1994, pp. 17–41.
- [127] S. Burauer, T. Sachert, T. Sottmann, and R. Strey, “On microemulsion phase behavior and the monomeric solubility of surfactant,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 1, no. 18, pp. 4299–4306, 1999.
- [128] W. H. Kirkpatrick, “Surface active substances.” Google Patents, 23-Aug-1960.
- [129] C. Tanford, “The hydrophobic effect and the organization of living matter,” *Science (80-.)*,

- vol. 200, no. 4345, pp. 1012–1018, 1978.
- [130] D. J. Mitchell and B. W. Ninham, “Micelles, vesicles and microemulsions,” *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2*, vol. 77, no. 4, p. 601, 1981.
- [131] J. H. Clint, “Micelle formation,” in *Surfactant Aggregation*, Springer, 1992, pp. 82–129.
- [132] P. W. Atkins and J. De Paula, *Química física*. Médica Panamericana, 2008.
- [133] M.-P. Pileni, “The role of soft colloidal templates in controlling the size and shape of inorganic nanocrystals,” *Nat. Mater.*, vol. 2, no. 3, pp. 145–150, 2003.
- [134] T. P. Hoar and J. H. Schulman, “Transparent water-in-oil dispersions: The oleopathic hydro-micelle,” *Nature*, vol. 152, no. 3847, pp. 102–103, 1943.
- [135] J. H. Schulman, W. Stoeckenius, and L. M. Prince, “Mechanism of formation and structure of micro emulsions by electron microscopy,” *J. Phys. Chem.*, vol. 63, no. 10, pp. 1677–1680, 1959.
- [136] I. Danielsson and B. Lindman, “The definition of microemulsion,” *Colloids and Surfaces*, vol. 3, no. 4, pp. 391–392, 1981.
- [137] L. M. Prince, “Microemulsions versus micelles,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 52, no. 1, pp. 182–188, 1975.
- [138] J. Sjiiblom, R. Lindbergh, and S. E. Fribergc, “Microemulsions - phase equilibria characterization , structures , applications and chemical reactions,” vol. 95, pp. 125–287, 1996.
- [139] L. Qi, “Synthesis of inorganic nanostructures in reverse micelles,” *Encycl. Surf. Colloid Sci.*, vol. 2, pp. 6183–6207, 2006.
- [140] V. Uskoković and M. Drogenik, “Synthesis of Materials Within Reverse Micelles,” *Surf. Rev. Lett.*, vol. 12, no. 02, pp. 239–277, 2005.
- [141] S. Sathyamurthy, K. J. Leonard, R. T. Dabestani, and M. P. Paranthaman, “Reverse micellar synthesis of cerium oxide nanoparticles,” *Nanotechnology*, vol. 16, no. 9, pp. 1960–1964, 2005.
- [142] S. P. Moulik and B. K. Paul, “Structure, dynamics and transport properties of microemulsions,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 78, no. 2, pp. 99–195, 1998.
- [143] D. Langevin, “Micelles and Microemulsions,” *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 43, no. 1, pp. 341–369, 1992.
- [144] R. Vijayalakshmi and V. Rajendran, “Synthesis and characterization of nano-TiO₂ via different methods,” *Sch. Res. Libr.*, vol. 4, no. 2, pp. 1183–1190, 2012.
- [145] A. M. Ruiz, G. Sakai, A. Cornet, K. Shimano, J. R. Morante, and N. Yamazoe, “Microstructure control of thermally stable TiO₂ obtained by hydrothermal process for gas sensors,” *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 103, no. 1, pp. 312–317, 2004.

- [146] T. Sugimoto, X. Zhou, and A. Muramatsu, "Synthesis of uniform anatase TiO₂ nanoparticles by gel-sol method: 1. Solution chemistry of Ti(OH)_n (4-n)⁺ complexes," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 252, no. 2, pp. 339–346, 2002.
- [147] D. H. Kim, H. S. Hong, S. J. Kim, J. S. Song, and K. S. Lee, "Photocatalytic behaviors and structural characterization of nanocrystalline Fe-doped TiO₂ synthesized by mechanical alloying," *J. Alloys Compd.*, vol. 375, no. 1, pp. 259–264, 2004.
- [148] J. L. Guimaraes, M. Abbate, S. B. Betim, and M. C. M. Alves, "Preparation and characterization of TiO₂ and V₂O₅ nanoparticles produced by ball-milling," *J. Alloys Compd.*, vol. 352, no. 1, pp. 16–20, 2003.
- [149] D. H. Lee, Y. S. Cho, W. I. Yi, T. S. Kim, J. K. Lee, and H. J. Jung, "Metalorganic chemical vapor deposition of TiO₂: N anatase thin film on Si substrate," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 66, no. 7, pp. 815–816, 1995.
- [150] A. K. Ganguli, A. Ganguly, and S. Vaidya, "Microemulsion-based synthesis of nanocrystalline materials," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, no. 2, pp. 474–485, 2010.
- [151] M. Sanchez-Dominguez, C. Aubery, and C. Solans, "New Trends on the Synthesis of Inorganic Nanoparticles Using Microemulsions as Confined Reaction Media," *Smart Nanoparticles Technol.*, no. Figure 1, pp. 195–220, 2011.
- [152] M. A. Malik, M. Y. Wani, and M. A. Hashim, "Microemulsion method: A novel route to synthesize organic and inorganic nanomaterials," *Arab. J. Chem.*, vol. 5, no. 4, pp. 397–417, 2012.
- [153] I. Capek, "Preparation of metal nanoparticles in water-in-oil (w/o) microemulsions," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 110, no. 1–2, pp. 49–74, 2004.
- [154] a. Tavakoli, M. Sohrabi, and a. Kargari, "A review of methods for synthesis of nanostructured metals with emphasis on iron compounds," *Chem. Pap.*, vol. 61, no. 3, pp. 151–170, 2007.
- [155] C. J. O'Connor, V. Kolesnichenko, E. Carpenter, C. Sangregorio, W. Zhou, A. Kumbhar, J. Sims, and F. Agnoli, "Fabrication and properties of magnetic particles with nanometer dimensions," *Synth. Met.*, vol. 122, no. 3, pp. 547–557, 2001.
- [156] U. Natarajan, K. Handique, A. Mehra, J. R. Bellare, and K. C. Khilar, "Ultrafine Metal Particle Formation in Reverse Micellar Systems: Effects of Intermicellar Exchange on the Formation of Particles," *Langmuir*, vol. 12, no. 11, pp. 2670–2678, 1996.
- [157] R. K. Mitra, B. K. Paul, and S. P. Moulik, "Phase behavior, interfacial composition and thermodynamic properties of mixed surfactant (CTAB and Brij-58) derived w/o microemulsions with 1-butanol and 1-pentanol as cosurfactants and n-heptane and n-decane as oils," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 300, pp. 755–764, 2006.
- [158] L. Benedini, P. V. Messina, R. H. Manzo, D. A. Allemanni, S. D. Palma, E. P. Schulz, M. A.

- Frechero, and P. C. Schulz, "Colloidal properties of amiodarone in water at low concentration.," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 342, no. 2, pp. 407–14, 2010.
- [159] A. Bumajdad, J. Eastoe, and A. Mathew, "Cerium oxide nanoparticles prepared in self-assembled systems.," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 147–148, pp. 56–66, 2009.
- [160] N. L. D'Elía, A. N. Gravina, J. M. Ruso, J. A. Laiuppa, G. E. Santillán, and P. V. Messina, "Manipulating the bioactivity of hydroxyapatite nano-rods structured networks: Effects on mineral coating morphology and growth kinetic," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1830, no. 11, pp. 5014–5026, Nov. 2013.
- [161] M. Gradzielski, D. Langevin, and B. Farago, "Experimental investigation of the structure of nonionic microemulsions and their relation to the bending elasticity of the amphiphilic film," *Phys. Rev. E*, vol. 53, no. 4, pp. 3900–3919, 1996.

Capítulo 2

Objetivos

Objetivo General

La presente propuesta se enfoca en el diseño de materiales aplicables a la construcción de implantes de tejido óseo basados en TiO_2 modificados con nanocería. La presencia de nanocería permitiría controlar la producción de especies reactivas de oxígeno favoreciendo la regeneración tisular alrededor del implante y su osteointegración.

Objetivos Específicos

Sintetizar, materiales nanoestructurados en base a dióxido de titanio modificados con óxido de cerio a fin de combinar la resistencia mecánica del titanio con las propiedades de óxido-reducción del cerio. La presencia de nanopartículas de óxido de cerio en el material permitiría controlar la producción de niveles anormales de especies reactivas de oxígeno, responsables del estrés oxidativo, la cual se halla relacionada a serias patologías óseas y además es una de las causas de fracaso del implante.

Investigar el efecto de las propiedades texturales y modificación de los materiales preparados sobre cuatro características fundamentales para su empleo en la ingeniería de tejidos:

- a) capacidad para interactuar con especies biológicamente activas,
- b) bioactividad,
- c) biocompatibilidad y
- d) citoprotección frente a estrés oxidativo.

Capítulo 3

Síntesis de los materiales basados en TiO_2

3.1. Introducción

Los materiales objeto de estudio en este trabajo doctoral son: TiO_2 , Ce-TiO_2 , Ce-TiO_2 tipo fullereno inorgánico y $\text{CeO}_2\text{-TiO}_2$. Todos estos materiales han sido obtenidos utilizando sistemas de microemulsiones W/O y posteriores tratamientos térmicos, tal y como se describirá en la sección 3.3 de este capítulo, para dar lugar a productos finales en forma de polvo.

La clave para el desarrollo y explotación de nuevos materiales nanoestructurados radica en una mayor comprensión de cómo las condiciones de síntesis afectan sus propiedades con el fin de adaptarlos a necesidades específicas. En consecuencia, el conocimiento del mecanismo de formación de las nanoestructuras es de particular importancia. El método de abajo hacia arriba (*bottom-up*) propuesto para la síntesis de los materiales evaluados a lo largo de esta disertación consiste en tres pasos básicos para controlar su crecimiento, agregación y morfología: (i) preparación de la microemulsión, (ii) tratamiento hidrotérmico y (iii) calcinado. La combinación adecuada de los parámetros seleccionados determinados para cada uno de los pasos mencionados anteriormente ejerce un control delicado sobre la elasticidad interfacial de las microgotas, el intercambio de especies reactivas y, en consecuencia, en las características finales del material.

A lo largo de todo este capítulo se detallan las condiciones de síntesis, así como también la justificación fisicoquímica de determinadas condiciones tales como la temperatura del tratamiento hidrotérmico y la de calcinado, seleccionadas en función de la evolución cristalina de los materiales. Las propiedades del sistema empleado para sintetizar los materiales también tienen una alta participación en características tales como la morfología, topografía y tamaño de partículas del producto final, por lo tanto también resulta interesante hacer una mención al respecto en este capítulo, no obstante, una discusión más detallada de estas particularidades será abordada en el capítulo 4.

Para beneficio del lector, y para que pueda ser consultada cuando sea necesaria, la tabla siguiente detalla la nomenclatura utilizada para los materiales, así como también su composición elemental y, en los casos que corresponda, la relación molar Ce/Ti empleada durante la síntesis:

Tabla 3.1: Detalle de los materiales cuya síntesis se detalla en este capítulo.

Composición	Nomenclatura	Ce/Ti (mol %)	Precursor de cerio
TiO ₂	A	-	-
Ce-TiO ₂	B	0,09	Tripentanoato de cerio
CeO ₂ -TiO ₂	C	0,09	Nanopartículas de CeO ₂
TiO ₂	B₁	-	-
Ce-TiO ₂ tipo fullereno inorgánico	B₂	0,06	Tripentanoato de cerio
	B₃	0,12	Tripentanoato de cerio
	B₄	0,60	Tripentanoato de cerio
	B₅	1,20	Tripentanoato de cerio
	B₆	6,00	Tripentanoato de cerio
	B₇	12,00	Tripentanoato de cerio
	B₈	30,00	Tripentanoato de cerio

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Reactivos

Para la preparación de microemulsiones y posterior síntesis de los materiales se emplearon los siguientes reactivos: bromuro de hexadeciltrimetilamonio (C₁₆TAB, PM= 364,48 g/mol, 99%,

Sigma), n-heptano (PM= 100,21 g/mol, δ = 0,684 g/cm³, Merck), 1-butanol (PM= 74,12 g/mol, δ = 0,810 g/cm³, Merck), tripentanoato de cerio (Ce(Val)₃, PM= 443,1 g/mol), isopropóxido de titanio (TTIP, Ti(OiPr)₄, PM= 284,22 g/mol, δ = 0,960 g/cm³, 97%, Sigma-Aldrich), hidróxido de sodio (NaOH, PM= 40,00 g/mol, 97%, Sigma-Aldrich) y agua tridestilada.

3.2.2. Instrumental

Espectroscopía de Correlación de Fotones, *Photon Correlation Spectroscopy (PCS)*: El tamaño de gotitas de la microemulsión de partida modelo se realizó utilizando esta técnica basada en la dispersión dinámica de luz empleando un instrumento Malvern Autosizer S4700 equipado con un láser Coherent OBIS® 514-20 LS que emite en la banda del verde a λ = 514 nm. El análisis se realizó trabajando a un ángulo de dispersión de 90°, a 25°C de temperatura. La viscosidad de la solución fue establecida en 0,8703 mPa.s, mientras que el índice de refracción utilizado fue n_0 = 1,3919, ambos valores fueron obtenidos por interpolación de datos bibliográficos para mezclas binarias n-heptano/n-butanol[1] para una fracción molar X_{butanol} = 0,558.

Difracción de Rayos X de polvos, *Powder X-Ray Diffraction (XRD)*: La identificación estructural de los materiales B₁-B₈ se realizó con un difractómetro de rayos X marca Rigaku D-Max III que emplea radiación Cu K α y monocromador de grafito, operado a 35 Kv y 15 mA y en ángulos 2 θ en el rango de 10 a 70 grados.

3.2.3. Determinación del tamaño de las gotitas de la microemulsión C

El análisis del tamaño de gotas de la microemulsión fue llevado a cabo empleando la técnica de dispersión dinámica de luz, que se basa en el análisis de las fluctuaciones temporales de la intensidad de la luz dispersada por partículas en una solución que se mueven de forma aleatoria por agitaciones térmicas (movimiento Browniano). Debido a esto, las partículas pequeñas se mueven con mayor velocidad mientras que las más grandes lo hacen más lentamente. Para determinar el tamaño de las partículas se calcula la función de autocorrelación $g^2(q, \tau)$, que es un valor promedio del producto de las intensidades de luz dispersada observada en un tiempo arbitrario t , $I(t)$, y la intensidad observada en un tiempo posterior τ , $I(t + \tau)$, según la expresión (3.1), donde q es el vector de onda (ecuación (3.2)), siendo n_0 el índice de refracción del solvente y θ el ángulo de detección respecto al haz del láser). A partir de $g^2(q, \tau)$ se calcula $g^1(q, \tau)$ de acuerdo con la ecuación (3.3).

$$g^2(q; \tau) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (3.1)$$

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (3.2)$$

$$g^1(q; \tau) = \sqrt{|g^2(t) - 1|} \quad (3.3)$$

Si las partículas son idénticas en tamaño, esto es monodispersas, la función g^1 decae según una función exponencial simple (ecuación (3.4)) donde Γ es la constante de decaimiento. Con este parámetro es posible obtener el coeficiente de autodifusión D (ecuación (3.5)), que finalmente se aplica para calcular el radio hidrodinámico (R_h) de la gota utilizando la ecuación de Stokes-Einstein (ecuación (3.6)), donde k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta y η es la viscosidad de la fase continua.

$$g^1(q; \tau) = e^{-\Gamma\tau} \quad (3.4)$$

$$\Gamma = q^2 D \quad (3.5)$$

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (3.6)$$

Los resultados fueron analizados con el método de cumulantes para obtener información acerca de la distribución del tamaño de partículas[2].

3.2.4. Análisis semicuantitativo de fases cristalinas

La relación en peso correspondiente al contenido de rutilo/anatasa en una muestra de TiO₂, puede obtenerse a partir del análisis de los picos de difracción de rayos X correspondientes a los planos principales (110) y (101) de rutilo y anatasa respectivamente, utilizando la siguiente ecuación[4]:

$$F_r = \frac{1}{\left(1 + 1,265 \frac{I_{\text{rutilo}(110)}}{I_{\text{anatasa}(101)}}\right)} \quad (3.7)$$

La ecuación (3.7) es muy útil para determinar el contenido de fases cristalinas cuando sólo están presentes esas dos, rutilo y anatasa, tal como es el caso del material B₁. Sin embargo, cuando las muestras a analizar son más complejas y su contenido de fase amorfa se vuelve importante, entonces la determinación de fases es más dificultosa. Para poder determinar el contenido de fase amorfa presente en los materiales, se adaptó un método comúnmente utilizado en la determinación

del índice de cristalinidad de celulosa[5], [6]; dicho método consiste en integrar el área bajo la curva de todo el difractograma y restar el área correspondiente a la contribución de la fase amorfa, que generalmente corresponde con el pico ancho ubicado en $2\theta = 22,5^\circ$. El contenido amorfo de la muestra también puede, de manera inversa, obtenerse luego de integrar el difractograma completo y a éste restarle el área de los picos correspondientes a las partes cristalinas, tal y como se describe en la siguiente ecuación:

$$fase\ amorfa\ (\% \frac{p}{p}): 1 - \frac{\text{Área Total} - \text{Área cristalina}}{\text{Área Total}} \times 100 \quad (3.8)$$

De la misma manera, cada fase puede ser cuantificada dividiendo la suma de sus áreas sobre el área total:

$$fase\ X\ (\% \frac{p}{p}): 1 - \frac{\sum \text{Área de picos adjudicables a la fase X}}{\text{Área Total}} \times 100 \quad (3.9)$$

La integración de los difractogramas se llevó a cabo utilizando el software PeakFit v4.12 de la siguiente manera:

- Se resta la línea de base utilizando un difractograma realizado sobre el soporte solo.
- Se asume la función Voigt y pseudo-Voigt para ajustar la forma de los picos.
- Se permite que el software realice el ajuste y se refina hasta obtener valores de r^2 mayores que 0,90 – 0,95 (la menor precisión se obtiene cuando se trabaja con muestras pobremente cristalizadas)
- Se calculan las áreas correspondientes al difractograma total y a los picos propios de cada fase cristalina y se aplican las ecuaciones (3.8) y (3.9) para determinar los porcentajes de fase correspondientes.

3.3. Síntesis

Como se adelantó en la introducción de este capítulo, la síntesis de los materiales emplea sistemas de microemulsiones W/O conformadas por agua/C₁₆TAB/1-butanol/n-heptano. La selección de los componentes anfílicos de este sistema responde a consideraciones que se discuten a continuación.

En general, en la preparación de nanopartículas de óxidos metálicos se pueden utilizar diferentes tipos de anfílicos con el fin de controlar el tamaño de partículas, la polidispersidad, la morfología y área superficial, entre otras propiedades. Los surfactantes, además de introducir estabilización estérica, también pueden alterar el microambiente de reacción, controlando de esta

manera la tasa de crecimiento de las partículas, una característica muy interesante a la hora de regular la velocidad de hidrólisis de determinados precursores[7]. El bromuro de hexadeciltrimetilamonio es un surfactante catiónico muy popular en el ámbito de la síntesis de nanopartículas mediada por microemulsiones[7]–[12], cuya utilización está generalizada por dos razones fundamentales: por un lado forma películas flexibles que permiten un intercambio de reactivos muy dinámico[8], y por otro lado, debido a su naturaleza catiónica, es posible que las moléculas de C_{16}TAB se adsorban a los óxidos formados en el interior de las microemulsiones, proporcionando control sobre el crecimiento y estabilización de las partículas[7]. La concentración de C_{16}TAB utilizada en este trabajo está muy por encima de su concentración micelar crítica ($\text{CMC} = 0,335 - 0,364 \text{ g/L}$ de acuerdo con referencias bibliográficas[13], [14]), de manera que es seguro asumir que todas las moléculas del surfactante se encuentran en la interfase agua/aceite.

Los cosurfactantes son moléculas, generalmente alcoholes de cadena lineal intermedia, que se alojan en el dominio interfacial de la suspensión surfactante/aceite/agua, intercalándose entre las cadenas del surfactante. Su incorporación en el sistema permite disminuir la tensión interfacial entre las fases oleosa y acuosa permitiendo la agregación espontánea que da origen a la microemulsión propiamente dicha[15]. Es por ello que se espera que su presencia reduzca la concentración de surfactante en la microemulsión. Cuando se trabaja con microemulsiones inversas de agua/ C_{16}TAB /n-hexano, por ejemplo, la adición del n-pentanol induce un incremento en el área total de la interfase con una correspondiente disminución del espesor de la película interfacial[16]; esto se traduce en la preservación de la curvatura negativa de la interfase al aumentar el contenido acuoso en la microemulsión, conservando así la forma esférica de las gotitas y evitando la transición hacia estructuras bicontinuas. La presencia del cosurfactante es extremadamente útil cuando se trata de conservar la estructura de la microemulsión frente a cambios en la cantidad de agua del sistema, especialmente cuando ésta interviene activamente en las reacciones de síntesis, tal y como es el caso de la hidrólisis de los alcóxidos de titanio utilizados en este trabajo. Se ha demostrado que el sistema C_{16}TAB /n-butanol aumenta favorablemente la microemulsificación de agua y n-heptano[17], [18]; este hecho, sumado a que la longitud de la cadena hidrocarbonada del alcohol es lo suficientemente corta como para proveer flexibilidad a la película interfacial pero no tanto como para ser soluble en agua e interferir con las reacciones de síntesis que tienen lugar en el núcleo acuoso, hacen que el n-butanol sea el cosurfactante de elección en este trabajo.

En la figura 3.1 puede observarse que todas las síntesis fueron realizadas utilizando sistemas cuyas composiciones están comprendidas dentro de la zona de microemulsión monofásica. Lo mismo fue confirmado visualmente en el laboratorio al constatarse la ausencia de turbidez en las mismas.

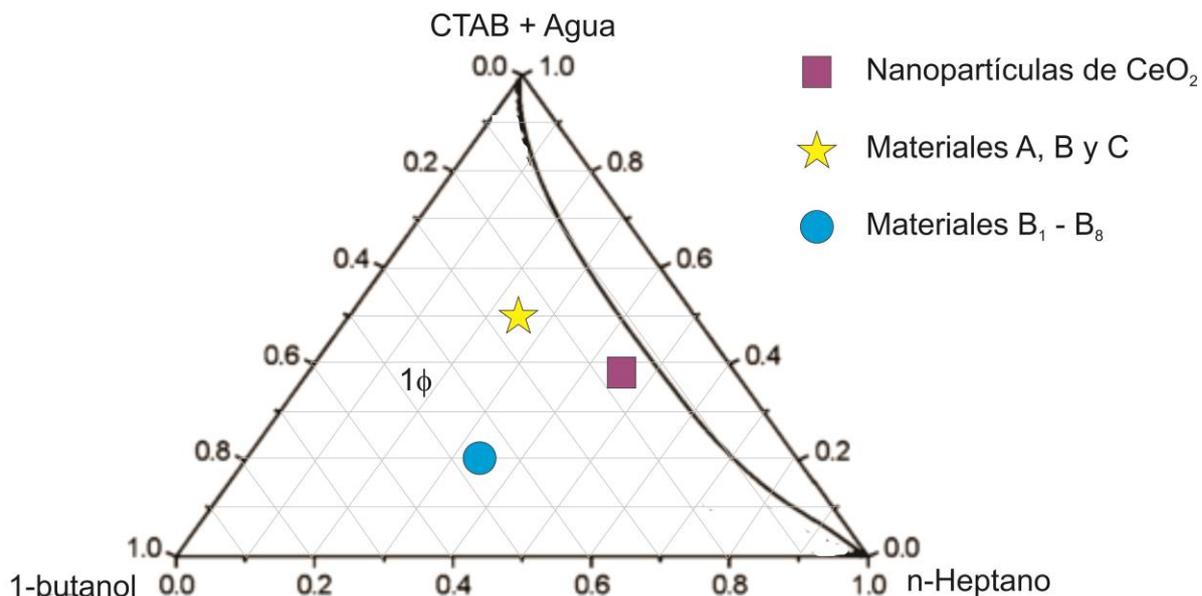


Figura 3.1: Diagrama de fase triangular del sistema cuaternario agua/ C_{16}TAB /1-butanol/n-heptano a $\omega=55,6$, 303 K en donde 1ϕ indica la zona de microemulsión monofásica (Esquema modificado del artículo de Mitra et al. [18]).

Se determinó el tamaño de los agregados de la microemulsión utilizada para la síntesis del TiO_2 nanoparticulado (microemulsión C) por medio de la técnica de dispersión dinámica de luz, constatándose que se trata de un sistema monodisperso con agregados de $7,3 \pm 2,2$ nm (cumulantes) figura 3.2.

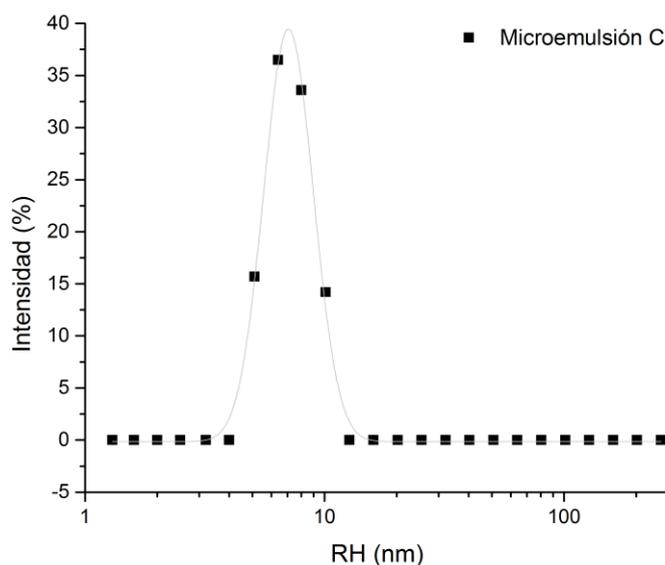


Figura 3.2: Función de distribución de radio hidrodinámico obtenido mediante PCS (ángulo de detección: 90°). La microemulsión C contiene 14,60 % de C_{16}TAB , 23,30 % de 1-butanol, 25,30 % de n-heptano y 36,50 % de agua tridestilada.

3.3.1. Síntesis de nanopartículas de CeO₂

Esta síntesis fue inspirada en los trabajos de Bumajdad *et al.*[7] y Ganguli *et al.*[11], en el cual se utiliza el método de doble microemulsión[7] para obtener nanopartículas de óxido de cerio (CeO₂ NPs) de entre 10 y 30 nm. Se detalla a continuación la composición de los dos sistemas empleados, así como también el procedimiento experimental para la obtención de las CeO₂ NPs utilizado en nuestro laboratorio:

- Microemulsión A: conteniendo 12,78% de C₁₆TAB, 9,58% de 1-butanol, 44,71% de n-heptano, 31,93% de agua tridestilada y 1% de tripentanoato de cerio.
- Microemulsión B: conteniendo 12,78% de C₁₆TAB, 9,58% de 1-butanol, 44,71% de n-heptano, 31,93% de agua tridestilada y 1% de hidróxido de sodio.

Una vez estabilizadas las dos microemulsiones, se agregó la microemulsión B sobre la A agitando magnéticamente durante 1 hora. La microemulsión resultante adquirió una tonalidad amarillenta indicando la formación de nanopartículas de CeO₂. Las mismas fueron posteriormente extraídas mediante centrifugado a 10.000 rpm durante 10 minutos. Finalmente las nanopartículas fueron lavadas con etanol y almacenadas en forma de dispersión etanólica. La caracterización de estas nanopartículas se encuentra detallada en la sección 4.3.1.1 del siguiente capítulo.

3.3.2. Síntesis de los materiales A, B y C

Los materiales A, B y C corresponden a TiO₂, Ce-TiO₂ y CeO₂-TiO₂ respectivamente (tabla 3.1). Su síntesis emplea un sistema estudiado y desarrollado previamente en nuestro laboratorio[19], usando el método de microemulsión simple según lo explicado por Bumajdad *et al.*[7]. Para la síntesis de los materiales basados en TiO₂ de este trabajo, se presentó el desafío de que el precursor (isopropóxido de titanio) es altamente reactivo en presencia de agua, por lo que debió desarrollarse una variante del método de la microemulsión simple, en el cual se invierte la localización de los precursores: en este caso el TTIP se incorpora junto con la fase oleosa a una microemulsión w/o ya preparada que contiene el agente precipitante (agua).

Durante el proceso de síntesis de cada uno de los materiales, se prepararon dos sistemas por separado cuya composición (expresada en porcentaje en peso, % p/p) se detalla en la tabla siguiente:

Tabla 3.2: Composición de los sistemas empleados en la síntesis de los materiales A, B y C (% p/p).

	Microemulsión C						Solución D	
	C ₁₆ TAB	1-butanol	n-heptano	Agua	Ce(Val) ₃	CeO ₂ NPs	n-heptano	TTIP
Material A	14,60%	23,30%	25,30%	36,50%	--	--	64,38%	35,62 %
Material B	14,56%	23,59%	25,26%	36,40%	0,02%	--	64,38%	35,62 %
Material C	13,60%	22,02%	23,59%	34,00%	--	6,80%	64,38%	35,62 %

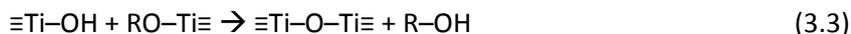
La incorporación del lantánido se realizó mediante dos estrategias que dan origen a los materiales B y C, a saber:

- Para el material B, denominado también Ce-TiO₂, se utilizó tripentanoato de cerio como precursor del Ce. Esta molécula es un derivado del ácido valerianico (CH₃(CH₂)₂COOH) y presenta la particularidad de ser insoluble en agua y en la mayoría de los solventes orgánicos, con excepción del n-butanol. Por lo tanto, puesto que el butanol es cosurfactante del C₁₆TAB en la microemulsión sobre la cual se trabaja, es de suponer que el tripentanoato de cerio se aloje cerca de esta molécula en la interfase.
- Para el material C, también identificado como CeO₂-TiO₂, el cerio se incorpora en forma de nanopartículas pre sintetizadas (de acuerdo con el procedimiento explicado en el inciso 3.3.1) que se agregan junto con el n-heptano a microemulsión, permaneciendo en suspensión en la fase continua.

La etapa de preparación de la Solución D es muy delicada debido a que los alcóxidos de titanio son altamente reactivos en condiciones de hidrólisis, reaccionando incluso con la humedad del ambiente, por lo que se debe preparar utilizando reactivos anhidros y tratando de minimizar la exposición al aire tanto como sea posible. Es por ello que, inmediatamente luego de preparados estos sistemas, se agrega la solución D sobre la microemulsión C, sin agitación y se deja equilibrar por 20 minutos para dar lugar a una policondensación hidrolítica del TTIP. Las recomendaciones anteriores permiten garantizar que el TTIP sólo reacciona con el agua confinada dentro de la microemulsión según la reacción general:



La hidrólisis de alcóxidos de titanio es un proceso muy complejo que ocurre en una serie de etapas de hidrólisis y polimerización, durante un fenómeno conocido como condensación hidrolítica, que origina una red polimérica inorgánica según el siguiente patrón de reacciones:



La red de óxidos se extiende tanto como las condiciones de hidrólisis permiten, limitada por el confinamiento de la microemulsión y la elasticidad interfacial de las microgotas. Asimismo, la composición química final del condensado depende del tamaño y la morfología del polímero[20].

Los geles resultantes fueron tratados en autoclave durante 24 horas a 100 °C. Los materiales obtenidos luego del tratamiento hidrotérmico fueron filtrados y lavados exhaustivamente con agua tridestilada para eliminar los restos de solvente, y dejados secar a temperatura ambiente.

Finalmente se los calcinó en mufla a 650 °C durante 7 horas obteniéndose materiales en forma de polvo. La temperatura óptima de calcinado fue determinada experimentalmente con el objetivo de obtener materiales con grado de cristalinidad y fase cristalina homogéneos; la explicación exhaustiva de este proceso será abordada en la sección 3.4.2.

3.3.3. Síntesis de los materiales B₁ - B₈

Los materiales B₁ a B₈, de fórmula Ce-TiO₂, fueron sintetizados pensando en (i) optimizar la cantidad de Ce(Val)₃ necesaria para la síntesis del material B y en (ii) observar el efecto de la concentración del dopante en las propiedades fisicoquímicas del TiO₂. El proceso de síntesis sigue la metodología descrita en la sección anterior para los materiales A, B y C.

Debido a que se usaron concentraciones crecientes de Ce(Val)₃, hubo que realizar pequeñas modificaciones en la composición porcentual de las microemulsiones respecto de las originales para lograr una disolución completa del tripentanoato de cerio en el cosurfactante.

De manera análoga a lo que ocurre en el caso de la síntesis del material B, es de esperarse que el tripentanoato de cerio se ubique en la interfase de la microemulsión, junto con el n-butanol. Se constató en el laboratorio que concentraciones de Ce(Val)₃ mayores a 2,13% p/p producen el colapso de la microemulsión.

En la siguiente tabla puede observarse en detalle la composición de los sistemas utilizados para la síntesis expresada en porcentaje en peso (% p/p):

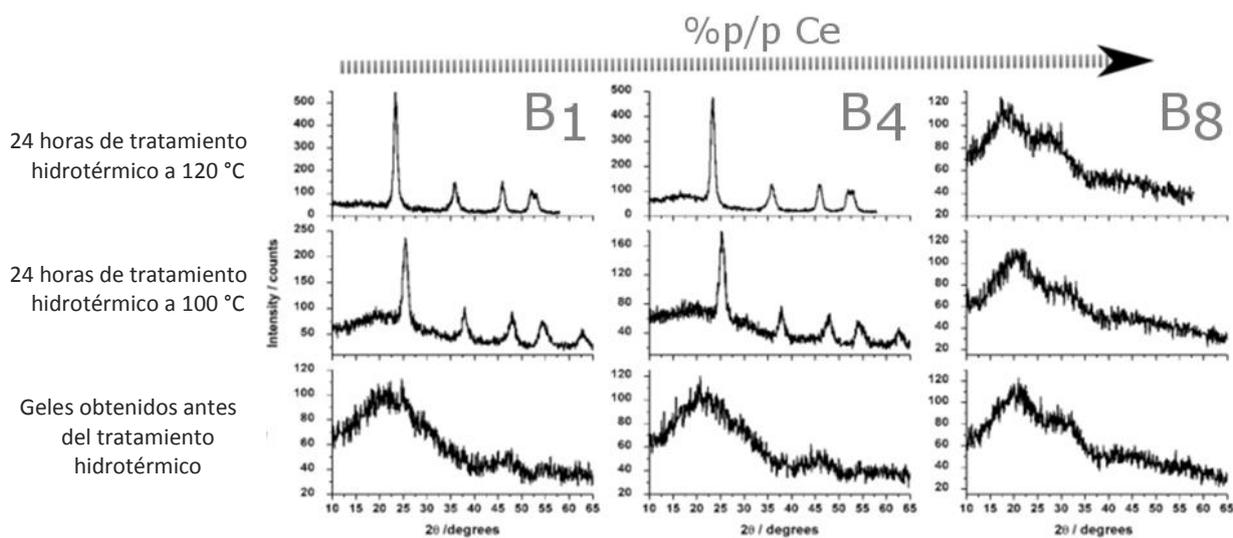
Tabla 3.3: Composición de los sistemas empleados en la síntesis de los materiales B₁ – B₈.

	Microemulsión C					Solución D	
	C ₁₆ TAB	1-butanol	n-heptano	Agua	Ce(Val) ₃	n-heptano	TTIP
Material B ₁	9,68%	47,06%	33,68%	9,68%	--	63,40%	36,60%
Material B ₂	9,68%	47,05%	33,57%	9,68%	0,02%	63,40%	36,60%
Material B ₃	9,68%	47,05%	33,57%	9,68%	0,02%	78,30%	21,70%
Material B ₄	9,67%	47,02%	33,55%	9,67%	0,09%	78,30%	21,70%
Material B ₅	9,66%	46,98%	33,53%	9,66%	0,17%	78,30%	21,70%
Material B ₆	9,60%	46,65%	33,29%	9,60%	0,86%	78,30%	21,70%
Material B ₇	9,52%	46,25%	33,00%	9,52%	1,71%	78,30%	21,70%
Material B ₈	9,48%	46,05%	32,86%	9,48%	2,13%	87,80%	12,20%

3.4. Tratamientos térmicos para la síntesis de los materiales

3.4.1. Efecto del tratamiento hidrotérmico

La estructura cristalina de estos materiales evoluciona a lo largo de todo el proceso de síntesis, como puede observarse en la figura 3.3, que muestra los difractogramas de rayos X característicos en las distintas etapas del proceso hidrotérmico, para tres materiales representativos: B₁, B₄ y B₈.


Figura 3.3: Evolución de la estructura cristalina de los materiales sometidos a diferentes temperaturas de tratamiento hidrotérmico para los materiales preparados con distintas relaciones molares porcentuales Ce/Ti: (B₁) 0, (B₄) 0,60 y (B₈) 30,00.

Se puede observar que antes del tratamiento hidrotérmico, todas las muestras presentan patrones de DRX típicos de materiales amorfos. El material B₈ retiene su estructura amorfa aún después del tratamiento hidrotérmico, independientemente de la temperatura aplicada. Al final de la etapa hidrotérmica, aparecen picos cristalinos asociados a estructuras de anatasa en los materiales B₁ y B₄. No se detectan picos de difracción correspondientes a óxido de cerio u otras estructuras de TiO₂, lo cual indica que el óxido de cerio no cristaliza de forma independiente durante el tratamiento hidrotérmico, aun a concentraciones relativamente altas del dopante. Durante el calentamiento isotérmico hidrotérmico, la temperatura salta rápidamente a un cierto valor y se mantiene constante; en consecuencia, la mayor fracción de la condensación de óxido de titanio se produce a altas temperaturas, provocando un aumento de la cristalinidad del material.

Debido a que 100 °C de tratamiento hidrotérmico son suficientes para iniciar la cristalización del TiO₂, se seleccionó esta temperatura para realizar las síntesis de todos los materiales estudiados en este trabajo.

3.4.2. Efecto de la temperatura de calcinación

El proceso de calcinación es un tratamiento térmico que se realiza a temperaturas siempre por debajo del punto de fusión del producto a calcinar y cuyo objetivo es provocar una descomposición térmica o un cambio en el estado cristalino de la muestra. En este trabajo las calcinaciones tienen lugar en presencia de aire. Este proceso se llevó a cabo sobre los materiales basados en TiO₂ con dos objetivos: por un lado, la eliminación de compuestos orgánicos que permanecen en el material como residuos luego de las reacciones de síntesis, y por otro lado, el procesamiento del material para obtener la cristalinidad adecuada.

Para poder determinar la temperatura óptima de calcinación, se estudió la evolución cristalina de los materiales B₁-B₈ en función de la temperatura, evaluándose el calcinado a 200, 400, 700, 800 y 900 °C; asimismo, se usaron los patrones de difracción de rayos X de los mismos materiales antes y después del tratamiento a 100 °C, con fines comparativos, la figura 3.4 muestra difractogramas de rayos X típicos obtenidos para los diferentes tratamientos térmicos.

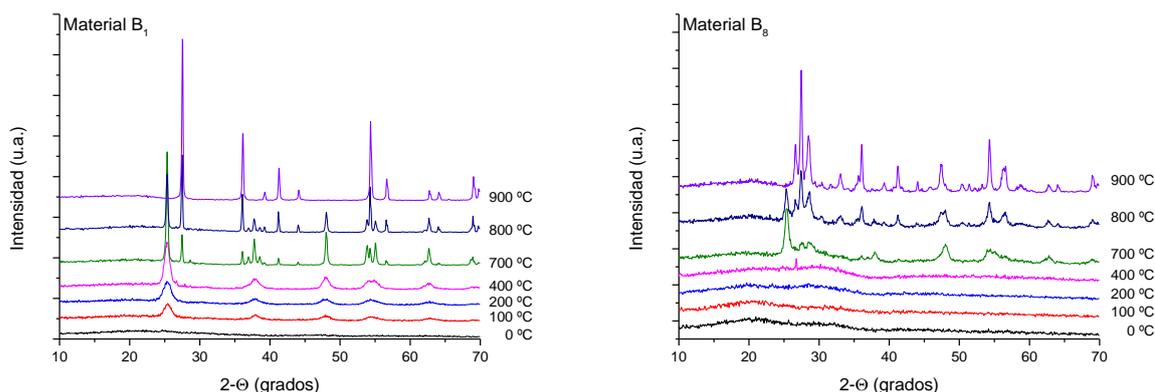


Figura 3.4: Difractogramas representativos de rayos X de los materiales B₁ y B₈ cuyo contenido de cerio es nulo y máximo respectivamente.

En esta sección se presenta un análisis semi-cuantitativo de fases llevado a cabo utilizando un método basado en la deconvolución de picos inspirado en la determinación del índice de cristalinidad de celulosa[6].

Para este análisis se empleó el software PeakFit v4.12 y se hicieron ciertas suposiciones, tales como que la forma de los picos ajusta a la función Voigt, que el contenido amorfo es asignable al pico ancho en $2\theta = 22,5^\circ$ [21] y que también es responsable de ensanchamiento de los picos. La validación del método también se ha realizado por contraste con otras técnicas, tales como el método ampliamente utilizado de Spurr & Myers que da la relación de anatasa/rutilo[4] y el refinamiento de Rietveld hecho por Matějová *et al.* [22] para determinar la relación de anatasa/amorfo/cerianita en los materiales de CeO₂-TiO₂. En ambos casos, las diferencias resultaron ser menores que 1%.

Una vez realizado el ajuste, se calcula el porcentaje en peso de cada fase de acuerdo con el área integrada bajo la curva del difractograma de rayos X, de acuerdo con el procedimiento descrito en materiales y métodos de este capítulo (sección 3.2.4).

La figura 3.5 muestra el análisis representativo de una de las muestras más complejas: B₈ calcinada a 800 °C.

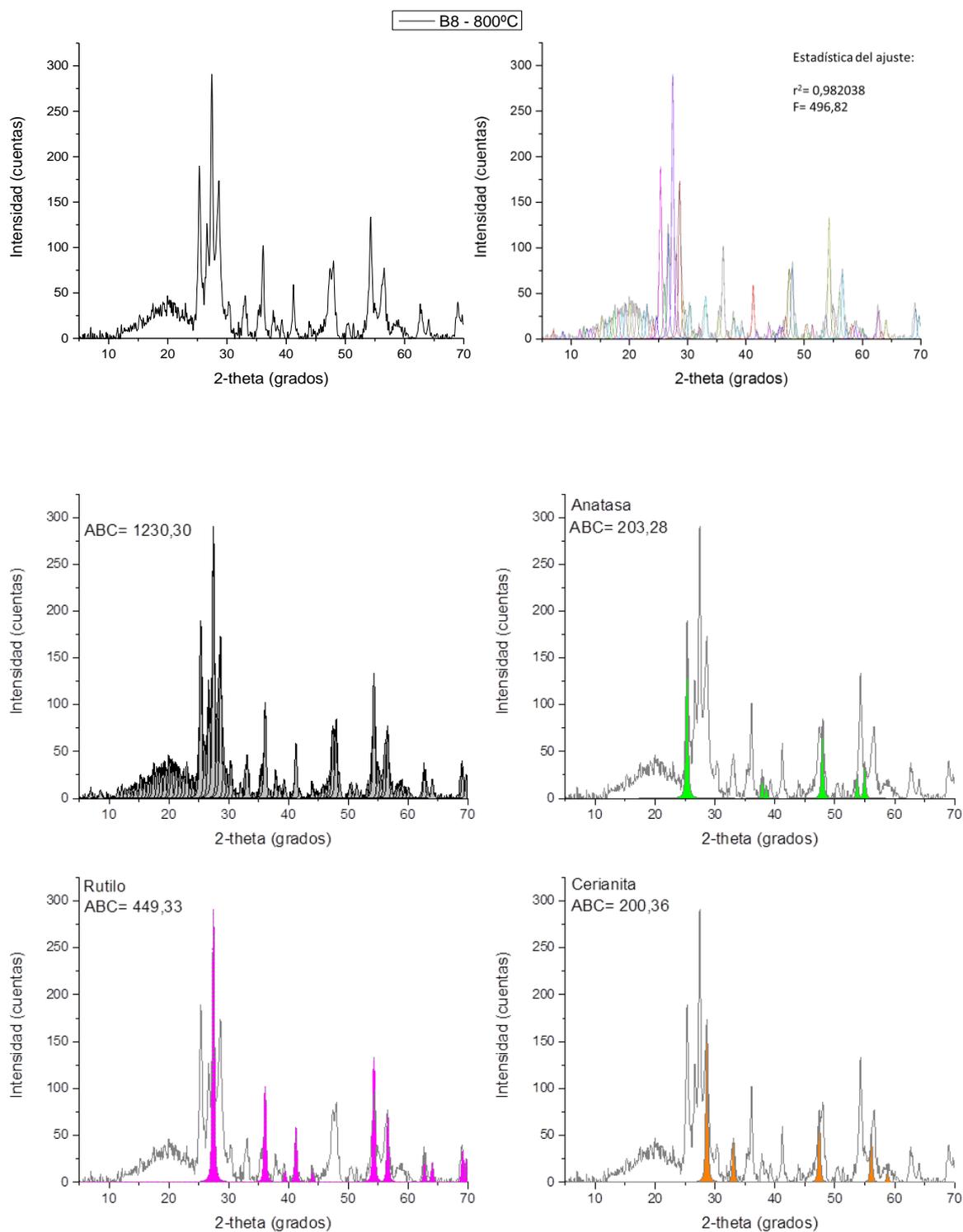


Figura 3.5: Deconvolución de picos del XRD del material B₈ calcinado a 800 °C. ABC corresponde con el área bajo la curva de los picos sombreados. Arriba está el difractograma antes y después del ajuste integral; abajo las áreas sombreadas correspondientes al difractograma total, a la fase anatasa, a rutilo y a cerianita, respectivamente. Los porcentajes en peso correspondientes a cada fase son: Anatasa 16,52 %, Rutilo 36,52 %, Cerianita 16,28 % y Amorfo 30,67 %.

De acuerdo con los difractogramas de rayos X, casi todos los materiales comienzan a cristalizar durante la fase del tratamiento hidrotérmico, excepto aquellos cuya concentración de cerio es muy elevada ($\text{Ce/Ti} > 6 \%$), que presentan una cristalización débil que comienza entre los 200 y 600 °C según el material. El óxido de cerio comienza a aparecer como una fase independiente cuando las concentraciones de cerio y las temperaturas de calcinación son muy elevadas, esto es, a partir de 700 °C y a $\text{Ce/Ti} > 12 \%$. Debido a que la cerianita tiene un alto poder de difracción de rayos X, es posible detectar cantidades muy pequeñas de esta fase porque su pico máximo es muy evidente en el difractograma, detectándose la mínima cantidad en la muestra preparada con $\text{Ce/Ti} = 30 \%$ y calcinada a 700 °C, con una fracción en peso correspondiente al 10 % del total. De hecho, cuando la concentración del dopante es tan alta, la relación anatasa/rutilo se vuelve similar a la del material sin dopar: $F_r = 0,51$ y $0,58$ respectivamente, lo cual sugiere que TiO_2 y CeO_2 dejan de formar una fase homogénea en B_8 para cristalizar de manera independiente.

La transformación de anatasa a rutilo es termodinámicamente posible luego de los 600 °C en muestras de TiO_2 puras[23]. Este hecho es consistente con lo observado durante el calentamiento de la muestra B_1 , donde puede verse, además, que a partir de 900 °C todo el material se halla cristalizado en forma de rutilo. En los materiales que contienen cerio se observa una clara estabilización de la fase anatasa, aumentando la temperatura de transición de fase; la muestra B_4 , cuya relación molar Ce/Ti es 0,60 %, presenta la máxima estabilización, poniendo de manifiesto que el rutilo recién aparece cuando la temperatura de calcinación supera los 800 °C.

Todo lo discutido hasta aquí se encuentra resumido en la figura 3.6.

En función de lo expuesto anteriormente, es posible observar que existen ciertas condiciones en las que el contenido de fase amorfa es mínimo, que ocurre cuando los materiales son preparados con relaciones molares Ce/Ti cercana a 0,12 % (material B_3) por lo que se decidió usar una concentración de trabajo de cerio ubicada en esa zona para la obtención del material B.

Respecto de la temperatura de calcinación fue necesario lograr compromiso entre la mínima temperatura posible de tratamiento, debido a consideraciones operativas, y la cristalinidad deseada de las muestras. Como a 700 °C ya se observa una transición de fase de anatasa a rutilo en el material sin cerio y se sabe que esta transición es posible a partir de 600 °C, se eligió una temperatura intermedia para asegurar que esta transición sea posible y al mismo tiempo se mantenga el porcentaje de fase amorfa en niveles suficientemente bajos; 650 °C parece ser adecuada para estos fines y es por ello que esa temperatura ha sido seleccionada para la síntesis de todos los materiales evaluados en este trabajo.

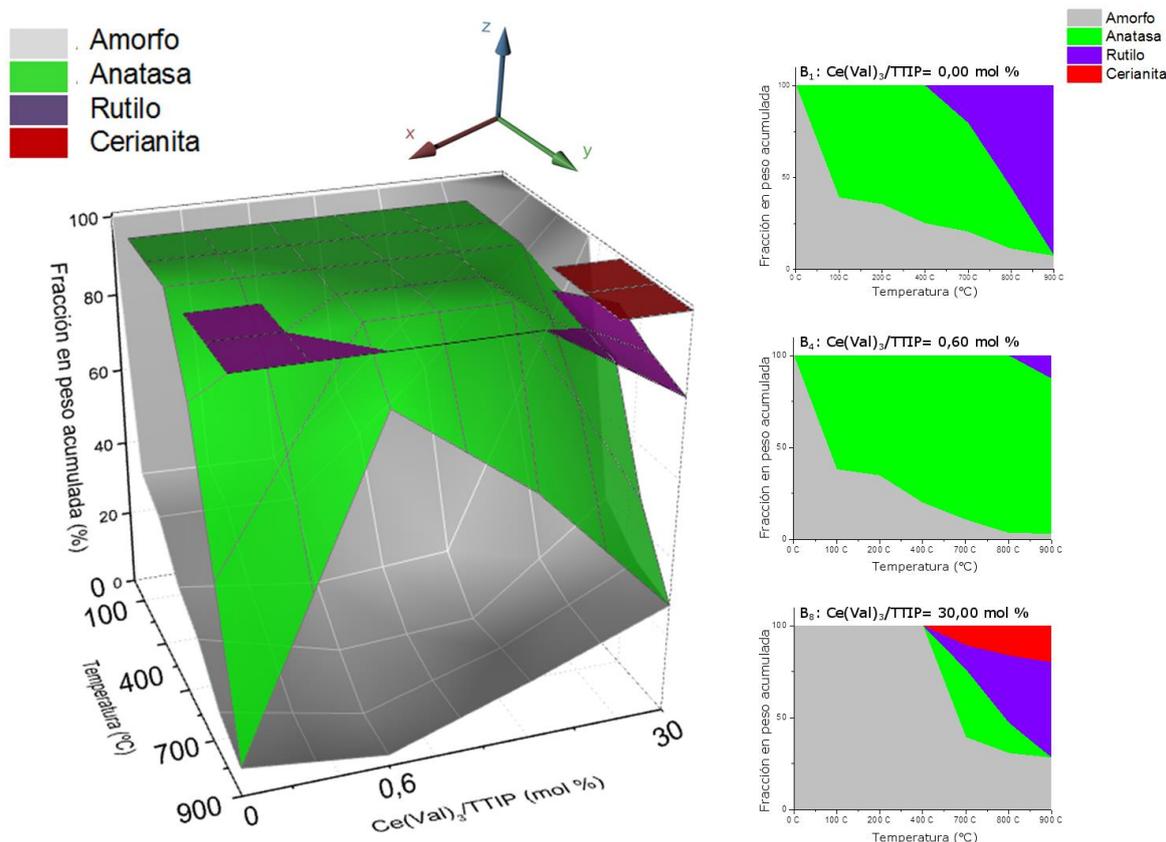


Figura 3.6: Diagrama de fases tridimensional construido para los materiales Ce-TiO_2 B_1 - B_8 , donde el eje x representa la relación molar Ce/Ti, el eje y corresponde a las temperaturas de tratamiento y el eje z representa el porcentaje acumulado de las fases presentes. Cada capa identifica el límite superior de la fase correspondiente. A la derecha se grafican cortes en el plano yz del diagrama tridimensional a concentraciones específicas correspondientes a la muestra B_1 , B_4 y B_8 .

3.5. Conclusiones

En este capítulo se han detallado las condiciones necesarias para la síntesis de los materiales basados en dióxido de titanio, cuyo estudio será desarrollado en los siguientes capítulos. Para ello, se utilizó una ruta sintética que emplea sistemas conocidos de microemulsiones, que actúan como nanorreactores, posterior tratamiento hidrotérmico y calcinación en atmósfera de aire. Se han optimizado también las condiciones experimentales en términos de temperaturas de tratamiento térmico y concentración adecuada de cerio necesaria para obtener un material de cristalinidad deseada.

Es de destacar, entonces, que la temperatura de tratamiento hidrotérmico fue ajustada a 100 °C debido a que es la mínima temperatura ensayada a la cual comienzan a aparecer los núcleos de cristalización del TiO_2 . Asimismo, la temperatura de calcinación también fue seleccionada en virtud de que es la mínima temperatura que permite obtener materiales con contenido de fase anatasa variable entre la muestra sin cerio y aquellas que contienen el lantánido, una cantidad de

fase amorfa aceptable y además se logra la total eliminación de restos orgánicos provenientes de la síntesis; todas estas condiciones se cumplen al calcinar las muestras a 650 °C.

Por último, el contenido de cerio necesario para la síntesis del material B también fue seleccionado en virtud de las propiedades cristalinas del material, decidiéndose trabajar con una relación Ce/Ti= 0,09 mol%, contenido de cerio que la ubica entre los materiales B₂ y B₃.

3.6. Bibliografía

- [1] J. Nath and J. G. Pandey, "Viscosities of Binary Liquid Mixtures of Butanol + Pentane, + Hexane, + Heptane, and + Octane at T = 298.15 K," *J. Chem. Eng. Data*, no. 1, pp. 128–131, 1997.
- [2] D. E. Koppel, "Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy: the method of cumulants," *J. Chem. Phys.*, vol. 57, no. 11, pp. 4814–4820, 1972.
- [3] S. W. Provencher, "Inverse problems in polymer characterization: Direct analysis of polydispersity with photon correlation spectroscopy," *Die Makromol. Chemie*, vol. 180, no. 1, pp. 201–209, 1979.
- [4] R. a. Spurr and H. Myers, "Quantitative Analysis of Anatase-Rutile Mixtures with an X-Ray Diffractometer," *Anal. Chem.*, vol. 29, no. 5, pp. 760–762, 1957.
- [5] L. Segal, J. J. Creely, a. E. Martin, and C. M. Conrad, "An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer," *Text. Res. J.*, vol. 29, no. 10, pp. 786–794, 1959.
- [6] S. Park, J. O. Baker, M. E. Himmel, P. a Parilla, and D. K. Johnson, "Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance.," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 3, pp. 1–10, 2010.
- [7] A. Bumajdad, J. Eastoe, and A. Mathew, "Cerium oxide nanoparticles prepared in self-assembled systems.," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 147–148, pp. 56–66, 2009.
- [8] A. K. Ganguli, A. Ganguly, and S. Vaidya, "Microemulsion-based synthesis of nanocrystalline materials.," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, no. 2, pp. 474–485, 2010.
- [9] V. Uskoković and M. Drofenik, "Synthesis of Materials Within Reverse Micelles," *Surf. Rev. Lett.*, vol. 12, no. 02, pp. 239–277, 2005.
- [10] Y. Mei, Y. Han, Y. Li, W. Wang, and Z. Nie, "Measurement of microemulsion zone and preparation of monodispersed cerium oxide nanoparticles by W/O microemulsion method," *Mater. Lett.*, vol. 60, no. 25–26, pp. 3068–3072, 2006.
- [11] A. K. Ganguli, T. Ahmad, S. Vaidya, and J. Ahmed, "Microemulsion route to the synthesis of

- nanoparticles," *Pure Appl. Chem.*, vol. 80, no. 11, pp. 2451–2477, 2008.
- [12] M.-P. Pileni, "The role of soft colloidal templates in controlling the size and shape of inorganic nanocrystals.," *Nat. Mater.*, vol. 2, no. 3, pp. 145–150, 2003.
- [13] C. Yang, F. Chen, S. Luo, G. Xie, G. Zeng, and C. Fan, "Effects of surfactants and salt on Henry's constant of n-hexane," *J. Hazard. Mater.*, vol. 175, pp. 187–192, 2010.
- [14] J. M. Neugebauer, "Detergents: An overview," *Methods Enzymol.*, vol. 182, pp. 239–253, 1990.
- [15] J. H. Schulman, W. Stoeckenius, and L. M. Prince, "Mechanism of formation and structure of micro emulsions by electron microscopy," *J. Phys. Chem.*, vol. 63, no. 10, pp. 1677–1680, 1959.
- [16] G. Palazzo, F. Lopez, M. Giustini, G. Colafemmina, and A. Ceglie, "Role of the Cosurfactant in the CTAB / Water / n-Pentanol / n-Hexane Water-in-Oil," *J. Phys. Chem. B*, vol. 7, no. 8, pp. 1924–1931, 2003.
- [17] K. Maiti, I. Chakraborty, S. C. Bhattacharya, A. K. Panda, and S. P. Moulik, "Physicochemical studies of octadecyltrimethylammonium bromide: A critical assessment of its solution behavior with reference to formation of micelle, and microemulsion with n -butanol and n -heptane," *J. Phys. Chem. B*, vol. 111, no. 51, pp. 14175–14185, 2007.
- [18] R. K. Mitra, B. K. Paul, and S. P. Moulik, "Phase behavior, interfacial composition and thermodynamic properties of mixed surfactant (CTAB and Brij-58) derived w/o microemulsions with 1-butanol and 1-pentanol as cosurfactants and n-heptane and n-decane as oils," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 300, pp. 755–764, 2006.
- [19] J. M. Ruso, A. N. Gravina, N. L. D'Elía, and P. V Messina, "Highly efficient photoluminescence of SiO₂ and Ce-SiO₂ microfibrils and microspheres.," *Dalton Trans.*, vol. 42, no. 22, pp. 7991–8000, 2013.
- [20] B. E. Yoldas, "Hydrolysis of titanium alkoxide and effects of hydrolytic polycondensation parameters," *J. Mater. Sci.*, vol. 21, pp. 1087–1092, 1986.
- [21] C. T. Kniess, J. C. De Lima, and P. B. Prates, "The Quantification of Crystalline Phases in Materials : Applications of Rietveld Method," in *Sintering - Methods and Products*, 2005, pp. 293–316.
- [22] L. Matějová, V. Valeš, R. Fajgar, Z. Matěj, V. Holý, and O. Šolcová, "Reverse micelles directed synthesis of TiO₂-CeO₂ mixed oxides and investigation of their crystal structure and morphology," *J. Solid State Chem.*, vol. 198, pp. 485–495, 2013.
- [23] K. I. Hadjiivanov and D. G. Klissurski, "Surface chemistry of titania (anatase) and titania-supported catalysts," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 25, no. 1, pp. 61–69, 1996.

Capítulo 4

*Caracterización fisicoquímica de los materiales
basados en TiO_2*

4.1. Introducción

El éxito y la resistencia a la tensión de los implantes, tanto óseos como dentales, están determinados por sus propiedades fisicoquímicas y topográficas[1], ya sea para promover la adhesión, colonización y crecimiento celular, o para mejorar la función tisular[2]. Además, varios estudios en animales han demostrado que la resistencia al cizallamiento en la interfase hueso-implante puede ser optimizada en términos de rugosidad superficial[3], [4], es por ello que conocer las propiedades topográficas del material en estudio es esencial para poder entender su osteointegración.

Como se mencionó en el capítulo 1, las corrientes actuales de investigación en el área ortopédica han mostrado una gran inclinación hacia el desarrollo de materiales nanoestructurados, ya que el mismo hueso posee organización nanométrica en el primer nivel de su estructura jerárquica. El dióxido de titanio es un compuesto generalmente reconocido por formar una capa de pasivación sobre los implantes de titanio que protege al material de la corrosión[5] y lo hacen bioinerte[6]. Sin embargo, en la actualidad la inercia química ha dejado de ser una característica deseable y se busca que los implantes sean bioactivos, osteoconductores y capaces de integrarse con el tejido vivo[7], [8]. Para ello es que es necesario manipular ciertas propiedades del TiO₂ tales como el tamaño de

partícula, la superficie, la estructura cristalina y la reactividad superficial. Este capítulo se dedica a analizar todos estos parámetros con el objetivo de lograr una interpretación integral de los fenómenos químicos, bioquímicos y biológicos en los que interviene este material.

Ha de mencionarse en esta instancia que todas las caracterizaciones estructurales llevadas a cabo a lo largo de este capítulo, y sus correspondientes interpretaciones, están orientadas hacia el entendimiento de los fenómenos biológicos que se examinarán en los capítulos siguientes, tales como la adsorción de proteínas, la bioactividad, las propiedades catalíticas y antioxidantes, la biocompatibilidad y la citoprotección. Para beneficio del lector, se presenta una sección de materiales y métodos generales, en la que se describen todas las técnicas de caracterización y los correspondientes modelos utilizados para el análisis de los datos; y una sección de resultados y discusión que se divide en dos partes:

- La primera abocada a la caracterización de los materiales identificados como A, B y C (TiO₂, Ce-TiO₂ y CeO₂-TiO₂ respectivamente) en los que se evalúan dos métodos diferentes de incorporación de cerio a la matriz de dióxido de titanio: cerio elemental en forma de tripentanoato de cerio (Ce(Val)₃) para el material B, y nanopartículas presintetizadas de óxido de cerio para el material C. Estos materiales serán, además, los estudiados con mayor profundidad en los capítulos siguientes.
- La segunda parte aborda el estudio de un grupo particular de materiales conteniendo cerio que fue incorporado en su forma elemental (Ce(Val)₃) durante la síntesis y en concentraciones crecientes. Por su semejanza sintética con el material B presentado en el inciso anterior, estos materiales se denominan B₁, B₂, B₃, B₄, B₅, B₆, B₇ y B₈, de acuerdo con su contenido de cerio, siendo B₁ el control sin cerio y B₈ la muestra sintetizada en presencia de la mayor cantidad del dopante. Estos materiales fueron preparados con el objetivo inicial de optimizar las condiciones de síntesis para la obtención del material B en términos de concentración de cerio, temperatura de calentamiento hidrotérmico y de calcinado (como se describió en el capítulo anterior, sección 3.3.3). Sin embargo, debido a la peculiar característica de cristalizar en forma de estructuras de tipo fullereno inorgánico que presentan estas muestras cuando se las calcina a 650 °C, también se dedica una parte del capítulo al análisis de sus propiedades.

Hasta aquí, entonces, se ofrece un somero enunciado de las características y los materiales a estudiar que serán oportunamente profundizados en las secciones correspondientes de este capítulo.

4.2. Materiales y Métodos

Se describen a continuación las técnicas de caracterización, el equipamiento y las condiciones experimentales empleadas en el desarrollo de este capítulo.

4.2.1. Instrumental

Microscopía electrónica de barrido, *Scanning Electron Microscopy (SEM)*: Esta técnica se realizó empleando dos microscopios, el primero marca ZEISS FE-SEM ULTRA PLUS con EDX, operado con un voltaje de aceleración de 3,00 kV (WD: 2,1 mm). Se aplicó compensación de carga local mediante la inyección de gas nitrógeno y las imágenes fueron adquiridas mediante detectores “*in lens*” de electrones secundarios y AsB (*Angle selective Backscattered electrons*) de electrones retrodispersados. El microanálisis por dispersión de energías de rayos X (EDX) fue realizado con el mismo instrumento. Algunas microfotografías también fueron adquiridas empleando un microscopio marca LEO modelo EVO 40 XVP, operado a 10,00 kV (WD: 7,0 – 9,0 mm).

Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución, *High Resolution Transmission Electron Microscopy (H-TEM)*: Las microfotografías fueron tomadas usando un microscopio marca ZEISS Libra 200 FE OMEGA, operado a 200 kV (magnificación: 1000000x). Las observaciones se realizaron en campo brillante. El instrumento está provisto con un sistema de difracción de electrones (DE) mediante el cual se determinó el espaciado d utilizando la ecuación derivada de la Ley de Bragg: $rd = L\lambda$, donde r es la distancia puntual en el patrón DE y $L\lambda = 1$ es la constante de la cámara.

Difracción de Rayos X de polvos, *Powder X-Ray Diffraction (XRD)*: La identificación estructural de los materiales estudiados se ha realizado por XRD. Durante la realización del trabajo se utilizaron dos equipos diferentes. El primero es un difractómetro Philips PW 1710, usando radiación Cu K_α ($\lambda = 1,5418$ nm), con monocromador de grafito, operado a 45 kV, 30 mA y 298 K. El segundo es un Rigaku D-Max III que emplea radiación Cu K_α y monocromador de grafito, operado a 35 Kv y 15 mA.

Isotermas de adsorción de nitrógeno: Las isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno fueron obtenidas a 77 K usando un equipo Micromeritics ASAP 2020. Todas las muestras fueron degaseadas, previo al análisis, a una temperatura de 100 K y una presión de 10⁻⁴ Pa, durante 720 min. La evaluación de la superficie específica y porosidad fue llevada a cabo usando los modelos de BET y Barret-Joyner-Halenda (BJH), respectivamente.

Espectroscopía de infrarrojo cercano, *Near Infrared Spectroscopy (NIR)*: Para la obtención de los espectros de reflectancia de las muestras pulverizadas se empleó un espectrofotómetro

Nicolet iS50 FTIR–NIR que posee acoplado un accesorio de reflectancia difusa, también llamado esfera de integración. Los espectros se obtuvieron en atmósfera de aire a temperatura ambiente. Para estas mediciones, la esfera de integración fue operada en modo reflectancia en la región de 1000 – 2500 nm. Un estándar de oro para reflectancia difusa NIR (99,9% de reflectividad) se utilizó como referencia para calibrar la línea de base. Las muestras pulverizadas se montaron dentro de viales de vidrio de base plana formando cilindros de 10 mm de diámetro y 5 mm de espesor. Los controles se realizaron con anatasa comercial (Sigma-Aldrich).

Espectroscopía de fluorescencia: Para el estudio de la fotoluminiscencia de los materiales B₁–B₈ se utilizó un espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse trabajando con una longitud de onda de excitación de 220 nm. Los espectros fueron obtenidos a temperatura ambiente utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Previamente las muestras se suspendieron en etanol y se sonicaron durante 5 minutos. Etanol puro fue utilizado como blanco.

Espectroscopía Raman: Las medidas de dispersión Raman a temperatura ambiente de los materiales B₁–B₈ fueron llevadas a cabo utilizando un espectrofotómetro confocal marca Renishaw Raman, modelo “In via Reflex”, equipado con un láser de Argón ($\lambda = 514 \text{ nm}$) como fuente de excitación. Las aberturas ópticas fueron ajustadas de manera tal de obtener una resolución de 1 cm^{-1} . La luz dispersada fue colectada en geometría de retrodispersión utilizando un detector enfriado por nitrógeno líquido. Antes de cada medida, el espectrofotómetro fue calibrado usando una lámpara de mercurio.

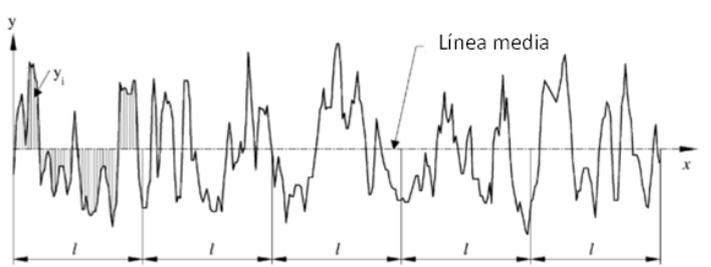
4.2.2. Evaluación de los parámetros de rugosidad

La rugosidad es el pequeño relieve que caracteriza a una superficie. La mayoría de las normas utilizan el concepto de línea media, a partir de la cual se mide la rugosidad. Esta línea es paralela a la dirección general del perfil, de forma que la suma de las áreas superiores, comprendidas entre la línea media y la línea del perfil, son iguales a la suma de las áreas inferiores.

Para medir la rugosidad cuantitativamente, es necesario definir ciertos parámetros que pueden calcularse a partir del perfil de rugosidad obtenido. Los parámetros de rugosidad más importantes debido a la información que proporcionan, y por ello los más utilizados, son los denominados parámetros de amplitud. Éstos se basan en medidas de la altura de las asperezas superficiales (Z)[9]:

R_a, Rugosidad media: Se define como el promedio de la desviación absoluta de las irregularidades del perfil de rugosidad respecto de la línea media y a lo largo de toda la longitud de la medición. Es el parámetro de rugosidad más universalmente empleado en el control de calidad

general de fabricación. Para calcular R_a se suman los valores absolutos de las áreas encerradas entre el perfil de rugosidad y la línea media, y se divide entre la longitud de la medición; en otras palabras R_a es la altura de un rectángulo de base l , cuya área es igual a las comprendidas entre el perfil de rugosidad y la línea media:



$$R_a = \frac{1}{l} \int_0^l |y(x)| dx \quad (4.1)$$

$$R_a = \frac{1}{l} \sum_{i=1}^n |y_i| \quad (4.2)$$

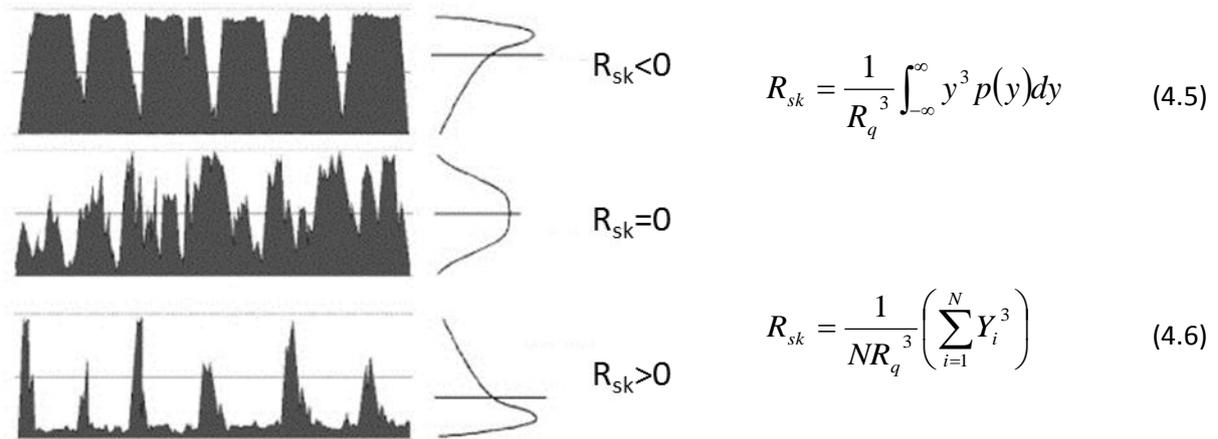
R_q , Rugosidad Cuadrática Media: En términos estadísticos representa la desviación estándar de la distribución de alturas de las asperezas. Matemáticamente se define como:

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{l} \int_0^l \{y(x)\}^2 dx} \quad (4.3)$$

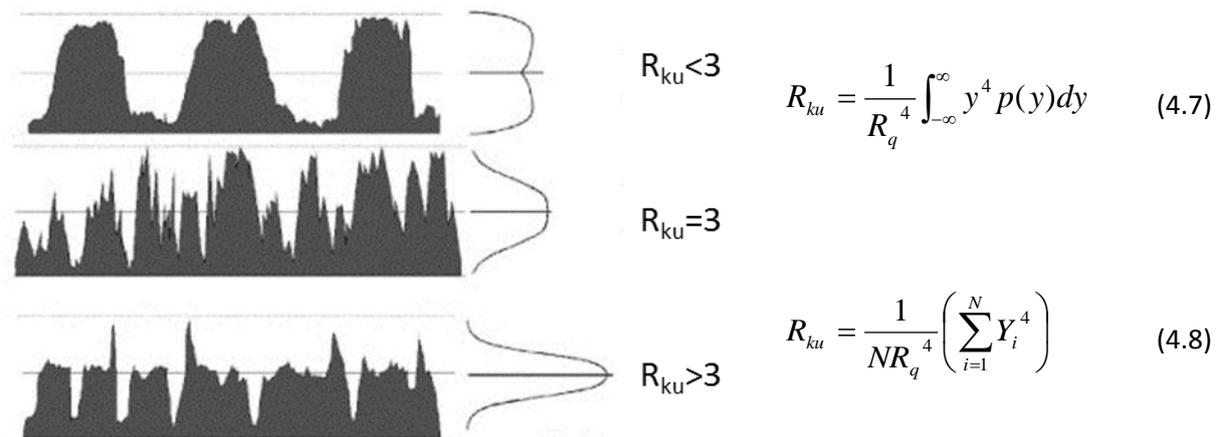
$$R_q = \sqrt{\frac{1}{l} \sum_{i=1}^n y_i^2} \quad (4.4)$$

Estos dos parámetros son incapaces de discernir diferentes topografías ya que podría darse el caso de tener dos superficies morfológicamente distintas pero con iguales parámetros R_a y R_q . Por lo tanto, es útil la utilización de dos parámetros adicionales, que se describen a continuación.

R_{sk} , Coeficiente de Asimetría: Representa el grado de simetría de la altura de las asperezas respecto del plano medio. Este parámetro es sensible a la presencia ocasional de valles profundos y picos altos sobre la superficie. Así, si sobre la superficie predominan los picos sobre los valles, tendremos $R_{sk} > 0$, y si se diera la situación opuesta, esto es, la presencia de picos truncados o raspaduras profundas, el valor de R_{sk} sería negativo. Si $R_{sk} = 0$, la distribución de irregularidades sobre la superficie es gaussiana. Este parámetro puede ser usado para distinguir entre dos perfiles con idénticos valores de R_a o R_q pero diferente forma. El coeficiente de asimetría de un perfil se calcula a partir de las ecuaciones presentes a continuación, en donde N representa el número de puntos, R_q es la Rugosidad Cuadrática Media, Y_i es la altura del perfil en el punto i :



R_{ku} , Coeficiente de Escarpadura: Indica la presencia de picos/valles desproporcionadamente altos/profundos. Si $R_{ku} < 3$ la curva de distribución se considera platicúrtica y tiene relativamente pocos picos agudos y valles profundos. Si $R_{ku} > 3$ la curva de distribución es leptocúrtica y donde predominan los picos altos y hay pocos valles. En el caso de que la distribución de picos y valles sobre la superficie sea gaussiana, tendremos que $R_{ku} = 3$.



Los parámetros de rugosidad fueron determinados para los materiales A, B y C a partir del análisis de las microfotografías electrónicas. La microscopía electrónica de barrido no aporta los parámetros de rugosidad ni permite hacer un análisis cuantitativo directamente, pero sí puede ser utilizado en el análisis de la rugosidad superficial[10], [11]. Varios autores han demostrado que el perfil de una superficie se puede obtener mediante el procesamiento de señales de electrones retrodispersados (BES) utilizando una PC conectada a un microscopio electrónico de barrido[12], [13]. La imagen de electrones retrodispersados que se produce es proporcional a la inclinación a lo largo de la superficie de barrido del haz de electrones. Esto significa que el perfil de rugosidad superficial se puede derivar mediante la integración de las intensidades BES, que varía a lo largo del área de escaneo. También es posible hacer medidas tridimensionales de rugosidad al hacer varios escaneos[14].

El análisis topográfico realizado durante la presente disertación utiliza imágenes adquiridas utilizando el microscopio electrónico de barrido modelo ZEISS FE-SEM ULTRA PLUS y el procesamiento de los datos se realizó utilizando el software ImageJ®[15] acoplado a varios paquetes de procesamiento tales como “*Roughness calculation*” y “*SurfCharJ 1q*”. Las imágenes para el análisis morfológico se obtuvieron empleando dos microscopios electrónicos de barrido, el LEO modelo EVO 40 XVP y el ZEISS FE-SEM ULTRA PLUS, ambos operados de acuerdo con las condiciones que se describen en la introducción de este capítulo.

4.2.3. Análisis cristalino

Debido a que el TiO₂ anatasa corresponde con el grupo espacial tetragonal ($a = b \neq c$; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$), los parámetros correspondientes a su geometría de red (a y c), así como también el volumen de la celda unidad (V), pueden calcularse usando las reflexiones (101) y (200):

$$\frac{1}{(d_{hkl})^2} = \left[\frac{h^2 + k^2}{a^2} \right] + \left[\frac{l^2}{c^2} \right] \quad (4.9)$$

$$V = a^2c \quad (4.10)$$

donde d_{hkl} es el espaciado interplanar obtenido empleando la ecuación de Bragg ($\lambda = 2 d_{hkl} \sin \theta$) y (hkl) son los índices de Miller de las reflexiones de simetría usadas en el cálculo [16].

La relación correspondiente al contenido de rutilo/anatasa puede obtenerse a partir del análisis de los picos de difracción de rayos X correspondientes a los planos principales (110) y (101) de rutilo y anatasa respectivamente, utilizando la siguiente ecuación[17]:

$$F_r = \frac{1}{\left(1 + 1,265 \frac{I_{rutilo(110)}}{I_{anatasa(101)}} \right)} \quad (4.11)$$

El tamaño promedio de los cristalitas puede ser calculado a partir de la aplicación de la ecuación de Scherrer[18], a partir del ancho a la mitad del pico correspondiente a la reflexión principal de anatasa (110) y/o rutilo (101) en el difractograma de rayos X:

$$\delta = \frac{0,89\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (4.12)$$

donde λ es la longitud de onda de la radiación de rayos X (Cu K $_{\alpha}$ = 1,5418 nm), 0,89 es la constante de Scherrer para partículas esféricas, β es el ancho del pico y θ es el ángulo de difracción de Bragg.

4.3. Resultados y Discusión

4.3.1. Materiales A, B y C

Los materiales A, B y C fueron sintetizados para explorar los efectos de diferentes formas de incorporación de cerio en las propiedades del TiO₂, que actúa como material de soporte. La incorporación del cerio se llevó a cabo de dos maneras:

- Incorporando tripentanoato de cerio (Ce(Val)₃) junto con el cosurfactante en la microemulsión según la técnica descrita previamente en el capítulo 3, sección 3.3.2.
- Agregando las partículas de nanocería preparadas previamente que se incorporan en forma de suspensión en la fase continua de la microemulsión.

En función de su contenido de cerio, los materiales se denominaron A, B y C y están formados por TiO₂, Ce-TiO₂ y CeO₂-TiO₂ respectivamente. La tabla 4.1 resume las condiciones de síntesis empleadas para obtener estos materiales expresando los valores en términos de relaciones molares.

Tabla 4.1: Resumen de las condiciones finales de síntesis empleadas en la obtención de los materiales A, B y C.

Muestra	Condiciones finales de síntesis				
	n-heptano/C ₁₆ TAB	Agua/C ₁₆ TAB	TTIP/C ₁₆ TAB	ButOH/C ₁₆ TAB	Ce(Val) ₃ /TTIP
A	12,6	50,6	1,2	8,0	0
B	12,6	50,6	1,2	8,0	9,0 × 10 ⁻⁴
C	12,6	50,6	1,2	8,0	9,0 × 10 ⁻⁴

4.3.1.1. Morfología

La figura 4.1 muestra las microfotografías electrónicas de barrido de los materiales A, B y C, TiO₂, Ce-TiO₂ y CeO₂-TiO₂ respectivamente, luego del proceso de calcinación. Todas las muestras están compuestas de pequeñas nanopartículas prismáticas de aproximadamente 20-50 nm de longitud (figura 4.8).

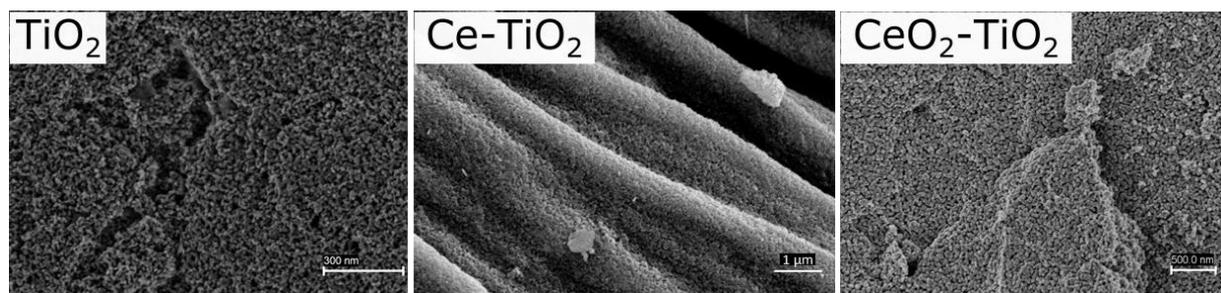


Figura 4.1: fotografías electrónicas de barrido que muestran la morfología de los materiales A, B y C.

La incorporación de nanopartículas de CeO_2 (figura 4.2) durante el proceso de síntesis no causa alteraciones en la forma final del producto (material C), de manera tal que este material presente la misma morfología indefinida que el material A.

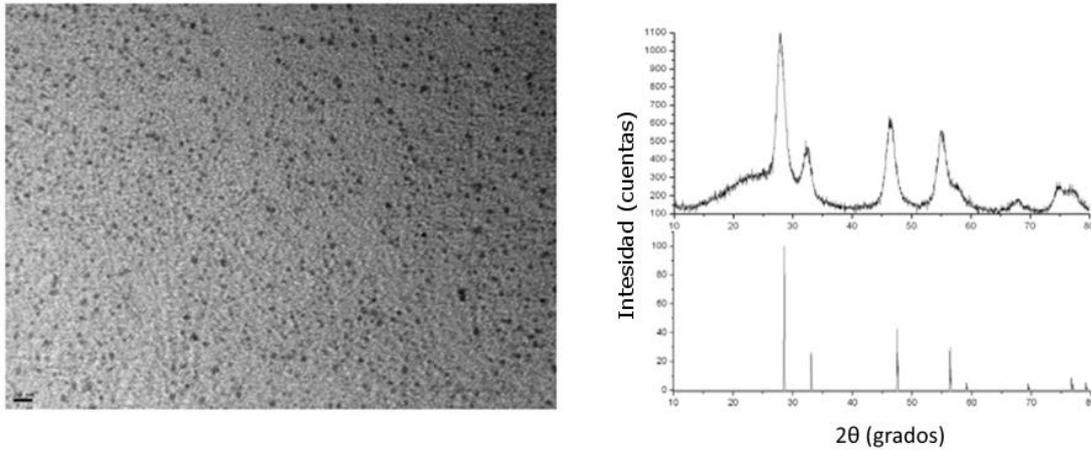


Figura 4.2: Caracterización de las nanopartículas de CeO_2 preparadas usando sistemas de microemulsiones agua/ $C_{16}TAB$ /butanol/ $Ce(Val)_3$ /aceite. El diagrama de difracción de rayos X coincide con el informado para el óxido de cerio en su forma cristalina cerianita (R050379-9 de la base de datos RRUFF, <http://rruff.info/>). El considerable ensanchamiento de los picos sugiere tamaños de partícula muy pequeños; observación que se confirma al analizar el material por microscopía electrónica de transmisión, revelando la presencia de partículas de CeO_2 de aproximadamente 5 nm de diámetro. Imagen adaptada del artículo de Ruso et al.[19]

La incorporación de la sal de cerio durante la síntesis, sin embargo, origina partículas de menor tamaño (material B) y que, además, se organizan en superestructuras en forma de bandas alineadas de 10 μm de longitud, 0,25 μm de diámetro y con una separación de 1,40 μm (figura 4.3).

La estabilidad de la microemulsión que, en última instancia, afecta el éxito de la síntesis, depende de varias condiciones experimentales: la relación molar agua/surfactante, la relación molar aceite/surfactante, el tipo y el contenido del agente estabilizante, la concentración del precursor en la solución y la velocidad de mezclado[20]. La combinación final de estos parámetros ejerce un delicado control sobre la elasticidad interfacial de las gotitas, el intercambio entre los precursores y la morfología final del material[21]. El $C_{16}TAB$ forma una película muy flexible que da lugar a micelas con una alta velocidad de intercambio[22]. La naturaleza dinámica del intercambio entre las gotitas de microemulsiones inversas juega un papel fundamental en el modelado de la forma final del material.

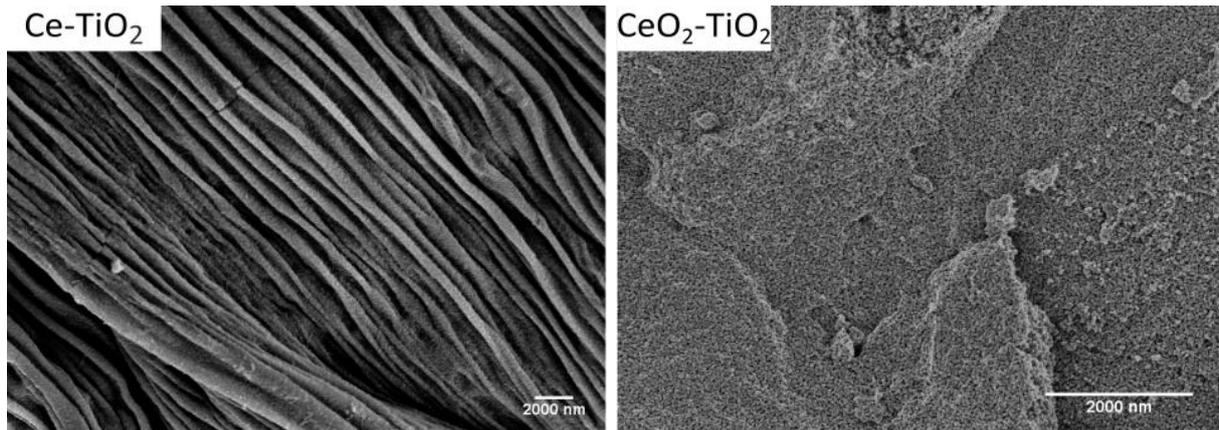


Figura 4.3: Microfotografías electrónicas de barrido que muestran la morfología de los materiales conteniendo cerio en sus distintas formas de incorporación. Izquierda, material B (Ce-TiO₂); derecha, material C (CeO₂-TiO₂).

La presencia de grupos Ce(Val)₃ probablemente modifica el parámetro de empaquetamiento y esto, en consecuencia, afecta el radio de curvatura de las gotas de la microemulsión de manera tal de causar un aumento en la rigidez de la interfase agua/aceite. Asimismo, también debe manipular la organización interfacial al afectar la compactibilidad de la película y su estabilidad temporal, de manera similar a como lo hace un cosurfactante en sistemas ternarios de microemulsiones estables[23], [24]. Para una curvatura interfacial (1/R) se espera una contribución energética por unidad de área según la forma[25]:

$$F = \gamma - \frac{K}{R_0 R} + \frac{K}{2R^2} \quad (4.13)$$

donde γ es la tensión interfacial, R_0 es el radio de curvatura de una micela esférica y R es el radio de curvatura de la gota de la microemulsión bajo cierta restricción; el parámetro K tiene unidades de energía y puede ser considerado como la rigidez de la interfase. La adición de un cosurfactante o cualquier molécula que se incorpore a la interfase de la microemulsión puede afectar los parámetros $1/R_0$ y K , modificando así la energía de curvatura interfacial, F .

Trabajos de investigación previos realizados por este grupo evaluaron el efecto de la rigidez interfacial en la morfología final del material, estableciéndose que, bajo condiciones hidrotérmicas, la formación de diferentes estructuras inorgánicas ocurría a través de un mecanismo de agregación orientado[19], [26]. En aquella oportunidad se señaló la necesidad de contar con una interfase poco flexible para conducir la formación de estructuras elongadas durante el proceso de síntesis hidrotérmico mediado por microemulsiones. Si la película interfacial es flexible, al someter a la microemulsión al tratamiento hidrotérmico, las micelas inversas se rompen y debido a la flexibilidad de su interfase, las microgotas se unen adoptando estructuras bicontinuas[19], [26]. Sin embargo,

cuando la película interfacial se presenta suficientemente rígida, se evita la formación de canales interconectados y el material inorgánico crece formando estructuras elongadas. Durante la síntesis del material B, y como se menciona anteriormente, es posible que la presencia de $Ce(Val)_3$ afecte la organización interfacial mediante la modificación de la compactibilidad de la película del tensioactivo, su estabilidad temporal y el parámetro de empaquetamiento, manipulando así el radio de curvatura de las gotitas de manera tal de aumentar la rigidez de la interfase agua/aceite.

Si se permite que las moléculas ajusten su área unitaria en función de la curvatura, la interfase sería menos rígida al doblarse (figura 4.4). Estos cambios interfaciales parecen ser suficientes para provocar asociaciones elongadas de nanopartículas, pero no lo suficientes como para provocar la formación de estructuras fibrilares. Un efecto similar fue observado durante la preparación materiales de $Ce-SiO_2$ mediante un proceso análogo[19].

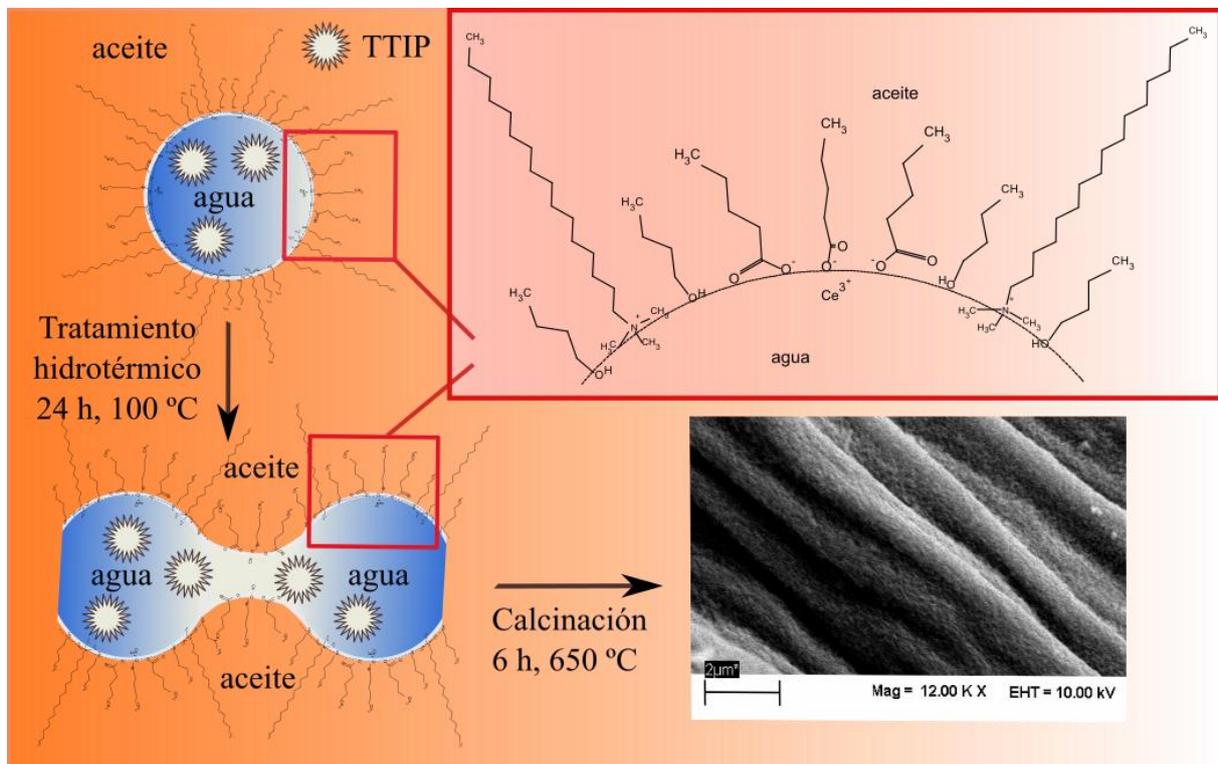


Figura 4.4: Representación esquemática de las condiciones de síntesis que conducen a la formación del material $Ce-TiO_2$ (B).

Otro factor importante para analizar, del que también depende la morfología final del producto, es la policondensación del precursor inorgánico. Como se adelantó en el capítulo anterior, las reacciones de hidrólisis de los alcóxidos de titanio son muy complejas[27] y producen policondensados cuya composición es función del tamaño físico y la morfología del polímero. Para la hidrólisis de isopropóxido de titanio (TTIP), Park *et al.*[28] demostraron que la reacción ocurre a través de un mecanismo asociativo, habiendo detectado un intermediario con número de

coordinación igual a 5 grupos –OR. Información termodinámica mostró una alta entalpía de activación en comparación con los pequeños valores de entropía de activación. Estos factores están relacionados con la dificultad de debilitar el enlace del grupo saliente y la complejidad de formación del enlace para el grupo entrante[28].

El sistema de microemulsiones empleado en este trabajo (tabla 4.1) posee una relación molar agua/surfactante entre 4 y 5 veces mayor que la relación molar aceite/surfactante y que la relación Ti⁴⁺/tensoactivo. La relación cosurfactante/surfactante es aproximadamente 8, en tanto que agua/ Ti⁴⁺ y aceite/ Ti⁴⁺ son 40 y 10 veces mayores que la relación Ti⁴⁺/surfactante. Bajo estas condiciones experimentales, existe una difusión lenta de iones Ti⁴⁺ a través de la fase orgánica continua hacia el interior de las gotas de la microemulsión y una hidrólisis de TTIP relativamente lenta en comparación con la velocidad de intercambio entre gotas[21]. La red de óxidos se extiende tanto como las condiciones de hidrólisis lo permiten[27], limitada por el confinamiento de la microemulsión y, como se menciona antes, por la elasticidad interfacial. En este caso, la producción de isopropanol (reacción 4.1) parece no tener relevancia en la microemulsión, probablemente debido a que la mayoría de los grupos –OR están localizados dentro del núcleo de las microgotas formando parte del producto de policondensación de TTIP[28].



4.3.1.2. Estructura cristalina y composición elemental

Para estudiar la composición elemental de estos materiales se emplearon dos técnicas, el microanálisis por dispersión de energías de rayos X (EDX) y la difracción de rayos X (XRD), siendo esta última, además la técnica de elección para resolver su estructura cristalina.

De acuerdo con los patrones de difracción de rayos X, figura 4.5, puede observarse que todos los materiales comienzan a cristalizar como TiO₂ anatasa (sistema tetragonal, *I41/amd*, JCPDS n° 21-1272) durante el tratamiento hidrotérmico. Cuando son sometidos al proceso de calcinación durante 6 horas a 650 °C, los materiales que contienen cerio, B y C, retienen la estructura de anatasa, mientras que el material A, correspondiente a la muestra de TiO₂ puro, se convierte parcialmente a rutilo, en concordancia con la transición de fase anatasa → rutilo que ocurre a partir de 600 °C, de acuerdo con lo informado en literatura[29]. La ausencia de picos de difracción a 2θ = 31 ° denota que las muestras siempre estuvieron libres de estructuras de TiO₂ brookita.

Estudios previos realizados con sistemas similares demostraron que la presencia de aniones RSO³⁻ en microemulsiones agua/AOT/n-heptano conducen a la inhibición del crecimiento de algunas

facetas cristalinas, conduciendo a la formación de nanocristales de anatasa de forma características[30]. En la presente disertación se estima que, al trabajar con una relación molar interfacial cosurfactante/surfactante= 8, es probable que los grupos $-OH$ del butanol actúen de la misma manera.

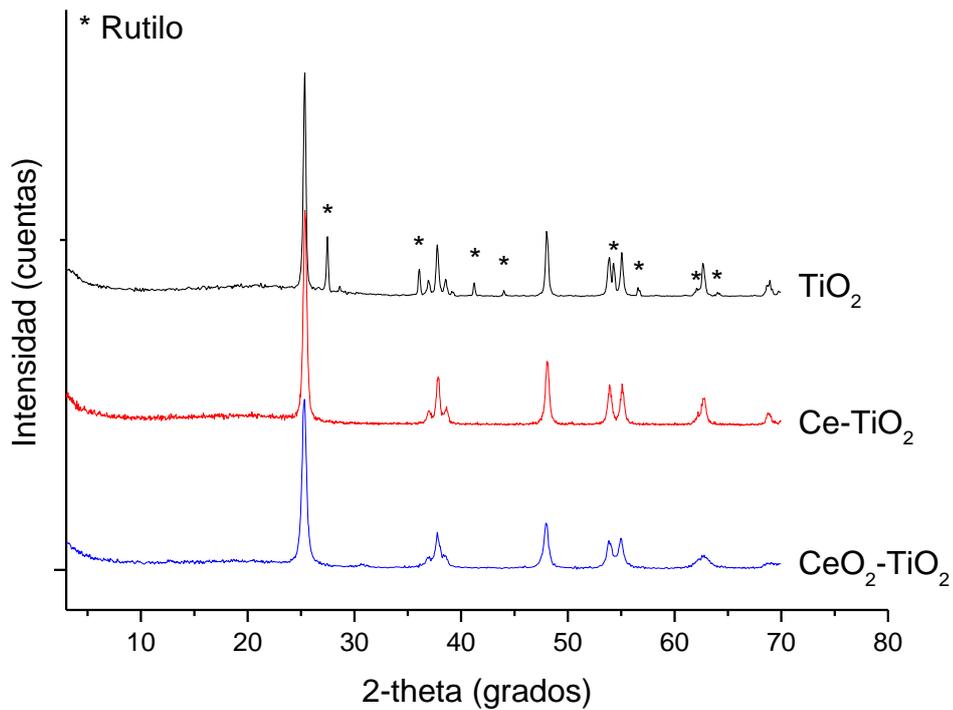


Figura 4.5: Patrones de difracción de rayos X de los materiales (A) TiO_2 , (B) $Ce-TiO_2$ y (C) CeO_2-TiO_2 luego del calcinado a $650\text{ }^\circ\text{C}$. Se observa que el material A se encuentra parcialmente transformado en rutilo (*) mientras que B y C retienen la estructura cristalina típica de anatasa.

No se detectaron indicios de picos de difracción correspondientes a óxido de cerio ni en el patrón de XRD (figura 4.5) ni en el microanálisis por EDX (figura 4.6), en el que sólo se observan señales correspondientes a titanio y oxígeno, en tanto que las señales correspondientes a silicio presentes en el espectro de A son bastante comunes y se deben a contaminación por sílice ambiental. La falta de señales correspondientes al cerio se atribuye a la pequeña cantidad del dopante y a la gran zona de distribución entre las partículas de óxido de titanio. La incorporación de átomos de Ce a la estructura cristalina de anatasa se manifiesta en la variación de los parámetros de red a y c , tabla 4.2. Un análisis más exhaustivo de la interacción entre los átomos de cerio, titanio y oxígeno en la red cristalina de anatasa se presenta en la sección 4.3.2.3.

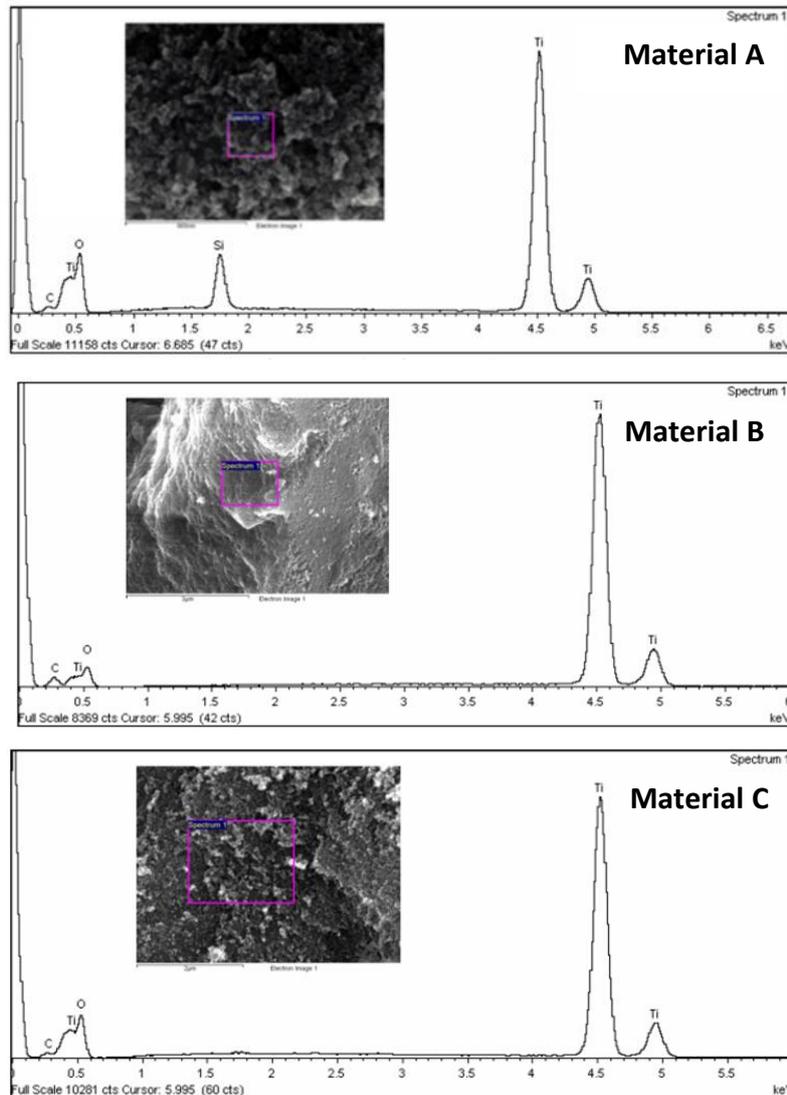


Figura 4.6: Microanálisis por dispersión de rayos X de los materiales (A) TiO_2 , (B) Ce-TiO_2 y (C) $\text{CeO}_2\text{-TiO}_2$ luego del calcinado a $650\text{ }^\circ\text{C}$.

La estabilización de TiO_2 en fase anatasa normalmente puede lograrse cambiando su composición superficial, y es habitual añadir otros átomos a titanía para mejorar las propiedades de TiO_2 , tales como la estabilidad estructural[31], [32]. Se ha informado que el CeO_2 en un estado finamente disperso tiene la propiedad de estabilizar la fase activa y de mejorar de la resistencia a la pérdida térmica[33]. De acuerdo con el modelo propuesto por Cao *et al.* [32], en las muestras que contienen cerio se forma un enlace Ti-O-Ce que mejora la resistencia del enlace Ti-O e inhibe la transición de fase y el crecimiento de las partículas. Los resultados hasta aquí expuestos podrían ser explicados utilizando estas mismas evidencias.

La falta de señales elementales correspondientes al cerio en los microanálisis por EDX en las muestras B y C puede explicarse debido al concepto de impregnación[7]. Cuando el agente dopante se encuentra completamente integrado dentro de la arquitectura interna del material de soporte, no

es detectable durante análisis superficiales como los llevados a cabo por SEM o EDX, incluso trabajando a la resolución más alta posible, siendo las mínimas señales detectables cuando el dopante supera 1-5 % de la composición total de la muestra, que no es el caso de estos materiales.

Tabla 4.2: Características cristalinas de los materiales A (TiO_2), B ($Ce-TiO_2$) y C (CeO_2-TiO_2). X_c representa el grado de cristalinidad, F_r el porcentaje de fase rutilo, a y c son ejes cristalográficos computados para la red cristalina de anatasa.

	Morfología	Fuente de cerio	X_c (%)	F_r (%)	a (Å)	c (Å)
A	Particulado		80	48	3,775	9,299
B	En bandas	Ce(Val) ₃	85	0	3,785	9,465
C	Particulado	Nanopartículas de CeO ₂	80	0	3,785	9,463

4.3.1.3. Rugosidad

La topografía de un implante puede ser definida en términos de forma, ondulación y rugosidad, siendo estos dos últimos considerados muy a menudo bajo el término de “textura”. Sin embargo conviene diferenciar estos dos términos y considerar las ondulaciones como la medida de las irregularidades superficiales cuyo espaciado es mayor que el presente en las medidas de rugosidad. Estrictamente entonces, se considera que la rugosidad corresponde a irregularidades superpuestas sobre una superficie ondulada[34].

Con el fin de evaluar los perfiles superficiales de las muestras A, B y C, TiO_2 , $Ce-TiO_2$ y CeO_2-TiO_2 respectivamente, se analizaron sus parámetros de rugosidad usando imágenes digitalizadas de microscopía electrónica de barrido (SEM) junto con diferentes paquetes informáticos (ImageJ® [15] y sus correspondientes aplicativos “Roughness calculation” y “SurfCharJ 1q”). La figura 4.7 muestra tres perfiles modelo a partir de los cuales obtuvieron los parámetros de rugosidad media (R_a), rugosidad cuadrática media (R_q), el coeficiente de escarpadura (R_{ku}) y el coeficiente de asimetría (R_{sk}) que se describieron oportunamente en la sección materiales y métodos de este capítulo.

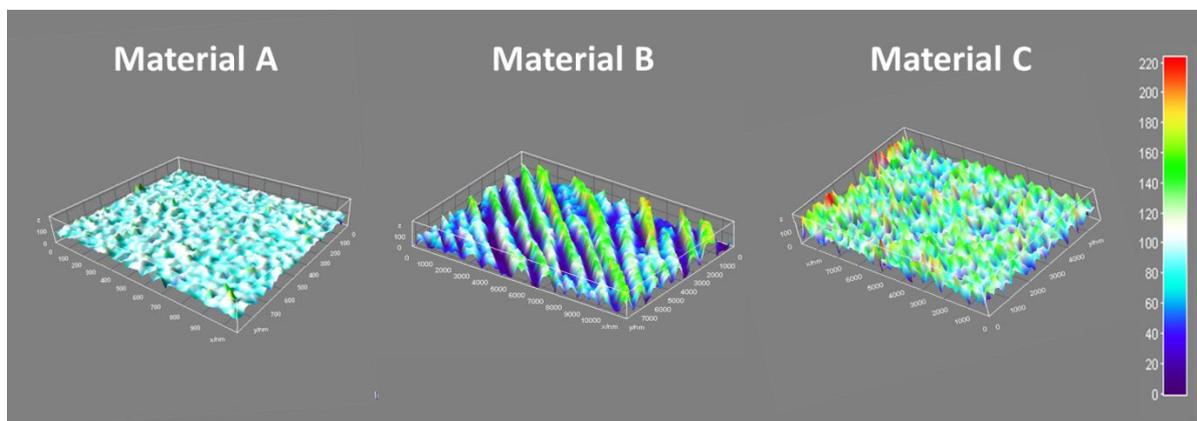


Figura 4.7: perfiles de rugosidad de los materiales A, B y C.

La tabla 4.3 muestra un resumen de los resultados obtenidos. Según estos datos, puede observarse que ambos parámetros R_q y R_a decrecen desde A hasta C. Para superficies sinusoidales regulares, R_q es proporcional a R_a , siendo generalmente 1,11 veces mayor; esta proporcionalidad se aleja del valor en el sentido $B > A > C$ por lo que se hace evidente que el perfil de B es el más heterogéneo de los tres. Los coeficientes R_{sk} y R_{ku} son indicadores de asimetría; todos los materiales presentan valores positivos de R_{sk} revelando que el perfil posee prevalencia de picos que protruyen sobre la línea media; valores negativos de R_{sk} son propios de superficies porosas. Como se verá en la siguiente sección, este hecho es consistente con la escasos de poros que presentan estos materiales.

El coeficiente de escarpadura describe la uniformidad del perfil o la agudeza de sus picos. Si $R_{ku} < 3$ la curva de distribución se dice que es platicúrtica y tiene relativamente pocos picos altos y valles bajos. Si $R_{ku} > 3$ la curva de distribución se dice que es leptocúrticas y tiene relativamente muchos picos altos y valles bajos. Todos los materiales son platicúrticos, pero la incorporación de átomos de Ce parece causar un ligero aumento de la agudeza de los picos en la superficie del material en comparación con el material de TiO₂ puro. El material con bandas (B) presentó el mayor valor R_{ku} de acuerdo con la existencia de un número importante de los picos en su topografía.

Tabla 4.3: Parámetros topográficos de los materiales TiO₂, Ce-TiO₂ y CeO₂-TiO₂

	R_q (nm)	R_a (nm)	R_{sk}	R_{ku}
A	100,97 ± 9,18	93,77 ± 8,79	1,18 ± 0,13	1,51 ± 0,42
B	79,35 ± 2,77	63,96 ± 2,63	1,44 ± 0,02	2,28 ± 0,11
C	64,42 ± 16,18	56,06 ± 15,51	1,33 ± 0,05	1,97 ± 0,16

Uno de los objetivos principales de la rugosidad superficial de los implantes es aumentar la resistencia al cizallamiento de la interfaz hueso-implante. Los parámetros de rugosidad superficial normalmente utilizados para caracterizar la topografía del implante no pueden discriminar entre superficies de las cuales se espera una alta resistencia a la cizalladura respecto de aquellas de las que no. Por otro lado, los coeficientes de asimetría y de escarpadura sí pueden hacer esta diferencia [35]. A medida que el módulo de elasticidad del material del implante es sustancialmente mayor que el del hueso, los picos de tensión surgirán en el hueso adyacente a los picos de rugosidad[36]. Cuanto más aguzadas sean las asperezas de la rugosidad superficial, mayores serán los puntos de tensión en el hueso[37]. Si las tensiones óseas son excesivas darán lugar a la resorción ósea [38], [39]. El coeficiente de escarpadura tiene su utilidad práctica en la predicción de estas tensiones y por lo tanto, es esperable que valores de $R_{ku} < 3$ sean deseables en términos de resistencia al cizallamiento.

4.3.1.4. Tamaño de partículas y superficie específica

A partir del estudio de las microfotografías electrónicas de barrido de A, B y C, es posible obtener la distribución de tamaño de partículas de estos materiales, figura 4.8. También, a partir de aplicar la ecuación de Scherrer (ecuación 4.12) en los difractogramas de rayos X, se puede calcular el tamaño promedio de los cristalitas. Como puede observarse, todas las muestras están constituidas por pequeñas nanopartículas prismáticas de aproximadamente 20-50 nm de longitud, y la presencia de átomos de cerio durante la síntesis de material se traduce en una leve disminución del tamaño de partículas, tabla 4.4.

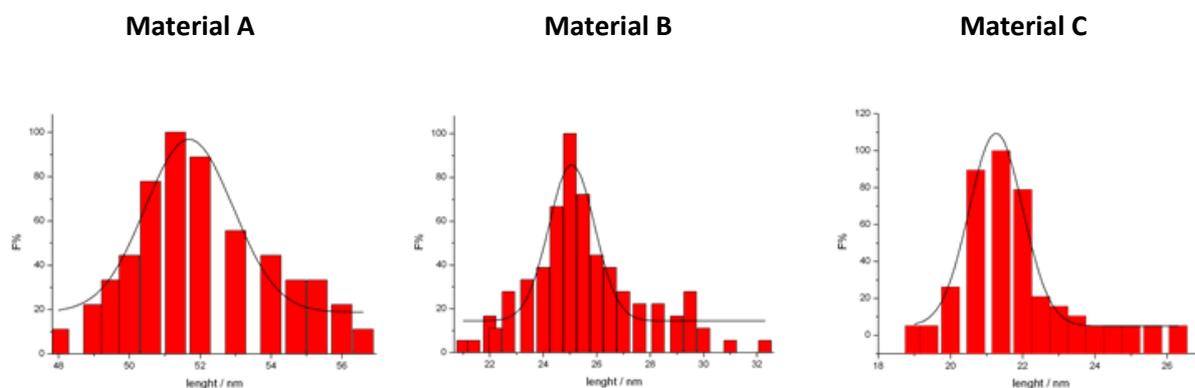


Figura 4.8: histogramas de distribución de tamaños de partículas para los materiales (A) TiO_2 , (B) $Ce-TiO_2$ y (C) CeO_2-TiO_2 obtenidos a partir de microfotografías SEM.

Las isothermas de adsorción-desorción de N_2 obtenidas para las muestras A, B y C (figura 4.9 a)) son del tipo IVa según la clasificación propuesta por Brunauer, Deming, Deming y Teller[40], observándose la presencia de un ciclo de histéresis del tipo H_1 según IUPAC[41]. Este tipo de isoterma de adsorción es típica para el caso de una interacción sustrato-adsorbato débil y no permite un cálculo exacto de la superficie interior porque los cambios de adsorción característicos que ocurren después de la saturación de la primera monocapa no son pronunciados. En general, los ciclos de histéresis de tipo H_1 se asocian con sólidos mesoporosos cuyos poros son de forma cilíndrica, tamaño similar y no intersectados, sin embargo ninguno de los materiales aquí estudiados presenta áreas superficiales lo suficientemente grandes ni un arreglo ordenado de mesoporos.

La tabla 4.4 resume los valores de superficie específica determinados por BET (S_{BET}) y de volumen de poro (V_{TP}) calculado aplicando la regla de Gurvitch. El error en el cálculo de S_{BET} fue siempre menor al 10 % en todas las muestras analizadas.

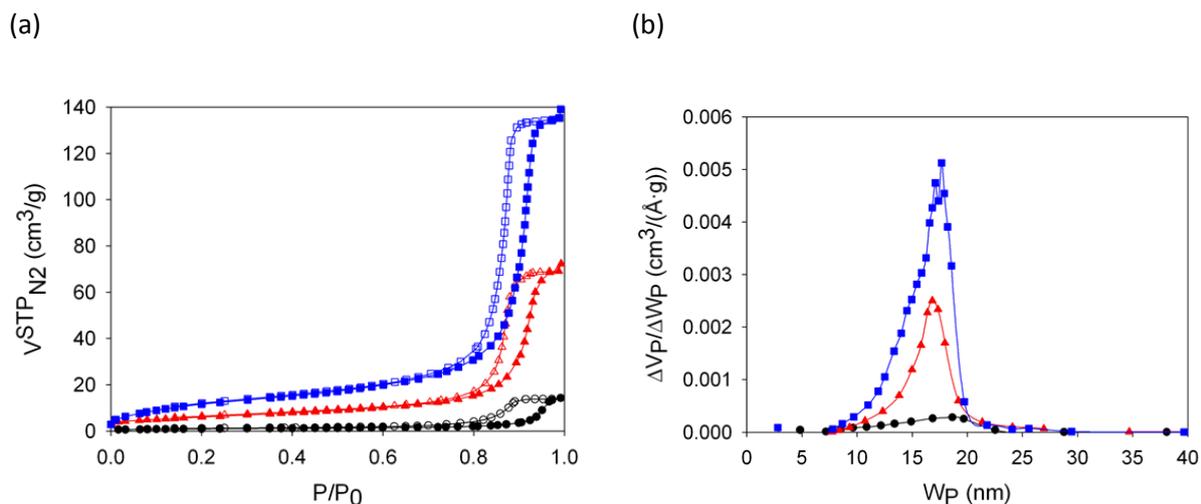


Figura 4.9: (a) Isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno para las muestras A (●), B (▲) y C (■); los símbolos llenos corresponden a la rama de adsorción y los símbolos vacíos a la rama de desorción. (b) Distribución de diámetro de poro obtenido a partir de la rama de desorción utilizando el método de BJH para las muestras A (●), B (▲) y C (■).

Tabla 4.4: Distribución de tamaño de partículas promedio obtenidas a partir de las microfotografías SEM (δ_1) y de los DRX (δ_2), superficie específica determinada por BET (S_{BET}), volumen de poro calculado por Gurvitch (V_{TP}) y diámetro de poro promedio (W_p).

	Composición	δ_1 (nm)	δ_2 (nm)	S_{BET} (m ² /g)	V_{TP} (cm ³ /g)	W_p (nm)
A	TiO ₂	51	40	3	0,01	17
B	Ce-TiO ₂	32	34	21	0,10	19
C	CeO ₂ -TiO ₂	21	28	43	0,21	19

En la figura 4.9 b) se muestra la distribución de diámetro de poro para las muestras en estudio, calculado a partir de la rama de desorción utilizando el método de BJH[42]. Se observa una distribución de diámetro bastante estrecha ubicándose el promedio del valor alrededor de 17-19 nm (tabla 4.4) para todas las muestras, indicando que la presencia de Ce no influye en el diámetro de poro obtenido. La diferencia de área bajo la curva existente entre las distribuciones de los diferentes materiales está relacionada con el volumen de poro de los mismos. Como puede verse, los materiales A y B responden a un modelo de distribución de tamaño de poro, mientras que C reporta otro modelo. Este hecho indica que no se produce separación de fases durante la asimilación de los átomos de cerio en la matriz de TiO₂ utilizando Ce(Val)₃ como precursor, en contraste a lo que ocurre con la incorporación de nanopartículas de CeO₂. Aunque desde el estudio de los patrones de difracción de rayos X de la muestra C los picos relacionados con estructuras cristalinas adjudicables a CeO₂ no pueden ser identificados (figura 4.5), la existencia de una distribución de tamaño de poro bimodal sería indicativo de una incorporación incompleta de nanopartículas de CeO₂ en la matriz de anatasa.

4.3.1.5. Hidrofilicidad

La hidrofilicidad de los polvos basados en TiO₂ fue evaluada por un método indirecto, mediante la inspección de los espectros de infrarrojo cercano (NIR) de las moléculas de agua adsorbidas a la superficie (figura 4.10). Para contrastar resultados se utilizó una muestra de anatasa comercial (AA). Todos los materiales evaluados presentan un patrón similar de bandas que puede adjudicarse a diferentes estados de moléculas de agua fisisorbidas sobre su superficie, indicando cierto grado de hidrofilicidad. La intensidad de los picos aumenta desde el material A hasta el C, y todos, excepto en A, son mayores que los correspondientes a la muestra comercial de anatasa (AA). El material A (TiO₂) y AA, de composición equivalente, no presentan diferencias sensibles en el patrón de agua adsorbida.

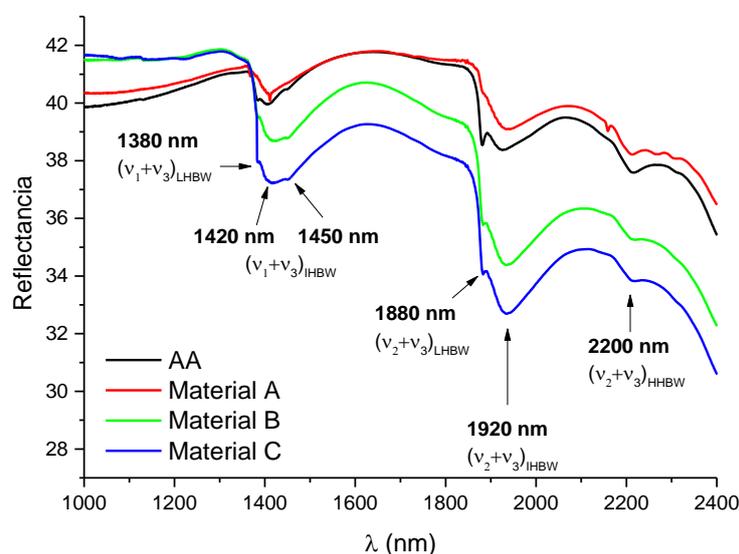


Figura 4.10: Espectros de infrarrojo cercano para moléculas de agua adsorbidas sobre anatasa comercial, AA, y sobre los materiales A, B y C. Los momentos vibracionales para el H₂O están representados por v_1 : estiramiento simétrico; v_2 : flexión; v_3 : estiramiento asimétrico; LHBW: asociación de agua con menos hidrógenos; IHBW: asociación de agua con número intermedio de hidrógenos; HHBW: agua asociada con alta cantidad de hidrógeno.

En el espectro NIR se observan pequeñas bandas de adsorción correspondientes a modos vibracionales de agua poco estructurada (*Less Hydrogen Bonded Water*, LHBW)[43] y que pueden ser asignadas a combinaciones de estiramiento simétrico y asimétrico (v_1+v_3), en 1380 nm, y a flexión y estiramiento asimétrico (v_2+v_3), en 1880 nm, equivalente a agua en estado gaseoso[43]. Las bandas anchas centradas en 1420-1450 nm y 1920 nm pertenecen a modos vibracionales de agua de estructuración intermedia (*Intermediate Hydrogen Bonded Water*, IHBW), representados por estiramientos simétrico y asimétrico (v_1+v_3) en 1420-1450 nm, y la combinación de flexión y estiramiento asimétrico (v_2+v_3), en 1920 nm. Finalmente, el pico ancho de menor intensidad,

centrado en 2200 nm, es similar al presentado por los modos vibracionales ($\nu_2+\nu_3$) del hielo[43], y por lo tanto se asocia con agua altamente estructurada (*High Hydrogen Bonded Water*, HHBW).

4.3.2. Materiales B₁-B₈

En el óxido de cerio existe una dependencia del tamaño de los parámetros de red en función de la diferencia de tamaños de los iones Ce⁴⁺ y Ce³⁺. Eso da lugar a la modificación de la red cristalina y al desarrollo de puntos de tensión debido a la pérdida de oxígeno de la región superficial[44]. Esta característica se puede utilizar para manipular las propiedades estructurales del material, que son especialmente valiosas en el desarrollo de nuevos dispositivos ortopédicos implantables, debido al fuerte efecto de la topografía del material sobre la viabilidad, propagación y proliferación de las células[45]. Basándose en la información de que el titanio y sus aleaciones son ampliamente utilizados en muchas aplicaciones ortopédicas[46] y que el uso de recubrimientos de TiO₂ aumentaría la bioactividad superficies metálicas[47], se decidió evaluar el efecto de diferentes concentraciones de cerio sobre la morfología, topografía, el polimorfismo y la capacidad de almacenamiento de oxígeno de los cristales de TiO₂. La tabla 4.5 muestra las condiciones finales de síntesis utilizadas en la obtención de esta serie de materiales, cuyos parámetros están dados en términos de relaciones molares.

Tabla 4.5: Resumen de las condiciones finales de síntesis empleadas en la obtención de los materiales B₁-B₈.

Muestra	Condiciones finales de síntesis				
	n-heptano/C ₁₆ TAB	Agua/C ₁₆ TAB	TTIP/C ₁₆ TAB	ButOH/C ₁₆ TAB	Ce(Val) ₃ /TTIP
B ₁	25,3	20,1	2,5	24	0
B ₂	25,3	20,1	2,5	24	6,0 × 10 ⁻⁴
B ₃	25,3	20,1	1,2	24	1,2 × 10 ⁻³
B ₄	25,3	20,1	1,2	24	6,0 × 10 ⁻³
B ₅	25,3	20,1	1,2	24	1,2 × 10 ⁻²
B ₆	25,3	20,1	1,2	24	6,0 × 10 ⁻²
B ₇	25,3	20,1	1,2	24	1,2 × 10 ⁻¹
B ₈	25,3	20,1	0,6	24	3,0 × 10 ⁻¹

4.3.2.1. Composición elemental

A partir de la inspección de los análisis por energía dispersiva de rayos X es posible inferir la composición elemental de todas las muestras (figura 4.11). Todos los espectros describen picos correspondientes a emisiones K_α del Ti a 4,510 keV, L_α en 0,452 keV y un pico satélite destacable en 4,930 keV que corresponde con la configuración electrónica K_β. Asimismo, también es posible

detectar las emisiones energéticas correspondientes a átomos de oxígeno cuya configuración K_α puede apreciarse en 0,523 keV. Debido al soporte de aluminio empleado para sostener las muestras, las señales correspondientes a este elemento también son apreciables en todos los espectros ($Al K_\alpha = 1,486$ keV).

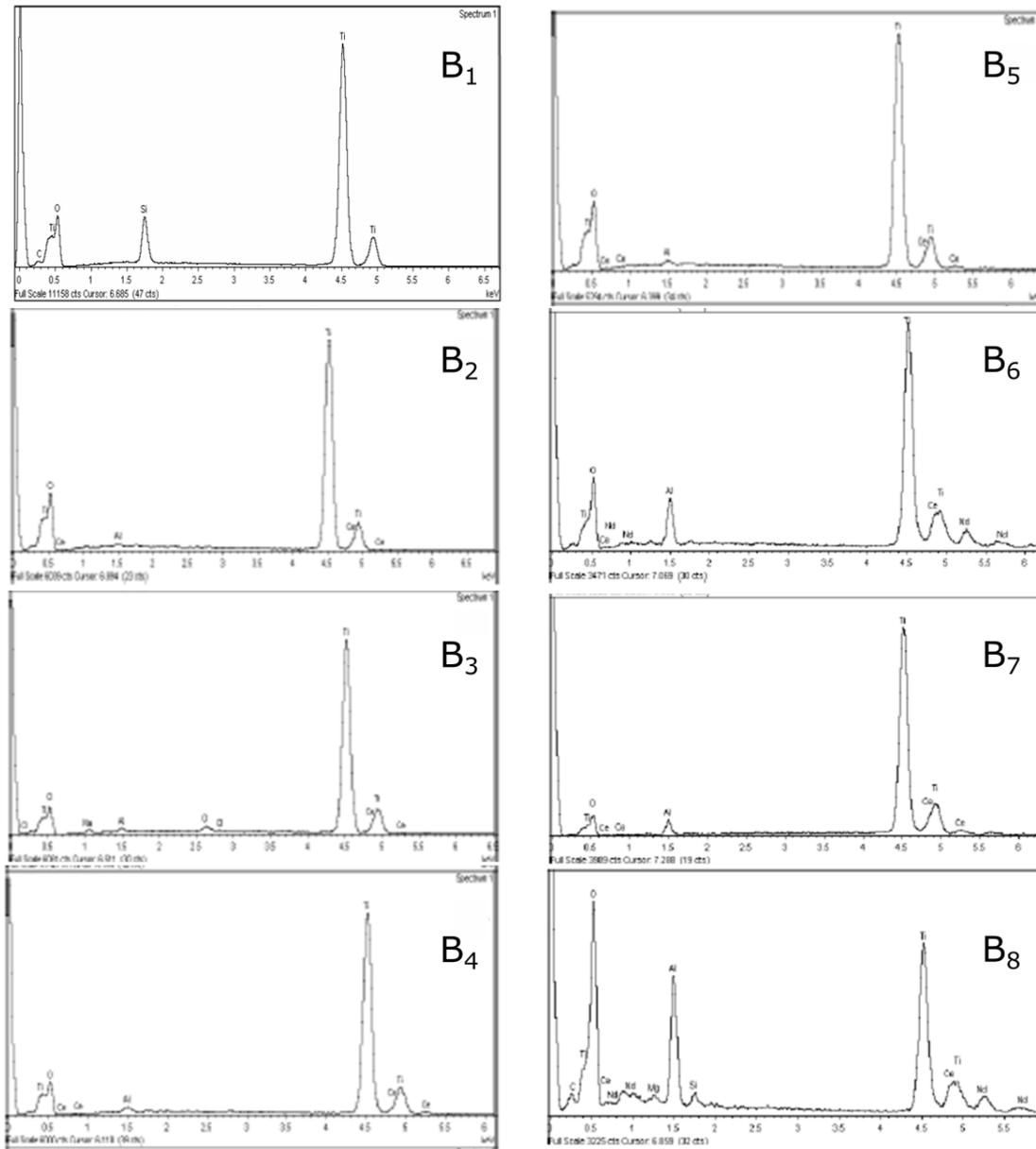


Figura 4.11: Microanálisis por EDX de los materiales $Ce-TiO_2$ tipo FI.

Las dispersiones energéticas correspondientes al cerio son bastante débiles en esta zona del espectro, y sólo pueden apreciarse las configuraciones energéticas L_α que se ubican en 4,839 keV. En general estas señales se encuentran solapadas con las líneas K_β del titanio por lo que su detección es bastante compleja, aún en las muestras más concentradas. Sin embargo, en las muestras más concentradas (esto es, a partir de B_4) es posible observar señales correspondientes a configuraciones

L_{β} del Ce en 5,261 keV; señales al satélite de L_{β} en 5,690 y a configuraciones M en 0,883 y 0,902 keV también son evidentes en el material B_8 .

Es posible concluir que todos los materiales están compuestos principalmente por átomos de titanio y oxígeno y que el cerio sólo se vuelve evidente en concentraciones relativamente elevadas, cuando la relación molar $Ce(Val)_3/TTIP > 6,0 \times 10^{-3}$, lo cual es coherente con los resultados de EDX obtenidos para los materiales B y C en la sección 4.3.1.2, con la salvedad de que en B y C, la cantidad de cerio incorporada durante la síntesis es insuficiente para manifestarse por dispersión de energía de rayos X.

4.3.2.2. Morfología

Esta sección presenta el análisis metodológico de las condiciones de síntesis y su influencia sobre las características estructurales de los materiales B_1 - B_8 . Se evaluó el comportamiento de fases sobre varias condiciones experimentales, observándose que bajo circunstancias específicas, la presencia de cerio induce la formación de estructuras de anatasa estables, cerradas y huecas con características típicas de ensamblajes de tipo fullereno inorgánico (FI) que usualmente son producidas por compuestos con arreglos bidimensionales en capas como los dicalcogenuros metálicos[48]–[51]. A diferencia de los dicalcogenuros metálicos, el dióxido de titanio no forma este tipo de estructuras en capas de tipo fullereno inorgánico espontáneamente, y su obtención generalmente requiere el empleo de procedimientos sintéticos muy elaborados[52]–[59].

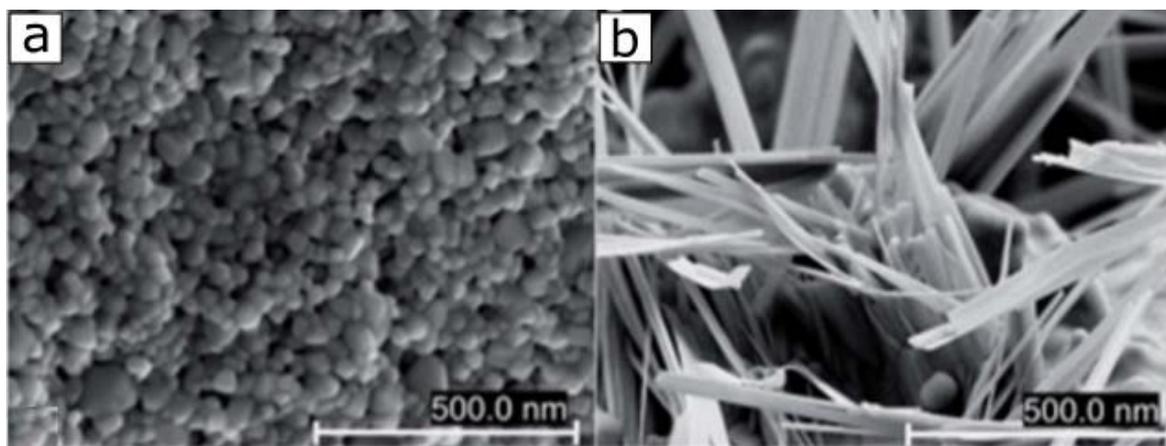


Figura 4.12: Microfotografías electrónicas de barrido representativas de los materiales B_2 (a) y B_8 (b) luego de ser calcinados a 650 °C durante 6 horas en flujo de aire.

La figura 4.12 muestra imágenes representativas de los materiales B_2 y B_8 luego de ser sometidas al proceso de calcinación a 650 °C durante 6 horas en flujo de aire. Las nanopartículas normalmente se muestran agregadas, pero pueden desasociarse fácilmente cuando se las somete a sonicación moderada. Las imágenes del aspecto de estas estructuras tipo fullereno inorgánico

pueden observarse en las imágenes de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (H-TEM), figura 4.13. La estructura en capas y la morfología hueca de estas estructuras tipo FI son bastante evidentes a partir de las fotografías obtenidas, su tamaño y forma, en cambio, son relativamente heterogéneos. La relación molar Ce/Ti, como se analizará más adelante, parece ser la responsable del control de estos parámetros.

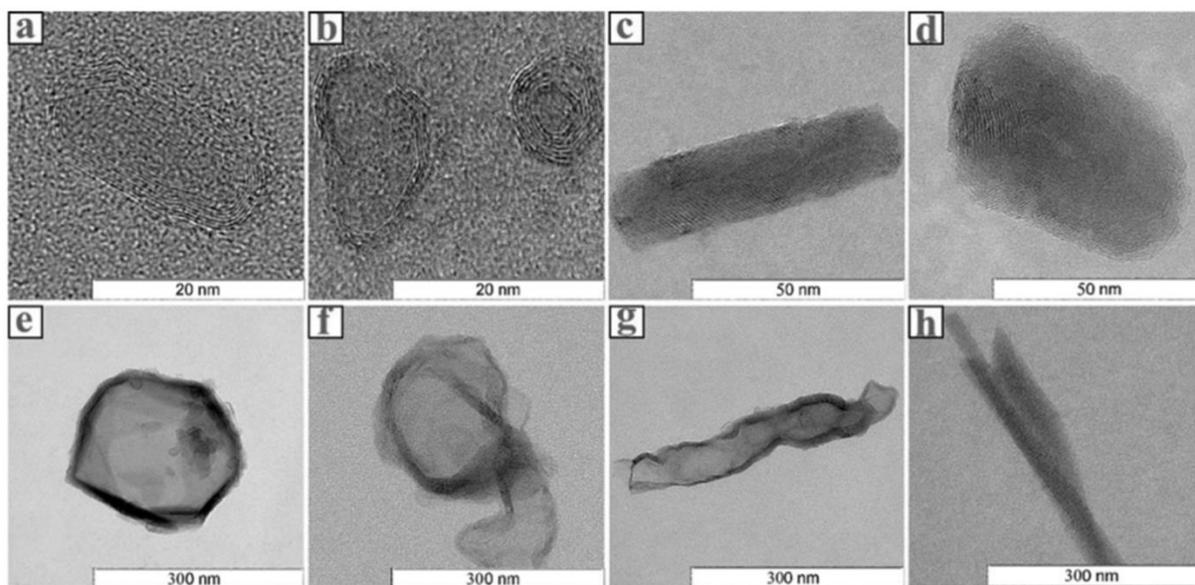


Figura 4.13: Imágenes H-TEM de los diferentes materiales Ce-TiO₂ tipo FI luego del calcinado a 650 °C: (a) B₁, (b) B₂, (c) B₃, (d) B₄, (e) B₅, (f) B₆, (g) B₇ y (h) B₈.

Como se muestra en la figura 4.13 a-d), el número de paredes múltiples que forman las estructuras de tipo cebolla casi-esféricas varía de seis a cincuenta a medida que la relación molar Ce/Ti en el material aumenta hasta 6×10^{-3} . Al mismo tiempo, el tamaño de las nanopartículas también aumenta, por ejemplo, en las muestras B₁ y B₂, la longitud y el ancho de las nanopartículas son aproximadamente 17 nm y 11 nm, respectivamente; mientras que en B₄, las nanopartículas son 58 nm de longitud y 37 nm de ancho. Asimismo, las partículas muestran una reducción en el ancho del espacio interior hueco, de acuerdo con el aumento del número de paredes múltiples. A medida que el contenido de Ce/Ti supera el valor de 6×10^{-3} , aparece una reducción del número de paredes múltiples siendo éstas 20 como máximo, y las estructuras comienzan a alargarse.

La figura 4.13 e-h) permite observar que la longitud de las estructuras de tipo FI se expande hasta 600 nm cuando la relación Ce/Ti aumenta desde 0,012 a 0,3. Evidentemente no es posible una expansión de la estructura FI con una retención simultánea del número de capas cristalinas concéntricas, por lo tanto, las estructuras se hacen más grandes a expensas del número de paredes. De acuerdo con el mecanismo propuesto por Tenne *et al.* [60], [61], la existencia de átomos contaminantes de cerio, posiblemente reduce o elimina la tensión de flexión de las capas de TiO₂ a

través de la formación de estructuras de óxido de cerio en las esquinas. Este efecto, combinado con la evolución del crecimiento del cristal restringido dentro de las gotitas de microemulsión, conduce al crecimiento de estructuras de tipo fullereno pasando de nanopartículas a estructuras alargadas de paredes múltiples. Una inspección cercana de las esquinas de estas estructuras revela la presencia de estructuras cristalinas correspondientes a óxido de cerio, figura 4.14.

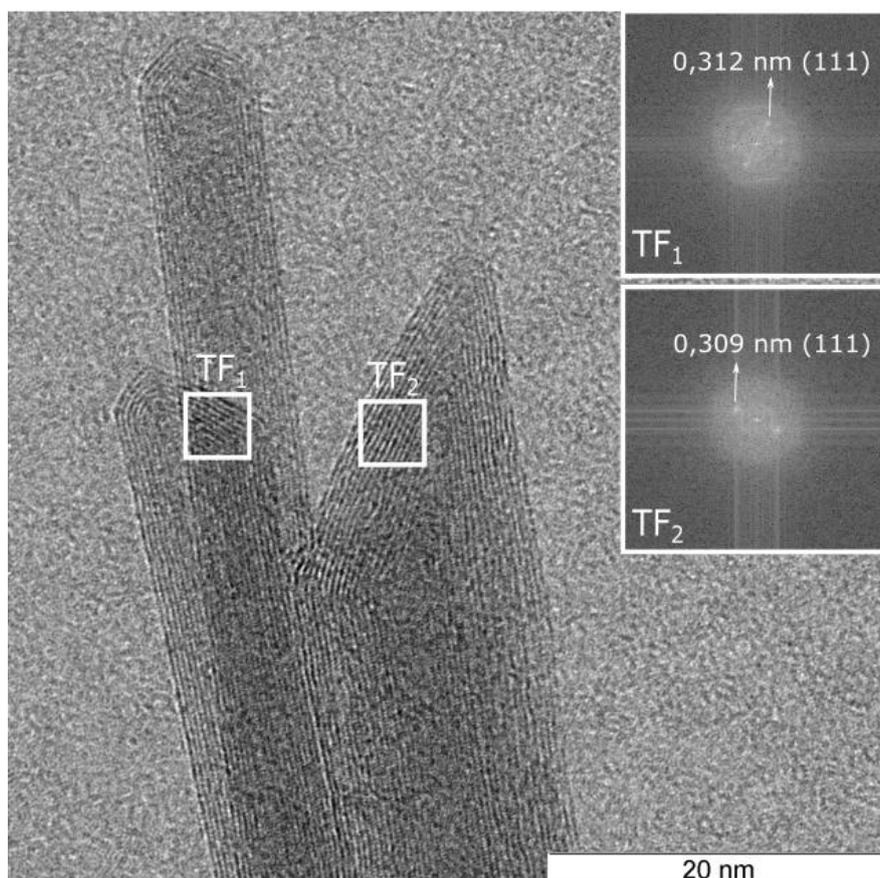


Figura 4.14: Microfotografía H-TEM del material B_8 ($\text{Ce}(\text{Val})_3/\text{TTIP}= 0,3$). El patrón de difracción de electrones de las áreas selectas de la microfotografía extraídos por Transformada de Fourier mediante procesamiento de imágenes evidencia la existencia del plano cristalino principal (111) de óxido de cerio.

La formación de estas estructuras FI en capas se inicia muy temprano durante el proceso de síntesis, cuando, ya en la etapa de la microemulsión, aparece una multitud de planos doblados en diversas direcciones, figura 4.15. Es de esperar que la naturaleza dinámica de las gotas en la microemulsión inversa juegue un papel clave en la formación de estructuras Ce-TiO_2 de tipo fullereno. La formación de este tipo de estructuras implica una alta tensión elástica, característica que puede correlacionarse con la rigidez de la interfase aceite/agua de las microgotas. De manera análoga a lo presentado en la sección 4.3.1.1, podría presumirse, en principio, que esta rigidez impacta directamente sobre la morfología final del material y su microestructura cristalina. Como alternativa, podría proponerse que el crecimiento de estructuras cristalinas curvadas involucraría la

participación de átomos contaminantes en la estructura cristalina[61]. Esta alternativa surge del hecho de que durante el proceso de síntesis de estos materiales de tipo fullereno inorgánico, los átomos de cerio se incorporan a la matriz de dióxido de titanio. Es posible que la presencia de grupos $\text{Ce}(\text{Val})_3$ en la síntesis tenga varios efectos: por un lado, influyen la organización interfacial afectando la compactibilidad de la película de tensioactivo y su estabilidad temporal; por otro lado, también afecta el parámetro de empaquetamiento, modificando el radio de curvatura de las gotas de la microemulsión de manera tal de aumentar la rigidez de la interfase agua/aceite. Al permitir que las moléculas ajusten su área unitaria en función de la curvatura, la interfase sería menos rígida y se curvaría con mayor facilidad, admitiendo la formación de estructuras alargadas en su interior. Este fenómeno, sumado a que la presencia de contaminantes de cerio capaces de formar estructuras de óxido de cerio en las esquinas de las capas de TiO_2 (figura 4.14), sería el responsable del crecimiento de este tipo de estructuras de paredes múltiples de tipo fullereno.

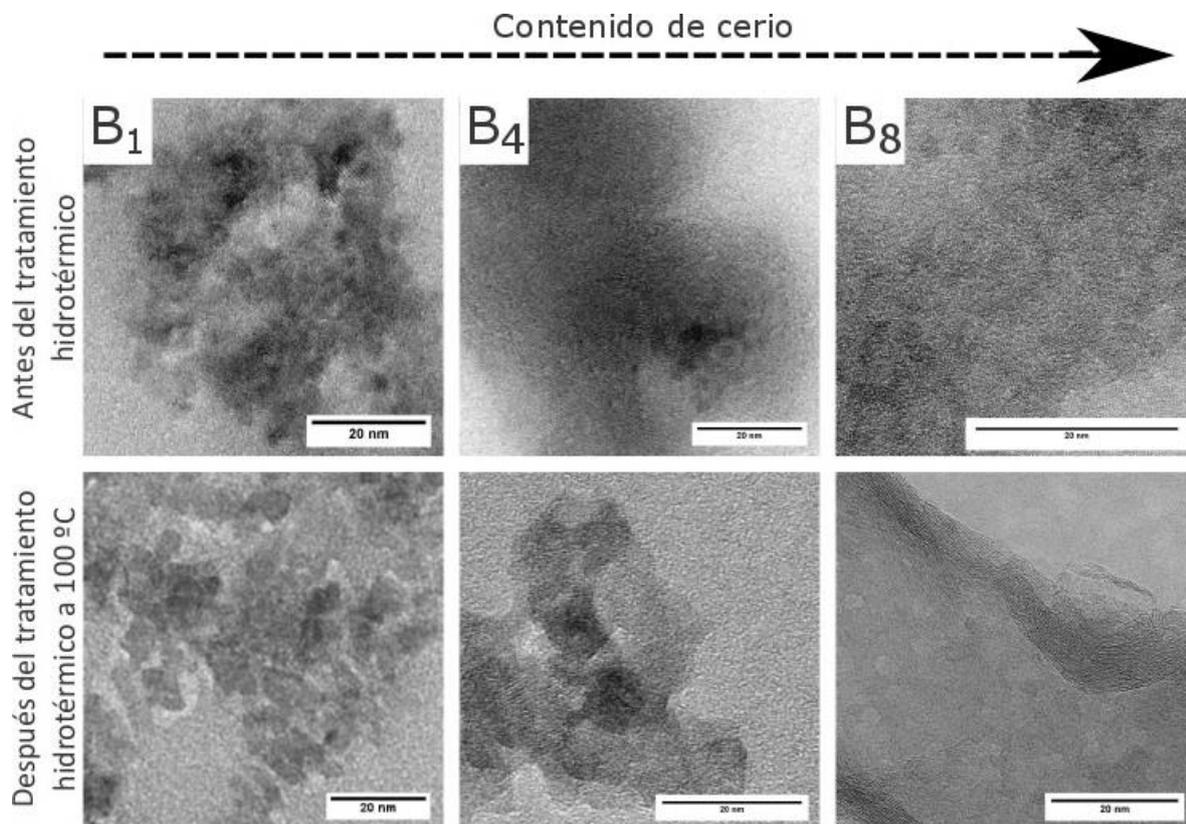


Figura 4.15: imágenes H-TEM de la evolución de las estructuras de tipo FI durante el tratamiento hidrotérmico a distintas relaciones molares Ce/Ti: (B_1) 0, (B_4) $6,0 \times 10^{-3}$ y (B_8) 0,30.

La figura 4.15 también muestra la evolución térmica de estas estructuras de tipo FI cuando son sometidas a tratamiento hidrotérmico. A la temperatura evaluada, los materiales retienen la morfología de tipo multilaminada. Sin embargo, puede observarse que existe un efecto diferente en la organización del material en función de su contenido de cerio. Para el caso del material B_1 (TiO_2 puro), el tratamiento hidrotérmico causa una segregación de la microemulsión y la formación de

estructuras indefinidas donde se pueden observar partículas aisladas con una incipiente forma poliédrica. El aumento en el contenido de cerio, induce la formación de estructuras elongadas, como se mencionó previamente.

Esencialmente, hay dos mecanismos propuestos para la síntesis de nanohilos inorgánicos/nanorodillos mediada por microemulsiones: el crecimiento dirigido por plantillas y el de agregación orientada[21]. En el primero, las gotitas de agua alargadas o canales de agua interconectados juegan el papel de plantilla para inducir la formación de núcleos alargados, que finalmente crecen en nanorodillos cuyas dimensiones son considerablemente más grandes que las de las plantillas que los originaron. En el mecanismo de agregación orientada, la precipitación inicial dentro de las gotitas de agua esféricas resulta en la formación de nanopartículas primarias encapsuladas por surfactante que posteriormente intervienen en la agregación orientada, proceso que implica la fijación lineal y la coalescencia debido a interacciones específicas de los cristales inorgánicos con agentes tensioactivos que conducen al crecimiento de nano-hilos cristalinos. En condiciones hidrotérmicas, generalmente se adopta el mecanismo de agregación orientada porque las micelas inversas pueden ser destruidos bajo estas condiciones de síntesis[21]. Cuando la película es altamente flexible, ha de aclararse que este no es el caso, al someter la microemulsión al tratamiento hidrotérmico, las micelas inversas se rompen como se muestra en el mecanismo de agregación orientada y debido a que su interfase es elástica, los nano-gotitas se fusionan adoptando estructuras bicontinuas[19], [26], [62]. Como resultado, el material obtenido final presentaría una estructura final indefinida o una bicontinua. En contraste, si la película interfacial es altamente inflexible, se lleva a cabo la formación de pequeñas partículas estructuradas, tal es el caso de los materiales B_1 - B_4 . Cuando la película parece ser lo suficientemente flexible, la configuración de canales interconectados se evita y el material inorgánico que crece dentro de las gotitas conduce a la formación de estructuras alargadas cuya expansión se limita a la elasticidad interfacial, tal y como se observa en los materiales B_5 - B_8 .

4.3.2.3. Estructura cristalina de estructuras tipo fullereno inorgánico

En todos los materiales Ce- TiO_2 (B_2 - B_8) con estructura de tipo FI, es posible observar que la distancia interplanar es de $0,34 \pm 0,05$ nm, lo cual se asemeja al espaciado d de los planos (101) de TiO_2 anatasa, figura 4.16.

El análisis de difracción de electrones realizado sobre los materiales Ce- TiO_2 de tipo fullereno permite medir la distancia entre capas y, confirmar así su naturaleza cristalina homogénea, figura 4.16 c). La inspección de los patrones de difracción de rayos X brinda un mayor entendimiento sobre la estructura y composición de estos materiales, como se muestra figura 4.17. Se puede observar en

dicha figura, que luego del calcinado a $650\text{ }^\circ\text{C}$ el material B_1 , formado por TiO_2 puro, cristaliza en forma de una mezcla de sus polimorfos rutilo y anatasa ($F_r = 0,50$), mientras que el resto de los materiales que contienen cerio, B_2 - B_8 , sólo presentan estructura cristalina correspondiente a anatasa (JCPDC 21-1272).

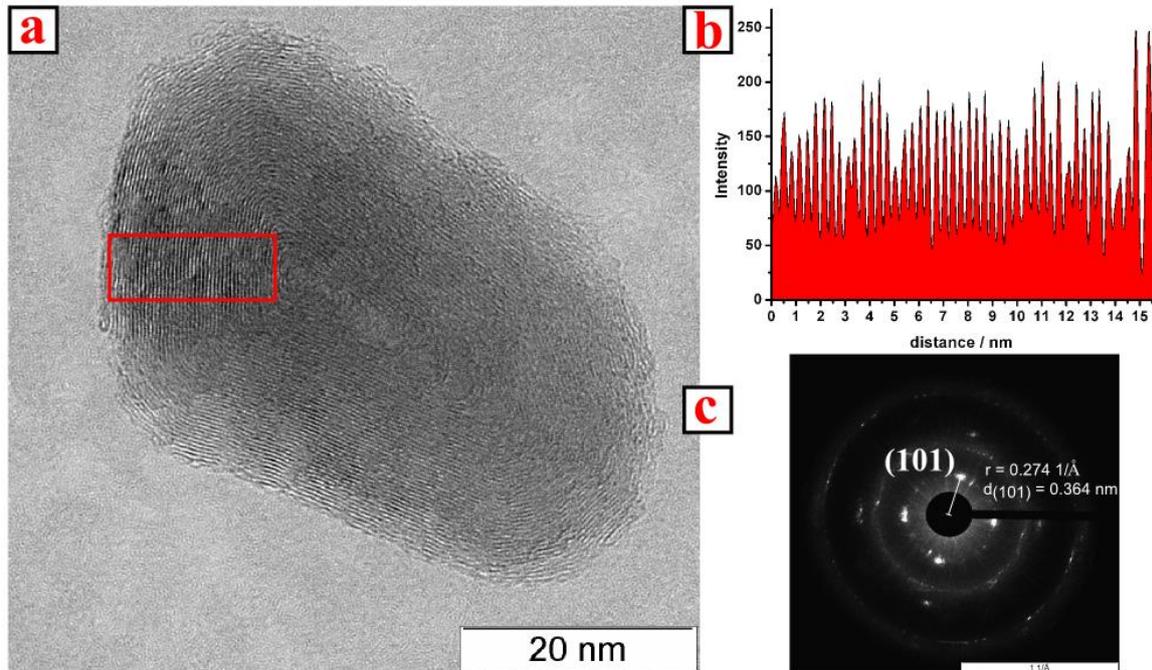


Figura 4.16: (a) Microfotografía H-TEM del material B_4 ($\text{Ce}(\text{Val})_3/\text{TTIP} = 6 \times 10^{-3}$). (b) Perfil del espaciado interplanar. (c) Análisis de difracción de electrones del área seleccionada en (a).

El aumento en el ancho a media altura (*full width at half-maximum*, FWHM) de los picos, así como también la reducción en sus intensidades a medida que aumenta la concentración del dopante, indica una pérdida en la organización cristalina de los materiales.

Debido a que en ningún momento se detectan picos de difracción correspondientes a formas cristalinas del óxido de cerio, es posible conjeturar que el dopante está altamente dispersado en la matriz del TiO_2 , impidiendo la formación de estructuras periódicas detectables mediante difracción de rayos X. Otra evidencia que permite inferir que el dopante se encuentra incorporado en la estructura cristalina del TiO_2 radica en la variación de los parámetros cristalográficos de la celda unidad de anatasa en estos materiales, tabla 4.6.

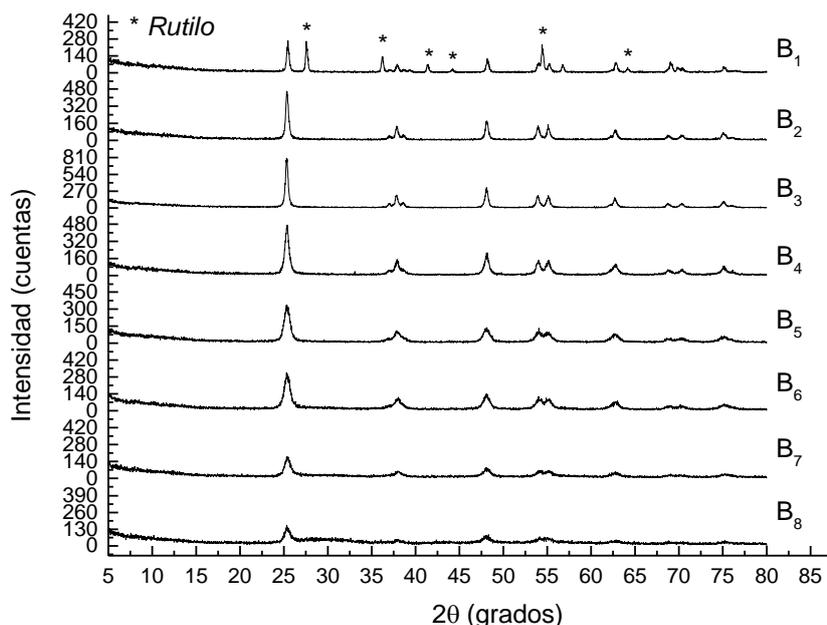


Figura 4.17: Patrón de difracción de rayos X de los materiales Ce-TiO_2 tipo fullereno. Todos los patrones pueden asignarse a reflexiones correspondientes a anatasa, excepto los marcados con (*) que se adjudican a rutilo.

Tabla 4.6: Parámetros cristalográficos de los materiales TiO_2 y Ce-TiO_2 tipo FI (B_1 - B_8), donde a y c son los ejes cristalográficos, V es el volumen de la celda unidad y 2ϕ corresponde al ángulo Ti-O-Ti .

Muestra	Ce(Val) ₃ /TTIP	Parámetros de red			
		a (Å)	c (Å)	V (Å ³)	2ϕ (°)
Anatasa Regular		3,785	9,514	136,308	156,16
B_1	0	3,775	9,540	135,960	156,03
B_2	$6,0 \times 10^{-4}$	3,781	9,530	136,264	156,09
B_3	$1,2 \times 10^{-3}$	3,793	9,503	136,028	156,17
B_4	$6,0 \times 10^{-3}$	3,782	9,449	135,168	156,29
B_5	$1,2 \times 10^{-2}$	3,783	9,403	134,594	156,42
B_6	$6,0 \times 10^{-2}$	3,786	9,335	133,636	156,58
B_7	$1,2 \times 10^{-1}$	3,782	9,214	131,820	156,87
B_8	$3,0 \times 10^{-1}$	3,785	9,215	132,032	156,89

Formalmente, la estructura anatasa es uno de los modelos de red cristalina de tipo 6:3 y se ajusta al sistema tetragonal, grupo espacial $I4_1/amd$, cuya celda unidad convencional contiene cuatro unidades de TiO_2 ($Z=4$), figura 4.18 a). El parámetro interno relacionado con la ubicación de los átomos de oxígeno es la coordenada fraccional u [63]. Los átomos de titanio ocupan la posición de

Wyckoff 4a en $(0, 0, 0)$, y todos los oxígenos son equivalentes y se ubican en la posición 8e $(0, 0, u)$. La estructura usualmente se describe como compuesta de cadenas de octaedros distorsionados de TiO_6 unidos por el vértice y que comparten aristas alternadas. Existen cinco distancias diferentes Ti–O y O–O en estos octaedros que pueden usarse, en conjunto con los parámetros de red, para caracterizar la celda unidad de anatasa: (i) una distancia larga que involucra los dos átomos de oxígeno ubicados a lo largo del eje c (oxígenos apicales), d_{Ti-O}^{ap} ; (ii) una distancia corta, d_{Ti-O}^{eq} , con los otros cuatro oxígenos en posición ecuatorial, que se arreglan formando un tetraedro comprimido a lo largo de uno de sus ejes C_2 ; (iii) d_{O-O}^{eq} , entre los oxígenos ecuatoriales; (iv) d_{O-O}^{sh} , entre un oxígeno apical y uno ecuatorial pertenecientes a aristas compartidas; y (v) d_{O-O}^{ush} , entre un oxígeno apical y uno ecuatorial de aristas no compartidas de los octaedros. Los oxígenos se ubican a lo largo del eje C_2 de triángulos isósceles formados por los átomos de Ti; las distancias entre ellos son dos d_{Ti-O}^{eq} y una d_{Ti-O}^{ap} . El ángulo Ti–O–Ti entre los dos enlaces más cortos se llama 2ϕ (tradicionalmente este ángulo se identifica como θ , sin embargo se ha alterado aquí por ϕ para evitar confusiones con el ángulo de difracción 2θ), figura 4.18 b).

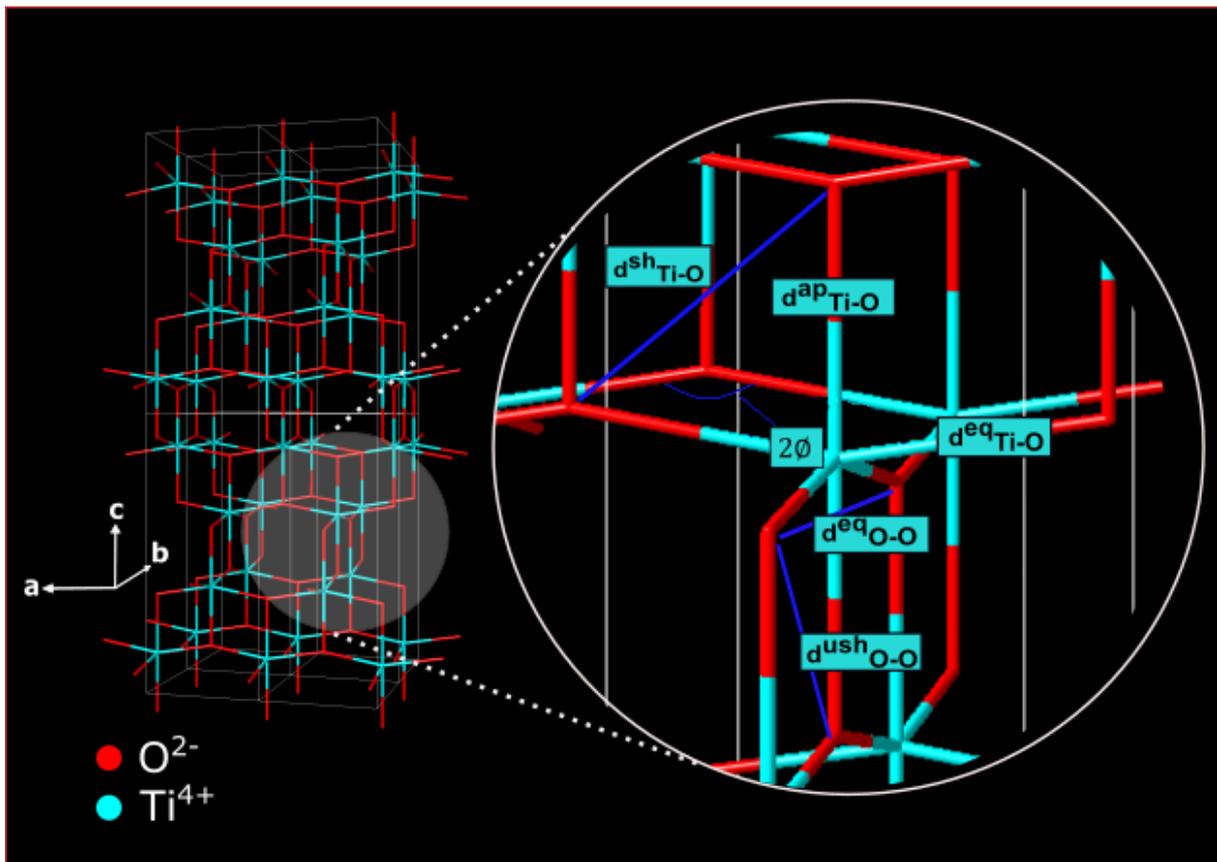


Figura 4.18: Representación esquemática de la celda unidad de anatasa (a) y (b) distancias Ti–O y O–O en el tetraedro regular de anatasa.

El grado de compresión está dado por el parámetro u , cuyo valor experimental para un cristal perfecto de anatasa es 0,208 [64], mientras que la situación plana límite ocurre para $u = 1/4$ [63]. Se analizó el efecto de la incorporación de los átomos de cerio en función de la alteración de las distancias Ti-O y O-O en el octaedro de anatasa, cuyos valores pueden expresarse en función de los parámetros de red a , c y u de acuerdo con las ecuaciones (4.14) a (4.19) [63].

Las distancias Ti-O y O-O fueron calculadas considerando $u = 0,208$ (cristal de anatasa regular) y $u = 0,25$ (condición plana extrema) y los resultados se resumen en la figura 4.19.

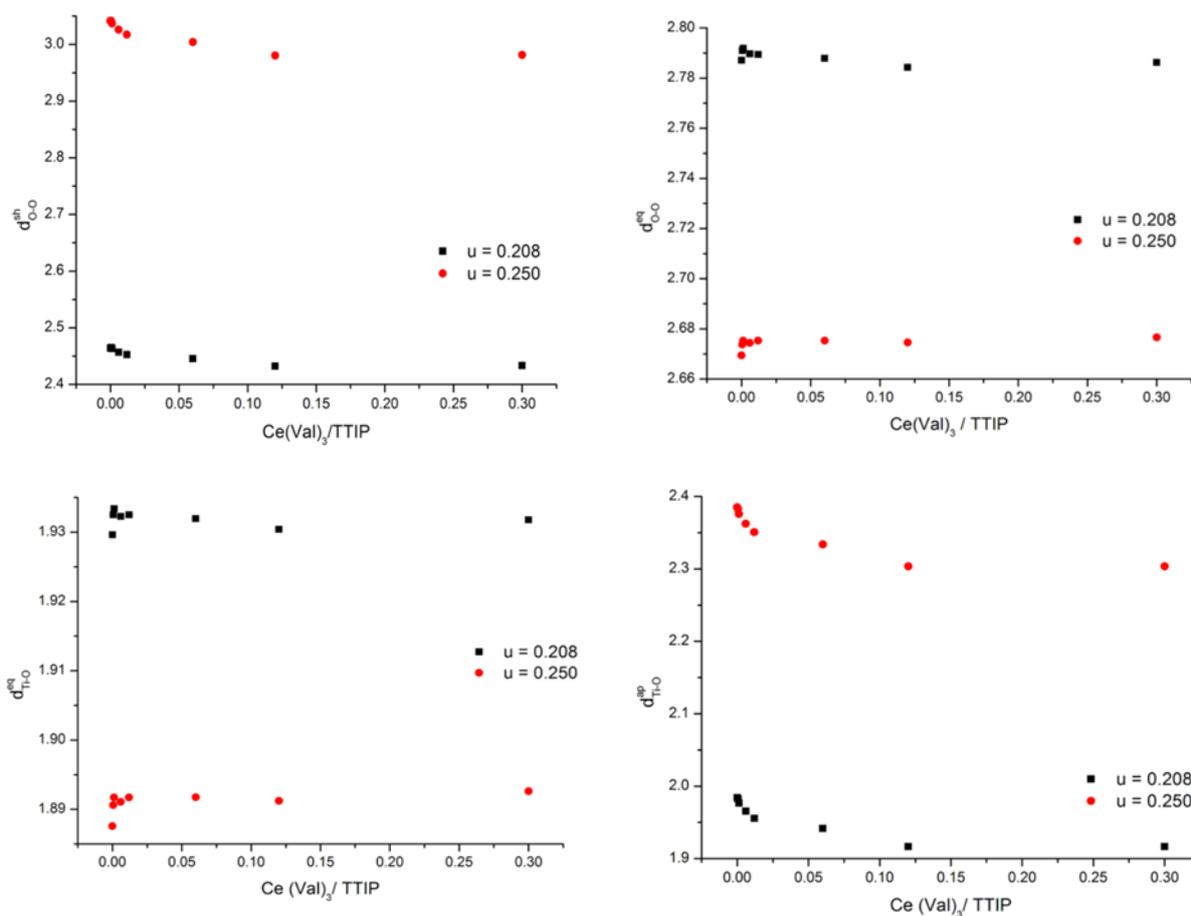


Figura 4.19: distancias interatómicas calculadas para la celda unidad de anatasa considerando $u = 0,208$ (cristal de anatasa regular) y $u = 0,25$ (condición plana extrema). La representación de los dos grupos de valores en función de las relaciones molares $Ce(Val)_3/TTIP$ muestran la misma tendencia.

$$d_{Ti-O}^{ap} = cu \quad (4.14)$$

$$d_{Ti-O}^{eq} = \sqrt{\frac{1}{4}a^2 + c^2\left(u - \frac{1}{4}\right)^2} \quad (4.15)$$

$$d_{o-o}^{eq} = \sqrt{\frac{1}{2}a^2 + c^2\left(2u - \frac{1}{2}\right)^2} \quad (4.16)$$

$$d_{o-o}^{sh} = \sqrt{\frac{1}{4}a^2 + c^2\left(2u - \frac{1}{4}\right)^2} \quad (4.17)$$

$$d_{o-o}^{ush} = \sqrt{\frac{1}{4}a^2 + \frac{1}{16}c^2} \quad (4.18)$$

$$2\phi = 2\arcsin\left(\frac{a}{2d_{Ti-o}^{eq}}\right) \quad (4.19)$$

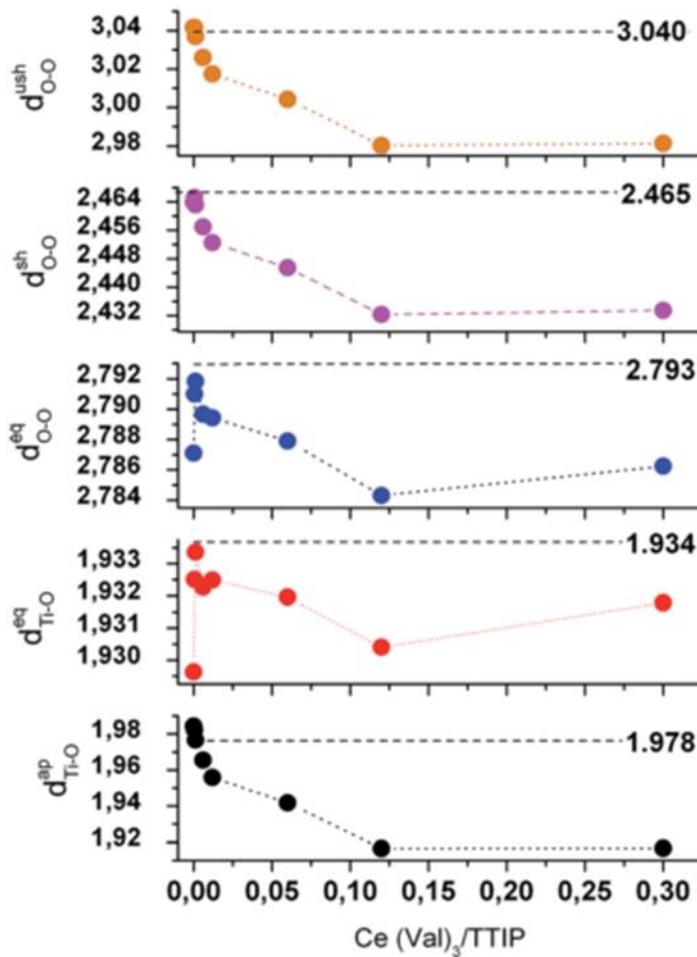


Figura 4.20: Variación de las distancias d_{o-o}^{ush} , d_{o-o}^{sh} , d_{o-o}^{eq} , d_{Ti-o}^{eq} y d_{Ti-o}^{ap} , en función de la relación molar $Ce(Val)_3/TTIP$ calculada considerando $u = 0,208$.

Debido a que los espectros de difracción de rayos X, figura 4.17, y los parámetros de red a y c calculados a partir de ellos, tabla 4.6, son análogos a los obtenidos para la anatasa regular, se asume que el parámetro de compresión u también debería ser similar. Es por ello que las distancias interatómicas calculadas utilizando $u = 0,208$ arroja una mejor representación del sistema real, figura 4.20. Los resultados obtenidos indican que todos los materiales presentan una celda unidad de

anatasa distorsionada. Para el material B_1 , puede verse que, como consecuencia del plegamiento en estructuras de tipo FI, existe un acortamiento del eje a y un incremento de c ; de acuerdo con lo presentado en la figura 4.20, esta distorsión es el resultado de la reducción de las distancias ecuatoriales Ti–O y O–O, y del leve incremento de la distancia apical Ti–O. Esta distorsión persiste con la incorporación de pequeñas cantidades de cerio; cuando la relación molar $\text{Ce}(\text{Val})_3/\text{TTIP} \geq 6 \times 10^{-3}$ aparece una reducción drástica de las distancias tanto ecuatoriales como apicales de Ti–O y O–O; las distancias compartidas y no compartidas de O–O también se observan condensadas. La integración de los átomos de cerio dentro del espacio tetraédrico de la anatasa causa un incremento de aproximadamente 1° en el ángulo Ti–O–Ti. El efecto general de todos estos parámetros se traduce en un acortamiento de la celda unidad a lo largo del eje cristalográfico c , tabla 4.6.

Utilizando el refinamiento estructural a partir del modelado molecular realizado con el software “Crystal Impact Endeavour v. 1.7e” y del método de Rietveld, fue posible construir un modelo del cristal de anatasa en el cual los átomos de cerio se intercalan a lo largo del eje c entre los octaedros ocupados de TiO_6 , figura 4.21 c), con una buena correlación entre los valores experimentales y teóricos (90 % y 95 % para Ce-Anatasa y Anatasa respectivamente).

Entre los lantánidos, el cerio es el único capaz de formar compuestos estables en un estado de oxidación tetravalente (Ce^{4+}). Además, el número de coordinación de los iones Ce^{4+} superficiales puede variar entre cuatro y ocho, mientras que el Ce^{4+} alojado en el seno del material tiene números de coordinación que varían entre seis y ocho[31]. Comparado con lo que ocurre en la anatasa pura, las distancias de los enlaces Ce–O de las estructuras dopadas con cerio son mucho mayores que las de los Ti–O, principalmente debido al hecho de que el radio atómico del Ce es mayor que el de Ti (87 pm versus 74,5 pm para los radios iónicos en cristales de Ce^{4+} y Ti^{4+} respectivamente[65], este hecho indicaría que el dopado con Ce puede inducir modificaciones locales de la estructura relativamente grandes[66].

López *et al.* han sugerido que el cerio afecta las características cristalográficas y de sinterización de compuestos $\text{CeO}_2\text{-TiO}_2$ debido a la segregación progresiva del cerio sobre la superficie del TiO_2 a medida que se eleva la temperatura y por las posibles sustituciones de Ti^{4+} por especies Ce^{4+} dentro de la estructura anatasa del TiO_2 [31], los resultados presentados en esta sección estarían de acuerdo con esta hipótesis y esto explicaría la estabilización térmica frente a la transición de fases que experimentan los materiales dopados con cerio.

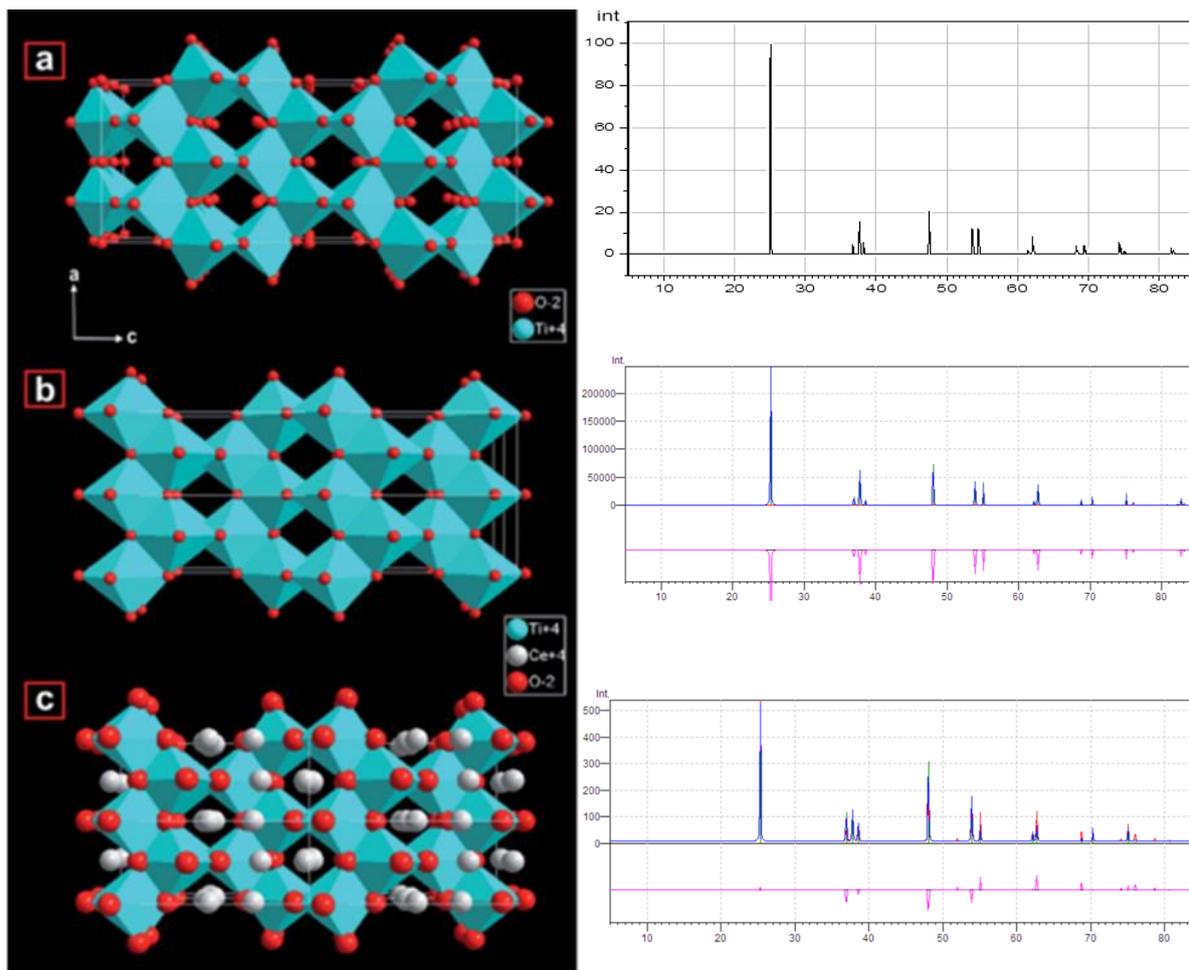


Figura 4.21: Representación esquemática de **(a)** cristal regular de anatasa; **(b)** material B_2 sin considerar la incorporación de cerio en la estructura y **(c)** material B_2 incorporando los átomos de cerio a la red cristalina, ambos **(b)** y **(c)** con sus correspondientes ajustes de Rietveld a la derecha.

La variación de cada distancia Ti–O y su alejamiento de los valores óptimos, implica una expresión de parámetros energéticos que es más evidente que los cambios puramente geométricos [64]. De acuerdo con referencias bibliográficas, la incorporación de átomos de cerio conduce a un decaimiento de los estados 3d del Ti y a un crecimiento de los estados 4f en la base de la banda de conducción [66]. La interacción de electrones en exceso provistos por los orbitales 3d del TiO_2 anatasa [67], con los orbitales f vacíos del CeO_2 [68], probablemente genera la estabilización estructural extra que se requiere para que se compacte el cristal y se pliegue para formar las estructuras de tipo fullereno inorgánico. Para tener una mejor visión de los cambios estructurales en las muestras B_1 - B_8 se utilizó la espectroscopía Raman.

La anatasa tiene seis modos Raman activos: $A_{1g} + 2B_{1g} + 3E_g$. Entre ellos, los tres modos E_g están centrados en 141 , 197 y 640 cm^{-1} ($E_g(1)$, $E_g(2)$ y $E_g(3)$); los dos modos B_{1g} se encuentran en 400 y 515 cm^{-1} ($B_{1g}(1)$ y $B_{1g}(2)$), figura 4.23 c). El modo más fuerte, $E_g(1)$, corresponde a vibraciones angulares simétricas de la red cristalina y es el pico característico de TiO_2 anatasa. Por otra parte, el

rutilo tiene cuatro modos Raman activos: $A_{1g} + B_{1g} + B_{2g} + 3E_g$. B_{1g} se detecta a alrededor de 143 cm^{-1} ; E_g , 447 cm^{-1} ; A_{1g} , 612 cm^{-1} y B_{2g} , 826 cm^{-1} . En virtud de sus mayores intensidades, E_g y A_g son considerados los picos distintivos para el TiO_2 rutilo[69]. Los espectros Raman con transformada de Fourier del material B_1 (TiO_2 puro), figura 4.22, muestra tres bandas intensas centradas a $\nu = 141, 466$ y 614 cm^{-1} que pueden ser atribuidas a los picos característicos de anatasa y rutilo, en tanto que los materiales B_2 - B_8 (Ce-TiO_2), figura 4.22, sólo presentan picos correspondientes a anatasa. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos a partir de los patrones de difracción de rayos X presentados en la figura 4.17.

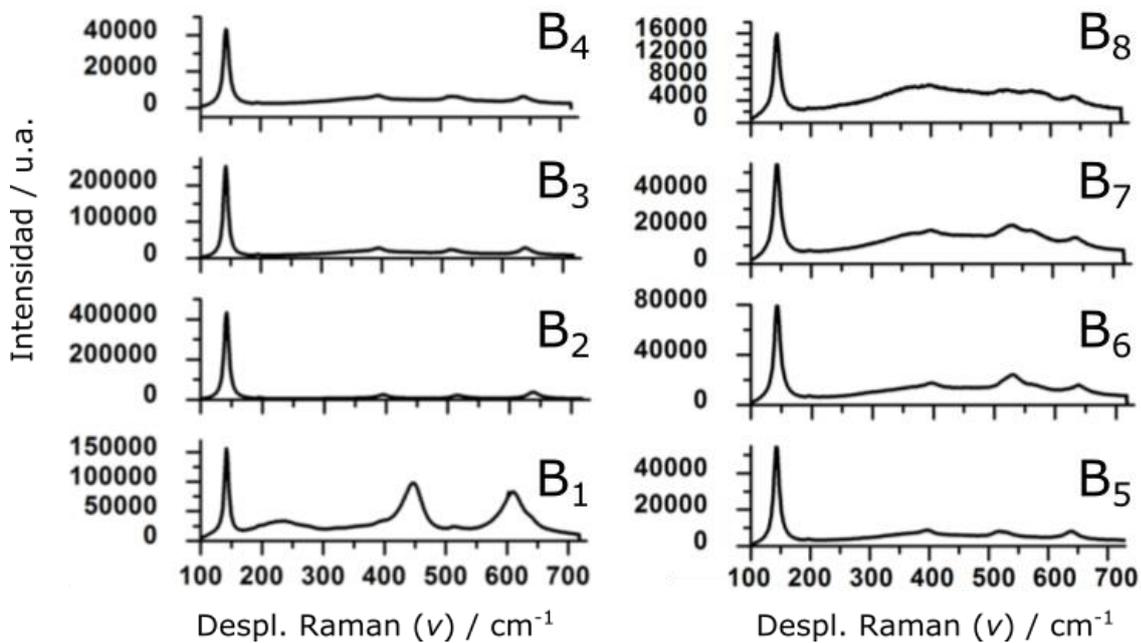


Figura 4.22: Espectros FT-Raman de los materiales B_1 - B_8 .

La figura 4.23 a) muestra la variación de la intensidad del modo vibracional $E_g(1)$, en función del contenido de cerio en los materiales. Como puede observarse, existe una clara reducción de la intensidad del pico Raman debido a la presencia del dopante. Como se mencionó anteriormente, el dopado con cerio provoca una modificación del hábito cristalino que conduce a un incremento en el estrés interno y es debido a eso que las vibraciones de los átomos de la red se restringen, produciendo una disminución en la intensidad de energía dispersada. También puede verificarse la presencia de un corrimiento al azul (hacia mayores frecuencias) del espectro Raman y un ensanchamiento asimétrico de los picos que se pone de manifiesto con el incremento del FWHM, que es proporcional al contenido de cerio. Puede decirse entonces que la presencia del dopante en la matriz de anatasa causa una contracción de la celda unidad, que se traduce en el ensanchamiento asimétrico de los picos, de manera análoga a lo que provoca la reducción del tamaño del cristalito en el efecto conocido como “confinamiento fonónico”[69].

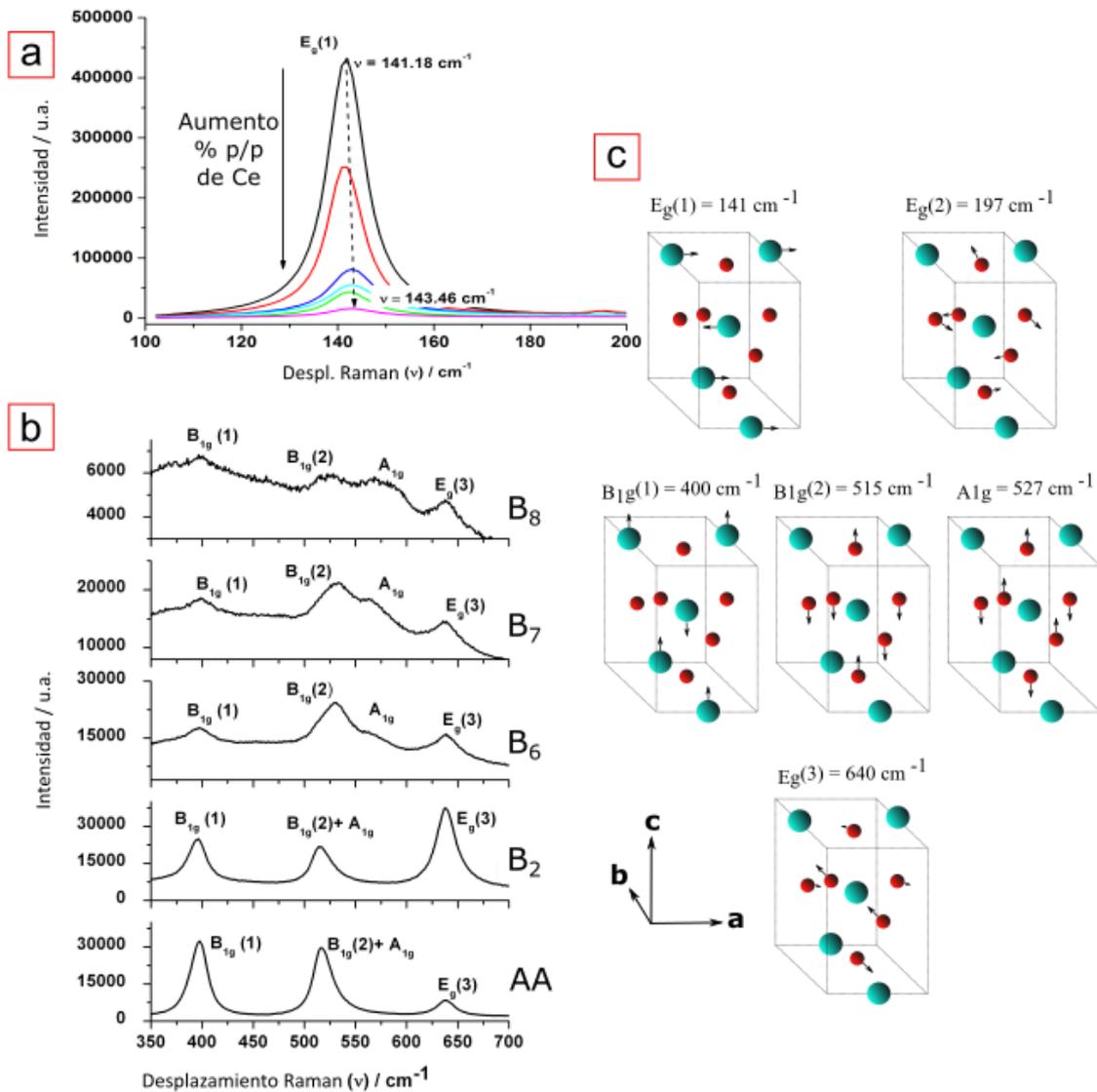


Figura 4.23: (a) Variación de los modos vibracionales Raman en función de diferentes relaciones molares $\text{Ce}(\text{Val})_3/\text{TTIP}$ significativas: E_{g1} y (b) $B_{1g}(1)$, $B_{1g}(2)$ y A_{1g} . (c) Representación esquemática de los modos vibracionales Raman.

El análisis de las distancias Ti–O y O–O realizado a partir de los difractogramas de rayos X, figura 4.20, reveló que la presencia del dopante produce una reducción de la celda unidad de anatasa a lo largo del eje cristalográfico c , debido al acomodamiento de los átomos de cerio entre los octaedros TiO_6 . Esta ubicación afectaría marcadamente a las bandas vibracionales Raman $B_{1g}(1)$, $B_{1g}(2)$ y A_{1g} , que corresponden a las vibraciones de Ti y O en la dirección del eje c [70], figura 4.23 c); de hecho, esta alteración es evidente en la figura 4.23 b), donde se muestra el efecto de la concentración del dopante en los modos vibracionales Raman activos $B_{1g}(1)$, $B_{1g}(2)$ y A_{1g} : cuando el contenido de cerio es bajo, la intensidad de los picos $B_{1g}(1)$, $B_{1g}(2)$ y A_{1g} se ve drásticamente disminuida en comparación con el modo $E_g(3)$ y, de hecho, la relación entre la altura de los picos se invierte en comparación con lo que ocurre en el material en ausencia de cerio. La incorporación de

cantidades crecientes de cerio en la matriz de anatasa produce una segregación de las bandas B_{1g}(2) y A_{1g}, que generalmente se presentan combinadas y son difíciles de separar debido a su posición relativa en el espectro. Resultados similares fueron encontrados por otros autores[71], [72], confirmando así el efecto estabilizador que posee el átomo de cerio sobre la fase anatasa.

4.3.2.4. Propiedades ópticas

Muchos estudios han informado acerca de la fotogeneración de especies reactivas de oxígeno en la superficie de nanopartículas de TiO₂ en soluciones acuosas[73]. La generación *in vivo* de ROS puede dañar virtualmente todos los tipos de biomoléculas orgánicas, incluyendo hidratos de carbono, ácidos nucleicos, lípidos y proteínas que conducen a una destrucción irreversible de los tejidos afectados. La disminución de las emisiones fotoluminiscentes en las nanopartículas de TiO₂ reduciría su capacidad de generar ROS *in vivo*, aumentando así su biocompatibilidad. Teniendo en cuenta las aplicaciones biomédicas que se pretende impartir a los materiales preparados, se evaluaron los cambios en las propiedades fotoluminiscentes inducidos por la presencia del cerio. Los espectros de fluorescencia de los materiales conteniendo cerio fueron obtenidos a 25 °C y λ_{EX}= 220 nm, como se describe en la sección materiales y métodos de este capítulo; anatasa pura (AA) fue utilizada como material de referencia. Los resultados se resumen en la figura 4.24.

La anatasa pura muestra dos bandas de diferente intensidad centradas en 287 nm y 370 nm. El pico en 287 nm es relativamente débil y puede atribuirse a transiciones verticales directas entre electrones foto-inducidos y huecos en la matriz de TiO₂. El pico en 370 nm es de alta intensidad y puede asignarse a la recombinación banda-a-banda porque está cerca de la banda de borde de luminiscencia y/o al excitón atrapado en defectos superficiales[30]. La presencia de átomos de cerio en la estructura de anatasa muestra un efecto notable en las intensidades de las bandas de fotoluminiscencia. En todos los materiales que contienen cerio la banda centrada a 287 nm desapareció mientras que la intensidad de la banda ubicada en 370 nm disminuyó en función del aumento de la proporción Ce/Ti. Una representación de la intensidad porcentual de la banda de 370 nm en función de la relación Ce(Val)₃/TTIP muestra un incremento menor de las emisiones de fotoluminiscencia con las pequeñas incorporaciones de átomo Ce de acuerdo con una disminución del parámetro de red *a* y un incremento del *c* en la celda unidad de anatasa (tabla 4.6). En la relación molar de Ce(Val)₃/TTIP ≥ 6 × 10⁻³ hubo una reducción drástica de ambas distancias Ti—O y O—O, apicales y ecuatoriales; asimismo las distancias *d*_{O—O}^{sh} y *d*_{O—O}^{ush} también se mostraron condensadas, figura 4.20. A partir del análisis de DRX y de la evaluación de las distancias cristalinas Ti—O y O—O, se determinó que la presencia del dopante causó la reducción de la celda unidad cristalográfica anatasa lo largo del eje *c*, debido al encaje de los átomos de cerio entre los octaedros ocupados de TiO₆. Esta

ubicación afectaría notablemente las bandas vibracionales Raman $B_{1g}(1)$, $B_{1g}(2)$ y A_{1g} , que corresponden a vibraciones de Ti y O a lo largo del eje c , como se menciona en la sección anterior. Se supone aquí que esta distorsión de la celda unidad de anatasa es también la causa de la disminución de la intensidad de la banda fotoluminiscente.

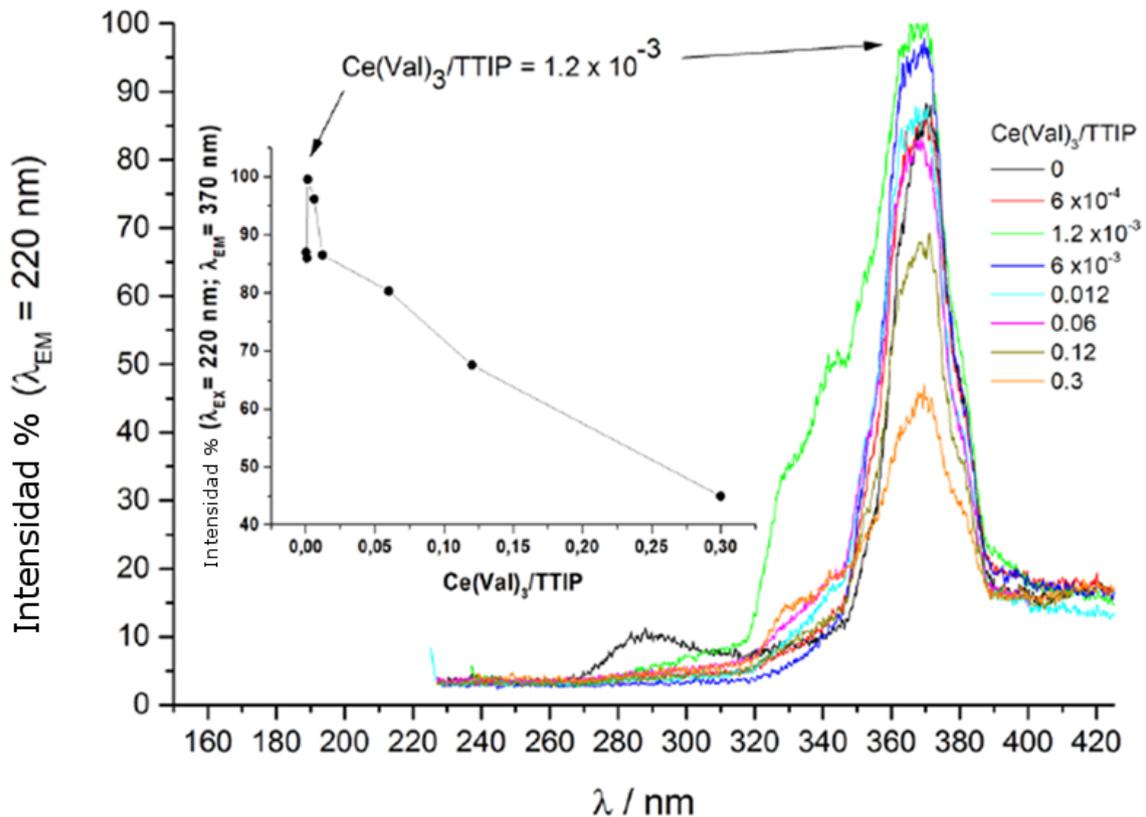


Figura 4.24: Espectros de fotoluminiscencia de los materiales Ce-Anatasa y Anatasa pura obtenidos con $\lambda_{EX} = 220$ nm. La figura insertada representa la variación de la banda de fotoluminiscencia en $\lambda_{EM} = 370$ nm en función de la relación $\text{Ce}(\text{Val})_3/\text{TTIP}$.

4.4. Conclusiones

En este capítulo se describieron las características fisicoquímicas de los materiales obtenidos en el transcurso de este trabajo de investigación, mediante la utilización de un método de síntesis que involucra el uso de microemulsiones como reactores y agentes directores de estructura. Los materiales caracterizados están basados en TiO_2 y su caracterización se agrupó en dos secciones, en función de las condiciones de síntesis empleadas: por un lado se encuentra la serie A, B y C, TiO_2 , Ce- TiO_2 y CeO₂- TiO_2 respectivamente y por el otro se halla el grupo B₁-B₈, que se describe como Ce- TiO_2 de tipo fullereno inorgánico.

El uso de microemulsiones como nanoreactores y la incorporación del cerio en forma de $\text{Ce}(\text{Val})_3$ (material B) permite manipular la organización interfacial de las microgotas de manera tal de

obtener nanopartículas de anatasa tetragonales que se ordenan en arreglos fibrilares de hasta 20 µm de largo por 1-2 µm de ancho. El uso de nanopartículas de cerio como precursor del lantánido, por otro lado, no afecta la organización de las nanopartículas de anatasa formadas (material C) y éstas se organizan irregularmente, de manera análoga al material sin dopar (material A). En todos los casos, la presencia de los átomos de cerio en la red cristalina de TiO₂ provoca la estabilización de la fase anatasa. En los tres casos, el tamaño de partículas oscila entre 20 y 50 nm, no presentan arreglos de mesoporos y sus superficies específicas varían desde 3 a 43 m²/g.

Respecto de los materiales Ce-TiO₂ con estructura tipo fullereno inorgánico, esto es, la serie B₁-B₈, puede concluirse que la presencia del lantánido en la red cristalina del TiO₂ afecta tanto la estructura y la conectividad interatómica como las emisiones fotoluminiscentes de la anatasa. De manera análoga a lo que ocurre durante la síntesis del material B, la incorporación de Ce(Val)₃ como precursor de cerio durante la síntesis en microemulsiones altera la distribución de los planos cristalinos del TiO₂, para dar lugar a capas huecas, cerradas y concéntricas, siendo éste un arreglo que generalmente se restringe a compuestos con estructura bidimensional. La presencia de los átomos de cerio parece ser la fuerza motriz que promueve el plegamiento de las estructuras y la estabilización de la fase anatasa que se observa ya desde etapas tempranas del proceso de síntesis. El tamaño de estas estructuras de tipo fullereno inorgánico puede modularse a través de la manipulación de la relación Ce/Ti durante la síntesis.

4.5. Bibliografía

- [1] S. Hansson and M. Norton, "The relation between surface roughness and interfacial shear strength for bone-anchored implants. A mathematical model.," *J. Biomech.*, vol. 32, no. 8, pp. 829–836, 1999.
- [2] D. D. Deligianni, N. D. Katsala, P. G. Koutsoukos, and Y. F. Missirlis, "Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength.," *Biomaterials*, vol. 22, no. 1, pp. 87–96, 2001.
- [3] H. J. Rønold and J. E. Ellingsen, "Effect of micro-roughness produced by TiO₂ blasting-tensile testing of bone attachment by using coin-shaped implants," *Biomaterials*, vol. 23, no. 21, pp. 4211–4219, 2002.
- [4] M. Svehla, P. Morberg, W. Bruce, B. Zicat, and W. R. Walsh, "The effect of substrate roughness and hydroxyapatite coating thickness on implant shear strength.," *J. Arthroplasty*, vol. 17, no. 3, pp. 304–311, 2002.
- [5] J. Lausmaa, B. Kasemo, and H. Mattsson, "Surface spectroscopic characterization of titanium implant materials," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 44, no. 2, pp. 133–146, 1990.

- [6] L. L. Hench, "Bioceramics: From Concept to Clinic," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 74, no. 7, pp. 1487–1510, 1991.
- [7] D. M. Dohan Ehrenfest, P. G. Coelho, B. S. Kang, Y. T. Sul, and T. Albrektsson, "Classification of osseointegrated implant surfaces: Materials, chemistry and topography," *Trends Biotechnol.*, vol. 28, no. 4, pp. 198–206, 2010.
- [8] A. Hamlekhan, C. Takoudis, C. Sukotjo, M. T. Mathew, and A. Viridi, "Recent Progress toward Surface Modification of Bone / Dental Implants with Titanium and Zirconia Dioxide Nanotubes Fabrication of TiO₂ nanotubes," *J. Nanotechnol. Smart Mater.*, vol. 1, no. 301, pp. 1–14, 2014.
- [9] E. S. Gadelmawla, M. M. Koura, T. M. a Maksoud, I. M. Elewa, and H. H. Soliman, "Roughness parameters," *J. Mater. Process. Technol.*, vol. 123, no. 1, pp. 133–145, 2002.
- [10] G. Chinga, "Structural studies of LWC paper coating layers using SEM and image analysis techniques," Fakultet for naturvitenskap og teknologi, 2002.
- [11] D. Chappard, I. Degasne, G. Hure, E. Legrand, M. Audran, and M. F. Basle, "Image analysis measurements of roughness by texture and fractal analysis correlate with contact profilometry," *Biomaterials*, vol. 24, no. 8, pp. 1399–1407, 2003.
- [12] T. Suganuma, "Measurement of surface topography using SEM with two secondary electron detectors," *J. Electron Microsc. (Tokyo)*, vol. 34, no. 4, pp. 328–337, 1985.
- [13] H. Sato and M. O-hori, "Surface roughness measurement using scanning electron microscope with digital processing," *J. Manuf. Sci. Eng.*, vol. 109, no. 2, pp. 106–111, 1987.
- [14] B. Bhushan, *Principles and applications of tribology*. John Wiley & Sons, 2013.
- [15] M. D. Abràmoff, P. J. Magalhães, and S. J. Ram, "Image processing with ImageJ," *Biophotonics Int.*, vol. 11, no. 7, pp. 36–42, 2004.
- [16] B. D. Cullity, "Stress measurement," *Elements X-ray Diffr.*, pp. 431–453, 1956.
- [17] R. a. Spurr and H. Myers, "Quantitative Analysis of Anatase-Rutile Mixtures with an X-Ray Diffractometer," *Anal. Chem.*, vol. 29, no. 5, pp. 760–762, 1957.
- [18] J. I. Langford and a. J. C. Wilson, "Scherrer after sixty years: A survey and some new results in the determination of crystallite size," *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 11, no. 2, pp. 102–113, 1978.
- [19] J. M. Ruso, A. N. Gravina, N. L. D'Elía, and P. V Messina, "Highly efficient photoluminescence of SiO₂ and Ce-SiO₂ microfibrils and microspheres," *Dalton Trans.*, vol. 42, no. 22, pp. 7991–8000, 2013.
- [20] M. A. Malik, M. Y. Wani, and M. A. Hashim, "Microemulsion method: A novel route to synthesize organic and inorganic nanomaterials," *Arab. J. Chem.*, vol. 5, no. 4, pp. 397–417, 2012.
- [21] L. Qi, "Synthesis of inorganic nanostructures in reverse micelles," *Encycl. Surf. Colloid Sci.*, vol. 2, pp. 6183–6207, 2006.

- [22] M. A. López-Quintela, C. Tojo, M. C. Blanco, L. G. Rio, and J. R. Leis, "Microemulsion dynamics and reactions in microemulsions," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 9, no. 3, pp. 264–278, 2004.
- [23] H. T. Jung, B. Coldren, J. A. Zasadzinski, D. J. Iampietro, and E. W. Kaler, "The origins of stability of spontaneous vesicles," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 98, no. 4, pp. 1353–1357, 2001.
- [24] M. L. Curri, A. Agostiano, L. Manna, M. Della Monica, M. Catalano, L. Chiavarone, V. Spagnolo, and M. Lugarà, "Synthesis and characterization of CdS nanoclusters in a quaternary microemulsion: the role of the cosurfactant," *J. Phys. Chem. B*, vol. 104, no. 35, pp. 8391–8397, 2000.
- [25] P. G. De Gennes and C. Taupin, "Microemulsions and the flexibility of oil/water interfaces," *J. Phys. Chem.*, vol. 86, no. 13, pp. 2294–2304, 1982.
- [26] N. Hassan, V. Verdinelli, J. M. Ruso, and P. V Messina, "Mimicking natural fibrous structures of opals by means of a microemulsion-mediated hydrothermal method," *Langmuir*, vol. 27, no. 14, pp. 8905–8912, 2011.
- [27] B. E. Yoldas, "Hydrolysis of titanium alkoxide and effects of hydrolytic polycondensation parameters," *J. Mater. Sci.*, vol. 21, pp. 1087–1092, 1986.
- [28] J.-K. Park, J.-J. Myoung, J.-B. Kyong, and H.-K. Kim, "Reaction mechanism for the hydrolysis of titanium alkoxides," *Bull. Chem. Soc.*, vol. 24, no. 5, pp. 671–673, 2003.
- [29] K. I. Hadjiivanov and D. G. Klissurski, "Surface chemistry of titania (anatase) and titania-supported catalysts," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 25, no. 1, pp. 61–69, 1996.
- [30] J. M. Ruso, V. Verdinelli, N. Hassan, O. Pieroni, and P. V Messina, "Enhancing CaP biomimetic growth on TiO₂ cuboids nanoparticles via highly reactive facets," *Langmuir*, vol. 29, no. 7, pp. 2350–2358, 2013.
- [31] T. López, F. Rojas, R. Alexander-Katz, F. Galindo, A. Balankin, and A. Buljan, "Porosity, structural and fractal study of sol–gel TiO₂–CeO₂ mixed oxides," *J. Solid State Chem.*, vol. 177, no. 6, pp. 1873–1885, 2004.
- [32] X. P. Cao, D. Li, W. H. Jing, W. H. Xing, and Y. Q. Fan, "Synthesis of visible-light responsive C, N and Ce co-doped TiO₂ mesoporous membranes via weak alkaline sol–gel process," *J. Mater. Chem.*, vol. 22, no. 30, pp. 15309–15315, 2012.
- [33] K. V Baiju, P. Periyat, W. Wunderlich, P. K. Pillai, P. Mukundan, and K. G. K. Warriar, "Enhanced photoactivity of neodymium doped mesoporous titania synthesized through aqueous sol–gel method," *J. Sol-gel Sci. Technol.*, vol. 43, no. 3, pp. 283–290, 2007.
- [34] E. G. Hoffman, C. J. McCauley, and M. I. Hussain, *Shop Reference for Students and Apprentices*. Industrial Press, 2001.
- [35] K. N. Hansson and S. Hansson, "Skewness and Kurtosis: Important Parameters in the

- Characterization of Dental Implant Surface Roughness—A Computer Simulation,” *ISRN Mater. Sci.*, vol. 2011, pp. 1–6, 2011.
- [36] S. P. Timoshenko, “JN Goodier Theory of Elasticity,” *New York, McGraw-Hill*, vol. 5, p. 500, 1951.
- [37] S. Hansson and M. Werke, “The implant thread as a retention element in cortical bone: the effect of thread size and thread profile: a finite element study,” *J. Biomech.*, vol. 36, no. 9, pp. 1247–1258, 2003.
- [38] F. Isidor, “Loss of osseointegration caused by occlusal load of oral implants. A clinical and radiographic study in monkeys,” *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 7, no. 2, pp. 143–152, 1996.
- [39] S. J. Hoshaw, J. B. Brunski, and G. V. B. Cochran, “Mechanical Loading of Brånemark Implants Affects Interfacial Bone Modeling and Remodeling,” *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, vol. 9, no. 3, 1994.
- [40] S. Brunauer, L. S. Deming, W. E. Deming, and E. Teller, “On a Theory of the van der Waals Adsorption of Gases,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 62, no. 7, pp. 1723–1732, 1940.
- [41] J. Rouquerol, D. Avnir, C. W. Fairbridge, D. H. Everett, J. M. Haynes, N. Pernicone, J. D. F. Ramsay, K. S. W. Sing, and K. K. Unger, “Recommendations for the characterization of porous solids (Technical Report),” *Pure Appl. Chem.*, vol. 66, no. 8, pp. 1739–1758, 1994.
- [42] E. P. Barrett, L. G. Joyner, and P. P. Halenda, “The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 73, no. 1, pp. 373–380, 1951.
- [43] M. Takeuchi, K. Sakamoto, G. Martra, S. Coluccia, and M. Anpo, “Mechanism of photoinduced superhydrophilicity on the TiO₂ photocatalyst surface,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 109, pp. 15422–15428, 2005.
- [44] B. Choudhury and A. Choudhury, “Ce 3+ and oxygen vacancy mediated tuning of structural and optical properties of CeO₂ nanoparticles,” *Mater. Chem. Phys.*, vol. 131, no. 3, pp. 666–671, 2012.
- [45] R. A. Gittens, T. McLachlan, R. Olivares-Navarrete, Y. Cai, S. Berner, R. Tannenbaum, Z. Schwartz, K. H. Sandhage, and B. D. Boyan, “The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 13, pp. 3395–3403, 2011.
- [46] M. Geetha, A. K. Singh, R. Asokamani, and A. K. Gogia, “Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants—a review,” *Prog. Mater. Sci.*, vol. 54, no. 3, pp. 397–425, 2009.
- [47] D. Wei, Y. Zhou, D. Jia, and Y. Wang, “Characteristic and in vitro bioactivity of a microarc-oxidized TiO₂-based coating after chemical treatment,” *Acta Biomater.*, vol. 3, no. 5, pp. 817–

- 827, 2007.
- [48] R. Tenne, "Inorganic Nanotubes and Fullerene-Like Materials," *Chem. Eur. J.*, vol. 8, no. 23, pp. 5296–5304, 2002.
- [49] H. Wu, R. Yang, B. Song, Q. Han, J. Li, Y. Zhang, Y. Fang, R. Tenne, and C. Wang, "Biocompatible inorganic fullerene-like molybdenum disulfide nanoparticles produced by pulsed laser ablation in water," *ACS Nano*, vol. 5, no. 2, pp. 1276–1281, 2011.
- [50] G. R. Samorodnitsky-Naveh, M. Redlich, L. Rapoport, Y. Feldman, and R. Tenne, "Inorganic fullerene-like tungsten disulfide nanocoating for friction reduction of nickel-titanium alloys," *Nanomedicine*, vol. 4, no. 8, pp. 943–950, 2009.
- [51] M. Remskar, A. Mrzel, Z. Skraba, A. Jesih, M. Ceh, J. Demšar, P. Stadelmann, F. Lévy, and D. Mihailovic, "Self-assembly of subnanometer-diameter single-wall MoS₂ nanotubes," *Science (80-.)*, vol. 292, no. 5516, pp. 479–481, 2001.
- [52] D. Wang, F. Zhou, Y. Liu, and W. Liu, "Synthesis and characterization of anatase TiO₂ nanotubes with uniform diameter from titanium powder," *Mater. Lett.*, vol. 62, no. 12, pp. 1819–1822, 2008.
- [53] S. Nosheen, F. S. Galasso, and S. L. Suib, "Role of Ti–O Bonds in Phase Transitions of TiO₂," *Langmuir*, vol. 25, no. 13, pp. 7623–7630, 2009.
- [54] T. Gao, H. Fjellvåg, and P. Norby, "Crystal structures of titanate nanotubes: a Raman scattering study," *Inorg. Chem.*, vol. 48, no. 4, pp. 1423–1432, 2009.
- [55] Y. G. Andreev and P. G. Bruce, "Demonstrating structural deformation in an inorganic nanotube," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, no. 30, pp. 9931–9934, 2008.
- [56] L. P. An, X. P. Gao, G. R. Li, T. Y. Yan, H. Y. Zhu, and P. W. Shen, "Electrochemical lithium storage of titania nanotubes modified with NiO nanoparticles," *Electrochim. Acta*, vol. 53, no. 13, pp. 4573–4579, 2008.
- [57] J.-C. Chang, W.-J. Tsai, T.-C. Chiu, C.-W. Liu, J.-H. Chao, and C.-H. Lin, "Chemistry in a confined space: characterization of nitrogen-doped titanium oxide nanotubes produced by calcining ammonium trititanate nanotubes," *J. Mater. Chem.*, vol. 21, no. 12, pp. 4605–4614, 2011.
- [58] Á. Kukovecz, M. Hodos, E. Horvath, G. Radnóczy, Z. Kónya, I. Kiricsi, A. Kukovecz, M. Hodos, E. Horváth, G. Radnóczy, Z. Kónya, and I. Kiricsi, "Oriented crystal growth model explains the formation of titania nanotubes," *J. Phys. Chem. B*, vol. 109, no. 38, pp. 17781–17783, 2005.
- [59] T. Kasuga, M. Hiramatsu, A. Hoson, T. Sekino, and K. Niihara, "Formation of titanium oxide nanotube," *Langmuir*, vol. 14, no. 12, pp. 3160–3163, 1998.
- [60] R. Tenne, "Fullerene-like materials and nanotubes from inorganic compounds with a layered (2-D) structure," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 208, no. 1–3, pp. 83–92, 2002.

- [61] R. Tenne, L. Margulis, M. e a1 Genut, and G. Hodes, "Polyhedral and cylindrical structures of tungsten disulphide," *Nature*, vol. 360, no. 6403, pp. 444–446, 1992.
- [62] A. N. Gravina, J. M. Ruso, J. A. Laiuppa, G. E. Santillán, J. L. Marco-Brown, N. L. D'Elia, and P. V. Messina, "Striped, bioactive Ce–TiO₂ materials with peroxyxynitrite-scavenging activity," *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, pp. 834–845, 2014.
- [63] M. Calatayud, P. Mori-Sánchez, A. Beltrán, A. M. Pendás, E. Francisco, J. Andrés, and J. M. Recio, "Quantum-mechanical analysis of the equation of state of anatase TiO₂," *Phys. Rev. B*, vol. 64, no. 18, p. 184113, 2001.
- [64] A. Fahmi, C. Minot, B. Silvi, and M. Causa, "Theoretical analysis of the structures of titanium dioxide crystals," *Phys. Rev. B*, vol. 47, no. 18, p. 11717, 1993.
- [65] R. D. Shannon, "Acra Crystallogr," *Sect. A*, vol. 32, p. 751, 1976.
- [66] C. Fu, T. Li, J. Qi, J. Pan, S. Chen, and C. Cheng, "Theoretical study on the electronic and optical properties of Ce 3+-doped TiO₂ photocatalysts," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 494, no. 1, pp. 117–122, 2010.
- [67] B. J. Morgan and G. W. Watson, "Intrinsic n-type defect formation in TiO₂: a comparison of rutile and anatase from GGA+ U calculations," *J. Phys. Chem. C*, vol. 114, no. 5, pp. 2321–2328, 2010.
- [68] J. Fang, H. Bao, B. He, F. Wang, D. Si, Z. Jiang, Z. Pan, S. Wei, and W. Huang, "Interfacial and surface structures of CeO₂-TiO₂ mixed oxides," *J. Phys. Chem. C*, vol. 111, no. 51, pp. 19078–19085, 2007.
- [69] C.-H. Yang and Z.-Q. Ma, "Raman spectral analysis of TiO₂ thin films doped with rare-earth samarium," *Appl. Opt.*, vol. 51, no. 22, pp. 5438–5441, 2012.
- [70] O. Frank, M. Zikalova, B. Laskova, J. Kürti, J. Koltai, and L. Kavan, "Raman spectra of titanium dioxide (anatase, rutile) with identified oxygen isotopes (16, 17, 18)," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 14, no. 42, pp. 14567–14572, 2012.
- [71] M. S. P. Francisco and V. R. Mastelaro, "Inhibition of the anatase-rutile phase transformation with addition of CeO₂ to CuO-TiO₂ system: Raman spectroscopy, X-ray diffraction, and textural studies," *Chem. Mater.*, vol. 14, no. 6, pp. 2514–2518, 2002.
- [72] P. Periyat, K. V Baiju, P. Mukundan, P. K. Pillai, and K. G. K. Warriar, "Aqueous colloidal sol–gel route to synthesize nanosized ceria-doped titania having high surface area and increased anatase phase stability," *J. sol-gel Sci. Technol.*, vol. 43, no. 3, pp. 299–304, 2007.
- [73] Y. Li, W. Zhang, J. Niu, and Y. Chen, "Mechanism of photogenerated reactive oxygen species and correlation with the antibacterial properties of engineered metal-oxide nanoparticles," *ACS Nano*, vol. 6, no. 6, pp. 5164–5173, 2012.

Capítulo 5

Bioactividad y adsorción de proteínas

5.1. Introducción

Muchos materiales artificiales que se utilizan para reparar defectos óseos suelen ser encapsulados por un tejido fibroso que los aísla del hueso circundante. En consecuencia, estos materiales no se adhieren al hueso y esto se convierte en un problema crítico para su uso en la regeneración de tejido óseo. Sin embargo, desde principios de los años '70, este problema comenzó a solucionarse con el uso de vidrios bioactivos[1], una nueva generación de materiales capaces de unirse e integrarse espontáneamente con el hueso del paciente. En este punto es interesante detenerse para responder dos interrogantes íntimamente ligados: ¿Qué es un material bioactivo? Y ¿Qué significa que un implante esté osteointegrado?

Comenzando por la última pregunta, el concepto de osteointegración fue definido por Brånemark en 1959, como la existencia de un tejido altamente diferenciado que provee una conexión directa, estructural y funcional entre el hueso vivo y ordenado, y la superficie de un implante sometido a carga funcional[2]. Para ello debe haber, entonces, una interfase implante-hueso caracterizada por una unión química directa del implante con los tejidos circundantes que se posibilita debido a la presencia de iones calcio y fosfato libres en la superficie. A propósito de la bioactividad, en la conferencia de consenso de la Sociedad Europea de Biomateriales que se celebró

en 1987, se definió que un material bioactivo es aquel que ha sido diseñado para inducir una respuesta biológica específica. Entonces, para que los implantes óseos sean considerados bioactivos, deben ser capaces de, en principio, permitir la formación de una capa estable de fosfatos de calcio sobre su superficie que sirva de interfase para permitir la posterior cascada de eventos biológicos tendientes a una osteointegración exitosa.

La bioactividad se evaluaba inicialmente mediante su implantación en animales de experimentación, verificando que se produjera una unión mecánicamente fuerte con el hueso. Actualmente existen diversos ensayos *in vitro* que permiten una evaluación previa de los materiales antes de los ensayos *in vivo*. De esta manera, se ha establecido una relación entre la capacidad de un material de formar una capa de carbonato hidroxiapatita tras sumergirlo en un Suero Fisiológico Simulado (SBF, *Simulated Body Fluid*) y su capacidad para enlazarse a los tejidos vivos[3]. Esto ha convertido a los denominados ensayos de bioactividad *in vitro* en ensayos preliminares para evaluar nuevos materiales candidatos para ser utilizados como implantes.

Actualmente, la mayoría de estos ensayos se realizan en el SBF propuesto por Kokubo *et al.*[4], que es una solución acuosa acelular y aprotéica cuyo pH y composición iónica es similar a la del plasma humano. La composición de esta solución se indica en el apartado 5.2.4. El SBF es usado para reproducir el microambiente biológico en el cual se produce la mineralización ósea y, si bien contiene todos los iones necesarios para la formación de hidroxiapatita (HAp), ésta no precipita espontáneamente en ausencia de agentes de nucleación. Asimismo, la estructura y la composición química de la hidroxiapatita que se formase dependen fuertemente de la naturaleza de solución y de las propiedades del material que actúe como centro de nucleación, tales como su topografía, porosidad, composición química y estructura cristalina[5].

Es importante destacar que el microambiente que se genera en los sitios de implantación es bastante más complejo, especialmente por la presencia de proteínas plasmáticas. Actualmente se sabe que el comportamiento *in vivo* de los biomateriales puede ser diferente de aquel observado en los clásicos ensayos *in vitro* debido a la interacción que puede haber con las macromoléculas presentes en el medio[6]. Como se mencionó previamente, la nucleación y crecimiento de los cristales de hidroxiapatita están termodinámicamente regulados por la supersaturación local y las propiedades del sustrato, sin embargo, las proteínas también juegan un importante rol en este proceso, ya sea por estar disueltas en el medio o adsorbidas a la superficie del implante[7]. De hecho, hay ciertas proteínas que son promotoras de la mineralización ósea *in vivo*, tales como sialoproteína ósea y proteína de la matriz dentinaria I; mientras que otras, como es el caso del colágeno tipo I y la osteopontina, no promueven la mineralización[8].

La adsorción de proteínas en la superficie de biomateriales e implantes médicos en general, es un aspecto esencial en la cascada de eventos que tienen lugar en la interfase entre un material sintético y el entorno biológico. Se sabe que el primer componente en entrar en contacto con un biomaterial insertado quirúrgicamente es el plasma sanguíneo. Cuando esto ocurre, el primer evento en llevarse a cabo en la interfase implante-tejido es la interacción de la superficie del material con iones disueltos y moléculas de agua[9]; inmediatamente después de que se forma esta capa de hidratación, las proteínas sanguíneas empiezan a colonizar la superficie[10].

La adsorción de proteínas sanguíneas influencia, en última instancia, el comportamiento celular: cuando las células alcanzan el sitio de implantación, “exploran” la capa de proteínas que cubre la superficie en busca de factores de activación a los cuales asociarse. De esta manera, la adsorción de proteínas juega un papel fundamental en la integración de un implante con el tejido circundante. El tipo, la cantidad y la conformación de las proteínas adsorbidas juegan un rol primordial en la subsiguiente adhesión, proliferación y diferenciación celular, siendo éstas también capaces de activar procesos inflamatorios o respuestas inmunológicas ante cuerpos extraños[11]. Muchos estudios han demostrado, por ejemplo, que la fibronectina, proteínas morfogénicas óseas y algunos péptidos sintéticos, pueden regular la adhesión celular y subsecuentemente la adhesión del tejido al material implantado, aumentando así la velocidad de regeneración del tejido normal[12]–[14]. Otros reportes también informan que la naturaleza de las proteínas adsorbidas en la superficie del implante afecta la adhesión celular inicial y la fuerza con la que el implante se integrará al tejido[15]. Se sabe que, al adsorberse, las proteínas sufren cambios conformacionales y es la naturaleza de estos cambios la que influye en las interacciones celulares; ha de destacarse entonces que no todos los cambios son beneficiosos para la adhesión celular, por ejemplo, la fibronectina que se desnaturalice al adsorberse a una superficie ya no será capaz de estimular la adhesión y crecimiento de las células[16].

La adsorción de proteínas es un proceso dinámico que involucra interacciones no covalentes tales como fuerzas electrostáticas, hidrofóbicas, puentes hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. Además, tanto las propiedades de las proteínas como las de la superficie del material juegan un papel fundamental en el proceso de adsorción, como se resume en la tabla 5.1. Debido a que las interacciones entre el material y las proteínas siempre ocurren en el medio líquido, la forma correcta de referirse a la frontera entre el material y el medio es interfase y no superficie, dado que esta última se restringe al límite entre fase condensada y fase gaseosa. Por lo tanto, se utilizará esta denominación de ahora en más para describir a la superficie del sustrato cuando éste se estudie en medio acuoso.

Tabla 5.1: Propiedades superficiales y de las proteínas que influyen en el fenómeno de adsorción. (Adaptado de la publicación de Wang et al.[17])

Propiedades de las proteínas que afectan la adsorción	
Propiedad	Efecto
Tamaño	Moléculas más grandes poseen mayor cantidad de sitios de contacto con la interfase.
Carga	Moléculas cerca de su punto isoeléctrico se suelen adsorber más fácilmente.
Estabilidad estructural	Proteínas menos estables, tales como aquellas con menor interacción intramolecular, se pueden desdoblarse más fácilmente generando mayor cantidad de sitios de unión con la interfase.

Propiedades de la interfase que afectan la adsorción	
Propiedad	Efecto
Topografía	Mayor textura expone mayor área interfacial para la interacción con proteínas.
Composición	La identidad química de la interfase determina el tipo de fuerzas intermoleculares que gobernarán la interacción.
Hidrofobicidad	Superficies hidrofóbicas tienden a adsorber más cantidad de proteínas.
Heterogeneidad	Irregularidades en la interfase resultan en dominios que pueden interactuar de distinta manera con las proteínas.
Potencial	Influencia la distribución de los iones en solución y la polaridad de la superficie.

El plasma sanguíneo está compuesto por un gran número de proteínas entre las que se destacan tres grupos mayoritarios: Albúmina ($\approx 55\%$), Globulinas ($\approx 38\%$) y Fibrinógeno ($\approx 7\%$). La hemocompatibilidad de los materiales utilizados en implantes quirúrgicos está directamente relacionada con procesos de adsorción-desorción de proteínas sanguíneas en su superficie. En este trabajo se seleccionó a la albúmina como modelo de estudio por varias razones:

- Es de la proteína más abundante del suero (3,5 – 5 g/dL).
- Sus propiedades fisiológicas, estructurales y estabilidad en reacciones bioquímicas están bien caracterizadas por lo que su uso como modelo de proteína globular está muy generalizado.
- Estudios recientes demostraron que su presencia en la interfase implante-tejido mejora la cicatrización ósea en modelos animales[18].

El alto grado de semejanza que existe entre la Albúmina de Suero Humano y la Albúmina de Suero Bovino, esto es un 88 % de homología en su estructura primaria[19], menos de 1 % de diferencia entre sus pesos moleculares e idénticos puntos isoeléctricos [20], además de su alta disponibilidad y bajo costo, hacen que esta última sea un sustituto ampliamente utilizado en el estudio de adsorción de proteínas. Por todas estas razones se selecciona la Albúmina de Suero Bovino como modelo experimental para este trabajo.

Los objetivos de este capítulo pueden resumirse en tres pilares fundamentales:

- Evaluar el efecto de la topografía y estructura cristalina que los materiales tienen sobre la naturaleza de los depósitos de fosfatos de calcio (CaP) que puedan formarse en presencia de SBF.
- Determinar el grado de afinidad de los materiales por la proteína plasmática más abundante en el sitio de implantación.
- Estudiar el efecto de la presencia de albúmina, en la morfología, composición y cristalinidad de los precipitados de CaP.

5.2. Materiales y Métodos

5.2.1. Reactivos

Para la preparación del suero fisiológico simulado y de la solución salina regulada por fosfatos, se emplearon los siguientes reactivos: Cloruro de sodio (NaCl, PM = 58,4 g/mol, 99,5 % Sigma), bicarbonato de sodio (NaHCO₃, PM= 84,007 g/mol, 99,5 % Sigma-Aldrich), cloruro de potasio (KCl, PM= 74,5513 g/mol, 99,5 % Sigma-Aldrich), fosfato dipotásico trihidratado (K₂HPO₄·3H₂O, PM= 228,23 g/mol, 99 % Sigma-Aldrich), fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄, PM= 141,96 g/mol, 99,95 % Sigma-Aldrich), cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl₂·6H₂O, PM= 197,211 g/mol, 98 % Sigma-Aldrich), cloruro de calcio (CaCl₂, PM= 110,98 g/mol, 95 % Sigma-Aldrich), sulfato sódico (Na₂SO₄, PM= 142,04 g/mol, 99 % Sigma-Aldrich), Tris (CH₂OH)₃CNH₂, PM= 121,1350 g/mol, 99 % Sigma-Aldrich), ácido clorhídrico (HCl, PM= 36,46 g/mol, 30,0-34,0 % Cicarelli), hidróxido de sodio (NaOH, PM= 40,00 g/mol, 97 %, Sigma-Aldrich) agua bidestilada. La albúmina de suero bovina, *Bovine Serum Albumin* (SBA, fracción V, 66000 g/mol, 98 %) fue obtenida de Carl Roth. Dióxido de titanio en fase anatasa pura y en forma de nanopolvo (TiO₂, PM= 78,87 g/mol, 99,7 %) fue adquirido en Sigma-Aldrich.

5.2.2. Instrumental

Microscopía electrónica de barrido, *Scanning Electron Microscopy (SEM)*: Esta técnica se realizó empleando dos microscopios, el primero marca ZEISS FE-SEM ULTRA PLUS con EDX, operado con un voltaje de aceleración de 3,00 kV (WD: 2,1 mm). Se aplicó compensación de carga local mediante la inyección de gas nitrógeno y las imágenes fueron adquiridas mediante un detector “*in lens*” de electrones secundarios. El microanálisis por dispersión de energías de rayos X (EDX) fue realizado con el mismo instrumento. Algunas microfotografías también fueron adquiridas empleando un microscopio marca LEO modelo EVO 40 XVP, operado a 10,00 kV (WD: 7,0 – 9,0 mm).

Espectroscopía UV-Visible: Los ensayos de adsorción de albúmina en los materiales A, B y C fueron llevados a cabo utilizando esta técnica. Para ello se registró la absorbancia en función del tiempo empleando un espectrofotómetro UV-Vis modelo Agilent Cary 60, trabajando en condiciones normales de presión y temperatura y $\lambda_{\max} = 280$ nm.

5.2.3. Ensayo de adsorción de albúmina

Para evaluar la adsorción de albúmina sobre los materiales A, B y C se seleccionó una concentración de BSA = 1 mg/mL. La concentración fue seleccionada en virtud de lo informado por otros autores para estudios equivalentes[21], [22] y en vistas de ensayos preliminares realizados durante este trabajo, en los que la adsorción de proteínas realizada a concentraciones iniciales mayores no suscitan cambios apreciables con la técnica de detección empleada. Antes de realizar el ensayo de adsorción, se confeccionó una curva de calibrado de BSA en solución salina regulada por fosfatos (PBS 1X, *Phosphate Buffered Saline*, preparado de acuerdo con procedimientos estándares[23]), utilizando concentraciones de albúmina de 50, 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 $\mu\text{g/mL}$. Se registró la absorbancia UV-Vis espectrofotométricamente a la longitud de onda de absorción de los aminoácidos aromáticos Tirosina (Tyr) y Triptófano (Trp), que tiene lugar a $\lambda_{\max} = 280$ nm[24], en una cubeta de cuarzo de 0,5 cm de paso óptico.

Para realizar el ensayo de adsorción se disolvió una cantidad adecuada de BSA en PBS 1X para lograr una concentración final de 2 mg/mL. También se pesaron 20 mg de material que se transfirieron inmediatamente a una cubeta de cuarzo de 0,5 cm de paso óptico y se agregaron 0,5 mL de PBS 1X, la suspensión se dejó reposar para permitir que el material se asiente en el fondo de la cubeta y evitar así errores en la medida de absorbancia causados por fenómenos de dispersión. La cubeta se colocó en un espectrofotómetro UV-Vis, se configuró la longitud de onda de absorción a 280 nm y se agregaron 0,5 mL de la solución de BSA preparada con anterioridad. Inmediatamente después se comenzó a registrar la absorbancia cada 0,5 segundos durante 90 minutos. Usando el coeficiente de absorción determinado a partir de la pendiente de la curva de calibrado de BSA en

PBS 1X, es posible calcular la cantidad de albúmina en el sobrenadante en función del tiempo a partir de las medidas de absorbancia, usando la ecuación: $A = \epsilon b c$, donde A es la absorbancia, ϵ es el coeficiente de absorción, b es el paso óptico y c es la concentración de albúmina. La cantidad de albúmina adsorbida se calcula a partir de:

$$\Gamma \left(\mu\text{g}/\text{m}^2 \right) = \frac{(C_0 - C) \times V}{m \times S} \quad (5.1)$$

donde Γ es la densidad de proteína adsorbida, C_0 es la concentración inicial, C es la concentración en el tiempo t , V es el volumen de la solución, m la masa del adsorbente y S es el área BET del adsorbente (informada en la sección 4.3.1.4). Los resultados se expresan como μg de proteína adsorbida por m^2 de material. El ajuste de los datos experimentales se realizó utilizando un modelo asintótico cuya fórmula se describe de la siguiente manera:

$$y = a - b \times c^x \quad (5.2)$$

donde a es la asíntota horizontal, b es el rango de respuesta y c es el parámetro correspondiente a la velocidad; x e y son las variables independiente y dependiente, respectivamente.

5.2.4. Ensayo de bioactividad

Para realizar en ensayo de bioactividad, los materiales A, B y C se mantuvieron en contacto con Suero Fisiológico Simulado. La solución fue preparada de acuerdo con el procedimiento descrito por *Oyane et al.*[25], posteriormente estandarizado en la norma ISO 23317:2014[26], utilizando reactivos de grado analítico y trabajando a 37 °C bajo agitación constante. Para la realización de este ensayo se emplea una solución SBF 1,5X que se preparó haciendo las correcciones necesarias en las cantidades de reactivos sugeridas por los protocolos originales para la preparación de SBF 1X. A partir de aquí, cada vez que se haga referencia al suero fisiológico simulado, ha de entenderse que se trata de la solución 1,5X, a menos que se aclare lo contrario.

A continuación se describe brevemente cómo se realizó el ensayo de bioactividad propiamente dicho: 5 mg de cada material se sumergieron en 3 mL de SBF y las suspensiones se mantuvieron en baño termostático a 37 °C por períodos de 1, 3, 6, 10, 15, 20, 30, 65 días, figura 5.1. Como controles negativos se evaluaron dos condiciones simultáneamente: por un lado se mantuvo la solución en un tubo de polietileno igual a los utilizados en el ensayo y se consideró al mismo como válido al constatarse la ausencia de precipitados sobre las paredes del tubo al final del experimento; por otro lado, se realizó un control de bioactividad negativo utilizando una muestra de anatasa comercial pura (AA) que se trató bajo las mismas condiciones que los materiales A, B y C. Luego del tratamiento, las muestras fueron removidas de la solución, enjuagadas con agua destilada y secadas a 37 °C. Finalmente, los polvos obtenidos fueron analizados mediante microscopía electrónica de

barrido (SEM) y microanálisis por dispersión de energías de rayos X (EDX) para evaluar la formación de la capa de fosfatos de calcio sobre la superficie.

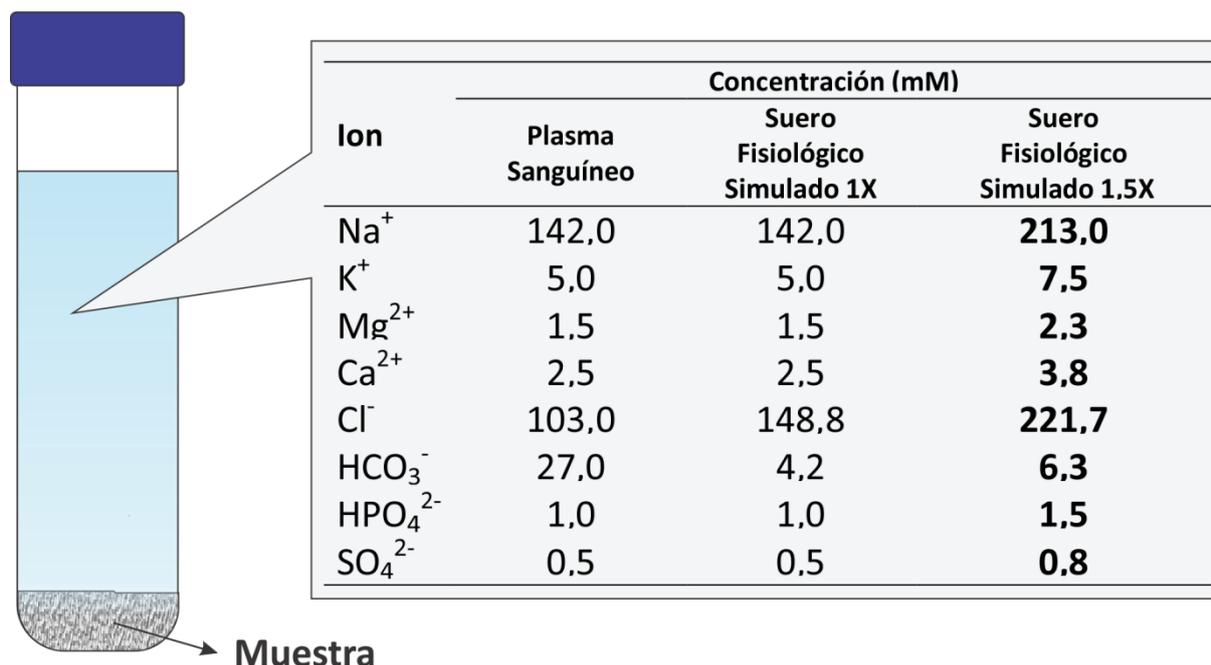


Figura 5.1: Esquema del ensayo de bioactividad. La tabla muestra la composición iónica del Suero Fisiológico Simulado y del plasma sanguíneo humano.

5.2.5. Ensayo de bioactividad en presencia de albúmina

Para evaluar el efecto de la presencia de albúmina en el estudio de la bioactividad, se ensayaron dos condiciones experimentales, una en la que la proteína de encuentra disuelta en el SBF (i) y la otra en la que la albúmina de adsorbe a los materiales antes de su inmersión en SBF (ii). Independientemente de la condición ensayada, el suero fisiológico simulado se preparó de la misma manera que en el apartado anterior:

- (i) En esta condición se prepara una solución de BSA en SBF de concentración 1mg/mL y se sumergen 5 mg de cada material en la misma. El ensayo se realiza en tubos de polietileno, y se procede de manera equivalente al ensayo de bioactividad descrito en la sección anterior. Los tubos se mantienen en baño termostático a 37 °C durante 10 días.
- (ii) La adsorción de albúmina a los materiales A, B y C se realiza por inmersión de 5 mg del material en una solución de BSA en PBS 1X de concentración 1 mg/mL durante 3 horas para asegurar que la adsorción alcance un valor de saturación. A continuación se remueve el sobrenadante, se enjuaga cuidadosamente con PBS para eliminar la proteína en exceso, se agregan 3 mL del Suero Fisiológico Simulado y se coloca en baño termostático a 37 °C por 10 días.

La estabilidad de la albúmina en solución se controló espectrofotométricamente, verificándose la ausencia de cambios en el espectro UV de la solución registrado al principio y al final del ensayo. De la misma manera se controló que el pH del SBF en presencia y en ausencia de albúmina tampoco variase. Se consideró válido el ensayo al cumplirse estas dos condiciones y al constatar que los tubos control (sin material) no presentasen precipitados visibles.

5.2.6. Análisis estadístico

Para el estudio de los parámetros de rugosidad, las diferencias estadísticas entre el material y sus respectivos tratamientos se determinó usando el test T de Student a una cola, considerando que valores de $p > 0,05$ son no significativos. Los datos cuantitativos se expresaron como promedio \pm desvío estándar para tres medidas.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Bioactividad

La capacidad de un material para enlazarse con el tejido óseo es un fenómeno conocido como bioactividad y se evalúa rutinariamente verificando si el material es capaz de inducir la formación de una capa de hidroxiapatita en su superficie cuando se lo sumerge en suero fisiológico simulado, una solución cuya concentración iónica es prácticamente equivalente a la del plasma sanguíneo[25]. En esta sección la examinación de la formación de una capa de hidroxiapatita sobre la superficie de los materiales expuestos a SBF se realizó mediante inspección con microscopía electrónica de barrido. La figura 5.2 muestra imágenes representativas de los resultados obtenidos luego de la inmersión en SBF durante 1, 6 y 10 días, imágenes de los materiales antes del tratamiento (día 0) se muestran con fines comparativos. En los tres materiales puede observarse la formación de depósitos de aspecto esférico sobre su superficie; el microanálisis por EDX realizado sobre estos depósitos revela que están compuestos principalmente por calcio, fósforo y oxígeno, donde la relación atómica Ca/P es muy cercana a la de la hidroxiapatita estequiométrica ($\text{Ca/P} \approx 1,67$), figura 5.3.

En condiciones fisiológicas, el fluido extracelular no se encuentra suficientemente supersaturado respecto de hidroxiapatita, por lo que el mineral no precipita espontáneamente; para lograr la mineralización ósea, osteoblastos y condrocitos actúan en conjunto formando vesículas de matriz extracelular que sirven como microambiente en el cual los iones calcio y fosfato pueden aumentar su concentración de manera suficiente como para inducir la precipitación de los cristales de HAp[8]. Muchos autores recomiendan la utilización de SBF 1X en el estudio de la bioactividad de materiales[3], [27], [28], sin embargo esto podría dar lugar a la obtención de resultados falsos

negativos (esto es, categorizar a un material como no bioactivo por no ser capaz de inducir la precipitación *in vitro* de HAp cuando en realidad sí puede unirse al tejido óseo en modelos *in vivo*, tal y como se observa en ciertos carbonatos de calcio o β -fosfato tricálcicos[26]). En virtud de lograr un modelo experimental más cercano a lo que ocurre durante la mineralización ósea en sistemas biológicos, se decidió emplear un suero fisiológico simulado cuya concentración iónica es 1,5 veces superior a la del plasma sanguíneo.

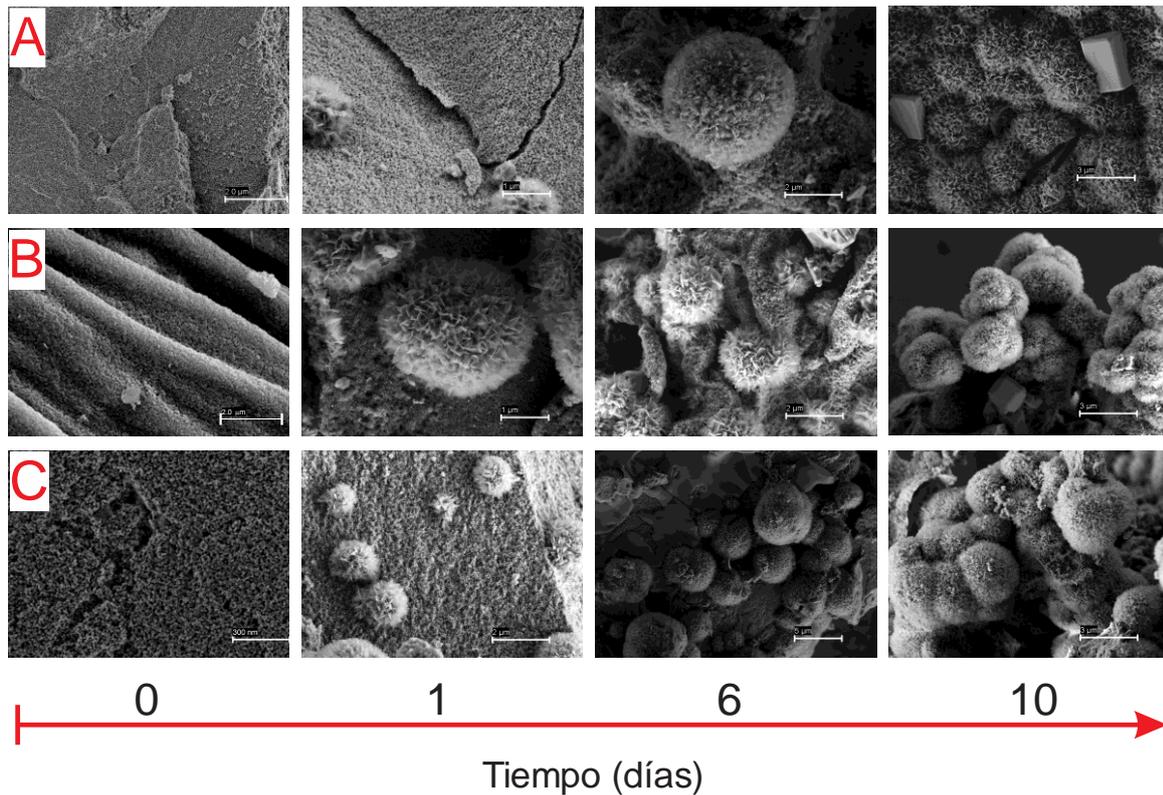
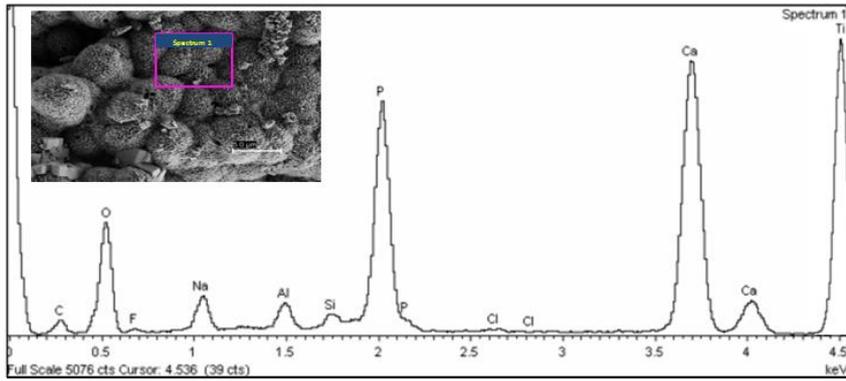


Figura 5.2: Microfotografías electrónicas (SEM) de los materiales y sus depósitos de HAp formados luego de 1, 6 y 10 días de incubación en SBF a 37°C.

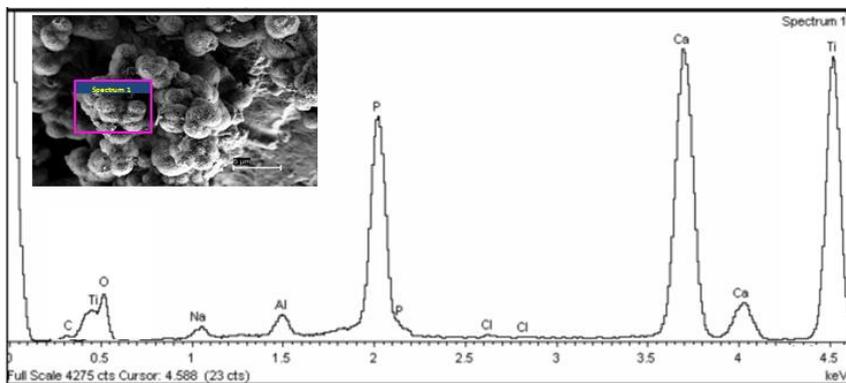
Sería posible criticar la selección de estas condiciones experimentales argumentando que el sistema SBF 1,5X está sobresaturado respecto de apatita, que es metaestable y que es cuestión de tiempo para que evolucione hacia el equilibrio termodinámico induciendo la precipitación espontánea de cristales de apatita[7], [29]. Es por ello que se utilizó un control de bioactividad negativo, esto es, una muestra de anatasa comercial (AA) cuya ausencia de bioactividad fue confirmada por otros autores[30] y también en repetidas oportunidades en nuestro laboratorio utilizando SBF 1X y SBF 1,5X. La figura 5.4 muestra las microfotografías electrónicas de esta muestra antes y después de la inmersión durante 30 días en SBF 1,5X, observándose la ausencia de precipitados de fosfatos de calcio, lo cual permite verificar que la presencia de los depósitos minerales observados en los materiales A, B y C, no es producto directo de la inestabilidad termodinámica del suero fisiológico simulado.

Material A



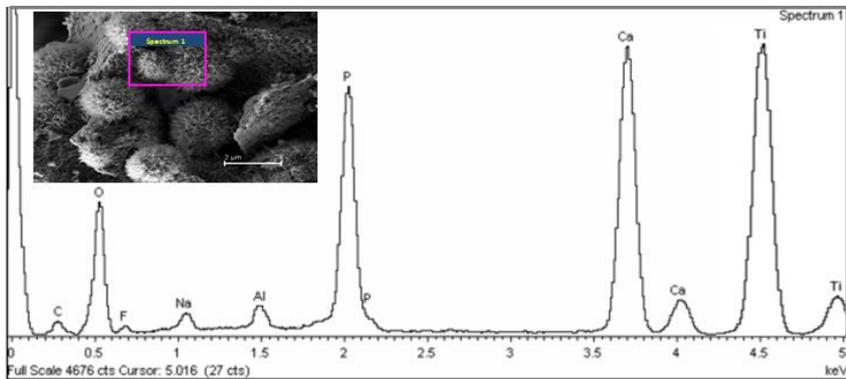
Ca/P = 1,63

Material B



Ca/P = 1,62

Material C



Ca/P = 1,60

Figura 5.3: Microanálisis por dispersión de energías de rayos X (EDX) de la capa de HAp desarrollada en los materiales A, B y C luego de 10 días de inmersión en SBF a 37 °C, con sus respectivas relaciones atómicas Ca/P.

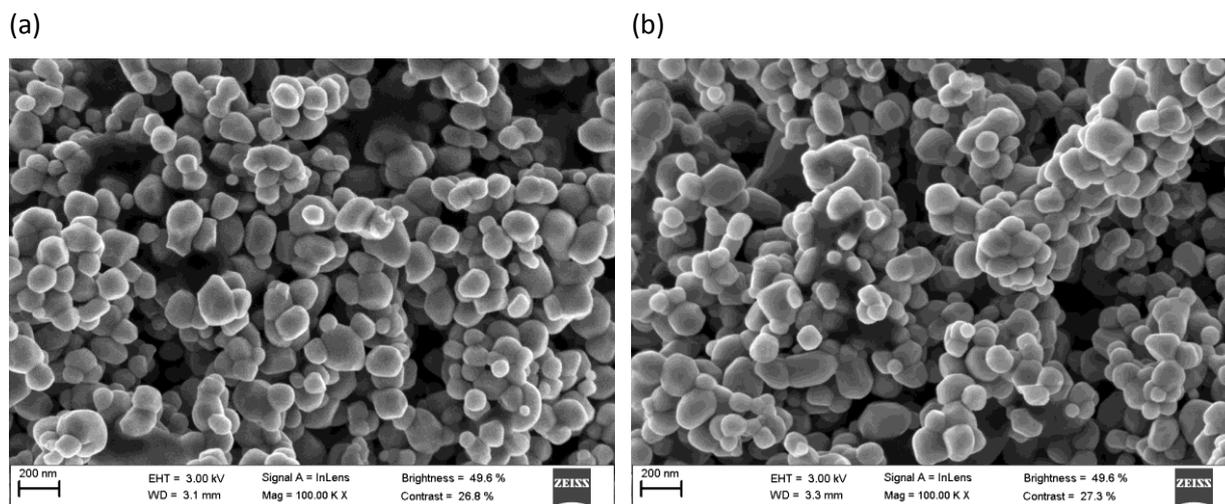


Figura 5.4: Microfotografías electrónicas (SEM) de una muestra de anatasa comercial (AA) **(a)** antes y **(b)** luego de 30 días de incubación en SBF 1,5X a 37 °C.

En general, las teorías concernientes a la bioactividad del TiO_2 cristalino están aún en etapa de desarrollo. El consenso general es que el óxido de titanio es bioactivo debido a la presencia de grupos oxhidrilo ($-\text{OH}$) que se forman en la superficie del material luego de su inmersión en SBF. Son estos grupos $-\text{OH}$ los que catalizan la precipitación de hidroxiapatita. Uchida *et al.*[31] estudiaron el crecimiento de HAp en superficies de TiO_2 que presentaban diferentes estructuras cristalinas y elaboraron una teoría que explicaría por qué los grupos $-\text{OH}$ correspondientes a titania amorfa parecerían menos efectivos que los presentes en rutilo o anatasa a la hora de estimular la deposición de estos cristales de fosfatos de calcio. Ellos sugieren que para ciertos planos cristalográficos en las estructuras de TiO_2 , las posiciones de los átomos de oxígeno se solapan convenientemente con los grupos $-\text{OH}$ de la HAp, favoreciendo una nucleación epitaxial. Es esperable que crecimiento epitaxial de HAp esté favorecido sobre rutilo debido a similitudes bidimensionales en ambas estructuras cristalinas[32]. En contraste, y de acuerdo con Li *et al.*[30], la HAp biomimética no puede formarse sobre monocristales de anatasa, figura 5.4; una de las razones que los autores plantean es que la densidad de grupos $-\text{OH}$ no es lo suficientemente alta en el plano cristalino adecuado. Ellos también notaron que mientras cristales individuales de anatasa densamente empaquetada carecían de bioactividad, los de anatasa porosa sí inducían la deposición de apatita. En general, se cree que una estructura porosa es capaz de acelerar el proceso biomimético[33].

Los materiales obtenidos en el presente trabajo (A, B y C) mostraron ser bioactivos, independientemente de su estructura cristalina y del hecho de que no presentan grandes áreas superficiales ni arreglos ordenados de mesoporos, tabla 4.2. En consecuencia, los resultados aquí

obtenidos demuestran que tanto las diferencias en el polimorfismo cristalino como la porosidad no son suficientes para inducir y/o explicar la bioactividad.

Tabla 4.2: características fisicoquímicas del recubrimiento de fosfato de calcio en los materiales luego de 10 días de incubación en SBF.

	Morfología	Ca/P	R _q (nm)	R _a (nm)	R _{sk}	R _{ku}
TiO ₂	Capa densa aplanada	1,63	70,87	61,58	1,41	2,27
Ce-TiO ₂	Capa esferulítica	1,62	60,09	45,43	1,80	3,97
CeO ₂ -TiO ₂	Capa esferulítica	1,60	50,77	41,47	1,55	2,86

Antes de que ocurran las reacciones bioquímicas que dan lugar al comportamiento bioactivo, ciertos procesos fisicoquímicos deben ser termodinámicamente posibles. La textura superficial tiene injerencia directa sobre la energía superficial, la cual, oportunamente, afecta la biorreactividad[34]. Debido a que la formación de HAp sobre TiO₂ en soluciones acuosas sobresaturadas es un proceso de nucleación heterogéneo, de acuerdo con la teoría de nucleación clásica, la energía libre crítica (ΔG) depende de la sobresaturación de la solución (S), de la temperatura (T), de la energía de nucleación interfacial neta (σ) y del área superficial de la partícula (A), de acuerdo con la siguiente ecuación[34]:

$$\Delta G = - RT \ln(S) + \sigma A \quad (5.1)$$

En este trabajo, los materiales fueron sumergidos en la solución de SBF a temperatura y con sobresaturación respecto de HAp constantes; asimismo no se observan mayores diferencias respecto a las áreas superficiales de los precipitados. La única variación existente entre ellos es la barrera de energía interfacial neta dada por el parámetro (σ), que es altamente dependiente tanto de la topografía superficial como de la presencia, en la interfase, de los componentes altamente polares[34], [35]. En consecuencia, se cree aquí que la nucleación heterogénea de la HAp está activamente influenciada por la energía superficial y la topografía de los materiales: en superficies rugosas, como es el caso de estos materiales, los valles parecen ser los sitios preferenciales para la nucleación y crecimiento de los fosfatos de calcio, causando una reducción del parámetro R_a. De la misma manera, superficies con asimetría positiva favorecen la deposición de fases ricas en calcio. El análisis topográfico indica que los materiales B y C, que presentan el mayor número de valles, inducen un mayor y más rápido recubrimiento de su superficie con cristales de HAp. Es relevante destacar que los aglomerados de HAp alteran la topografía original del material, figura 5.2 (tabla 5.2 y tabla 4.3, capítulo 4), disminuyendo la rugosidad a nivel nanométrico.

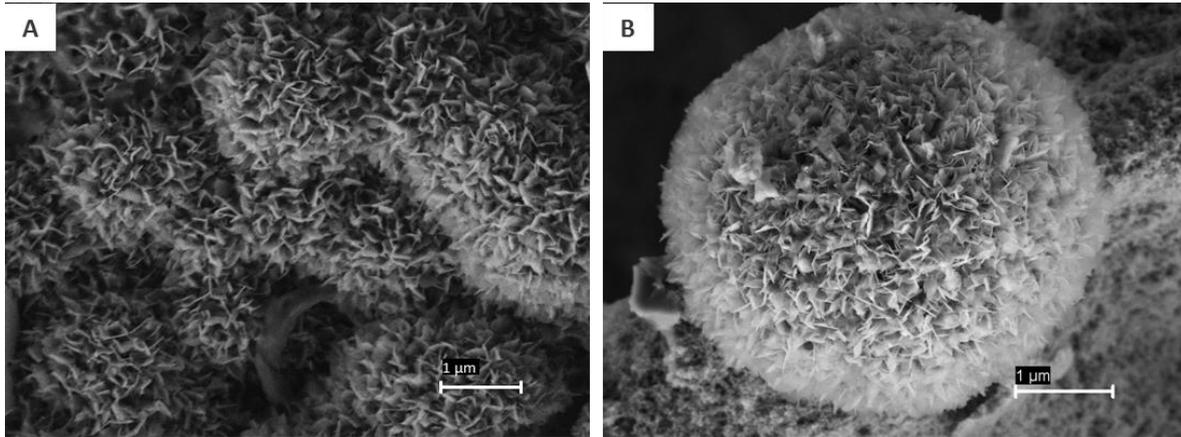


Figura 5.5: Microfotografías electrónicas de los depósitos de HAp en el material A (compuesto por rutilo y anatasa) y el material B (anatasa pura) luego de 10 días de incubación en 1,5 SBF a 37 °C.

Las capas de hidroxiapatita que se formaron sobre los materiales poseen apariencias fundamentalmente diferentes, como puede apreciarse en la figura 5.5. Los cristales de HAp que cubren la superficie del material A (TiO_2) crecen como una densa capa de cristalitas en forma de disco que crecen lado a lado, mientras que los que se desarrollan sobre el material B (Ce-TiO_2) aparecen en forma de racimos de esferas. En este trabajo se asume que estas diferencias están relacionadas con un crecimiento preferencial de los cristales de HAp respecto de las fases cristalinas del dióxido de titanio. De esta manera, en el material A, el crecimiento preferencial ocurre de forma paralela a la superficie, posiblemente debido a la interacción con el plano (001) del rutilo superficial[36]. En contraste, si el crecimiento epitaxial es preferencial sobre la superficie correspondiente al plano (110) de anatasa[35], [36] (figura 5.6), como sucede en los materiales B y C, los depósitos de HAp forman glóbulos o rosetas, de 3-5 μm de diámetro, compuestos de aglomerados de cristalitas discoidales de $\approx 150 \text{ nm}$ de longitud.

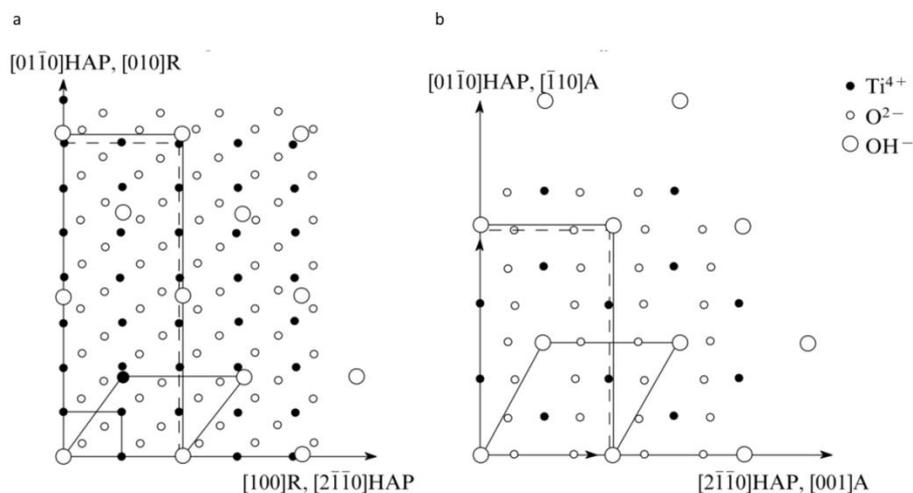


Figura 5.6: Puntos de coincidencia en las redes cristalinas para los planos (a) (001)R/(0001)HAp y (b) (110)A/(0001)HAp. Imagen adaptada de la publicación de V. M. Ievlev [35].

Es interesante destacar que partículas esféricas con forma de pétalos en la capa de fosfatos de calcio que se forma sobre la superficie del material, como las observadas en B y C, están asociadas con una mayor velocidad de formación ósea sobre implantes[37] y una mayor adhesión de células osteogénicas debido a un aumento en la superficie y rugosidad del sustrato[28].

5.3.2. Adsorción de albúmina

Cuando un material es implantado en el organismo, su superficie es inmediatamente cubierta por una película de proteínas que actúa como mediadora de la comunicación entre el implante y el microambiente del cuerpo. Debido a que los biomateriales son expuestos a la sangre durante el proceso de implantación, la capa inicial de proteínas adheridas está compuesta principalmente por proteínas plasmáticas. Siendo la albúmina la proteína más abundante del plasma sanguíneo, resulta interesante evaluar su interacción con los materiales A, B y C, y su posterior influencia sobre un proceso crítico en la osteointegración que es la mineralización. Esta sección se dedica a evaluar la cinética y afinidad de una proteína modelo, la albúmina de suero bovino, sobre los materiales compuestos por TiO_2 , Ce-TiO_2 y $\text{CeO}_2\text{-TiO}_2$.

La cuantificación de proteínas en solución es posible usando espectroscopía UV-Visible[38]. Las proteínas son capaces de absorber radiación en el UV cercano dependiendo principalmente de su contenido en los aminoácidos aromáticos Tirosina (Tyr) y Triptófano (Trp), así como también, aunque en menor medida, de la cantidad de Fenilalanina (Phe) y puentes disulfuro. Esta absorción tiene lugar a $\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ nm}$, sin embargo su intensidad puede variar mucho entre diferentes proteínas (por ejemplo para una solución 1 mg/mL, puede oscilar entre 0 y 4 dependiendo del contenido en Tyr y Trp, aunque la mayoría de valores se concentran en el rango de 0,5 – 1,5)[38]. Para asegurar que se cumple con la ley de Lambert-Beer en el rango de concentraciones de trabajo para la albúmina de suero bovino, se confeccionó una curva de calibrado con concentraciones que oscilan entre 50 y 1000 $\mu\text{g/mL}$. Como puede observarse en la figura 5.7, existe una buena relación lineal entre los valores de absorbancia y las concentraciones de albúmina de interés ($R^2 = 0,99635$). La gráfica también permite obtener el coeficiente de absortividad para BSA, $\epsilon = 5,41 \times 10^4 \text{ cm}^2/\mu\text{g}$, que concuerda con lo informado por otros autores[39].

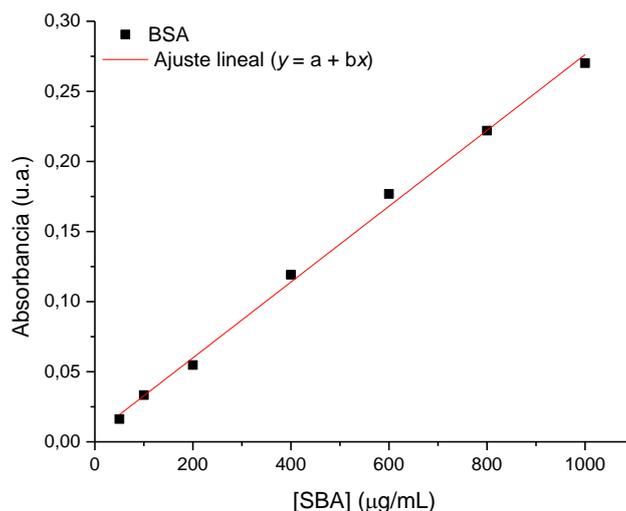


Figura 5.7: Curva de calibrado de albúmina de suero bovina en PBS obtenida a $\lambda_{max} = 280 \text{ nm}$. El ajuste responde bien al modelo lineal $y = a + bx$ ($R^2 = 0,99635$).

Los ensayos de adsorción de albúmina (figura 5.8) demuestran que la cantidad de albúmina adsorbida es máxima en el material A (TiO_2), alcanzando la saturación a los 60 minutos de incubación con la proteína. El material B (Ce-TiO_2) presenta una afinidad menor por la proteína, siendo su concentración de saturación de casi $300 \mu\text{g}/\text{m}^2$, esto es más de 6 veces menor que la saturación lograda en el material A, en tanto que el equilibrio se alcanza un poco más lento, alrededor de los 80 minutos. Finalmente, el material C ($\text{CeO}_2\text{-TiO}_2$) presenta una mínima afinidad por BSA; si bien el equilibrio no se alcanza en el tiempo que dura el ensayo, el modelo al que ajusta el comportamiento de este sistema predice que la adsorción máxima no superaría los $55 \mu\text{g}/\text{m}^2$, lo cual hace a la superficie de este material más de 30 veces menos afín por la albúmina que el TiO_2 puro.

Muchos autores han demostrado que superficies hidrofóbicas son ideales para promover la adhesión de proteínas en general[35] y de BSA en particular[40]; los resultados presentados hasta aquí se muestran en concordancia con lo afirmado por estos autores, ya que el orden de hidrofiliidad de los materiales crece en el sentido $A < B < C$ (figura 4.10, capítulo 4). Otros autores también aseguran que la capacidad de adsorción proteica también se encuentra directamente relacionada con la superficie específica del sustrato[42], los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el efecto hidrofóbico es más importante, ya que la superficie específica de los materiales posee una correlación inversa con la cantidad de BSA adsorbida.

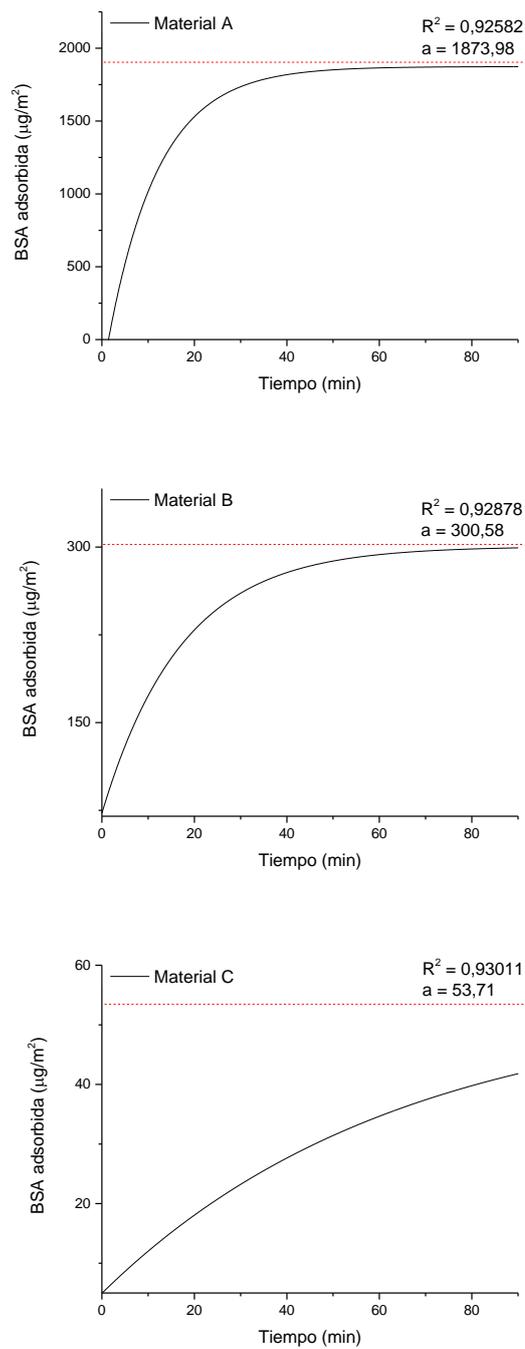


Figura 5.8: Perfiles de adsorción de albúmina para los materiales A, B y C. Los resultados responden al modelo asintótico $y=a-b.c^x$, donde a es la asíntota horizontal del modelo y representa la adsorción máxima.

5.3.3. Bioactividad en presencia de albúmina

En el apartado 5.1 se comentó que las proteínas plasmáticas son las primeras en entrar en contacto con la superficie del implante y, siendo la Albúmina la más abundante, resulta ser un buen modelo para estudiar la influencia de las macromoléculas en la bioactividad del material. El rol de la

albúmina en este proceso permanece bajo discusión y aún no está definido si actúa como promotor, inhibidor o ambos[6], por lo que resulta interesante incorporar esta proteína al estudio de la bioactividad *in vitro*. Esta sección evalúa el efecto de la proteína modelo BSA sobre el proceso de mineralización del material que tiene lugar cuando se lo sumerge en suero fisiológico simulado. Se ensayaron dos condiciones experimentales: el tratamiento (i) en el que la albúmina se mantuvo disuelta en el SBF durante todo el ensayo de bioactividad; y el tratamiento (ii), en el que primero se adsorbió una capa de albúmina a los materiales y luego se los sumergió en suero fisiológico simulado sin modificar. El ensayo de bioactividad en estas condiciones se llevó a cabo durante 10 días a 37 °C. Las microfotografías electrónicas de barrido, los microanálisis por energía dispersiva de rayos X y el análisis topográfico se resumen en las figuras 5.9, 5.10 y 5.11, respectivamente.

Los materiales A y B, cuando son sumergidos en suero fisiológico simulado conteniendo 1 mg/mL de BSA (tratamiento (i)) muestran total ausencia de los típicos depósitos de fosfatos de calcio (CaP) que se obtienen luego del tratamiento en SBF solo (figura 5.2), lo cual se puede confirmar a partir del análisis elemental (figura 5.10) que muestra ausencia de fósforo. Lo que se observa, en cambio, es la superficie del material cubierta por albúmina de manera cualitativamente proporcional a su afinidad por la proteína, lo cual explica el alto grado de cobertura observado en el material A respecto de la escasez de proteína adsorbida presente en el material B. Las microfotografías electrónicas correspondientes al material C luego del tratamiento (i) no muestran indicios de proteína adsorbida. Este material, en cambio, sí es capaz de formar una capa de cristales de fosfatos de calcio de forma, tamaño y composición similares a los desarrollados cuando el ensayo de bioactividad se lleva a cabo en ausencia de proteínas. Esto indicaría que la baja afinidad del material C por BSA mantendría la interfase libre para que pueda actuar como centro de nucleación efectivo para el crecimiento de estos cristales típicos de hidroxiapatita.

Cuando se permite que la proteína se preadsorba a los materiales y luego se los sumerge en SBF preparado en ausencia de BSA, los resultados se muestran significativamente diferentes: el material A, que antes no presentaba depósitos de CaP, ahora muestra claros indicios de núcleos de cristalización de CaP que cubren toda su superficie; estos centros, además, poseen la misma relación Ca/P que la hidroxiapatita estequiométrica. La forma de estos depósitos es típica para cristales de HAP en etapas de cristalización muy tempranas, lo cual permite inferir que la presencia de albúmina adsorbida al material genera un retraso en la velocidad de maduración de estos cristales. Esto probablemente se deba a que el alto grado de cobertura de la superficie del material A con BSA dificultaría el contacto entre los grupos —OH del óxido de titanio y los iones Ca de la solución necesarios para promover el crecimiento epitaxial de estos cristales.

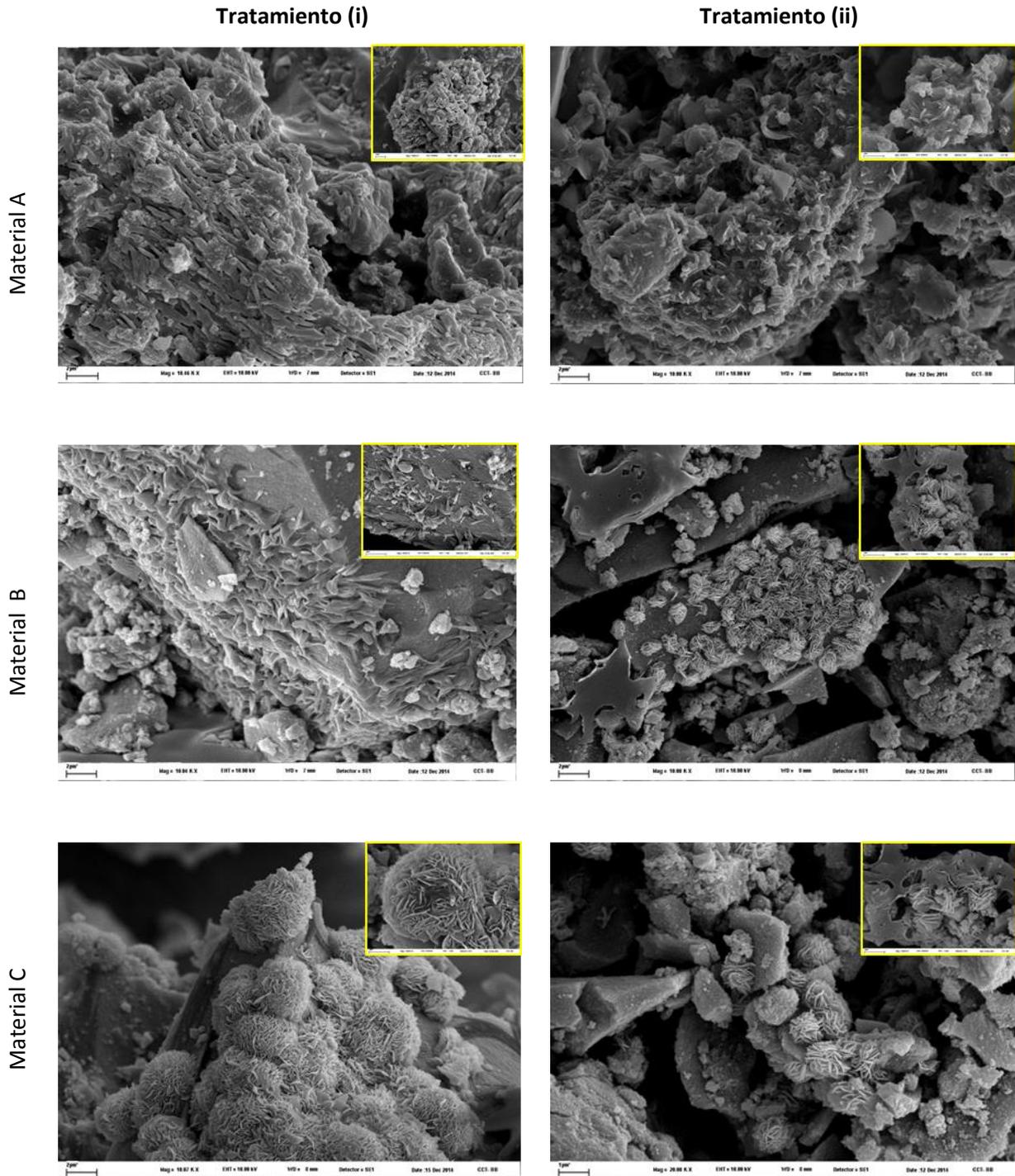


Figura 5.9: Microfotografías SEM de los materiales A, B y C luego del ensayo de bioactividad en presencia de albúmina luego de 10 días en los dos tratamientos: **(i)** el material es inmerso en una solución de BSA en SBF 1 mg/mL; **(ii)** el material con una capa preadsorbida de BSA, se sumerge en SBF. El recuadro muestra magnificaciones de áreas de interés.

Una explicación equivalente puede abordarse para el tratamiento (ii) de los materiales B y C, cuya afinidad superficial por albúmina es relativamente baja. La observación de las microfotografías electrónicas de barrido (figura 5.9) confirma que los depósitos de fosfatos de calcio crecen sobre la

superficie del material y no sobre la proteína; más aún, las imágenes en los recuadros confirman que estos depósitos minerales son capaces de desplazar a la albúmina de sus sitios de anclaje en la superficie de los materiales. La forma de estos depósitos, sin embargo, difiere sensiblemente de la observada para esos mismos materiales cuando se ensaya su bioactividad en ausencia de proteínas; los aglomerados no tienen su forma de roseta tan definida y los cristalitas se muestran engrosados y con un aparente crecimiento preferencial en el plano longitudinal de los cristales.

Este tipo de estructuras fue descrita recientemente por Ge *et al.*[43] como “nanoflores inorgánico-proteicas híbridas” y su formación se debe a que las moléculas de la proteína son capaces de formar complejos con cationes divalentes que luego se convierten en sitios de nucleación para la formación de cristales. Estos complejos surgen de la interacción entre algunos aminoácidos tales como histidina y/o los nitrógenos de los grupos amida del esqueleto proteico con ciertos cationes divalentes. Si bien estos autores reportaron el crecimiento de las nanoflores para complejos de fosfato de cobre con BSA, este mismo concepto puede aplicarse a la formación de complejos de fosfatos de calcio con BSA[44]. Tanto para el material B como para el C, los depósitos de CaP son similares en densidad, forma y contenido mineral; el exceso de calcio observado en el microanálisis (figura 5.10) puede deberse a que los iones calcio actúan simultáneamente como átomos puente entre las cadenas de albúmina para formar estas nanoflores y como constituyentes estructurales de los cristales de fosfatos de calcio.

El análisis de la topografía de los materiales, figura 5.11, realizado de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 4.2.2 del capítulo anterior, revela la existencia de un cambio en la asimetría y la escarpadura de los materiales B y C, en tanto que no existen mayores diferencias en el TiO_2 luego de cualquiera de los ensayos de bioactividad realizados. La asimetría se muestra conservada para el material C luego del ensayo de bioactividad en presencia de proteínas mientras que B presenta una ligera disminución en el número de picos, lo cual sería en principio deseable para disminuir los puntos de tensión entre la superficie del implante y el hueso[45]. Asimismo, la escarpadura del relieve también disminuye cuando hay proteínas presentes en el medio, alejando el parámetro R_{ku} del valor crítico de 3, lo cual también representa una característica favorable al momento de aumentar la resistencia al cizallamiento.

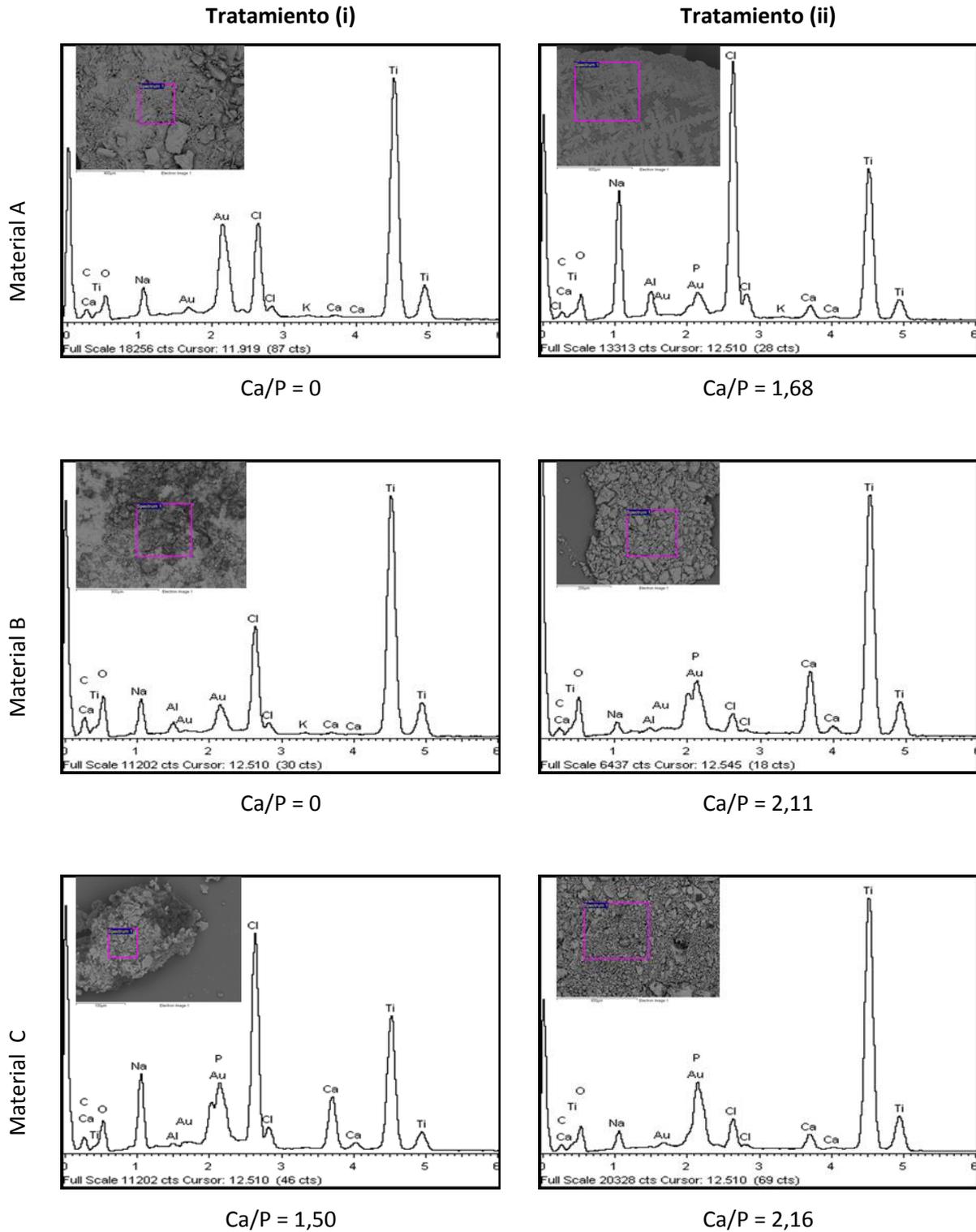


Figura 5.10: Microanálisis por dispersión de energías de rayos X (EDX) de los materiales A, B y C luego de 10 días del ensayo de bioactividad en presencia de albúmina. Debajo de cada fotografía se detalla la relación atómica Ca/P de los depósitos formados en la superficie.

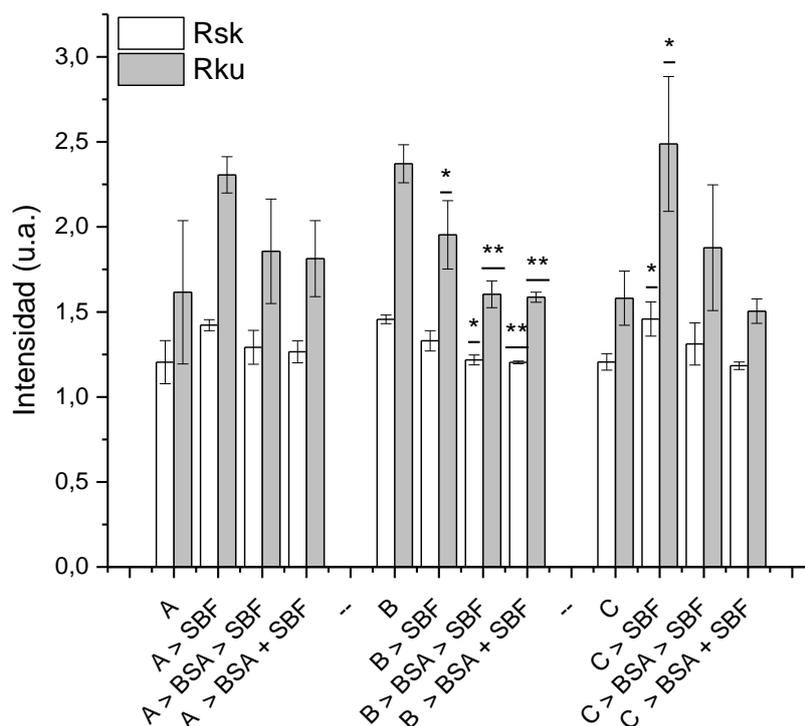


Figura 5.11: Parámetros de rugosidad comparados para los materiales A, B y C, antes y después de los diferentes ensayos de bioactividad. Coeficiente de asimetría (R_{sk}) y coeficiente de escarpadura (R_{ku}). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ significativamente diferentes que el material correspondiente sin tratar.

Una visión integral de estos resultados demuestra que la presencia de proteínas interfiere en distintos niveles con el proceso de mineralización: por un lado cuando la superficie del sustrato tiene moderada afinidad por BSA, el proceso de adsorción proteica gana importancia e impide que mineralización tenga lugar, tal como se demuestra en el tratamiento (i) de los materiales A y B. Por otro lado, también es posible afirmar que la mineralización es un proceso que ocurre estrictamente sobre la superficie del material y que su fuerza motriz responde a las consideraciones energéticas explicadas en la sección 5.3.1. Algunos autores han explicado que la mineralización en SBF en presencia de proteínas está retardada debido a un aumento en la viscosidad de la solución que genera mayor resistencia a la difusión de iones calcio y fosfato hacia el sustrato[7], los resultados presentados en esta sección difieren en este sentido, y se ha establecido que la afinidad superficial del material por la proteína en estudio es el factor crítico en dificultar la mineralización, lo cual se demuestra observando que la capa mineral desarrollada sobre el material C luego del tratamiento (i) no difiere significativamente de la obtenida cuando el ensayo de bioactividad se realiza en ausencia de proteínas. De la misma manera es posible afirmar que la presencia de albúmina altera la nucleación pero no el crecimiento de los cristales de CaP.

A partir del hecho de que los depósitos minerales requieren la existencia de centros de nucleación sobre la superficie del material, y de que estos depósitos crecen desplazando a proteínas plasmáticas, tales como albúmina, de sus puntos de anclaje sobre el sustrato (materiales B y C, tratamiento (ii)), es posible estimar que la osteointegración de materiales con alta afinidad por proteínas plasmáticas podría mejorarse si se modifica su superficie a través de la deposición biomimética de centros de nucleación de fosfatos de calcio, por ejemplo, a través de la inmersión en suero fisiológico simulado, antes de su aplicación biomédica.

5.4. Conclusiones

Las observaciones que surgen luego de estudiar la bioactividad de los materiales en diferentes condiciones, permiten concluir que la nucleación heterogénea de la HAp está activamente influenciada por la energía superficial y la topografía de los materiales, siendo los valles los sitios preferenciales de nucleación y crecimiento de los cristales de HA.

La forma de los cristales de HAp está íntimamente ligada a la estructura cristalina del dióxido de titanio, observándose un crecimiento epitaxial de la capa mineral, en donde la interacción del plano (0001) de la HAp con el (001) de rutilo induce un crecimiento de forma paralelo a la superficie, mientras que la interacción preferencial entre los planos (110)Anatasa/(0001)HAp produce depósitos en forma de roseta que se desarrollan de manera perpendicular a la superficie.

La albúmina, la proteína plasmática más abundante, presenta una adsorción preferencial sobre superficies hidrofóbicas, por lo que la densidad proteica y su velocidad de adsorción decrecen en el sentido $\text{TiO}_2 > \text{Ce-TiO}_2 > \text{CeO}_2\text{-TiO}_2$.

Existe poco consenso sobre la influencia de la albúmina plasmática sobre el proceso de mineralización y posterior osteointegración. En este trabajo se evaluó su influencia sobre la bioactividad del material, demostrándose que la presencia de albúmina dificulta la formación de núcleos de fosfatos de calcio al bloquear los sitios de contacto entre los grupos —OH del óxido de titanio y los iones Ca de la solución, necesarios para iniciar el proceso de nucleación heterogéneo. También quedó demostrado que la mineralización ocurre sobre la superficie de los materiales y no sobre la capa de proteína adsorbida y que, una vez iniciado el proceso, el crecimiento de los cristales de fosfatos de calcio es capaz de desplazar a la albúmina de la superficie del biomaterial. Asimismo también se demostró que la forma de los depósitos de HAp se altera debido a la formación de complejos entre la albúmina y los fosfatos de calcio.

La topografía de los materiales se ve ligeramente alterada luego de los ensayos de bioactividad, ya sea en ausencia o en presencia de albúmina, observándose, en general, un aumento

de la asimetría. Es interesante destacar que el material B presenta una disminución de la escarpadura de los picos de su relieve, siendo ésta una característica favorable para la adhesión celular y la resistencia al cizallamiento del implante.

Debido a que la bioactividad es una cascada de eventos superficiales, el control del exterior del biomaterial en la nanoescala hace posible imitar el proceso de biomineralización y de esta manera estimular la función de los osteoblastos con propósitos regenerativos. Los resultados obtenidos en este capítulo permitirían entender la relación entre las propiedades superficiales de los materiales y la osteointegración, permitiendo identificar las características más favorables para garantizar el éxito de los implantes óseos y dentales.

5.5. Bibliografía

- [1] L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen, and T. K. Greenlee, "Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 5, no. 6, pp. 117–141, 1971.
- [2] P. I. Branemark, "Vital microscopy of bone marrow in rabbit," *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, vol. 11 Supp 38, pp. 1–82, 1959.
- [3] T. Kokubo and H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?," *Biomaterials*, vol. 27, pp. 2907–2915, 2006.
- [4] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, and T. Yamamuro, "Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W.," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 24, no. 6, pp. 721–734, 1990.
- [5] A. F. Mavrogenis, R. Dimitriou, J. Parvizi, and G. C. Babis, "Biology of implant osseointegration," *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.*, vol. 9, no. 2, pp. 61–71, 2009.
- [6] C. Combes and C. Rey, "Adsorption of proteins and calcium phosphate materials bioactivity," vol. 23, no. October 2001, pp. 2817–2823, 2002.
- [7] K. Wang, Y. Leng, X. Lu, F. Ren, X. Ge, and Y. Ding, "Theoretical analysis of protein effects on calcium phosphate precipitation in simulated body fluid," *CrystEngComm*, vol. 14, no. 18, p. 5870, 2012.
- [8] B. Clarke, "Normal bone anatomy and physiology," *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 3 Suppl 3, pp. 131–139, 2008.
- [9] L. L. Hench, "Bioceramics: From Concept to Clinic," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 74, no. 7, pp. 1487–1510, 1991.
- [10] K. Anselme, "Osteoblast adhesion on biomaterials.," *Biomaterials*, vol. 21, no. 7, pp. 667–81, Apr. 2000.

- [11] A. R. and D. T. C. James M. Anderson, "Foreign body reaction to biomaterials," *Semin Immunol.*, vol. 20, no. 2, pp. 997–1003, 2008.
- [12] T. N. Gerhart, C. A. Kirker-Head, M. J. Kriz, M. E. Holtrop, G. E. Hennig, J. Hipp, S. H. Schelling, and E. Wang, "Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein.," *Clin. Orthop. Relat. Res.*, no. 293, pp. 317–326, 1993.
- [13] R. Jimbo, T. Sawase, Y. Shibata, K. Hirata, Y. Hishikawa, Y. Tanaka, K. Bessho, T. Ikeda, and M. Atsuta, "Enhanced osseointegration by the chemotactic activity of plasma fibronectin for cellular fibronectin positive cells," *Biomaterials*, vol. 28, no. 24, pp. 3469–3477, 2007.
- [14] K. M. Hennessy, W. C. Clem, M. C. Phipps, A. A. Sawyer, F. M. Shaikh, and S. L. Bellis, "The effect of RGD peptides on osseointegration of hydroxyapatite biomaterials," *Biomaterials*, vol. 29, no. 21, pp. 3075–3083, 2008.
- [15] B. G. Keselowsky, D. M. Collard, and A. J. García, "Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding," *Biomaterials*, vol. 25, no. 28, pp. 5947–5954, 2004.
- [16] B. G. Keselowsky, D. M. Collard, and A. J. García, "Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion," *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 66A, no. 2, pp. 247–259, 2003.
- [17] K. Wang, C. Zhou, Y. Hong, and X. Zhang, "A review of protein adsorption on bioceramics," *Interface Focus*, vol. 2, no. 3, pp. 259–277, 2012.
- [18] G. Skaliczki, K. Schandl, M. Weszl, T. Major, M. Kovács, J. Skaliczki, M. Szendrői, C. Dobó-Nagy, and Z. Lacza, "Serum albumin enhances bone healing in a nonunion femoral defect model in rats: a computer tomography micromorphometry study," *Int. Orthop.*, vol. 37, no. 4, pp. 741–745, 2013.
- [19] F. F. Tian, F. L. Jiang, X. Le Han, C. Xiang, Y. S. Ge, J. H. Li, Y. Zhang, R. Li, X. L. Ding, and Y. Liu, "Synthesis of a novel hydrazone derivative and biophysical studies of its interactions with bovine serum albumin by spectroscopic, electrochemical, and molecular docking methods," *J. Phys. Chem. B*, vol. 114, no. 46, pp. 14842–14853, 2010.
- [20] D. C. Carter and J. X. Ho, "Lipoproteins, apolipoproteins, and lipases," *Adv. Protein Chem.*, vol. 45, pp. 153–203, 1994.
- [21] J. L. Wehmeyer, R. Synowicki, R. Bizios, and C. D. García, "Dynamic adsorption of albumin on nanostructured TiO₂ thin films," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 30, no. 2, pp. 277–282, 2010.
- [22] S. R. Sousa, P. Moradas-Ferreira, B. Saramago, L. Viseu Melo, and M. A. Barbosa, "Human serum albumin adsorption on TiO₂ from single protein solutions and from plasma," *Langmuir*, vol. 20, no. 22, pp. 9745–9754, 2004.
- [23] R. Dulbecco and G. Freeman, "Plaque production by the polyoma virus," *Virology*, vol. 8, no. 3,

- pp. 396–397, 1959.
- [24] A. Aitken and M. P. Learmonth, “Protein Determination by UV Absorption,” *Protein Protoc. Handb.*, pp. 3–6, 2009.
- [25] A. Oyane, H. Kim, T. Furuya, T. Kokubo, T. Miyazaki, and T. Nakamura, “Preparation and assessment of revised simulated body fluids,” *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 65A, no. 2, pp. 188–195, 2002.
- [26] “ISO 23317:2014 Implants for surgery — In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials,” *Int. Organ. Stand.*, vol. Third edit, p. 13, 2014.
- [27] M. Yousefpour, A. Afshar, J. Chen, and X. Zhang, “Bioactive layer formation on alkaline-acid treated titanium in simulated body fluid,” *Mater. Des.*, vol. 28, no. 7, pp. 2154–2159, 2007.
- [28] J. Wang, P. Layrolle, M. Stigter, and K. De Groot, “Biomimetic and electrolytic calcium phosphate coatings on titanium alloy: Physicochemical characteristics and cell attachment,” *Biomaterials*, vol. 25, no. 4, pp. 583–592, 2004.
- [29] M. Bohner and J. Lemaitre, “Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution?,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 12, pp. 2175–2179, 2009.
- [30] P. Li, C. Ohtsuki, T. Kokubo, K. Nakanishi, N. Soga, and K. de Groot, “The role of hydrated silica, titania, and alumina in inducing apatite on implants,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 28, no. 1, pp. 7–15, 1994.
- [31] M. Uchida, H.-M. Kim, T. Kokubo, S. Fujibayashi, and T. Nakamura, “Structural dependence of apatite formation on titania gels in a simulated body fluid,” *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 64, no. 1, pp. 164–170, 2003.
- [32] C. Lindahl, P. Borchardt, J. Lausmaa, W. Xia, and H. Engqvist, “Studies of early growth mechanisms of hydroxyapatite on single crystalline rutile: a model system for bioactive surfaces,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 21, no. 10, pp. 2743–2749, 2010.
- [33] M. Wen, J.-F. Gu, G. Liu, Z.-B. Wang, and J. Lu, “Nanocrystalline Titanium to Mesoporous Anatase with High Bioactivity,” *Cryst. Growth Des.*, vol. 7, no. 12, pp. 2400–2403, 2007.
- [34] X. B. Chen, Y. C. Li, P. D. Hodgson, and C. Wen, “The importance of particle size in porous titanium and nonporous counterparts for surface energy and its impact on apatite formation,” *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 6, pp. 2290–2302, 2009.
- [35] V. M. Ievlev, “Coatings based on calcium phosphates for metallic medical implants,” *Russ. Chem. Rev.*, vol. 82, no. 2, pp. 131–149, 2013.
- [36] F. Lindberg, J. Heinrichs, F. Ericson, P. Thomsen, and H. Engqvist, “Hydroxylapatite growth on single-crystal rutile substrates,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 23, pp. 3317–3323, 2008.
- [37] C. Gao, P. Wei, P. Feng, T. Xiao, C. Shuai, and S. Peng, “Nano SiO₂ and MgO Improve the Properties of Porous β -TCP Scaffolds via Advanced Manufacturing Technology,” *Int. J. Mol.*

- Sci.*, vol. 16, no. 4, pp. 6818–6830, 2015.
- [38] J. M. Walker, *The Protein Protocols Handbook*, Second Edi., vol. 3, no. 2. 2002.
- [39] F. Y. Oliva, L. B. Avalor, O. R. Cámara, and C. P. De Pauli, “Adsorption of human serum albumin (HSA) onto colloidal TiO₂ particles, Part I,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 261, no. 2, pp. 299–311, 2003.
- [40] Y. L. Jeyachandran, J. A. Mielczarski, E. Mielczarski, and B. Rai, “Efficiency of blocking of non-specific interaction of different proteins by BSA adsorbed on hydrophobic and hydrophilic surfaces,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 341, no. 1, pp. 136–142, 2010.
- [41] M. Tanaka, T. Motomura, M. Kawada, T. Anzai, Y. Kasori, T. Shiroya, K. Shimura, M. Onishi, and A. Mochizuki, “Blood compatible aspects of poly (2-methoxyethylacrylate)(PMEA)—relationship between protein adsorption and platelet adhesion on PMEA surface,” *Biomaterials*, vol. 21, no. 14, pp. 1471–1481, 2000.
- [42] T. Kopac and K. Bozgeyik, “Effect of surface area enhancement on the adsorption of Bovine Serum Albumin onto titanium dioxide,” *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 76, no. 1, pp. 265–271, 2010.
- [43] J. Ge, J. Lei, and R. N. Zare, “Protein–inorganic hybrid nanoflowers,” *Nat. Nanotechnol.*, vol. 7, no. 7, pp. 428–432, 2012.
- [44] Z. Lin, Y. Xiao, L. Wang, Y. Yin, J. Zheng, H. Yang, and G. Chen, “Facile synthesis of enzyme-inorganic hybrid nanoflowers and their application as an immobilized trypsin reactor for highly efficient protein digestion,” *RSC Adv.*, vol. 4, no. 27, pp. 13888–13891, 2014.
- [45] S. Hansson and M. Werke, “The implant thread as a retention element in cortical bone: the effect of thread size and thread profile: a finite element study,” *J. Biomech.*, vol. 36, no. 9, pp. 1247–1258, 2003.

Capítulo 6

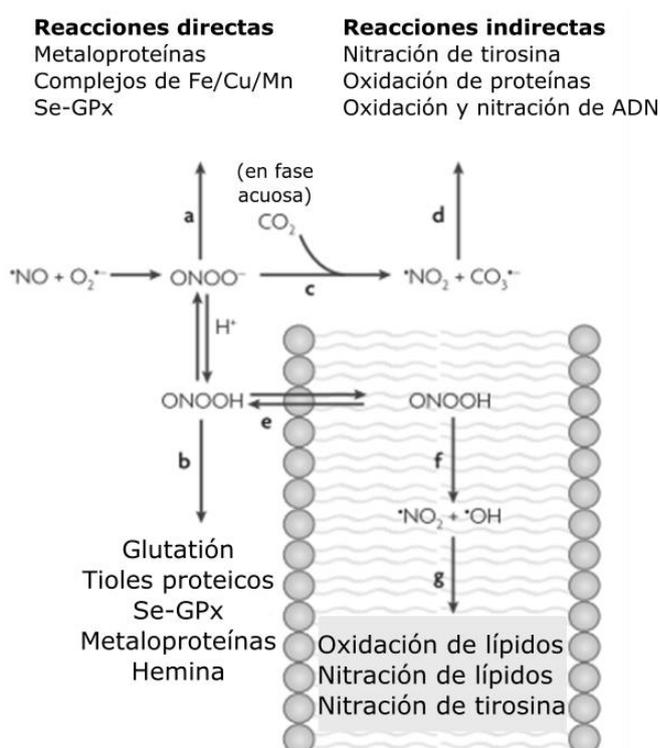
Degradación de peroxinitrito

6.1. Introducción

El peroxinitrito (ONOO^-) es una especie oxidante altamente reactiva, generalmente conocida por su potencia para inducir muerte celular. Este anión es producido por la reacción entre los radicales óxido nítrico (NO^\bullet) y superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) a una velocidad controlada por la difusión ($\sim 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)[1].

En condiciones fisiológicas, la producción de peroxinitrito (ONOO^-) es baja y el daño oxidativo está minimizado por las defensas antioxidantes endógenas[2]. Sin embargo, aumentos pequeños en la producción simultánea de superóxido y óxido nítrico son capaces de aumentar considerablemente la formación de peroxinitrito: un incremento de 10 veces la producción de estas dos especies es capaz de multiplicar por 100 la tasa de formación de ONOO^- [3]. En consecuencia, ciertas condiciones patológicas como fibrosis pulmonar[4], colitis ulcerativa[5], isquemia cerebral[6] o la inflamación producida tras la inserción de implantes en el tejido óseo[7], podrían aumentar desmedidamente la cantidad de peroxinitrito en el tejido, originando oxidación y potencial

destrucción de los componentes celulares, que pueden derivar en la disfunción de procesos celulares críticos, interrupción de cascadas de señalización intracelular e incluso, podría llegar a producirse la inducción de muerte celular por apoptosis o necrosis[8] (figura 6.1). Independientemente de su corta vida media a pH fisiológico (~10 ms), su habilidad para atravesar las membranas plasmáticas implica que el peroxinitrito generado en una célula puede afectar a células vecinas ubicadas en el rango de una a dos células (~5–20 μm), por lo que su radio de acción es enorme, comparado con el de otros radicales[9].



El anión peroxinitrito (ONOO^-) está en equilibrio con el ácido peroxinitroso (ONOOH ; $\text{pK}_a = 6,8$) y cualquiera de los dos puede reaccionar directamente con biomoléculas como se indica (a) y (b). Una reacción fundamental del ONOO^- en los sistemas biológicos es su rápida reacción con dióxido de carbono (en equilibrio con niveles fisiológicos de aniones bicarbonato), (c), que conduce a la formación de radicales carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) y dióxido de nitrógeno (NO_2^\bullet), que son buenos oxidantes de un electrón, (d) y pueden oxidar fácilmente aminoácidos como la cisteína y la tirosina. Como alternativa, el ONOOH puede experimentar fisión homolítica para generar los radicales oxidantes de un electrón hidroxilo OH^\bullet y NO_2^\bullet , (e). Sin embargo, esta reacción es lenta en los sistemas biológicos en comparación con las otras reacciones de ONOO^- y ONOOH y por lo tanto es un modesto componente de la reactividad *in vivo* del peroxinitrito en compartimentos acuosos. Debido a que el ONOOH atraviesa fácilmente bicapas lipídicas (f), su descomposición a radicales OH^\bullet y NO_2^\bullet parece ser relevante en las fases hidrofóbicas para iniciar la peroxidación lipídica y los procesos de nitración de lípidos y proteínas (g). Además, el ONOOH en las membranas puede sufrir reacciones directas con centros metálicos tales como hemina o tioles asociados a la membrana

Figura 6.1: Reacciones biológicas del peroxinitrito. Esquema adaptado de la publicación de Szabó et al.[9].

Hoy se sabe que cantidades anormales de peroxinitrito en el tejido óseo, están asociadas con resorción ósea periprotésica y aflojamiento del implante[10], sin embargo, algunos autores han informado que algunas partículas de óxido de titanio son capaces de acelerar la descomposición del peroxinitrito[11]. Como se menciona en el Capítulo 1, se ha demostrado que las nanopartículas de óxido de cerio poseen una capacidad de almacenamiento de oxígeno sustancial debido a la propiedad de los átomos de cerio para alternar entre los estados redox Ce^{4+} y Ce^{3+} . En muchos estudios se estableció que, dependiendo de la química y reactividad superficiales, estas nanopartículas pueden convertir eficientemente tanto especies reactivas de oxígeno, ROS, (O_2^- y H_2O_2) como especies reactivas de nitrógeno, NOS, (NO , NO^\bullet y ONOO^-), en moléculas menos dañinas, tanto *in vivo* como *in vitro*. Debido a que gran parte del daño atribuido a los radicales superóxido y

óxido nítrico es en realidad el resultado de la oxidación o nitración provocada por la molécula de peroxinitrito o sus productos de clivaje, resulta lógico estudiar la interacción entre los materiales preparados y esta molécula altamente reactiva. A continuación se presentan los resultados obtenidos.

6.2. Materiales y Métodos

6.2.1. Reactivos

Para la preparación del peroxinitrito se emplearon los siguientes reactivos: nitrito de sodio (NaNO_2 , PM= 69,00 g/mol, Sigma-Aldrich), ácido clorhídrico (HCl, PM= 36,46 g/mol, 30,0-34,0 % Cicarelli), hidróxido de sodio (NaOH, PM= 40,00 g/mol, 97%, Sigma-Aldrich), peróxido de hidrógeno, (H_2O_2 , PM= 34,01 g/mol, 30 %, Sigma-Aldrich) y agua tridestilada.

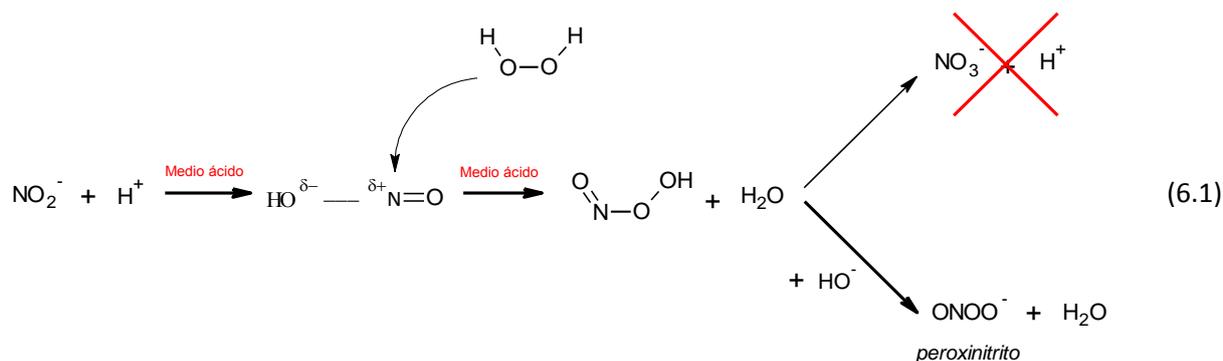
6.2.2. Instrumental

Espectroscopía UV-Visible (UV-Vis): Los ensayos de degradación de peroxinitrito fueron llevados a cabo utilizando esta técnica. Para ello se registró la absorbancia en función del tiempo empleando un espectrofotómetro UV-Vis modelo JASCO V-630 bio equipado con un controlador de temperatura (ETCS-761 JASCO), trabajando en condiciones normales de presión y temperatura a $\lambda_{\text{max}} = 302 \text{ nm}$.

6.2.3. Síntesis de peroxinitrito

La síntesis de peroxinitrito fue llevada a cabo utilizando un método simple, inspirado en los trabajos de Saha *et al.*[12] y Robinson y Beckman[13] para obtener un producto final de rendimiento aceptable y con menos de un 2 % de residuos contaminantes.

Durante la síntesis se hace reaccionar una solución acidificada de peróxido de hidrógeno ($\text{HCl} + \text{H}_2\text{O}_2$) con una de nitrito de sodio (NaNO_2). Como el pK_a del Nitrito es aproximadamente 3,4, bajo condiciones moderadamente ácidas se forma ácido nitroso (HNO_2) que es un eficiente donador de cationes Nitrosilo (NO^+). A continuación ocurre el ataque nucleofílico del peróxido de hidrógeno que genera, como producto final, ácido peroxinitroso (ONOOH). Al pH de trabajo, el ácido peroxinitroso, cuyo pK_a es de 6,8, tiene un tiempo de vida media de menos de 1 segundo, descomponiéndose a Nitrato (NO_3^-) mediante un mecanismo relativamente complejo[14] que, por carecer de relevancia a los objetivos del capítulo, no se profundizará. Para evitar esta rápida degradación, la reacción puede ser sofocada agregando un exceso de base (en este caso, NaOH 1,2 M) para obtener el anión peroxinitrito, que es estable en soluciones básicas. La reacción (6.1) resume lo hasta aquí explicado:



Ahora que ya está ilustrada la química de la reacción, se procederá a describir la operación experimental empleada en la obtención del peroxinitrito. Típicamente se preparan tres soluciones usando agua tridestilada:

- H_2O_2 (0,6 M) + HCl (0,7 M), que se obtienen mezclando 1,45 mL de HCl 37 % y 1,70 mL de H_2O_2 30 % en un volumen final de 25,0 mL;
- NaNO_3 (0,6 M) que se logra disolviendo 1,035 g de la sal en 25,0 mL de agua y finalmente,
- NaOH (1,2 M) que se prepara disolviendo 1,200 g del reactivo en 25,0 mL de agua.

Las soluciones se mantienen a temperatura ambiente para lograr un mayor rendimiento. Las tres soluciones son cargadas en jeringas descartables, que se unen mediante conectores plásticos y tubos tipo "T", como se muestra en la figura 6.2. La ventaja de esta configuración es que se tiene una mezcla de nitrito acidificado más peróxido de hidrógeno en la primera unión "T" para obtener el ácido peroxinitroso cuya descomposición es inmediatamente evitada con el agregado de la solución básica en la segunda unión "T". El producto final, una solución amarillenta de peroxinitrito, es colectado en un Erlenmeyer ubicado en un baño de hielo. Pueden quedar impurezas de peróxido de hidrógeno en el producto final por lo que a la solución anterior se le agrega una pequeña cantidad de dióxido de manganeso (para catalizar su descomposición), se permite reaccionar por 15 minutos tras lo cual la solución es filtrada usando papel de filtro No. 3. La concentración de peroxinitrito puede obtenerse utilizando espectroscopía UV-Visible midiendo la absorbancia de una dilución básica a $\lambda = 302$ nm y empleando el correspondiente coeficiente de extinción, $\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [15]. De esta manera, se calculó que el producto final posee una concentración aproximadamente 25 mM. La solución de peroxinitrito puede almacenarse a -22 °C, donde se descompone con un tiempo de vida media de 1–2 semanas. Sin embargo, se utilizaron soluciones recién preparadas para cada uno de los experimentos realizados.

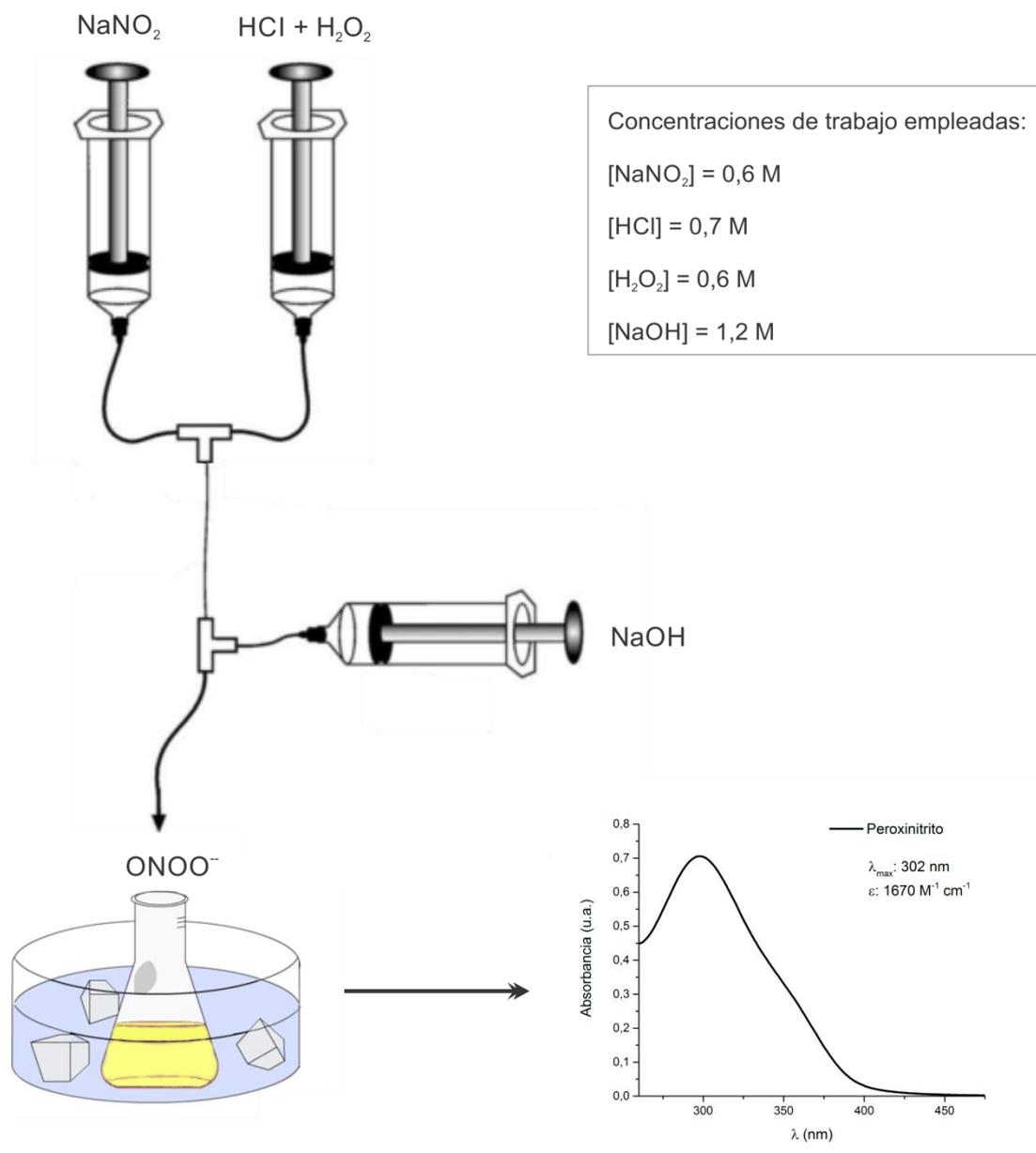


Figura 6.2: Esquema de la síntesis de peroxinitrito. En primer lugar se cargan las soluciones de H_2O_2 (0,6 M) + HCl (0,7 M) y de NaNO_3 (0,6 M) contenidas en las dos jeringas verticales; la reacción es direccionada hacia la formación de peroxinitrito mediante el agregado de NaOH (1,2 M) a través de la jeringa horizontal. El producto es colectado en baño de hielo ($T = 1 \text{ }^\circ\text{C}$). A la derecha se observa el espectro de absorción UV del producto obtenido.

6.2.4. Estudios de degradación

La degradación de peroxinitrito en presencia de los materiales (A, B y C) se realizó mediante estudios de espectrofotometría UV-Visible. Para ello, se agregaron $100 \mu\text{L}$ de la solución original recién preparada de peroxinitrito ($\text{pH} = 13,3$) a una cubeta de cuarzo de 1 mL (con 1 cm de paso óptico), y se diluyó con $900 \mu\text{L}$ de una solución reguladora de fosfato de sodio, PBS, (100 mM , $\text{pH} = 7,4$), condición que de aquí en más será denominada "T1", o con $900 \mu\text{L}$ de agua

tridestilada lo cual corresponderá a una condición "T2" en la que el pH de la solución es de 13,1. La interacción con el material se estudió incorporando 10 mg de cada uno junto con las diluciones en la misma cubeta. Cada muestra fue analizada durante 3500 segundos tomando medidas cada 0,5 segundos, a la longitud de onda de máxima absorción del peroxinitrito: $\lambda_{\text{máx}} = 302 \text{ nm}$. Para una mejor comparación de los resultados, la Absorbancia (A), fue normalizada sustrayendo la absorbancia a tiempo final (A_f) y dividiendo por la amplitud ($A_0 - A_f$), de acuerdo a lo descrito por Quijano et al.[16].

6.2.5. Cinética de la degradación de peroxinitrito

El progreso de la reacción de degradación de ONOO^- puede ser seguido midiendo, como se mencionó anteriormente, la absorbancia de luz UV a $\lambda_{\text{máx}} = 302 \text{ nm}$. A partir de la aplicación de la Ley de Lambert y Beer[17], utilizando el coeficiente de extinción informado para esta especie $\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [15], puede sencillamente transformarse la absorbancia en concentración de peroxinitrito (ecuación 6.1, donde A es absorbancia, l es el paso óptico de la cubeta en cm y c es la concentración molar de la especie), por lo que el decaimiento será expresado como concentración molar de ONOO^- en función del tiempo:

$$A = \epsilon \times l \times c \quad (6.1)$$

La velocidad de reacción fue determinada a partir de la derivada punto a punto sobre la pendiente de la curva de variación de la concentración del peroxinitrito en función del tiempo. Todos los estudios fueron realizados a 25 °C.

La ley de velocidad, las correspondientes constantes y los órdenes de reacción fueron calculados utilizando la expresión para la velocidad integrada[18]:

$$v = \int_{[A]_0}^{[A]} \frac{\partial [A]}{[A]} = - \int_0^t k \partial t = k \times [A]^n \quad (6.2)$$

donde k es la velocidad específica de la reacción o constante de la velocidad, $[A]$, la concentración, y n el orden de dicha reacción.

La forma integrada de la ley de velocidad para reacciones de primer y segundo orden se enuncian en las ecuaciones 6.3 y 6.4 respectivamente, donde $[A]$ es la concentración, k es la constante de velocidad y t es el tiempo:

$$[A] = [A]_0 \times e^{-kt} \quad (6.3)$$

$$\frac{1}{[A]} = kt + \frac{[A]}{[A]_0} \quad (6.4)$$

6.3. Resultados y discusión

En la primera condición de tratamiento (T1), no se observaron diferencias significativas en la velocidad de decaimiento de la concentración de peroxinitrito respecto de la presencia o ausencia de los materiales, como se manifiesta en la figura 6.3. Se asumió que en las condiciones de pH de T1 la reacción de degradación del peroxinitrito en sí misma es tan rápida (algunos autores han llegado a informar tiempos de vida media de 10 ms en medios biológicos[9]) que la técnica de detección empleada falla en revelar cualquier efecto distintivo que pudiere surgir de la interacción material- ONOO^- .

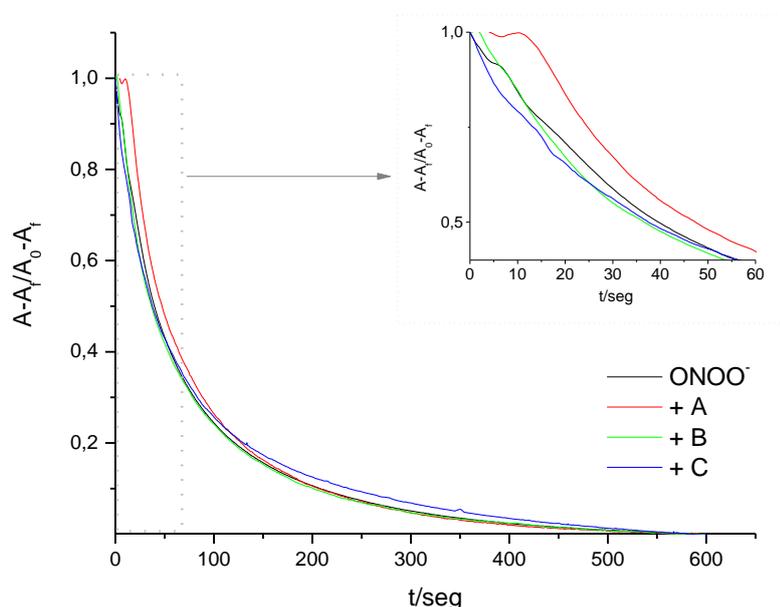
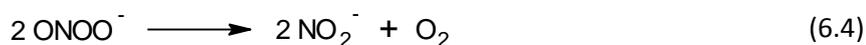
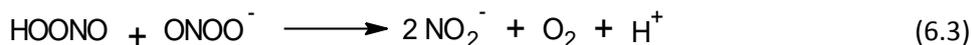
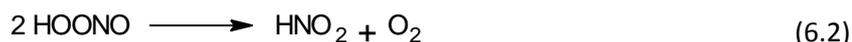


Figura 6.3: Degradación de peroxinitrito en presencia y ausencia de los materiales, en solución de PBS (T1), a 25 °C.

Para poder indagar con mayor profundidad en la cinética de degradación de esta especie reactiva, se decidió trabajar en condiciones de pH en las que se sabe que el peroxinitrito es más estable: T2 (pH= 13,1). En T2, esta degradación es mucho más lenta y permite que se manifiesten diferencias visibles debido a la presencia de los materiales. La química detrás de la degradación del peroxinitrito es sumamente compleja y puede tomar muchas rutas diferentes influenciada por la presencia o ausencia de especies tales como CO_2 , H^+ y metales durante su descomposición[19]. Se sabe que el ácido peroxinitroso se isomeriza a nitrato (reacción 1), sin embargo, el peroxinitrito se descompone de otra manera, cuya naturaleza aún hoy en día sigue siendo objeto de discusión. De acuerdo con Kissner y Koppenol, hay varias posibles reacciones que pueden ser consideradas para la descomposición del peroxinitrito, entre estas se destacan[20]:



Como se explicó en la sección 6.2.3, debido a que el pK_a del ácido peroxinitroso es de 6,8 en una solución de fuerza iónica 0,1 M y a 25 °C, bajo las condiciones de trabajo "T2" ($\text{pH} = 13,1$), el anión peroxinitrito es la especie predominante como resultado de la reacción 1. Finalizado el estudio de degradación, la única molécula detectable es el anión nitrito (figura 6.4), por lo tanto se asumió que la descomposición de peroxinitrito transcurre principalmente a través de la reacción bimolecular (reacción 6.4) que es más lenta que la reacción 6.3 de acuerdo con lo argumentado por Kissner y Koppenol[20]. La reacción 6.3 también podría tener lugar en caso de que quedara algo del ácido peroxinitroso en el medio, sin embargo, al ser más rápida que la reacción 6.4, no sería determinante de la velocidad.

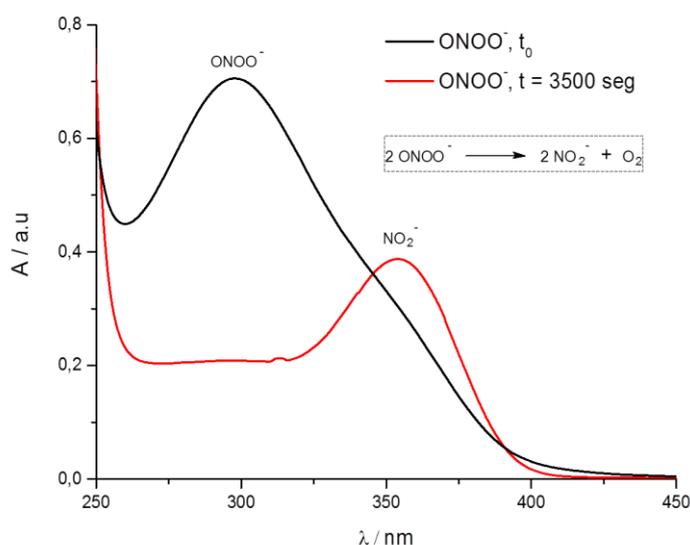


Figura 6.4: Espectro de absorción UV de peroxinitrito antes y después de la degradación. A t_{0s} , la única especie detectable es peroxinitrito ($\lambda_{max} = 302 \text{ nm}$, $\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y a t_{3500s} sólo se observa su producto de degradación, nitrito ($\lambda_{max} = 354 \text{ nm}$, $\epsilon = 23 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)[21].

El estudio de la velocidad de decaimiento de peroxinitrito en T2 reveló que todos los materiales aceleraban y modificaban la cinética de conversión de ONOO^- a NO_2^- , como se manifiesta en la figura 6.5.

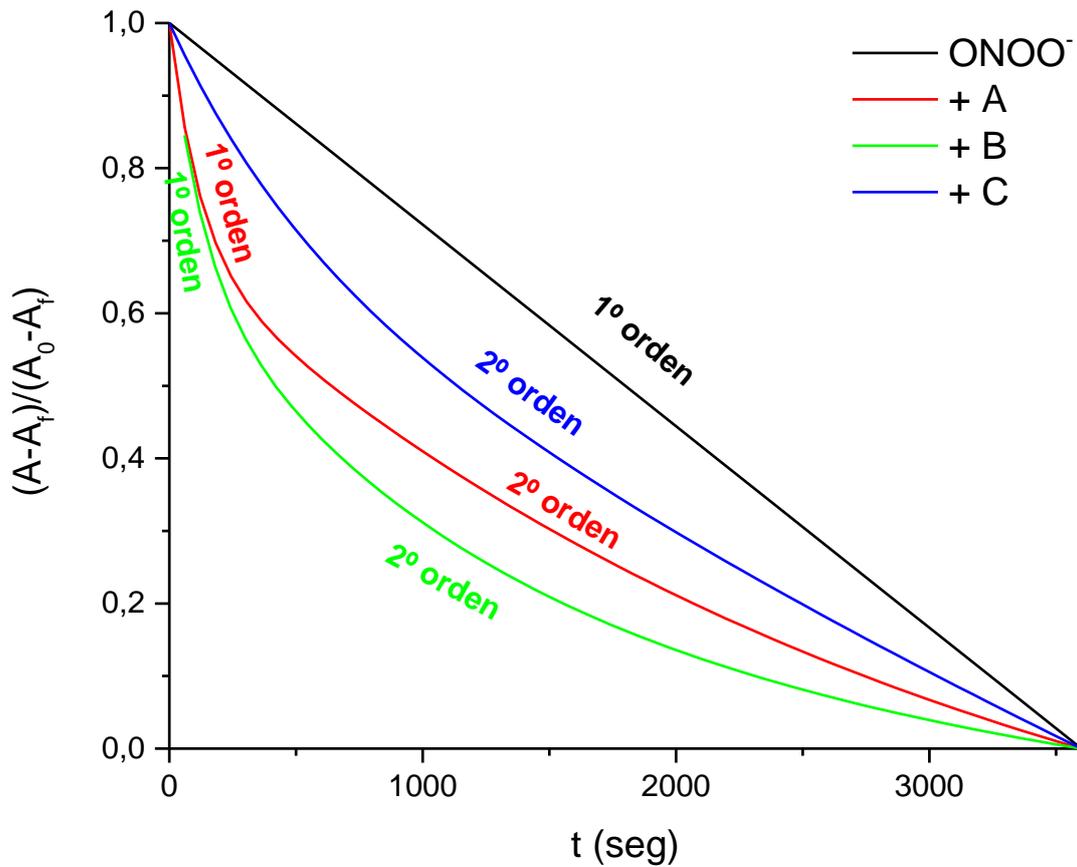


Figura 6.5: Evolución temporal de la degradación de ONOO^- en presencia y ausencia de los materiales a 25 °C y $\text{pH}= 13,1$. Datos obtenidos a partir del decaimiento de la absorbancia (A) a $\lambda= 302$ nm. Se normalizó la Absorbancia (A) sustrayendo la absorbancia a tiempo final (A_f) y dividiendo por la amplitud ($A_0 - A_f$).

Para determinar los parámetros cinéticos de la degradación de peroxinitrito se graficó la velocidad de reacción en función de la concentración de ONOO^- , obtenida como la derivada punto a punto del gráfico de concentración en función del tiempo para cada condición experimental. La figura 6.6 muestra esta relación representada para cada una de las condiciones experimentales.

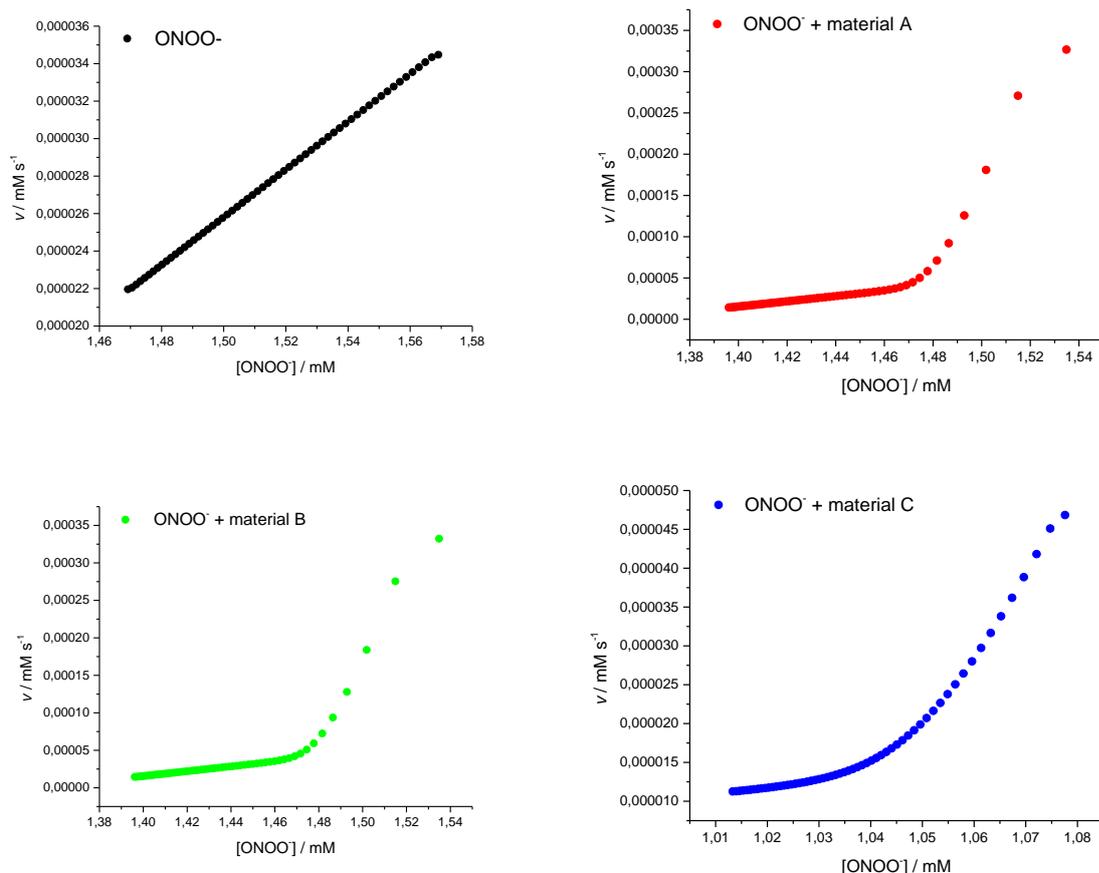


Figura 6.6: Variación de la velocidad de reacción en función de la concentración de ONOO^- .

Los parámetros cinéticos fueron calculados a partir de la dependencia de la velocidad de reacción sobre la concentración. A título ilustrativo, se describe a continuación el procedimiento empleado para determinar el orden y la constante de velocidad para la degradación de peroxinitrito en presencia del material B (figura 6.7).

En la gráfica de velocidad de reacción en función de la concentración de peroxinitrito se aplicó la ley diferencial de velocidad (ecuación (6.2)), iterando sobre distintos rangos de concentración hasta obtener el mejor ajuste posible; la figura 6.7 muestra que la velocidad de degradación de peroxinitrito en presencia del material B no responde a un solo orden en todo el rango de concentraciones estudiado, sino que se muestra de segundo orden a concentraciones bajas del reactivo, mientras que a mayores concentraciones, la cinética se aproxima más a una de primer orden. Para confirmar el orden de reacción y calcular con mayor precisión las respectivas constantes de velocidad, se realizan los gráficos aplicando la forma integrada de la ley de velocidad cuya expresión se encuentra en las ecuaciones (6.3) y (6.4) para cinéticas de primer y segundo orden respectivamente; se espera que, de ser correctos los órdenes de reacción, las gráficas correspondan con una línea recta, de cuya pendiente puede obtenerse la constante de velocidad, k . Este

procedimiento se aplicó a todas las condiciones experimentales y los parámetros cinéticos derivados de los correspondientes ajustes se encuentran resumidos en la tabla 6.1.

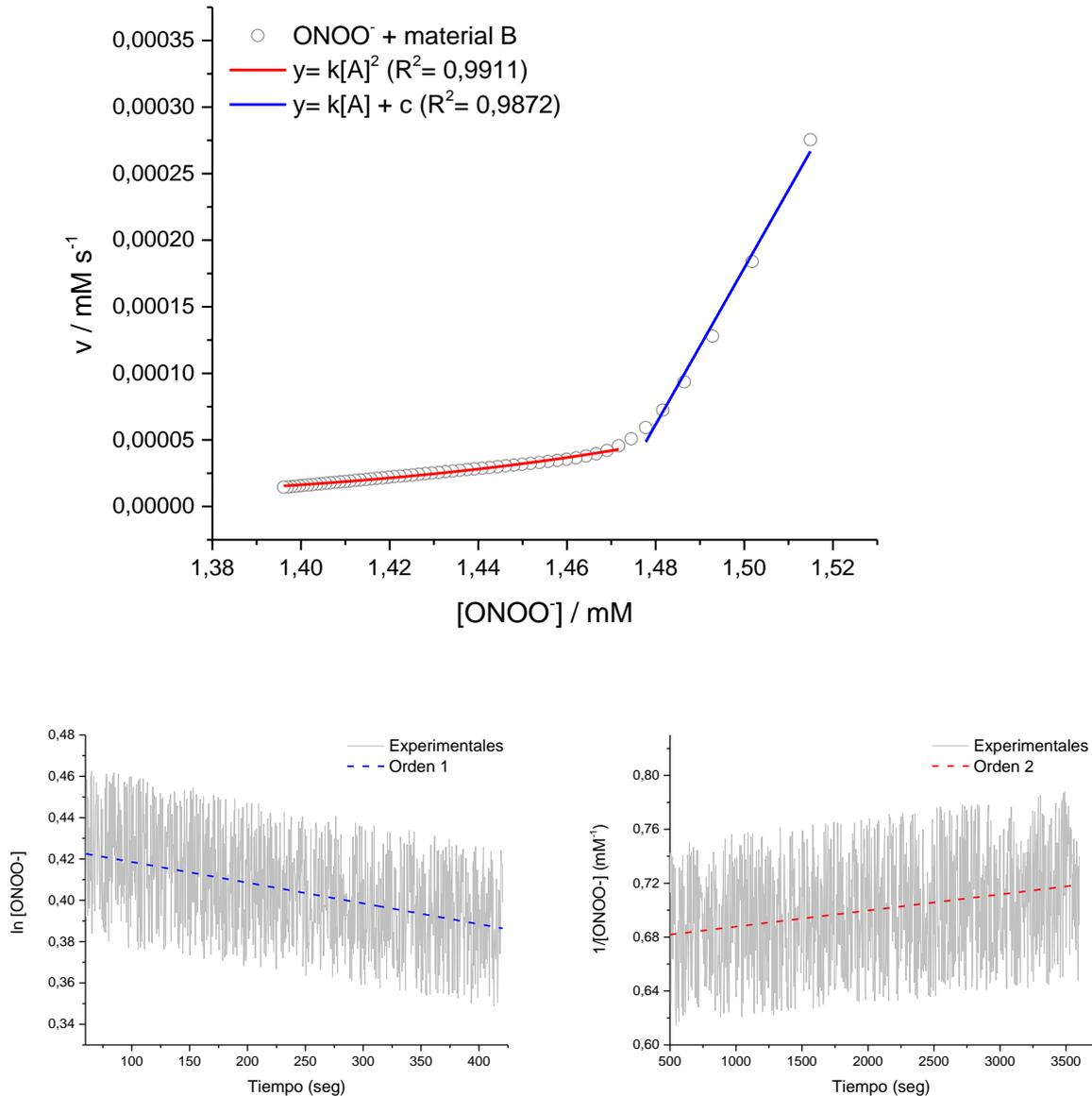


Figura 6.7: Velocidad de degradación de peroxinitrito en presencia del material B. Arriba: el ajuste por secciones utilizando la ecuación 3 revela un cambio de cinética. Abajo: expresiones lineales que revelan cinética de primer y segundo orden para los datos obtenidos experimentalmente. En ambos gráficos, la constante de velocidad puede determinarse a partir de las pendientes de las rectas[18].

En presencia de los materiales A y B hay un aumento tanto en la velocidad como en el orden de reacción que ocurre luego de un período de inducción. Sin embargo, en contacto con el material C, la degradación de peroxinitrito sigue una cinética de segundo orden desde el comienzo del

experimento. Se determinó experimentalmente que la degradación del ONOO^- en ausencia de los materiales ocurre a través de una cinética de primer orden cuya constante es $k_1 = 1,27 \pm 0,04 \times 10^{-4} \text{ seg}^{-1}$ (tabla 6.1). El valor obtenido para esta constante es comparable con aquellos encontrados en literatura para la descomposición de peroxiácidos[22]; sin embargo en estos compuestos la reacción es de primer orden tanto para el ácido como para su base conjugada. En presencia de los materiales A y B, la degradación se comporta con una cinética de primer orden, con un ligero incremento en el valor de k_1 , seguido por una transformación hacia una cinética de segundo orden que ocurre a $[\text{ONOO}^-] = 1,47 \text{ mM}$ para el material A y de $[\text{ONOO}^-] = 0,74 \text{ mM}$ para el material B, cuya constante de velocidad k_2 experimenta un incremento considerable. Finalmente, para la degradación en presencia del material C, no pudo detectarse un período de inducción y la reacción posee una cinética de segundo orden en todo su recorrido.

Tabla 6.1: Parámetros cinéticos de la degradación de peroxinitrito en ausencia y presencia de los materiales.

	Rango de [ONOO ⁻]	k_1 [s ⁻¹]	R ²	Rango de [ONOO ⁻]	k_2 [mM ⁻¹ s ⁻¹]	R ²
ONOO ⁻	1,47 – 1,57 mM	$(1,27 \pm 0,04) \times 10^{-4}$	0,9999			
+ A	1,39 – 1,47 mM	$(3,35 \pm 0,07) \times 10^{-4}$	0,9987	1,47 – 1,52 mM	$(0,064 \pm 0,017)$	0,9989
+ B	1,39 – 1,47 mM	$(6,14 \pm 0,09) \times 10^{-4}$	0,9872	1,47 – 1,52 mM	$(0,068 \pm 0,013)$	0,9911
+ C				1,01 – 1,08 mM	$(0,012 \pm 0,022)$	0,9969

En base a una exhaustiva inspección bibliográfica[20], [22]–[24] y de acuerdo con la descomposición de peroxiácidos, este trabajo propone el siguiente mecanismo que explicaría el comportamiento de la degradación de peroxinitrito en presencia de los materiales estudiados:



Se asume aquí que para la degradación de peroxinitrito en ausencia de los materiales, la reacción (6.6) es la etapa lenta, ergo, el paso determinante de la velocidad. De esta manera la reacción estaría respondiendo a una cinética de primer orden. Los materiales interactuarían con el intermediario causando que la reacción (6.5) influyera la velocidad generando así una conversión de la reacción global hacia una cinética de segundo orden con el correspondiente cambio de las constantes de velocidad. Los resultados sugieren que la interacción con ONOO^- no es específica respecto de los átomos de cerio (Ce) presentes en el material, lo cual estaría de acuerdo con resultados presentes en la literatura[24].

Si bien todos los materiales son capaces de aumentar la degradación de peroxinitrito, la presencia del Ce provoca una transformación de la cinética hacia una de segundo orden a concentraciones menores de ONOO⁻. De hecho, en presencia del material C, el cual contiene nanopartículas de CeO₂, no es posible detectar una concentración de inducción y el proceso de degradación manifiesta una cinética de segundo orden desde el comienzo. En este caso, el efecto sobre k_2 es menor. El material B combina la menor concentración de inducción con el mayor aumento en la constante de velocidad.

6.4. Conclusiones

Los resultados obtenidos representan evidencia preliminar convincente de que los materiales degradan activamente al peroxinitrito. El mecanismo exacto detrás de esta reacción catalítica de degradación permanece siendo una incógnita, ya que los materiales podrían interactuar tanto con el anión ONOO⁻ como con alguna de las especies radicalarias que surgen de la ruptura no enzimática del anión.

La alta velocidad de degradación hace que sea necesario emplear técnicas más sofisticadas de detección que permitan poner en evidencia la presencia de especies intermediarias. En esta tesis se abren las puertas hacia una nueva línea de investigación que involucraría la elucidación del mecanismo de degradación de peroxinitrito. Para ello, hay disponibles ciertas técnicas que nos gustaría recomendar, tales como las recientemente desarrolladas Espectroscopía de Estructura Fina por Absorción de Rayos X extendida con microsegundos de resolución[25], que utiliza fuentes de radiación sincrotrón de tercera generación y la Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear 2D *in-situ* ultra-rápida[26]; ambas, combinadas con el modelado molecular que emplea la Teoría del Funcional de la Densidad (*DFT, Density Functional Theory*), podrían llevar a buen puerto la develación de la incógnita aquí planteada.

6.5. Bibliografía

- [1] J. S. Beckman, T. W. Beckman, J. Chen, P. A. Marshall, and B. A. Freeman, "Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 87, no. 4, pp. 1620–1624, 1990.
- [2] R. Radi, A. Cassina, and R. Hodara, "Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria," *Biol. Chem.*, vol. 383, no. 3–4, pp. 401–409, 2002.
- [3] L. Pacher, J. S. Beckman, and L. Liaudet, "Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease," *Physiol Rev*, vol. 87, pp. 315–424, 2007.
- [4] D. Saleh, P. J. Barnes, and A. Giaid, "Increased production of the potent oxidant peroxynitrite in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis.," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*,

- vol. 155, no. 5, pp. 1763–1769, 1997.
- [5] H. Kimura, R. Hokari, S. Miura, T. Shigematsu, M. Hirokawa, Y. Akiba, I. Kurose, H. Higuchi, H. Fujimori, and Y. Tsuzuki, “Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis,” *Gut*, vol. 42, no. 2, pp. 180–187, 1998.
- [6] J. N. Keller, M. S. Kindy, F. W. Holtsberg, D. K. S. Clair, H.-C. Yen, A. Germeyer, S. M. Steiner, A. J. Bruce-Keller, J. B. Hutchins, and M. P. Mattson, “Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction,” *J. Neurosci.*, vol. 18, no. 2, pp. 687–697, 1998.
- [7] R. Korhonen, A. Lahti, H. Kankaanranta, and E. Moilanen, “Nitric oxide production and signaling in inflammation,” *Curr. Drug Targets-Inflammation Allergy*, vol. 4, no. 4, pp. 471–479, 2005.
- [8] L. Virág, E. Szabo, P. Gergely, and C. Szabó, “Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention,” *Toxicol. Lett.*, vol. 140, pp. 113–124, 2003.
- [9] C. Szabó, H. Ischiropoulos, and R. Radi, “Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 6, no. 8, pp. 662–680, 2007.
- [10] M. Hukkanen, S. A. Corbett, J. Batten, Y. T. Konttinen, I. D. McCarthy, J. Maclouf, S. Santavirta, S. P. Hughes, and J. M. Polak, “Aseptic loosening of total hip replacement. Macrophage expression of inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2, together with peroxynitrite formation, as a possible mechanism for early prosthesis failure,” *J. Bone Joint Surg. Br.*, vol. 79, no. 3, pp. 467–474, 1997.
- [11] R. Suzuki, G. Hirata, J. McKittrick, and J. A. Frangos, “Surface Interaction of Inflammatory Species with Titanium and Titanium Oxide,” *MRS Online Proc. Libr. Arch.*, vol. 530, pp. 111–117, 1998.
- [12] A. Saha, S. Goldstein, D. Cabelli, and G. Czapski, “Determination of optimal conditions for synthesis of peroxynitrite by mixing acidified hydrogen peroxide with nitrite,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 24, no. 4, pp. 653–659, 1998.
- [13] K. M. Robinson and J. S. Beckman, “Synthesis of peroxynitrite from nitrite and hydrogen peroxide,” *Methods Enzymol.*, vol. 396, no. 5, pp. 207–214, 2005.
- [14] G. Merényi, J. Lind, G. Czapski, and S. Goldstein, “Direct determination of the Gibbs’ energy of formation of peroxynitrous acid,” *Inorg. Chem.*, vol. 42, no. 12, pp. 3796–3800, 2003.
- [15] R. M. Uppu, J. N. Lemercier, G. L. Squadrito, H. Zhang, R. M. Bolzan, and W. a Pryor, “Nitrosation by peroxynitrite: use of phenol as a probe,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 358,

- no. 1, pp. 1–16, 1998.
- [16] C. Quijano, D. Hernandez-Saavedra, L. Castro, J. M. McCord, B. a. Freeman, and R. Radi, “Reaction of peroxynitrite with Mn-Superoxide dismutase. Role of the metal center in decomposition kinetics and nitration,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 15, pp. 11631–11638, 2001.
- [17] Beer, “Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten,” *Ann. Phys.*, vol. 162, no. 5, pp. 78–88, 1852.
- [18] P. W. Atkins and J. De Paula, *Química física*. Médica Panamericana, 2008.
- [19] C. E. Richeson, P. Mulder, V. W. Bowry, and K. U. Ingold, “The complex chemistry of peroxynitrite decomposition: New insights,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 120, no. 29, pp. 7211–7219, 1998.
- [20] R. Kissner and W. H. Koppenol, “Product distribution of peroxynitrite decay as a function of pH, temperature, and concentration,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, no. 2, pp. 234–239, 2002.
- [21] J. J. Jankowski, D. J. Kieber, and K. Mopper, “Nitrate and nitrite ultraviolet actinometers,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 70, no. 3, pp. 319–328, 1999.
- [22] C. Molina, R. Kissner, and W. H. Koppenol, “Decomposition kinetics of peroxynitrite: influence of pH and buffer,” *Dalton Trans.*, vol. 42, no. 27, pp. 9898–9905, 2013.
- [23] M. Kirsch, H.-G. Korth, A. Wensing, R. Sustmann, and H. de Groot, “Product formation and kinetic simulations in the pH range 1–14 account for a free-radical mechanism of peroxynitrite decomposition,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 418, no. 2, pp. 133–150, 2003.
- [24] J. M. Dowding, S. Seal, and W. T. Self, “Cerium oxide nanoparticles accelerate the decay of peroxynitrite (ONOO⁻),” *Drug Deliv. Transl. Res.*, vol. 3, no. 4, pp. 375–379, 2013.
- [25] Q. Kong, F. Baudelet, J. Han, S. Chagnot, L. Barthe, J. Headspith, R. Goldsbrough, F. E. Picca, and O. Spalla, “Microsecond time-resolved energy-dispersive EXAFS measurement and its application to film the thermolysis of (NH₄)₂[PtCl₆],” *Sci. Rep.*, vol. 2, no. 1018, pp. 1–9, 2012.
- [26] R. Boisseau, U. Bussy, P. Giraudeau, and M. Boujtita, “In Situ Ultrafast 2D NMR Spectroelectrochemistry for Real-Time Monitoring of Redox Reactions,” *Anal. Chem.*, vol. 87, no. 1, pp. 372–375, 2015.

Capítulo 7

Biocompatibilidad

7.1. Introducción

Una pregunta esencial que necesita responderse a la hora de decidir si un biomaterial será apto para entrar en contacto con el cuerpo humano es si éste es biocompatible. La biocompatibilidad puede ser definida como “la habilidad de un material para ejercer una función específica y generar una respuesta apropiada en el hospedador”[1].

Para poder predecir las reacciones que ocurren cuando un material es insertado en el organismo, se desarrollaron una serie de ensayos *in vitro* de biocompatibilidad que, tradicionalmente, evalúan la citotoxicidad del material. Estos estudios, en general, monitorean un evento final, como la permeabilidad de la membrana citoplasmática de células muertas, o algún parámetro metabólico específico tal como división celular o actividad enzimática. En la actualidad también están cobrando auge otro tipo de ensayos *in vitro* que evalúan la activación de determinados procesos biológicos, tales como mutagénesis o la inducción de la respuesta inflamatoria y de reacciones inmunes hacia los materiales.

Cualquier estudio, ya sea *in vitro* o *in vivo* debe tener en cuenta la aplicación final del biomaterial. Además, es importante considerar que los ensayos que se seleccionan y sus resultados

tengan relevancia en el entorno mucho más complejo del organismo. Los estudios experimentales han demostrado, en general, una buena correlación entre resultados *in vitro* e *in vivo*[2], [3], confirmando así la idoneidad de los estudios *in vitro* como una primera impresión de la biocompatibilidad del material.

Habitualmente, cualquier dispositivo médico implantable debe ser evaluado en tres pasos sucesivos. El primero es la evaluación *in vitro* con cultivos celulares, que proveen información rápida y de bajo costo. Este paso no sólo es necesario antes de la aplicación del biomaterial sino también durante el diseño del implante con el fin de seleccionar los materiales más apropiados. El segundo paso es la evaluación *in vivo* con modelos animales, que sólo se lleva a cabo con el producto final. El último paso es la evaluación clínica en pacientes humanos[4]. El objetivo de este trabajo, y lo que se discutirá a lo largo de este capítulo es justamente, hallar evidencia biológica que nos permita seleccionar, dentro de los materiales preparados, el más adecuado para ser utilizado en la regeneración de tejido óseo.

Para la determinación de la toxicidad intrínseca de estos materiales, se evaluaron la morfología, viabilidad y actividad metabólica de dos modelos celulares: la línea L929 de fibroblastos de ratón y el cultivo primario de pre-osteoblastos de calvaria de rata neonatal. La selección de estos dos modelos celulares responde a varias premisas, a saber:

Las líneas celulares de fibroblastos de ratón tales como 3T3 o L929, están siendo rutinariamente empleadas en la evaluación de propiedades citotóxicas de biomateriales debido a la buena reproducibilidad de sus tasas de crecimiento y respuesta biológica; estas propiedades, sumadas a que es relativamente sencillo controlar sus condiciones de cultivo, hace que ambas líneas sean actualmente recomendadas por estándares internacionales para la evaluación de dispositivos médicos con aplicaciones odontológicas[4]. Más aun, los fibroblastos son células íntimamente ligadas al proceso de regeneración tisular y cicatrización de heridas, ya que participan en la ruptura del coágulo de fibrina, crean nueva matriz extracelular y estructuras de colágeno que sirven de soporte para la actividad de otras células envueltas en la regeneración del tejido conectivo, y finalmente se encargan de la contracción de la herida[5]. Todas estas razones, sumadas al hecho de que los fibroblastos suelen ser uno de los tipos celulares mayoritarios en el tejido que rodea al implante, hacen oportuno el uso de la línea L929 como modelo para evaluar la citotoxicidad de nuestros materiales.

Los pre-osteoblastos tienen su origen en células mesenquimales osteoprogenitoras y son la forma proliferativa e indiferenciada de los osteoblastos, las células encargadas de secretar la matriz

ósea (hidroxiapatita, colágeno tipo I y muchas otras proteínas no colágenas). Estas células migran y se adhieren a la superficie del biomaterial ya al primer día luego de la implantación, secretando proteínas óseas y creando una matriz no colágena sobre la superficie del implante para regular su posterior anclaje y mineralización[6]. La íntima relación de este tipo celular con el proceso de regeneración ósea y posterior aceptación del implante es crítica. Hoy en día la toxicidad causada por la liberación de iones metálicos provenientes de prótesis óseas es un gran problema clínico. Es por ello que estudiar la toxicidad que los materiales puedan ejercer sobre este modelo celular debe ser tenido muy en cuenta.

En este capítulo se estudiará el efecto de la microestructura, la concentración de iones cerio, la capacidad de almacenamiento de oxígeno y las propiedades fisicoquímicas de los materiales sobre la supervivencia, proliferación, morfología y adhesión de dos modelos celulares con el objetivo de comenzar a identificar el o los materiales más adecuados para ser empleados en la regeneración del tejido óseo así como también para descartar aquellos que presenten signos de incompatibilidad biológica.

7.2. Materiales y métodos

7.2.1. Reactivos

El Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (*High-sugar Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM), Suero Fetal Bovino (*Fetal Bovine Serum*, FBS) y Penicilina/Estreptomina (P/S) 5000 U/mL, así como también la línea celular L929 derivada de fibroblastos de ratón fueron obtenidos en American Type Culture Collection (ATCC). El Medio de Cultivo Mínimo Esencial modificación alfa (*Minimum Essential Medium Alpha Modification*, α -MEM) proviene de Sigma Chemical Co.. La solución de Tripsina/EDTA obtenida en Gibco. El reactivo de viabilidad PrestoBlue® (10X) procede de Invitrogen y los CdTe-Quantum Dots (CdTe-QDs) fueron comprados a Vive Nano Inc. (formerly Northern Nanotechnologies Inc.). La solución de buffer fosfato 10X (*Phosphate Buffer Saline*, PBS), pH= 7,4 fue adquirida en ThermoFisher. El reactivo de Trypan Blue 0,4 % proviene de Gibco y la solución de Giemsa se compró a Sigma-Adrich.

7.2.2. Instrumental

Microscopía óptica y de contraste de fases: La observación del cultivo celular de fibroblastos sin fijar y sus correspondientes fotografías fueron realizadas usando un microscopio invertido modelo Olympus CKX41 acoplado a una cámara digital Q-Imaging QICAM, trabajando con una magnificación de 10X y 20X. Las microfotografías de contraste de fases fueron capturadas luego de fijar las células utilizando un microscopio OLYMPUS IX 81 acoplado con una cámara de campo

claro QIMAGING QIClick trabajando con una magnificación de 40X; el software utilizado para la adquisición de imágenes fue el Image-Pro Plus 7.0.

Espectroscopía de fluorescencia: La actividad metabólica de los fibroblastos fue monitoreada midiendo la intensidad de la fluorescencia emitida por el reactivo de viabilidad. Para ello se utilizó un lector de placas de cultivo multi-well modelo PolarStar Optima Multidetecction Microplate Reader (BMG Labtech), trabajando en modo de detección de fluorescencia a $\lambda_{Ex}= 560$ nm y $\lambda_{Em}= 590$ nm respectivamente.

Microscopía óptica: Luego de los tratamientos, las células fueron observadas utilizando un microscopio invertido modelo Nikon Eclipse TE 300 acoplado a una cámara Nikon Digital Sight DS U2 tanto para el conteo celular como para la evaluación de su morfología.

7.2.3. Cultivo celular de fibroblastos

La línea celular de fibroblastos murinos se cultivó de acuerdo con las especificaciones del proveedor, brevemente: las células se mantuvieron en medio de cultivo completo que consiste en DMEM suplementado con 10 % de FBS y 1 % de Penicilina/Estreptomina (P/S) en frascos de cultivo de poliestireno de 25 cm², a 37 °C en atmósfera humidificada con un balance CO₂/aire de 5/95%. Los subcultivos se realizaron mediante tripsinización dos a tres veces por semana, cuando la confluencia alcanzó el 70-80 %.

7.2.4. Aislamiento de pre-osteoblastos y cultivo celular

Los pre-osteoblastos de calvaria de rata fueron obtenidos a partir de ratas neonatales de 5 días que fueron sacrificadas por decapitación. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo en conformidad con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, publicada por el US National Institute of Health en su publicación número 85-23, revisada en 1996[7]. Brevemente, las calvarias se incubaron en PBS conteniendo EDTA 4 mM a 37 °C por dos períodos de 10 minutos cada uno, descartando el sobrenadante al finalizar; a continuación se enjuagaron con PBS y se las sometió a un proceso de digestión en PBS conteniendo 200 U/mL de colagenasa por cuatro períodos de 15 minutos cada uno. Se descartaron las células liberadas durante la primera digestión y aquellas liberadas durante las digestiones subsecuentes se centrifugaron por 10 minutos a 1500 rpm, se colectaron y unificaron.

Finalmente las células fueron cultivadas en α -MEM-15 % FBS-1 % P/S a 37 °C en atmósfera humidificada conteniendo 5,5 % CO₂. Luego de 24 horas, el medio de cultivo fue reemplazado por α -MEM-10 % FBS-1 % P/S y la incubación continuó hasta que las células alcanzaron el 80 % de

confluencia (generalmente 2 a 3 días). Las células que no se usaron para los ensayos de citotoxicidad inmediatos, fueron congeladas en nitrógeno líquido y reservadas para usos posteriores.

7.2.5. Preparación de los materiales para el ensayo de citotoxicidad

Para la realización de los ensayos en contacto con fibroblastos de ratón L929 se prepararon soluciones frescas inmediatamente antes de comenzar los mismos de acuerdo al procedimiento que se describe a continuación: se pesó la cantidad adecuada de los materiales a testear (A, B, B₁-B₈, C y Anatasa Comercial (AA)) dentro de viales de vidrio que luego fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 30 minutos. A continuación, mediante técnica aséptica, se incorporó el volumen apropiado de DMEM-10 % FBS-1 % P/S a cada vial para obtener una solución madre estéril de 1 mg/mL. Los materiales se suspendieron por sonicación en baño termostatzado a una frecuencia de 40 kHz (Ultrasonic Cleaner Benson 200) e inmediatamente después se prepararon las suspensiones de trabajo mediante diluciones sucesivas en medio de cultivo completo para obtener las concentraciones finales deseadas.

Para llevar a cabo el grupo de ensayos de biocompatibilidad con pre-osteoblastos de calvaria de rata, se testearon los siguientes materiales: B₁ (TiO₂) que corresponde al control sin cerio; B₂, B y B₄ que fueron obtenidos a partir de una relación molar Ce(Val)₃/TTIP de 6×10^{-4} , 9×10^{-4} y 60×10^{-4} respectivamente; y B_{SBF} que es B luego de 30 días de inmersión en Suero Fisiológico Simulado para permitir la formación de una capa superficial de HAp. La viabilidad se determinó con el ensayo de Azul de Tripano. Para ello se pesó la cantidad adecuada de cada material en viales de vidrio que luego fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 30 minutos. Luego se prepararon las suspensiones correspondientes mediante el agregado de α -MEM-10 % FBS-1 % P/S para obtener suspensiones estériles de trabajo de concentración adecuada (250 μ g/mL). Los materiales se suspendieron por sonicación en baño termostatzado a una frecuencia de 40 kHz antes de cada ensayo.

7.2.6. Ensayos de citotoxicidad

7.2.6.1. Citotoxicidad frente a fibroblastos de ratón L929

Para determinar la citotoxicidad de los materiales, se preparó una suspensión celular en DMEM-10 % FBS-1 % P/S. Se sembraron 50 μ L de dicha suspensión en una placa de cultivo opaca de 96 pocillos (Nunc™) en una densidad de 5000 células por pocillo y se mantuvieron a 37 °C en atmósfera humidificada con un balance CO₂/aire de 5/95% durante toda la noche. Luego, cada pocillo fue tratado con 50 μ L de las suspensiones de los materiales recientemente preparadas para obtener las concentraciones deseadas: 1000, 500, 100, 50 and 10 μ g/mL para los materiales A, B y C;

y 100 µg/mL para B₁-B₈ y AA. Luego de 24, 48 y 72 horas de incubación, se determinó la viabilidad celular mediante la técnica de PrestoBlue® de acuerdo con el protocolo del fabricante y como se describe en la sección siguiente. Células tratadas con CdTe-QDs a una concentración efectiva de 500 µg/mL fueron usadas como control positivo (C+) y células sin tratar fueron usadas como control negativo (C-) para normalizar los resultados. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados de viabilidad celular se expresaron como porcentaje del control negativo. El siguiente esquema resume el procedimiento hasta aquí descrito:



Figura 7.1: Esquema modelo del ensayo de citotoxicidad para los materiales A, B y C frente a fibroblastos de ratón L929. Células sin tratar fueron utilizadas como control negativo y células tratadas con 500 µg/mL de CdTe-QDs se utilizaron como control positivo. La viabilidad se midió con el ensayo de PrestoBlue.

7.2.6.2. Citotoxicidad frente a pre-osteoblastos de calvaria de rata

Para evaluar la citotoxicidad de los materiales se preparó una suspensión de pre-osteoblastos de calvaria de rata en α -MEM-10 % FBS-1 % P/S, luego 300 µL de esta suspensión fueron sembrados en una placa de 48-pocillos y mantenidos a 37 °C en atmósfera humidificada conteniendo 5,5 % CO₂, durante un día. Al cabo de este tiempo, se incorporaron 200 µL de las respectivas suspensiones de los materiales (B₁, B₂, B, B₄ y B_{SBF}) previamente sonicadas de manera tal de alcanzar una concentración final de 100 µg/mL en cada pocillo de tratamiento, continuando con la incubación. Finalmente, luego de 24 y 72 horas, se estudió la viabilidad celular mediante la técnica de Azul de Tripiano, de acuerdo con la descripción ofrecida en la siguiente sección. Células sin tratar y cultivadas en las mismas condiciones fueron usadas como control negativo (C-). Los ensayos se realizaron por triplicado.

7.2.7. Ensayos de viabilidad celular

7.2.7.1. Ensayo de PrestoBlue

Para determinar el número de fibroblastos viables presentes en la suspensión, se seleccionó la técnica de PrestoBlue® que está basada en el principio de que las células viables son capaces de mantener un ambiente reductor en su citoplasma, mientras que las células no viables pierden rápidamente su capacidad metabólica[8]. El reactivo de detección utiliza la habilidad que tienen las células viables para metabolizar al reactivo resazurina de su forma oxidada (azul oscuro) a su forma reducida rojo fluorescente ($\lambda_{Ex}= 560 \text{ nm}$; $\lambda_{Em}= 590 \text{ nm}$), figura 7.2.

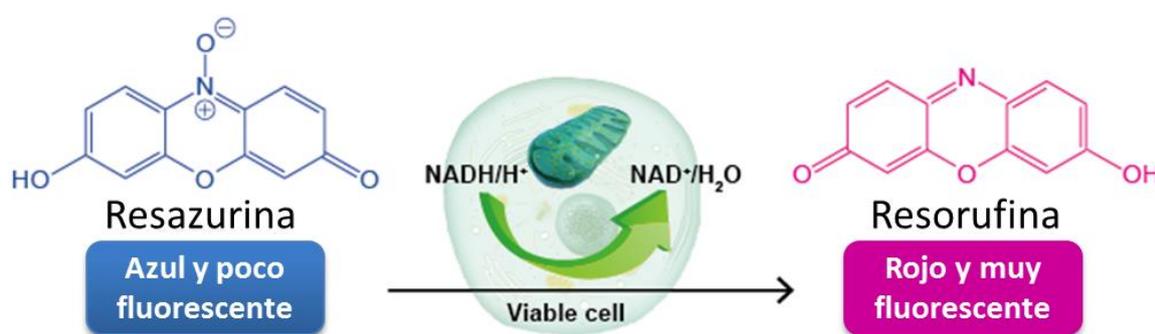


Figura 7.2: Las células viables reducen el reactivo resazurina de color azul a su forma roja altamente fluorescente, resorufina. Imagen modificada de <http://www.biotoool.com/product/vita-blue-cell-viability-reagent.html>.

El procedimiento experimental empleado en la determinación de la viabilidad celular de los fibroblastos de ratón L929 consistió en incorporar 10 μL del reactivo (PrestoBlue®) en cada pocillo del ensayo y las placas se mantuvieron en el incubador a 37 °C durante 30 minutos para dar lugar a que ocurra la reacción de reducción. Finalmente la intensidad de la fluorescencia fue medida trabajando con las longitudes de onda de excitación y emisión apropiadas para la resorufina. Las líneas de base para los valores de fluorescencia fueron determinadas para cada condición experimental utilizando controles en ausencia de células. El porcentaje de viabilidad celular que se informa en los resultados se obtiene para cada ensayo utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{(\text{Fluorescencia del tratamiento}) \times 100 \%}{(\text{Fluorescencia del control negativo})} \quad (7.1)$$

7.2.7.2. Ensayo de Azul de Tripano

Para determinar la viabilidad de los pre-osteoblastos se seleccionó una técnica de exclusión de captación que emplea un colorante derivado de la toluidina, el Azul de Tripano, capaz de teñir tejidos y células muertas[9]. El principio de funcionamiento es sencillo: las células viables no permiten la absorción del colorante a través de sus membranas plasmáticas; sin embargo, cuando las células mueren pierden la integridad de sus membranas, volviéndose permeables al colorante y permitiendo que éste se acumule en su interior y las tiña, Figura 7.3. Por lo tanto, las células no viables mostrarán un color azul distintivo bajo el microscopio óptico permitiendo su correcta identificación y conteo con hemocitómetro.

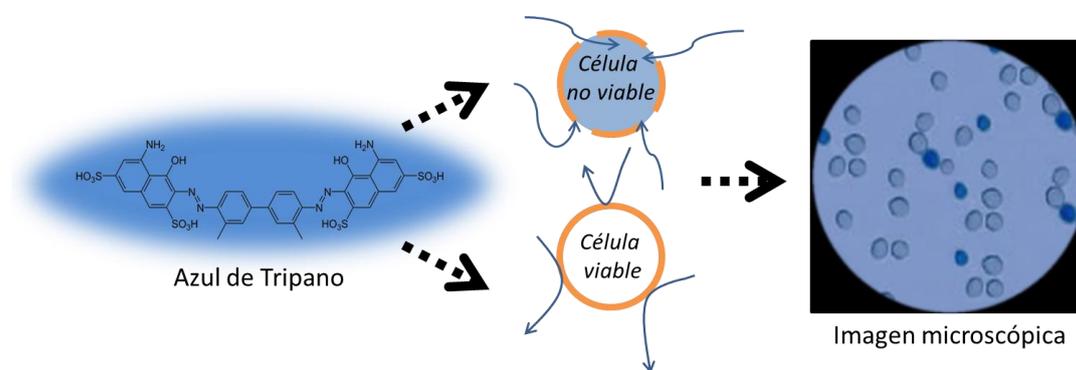


Figura 7.3: Principio de exclusión del método de Azul de Tripano. Las células viables no son permeables al colorante mientras que las no viables sí permiten la acumulación del colorante en su interior.

El procedimiento experimental empleado en este trabajo para determinar la viabilidad celular de los pre-osteoblastos de calvaria de rata consistió en remover el medio de cultivo y lavar cada pocillo con PBS 1X. A continuación las células se despegaron usando una solución de tripsina en PBS 0,25 % (25 μ L por pocillo) y se detuvo la reacción agregando 100 μ L de α -MEM-10 % FBS. Finalmente, se agregaron 10 μ L de solución de Azul de Tripano 0,1 % a cada pocillo y la suspensión se transfirió a un hemocitómetro para su conteo por duplicado. El porcentaje de viabilidad celular que se informa en los resultados se obtuvo para cada ensayo utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{(\text{Número de células viables por mL de alícuota}) \times 100 \%}{(\text{Número total de células por mL de alícuota})} \quad (7.2)$$

7.2.8. Determinación de la morfología celular de L929 e interacción con los materiales

Con este propósito las células L929 fueron sembradas en una densidad de $1,5 \times 10^5$ células/pocillo usando una placa de cultivo de 6 pocillos conteniendo cubreobjetos de vidrio en el fondo; de esta manera se las mantuvo en incubador a 37 °C y 5 % CO₂ durante 24 horas para permitir la estabilización del cultivo y la adhesión celular. Luego, se incorporó un volumen adecuado de una suspensión de los materiales A, B y C, para alcanzar una concentración de 100 µg/mL en cada pocillo y la incubación continuó por otras 24 horas en las mismas condiciones. Finalmente, se removieron los cubreobjetos, se los lavó exhaustivamente con PBS 1X para eliminar el resto de material que no estuviese interactuando con las células y se los montó en portaobjetos adecuados para su observación microscópica.

La morfología también se evaluó mediante observación microscópica directa en las placas de cultivo transparentes de 96 pocillos. Para ello se sembraron 50 µL de una suspensión de L929 preparada en DMEM-10 % FBS-1 % P/S, en una densidad de 5000 células por pocillo. A continuación se añadieron 50 µL de una suspensión de los materiales A, B y C a los pocillos de tratamiento y 50 µL de medio de cultivo completo en los pocillos control. Se tomaron las fotografías correspondientes al $t=0$ utilizando un microscopio óptico invertido, y se continuó la incubación a 37 °C y 5 % CO₂ durante 24 horas. Luego de ese tiempo, se volvieron a fotografiar las muestras. En este estudio no se permitió que el cultivo alcance un estado confluyente con el objetivo de evitar la formación de desmosomas en banda y beneficiar, de esta manera, el estudio del efecto de los materiales sobre células individuales.

7.2.9. Determinación de la morfología celular de pre-osteoblastos e interacción con los materiales

Para la evaluación morfológica los pre-osteoblastos se sembraron en placas de cultivo conteniendo cubreobjetos de vidrio en el fondo usando el medio de cultivo α -MEM-10 % FBS-1 % P/S. Luego de 72 horas de incubación a 37 °C y 5,5 % CO₂ en contacto con los materiales, se removieron los cubreobjetos, se los lavo con PBS 1X y se los dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se fijaron con metanol, se tiñeron con Giemsa[10] y se las montó en portaobjetos adecuados para su observación microscópica.

7.2.10. Análisis estadístico

Para los estudios de viabilidad celular, se realizaron tests de ANOVA y el grado de significancia de las diferencias se determinó usando el test T de Student a una cola, considerando

que valores de $p > 0,05$ son no significativos. Los datos cuantitativos siempre se expresaron como promedio \pm desvío estándar para cada grupo de experimentos.

7.3. Resultados y Discusión

7.3.1. Viabilidad de fibroblastos: Efecto de la concentración del material

En un primer intento por determinar la toxicidad intrínseca de los materiales A, B y C, esto es, el efecto general que el material pueda ejercer sobre cualquier tipo celular, se evaluó la viabilidad de fibroblastos de ratón (L929), una línea modelo para ensayos de biocompatibilidad recomendada por estándares internacionales[4]. Para ello se utilizó el ensayo de PrestoBlue luego de 24, 48 y 72 horas de incubación en presencia de concentraciones crecientes de dichos materiales. Las concentraciones evaluadas fueron 10, 50, 100, 500 y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados se resumen en la Figura 7.4.

El análisis de los resultados muestra que la viabilidad de los fibroblastos, en general, oscila entre 80 y 140 % respecto del control negativo. No existen prácticamente diferencias significativas en la viabilidad celular en presencia de los materiales A y B para todas las condiciones de tratamiento, excepto en las máximas concentraciones de B luego de 24 y 48 horas de incubación, pero este resultado se normaliza a las 72 horas, volviéndose no significativo. Un caso similar se da a las 24 horas de tratamiento con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del material A; sin embargo, el hecho de que la diferencia respecto del control negativo (C-) es considerablemente pequeña y que el número de células viables rápidamente se estabiliza a las 48 horas de co-incubación (volviéndose prácticamente idéntico al (C-)), hacen que esta concentración pueda considerarse como no tóxica. En general estos dos materiales, A y B, dan lugar a viabilidades que oscilan entre un 90 y 110 % respecto del control negativo, valores considerados normales para este modelo celular[11].

El efecto ejercido por el material C, este es, aquel compuesto por $\text{CeO}_2\text{-TiO}_2$, merece especial consideración. Se observa un incremento aparente en la viabilidad celular en presencia del material que es proporcional a la concentración empleada. Luego de 24 y 48 horas de incubación los valores de viabilidad alcanzan máximos de 138 % y 134 %, respectivamente, que tienden a estabilizarse a las 72 horas, aunque manteniendo siempre la tendencia inicial. Es importante destacar en este punto que el marcador de viabilidad empleado, PrestoBlue, mide un evento bioquímico que ocurre cuando las células están vivas y que deja de ocurrir luego de que estas mueren. El metabolismo activo de las células viables que permite la reducción de resazurina a su forma fluorescente, resorufina, es cuantificable espectrofotométricamente y una disminución en la intensidad de la fluorescencia sirve entonces como marcador de muerte celular. Ahora bien, la afirmación opuesta, esto es, que el

aumento en la intensidad de fluorescencia está siempre relacionado con un aumento en el número de células viables no es necesariamente verídico para el caso de los fibroblastos ya que éstos son capaces de mantener su metabolismo muy activo aún en estado de quiescencia. La alta actividad metabólica observada para este material podría deberse tanto a un aumento en la proliferación celular como a una activación de la síntesis y secreción de moléculas de la matriz extracelular[12].

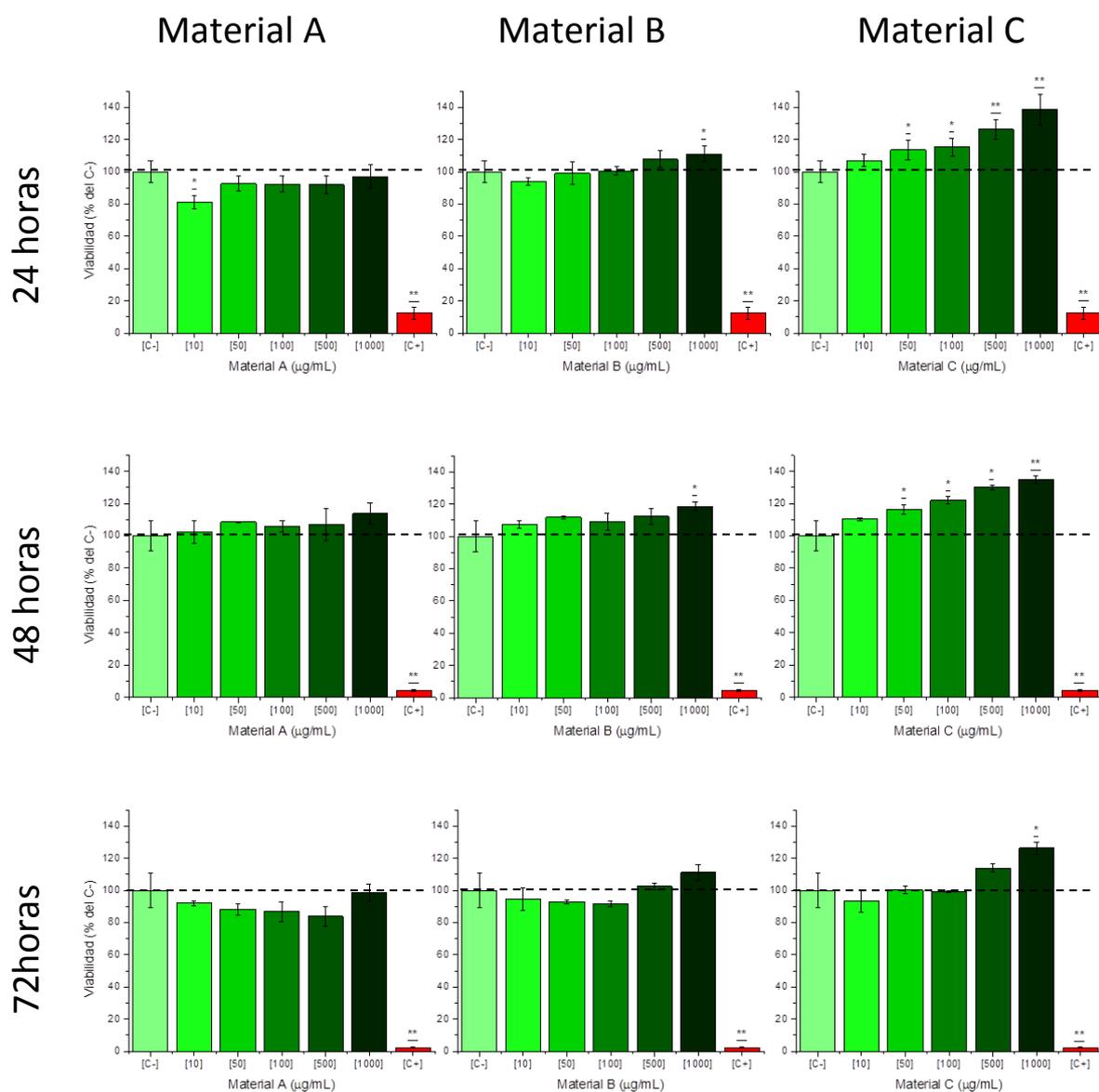


Figura 7.4: Viabilidad de fibroblastos de ratón (L929) en presencia de los materiales A, B y C luego de 24, 48 y 72 horas de incubación. El efecto citotóxico fue medido utilizando el ensayo de PrestoBlue. El control positivo (C+) representa células tratadas con Cd-Te Quantum Dots en una concentración tóxica efectiva de 500 µg/mL. Todos los resultados están expresados como promedio ± desvío estándar de tres réplicas y están normalizados respecto del grupo de células sin tratar (C-). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ corresponde a valores significativamente mayores o menores que (C-).

Para descartar que este efecto se deba a un aumento en el número de células viables basta con observar las intensidades de fluorescencia absolutas que presentan las células sin tratar, esto es, las correspondientes al control negativo. Aprovechando el hecho de que el cultivo celular de L929 es muy reproducible, es posible estimar el número de células viables presentes en el medio a lo largo del tiempo a partir del número inicial de células sembradas (5000 células/pocillo) si se tiene en cuenta que el tiempo de duplicación calculado para este modelo celular cultivado en las mismas condiciones es de 30 ± 2 horas[13]. Este dato permite hacer una aproximación de la cantidad de células que debería haber presentes en el cultivo al cabo de 72 horas y la intensidad de la fluorescencia correspondiente a ese número de células.

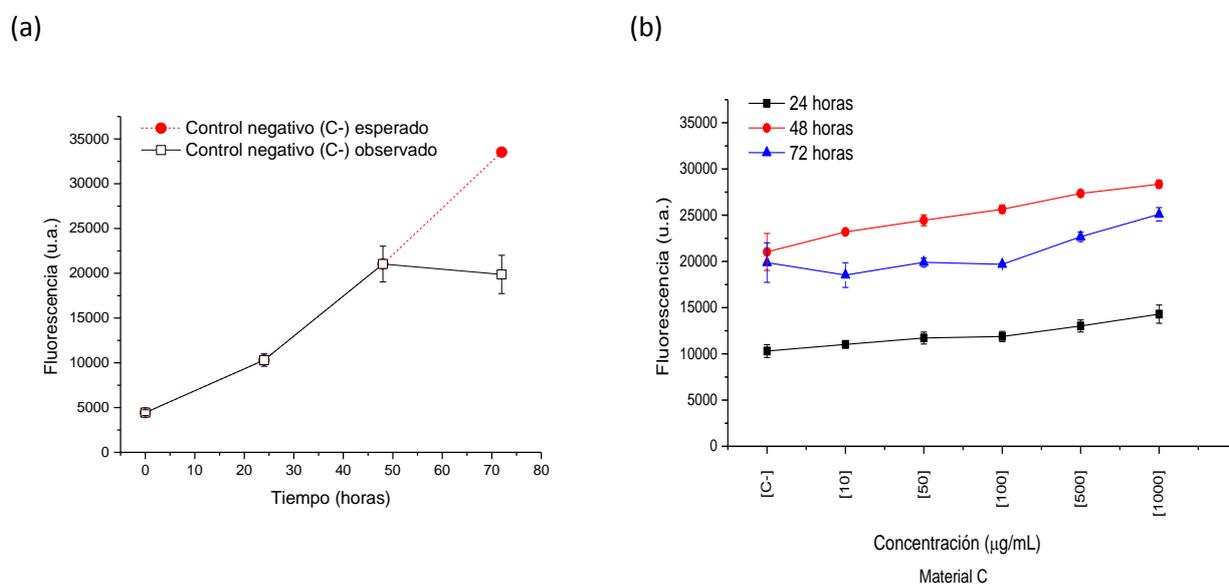


Figura 7.5: **(a)** Relación entre la fluorescencia observada y la esperada para el cultivo de fibroblastos de ratón en ausencia de materiales (C-) al inicio del ensayo de citotoxicidad y luego de 24, 48 y 72 horas. **(b)** Valores absolutos de fluorescencia para el ensayo de citotoxicidad en presencia del material C al cabo de 24, 48 y 72 horas de incubación.

Como se aprecia en la figura 7.5 a), la intensidad de la fluorescencia crece linealmente en el tiempo a medida que el número de células aumenta. Sin embargo luego de 72 horas de incubación, la intensidad observada se desvía considerablemente del valor que uno esperaría encontrar para el número de células estimado en caso de que éstas se hallasen proliferando activamente; más aún, la fluorescencia medida no difiere significativamente de la obtenida el día anterior ($t= 48$ horas). Esto sugiere entonces, que los fibroblastos alcanzaron la confluencia en el pocillo y habrían entrado en estado quiescente. A partir de esta premisa, es posible cuestionar que el aumento en la intensidad de la fluorescencia observada luego del tratamiento con concentraciones crecientes del material C (figura 7.5 b)) se deba a un aumento en la proliferación de los fibroblastos.

7.3.2. Morfología de fibroblastos

De acuerdo con lo recomendado por Ekwall *et al.* [14], la morfología celular es un análisis que debe hacerse antes y después del test de toxicidad de manera tal de poder comparar la apariencia de las células con los resultados de estos ensayos. Dado que los nanomateriales en estudio (A, B y C) se organizan en superestructuras que exhiben diferentes aspectos superficiales, y que el objetivo de este ensayo fue evaluar el efecto de las nanopartículas sobre el comportamiento celular, los materiales fueron vigorosamente sonicados para dispersar las partículas en el medio de cultivo.

La figura 7.6 muestra la apariencia del cultivo celular en el momento inicial, tiempo en el que el material y las células son incorporados simultáneamente; y luego de 24 horas de co-incubación. La condición control corresponde a células cultivadas en ausencia de materiales.

En el tiempo inicial se observa células de aspecto redondeado, ya que éstas aún no comenzaron a adherirse; el material, en todos los casos, se observa homogéneamente distribuido en el área de cultivo, a excepción de algunos agregados que son más evidentes en los materiales B y C.

Al cabo de 24 horas, es posible observar una fuerte interacción entre los materiales A y B con los fibroblastos; sin embargo, esta asociación no parece tener impacto sobre el comportamiento celular en lo que respecta a morfología y adhesión. La interacción con el material C, por otra parte sí parece afectar el normal funcionamiento de estas células. En este caso, tras 24 horas de incubación, la mayoría de los fibroblastos muestran una tendencia hacia la retracción de sus proyecciones, se vuelven redondeados y pierden capacidad de adherencia, aglomerándose en torno a las partículas.

Para poder tener una visión más detallada de la interacción que existe entre los materiales y este modelo celular, se decidió evaluar la morfología de un cultivo de fibroblastos luego de 24 horas de incubación, en presencia de A, B y C, empleando microscopía óptica de contraste de fases, figura 7.7. Nuevamente, células sin tratar fueron utilizadas como control negativo (C-) para contrastar resultados.

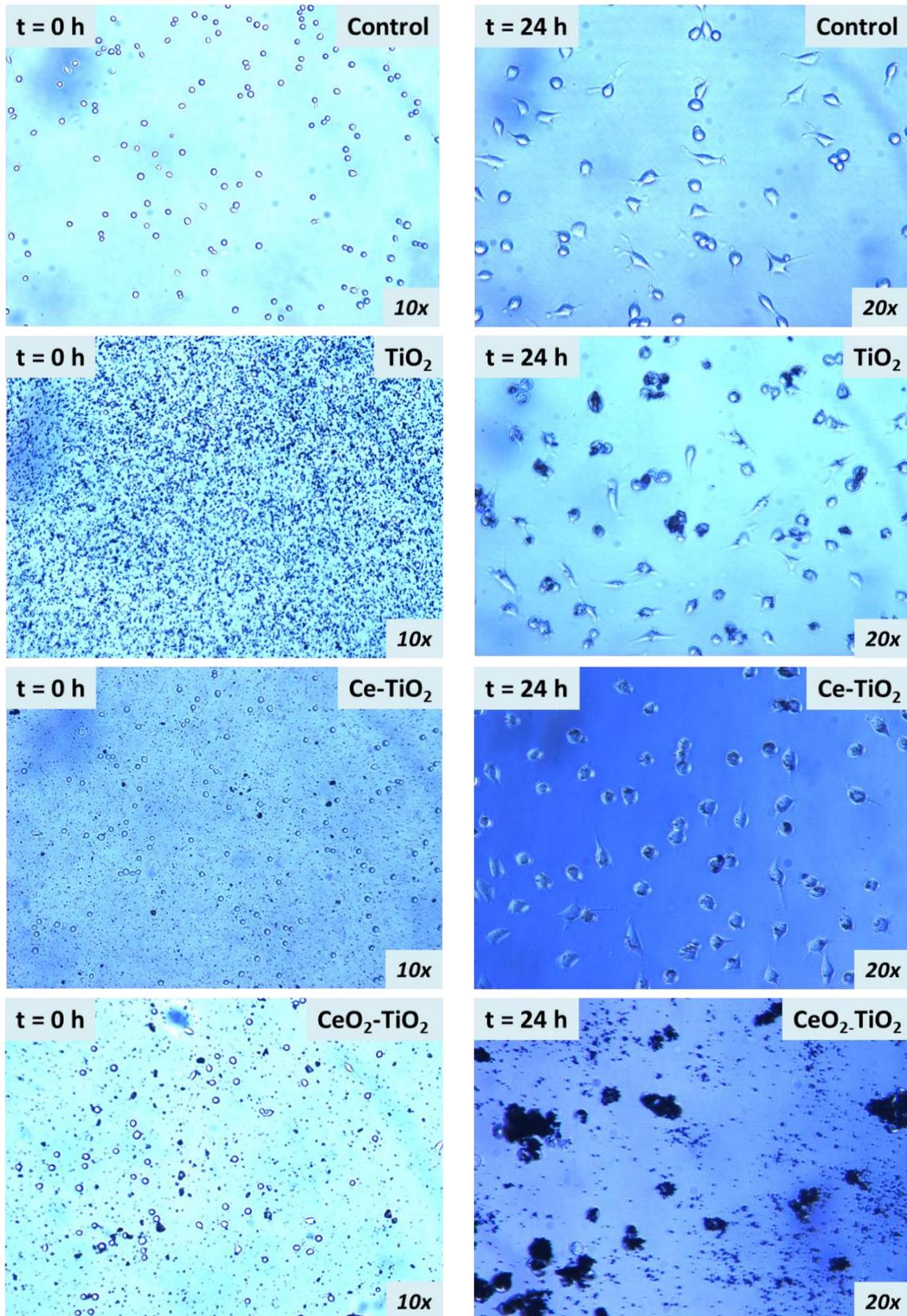


Figura 7.6: Células L929 cultivadas en presencia (tratamiento) y ausencia (control) de los materiales A (TiO_2), B ($Ce-TiO_2$) y C (CeO_2-TiO_2) suspendido en el medio de cultivo. Las fotografías de microscopía óptica fueron tomadas in situ, en campo claro, sobre la placa de cultivo al inicio del tratamiento ($t= 0$ h) y al final del mismo ($t= 24$ h). Se observa una fuerte asociación entre las partículas y las células al final del tratamiento pero no es posible determinar la localización celular de las mismas.

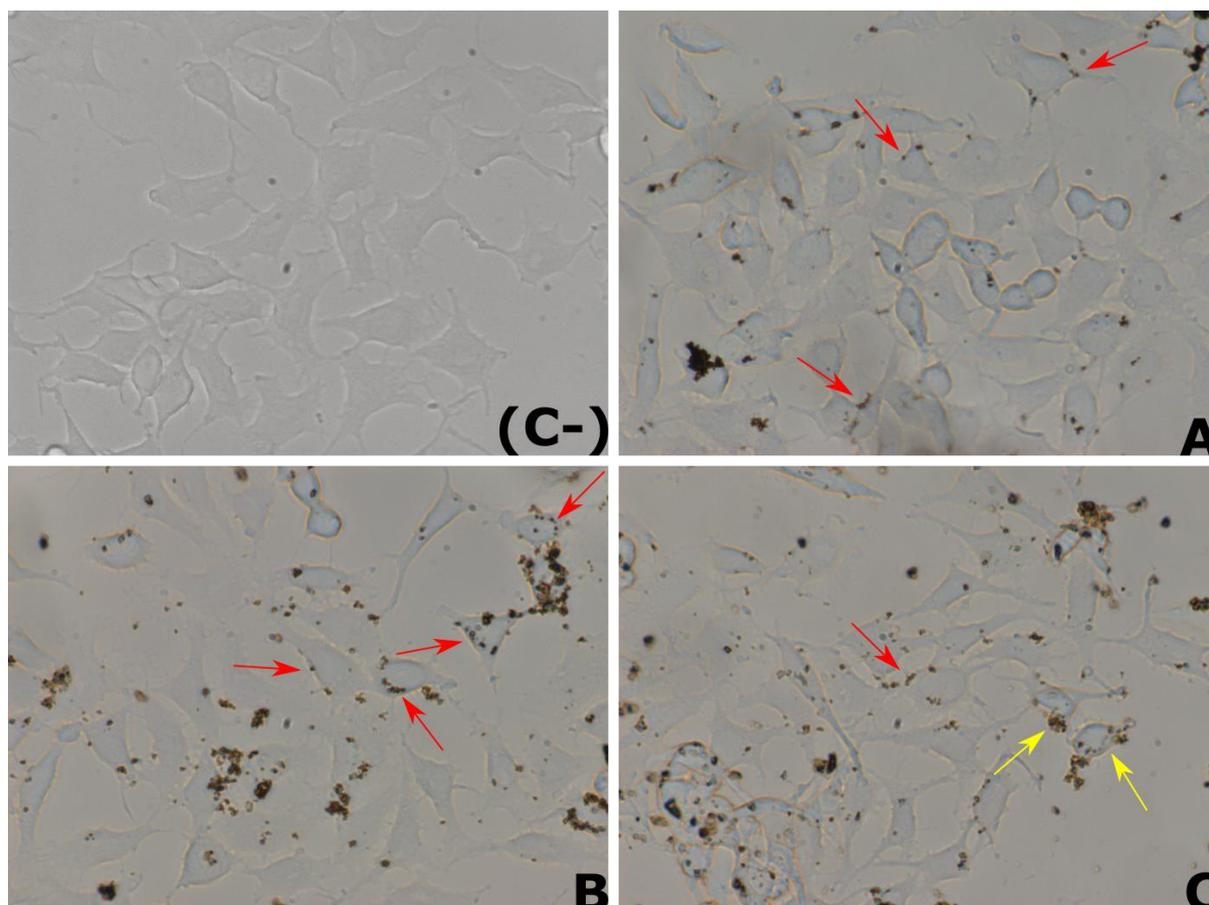


Figura 7.7: Microscopía óptica de contraste de fases mostrando la morfología celular de los fibroblastos de ratón luego de 24 horas de cultivo en presencia de los materiales TiO_2 (A), Ce-TiO_2 (B) Y $\text{CeO}_2\text{-TiO}_2$ (C). Células cultivadas en ausencia de materiales fueron utilizadas como control negativo (C-). Magnificación 40X.

La figura 7.7 muestra que las células control crecen y se esparcen normalmente sobre el sustrato, mostrando muchos de los caracteres propios de fibroblastos normales: presentan un citoplasma irregular, ramificado y en forma de huso, con gran cantidad de protrusiones filopódicas. Una morfología similar se observa cuando las células son tratadas con los materiales A y B, en forma consistente con las observaciones realizadas en el cultivo sin fijar (figura 7.7). En el cultivo de los fibroblastos en presencia del material C, sin embargo, puede observarse que aquellas células rodeadas por gran cantidad de partículas adquieren un aspecto redondeado, mostrando evidencia clara de una reducción de las protrusiones pseudopodiales (flechas amarillas en la figura 7.7). Además, estas células pierden capacidad de adherirse al sustrato, forman agregados (círculos de puntos en la figura 7.8) y pueden ser fácilmente desprendidas de su soporte cuando se las lava.

En todos los casos, la observación microscópica pone en evidencia la fuerte interacción que existe entre los materiales y las células; sin embargo, este análisis no permite determinar categóricamente la localización celular exactas de las partículas, aunque se sospecha que están

alojadas en la superficie celular y/o fuertemente asociadas a la membrana plasmática (flechas rojas en figura 7.7).

La interacción de nanopartículas y la membrana celular es dependiente del tamaño de la nanopartícula y muy probablemente está íntimamente ligada al proceso de envoltura que inicia la endocitosis mediada por receptores; proceso cuya iniciación requiere la formación concertada de múltiples interacciones nanopartícula-receptor[15]. Varios modelos matemáticos han demostrado que la endocitosis mediada por receptor es óptima cuando no escasean puntos de unión tanto en las nanopartículas como en la superficie celular[16]. Termodinámicamente, una partícula de 50-60 nm es capaz de reclutar suficiente cantidad de receptores como para desencadenar exitosamente el proceso de internalización[17]. La absorción pasiva de las nanopartículas también depende del tamaño, y ésta es frecuente cuando no superan los 15-20 nm de diámetro, aunque esta característica depende del modelo celular empleado y de las propiedades fisicoquímicas de la partícula[15]. Aunque es necesario profundizar más sobre la interacción entre estos materiales y el modelo celular elegido para poder ser verdaderamente concluyentes al respecto, es posible conjeturar en principio que, como el tamaño de partícula de los materiales A, B y C oscila entre 28 y 40 nm, la sospecha de que las partículas no se encuentran internalizadas sería consistente con lo reportado en la literatura por otros autores.

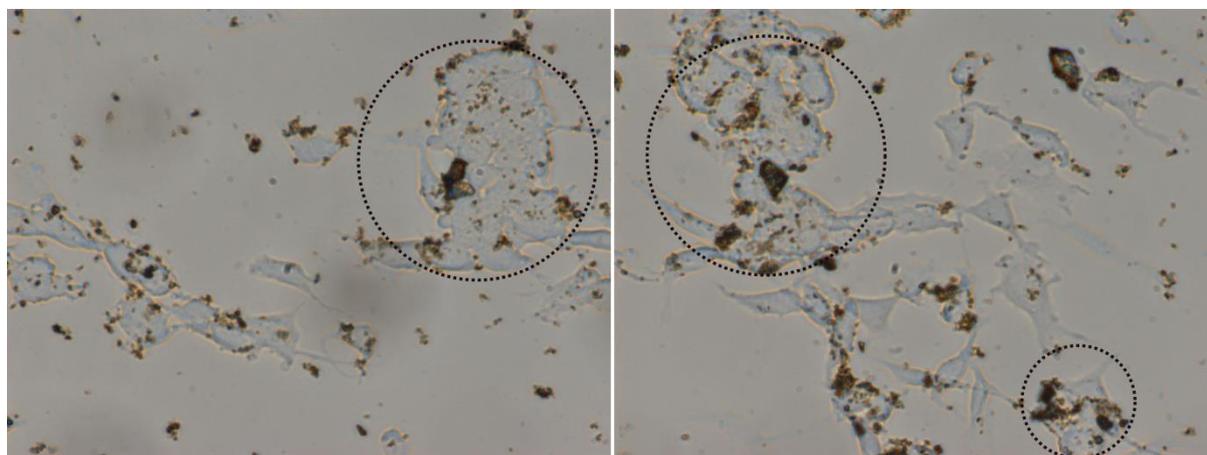


Figura 7.8: Microfotografías ópticas de contraste de fases mostrando agregados celulares (círculos en línea de puntos) luego de 24 horas de cultivo en presencia del material C ($\text{CeO}_2\text{-TiO}_2$). Magnificación 40X.

El evidente efecto del material C sobre la adhesión superficial de los fibroblastos puede entenderse a partir de las características de hidrofobicidad del material, ya que éste se distingue por poseer la mayor intensidad en las bandas del espectro de infrarrojo cercano (sección 4.3.1.5, capítulo 4) que denotan su mayor capacidad para captar moléculas de agua y lo que lo convierte en el material más hidrofílico. Para lograr una correcta adhesión celular, debe existir una superficie

moderadamente hidrofílica, que resulta óptima ya que, superficies extremadamente hidrofílicas, tales como las de diamantes nanoestructurados (ángulo de contacto de aproximadamente 2°) [18] o altamente hidrofóbicas, tales como copolímeros en bloque de ácido poli DL-láctico y polioxietileno [19], resisten casi totalmente la adhesión celular. Superficies altamente hidrofílicas, entonces, como es el caso del material C, limitan o impiden totalmente la adhesión y el crecimiento celular. Se sabe que este tipo de superficies se adsorben débilmente a las moléculas de la membrana celular encargadas de la adhesión, lo cual puede dar lugar al desprendimiento de las células de su sustrato, especialmente en períodos de cultivo prolongados, cuando son capaces de unir varias células simultáneamente[20].

Un factor que merece ser considerado a la hora de evaluar la toxicidad del material C es la incorporación de estructuras de cerio en la matriz de TiO₂. Como se explicó en el capítulo 2, el material C es sintetizado utilizando nanopartículas de CeO₂ como fuente de cerio, mientras que los materiales B y B₁-B₈ son preparados a partir de concentraciones crecientes de tripentanoato de cerio que están por encima y por debajo de la concentración de Ce empleada en la síntesis del material C. Para indagar si el efecto negativo observado en la actividad metabólica y la adhesión celular pueden ser atribuidos a la presencia del lantánido, se decidió evaluar los mismos parámetros en la serie B₁-B₈ para contrastar resultados. Su discusión se encuentra desarrollada en la sección siguiente.

7.3.3. Viabilidad y morfología de fibroblastos: Efecto de la concentración de cerio

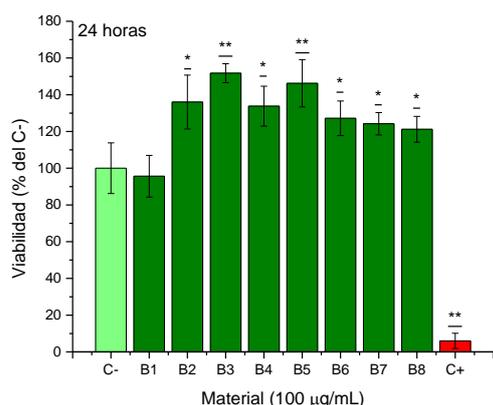
Para evaluar la toxicidad ejercida por los materiales con contenido creciente de cerio en su composición elemental, se estudió la viabilidad celular en un modelo de fibroblastos de ratón (L929) en contacto con los materiales B₁-B₈ a una concentración efectiva de 100 µg/mL durante 24 horas, que es el tiempo recomendado por la norma ISO 10993-5 para este tipo de estudios[4]. La selección de la concentración de trabajo coincide con lo reportado por otros autores en estudios similares[21][22]. Para contrastar resultados, otro grupo de experimentos fue llevado a cabo con TiO₂ comercial (AA, Anatasa Aldrich) en concentraciones crecientes que variaron desde 10 hasta 1000 µg/mL. La supervivencia celular fue estimada indirectamente a través del seguimiento de la actividad metabólica mitocondrial, usando el ensayo de PrestoBlue.

Como puede observarse en la figura 7.9 a), la proliferación de los fibroblastos en presencia de los materiales que contienen cerio fue significativamente mayor que las observadas en el control negativo y el material B₁, que consiste en TiO₂ puro. Puede observarse que se alcanza un máximo en la proliferación celular en aquellas condiciones que contienen las muestras B₃-B₅, preparadas con una relación molar Ce/Ti de $1,2 \times 10^{-3}$, 6×10^{-3} y 12×10^{-3} respectivamente; concentraciones menores y

mayores de cerio usadas durante la síntesis, dieron origen a materiales con menor efecto en el crecimiento celular.

Actualmente se sabe que las nanopartículas de óxido de cerio tienen la habilidad de neutralizar radicales libres en condiciones fisiológicas a través de mecanismos comparables con los de las enzimas endógenas superóxido dismutasa[23] y catalasa[24]. Así también, en el capítulo anterior se demostró la capacidad que tienen los materiales B y C (Ce-TiO_2 y $\text{CeO}_2\text{-TiO}_2$ respectivamente) para acelerar la degradación del radical peroxinitrito (ONOO^\cdot) dando lugar a especies menos dañinas (NO_2)[25]. Ahora bien, teniendo en cuenta estos hechos, y sumados a la premisa de que el balance redox es de particular importancia en la proliferación de fibroblastos[26], podría pensarse que ante proporciones específicas de Ce/Ti durante la síntesis, el material obtenido posee una capacidad de almacenamiento de oxígeno óptima para favorecer la proliferación de fibroblastos.

(a)



(b)

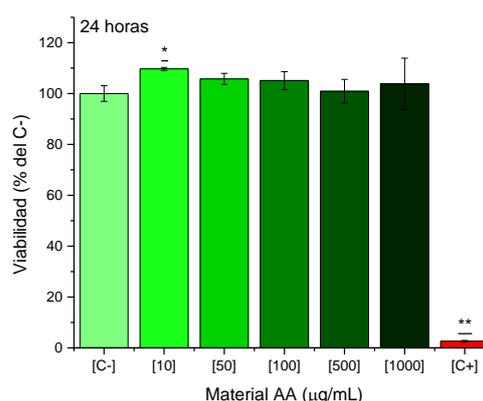


Figura 7.9: Viabilidad de fibroblastos de ratón (L929) luego de 24 horas de incubación con los materiales (a) B₁-B₈ (TiO_2 y Ce-TiO_2 experimentales) y (b) AA (TiO_2 comercial), usando el ensayo de PrestoBlue. Medio de cultivo puro fue usado como (C-), en tanto que CdTe-QDs actuaron como (C+). Las intensidades de fluorescencia fueron normalizadas respecto del (C-), que se consideró como 100% y el resultado se expresa como promedio \pm desvío estándar de 3 réplicas. Nota: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparados con el (C-).

En la figura 7.9 b) puede observarse la evolución de la viabilidad celular en presencia de concentraciones crecientes de una muestra de TiO_2 comercial de referencia. Como puede apreciarse, no hay cambios visibles en la viabilidad a las concentraciones testeadas, particularmente en 100 µg/mL, que es la misma que se empleó en el análisis de la supervivencia celular en presencia de los materiales conteniendo cerio. Esto permite inferir que el aumento en la viabilidad observado en

presencia de los materiales conteniendo cerio no se debe al TiO_2 solo, sino a las características particulares que poseen los materiales conteniendo al lantánido.

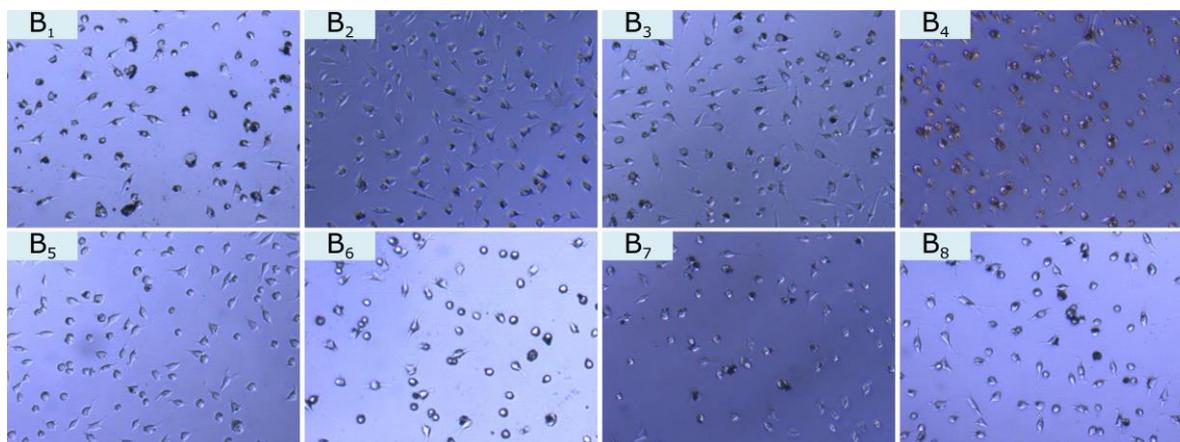


Figura 7.10: Microfotografías ópticas de las células L929 cultivadas en presencia de los materiales B₁-B₈ (TiO_2 y Ce- TiO_2 preparados con concentraciones crecientes de cerio). Las fotografías de microscopía óptica fueron tomadas in situ, en campo claro, sobre la placa de cultivo al final del tratamiento con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada material ($t=24$ h). Magnificación: 20X.

La exploración de la morfología celular mediante microscopía óptica luego de 24 horas de tratamiento con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los materiales (figura 6.10) muestra que no existen cambios apreciables en la morfología y adhesión de las células. La evaluación morfológica fue realizada en placas de cultivo multi-well de 96 pocillos respetando el protocolo utilizado para los ensayos de viabilidad celular, por lo que las imágenes ilustradas en esta figura pueden ser vistas como una fotografía tomada al mismo tiempo que se realizó el ensayo de viabilidad. La ausencia de confluencia en el cultivo permite suponer que las células se encuentran en fase proliferativa activa y que el aumento en la actividad metabólica determinado con PrestoBlue puede asociarse con un aumento en la viabilidad celular.

De estos ensayos es posible concluir, en primera instancia, que los materiales B₁-B₈ carecen de toxicidad intrínseca en términos de viabilidad y morfología celular. El aumento en la supervivencia celular aparenta ser concentración dependiente y podría estar relacionado con la capacidad de almacenamiento de oxígeno de estos materiales, ya que se sabe que ambientes reductores favorecen la proliferación de fibroblastos[27]. Esta hipótesis, sin embargo, necesita ser evaluada en profundidad para confirmarse.

7.3.4. Viabilidad y morfología de pre-osteoblastos: Efecto del material y material + HAp

Retomando lo mencionado en la introducción de este capítulo, el propósito de los ensayos de citotoxicidad es el de determinar la existencia de posibles efectos tóxicos, ya sea por el

biomaterial mismo, o por productos que se desprendan de él. Como en todo ensayo primario de biocompatibilidad, esta etapa estudia la muerte celular y la alteración en la morfología y adhesión celular. Esta sección no sólo evalúa la biocompatibilidad de los materiales *per se*, sino que además, hace particular hincapié en la toxicidad que surgiera por la posible liberación de átomos de cerio o sus óxidos al entorno biológico. Es por ello que se evalúan materiales cuyas concentraciones se encuentran por debajo y bastante por encima de la que contiene el material B. Asimismo, en vistas de la íntima relación que existe entre los osteoblastos y la superficie mineralizada del biomaterial, es importante descartar efectos tóxicos debido a la presencia de esta cubierta de fosfatos de calcio; es por esto que también se estudió la citotoxicidad del material cubierto de hidroxiapatita (obtenido por inmersión en SBF durante 30 días). Los resultados correspondientes a la viabilidad celular están resumidos en la figura 7.11, mientras que morfología y adhesión celular están representadas en la figura 7.12.

El incremento en el contenido de cerio en el material, así como la presencia de la cubierta de hidroxiapatita, se evaluó al cabo de 24 y 72 horas para el caso de la viabilidad celular y a 72 horas en el estudio morfológico. Como se observa en la figura 7.11, tanto las propiedades fisicoquímicas como el contenido de cerio (relación molar $\text{Ce}(\text{Val})_3/\text{TTIP}$: 0, 6×10^{-4} , 9×10^{-4} y 60×10^{-4}) no alteran la viabilidad celular luego de 24 y 72 horas de tratamiento, mostrándose ésta conservada y sin diferencias estadísticamente significativas respecto del control negativo.

Estos materiales, además, exhiben superficies reactivas capaces de unirse a los tejidos vivos al inducir la nucleación y crecimiento de una cubierta de hidroxiapatita en la interfase implante-tejido. Es por ello que evaluar el cambio en la microtopografía inducido por la presencia de esta capa mineral en la respuesta celular, también merece ser considerado. En este caso, tampoco se observan cambios significativos sobre la viabilidad celular tanto a 24 como a 72 horas. Este dato es particularmente interesante porque existe evidencia de que la presencia de una capa de hidroxiapatita pre-formada sobre la superficie de materiales de TiO_2 estimula la expresión de marcadores de diferenciación del fenotipo osteoblástico[28], por lo que el uso de este tipo de cubierta se plantea como una alternativa interesante para mejorar la regeneración del tejido óseo debido a una interacción con osteoblastos optimizada.

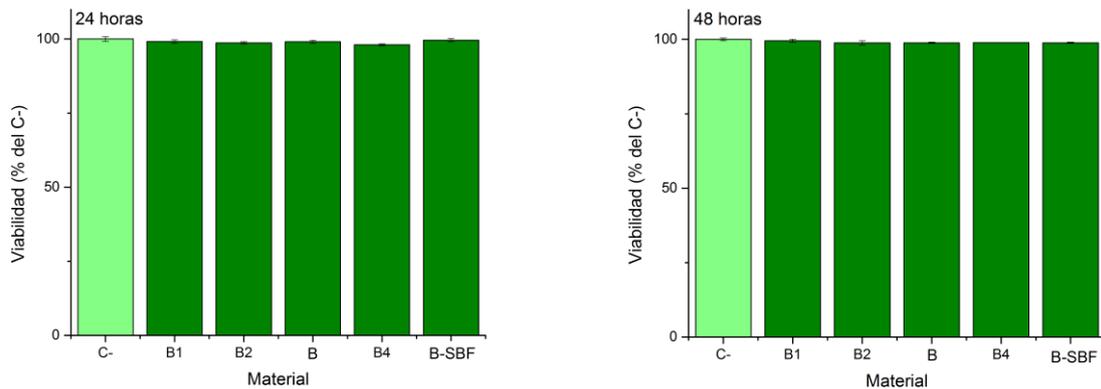


Figura 7.11: Efecto de la concentración de cerio y la presencia de la cubierta de HAp en la viabilidad de osteoblastos. Células sin tratar fueron utilizadas como control negativo (C-), B_1 (TiO_2) corresponde al control sin cerio, B_2 , B y B_4 fueron obtenidos a partir de una relación molar $Ce(Val)_3/TTIP$ de 6×10^{-4} , 9×10^{-4} y 60×10^{-4} respectivamente; B-SBF es el material B conteniendo una cubierta de HAp. La viabilidad se determinó con el ensayo de Azul de Tripano.

Durante el proceso de adhesión y crecimiento celular, la morfología de los pre-osteoblastos cultivados en presencia de los materiales se mostró similar a la del control negativo para todas las muestras evaluadas (figura 7.12). Las células lucen su típica morfología poligonal y se extienden a lo largo de la superficie de manera normal, observándose también la presencia de abundantes áreas de protrusión celular.

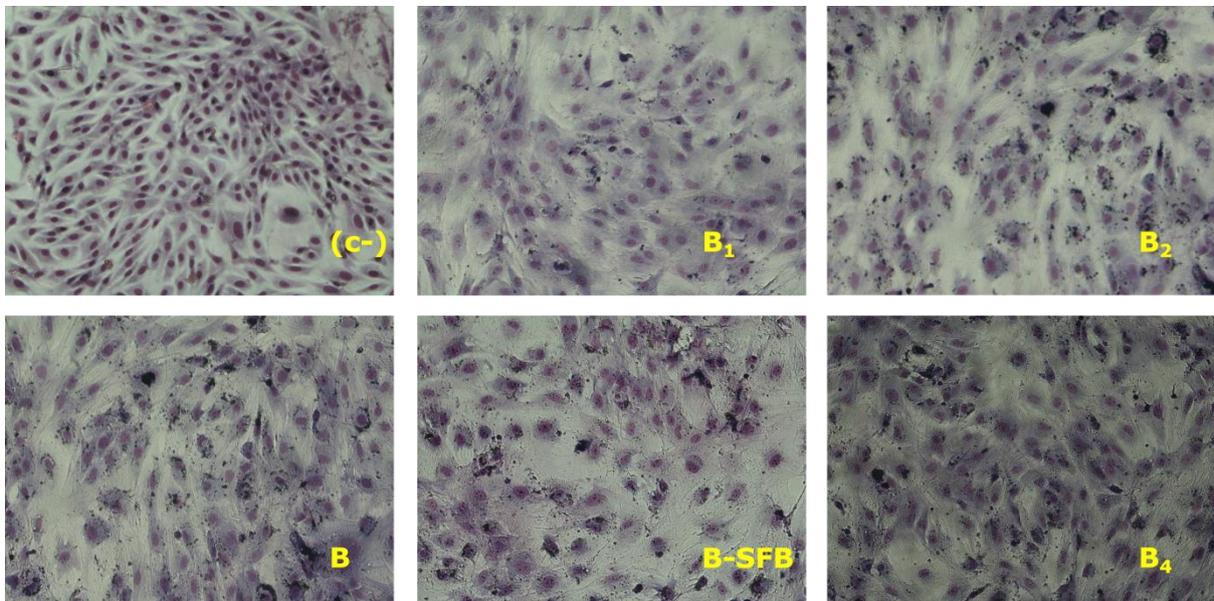


Figura 7.12: Microfotografías ópticas de pre-osteoblastos con tinción Giemsa luego de 72 horas de tratamiento. Magnificación: 20X. Células sin tratar pertenecen al control negativo (C-), B_1 (TiO_2) es el control sin cerio, B_2 , B y B_4 fueron obtenidos a partir de una relación molar $Ce(Val)_3/TTIP$ de 6×10^{-4} , 9×10^{-4} y 60×10^{-4} respectivamente; B-SBF es el material B conteniendo una cubierta de HAp.

7.4. Conclusiones

A lo largo de este capítulo se resumen varios ensayos de biocompatibilidad por contacto directo de los materiales con dos modelos celulares: la línea de fibroblastos de ratón L929 y el cultivo primario de pre-osteoblastos de calvaria de rata, con resultados marcadamente distinguibles.

En cuanto a la biocompatibilidad del material A, TiO_2 puro, no se ha hallado evidencia que demuestre la toxicidad del mismo, al menos en las concentraciones de trabajo empleadas en estos estudios. La actividad metabólica de fibroblastos no se ve afectada por concentraciones del material que van desde los 10 a los 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en ensayos que duraron hasta 72 horas. Así también, la morfología y la capacidad de adhesión al sustrato de este mismo modelo tampoco sufrió alteraciones debido a la presencia del material. El cultivo con pre-osteoblastos de calvaria de rata arrojó resultados similares con el material análogo, B_1 , cuya presencia no parece afectar la ni viabilidad ni la morfología celular de este modelo.

Respecto de los materiales que contienen cerio incorporado en su forma elemental a la matriz de dióxido de titanio, la serie $\text{B}_2\text{-B}_8$, se observa que su presencia produce un aumento en la proliferación de los fibroblastos sin alteraciones morfológicas significativas respecto al control que se manifiesta dependiente de la concentración del dopante. El estudio con pre-osteoblastos, en tanto, confirma la inocuidad de varios de ellos tanto en lo referente a la viabilidad celular como a la morfología y capacidad de adhesión. En el capítulo 4 se demostró el efecto de la incorporación de cerio en la capacidad de almacenamiento de oxígeno y en la estabilidad del polimorfo Anatasa del TiO_2 . Teniendo en cuenta que el balance redox afecta directamente la proliferación de este tipo celular, podría conjeturarse que es posible manipular la tasa de crecimiento de estas células a través de la modificación de la capacidad de almacenamiento de oxígeno de los materiales, capacidad que se logra, justamente, variando las proporciones específicas de Ce/Ti durante la síntesis. Si bien esta hipótesis necesita ser evaluada con mayor profundidad, estos materiales se presentan como candidatos con aplicaciones interesantes en la regeneración tisular y abren las puertas hacia una nueva línea de investigación que contemple el estudio del mecanismo por el cual se estimula la proliferación de fibroblastos.

El material B, Ce-TiO_2 , cuya caracterización fisicoquímica y propiedades óxido-reductoras fueron exhaustivamente explicadas en los capítulos 4 y 6, se muestra como un candidato prometedor en lo que a impacto sobre la regeneración ósea se refiere. Los ensayos realizados sobre la línea celular L929 demostraron que la presencia del material, al igual que lo que ocurre con el material A, no repercute negativamente sobre la viabilidad celular en todas las concentraciones empleadas, en co-incubaciones que se extendieron hasta por 72 horas. La proliferación, adhesión y

morfología de los fibroblastos tampoco se ve alterada frente a la presencia de este material, incluso aunque, de manera similar a lo observado en el caso del TiO₂, las partículas se observan fuertemente adheridas a las células. La biocompatibilidad de este material también fue ensayada con el modelo de pre-osteoblastos de calvaria de rata, donde no mostró afectar la supervivencia celular al cabo de 24 y 72 horas de cultivo en contacto directo. Más aún, también se evaluó la citotoxicidad de este material conteniendo una cubierta de hidroxiapatita, demostrándose que la alteración de la micro-morfología del material no tiene impacto negativo apreciable sobre la supervivencia ni la morfología de estas células.

Finalmente, los resultados obtenidos para el material C, CeO₂-TiO₂, merecen ser tomados con precaución. La observación de las microfotografías de contraste de fases muestra que la morfología y adhesión de los fibroblastos de ratón en presencia del material están visiblemente alteradas, con células de aspecto redondeado, aglomeradas en torno a las partículas y con pérdida de la densidad de sus protrusiones filopódicas. Estas células, además muestran una actividad metabólica anormalmente alta que se manifiesta ya a las 24 horas de co-incubación y que no está asociada con un aumento en el número de células viables. Si bien las razones biológicas detrás de estos efectos permanecen sin clarificar, la observación de estos dos fenómenos permite inferir que este material presenta un grado de toxicidad no aceptable para su empleo como objeto implantable.

7.5. Bibliografía

- [1] D. Williams, "Revisiting the definition of biocompatibility," *Med. Device Technol.*, vol. 14, no. 8, pp. 10–13, 2003.
- [2] T. L. Riss and R. a Moravec, "Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays.," *Assay Drug Dev. Technol.*, vol. 2, no. 1, pp. 51–62, 2004.
- [3] A. S. Bale, E. Kenyon, T. J. Flynn, J. C. Lipscomb, D. L. Mendrick, T. Hartung, and G. W. Patton, "Symposium report: Correlating in vitro data to in vivo findings for risk assessment," *ALTEX*, vol. 31, no. 1, pp. 79–90, 2014.
- [4] B. ISO, "10993-5: Biological evaluation of medical devices," *Tests Vitr. Cytotox.*, 1999.
- [5] P. Bainbridge, "Wound healing and the role of fibroblasts," *J. Wound Care*, vol. 22, no. 8, pp. 407–408, 410–412, 2013.
- [6] A. F. Mavrogenis, R. Dimitriou, J. Parvizi, and G. C. Babis, "Biology of implant osseointegration," *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.*, vol. 9, no. 2, pp. 61–71, 2009.
- [7] J. D. Clark, R. L. Baldwin, K. A. Bayne, M. J. Brown, G. F. Gebhart, J. C. Gonder, J. K. Gwathmey, M. E. Keeling, D. F. Kohn, and J. W. Robb, "Guide for the care and use of laboratory animals,"

- Inst. Lab. Anim. Resour. Natl. Res. Counc.*, vol. 125, 1996.
- [8] M. Boncler, M. Różalski, U. Krajewska, A. Podsedek, and C. Watala, "Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells.," *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, vol. 69, no. 1, pp. 9–16, 2014.
- [9] W. Strober, "Trypan blue exclusion test of cell viability," *Curr. Protoc. Immunol.*, vol. Appendix 3, p. Appendix 3B, 2001.
- [10] G. Giemsa, "Eine Vereinfachung und Vervollkommnung meiner Methylenazur-Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nochtschen Chromatinfärbung," *Zentabl. Bakteriol. Parasitenkd. Infectkrankh*, vol. 37, p. 308, 1904.
- [11] K. G. Ozdemir, H. Yilmaz, and S. Yilmaz, "In vitro evaluation of cytotoxicity of soft lining materials on L929 cells by MTT assay," *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, vol. 90, no. 1, pp. 82–86, 2009.
- [12] J. M. S. Lemons, X.-J. Feng, B. D. Bennett, A. Legesse-Miller, E. L. Johnson, I. Raitman, E. a Pollina, H. a Rabitz, J. D. Rabinowitz, and H. a Coller, "Quiescent fibroblasts exhibit high metabolic activity.," *PLoS Biol.*, vol. 8, no. 10, p. e1000514, 2010.
- [13] I. Assanga, "Cell growth curves for different cell lines and their relationship with biological activities," *Int. J. Biotechnol. Mol. Biol. Res.*, vol. 4, no. 4, pp. 60–70, 2013.
- [14] B. Ekwall, V. Silano, and F. Zucco, "Chapter 7 - Toxicity Tests with Mammalian Cell Cultures," *Short-term Toxic. Tests Non-genotoxic Eff.*, pp. 75–98, 1990.
- [15] L. Shang, K. Nienhaus, and G. U. Nienhaus, "Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters.," *J. Nanobiotechnology*, vol. 12, no. 5, pp. 1–11, 2014.
- [16] H. Yuan, J. Li, G. Bao, and S. Zhang, "Variable nanoparticle-cell adhesion strength regulates cellular uptake," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 105, no. 13, p. 138101, 2010.
- [17] A. Verma and F. Stellacci, "Effect of Surface Properties on Nanoparticle-Cell Interactions," *Small*, vol. 6, no. 1, pp. 12–21, 2010.
- [18] W. C. Clem, S. Chowdhury, S. A. Catledge, J. J. Weimer, F. M. Shaikh, K. M. Hennessy, V. V. Konovalov, M. R. Hill, A. Waterfeld, and S. L. Bellis, "Mesenchymal stem cell interaction with ultra-smooth nanostructured diamond for wear-resistant orthopaedic implants," *Biomaterials*, vol. 29, no. 24, pp. 3461–3468, 2008.
- [19] L. Bacakova, E. Filova, D. Kubies, L. Machova, V. Proks, V. Malinova, V. Lisa, and F. Rypacek, "Adhesion and growth of vascular smooth muscle cells in cultures on bioactive RGD peptide-carrying polylactides," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 18, no. 7, pp. 1317–1323, 2007.
- [20] L. Bacakova, E. Filova, M. Parizek, T. Ruml, and V. Svorcik, "Modulation of cell adhesion,

- proliferation and differentiation on materials designed for body implants,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 29, no. 6, pp. 739–767, 2011.
- [21] J. Valant, I. Iavicoli, and D. Drobne, “The importance of a validated standard methodology to define in vitro toxicity of nano-TiO₂,” *Protoplasma*, vol. 249, no. 3, pp. 493–502, 2012.
- [22] C.-Y. Jin, B.-S. Zhu, X.-F. Wang, and Q.-H. Lu, “Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells,” *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 21, no. 9, pp. 1871–1877, 2008.
- [23] E. G. Heckert, A. S. Karakoti, S. Seal, and W. T. Self, “The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanocerium,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 18, pp. 2705–9, 2008.
- [24] T. Pirmohamed, J. M. Dowding, S. Singh, B. Wasserman, E. Heckert, A. S. Karakoti, J. E. S. King, S. Seal, and W. T. Self, “Nanocerium exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity,” *Chem. Commun. (Camb.)*, vol. 46, no. 16, pp. 2736–2738, 2010.
- [25] A. N. Gravina, J. M. Ruso, J. A. Laiuppa, G. E. Santillán, J. L. Marco-Brown, N. L. D’Elia, and P. V. Messina, “Striped, bioactive Ce–TiO₂ materials with peroxynitrite-scavenging activity,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, pp. 834–845, 2014.
- [26] T. Finkel and N. J. Holbrook, “Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing,” *Nature*, vol. 408, no. 6809, pp. 239–247, 2000.
- [27] D. E. Hutter, B. G. Till, and J. J. Greene, “Redox state changes in density-dependent regulation of proliferation,” *Exp. Cell Res.*, vol. 232, no. 2, pp. 435–438, 1997.
- [28] P. a. Ramires, a. Romito, F. Cosentino, and E. Milella, “The influence of titania/hydroxyapatite composite coatings on in vitro osteoblasts behaviour,” *Biomaterials*, vol. 22, no. 12, pp. 1467–1474, 2001.

Capítulo 8

Citoprotección frente a peróxido de hidrógeno

8.1. Introducción

Cuando un material es implantado, éste se ve inmediatamente expuesto a fluidos biológicos y células, al tiempo que el organismo responde activando el proceso de cicatrización de la herida. Este evento, independientemente del tejido del que se trate, comprende cuatro fases: hemostasis (cuya duración comprende desde varios segundos a horas), inflamación (horas a días), reparación (días a semanas) y remodelado (semanas a meses), figura 1.4. La hemostasis comienza inmediatamente luego de producida la herida, cuando se rompen los vasos sanguíneos, liberando plasma y células de sangre periféricas en el sitio de implantación; las plaquetas se adhieren a las fibras de colágeno expuestas y se forma un coágulo que actúa como barrera temporaria para prevenir el sangrado excesivo y el esparcimiento de patógenos al torrente sanguíneo[1]. La presencia de superficies extrañas, tales como las del biomaterial, inician una cascada acelerada de activación de proteínas que conducen a la formación de fibrina que, en etapas posteriores sirven de andamiaje para la migración de células madre mesenquimales responsables de la reparación tisular[2].

Las siguientes dos etapas (inflamación, reparación) suelen estar solapadas ya que tanto células inflamatorias como células responsables de la reparación tisular, son quimiotácticamente atraídas por y hacia el reservorio de factores de crecimiento alojado en el coágulo de fibrina recién formado[3]. Las células responsables de la respuesta inflamatoria, macrófagos y neutrófilos, están entre las primeras en entrar en contacto con la superficie del biomaterial, llegando dentro de las primeras 24 horas de producida la herida[4]. Macrófagos activados y neutrófilos extravasados del torrente sanguíneo, liberan enzimas proteolíticas para digerir residuos extraños y eliminan bacterias por medio de fagocitosis y producción de superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2)[5].

Durante el proceso inflamatorio la resistencia en la herida es mínima, debido a que los tejidos no recuperan su fortaleza funcional hasta que la inflamación avanza hacia la fase de reparación. Esta transición generalmente ocurre luego de una semana de producida la herida y es mediada por citoquinas antiinflamatorias y macrófagos que atraviesan una transición fenotípica hacia un estado regenerativo que estimula la angiogénesis y la actividad de keratinocitos y fibroblastos[6], [7]. La reparación tisular se caracteriza por un aumento en la proliferación celular, neovascularización y síntesis de la matriz extracelular para rellenar el tejido dañado, que fue oportunamente despejado durante la fase inflamatoria. Las células encargadas de producir la ECM, ergo, responsables de generar la matriz que soporte y devolver la integridad estructural al tejido, incluye a los fibroblastos en el tejido conectivo, condrocitos en el cartílago y osteoblastos en el tejido óseo. El resultado final del proceso de reparación es vital para la cicatrización de heridas, ya que allí se establece el andamiaje necesario para reconstruir el tejido dañado.

Para que la herida sane apropiadamente, todas las fases deben ocurrir de manera concertada y deben tener la duración adecuada. Muchos factores pueden interferir con una o más fases de este proceso, causando alteraciones en la cicatrización, pero en general, lo más observado es la evolución de las heridas hacia estados de inflamación patológica[8] debido a una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno.

Como se mencionó anteriormente, en heridas que atraviesan un proceso de cicatrización normal, las ROS tales como O_2^- y H_2O_2 , actúan como mensajeros celulares que estimulan procesos claves en la reparación tisular, incluyendo la migración celular, angiogénesis y la acción de citoquinas. Condiciones tanto de hipoxia como de hiperoxia aumentan la producción de especies reactivas de oxígeno a niveles que pasan de ser beneficiosos a causantes de daño tisular[9]. Para evitar esto, existen varios mecanismos fisiológicos de detoxificación, que incluyen la dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno y agua, proceso mediado por varias superóxido dismutasas (SOD). Si bien el H_2O_2 no es un radical, también puede causar mucho daño celular debido

a la generación de radicales hidroxilo en presencia de iones hierro o cobre (reacción de Fenton,[10]). Estos radicales son altamente agresivos, resultando en la oxidación de macromoléculas celulares. Por lo tanto, el H_2O_2 debe ser rápidamente detoxificado, y esto se logra a través de la acción de catalasa, varias peroxidasas y peroxirredoxinas (figura 8.1). Si esta detoxificación es insuficiente o las ROS son producidas en cantidades excesivas, ocurre el estrés oxidativo, resultando en daño celular severo.

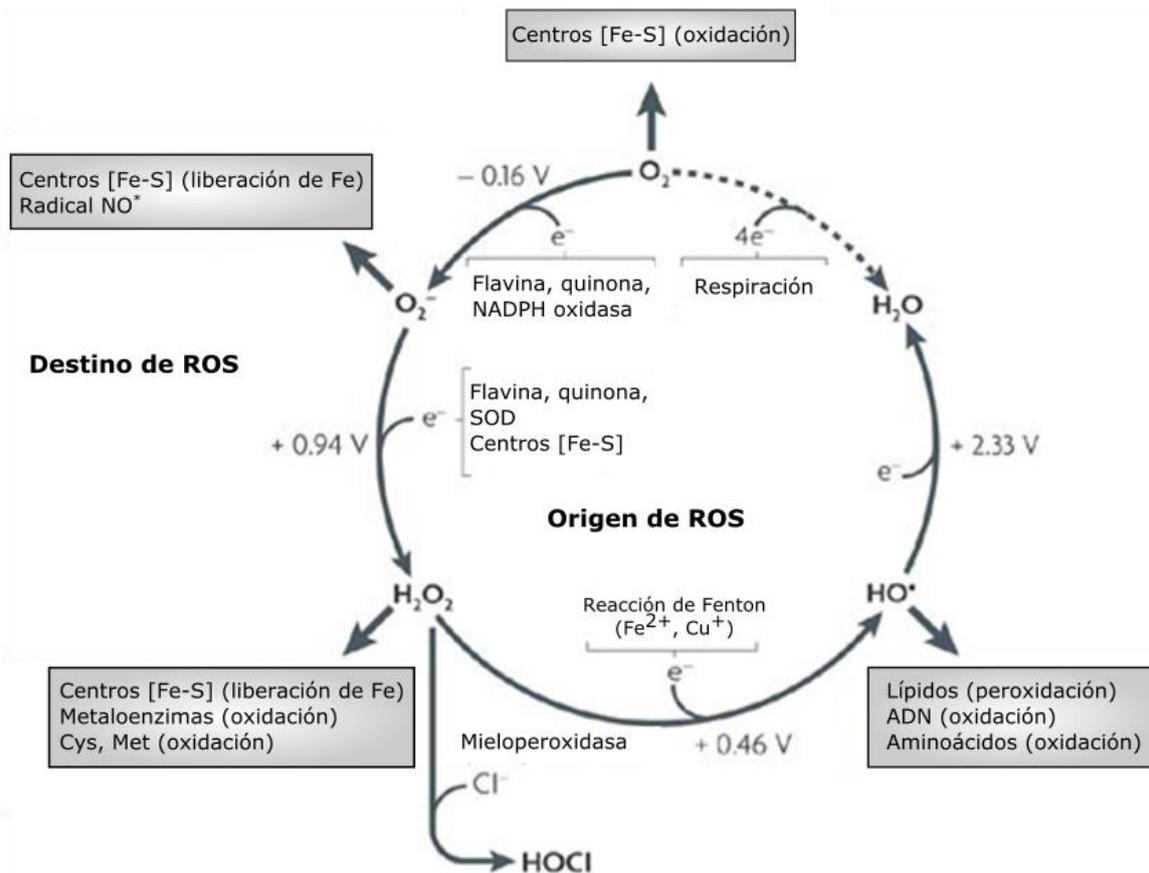


Figura 8.1: Especies reactivas de oxígeno: producción, eliminación y principales reacciones celulares. Esquema adaptado de la publicación de D'Autréaux y Toledano [11].

Se ha demostrado que, en el tejido óseo, el peróxido de hidrógeno, a través de la oxidación de proteínas involucradas en la diferenciación, es capaz de modular la actividad celular ya sea estimulando la actividad de osteoclastos o inhibiendo la de los osteoblastos, resultando, en última instancia, en la pérdida de masa ósea y en el caso de los implantes, a una pobre integración [12], [13]. Asimismo, en el tejido conectivo subyacente, donde predominan los fibroblastos, el exceso de ROS también puede modificar la actividad de los fibroblastos originando una cicatrización ineficiente[14], [15].

Queda claro, a esta altura, que el control de la actividad de especies reactivas de oxígeno es un factor crítico a la hora de garantizar la osteointegración exitosa del biomaterial y la correcta

cicatrización del sitio de implantación. Es por ello que en esta sección se planea investigar la capacidad que posee el material Ce-TiO₂ para proteger del estrés oxidativo a las células responsables de la cicatrización, cuando éstas son sometidas a cantidades externas excesivamente elevadas del agente oxidante H₂O₂. La selección del material, el modelo celular, el agente oxidante y sus concentraciones responde a las consideraciones que se mencionan a continuación:

- Como se demostró en el capítulo 6, los materiales A, B y C son capaces de degradar activamente a la especie reactiva de oxígeno, peroxinitrito, lo cual permite pensar, en primera instancia que los materiales podrían tener efectos catalíticos sobre la degradación de otras ROS. Asimismo, como se describe en el capítulo 7, los materiales A y B se mostraron inocuos en términos de viabilidad, morfología y proliferación de cultivos celulares de osteoblastos y fibroblastos, mientras que el material C, presentó efectos deletéreos sobre la morfología y la adhesión de fibroblastos, lo cual hace que su biocompatibilidad sea, al menos en principio, cuestionable. Debido a estas razones, esta sección plantea conducir los experimentos de citoprotección usando los materiales A y B, cuya actividad frente a radicales libres y su biocompatibilidad fueron demostradas en los capítulos anteriores.
- A propósito del modelo celular elegido, hay que tener en cuenta que el proceso de implantación genera la disrupción de los tejidos tanto conectivo como óseo, y que los tipos celulares predominantes, y responsables de la reparación, son los fibroblastos en el primero y los osteoblastos en el segundo. Fenotípicamente hablando, los osteoblastos son muy similares a los fibroblastos; todos los genes expresados en los fibroblastos, también están expresados en los osteoblastos. La única diferencia es la expresión de dos transcritos primarios específicos de osteoblastos: uno que codifica al factor de transcripción Cbfa1 (uno de los primeros y más específicos marcadores de la osteogénesis) y el otro que codifica la osteocalcina (la proteína más abundante de la matriz no colágena del hueso)[16]. Debido a que el objetivo de este trabajo es evaluar la supervivencia celular frente al estrés oxidativo, cualquiera de los dos modelos sería, en principio, igualmente adecuado. Se decide trabajar con el modelo de fibroblastos debido a las ventajas que plantea la manipulación de la línea L929 mencionada en el capítulo anterior, así como también, porque ya se poseen datos fehacientes de que los dos materiales A y B, no presentan toxicidad inherente frente a estas células.
- Los efectos tóxicos y las funciones fisiológicas del H₂O₂ han sido ampliamente utilizadas para entender vías de señalización que se activan durante el estrés oxidativo ya sea para el cribado o la evaluación de la eficacia de agentes antioxidantes[17]. Estos experimentos, con frecuencia, consisten en la exposición a una dosis en bolo de H₂O₂ incorporada con el medio

de cultivo al modelo celular en estudio. Por ejemplo, en líneas celulares proliferativas de mamíferos se ha descrito la existencia de un patrón de respuesta al H₂O₂: niveles muy bajos (3 a 15 µM) causan estimulación del crecimiento, niveles mayores (120 a 150 µM) inducen arresto temporal del crecimiento, concentraciones intermedias (250 a 400 µM) producen una detención permanente del crecimiento, y concentraciones mayores (≥ 1 mM) producen muerte celular por necrosis[17]. Es importante destacar que este comportamiento no es constante a lo largo de diferentes líneas celulares por lo que debe ser estudiado para cada sistema en particular. En este sentido, Lennon *et al.* demostraron que ~60 % of HL60 entraban en estado apoptótico luego de 8 horas de exposición a 15 µM H₂O₂[18], asimismo, Gardner *et al.* probaron que concentraciones de H₂O₂ de entre 5 y 10 mM producen 100% de muerte celular luego de 8 horas de incubación y que más de 10 mM inducían necrosis celular detectable luego de 90 minutos de incubación usando la línea celular L929 como blanco[19]. En base a lo mencionado hasta aquí, es evidente la necesidad de establecer las condiciones tóxicas apropiadas para esta línea celular, así como también el tiempo adecuado de incubación; por lo tanto, su determinación ha de ser llevada a cabo antes de conducir los ensayos de citoprotección.

8.2. Materiales y métodos

8.2.1. Reactivos

Para el cultivo celular y los ensayos presentados en este capítulo, se emplearon los siguientes reactivos: Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (*High-sugar Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM), Suero Fetal Bovino (*Fetal Bovine Serum*, FBS) y Penicilina/Streptomycin al 1%, todos ATCC. Peróxido de hidrógeno 30 % p/p (9,79 M) se obtuvo en Sigma-Aldrich, la solución de tripsina-EDTA (1X) se compró a Gibco y el reactivo de viabilidad PrestoBlue (10X) se obtuvo de Invitrogen. CdTe-Quantum Dots (CdTe-QDs) se obtuvieron de Vive Nano Inc.

8.2.2. Instrumental

Espectroscopía de fluorescencia: La actividad metabólica de los fibroblastos fue monitoreada midiendo la intensidad de la fluorescencia emitida por el reactivo de viabilidad. Para ello se utilizó un lector de placas de cultivo multi-well modelo PolarStar Optima Multidetecction Microplate Reader (BMG Labtech), trabajando en modo de detección de fluorescencia a λ_{Ex} = 560 nm y λ_{Em} = 590 nm respectivamente.

Espectroscopía UV-Visible: Las propiedades antioxidantes del material B frente a H₂O₂ fueron determinadas utilizando esta técnica. Para ello se registró la absorbancia en función del tiempo empleando un espectrofotómetro UV-Vis modelo Agilent Cary 60, trabajando a la longitud de onda de absorción del H₂O₂ (240 nm) y en condiciones normales de presión y temperatura.

8.2.3. Cultivo celular

El modelo celular elegido para realizar estos experimentos es la línea celular L929 de fibroblastos de ratón. El cultivo y mantenimiento celular se realizaron de acuerdo al procedimiento descrito en el capítulo 7, sección 7.2.3.

8.2.4. Preparación de los materiales para el ensayo de citoprotección

Los materiales que se ensayaron en esta oportunidad fueron A y B (TiO₂ y Ce-TiO₂ respectivamente). La preparación de los mismos para los ensayos de citoprotección se realizó de la misma manera que para los empleados en el ensayo de citotoxicidad de L929 descrito en la sección 7.2.5 del capítulo anterior, con una sola variación: el medio de cultivo empleado para suspender los materiales no contiene suero fetal bovino (DMEM-1 % P/S). La total ausencia de proteínas en el medio de cultivo es un requerimiento en los ensayos conteniendo H₂O₂ para evitar la rápida degradación del peróxido por los antioxidantes presentes en el FBS[19], [20].

8.2.5. Determinación de la potencia citotóxica del peróxido de hidrógeno

Tal y como se expresó en la introducción de este capítulo, es necesario determinar la concentración de H₂O₂ que resulta tóxica para el modelo celular elegido (L929). Para ello, se realizaron los experimentos de acuerdo con el siguiente esquema: 100 µL de una suspensión celular preparada en DMEM-10 % FBS-1 % P/S fueron sembrados en una placa de cultivo de 96 pocillos en una densidad de 5000 células/pocillo y mantenidos a 37 °C en atmósfera humidificada conteniendo 5 % de CO₂. Luego de 24 horas, se removió el medio de cultivo, se realizaron dos lavados con PBS 1X y se repuso el medio de cultivo (DMEM-1 % P/S), esta vez, en ausencia de proteínas; la incubación continuó por otras 24 horas. Como se mencionó en el apartado anterior, la ausencia de proteínas es necesaria en estos experimentos para evitar la degradación del peróxido de hidrógeno causada por agentes antioxidantes presentes en el suero fetal bovino.

Las soluciones de H₂O₂ empleadas en esta sección se prepararon inmediatamente antes de ser utilizadas disolviendo la cantidad apropiada de H₂O₂ 30 % en DMEM; 100 µL de estas soluciones se incorporaron a los pocillos correspondientes para alcanzar concentraciones finales de 200, 350, 500, 600, 800, 1000, 2000 y 4000 µM. El siguiente paso fue continuar con la incubación por 4 horas a

37 °C en atmósfera humidificada. Finalmente, se evaluó la viabilidad celular utilizando el ensayo de PrestoBlue, tal y como se describe en la sección 7.2.7.1 del capítulo anterior.

Nota: en este capítulo se describen sólo las condiciones óptimas de trabajo para obtener la potencia citotóxica del peróxido de hidrógeno frente a L929. Ha de aclararse en este punto que tanto las concentraciones de trabajo como los tiempos de incubación fueron cuidadosamente seleccionados en base a estudios experimentales realizados previamente, en los que se testearon concentraciones que iban desde 10 a 10000 µM y tiempos de incubación de 1, 2 y 4 horas. Para beneficio del lector, se evita aquí hacer una descripción más extensa de estos ensayos y sus correspondientes resultados.

Los resultados de cada experimento se obtuvieron por triplicado y se expresaron como la variación del porcentaje de mortalidad celular respecto a las células sin tratar (control negativo, C-) en función de la concentración de H₂O₂. Una representación esquemática de este experimento puede encontrarse rotulada como condición T0 en la figura 8.2. Los valores de concentración letal (CL) se derivaron a partir del ajuste de la curva concentración respuesta como se describe a continuación.

Para el ajuste de las curvas de concentración respuesta para la mortalidad causada por H₂O₂ se utilizó un modelo de regresión logístico no lineal de cuatro parámetros[21], que responde a la siguiente ecuación:

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(\log x_0 - x)p}} \quad (8.1)$$

donde x es la concentración o la variable independiente e y corresponde al valor de la respuesta; A_2 y A_1 son la respuesta máxima y mínima respectivamente; $\log x_0$ es el valor de la respuesta en el medio entre el valor máximo y mínimo; p es la pendiente de la curva.

Las respectivas concentraciones letales CL20, CL50 y CL80, que describen la concentración de H₂O₂ capaz de producir el 20, 50 y 80 % de mortalidad respectivamente, son parámetros que se derivaron luego de realizado el ajuste de las curvas, de acuerdo con esta ecuación:

$$EC_F = 10^{\left[\log x_0 + \frac{\log\left(\frac{F}{100-F}\right)}{p} \right]}; \quad F = \text{porcentaje de respuesta}; \quad p = \text{pendiente} \quad (8.2)$$

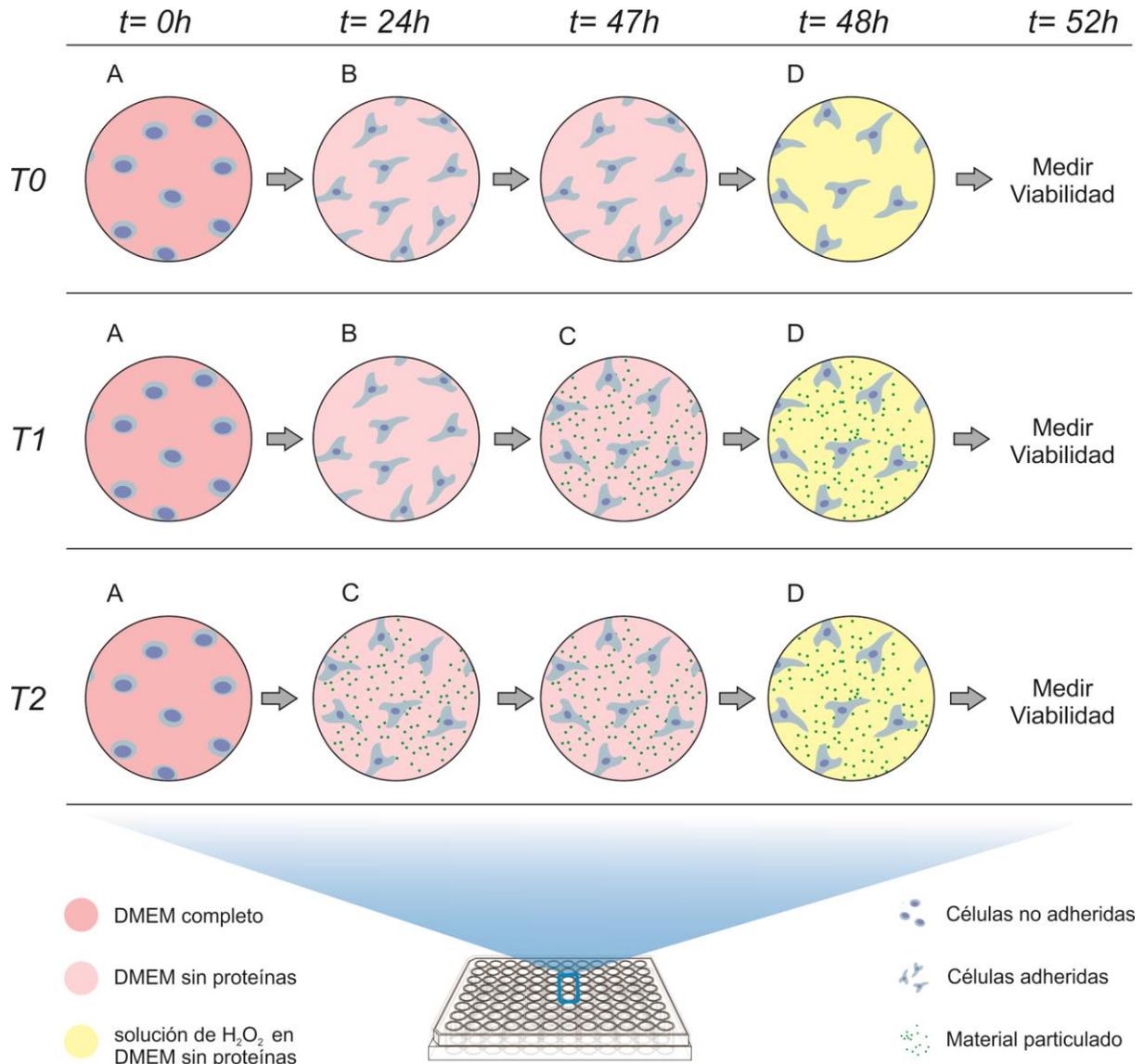


Figura 8.2: Diseño experimental para la determinación de la potencia citotóxica del peróxido de hidrógeno (**T0**) y el efecto citoprotector inducido tras 1 hora (**T1**) y 24 horas (**T2**) de pre-incubación en presencia de los materiales A y B. **(A)** sembrado de 5000 células/pocillo en medio de cultivo sin proteínas. **(B)** lavado con PBS y adición de medio de cultivo sin proteínas. **(C)** lavado con PBS y adición de la suspensión de los materiales en medio de cultivo sin proteínas. **(D)** incorporación de la solución de H_2O_2 preparado en medio de cultivo sin proteínas.

8.2.6. Determinación del efecto citoprotector de los materiales frente a peróxido de hidrógeno

Para determinar el efecto citoprotector de los materiales frente al estrés oxidativo inducido por H_2O_2 se realizaron dos grupos de experimentos que se llevaron a cabo simultáneamente, evaluando una hora (**T1**) y 24 horas (**T2**) de pre-incubación de las células L929 en presencia de los materiales antes de la incorporación del peróxido de hidrógeno (ver diseño experimental en figura 8.2): en ambos casos, 100 μ L de una suspensión celular preparada en DMEM-10 % FBS-1 % P/S

fueron sembrados en placas de 96 pocillos en una densidad de 5000 células/pocillo y mantenidos a 37 °C en atmósfera humidificada conteniendo 5 % de CO₂. Luego de 24 horas, se removió el medio de cultivo y las células fueron enjuagadas dos veces con PBS 1X. A partir de aquí, las placas correspondientes a las diferentes condiciones fueron tratadas de manera diferente, a saber:

- **T1)** se incorporaron 100 µL de medio de cultivo sin proteínas y se continuó la incubación a 37 °C por 23 horas; una vez transcurrido ese tiempo, el medio de cultivo se reemplazó por 100 µL de suspensiones de los materiales recién preparadas a las concentraciones deseadas (10, 50, 100, 500 y 1000 µg/mL) y se continuó con la incubación por el lapso de una hora.
- **T2)** se incorporaron 100 µL de las suspensiones recién preparadas de los materiales en las concentraciones deseadas (10, 50, 100, 500 y 1000 µg/mL) y se continuó la incubación a 37 °C por 24 horas.

Finalmente, cada pocillo de tratamiento (tanto en T1 como en T2) recibió 100 µL de una dosis en bolo de H₂O₂ en una concentración apropiada para producir la mortalidad del 20 y del 80 % de las células. Se continuó con la incubación a 37 °C por 4 horas y la viabilidad se determinó con el ensayo de PrestoBlue (ver capítulo 7, sección 7.2.7.1). Células sin tratar fueron utilizadas como control negativo (C-) y células tratadas sólo con la concentración efectiva de peróxido de hidrógeno fueron consideradas como control positivo (C+). Los controles de línea de base fueron llevados a cabo con medio de cultivo solo, medio de cultivo + H₂O₂, medio de cultivo + materiales y medio de cultivo + materiales + H₂O₂.

8.2.7. Determinación de la eliminación de H₂O₂ mediada por el material B (Ce-TiO₂)

Para determinar la capacidad intrínseca del material B para eliminar peróxido de hidrógeno del medio de reacción se estudió la cinética de decaimiento de la concentración de H₂O₂ utilizando espectroscopía UV-Visible. Para ello se trabajó a la longitud de onda de absorción del peróxido de hidrógeno ($\lambda = 240$ nm). Se seleccionaron dos medios de reacción: solución reguladora de fosfatos (PBS, pH= 7,4), para simular condiciones biológicas, y solución reguladora Tris/HCl (pH= 7,5), para contrastar resultados. La selección de estos dos tampones responde a la existencia de evidencia sólida acerca de que la presencia de aniones fosfato influencia fuertemente las propiedades antioxidantes de las nanopartículas de CeO₂[22], por lo tanto su impacto sobre el material Ce-TiO₂ (B), debe ser también considerado; el PBS se eligió teniendo en cuenta que el fosfato es el principal anión intracelular y se quimisorbe fuertemente a la superficie de nanopartículas conteniendo TiO₂ y/o cerio; el Tris/HCl fue seleccionado porque es químicamente inerte frente a los materiales

conteniendo TiO_2 [23]. El pH se mantuvo constante en los dos tratamientos para permitir la comparación entre el contenido aniónico de los dos sistemas reguladores.

Los experimentos llevados a cabo en esta sección están inspirados en la determinación de la actividad de la enzima catalasa descrita por primera vez por Aebi[24]. Allí se establece que la descomposición del peróxido de hidrógeno puede seguirse directamente midiendo el decaimiento de la absorbancia a $\lambda = 240 \text{ nm}$ ($\epsilon = 43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)[25]. La diferencia en absorbancia (ΔA_{240}) por unidad de tiempo puede ser luego relacionada con la capacidad depuradora del material. Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, se pesó una cantidad adecuada del material B y se la colocó en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico; a continuación se incorporó 1 mL de la solución de H_2O_2 preparada en la solución reguladora correspondiente e inmediatamente se depositó la cubeta en el espectrofotómetro para permitir el monitoreo *in situ* de la reacción. Las medidas se tomaron cada 5 minutos durante 2 horas. Para corroborar la existencia de una relación lineal entre la concentración de peróxido de hidrógeno y la absorbancia, se confeccionó una curva de calibrado en el rango de concentraciones de trabajo. Finalmente la capacidad depuradora del material se calculó de la siguiente manera, expresando los resultados como μmoles de H_2O_2 depurados por gramo de material (utilizando el coeficiente de extinción determinado experimentalmente para convertir absorbancia a unidades de concentración de H_2O_2):

$$\text{capacidad depuradora} = \frac{([\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{inicial}} - [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{equilibrio}})}{(\text{Cantidad de material})} \quad (8.3)$$

Las soluciones de peróxido de hidrógeno se prepararon disolviendo la cantidad apropiada de H_2O_2 30 % en PBS y Tris/HCl respectivamente, cuidando siempre de trabajar con concentraciones iniciales menores a 10 mM para evitar la formación de burbujas debido a la liberación de O_2 . La cantidad de material B pesada en cada experiencia fue de 0,0369 g.

8.2.8. Cálculo de la viabilidad teórica

Con el objetivo de poder evaluar si el efecto citoprotector ejercido por el material B (Ce-TiO_2) respondería únicamente a la capacidad depuradora que el material tiene por sí mismo, se procedió a realizar el cálculo de la viabilidad teórica de los fibroblastos en presencia del material B + H_2O_2 , aprovechando el dato de la capacidad depuradora del mismo obtenida como se expresa en el apartado anterior.

Como se verá en los resultados de los ensayos anteriores, el material satura su capacidad para eliminar peróxido de hidrógeno a alrededor de las 2 horas de incubación en PBS, por lo tanto, es seguro asumir que en los ensayos de citoprotección, en los que el material está en contacto con el

H₂O₂ durante 4 horas, también se llega al equilibrio. Teniendo esto en cuenta, y a partir del valor de la capacidad depuradora del material B, la cantidad absoluta de peróxido de hidrógeno utilizada en cada tratamiento (CL20 y CL80) y la cantidad de material utilizado en cada condición (10 – 1000 µg/mL), es posible calcular la cantidad de H₂O₂ que sería degradada en el medio de cultivo de los ensayos de citoprotección. Una vez obtenido ese valor, se puede estimar la concentración final de peróxido de hidrógeno simplemente restando esa cantidad a la que había inicialmente en el pocillo. Por último, la concentración final de H₂O₂ en el cultivo se usa para calcular la viabilidad teórica mediante la extrapolación de este valor en la curva de concentración respuesta.

8.3. Resultados y discusión

8.3.1. Viabilidad de fibroblastos en respuesta al estrés oxidativo:

determinación de las concentraciones letales efectivas de peróxido de hidrógeno

Como se mencionó en la introducción de este capítulo, el objetivo aquí es determinar el efecto citoprotector que puedan ejercer los materiales A y B frente al estrés oxidativo inducido por concentraciones en exceso de peróxido de hidrógeno, una especie reactiva de oxígeno de origen tanto endógeno como exógeno. Esta molécula es actualmente reconocida como un mediador celular fisiológico, que tiene participación en diversas funciones normales tales como la proliferación celular, diferenciación y migración[26], [27]; sin embargo, a concentraciones elevadas, es responsable de producir muerte celular por inducción de fenómenos apoptóticos o necróticos[28]. Se ha demostrado que, en cultivos celulares, el grado de toxicidad del H₂O₂ es dependiente de su concentración, del tipo y densidad celular, y del tiempo de contacto[17]; de esto se deduce la necesidad de establecer las concentraciones tóxicas apropiadas para cada modelo celular en particular y es lo que se aborda en esta sección.

Fibroblastos de ratón pertenecientes a la línea L929 fueron sembrados en una densidad baja (130 células/cm²) y dejados estabilizar por 48 horas a 37 °C con cambios periódicos de medio de cultivo. Luego de ese período, las células fueron expuestas a concentraciones crecientes de H₂O₂ (200, 350, 500, 600, 800, 1000, 2000 and 4000 µM) durante 4 horas para luego determinar la viabilidad celular mediante el ensayo de PrestoBlue y observación morfológica.

La exposición al peróxido de hidrógeno produce un incremento en la mortalidad celular que es dependiente de la concentración, como puede observarse en la figura 8.3. En su conjunto, los datos obtenidos en esta sección revelan que, luego de 4 horas de exposición, bajas concentraciones de H₂O₂ (< 295 µM) preservan el número de células viables, mientras que concentraciones mayores

(> 300 μM) poseen efectos deletéreos que conducen a la muerte celular. Más aún, a partir de $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1225 \mu\text{M}$ ya se manifiesta la inducción del 100 % de mortalidad, que además se confirma con la observación microscópica de lisis celular total. Estos resultados están de acuerdo con lo informado en la literatura acerca de que en las heridas la concentración de peróxido de hidrógeno oscila en niveles no tóxicos de 150 a 200 μM , por lo que su relevancia fisiológica es de destacar[29]. Las concentraciones letales CL20, CL50 y CL80, correspondientes al 20, 50 y 80 por ciento de mortalidad respectivamente, están resumidas en la figura 8.3 bajo la sigla de ECX (donde EC es el acrónimo para Effective Concentration, o concentración efectiva, y X corresponde al porcentaje de efectividad).

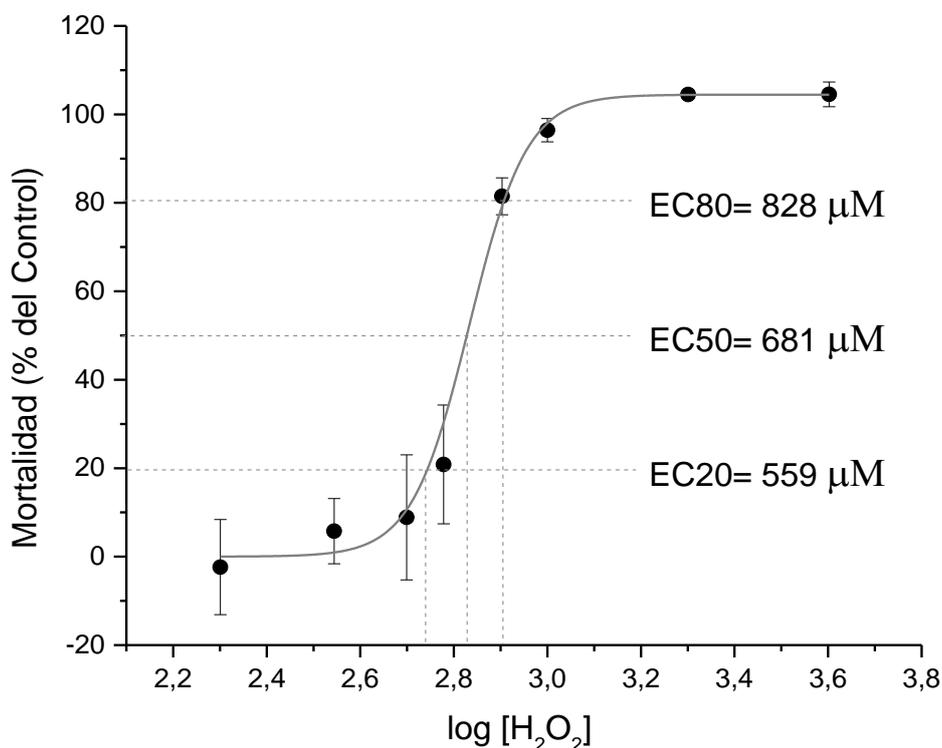


Figura 8.3: Curva concentración-respuesta para la mortalidad celular de fibroblastos de ratón (L929) inducida luego de 4 horas de exposición a H_2O_2 . Cada punto representa el promedio de tres experimentos \pm el desvío estándar; $R^2 = 0,9939$. $[\text{H}_2\text{O}_2]$ está expresada en μM .

8.3.2. Viabilidad de fibroblastos en respuesta al estrés oxidativo:

Determinación del efecto citoprotector de los materiales A y B frente a peróxido de hidrógeno

La presente sección tiene como objetivo determinar si la presencia de los materiales tiene alguna influencia en la supervivencia celular de fibroblastos de ratón cuando éstos son expuestos a concentraciones letales de peróxido de hidrógeno. Para esto se estudiaron dos tiempos de pre-

incubación de los materiales junto con el cultivo celular antes de la dosificación con H_2O_2 : 1 y 24 horas; asimismo, también se evaluaron dos concentraciones letales de borde, 559 y 828 μM (correspondientes a las CL20 y CL80 respectivamente); por último, las concentraciones de los materiales empleadas fueron de 10, 50, 100, 500 y 1000 $\mu g/mL$. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de PrestoBlue. Para la realización de estos experimentos, los tiempos transcurridos entre la siembra y el tratamiento con peróxido de hidrógeno, así como también los cambios de medio de cultivo, se mantuvieron constantes respecto de las condiciones empleadas en la determinación de las correspondientes concentraciones letales (ver esquema de la figura 8.2) para poder asegurar que las cantidades de H_2O_2 empleadas aquí inducen la mortalidad esperada.

La figura 8.4 resume los resultados de los experimentos que se acaban de introducir. Como puede observarse, el efecto citoprotector resultó independiente de la concentración aplicada en el caso del material A (TiO_2) para todos los tratamientos evaluados; lo cual sugiere la ausencia de influencia del material sobre el estrés oxidativo inducido por el peróxido de hidrógeno solo. Respecto del material que contiene cerio, este es, B ($Ce-TiO_2$), no se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto del control positivo (C+) cuando el tiempo de pre-incubación fue corto (1 hora). Ahora bien, luego de 24 horas de pre-incubación, el material presenta indicios visibles de un efecto citoprotector que se ve reflejado en un evidente aumento de la viabilidad de los fibroblastos. Los resultados muestran una tendencia positiva pseudo-lineal en este efecto, que aparenta ser concentración dependiente, alcanzando mínimos y máximos en 10 y 500 $\mu g/mL$ respectivamente. Cuando la concentración de los materiales excede los 1000 $\mu g/mL$ se observa una marcada reducción en el efecto citoprotector.

La pre-incubación de los fibroblastos durante 24 horas en presencia de 500 $\mu g/mL$ del material B ($Ce-TiO_2$) es la condición en las que se observa el máximo efecto citoprotector frente al estrés oxidativo inducido por H_2O_2 , observándose que la viabilidad celular se muestra casi duplicada respecto a la observada para las células tratadas con el agente oxidante solo. La inexistencia de este efecto cuando el peróxido de hidrógeno es incorporado poco después de agregados los materiales al medio de cultivo (ver gráficos de 1 hora de pre-incubación en la figura 8.4), sugiere la necesidad de un procesamiento previo.

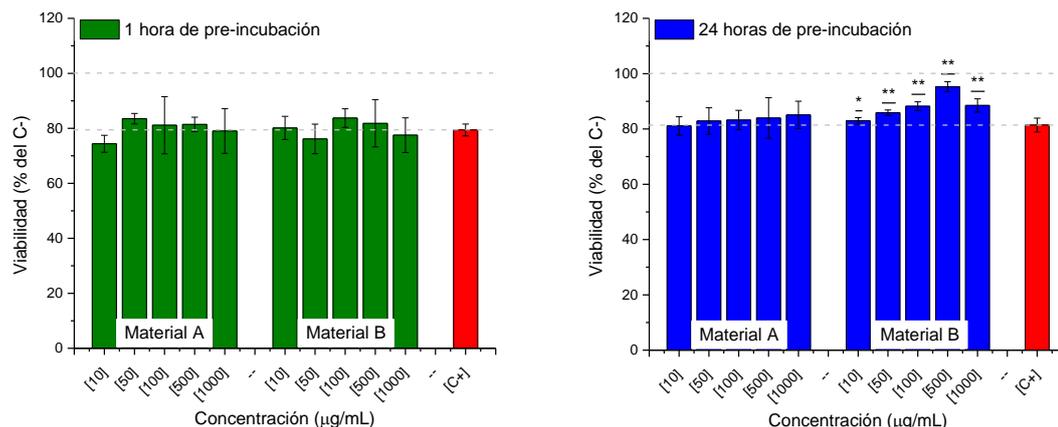
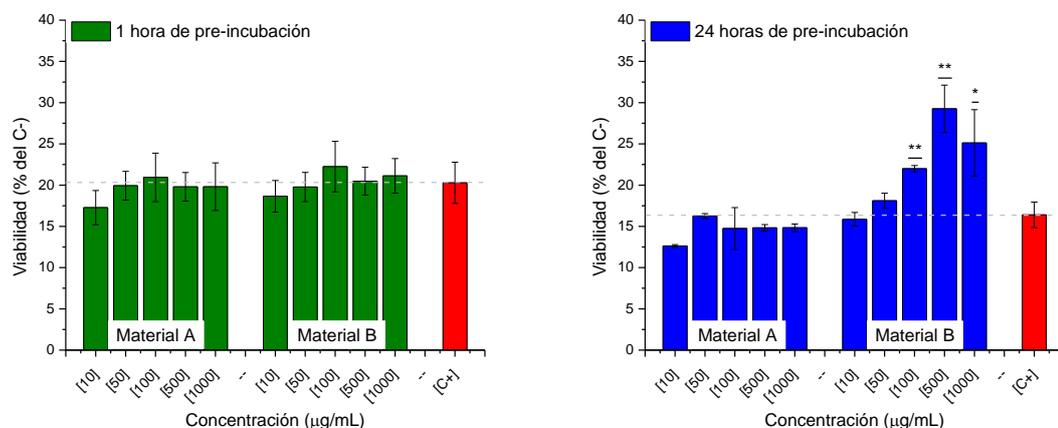
CL20

CL80


Figura 8.4: Viabilidad de fibroblastos murinos L929 frente a concentraciones letales de H₂O₂ que inducen el 20 y 80 % de mortalidad (CL20 y CL80 respectivamente) luego de 1 y 24 horas de pre-incubación con concentraciones crecientes de los materiales TiO₂ (A) y Ce-TiO₂ (B). Células cultivadas en presencia de H₂O₂ y ausencia de materiales fueron consideradas como control positivo (C+); células cultivadas con medio de cultivo solo se consideraron como control negativo (C-) y se utilizaron para normalizar los resultados. *p < 0.05, **p < 0.01; significativamente mayores que (C+).

Hasta aquí se ha ofrecido una mera descripción de los hechos experimentales. Para comenzar a entender cada uno de estos resultados, es necesario hacer antes una revisión individualizada de otros antecedentes prácticos y teóricos. Es sabido que los electrones (e⁻) en la banda de valencia (BV) del TiO₂ pueden ser fotoexcitados y transferidos a la banda de conducción (BC)[30]. Estos e⁻ en la BC pueden inducir reacciones radicalarias en la interfase TiO₂/solución acuosa formando especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como HO₂[•], O₂^{•-}, HO[•] cuando los e⁻ fotoexcitados del TiO₂ reaccionan con oxígeno, agua o peróxido de hidrógeno. Fenoglio *et al.*[31] determinaron que esas ROS también pueden generarse en ausencia de irradiación específica e incluso en condiciones *in vitro* o en ensayos biológicos *in vivo*. Sin embargo, en los resultados obtenidos en este trabajo no se ve un efecto visible en la viabilidad de fibroblastos L929 en presencia de TiO₂ (figura 7.4 del capítulo 7) y TiO₂-H₂O₂ (figura 8.4) cuando se los compara con los controles. Si las ROS (en

caso de que las hubiese) son generadas debido al dióxido de titanio, su concentración no parece ser suficiente para dañar visiblemente a las células.

La presencia de átomos de cerio en las superestructuras de TiO_2 , por otra parte, parece tener un impacto directo sobre la viabilidad celular. Las nanocería poseen propiedades autocatalíticas y además son capaces de eliminar radicales libres y generar un efecto citoprotector en sistemas biológicos[32], [33]; todos estos atributos se deben a la presencia de estados de valencia mixtos en el CeO_2 ($\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$) y a vacancias de oxígeno. Además, los defectos electrónicos en las nanocería son relativamente resistentes al daño radicalario, permitiendo que ocurra el ciclo de autorregeneración $\text{Ce}^{3+} \rightarrow \text{Ce}^{4+} \rightarrow \text{Ce}^{3+}$ [34]. Otros autores han establecido que las nanocería pueden actuar como superóxido dismutasa (SOD) mimético mediante su reacción con el radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y como catalasa (CAT) mimético al convertir peróxido de hidrógeno en oxígeno molecular y agua[25], [35]. La actividad CAT mimética es más evidente en nanocería conteniendo altos niveles de Ce en su estado de oxidación Ce^{4+} [25], contrariamente a lo que ocurre con la actividad SOD mimética, que adquiere relevancia cuando predomina el estado Ce^{3+} [36]. Estudios *in vitro* realizados por Zhou *et al.*[37] demostraron que 5-40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de nanopartículas de óxido de cerio producían un efecto citoprotector frente al estrés oxidativo inducido por H_2O_2 en un cultivo de osteoblastos cuando éstos eran pre-incubados durante 24 horas en presencia de las nanocería; más aún, demostraron que este fenómeno se debía a que las nanopartículas inducían un aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa y superóxido dismutasa. Como último comentario, es importante destacar que si bien los materiales con los que se trabaja en esta tesis no están hechos de CeO_2 puro, sí contienen el lantánido cuya presencia es responsable de la capacidad de almacenamiento de oxígeno, siendo esto, en última instancia, lo que permite que nanocería eliminen ROS[38], [39]. Dicho esto, no es ilógico pensar que el material Ce- TiO_2 podría retener las propiedades óxido-reductoras de las nanopartículas de CeO_2 .

Teniendo en cuenta toda la información presentada en el párrafo anterior, y para empezar a entender el efecto citoprotector observado aquí, es razonable que surja el interrogante de si ese efecto se debe a las propiedades autocatalíticas del material o a la inducción de la activación de enzimas antioxidantes, de manera similar a lo que ocurre con las nanocería de los ensayos de Zhou *et al.*. Nos abocaremos pues, en las dos secciones siguientes, a tratar de resolver estas cuestiones.

8.3.3. Determinación de la actividad depuradora de H_2O_2 mediada por el material B

En esta sección se evalúa la capacidad del material Ce- TiO_2 para eliminar peróxido de hidrógeno del medio de reacción luego de la pre-incubación del material durante 1 y 24 horas en

soluciones reguladoras de fosfato básico salino (PBS) y Tris/HCl que regulan a un pH de 7,4 y 7,5 respectivamente. La cinética de degradación de H_2O_2 fue medida a temperatura ambiente, en cubeta de cuarzo, utilizando espectrofotometría UV-Visible a $\lambda = 240$ nm. Para poder expresar las medidas de absorbancia en las correspondientes concentraciones de H_2O_2 , se determinó experimentalmente el coeficiente de extinción (ϵ) para esta molécula en ambas soluciones reguladoras, hallándose un valor de $\epsilon = 42,054 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, que está de acuerdo con lo determinado por otros autores ($43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para sistemas equivalentes[25]. Las curvas correspondientes a la cinética de degradación de H_2O_2 en ambas soluciones reguladoras a sus respectivos tiempos de pre-incubación, 1 y 24 horas, se muestran en la figura 8.5. Los modelos utilizados para el ajuste de las curvas de degradación y sus respectivos parámetros se encuentran detallados en la tabla 8.1.

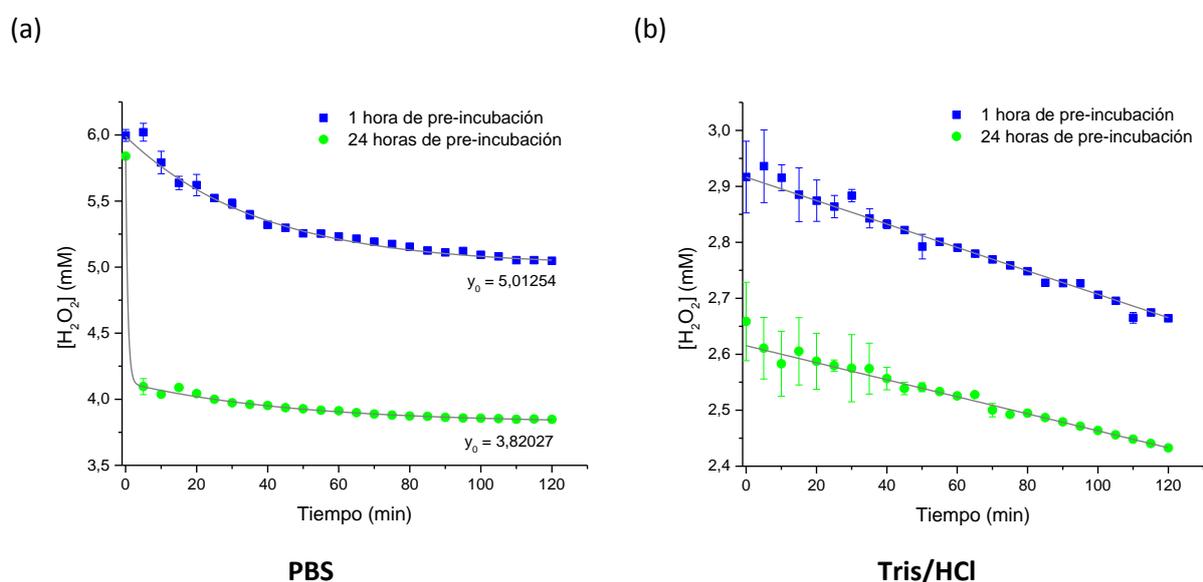


Figura 8.5: Degradación de peróxido de hidrógeno en presencia del material B luego de 1 y 24 horas de pre-incubación de 0,0369 g del material en PBS (a) y en Tris/HCl (b). Las concentraciones inicial y final de H_2O_2 para 1 hora de pre-tratamiento fueron $5,84 \times 10^{-3} \text{ M}$ y $5,01 \times 10^{-3} \text{ M}$ respectivamente, mientras que para 24 horas de pre-tratamiento fueron $6,00 \times 10^{-3} \text{ M}$ y $3,82 \times 10^{-3} \text{ M}$ respectivamente. Las medidas fueron tomadas utilizando un espectrofotómetro UV-Vis operado a $\lambda = 240$ nm, con una cubeta de cuarzo a RT.

Tabla 8.1: Modelos y parámetros de ajuste para la degradación de peróxido de hidrógeno en presencia del material B.

	1 hora de pre-incubación			24 horas de pre-incubación		
	Modelo	$y = A1 \cdot \exp(-x/t1) + y0$		Modelo	$y = y0 + A1 \cdot \exp(-(x-x0)/t1) + A2 \cdot \exp(-(x-x0)/t2)$	
PBS	R²	0,98667		R²	0,99873	
	Parámetro	Valor		Parámetro	Valor	
		y0	5,01254		y0	3,82027
		A1	0,97631		x0	-0,00646
		t1	37,75251		A1	0,30561
		k	0,02649		t1	46,74907
				A2	1,75675	
				t2	0,59384	
	1 hora de pre-incubación			24 horas de pre-incubación		
	Modelo	$y = a + b \cdot x$		Modelo	$y = a + b \cdot x$	
Tris/HCl	R²	0,99253		R²	0,99069	
	Parámetro	Valor		Parámetro	Valor	
		a	2,91638		a	2,6153
		b	-0,00209		b	-1,52×10 ⁻⁰³

Analizando los gráficos anteriores puede observarse que luego de 24 horas de pre-incubación del material B en solución reguladora de fosfato, la degradación del H₂O₂ es más rápida y eficiente, siendo su t_{1/2} inferior a 10 minutos, mientras que al pre-incubar el material sólo una hora, lleva al menos 30 minutos alcanzar este valor. Al cabo de dos horas se llega al estado de equilibrio en las dos condiciones, lo cual permite llegar a la conclusión de que la capacidad de depuración del material ha alcanzado su límite de saturación. Los resultados se encuentran expresados en µmoles de H₂O₂ degradados por gramo de material y se resumen en la tabla 8.2. La degradación llevada a cabo en solución de Tris/HCl no muestra variaciones cinéticas respecto de los distintos tiempos de incubación, mostrando, en ambos casos, pendientes casi nulas (figura 8.5 b)).

Tabla 8.2: Degradación de H₂O₂ y actividad depuradora intrínseca calculada para el material B (Ce-TiO₂).

Medio de reacción	Pre-incubación (h)	[H ₂ O ₂] ₀ (mM)	[H ₂ O ₂] _f (mM)	Actividad depuradora (μmol H ₂ O ₂ g ⁻¹ B)
PBS (pH= 7,4)	1	6,00	5,01	54,8
	24	5,84	3,82	109,2
Tris/HCl (pH= 7,5)	1	2,93	2,67	11,1
	24	2,64	2,43	11,1

De acuerdo con los resultados experimentales de esta sección, puede concluirse que la solución reguladora de fosfato básico salino acelera la degradación del peróxido de hidrógeno y que el máximo efecto se logra cuando se pre-incuba el material en el medio de reacción durante 24 horas. Para ambas condiciones temporales en PBS, el equilibrio en la degradación de H₂O₂ se alcanza al cabo de dos horas de contacto con el material. Por otra parte, si se utiliza la solución reguladora de Tris/HCl en lugar de PBS, la velocidad de degradación no cambia, es excesivamente lenta y no se alcanza el estado de equilibrio en las condiciones de trabajo estudiadas.

A partir de lo expresado anteriormente, se derivan dos conclusiones, por un lado, que la degradación de H₂O₂ no es simple consecuencia del pH del medio de reacción, y por otro, que la presencia de aniones fosfato tiene cierta influencia en el mecanismo de degradación de peróxido de hidrógeno mediado por el material B, que puede entenderse como se describe a continuación.

En general, las especies presentes en la solución alteran el potencial superficial de los materiales controlando tanto sus estados de oxidación como su reactividad, por lo tanto, es necesario considerar el comportamiento de estos materiales cuando son dispersados en el medio de cultivo celular, soluciones reguladoras, sueros, etc. En el material Ce-TiO₂, los electrones provenientes de la BV del TiO₂ pueden transferirse al nivel 4f del cerio haciendo que los átomos que de Ce⁴⁺ que se encuentren en la superficie del dióxido de titanio pasen al estado Ce³⁺:



La solución reguladora de fosfato básico salino, que contiene 50-100 mM de aniones fosfato, es el típico sistema tampón empleado en la simulación del entorno biológico y por ello fue seleccionado para estos experimentos. Como se mencionó previamente, Singh *et al.*[36] demostraron que nanopartículas de CeO₂ expuestas a esta solución perdían su actividad SOD mimética, sugiriendo además, una fuerte correlación entre los átomos de Ce³⁺ superficiales con los aniones PO₄³⁻ provenientes de la solución. Los mismos autores demostraron paralelamente la formación de un compuesto muy estable, el fosfato de cerio, en la superficie del material que actúa

como una “trampa de Ce^{3+} ”, bloqueando la inter-conversión entre los estados de oxidación Ce^{3+}/Ce^{4+} .

En solución, el peróxido de hidrógeno puede descomponerse por dos mecanismos diferentes: (i) aceptando electrones, ergo, actuando como agente oxidante, o (ii) donando electrones, actuando así como agente reductor:



Si los átomos de Ce se encuentran en su estado de oxidación 3+, el H_2O_2 puede descomponerse catalíticamente aceptando electrones a través de la reacción 8.2; mientras que a altas concentraciones de Ce^{4+} , el H_2O_2 sólo puede donar electrones y descomponerse mediante la reacción 8.3. En nuestras condiciones experimentales, puede decirse que los átomos de Ce^{3+} fotogenerados mediante la reacción 8.1 en la superficie del material Ce-TiO₂, quedaron atrapados por los iones PO_4^{3-} , haciendo que la especie Ce^{4+} sea el estado de oxidación predominante en la superficie. Como consecuencia, el material B disperso en PBS actuaría como CAT mimético, haciendo que el H_2O_2 se descomponga a través de la reacción 8.3. Una discusión más integradora de estos resultados y su relación con el aumento en la supervivencia celular, observado en los ensayos con fibroblastos, se aborda a continuación.

El efecto citoprotector del material B se manifiesta luego de 24 horas de incubación en medio de cultivo, lo cual es consistente con el aumento en la velocidad de degradación experimentado por el peróxido de hidrógeno luego de 24 horas de pre-incubación del material en PBS; esto probablemente se deba a que se requiere un cierto tiempo hasta que se generan la cantidad de iones Ce^{4+} para iniciar el ciclo de citoprotección. Además, la capacidad del material Ce-TiO₂ para proteger a los fibroblastos del estrés oxidativo es dependiente de la concentración; un exceso de Ce^{3+} o una cantidad insuficiente de PO_4^{3-} , también pueden producir un aumento en la concentración de especies reactivas de oxígeno disponibles en solución para generar daño celular. Por ejemplo, el Ce^{3+} también es capaz de descomponer al H_2O_2 a través de un mecanismo de tipo Fenton[40], [41] para generar radicales hidroxilo, de acuerdo con la siguiente ecuación:



Considerando que la cantidad de fosfatos presentes en el medio de cultivo es mucho menor que la que contiene el PBS, menos de 1 mM[42] en el primero versus 50 - 100 mM en el segundo, podría ocurrir que frente a altas concentraciones del material (como es el caso de 1000 µg/mL), la

cantidad de aniones PO_4^{3-} sea insuficiente para atrapar a todos los átomos de Ce^{3+} , permitiendo que coexistan las reacciones 8.2, 8.3 y 8.4. Esto generaría especies reactivas en el medio que terminarían generando daño celular.

8.3.4. Determinación de la viabilidad teórica de los fibroblastos de ratón

Esta sección está planteada con el objetivo responder el interrogante de si la supervivencia de los fibroblastos observada experimentalmente podría explicarse solamente a partir de la capacidad intrínseca del material B para degradar el peróxido de hidrógeno. Para ello se graficó la viabilidad teórica de acuerdo con lo descrito en la sección materiales y métodos de este capítulo. Brevemente, se utilizó el valor de actividad depuradora en PBS (tabla 8.2) para calcular la cantidad de peróxido de hidrógeno que se degradaría en el medio de cultivo de acuerdo con las concentraciones de H_2O_2 (559 y 828 μM) y de material (10, 50, 100, 500 y 1000 $\mu\text{g/mL}$) que se emplearon; luego se calculó la cantidad de H_2O_2 que habría quedado en cada pocillo de cultivo y, finalmente, este valor se utilizó para extrapolar la viabilidad en la curva concentración respuesta (figura 8.3). Los resultados se observan en la figura 8.6. La figura 8.7, muestra la correlación que existe entre los valores teóricos, calculados como se acaba de describir, con los valores de supervivencia de L929 reales, obtenidos experimentalmente (Sección 8.2.8).

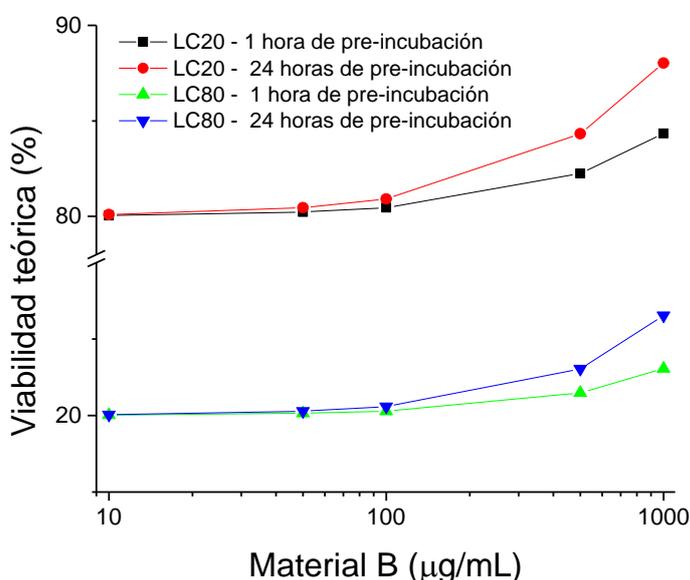


Figura 8.6: Viabilidad teórica de fibroblastos de ratón (L929) calculada por extrapolación de la curva concentración-respuesta utilizando las concentraciones finales H_2O_2 en los pocillos de cultivo luego de 4 horas de incubación en presencia del material B (dicha concentración se estimó a partir de la cantidad inicial de H_2O_2 en el pocillo y la capacidad depuradora determinada para el material B en PBS).

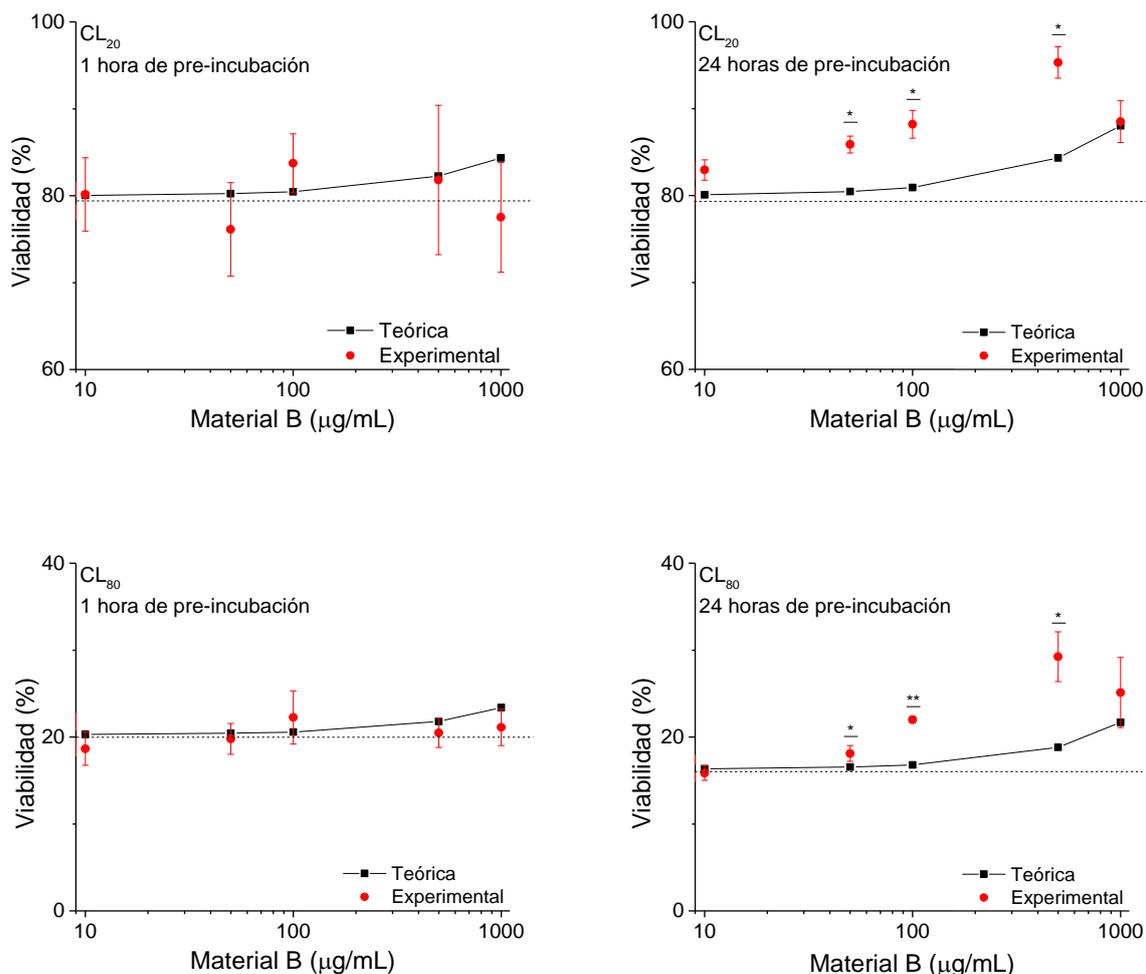


Figura 8.7: Comparación entre las viabilidades experimentales y teóricas para L929 luego de 1 y 24 horas de pre-incubación con el material B a CL₂₀ y CL₈₀. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Como puede observarse en la figura 8.7, existe una buena correlación entre las viabilidades predichas y obtenidas para 1 hora de pre-incubación con el material B, para ambas concentraciones letales de H₂O₂ testeadas (CL₂₀ y CL₈₀). Sin embargo, cuando la pre-incubación con el material B incrementa a 24 horas, las viabilidades experimentales se vuelven más altas que las predichas para concentraciones del material que se encuentran en el rango de 50 – 500 µg/mL, volviéndose menores a [Ce-TiO₂]= 1000 µg/mL. Esto sugiere que en condiciones de cultivo *in vitro*, la degradación de peróxido de hidrógeno podría no estar ocurriendo mediante un único mecanismo. Probablemente, en presencia del material B, se activarían ciertos mecanismos intracelulares que ayudarían a minimizar el efecto oxidativo del peróxido de hidrógeno, de forma similar a lo que ocurre con las nanocería estudiadas por Zhou *et al.*[37].

8.4. Conclusiones

A lo largo de este capítulo se ha demostrado la existencia de un efecto citoprotector mediado por el material B frente al estrés oxidativo inducido por el peróxido de hidrógeno, un mediador químico habitualmente presente en heridas, cuya concentración en exceso es capaz de inducir muerte celular y daño tisular. Se comprobó también que el efecto depurador del material es concentración dependiente y que está asociado a la presencia de átomos de cerio incorporados en la red cristalina del TiO₂ anatasa. Otra conclusión que se desprende de los resultados experimentales es que el mecanismo de degradación del peróxido de hidrógeno estaría influenciado por la presencia de iones fosfato, capaces de favorecer la prevalencia de Ce⁴⁺ en la superficie del material, permitiendo que éste actúe como CAT mimético. Debido a que el fosfato inorgánico es el anión intracelular más abundante y ubicuo en todos los tejidos, es extremadamente posible que el material Ce-TiO₂ exhiba, *in vivo*, un efecto citoprotector frente al daño inducido por peróxido de hidrógeno de mayor magnitud que el observado en condiciones *in vitro*. El alto grado de supervivencia celular observado en los fibroblastos pre-incubados por 24 horas con el material B no puede explicarse únicamente a través de la capacidad intrínseca del material para eliminar peróxido de hidrógeno del medio de cultivo, por lo que se sospecha que la presencia de Ce-TiO₂ podría inducir la activación de enzimas antioxidantes en las L929. En este aspecto, y para confirmar esta hipótesis, sería necesario profundizar en los mecanismos intracelulares que se activan ante la presencia del material, lo cual se plantea como un desafío futuro para poder entender el impacto del Ce-TiO₂ en sistemas biológicos y en sus aplicaciones biomédicas.

8.5. Bibliografía

- [1] Z. M. Ruggeri, "Platelets in atherothrombosis," *Nat. Med.*, vol. 8, no. 11, pp. 1227–1234, 2002.
- [2] B. W. Hale, L. R. Goodrich, D. D. Frisbie, C. W. McIlwraith, and J. D. Kisiday, "Effect of scaffold dilution on migration of mesenchymal stem cells from fibrin hydrogels," *Am. J. Vet. Res.*, vol. 73, no. 2, pp. 313–318, 2012.
- [3] R. A. F. Clark, "Fibrin and wound healing," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 936, no. 1, pp. 355–367, 2001.
- [4] D. R. Yager and B. C. Nwomeh, "The proteolytic environment of chronic wounds," *Wound Repair Regen.*, vol. 7, no. 6, pp. 433–441, 1999.
- [5] P. Martin and S. J. Leibovich, "Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly," *Trends Cell Biol.*, vol. 15, no. 11, pp. 599–607, 2005.
- [6] J. D. Stroncek and W. M. Reichert, "Overview of wound healing in different tissue types," in *Indwelling neural implants: strategies for contending with the in vivo environment*, CRC Pres.,

- W. Reichert, Ed. Boca Raton (FL): CRC Press Boca Raton, FL, USA, 2008.
- [7] D. M. Mosser and J. P. Edwards, "Exploring the full spectrum of macrophage activation," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, no. 12, pp. 958–969, 2008.
- [8] S. Guo and L. A. DiPietro, "Factors Affecting Wound Healing," *J. Dent. Res.*, vol. 89, no. 3, pp. 219–229, 2010.
- [9] P. G. Rodriguez, F. N. Felix, D. T. Woodley, and E. K. Shim, "The role of oxygen in wound healing: a review of the literature," *Dermatologic Surg.*, vol. 34, no. 9, pp. 1159–1169, 2008.
- [10] H. J. H. Fenton, "LXXIII.-Oxidation of tartaric acid in presence of iron," *J. Chem. Soc. Trans.*, vol. 65, no. 0, pp. 899–910, 1894.
- [11] B. D'Autréaux and M. B. Toledano, "ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis," *Nat. Rev. Mol. cell Biol.*, vol. 8, no. 10, pp. 813–824, 2007.
- [12] F. Wauquier, L. Leotoing, V. Coxam, J. Guicheux, and Y. Wittrant, "Oxidative stress in bone remodelling and disease," *Trends Mol. Med.*, vol. 15, no. 10, pp. 468–477, 2009.
- [13] K. K. Barouch, K. Todoki, Y. Maehata, M. Lee, and T. E. Vandyke, "Inflammation and Osseointegration," 2007.
- [14] J. C. Wataha, C. T. Hanks, and Z. Sun, "Effect of cell line on in vitro metal ion cytotoxicity," *Dent. Mater.*, vol. 10, no. 3, pp. 156–161, 1994.
- [15] A. Siddiqui, R. D. Galiano, D. Connors, E. Gruskin, L. Wu, and T. A. Mustoe, "Differential effects of oxygen on human dermal fibroblasts: acute versus chronic hypoxia," *Wound Repair Regen.*, vol. 4, no. 2, pp. 211–218, 1996.
- [16] P. Ducy, T. Schinke, and G. Karsenty, "The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance," *Science (80-.)*, vol. 289, no. 5484, pp. 1501–1504, 2000.
- [17] M. Gülđen, A. Jess, J. Kammann, E. Maser, and H. Seibert, "Cytotoxic potency of H₂O₂ in cell cultures: Impact of cell concentration and exposure time," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 49, no. 8, pp. 1298–1305, 2010.
- [18] S. V Lennon, S. J. Martin, and T. G. Cotter, "Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli," *Cell Prolif.*, vol. 24, no. 2, pp. 203–214, 1991.
- [19] A. M. Gardner, F. Xu, C. Fady, F. J. Jacoby, D. C. Duffey, Y. Tu, and A. Lichtenstein, "Apoptotic vs. Nonapoptotic Cytotoxicity Induced by Hydrogen Peroxide," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 22, no. 1–2, pp. 73–83, 1997.
- [20] M.-V. Clément, A. Ponton, and S. Pervaiz, "Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased superoxide anion concentration and reduction of intracellular milieu," *FEBS Lett.*, vol. 440, no. 1–2, pp. 13–18, 1998.
- [21] A. DeLean, P. J. Munson, and D. Rodbard, "Simultaneous analysis of families of sigmoidal

- curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves.," *Am. J. Physiol.*, vol. 235, no. 2, pp. E97–E102, 1978.
- [22] Y. Xue, Y. Zhai, K. Zhou, L. Wang, H. Tan, Q. Luan, and X. Yao, "The vital role of buffer anions in the antioxidant activity of CeO₂ nanoparticles," *Chemistry*, vol. 18, no. 35, pp. 11115–11122, 2012.
- [23] G. Gertler, G. Fleminger, and H. Rapaport, "Characterizing the adsorption of peptides to TiO₂ in aqueous solutions by liquid chromatography," *Langmuir*, vol. 26, no. 9, pp. 6457–6463, 2010.
- [24] H. Aebi, "Catalase," *Methods Enzym. Anal.*, pp. 673–684, 1974.
- [25] T. Pirmohamed, J. M. Dowding, S. Singh, B. Wasserman, E. Heckert, A. S. Karakoti, J. E. S. King, S. Seal, and W. T. Self, "Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity.," *Chem. Commun. (Camb)*, vol. 46, no. 16, pp. 2736–2738, 2010.
- [26] M. Sundaresan, Z. X. Yu, V. J. Ferrans, K. Irani, and T. Finkel, "Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction," *Science*, vol. 270, no. 5234, pp. 296–299, 1995.
- [27] S. G. Rhee, Y. S. Bae, S. R. Lee, and J. Kwon, "Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation.," *Sci. STKE*, vol. 2000, no. 53, p. pe1, 2000.
- [28] C. H. Coyle and K. N. Kader, "Mechanisms of H₂O₂-induced oxidative stress in endothelial cells exposed to physiologic shear stress.," *ASAIO J.*, vol. 53, no. 1, pp. 17–22, 2007.
- [29] S. Roy, S. Khanna, K. Nallu, T. Hunt, and C. Sen, "Dermal Wound Healing Is Subject to Redox Control," *Mol. Ther.*, vol. 13, no. 1, pp. 211–220, 2006.
- [30] C. Chen, X. Li, W. Ma, J. Zhao, H. Hidaka, and N. Serpone, "Effect of transition metal ions on the TiO₂-assisted photodegradation of dyes under visible irradiation: a probe for the interfacial electron transfer process and reaction mechanism," *J. Phys. Chem. B*, vol. 106, no. 2, pp. 318–324, 2002.
- [31] I. Fenoglio, G. Greco, S. Livraghi, and B. Fubini, "Non-UV-induced radical reactions at the surface of TiO₂ nanoparticles that may trigger toxic responses," *Chem. Eur. J.*, vol. 15, no. 18, pp. 4614–4621, 2009.
- [32] M. Das, S. Patil, N. Bhargava, J.-F. Kang, L. M. Riedel, S. Seal, and J. J. Hickman, "Auto-catalytic ceria nanoparticles offer neuroprotection to adult rat spinal cord neurons," *Biomaterials*, vol. 28, no. 10, pp. 1918–1925, 2007.
- [33] J. M. Perez, A. Asati, S. Nath, and C. Kaittanis, "Synthesis of Biocompatible Dextran-Coated Nanoceria with pH-Dependent Antioxidant Properties," *Small*, vol. 4, no. 5, pp. 552–556,

- 2008.
- [34] T. Xia, M. Kovochich, M. Liong, L. Mädler, B. Gilbert, H. Shi, J. I. Yeh, J. I. Zink, and A. E. Nel, "Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties," *ACS Nano*, vol. 2, no. 10, pp. 2121–2134, 2008.
- [35] E. G. Heckert, A. S. Karakoti, S. Seal, and W. T. Self, "The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanoceria.," *Biomaterials*, vol. 29, no. 18, pp. 2705–9, 2008.
- [36] S. Singh, T. Dosani, A. S. Karakoti, A. Kumar, S. Seal, and W. T. Self, "A phosphate-dependent shift in redox state of cerium oxide nanoparticles and its effects on catalytic properties," *Biomaterials*, vol. 32, no. 28, pp. 6745–6753, 2011.
- [37] G. Zhou, Y. Li, B. Zheng, W. Wang, J. Gao, H. Wei, S. Li, S. Wang, and J. Zhang, "Cerium oxide nanoparticles protect primary osteoblasts against hydrogen peroxide induced oxidative damage," *Micro & Nano Letters, IET*, vol. 9, no. 2, pp. 91–96, 2014.
- [38] S. Li, Q. Wang, T. Chen, Z. Zhou, Y. Wang, and J. Fu, "Study on cerium-doped nano-TiO₂ coatings for corrosion protection of 316 L stainless steel.," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 7, no. 1, p. 227, 2012.
- [39] Z. Mei, W. Xidong, W. Fuming, and L. Wenchao, "Oxygen sensitivity of nano-CeO₂ coating TiO₂ materials," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 92, no. 1–2, pp. 167–170, 2003.
- [40] S. S. Lee, W. Song, M. Cho, H. L. Puppala, P. Nguyen, H. Zhu, L. Segatori, and V. L. Colvin, "Antioxidant properties of cerium oxide nanocrystals as a function of nanocrystal diameter and surface coating.," *ACS Nano*, vol. 7, no. 11, pp. 9693–703, 2013.
- [41] A. D. Bokare and W. Choi, "Review of iron-free Fenton-like systems for activating H₂O₂ in advanced oxidation processes," *J. Hazard. Mater.*, vol. 275, no. MAY, pp. 121–135, 2014.
- [42] R. Dulbecco and G. Freeman, "Plaque production by the polyoma virus," *Virology*, vol. 8, no. 3, pp. 396–397, 1959.

Capítulo 9

Conclusiones generales y perspectivas

El presente trabajo de investigación ha abordado la tarea de desarrollar materiales nanoestructurados basados en óxido de titanio y dopados con cerio para ser empleados en la regeneración del tejido óseo. La presencia del lantánido fue pensada para conferir propiedades antioxidantes y la matriz de TiO_2 para proporcionar un andamiaje de características adecuadas para lograr una osteointegración efectiva del biomaterial. La síntesis de los materiales fue realizada mediante sistemas de microemulsiones que oficiaron de reactores químicos y agentes directores de estructura. Los párrafos siguientes enunciarán las observaciones más destacadas de este trabajo:

El método empleado para la síntesis de los materiales (microemulsiones W/O agua/CTAB/n-butanol/n-heptano seguido de tratamiento hidrotérmico a 100 °C y posterior calcinación a 650 °C en atmósfera de aire) ha probado ser efectivo para la preparación de polvos con tamaños de partícula homogéneos y con estructura cristalina de anatasa conservada en el caso de aquellos materiales conteniendo cerio (B, B₂-B₈ y C); el material A, correspondiente a TiO_2 puro, fue utilizado como referencia para poner de manifiesto las características estructurales que surgieran de la incorporación de cerio en sus diferentes formas. Asimismo se determinó que la cantidad óptima de $\text{Ce}(\text{Val})_3$ necesaria para conservar la estructura de anatasa en el TiO_2 se ubica en $\text{Ce}/\text{Ti} = 0,09 \text{ mol}\%$ y es por ello que se la seleccionó para la obtención del material B. Simultáneamente se comprobó que la presencia de tripentanoato de cerio en la interfase de la microemulsión así como también su flexibilidad, permiten manipular la organización macroscópica de los agregados de partículas para obtener arreglos fibrilares de hasta 20 μm de largo por 1-2 μm de ancho. También se puso de manifiesto que concentraciones crecientes de $\text{Ce}(\text{Val})_3$ durante el proceso de síntesis de nanopartículas de Ce-TiO_2 (materiales B₂-B₈) alteran la organización interplanar de los cristales de anatasa, dando origen a estructuras que cristalizan en forma de anillos concéntricos cuyo tamaño y número de planos plegados es controlable en función de la cantidad de cerio. De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, la presencia de órdenes cristalinos de ceria en las esquinas sería la responsable del plegamiento de estas estructuras de tipo fullereno inorgánico. Por todo lo mencionado hasta aquí es posible concluir que el método y las condiciones de síntesis se mostraron adecuados para lograr obtener un andamiaje de TiO_2 dopado con Ce de estructura fibrilar cuya organización simula el andamiaje fibrilar que presenta la matriz orgánica del tejido óseo.

El siguiente objetivo planteado para este trabajo de investigación fue evaluar la capacidad para interactuar con especies biológicamente activas, en cuyo caso se propuso estudiar la afinidad de los materiales por la proteína plasmática más abundante, albúmina, ya que su presencia en la interfase implante-tejido es inevitable y su rol en el proceso de mineralización es incierto. Los estudios de adsorción sobre los materiales TiO_2 (A), Ce-TiO_2 (B) y $\text{CeO}_2\text{-TiO}_2$ (C), demostraron una

afinidad decreciente por la proteína en el sentido $A > B > C$ en un patrón que se hallaría directamente relacionado con la hidrofobicidad característica de cada material.

Debido a la importancia de que el material sea capaz de promover la osteogénesis por contacto cuando es implantado, se procedió a verificar la bioactividad de los mismos. Esta propiedad es el resultado de un ensayo *in vitro* en el que se infiere la capacidad de enlazarse a tejidos vivos a partir de la habilidad del material para inducir la formación de una capa de HAp cuando se lo sumerge en Suero Fisiológico Simulado. El resultado de estos experimentos reveló que todos los materiales (A, B y C) poseen una topografía adecuada para promover la nucleación y crecimiento de estos cristales por lo que se los puede considerar como bioactivos. La presencia de albúmina, cuya influencia en la mineralización aún es tema de debate en la comunidad científica, ha demostrado, de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, afectar visiblemente el proceso de nucleación heterogénea de fosfatos de calcio sobre los materiales. De hecho, el material con mayor afinidad por la proteína (TiO_2) mostró casi total ausencia de depósitos minerales, mientras que aquel material con menor afinidad por albúmina ($\text{CeO}_2\text{-TiO}_2$) evidenció depósitos de CaP equivalentes al ensayo de bioactividad realizado en ausencia de la proteína. En este sentido, este trabajo de investigación aporta evidencia sólida al debate en curso para poner de manifiesto que esta proteína plasmática afecta negativamente el proceso de mineralización sobre el implante.

Un paso más adelante en la evaluación de la capacidad del material para interactuar con especies biológicamente activas fue comprobar la capacidad antioxidante del material. En este sentido se decidió verificar la habilidad de los materiales para acelerar la degradación de ciertas especies reactivas de oxígeno: el peroxinitrito y el peróxido de hidrógeno. Se dedicará este párrafo a comentar sobre el primero mientras que se hará un abordaje apropiado del H_2O_2 más adelante en este mismo capítulo. Todos los materiales fueron capaces de modificar la cinética de degradación de ONOO^- hacia órdenes de reacción mayores demostrando su participación en el proceso. La velocidad de degradación también fue mayor en presencia de los materiales. A propósito de la reacción de degradación, este trabajo propone un mecanismo que involucra la presencia de un intermediario reactivo.

Habiendo determinado dos de las características más deseadas en el desarrollo de este proyecto, esto es, la bioactividad y la capacidad para neutralizar especies radicalarias, se decidió avanzar más y determinar la biocompatibilidad de los materiales. Para ello se utilizaron ensayos estándar de viabilidad y morfología celular empleando dos modelos: un cultivo primario de pre-osteoblastos de calvaria de rata neonatal y una línea celular de fibroblastos de ratón, ambos de interés por su participación activa en el proceso de osteointegración de implantes. A las

concentraciones de trabajo empleadas, se determinó que los materiales no poseen efectos negativos sobre la viabilidad y morfología de pre-osteoblastos. El caso del modelo de fibroblastos, la presencia de TiO_2 puro no produce alteraciones detectables en su supervivencia y/o morfología. La concentración de cerio parece tener un impacto directo sobre la proliferación de este modelo, en lo que, se supone, podría ser un mecanismo asociado a la capacidad de almacenamiento de oxígeno de los materiales y su efecto sobre el balance redox celular. El material conteniendo nanopartículas de óxido de cerio ($\text{CeO}_2\text{-TiO}_2$) mostró un comportamiento anómalo en lo respectivo a su interacción con fibroblastos, manifestando un aumento excesivo de la actividad metabólica no asociado con un aumento en la proliferación y una pérdida de la adhesión celular al sustrato en condiciones de cultivo en contacto. Es por ello que se decidió discontinuar los estudios posteriores con este material.

El último desafío planteado en este trabajo de investigación fue evaluar el efecto citoprotector del material conteniendo cerio (B) frente al estrés oxidativo inducido en el modelo de fibroblastos de ratón por concentraciones anormalmente excesivas de H_2O_2 , para simular condiciones de inflamación crónica. Esta molécula se eligió por ser un mediador químico habitualmente presente en heridas, cuya concentración en exceso es capaz de inducir muerte celular y daño tisular. Pudo observarse que el material B (Ce-TiO_2), es capaz de mejorar la supervivencia celular frente a la presencia de esta especie reactiva y que lo hace en un mecanismo catalasa mimético que se ve favorecido por la presencia de iones fosfato en el medio. Se determinó también que la mejora en la supervivencia celular de este modelo no responde únicamente a la capacidad intrínseca del material para eliminar H_2O_2 sino que también podría estar induciendo la actividad de enzimas antioxidantes propias de las células.

A título de ponderación final, ha de mencionarse que el avance de este trabajo de investigación permitió seleccionar y desarrollar un material basado en TiO_2 y dopado con Ce, hasta aquí reconocido como material B o Ce-TiO_2 , cuyas características morfológicas, bioactivas, de reactividad química y biocompatibles, lo vuelven un candidato más que prometedor para ser empleado en la regeneración del tejido óseo. Si bien queda mucho por elucidar respecto al mecanismo de acción implicado en su efecto citoprotector y de degradación de especies reactivas de oxígeno, esto no es un impedimento para que se pueda continuar hacia el estudio de su performance sobre la osteointegración y biocompatibilidad en modelos *in vivo*.

Capítulo 10

Producción científica

El contenido de este trabajo forma parte de las siguientes publicaciones y presentaciones en reuniones científicas:

10.1. Publicaciones en revistas internacionales con referato

- 2014** 1. *“Striped, bioactive Ce–TiO₂ materials with peroxydinitrite-scavenging activity”*, **AN Gravina**, JM Ruso, JA Laiuppa, GE Santillán, JL Marco-Brown, NL D’Elia and PV Messina, *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, 2, Pages 834–845
- 2015** 2. *“Effect of ceria on the organization and bio-ability of anatase fullerene-like crystals”*. **AN Gravina**, JM Ruso, DA Mbeh, L’H Yahia, Y Merhi, J Sartuqui and PV Messina. *RSC Advances*, 2015, 5, Pages 8077–8087
- 2016** 3. *“Protective role against hydrogen peroxide and fibroblast stimulation via Ce-doped TiO₂ nanostructured materials”*. **AN Gravina**, K Maghni, M Welman, L’H Yahia, DA Mbeh and PV Messina. *BBA - General Subjects*, 2016, 1860, Pages 452-464
4. *“Ce-TiO₂ material with promising characteristics for osseointegration: interaction with fibroblasts and effect of albumin adsorption and bioactivity on 3D surface topography”*. **AN Gravina**, NL D’Elía, J Sartuqui, K Maghni K, L’H Yahia and PV Messina. *Bone*, 2016, 89, Page 65
5. *“Synthesis of PtSn nanostructured catalysts supported over TiO₂ and Ce-doped TiO₂ particles for the electro-oxidation of ethanol”*. AE Alvarez, **AN Gravina**, PV Messina, MM Duarte and JM Sieben. *Materials Science and Engineering B*, 2016, 211, Pages 26-32

10.2. Presentaciones en reuniones científicas

- 2012** 1. *“Materiales Nanoestructurados en base a Ti y Ce”*. **AN Gravina**, NL D’Elía y PV Messina. II Reunión Nanocórdoba 2012. Villa Carlos Paz, 1 al 3 de Octubre 2012
2. *“Ti-Ce nanostructured materials for bone tissue regeneration”*. **AN Gravina**, NL D’Elía and PV Messina. IV Congreso Argentino de Materia Blanda. Bahía Blanca, 21-23 de Noviembre de 2012

- 2013**
3. *“Crecimiento epitaxial de Hidroxiapatita sobre materiales de Anatasa-Ce aplicables a la regeneración de tejido óseo”*. **AN Gravina**, NL D’Elía, J Sartuqui y PV Messina. IX Reunión Anual de la AACr y I Reunión Latinoamericana de Cristalografía, Córdoba, 29 de Octubre a 1 de Noviembre de 2013
 4. *“Diseño de un nuevo material implantable para su aplicación en la regeneración de tejido óseo con potencial efecto antioxidante”*. **AN Gravina**, NL D’Elía, J Sartuqui, JM Ruso y PV Messina. LVIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata, 20-23 de Noviembre 2013
- 2014**
5. *“Preparación de catalizadores Pt-Sn/TiO₂-CeO₂ para la electro-oxidación de alcoholes”*. A Alvarez, **AN Gravina**, JM Sieben, PV Messina y MM Duarte. III Workshop Nacional sobre Celdas de Combustible, Bahía Blanca, 5-6 de Junio 2014
- 2015**
6. *“Materiales nanoestructurados para patologías óseas y dentales”*. PV Messina, LA Benedini, NL D’Elía, **AN Gravina** y J Sartuqui. V Congreso Interdisciplinario de la Salud, Bahía Blanca, 13-14 de Abril de 2015
 7. *“An alternative to Rietveld method for phase determination of Ce-TiO₂ materials”*. **AN Gravina**, NL D’Elía, J Sartuqui and PV Messina. XXII Brazilian Crystallographic Association Meeting and I Latin American Crystallographic Association Meeting, São Paulo (Brazil), 9-11 de Septiembre de 2015
 8. *“Material de Ce-TiO₂ con características favorables para la osteointegración: interacción con fibroblastos y efecto de la adsorción de albúmina y bioactividad en la topografía”*. **AN Gravina**, NL D’Elia, J Sartuqui, K Maghni, L’H Yahia y PV Messina. XXXII Reunión Anual de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral, Sierra de la Ventana, 29-31 de Octubre de 2015
- 2016**
9. *“Síntesis de catalizadores nanoestructurados de PtSn sobre sustratos de TiO₂ y Ce-TiO₂ para la electro-oxidación de etanol”*. AE Alvarez, **AN Gravina**, JM Sieben, PV Messina y MM Duarte. XXII Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Electroquímica, San José (Costa Rica), 14-18 de Marzo de 2016