

# **Métodos avanzados de caracterización de superficies biomiméticas**

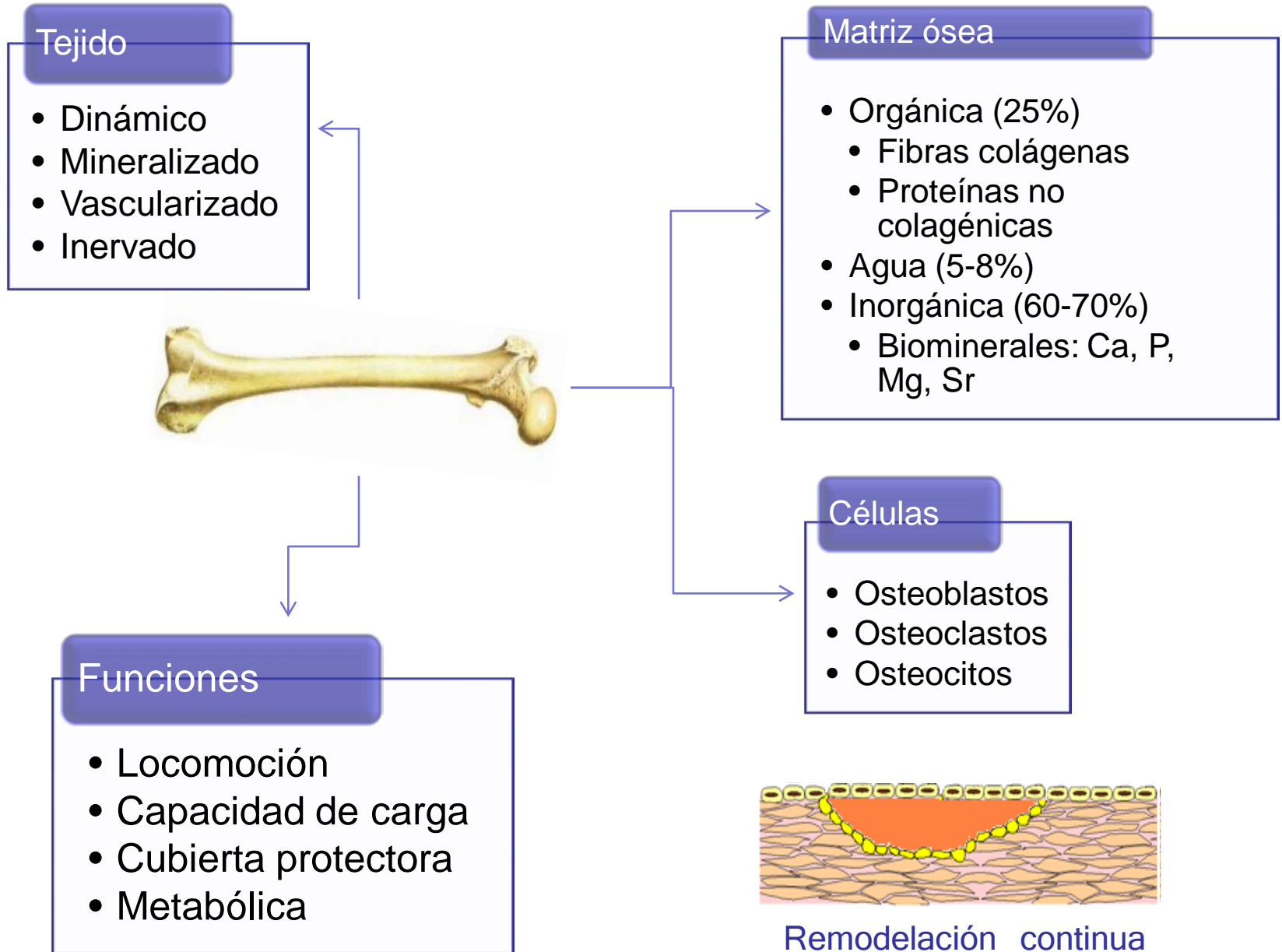
**Virginia Paredes<sup>1,2</sup>, Emiliano Salvagni<sup>1,2</sup>, Enrique Rodríguez-Castellón<sup>3</sup>, José María Manero<sup>1</sup>**

**<sup>1</sup>Nanoengineering Research Centre (CRnE). Technical University of Catalonia (UPC), Barcelona, Spain**

**<sup>2</sup> Biomaterials, Biomechanics and Tissue Engineering Group, Department of Materials Science and Metallurgy, Technical University of Catalonia (UPC), Barcelona, Spain,**

**<sup>3</sup> Departamento de Química Inorgánica, Universidad de Málaga, España**

# Introducción: El Hueso



# Introducción: Implantes



**Daños óseos**

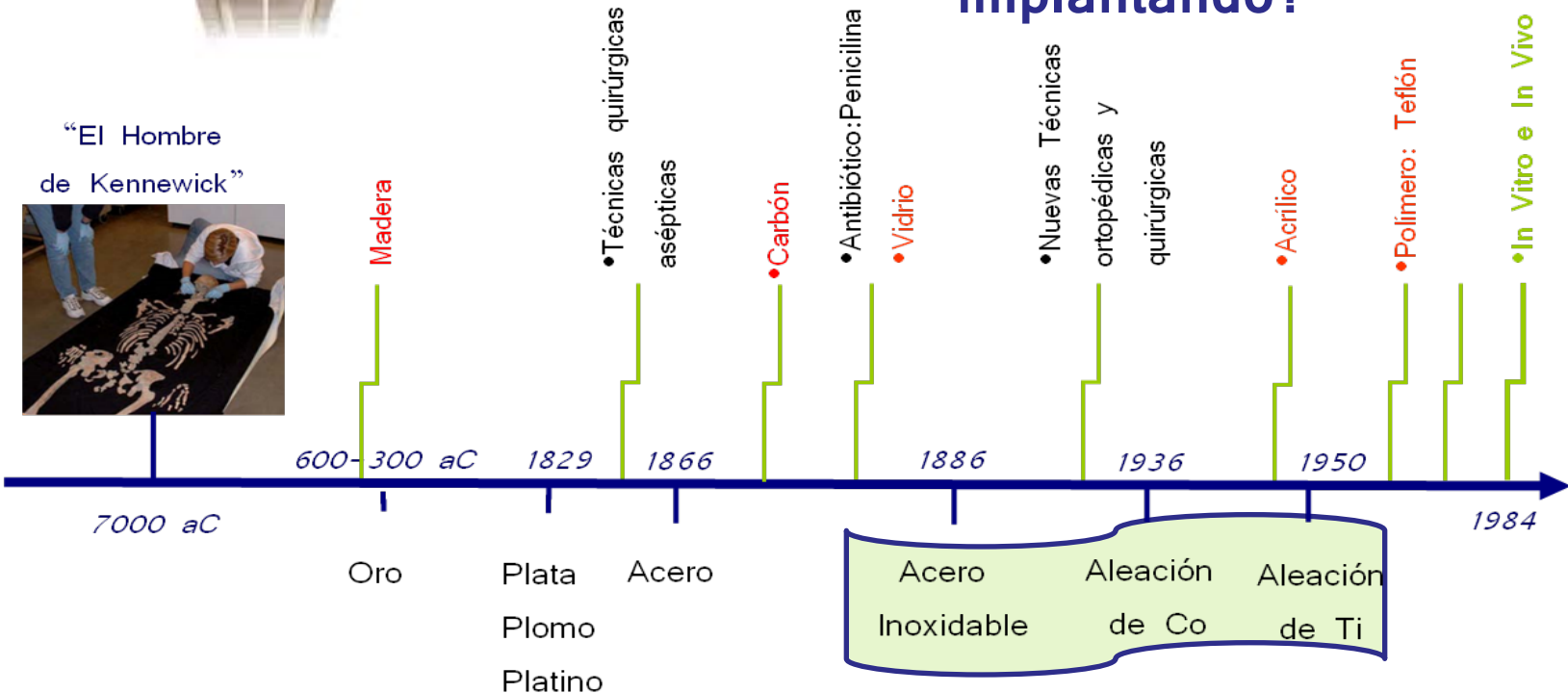
**Causas**

- Infecciones
- Envejecimiento
- Accidentes

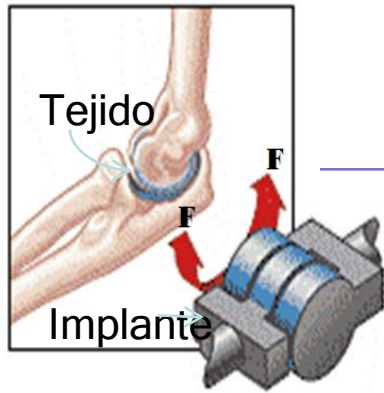
**Solución**



## ¿Qué material puede ser implantando?



# Introducción: Implantes



## Características

- Composición química
- Energía Superficial
- Concentraciones iónicas
- Contaminación

## Procesos

- Cicatrización
- Interface Célula-Material
- Oseointegración

## Problemas

- Encapsulamiento
- Hipersensibilidad
- Lesiones en la Piel
- Aflojamiento aséptico
- Liberación de iones

# Introducción

## Biofuncionalización de superficies para la reparación y regeneración de tejido

### A1. Materiales

#### Polímero

- PLA 70/30
- PMMA
- Citosan

#### Metal

- c.p. Ti
- CoCr
- TiHfNb

#### Síntesis de Péptidos

- Regeneración Ósea
- Regeneración Nerviosa
- Cardiovascular

### A2. Biofuncionalización

- Proceso de Selección
- Modificación Topográfica

### B. Caracterización

- Topográfica
- Química
- Mecánica

### C. Respuesta Biológica

- Regeneración Ósea
- Regeneración Nerviosa
- Cardiovascular

# Introducción:

## Aleación de CoCr

- ASTM F1537



Comercialmente aprobada por **American Society for Testing Materials** para aplicaciones biomédicas

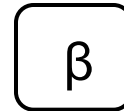
## Aleación de Ti

- Ti 16.2 Hf 24.8Nb



• Desarrollada en el grupo de investigación BIBITE

Nb, Zr, Hf y Ta metales de transición  $\beta$ -estabilizantes

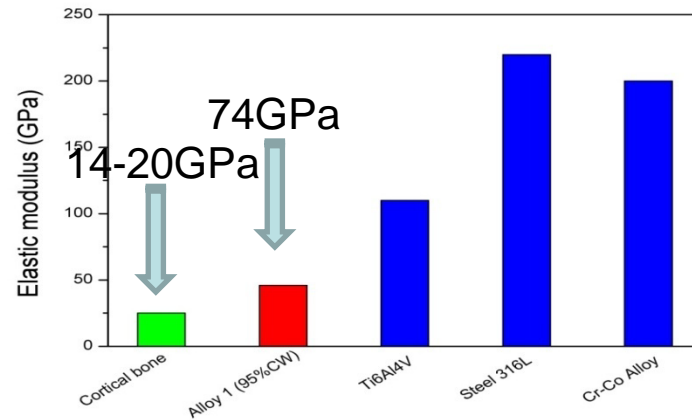


$\alpha''$

## Propiedades

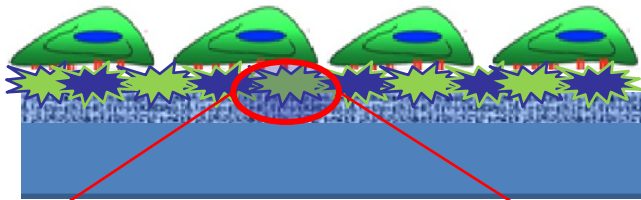
- Bajo módulo elástico
- No citotóxica
- Biocompatible
- Pseudoelasticidad
- Libre de Ni

## Bajo módulo elástico



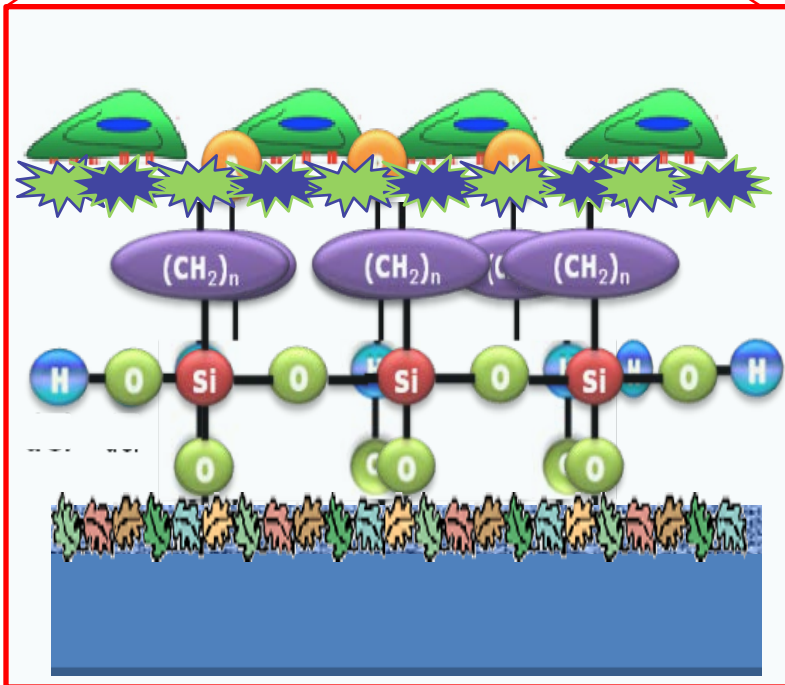
# Introducción

¿Qué aporta este estudio a los procesos de modificaciones biomiméticas actuales?



## Caracterización

- Respuesta celular



## 3. Inmovilización de Biomoléculas Caracterización y optimización

- Modificación biomimética
  - Activación
  - Silanización
  - Inmovilización de biomoléculas
- Respuesta celular

---

## Objetivo General

- Caracterizar y optimizar el proceso de modificación biomimética de dos superficies metálicas (aleación de CoCr ASTM F1537 y TiNbHf), para mejorar la regeneración de tejido óseo alrededor del implante.
-



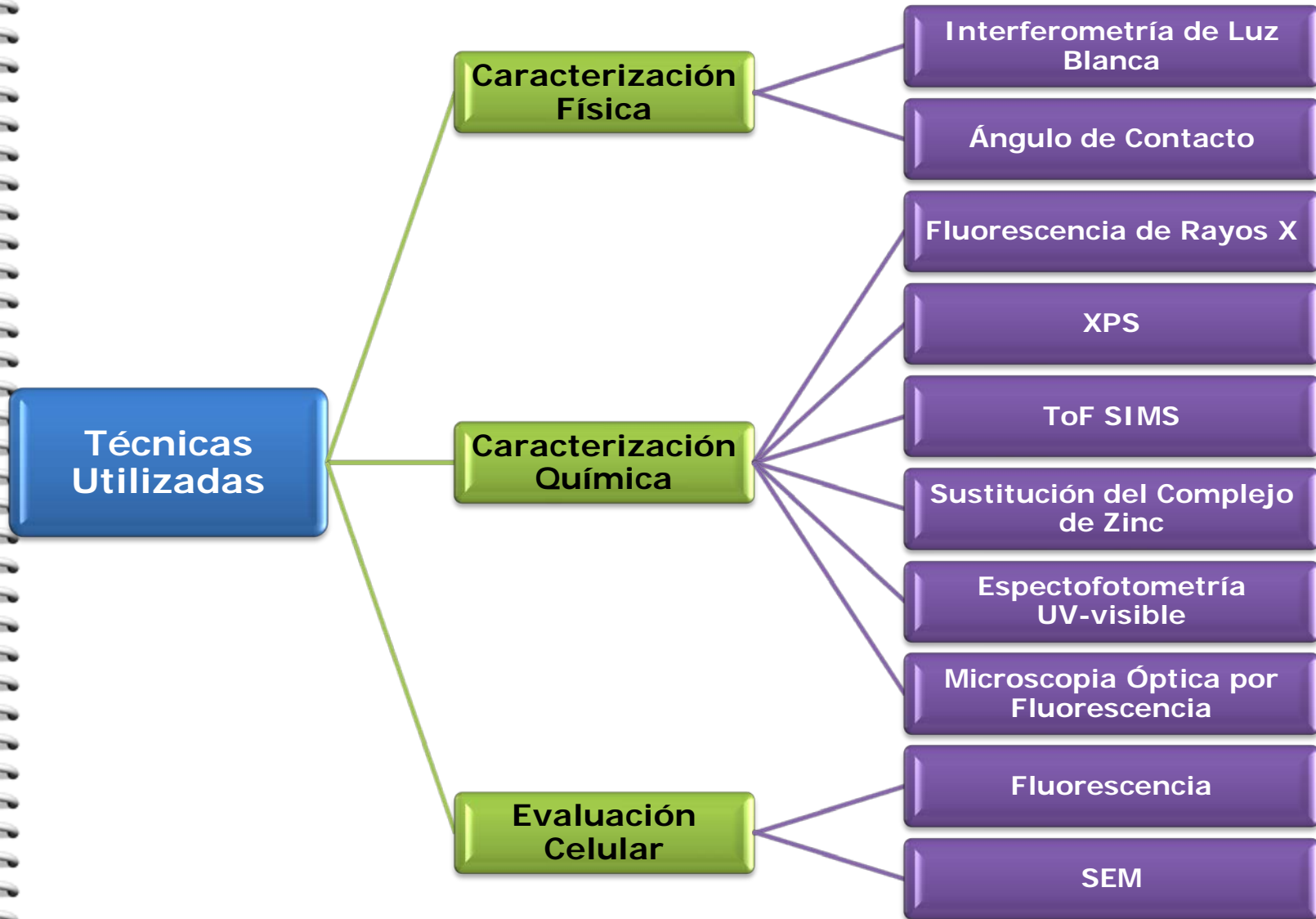
# Objetivos

---

## Objetivos Específicos

- Caracterizar el proceso de activación, en términos de concentración de grupos  $\text{OH}^-$ , grado de limpieza y composición química de la capa de óxidos.
  - Evaluar el proceso de silanización y seleccionar el mejor silano en función del porcentaje de Si adherido y su estabilidad.
  - Optimizar el proceso de inmovilización de biomoléculas, en términos de porcentaje de péptido adherido y estabilidad del enlace químico .
  - Validar el proceso de biofuncionalización efectuado, evaluando la influencia del uso de secuencias peptídicas cortas, sobre la respuesta celular.
-

# Metodología: Técnicas de Caracterización



# Metodología: Estrategia

## Biofuncionalización

- Mejora la adhesión celular y por ende la oseointegración.

### 1. Limpieza y Activación

- Ataque químico
- Plasma de oxígeno

### 2. Silanización

- CPTES
- GPTES
- APTES+Maleimido

### 3. Inmovilización de Biomoléculas

- RGD
- FHRRIKA
- PHSRN
- RGD+FHRRIKA
- RGD+PHSRN

## RGD

- En ≠ moléculas ECM
- Integrinas
- Promueve adhesión
- Resp inespecífica

## Organofuncional

## PHSRN

- En la fibronectina
- Integrina  $\alpha_5\beta_1$
- Resp específica

## FHRRIKA

- En sialoproteína de hueso
- Heparinas
- Resp específica

# Metodología: Biofuncionalización

## A1. Limpieza y Activación

### Limpieza

- Rugosidad
- Mojabilidad
- Eliminación de carbono

- Interferometría
- AC
- XPS

### Activación

- Grupos OH<sup>-</sup>

- AC
- XPS
- TSC Zn

### Óxidos

- Modificación de los óxidos

- XPS
- ToF SIMS

---

---

# Metodología: Biofuncionalización

## A2. Silanización

- Mojabilidad
- Enlace Si-O-Metal
- Estabilidad

- AC
- XPS

## A3. Inmovilización de biomolécula

- Mojabilidad
- Detección de la cisteína
- Concentración de péptido

- AC
- XPS
- Espectroscopia de UV

## B. Respuesta celular

- Adhesión

- Microscopía óptica
- Tinción con DAPI
- SEM

A1. Limpieza y  
Activación  
Acido nítrico

A2. Silanización  
GPTES  
APTES +Ma

B. Respuesta  
celular  
CoAMR  
CoAMRF

A3.  
Inmovilización  
de biomoléculas  
CoAMR  
CoAMRF

# *Sensibilidad superficial del XPS*

$h \cdot \nu$

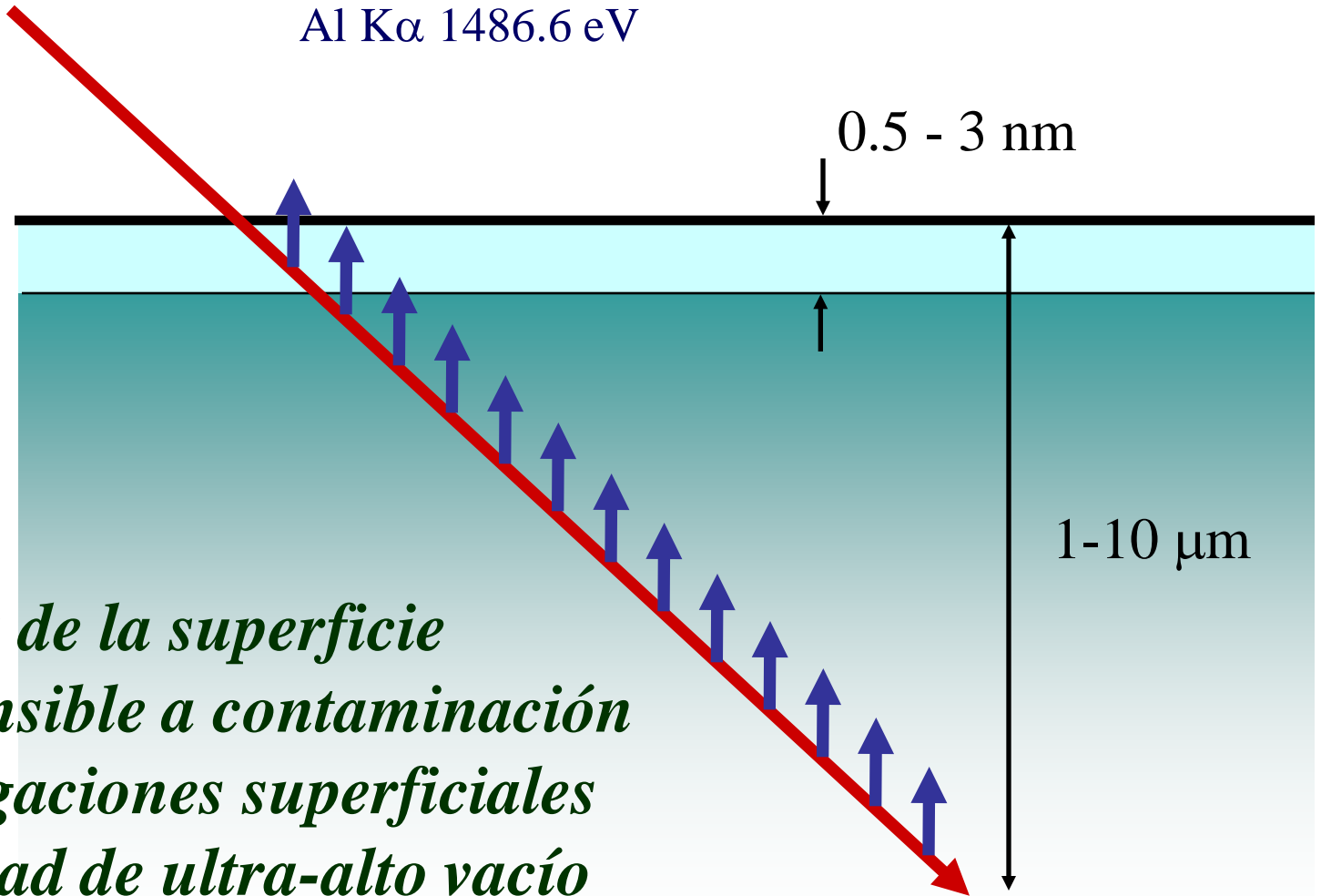
Rayos X: Mg K $\alpha$  1253.6 eV  
Al K $\alpha$  1486.6 eV

Superficie

0.5 - 3 nm

1-10  $\mu\text{m}$

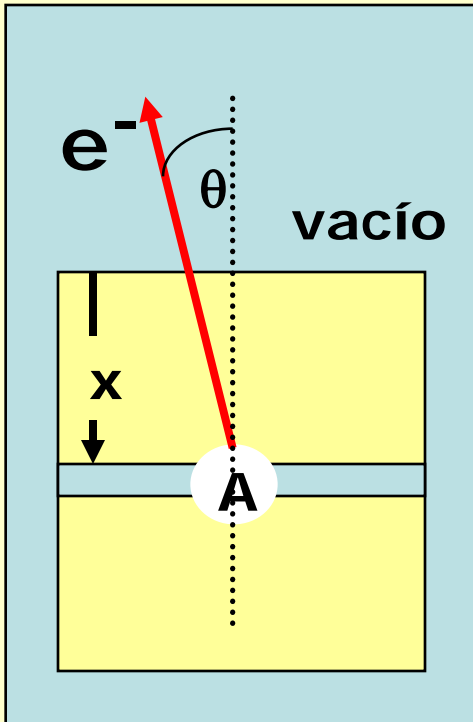
- ⇒ *Análisis de la superficie*
- ⇒ *Muy sensible a contaminación y segregaciones superficiales*
- ⇒ *Necesidad de ultra-alto vacío*



# Sensibilidad Superficial del XPS

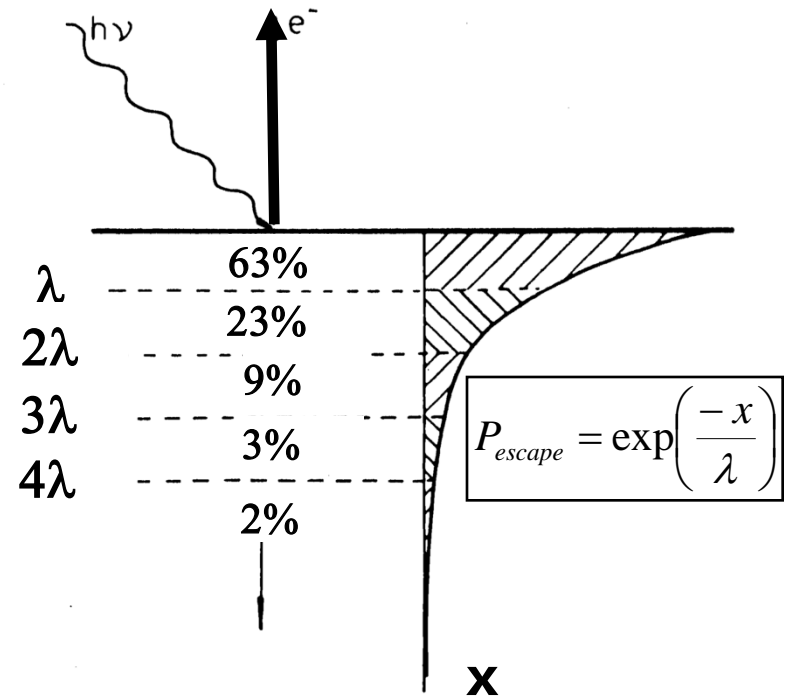
Probabilidad del electrón de alcanzar la superficie,

$$P_{\text{escape}} = \exp\left(\frac{-x}{\lambda \cos \theta}\right)$$



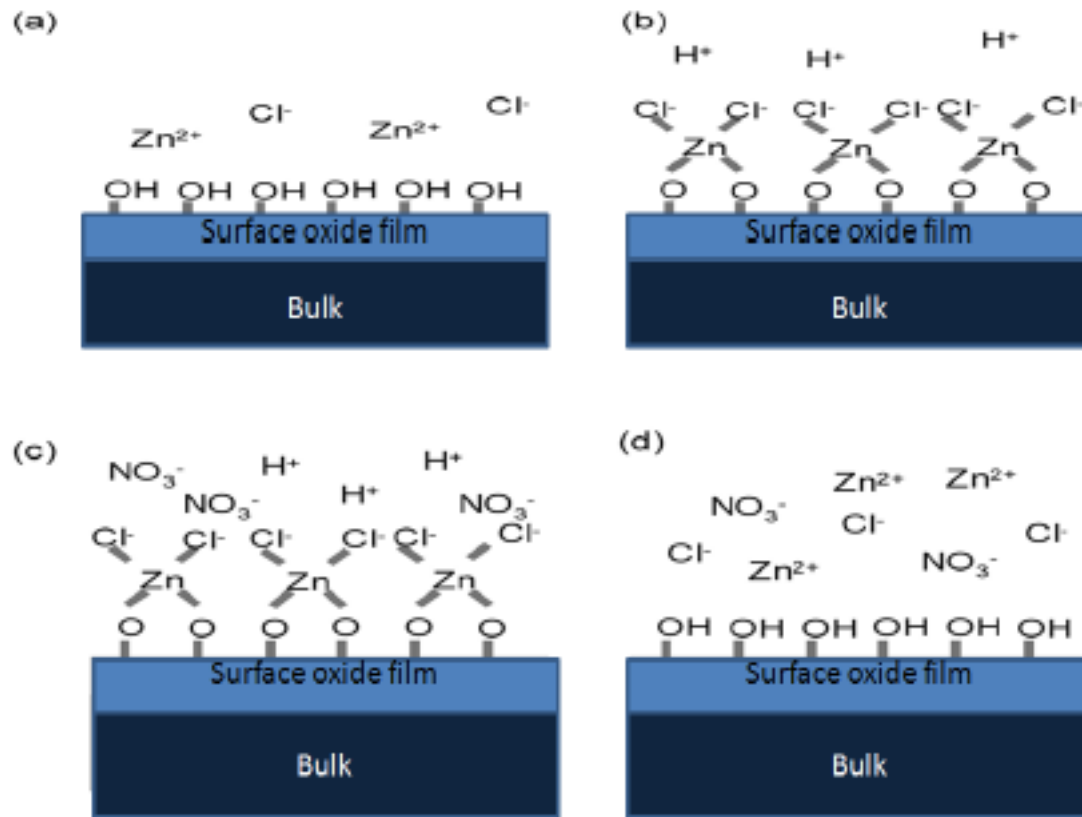
Intensidad de señal procedente de una rodaja superficial de grosor  $d$

$$I_{Ad} = K_A \int_0^d P dx = K_A \int_0^d \exp\left(\frac{-x}{\lambda \cos \theta}\right) dx$$



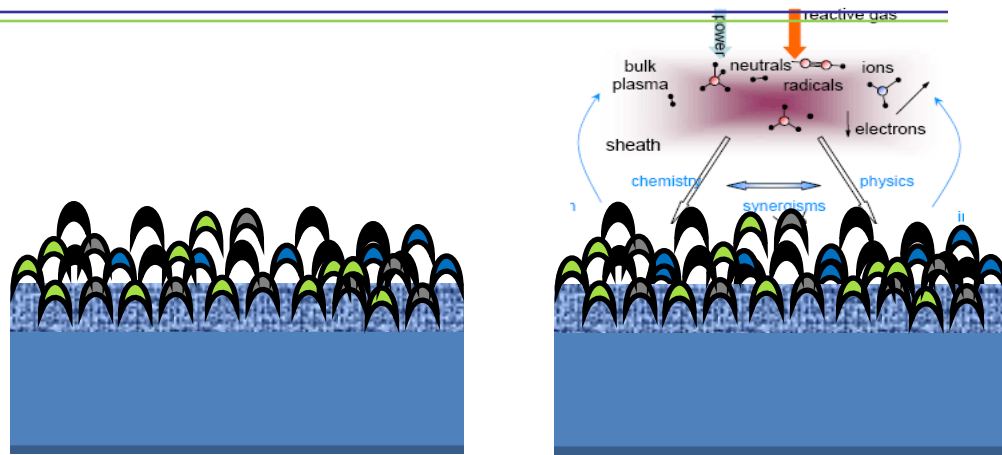


# Técnica de sustitución del complejo de Zn



$$C_{OH^-} = (C_{Zn^{2+}} \times 10^{-6} \times V \times A \times 2) / (M \times S)$$

# Limpieza



Control  
(CoCr)

Plasma de oxígeno  
(PO)

Ácido nítrico  
(AN)

## Caracterización Física

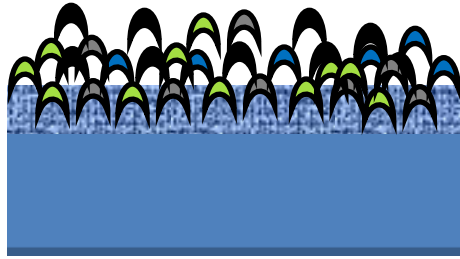
### Interferometría

Rugosidad

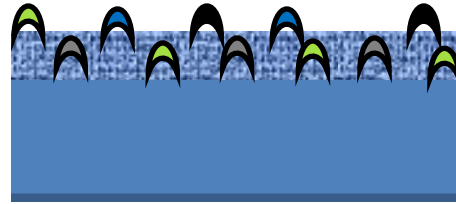
Parámetros	CoCr		PO		AN	
$R_a$ (nm)	20.1	$\pm 4.9$	13.6	$\pm 2.1$	24.7	$\pm 6.6$
$R_{ku}$	25.7	$\pm 5.9$	3.7	$\pm 0.4$	5.5	$\pm 2.7$
$R_q$ (nm)	16.0	$\pm 14.0$	17.2	$\pm 2.3$	30.4	$\pm 7.9$

- No intervendrá en los resultados de cada uno de los tratamientos
- Distribución homogénea entre picos y valles

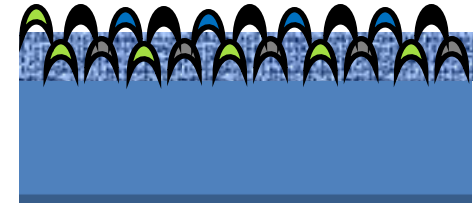
# Limpieza



Control  
(CoCr)



Plasma de oxígeno  
(PO)



Ácido nítrico  
(AN)

## Caracterización Física

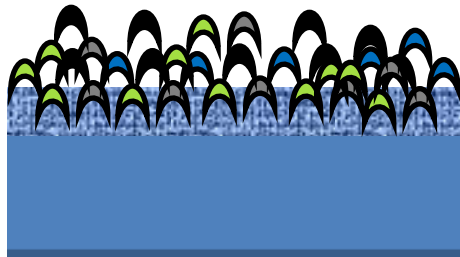
### Ángulo de contacto

Mojabilidad

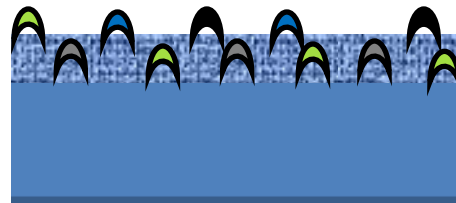
Parámetros	CoCr	PO	AN
AC (°)	<i>Aire</i> 69.9 ± 15.6	0.5 ± 0.1	28.6 ± 2.5
ES (mN/m)	<i>Salido</i> ± 6.2	75.5 ± 0.2	68.3 ± 1.2

- Superficies más hidrofílicas, debido a:
  - Eliminación de impurezas (limpieza)
  - La incorporación de grupos funcionales polares, incrementa ES

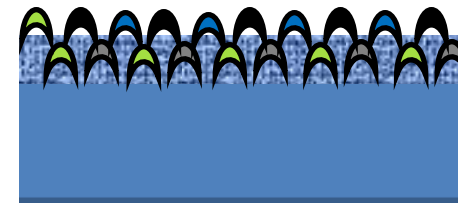
# Limpieza



Control  
(CoCr)



Plasma de oxígeno  
(PO)

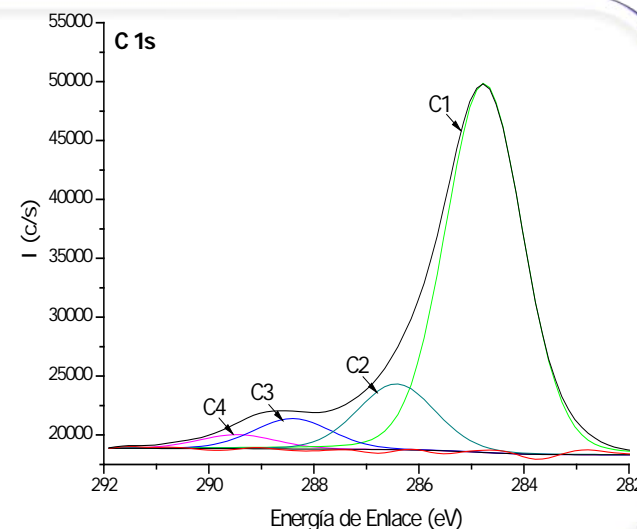


Ácido nítrico  
(AN)

## Caracterización Química

### XPS

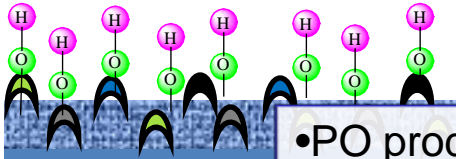
Pico	Enlace	CoCr	PO	AN
<b>C 1s</b>				
		<b>48±2.2</b>	<b>22±0.2</b>	<b>36±0.4</b>
C1	C-H, C-C	29	18	29
C2	C=O, C-OH	9	2	4
C3	C-O, N-C=O	5	0	0
C4	N-O-	5	2	3
<b>(C2+C3+C4)/C1</b>		<b>0.66</b>	<b>0.22</b>	<b>0.24</b>



Carbono

- Disminución de la contaminación de carbono
- La ratio indica que ambos son eficientes en términos de remoción de C

# Activación

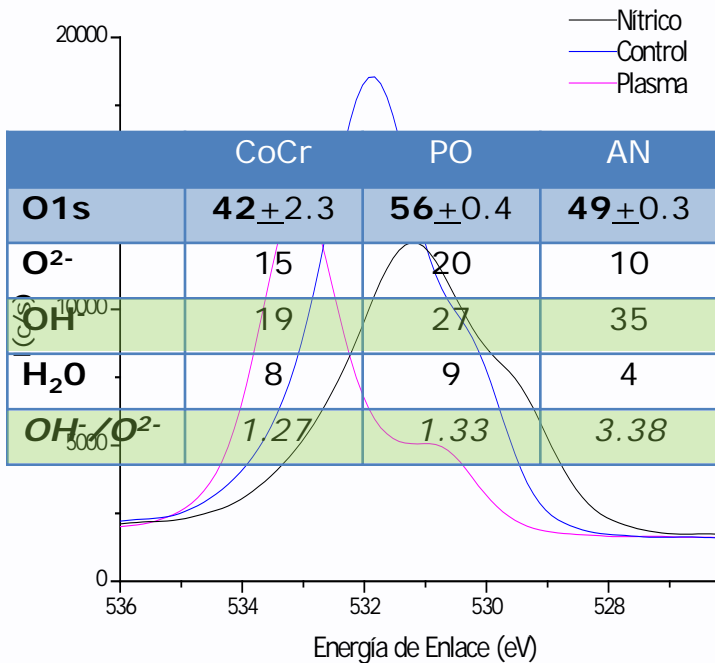


## Grupos OH<sup>-</sup>

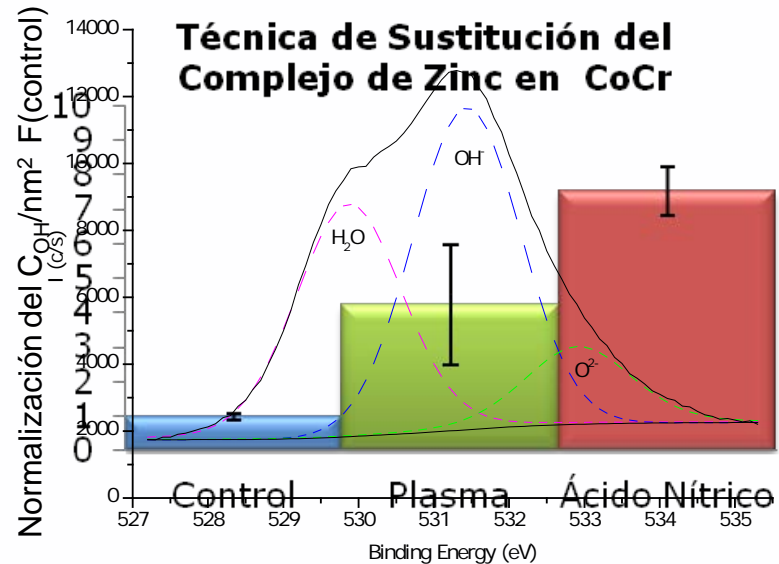
- PO produce una mayor cantidad de oxígeno
- AN introduce una mayor cantidad de grupos hidroxilos
- AN posee una mejor relación OH<sup>-</sup>/O<sup>2-</sup> y mayor C<sub>OH</sub>/nm<sup>2</sup>

## Caracterización Química

### XPS



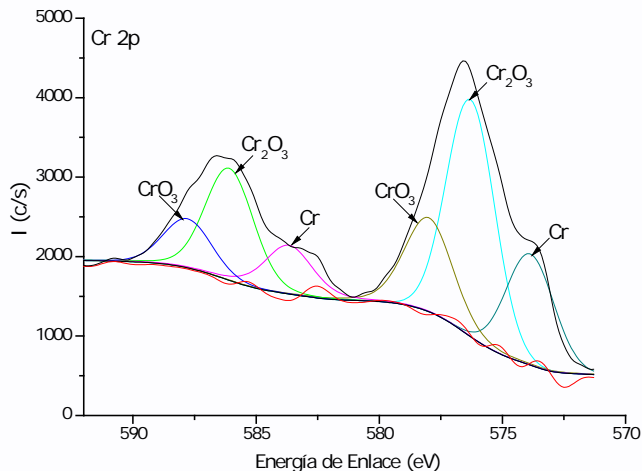
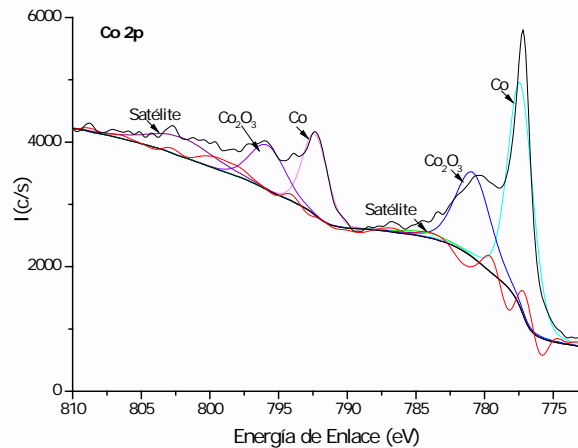
### TSC Zn



- Liberación de iones
- Resistencia a la corrosión

## Caracterización Química

### XPS



	CoCr	PO	AN
<b>Cr2p</b>	<b>4<sub>+0.0</sub></b>	<b>1<sub>+0.0</sub></b>	<b>6<sub>+0.2</sub></b>
Cr	0.4	0.1	0.6
Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	3.6	0.9	5.4
<b>Co2p</b>	<b>3<sub>+0.2</sub></b>	<b>16<sub>+0.2</sub></b>	<b>3<sub>+0.0</sub></b>
Co	1.7	0	1.3
Co <sub>2</sub> O <sub>3</sub> y Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	1.3	16	1.7
Cr <sub>x</sub> O <sub>y</sub> /Co <sub>x</sub> O <sub>y</sub>	<b>2.77</b>	<b>0.06</b>	<b>3.17</b>
Metal	30	0	21
Óxido	70	100	79

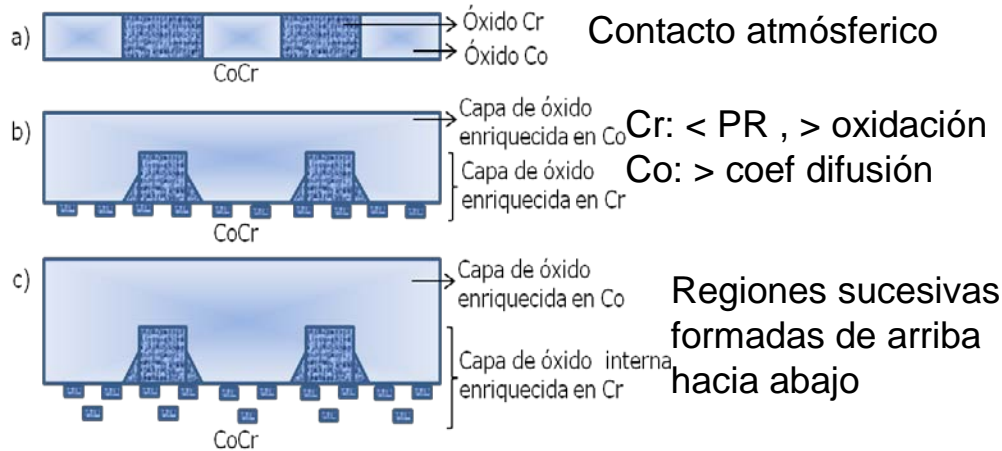
### Discusión

- El espesor de la capa de óxido aumenta mayoritariamente con PO.
- El PO óxida más fácilmente el Co.
- La relación de óxido varía para el caso del PO
- Con el AN se tiene una capa rica en Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Mantilnna et al (2004)

# Proceso de Oxidación

## Estudios anteriores



- Kitakami et al (1990): 315°C, 30 seg

- Fowler et al (1998); oxidación a 25°C disminuye el contenido de Cr al aplicar de 1200 L de O<sub>2</sub>

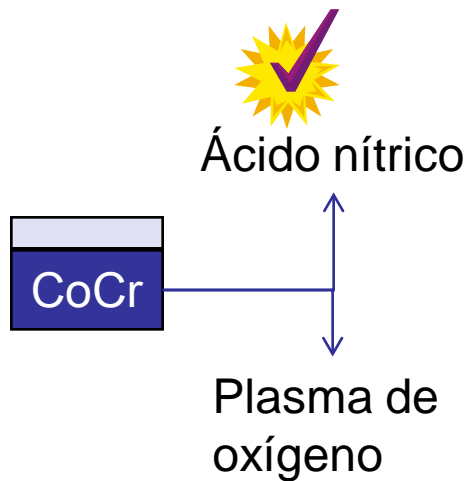
La estructura de óxido es consecuencia de la competencia entre la preferencia para Cr para oxidarse debido a su mayor potencial de oxidación y/o a la difusividad del Co.

## Potenciales Redox (PR)

$O_3 + 2H^+ + 2e \rightleftharpoons H_2O + O_2$	2,07 v
$Co^{3+} + e \rightleftharpoons Co^{2+}$	1,81 v
$Co_2O_3 + 6H^+ + 2e \rightleftharpoons 2Co^{2+} + 3H_2O$	1,75 v
$Cr_2O_7^{2-} + 14H^+ + 6e \rightleftharpoons 2Cr^{3+} + 7H_2O$	1,33 v
$O_2 + 4H^+ + 4e \rightleftharpoons 2H_2O$	1,23 v
$2NO_3^- + 10H^+ + 8e \rightleftharpoons N_2O + 5H_2O$	1,17 v
$NO_3^- + 4H^+ + 3e \rightleftharpoons NO + 2H_2O$	0,96 v
$HNO_3 + 2H^+ + 2e \rightleftharpoons HNO_2 + H_2O$	0,93 v
$HNO_2 + 7H^+ + 6e \rightleftharpoons NH_4^+ + 2H_2O$	0,86 v
$O_2 + 2H^+ + 2e \rightleftharpoons H_2O_2$	0,68 v
$Co^{2+} + 2e \rightleftharpoons Co$	-0,28 v
$Cr^{3+} + e \rightleftharpoons Cr^{2+}$	-0,41 v
$Cr^{2+} + 2e \rightleftharpoons Cr$	-0,74 v



# Resumen de la Etapa de Limpieza y Activación



## Limpieza

- El PO mostró mayor capacidad para la remoción del C1s.
- Ambos tratamientos son eficientes en términos de limpieza (C2+C3+C4/C1)

## Activación

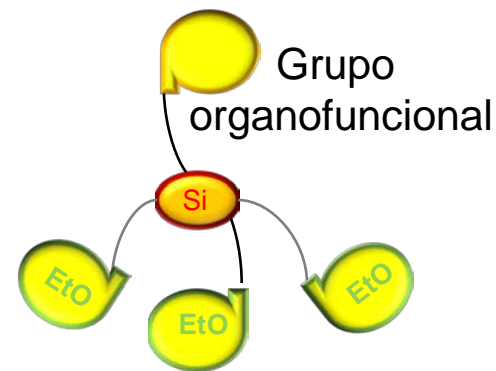
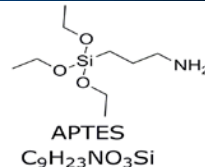
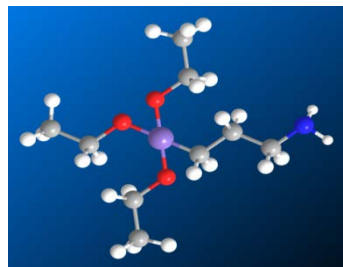
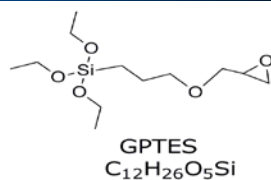
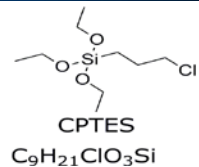
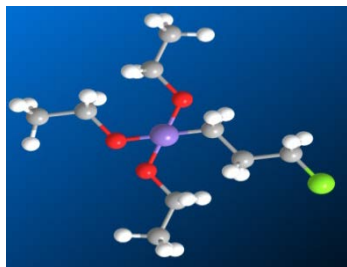
- El AN el que introduce una mayor cantidad de grupos hidroxilos en superficie, posee una mejor relación  $\text{OH}/\text{O}^2$  y el mayor valor de  $\text{C}_{\text{OH}}/\text{nm}^2$

## Capa de óxido

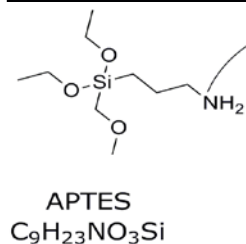
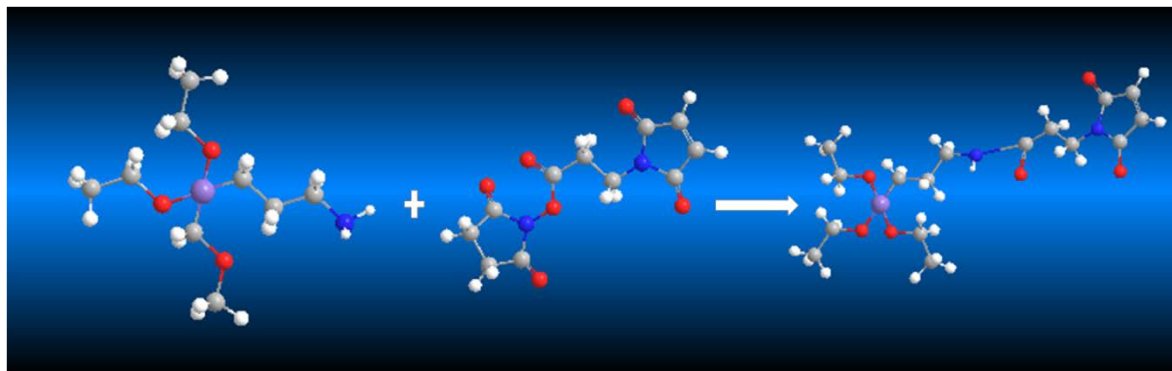
- El AN prácticamente no modifica la naturaleza de la capa de óxidos superficiales y la misma esta conformada mayoritariamente de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$



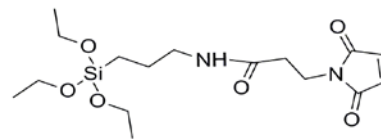
# Silanización: Organosilanos



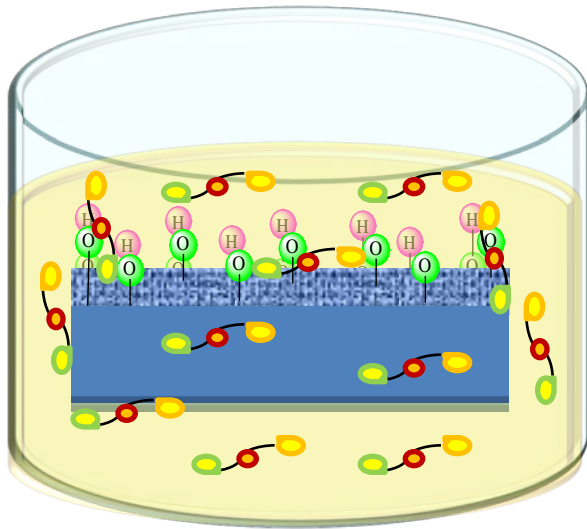
Grupo  
silicofuncional  
( $EtO=CH_3CH_2OH$ )



DMF



# Proceso de Silanización

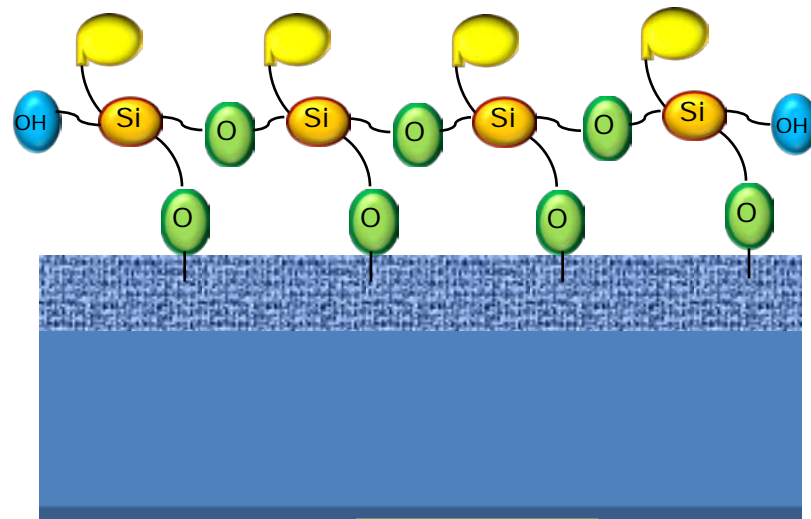


Metal-OH

base (B)

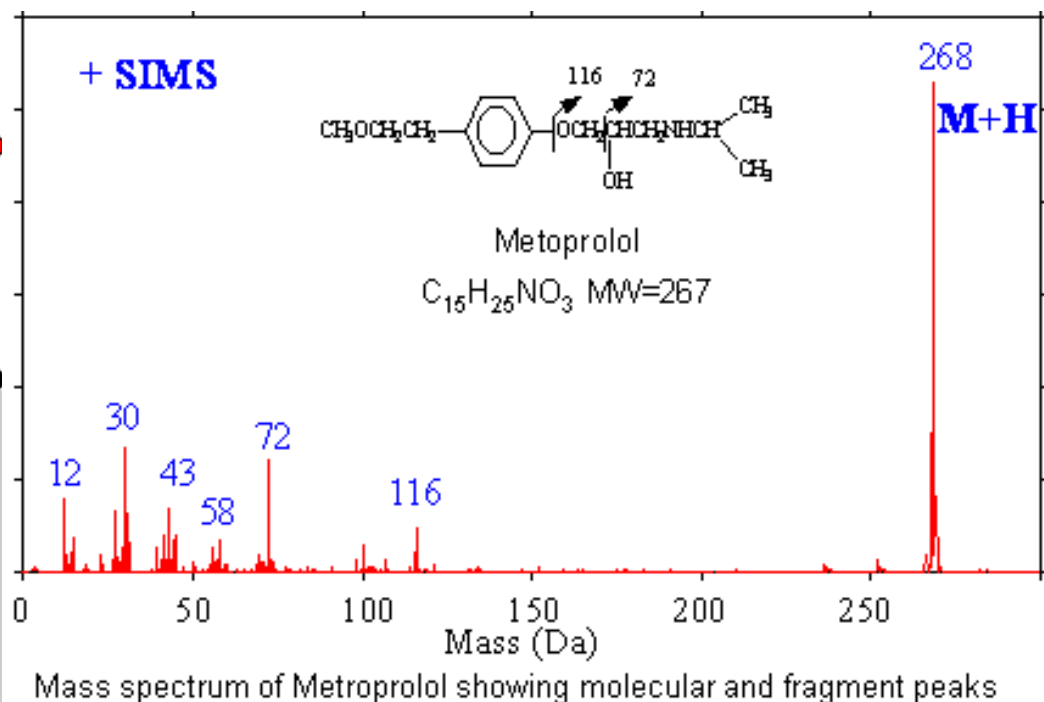
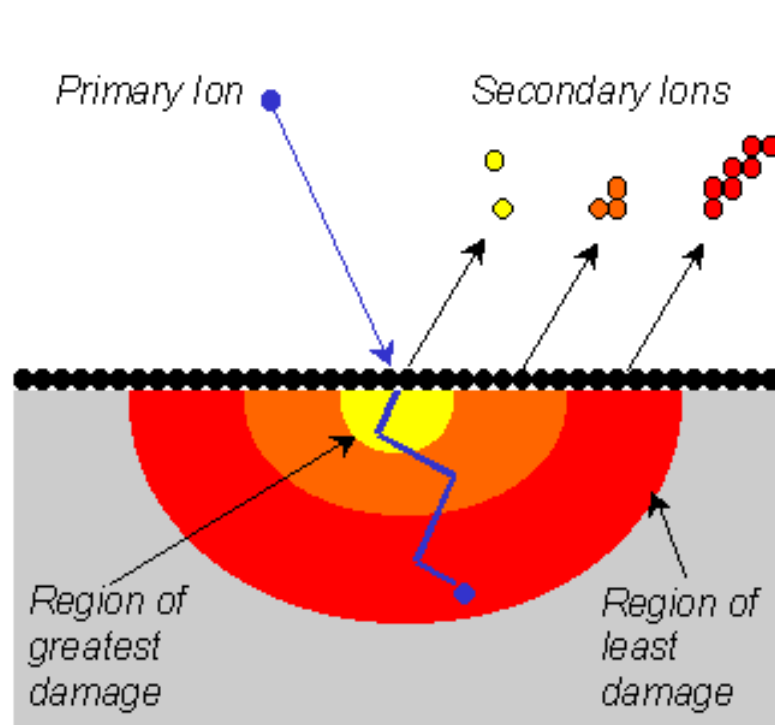
$BH^+ + Metal-O^-$

organosilano



Et + *Metal-O-Si*

# ToF-SIMS – Time of Flight-Secondary Ion Mass Spectroscopy



# Resultados: Silanización

## Caracterización Física

### ToF SIMS

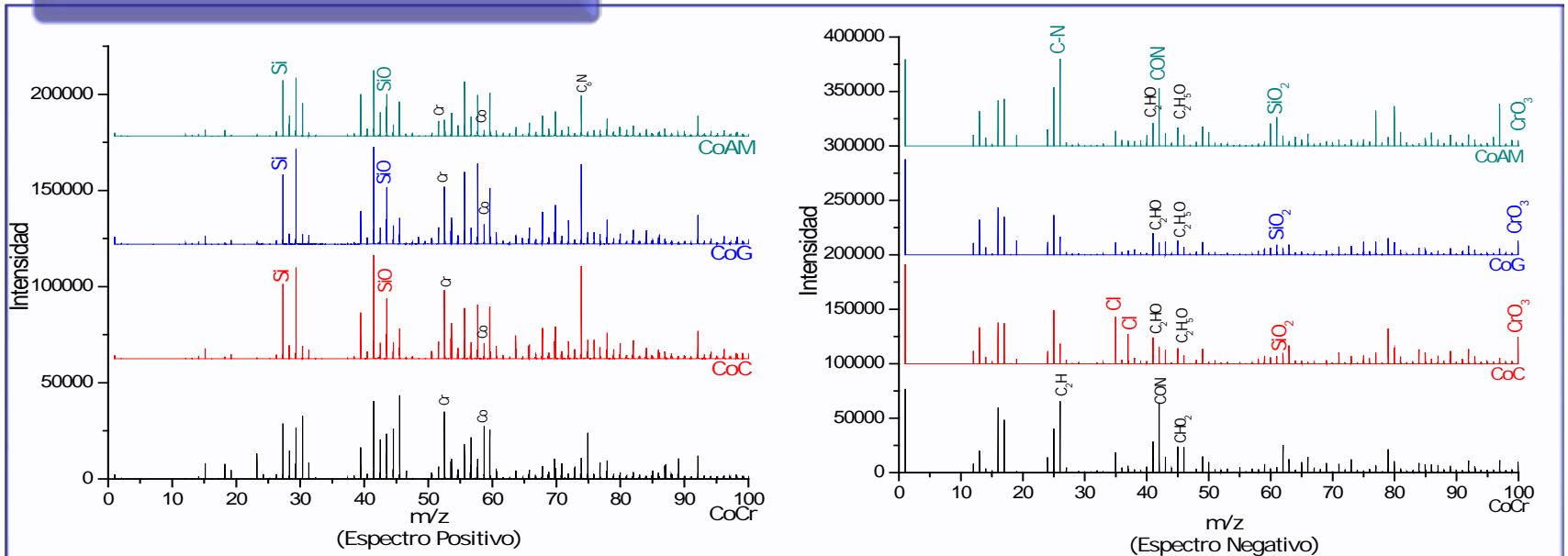
- En el espectro positivo:  $\text{Si}^+$  y  $\text{Si-O}^+$
- En el espectro negativo:  $\text{O-Si-O}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CN}^-$  y  $\text{CON}^-$
- **La identificación de fragmentos de organosilanos, confirma de la presencia de los mismos en la superficie.**

• El proceso de silanización originó una modificación superficial y la misma se realizó de manera homogénea sobre todas las superficies.

¿Se ha producido un enlace con la superficie?

## Caracterización Química

### ToF SIMS

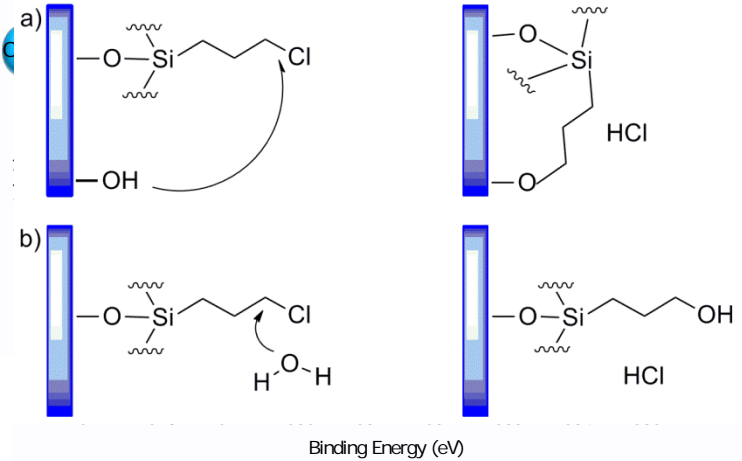


# Resultados: Silanización

## Caracterización Química

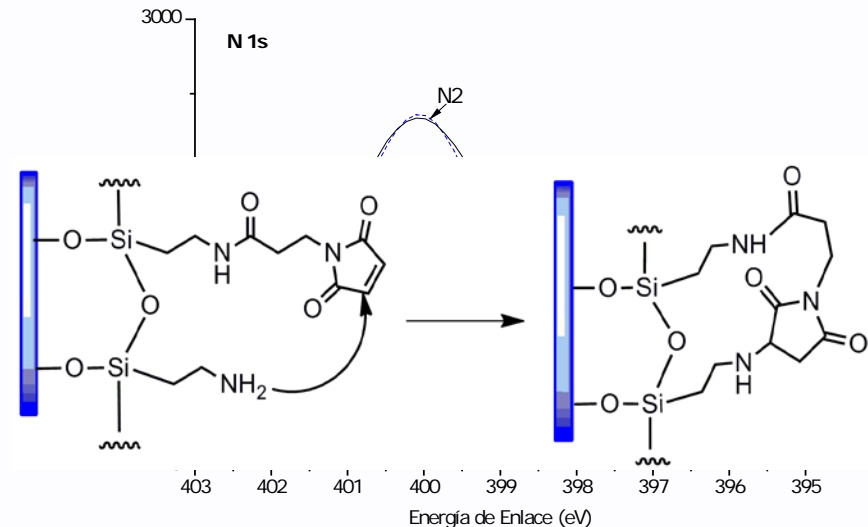
### XPS

PICOS	CoCr	AN	CPTES	GPES	AP+Ma
<b>N1s</b>	2±0.3	4±0.3	2±0.3	2±0.2	9±0.7
CrN, -C=NH	0.6	1.2	1.4	0.9	0.0
<b>O1s</b>	42±2.3	49±0.3	41±1.8	44±0.9	25±1.7
O <sup>2-</sup> , OH, Si-O-Metal	18	10	20	20	1
<b>O2</b>	19	35	15	16	7
H <sub>2</sub> O, -C-O, -C=O	8	4	6	8	18



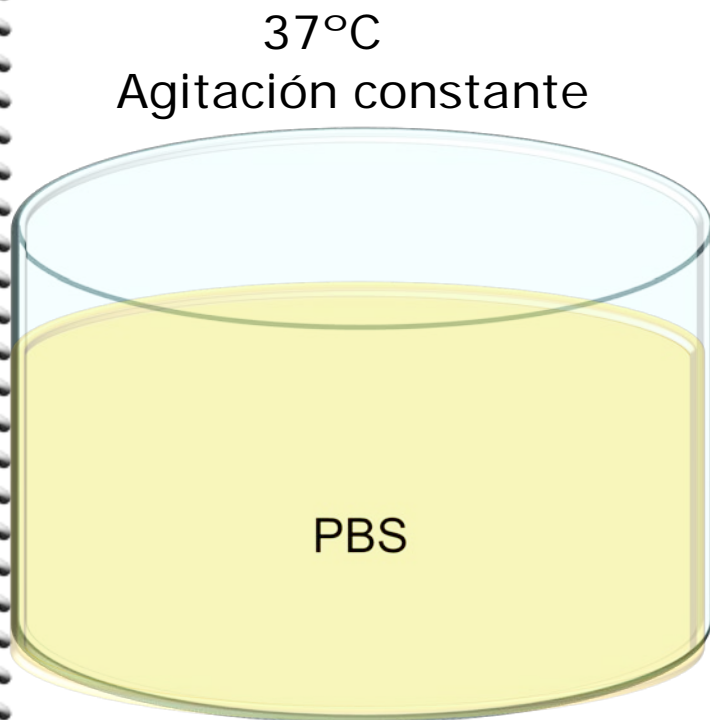
Energía de Enlace (eV)

PICOS	CoCr	AN	CPTES	GPES	AP+Ma
<b>C1s</b>	48±2.2	36±0.4	34±2.6	33±1.7	59±3.1
<b>N1s</b>	2±0.3	4±0.3	2±0.3	2±0.2	9±0.7
<b>O1s</b>	42±2.3	49±0.3	41±1.8	44±0.9	25±1.7
<b>Si2s</b>	0±0.0	0±0.0	3±0.3	2±0.1	7±0.5
<b>Cl2p</b>	0±0.0	0±0.0	2±0.1	0±0.0	0±0.0
<b>Cr2p</b>	4±0.0	6±0.2	12±0.8	14±0.6	0±0.0
<b>Co2p</b>	3±0.3	3±0.0	5±0.2	4±0.0	0±0.0
<b>Mo3d</b>	1±0.0	2±0.0	1±0.0	1±0.0	0±0.0

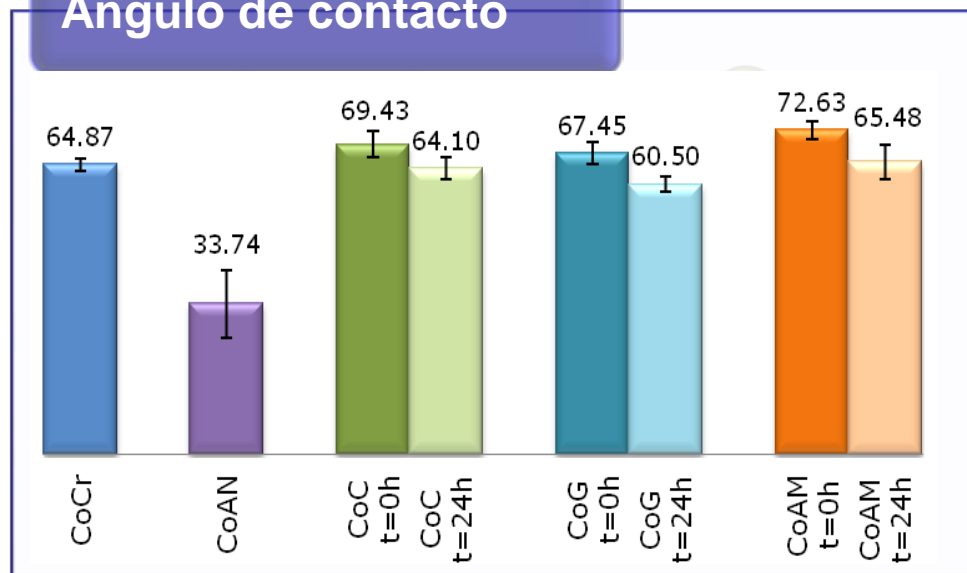


# Resultados: Estabilidad Térmica, Química y Mecánica de la Silanización

## Caracterización Física



### Ángulo de contacto



## Caracterización Química

### XPS

Muestras	C1s	N1s	O1s	Si2s	Cl2p
CPTES	42 $\pm$ 3.2	3 $\pm$ 0.4	49 $\pm$ 3.6	3 $\pm$ 0.4	2 $\pm$ 0.3
CPTES 24	48 $\pm$ 1.6	1 $\pm$ 0.1	48 $\pm$ 1.5	2 $\pm$ 0.1	1 $\pm$ 0.1
GPTES	41 $\pm$ 3.8	2 $\pm$ 0.3	55 $\pm$ 4.1	2 $\pm$ 0.3	-
GPTES 24	46 $\pm$ 1.2	2 $\pm$ 0.1	50 $\pm$ 2.3	2 $\pm$ 0.1	-
APTES Ma	59 $\pm$ 3.7	10 $\pm$ 0.6	24 $\pm$ 1.5	7 $\pm$ 0.5	-
APTES Ma 24	58 $\pm$ 3.1	8 $\pm$ 0.4	27 $\pm$ 1.4	7 $\pm$ 0.4	-

# Resumen de la Etapa de Silanización

## Caracterización Física

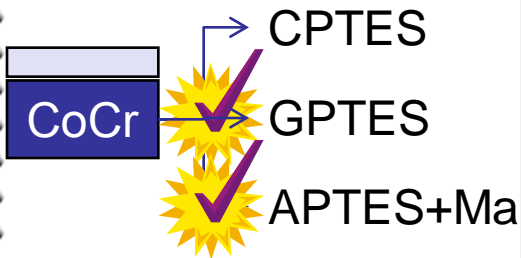
- La silanización origina una modificación en la mojabilidad superficial de manera homogénea sobre todas las superficies.

## Caracterización Química

- Para la ratio **O2/Si**, el **APTES+Ma** arrojó los mejores resultados.
- La ratio **N2/Si** fue  $<2$ , a causa de un proceso de polimerización.
- La efectividad de la silanización se ve afectada por la concentración de silano y al trabajar en un ambiente 100% anhídrido .

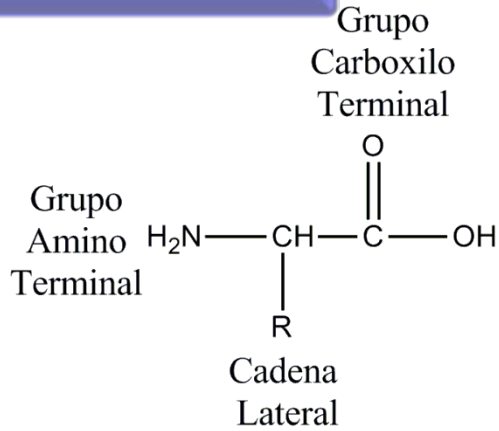
## Estabilidad de los Silanos

- La modificación de la mojabilidad superficial efectuada por la silanización, se mantiene.
- Los tres silanos se han enlazado en las superficie, en función de la estabilidad de los enlaces de O-Si-O, Si-O-metal. No obstante el menos estable fue CPTES

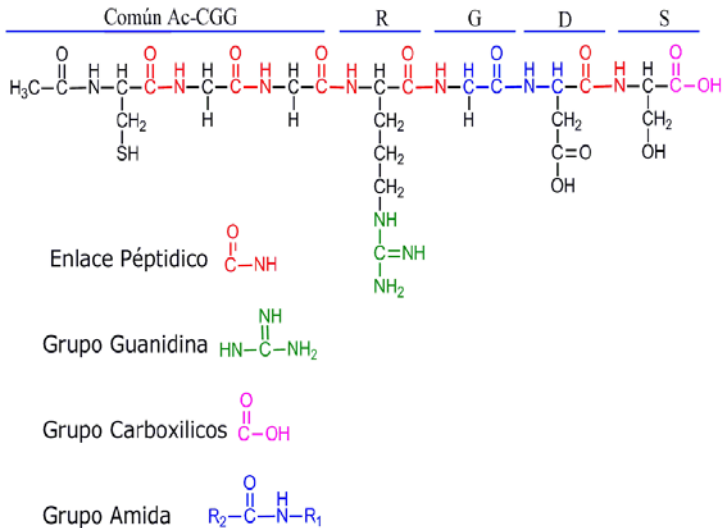


# Inmovilización de Biomoléculas: Péptidos

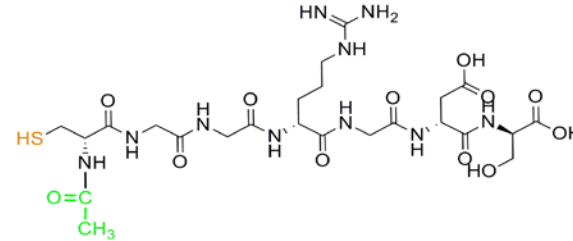
## Aminoácidos



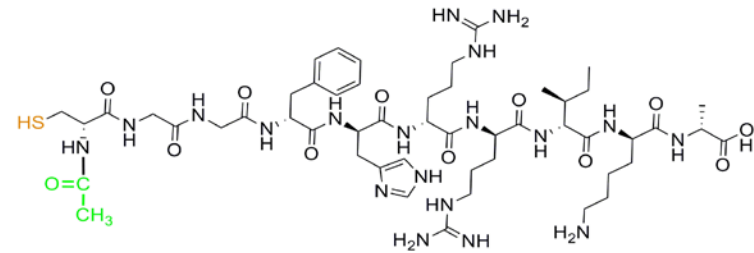
## Enlaces



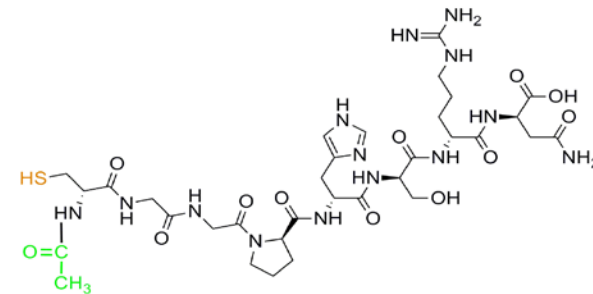
## Secuencias Peptídicas



**Ac-CGGRGDS**  
Fórmula Química  $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{N}_{10}\text{O}_{12}\text{S}$



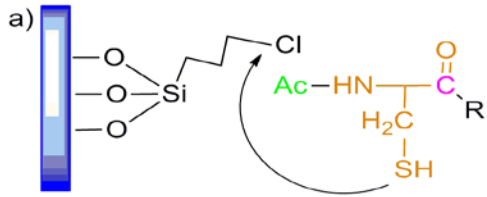
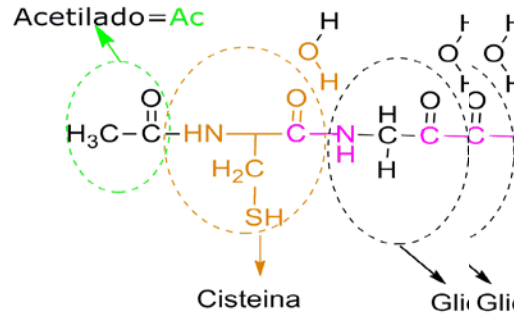
**Ac-CGGFHRRIKA**  
Fórmula Química  $\text{C}_{51}\text{H}_{83}\text{N}_{19}\text{O}_{12}\text{S}$



**Ac-CGGPHSRN**  
Fórmula Química  $\text{C}_{33}\text{H}_{52}\text{N}_{14}\text{O}_{12}\text{S}$



## Enlace péptido-silano



# Resultados: Inmovilización de Biomoléculas

## Condiciones de ensayo

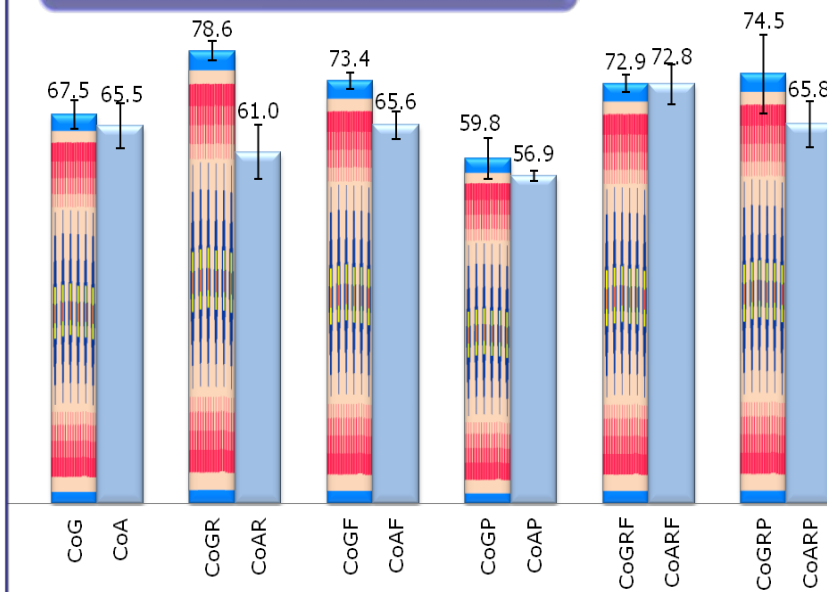
Muestra	pH	Tiempo
APTES+Ma	7	2h
GPTES	11	2h

→ PBS

→ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

## Caracterización Física

### Mojabilidad



- Se observa la modificación en la mojabilidad de las superficies con biomoléculas.

¿Se ha producido un enlace con la superficie?

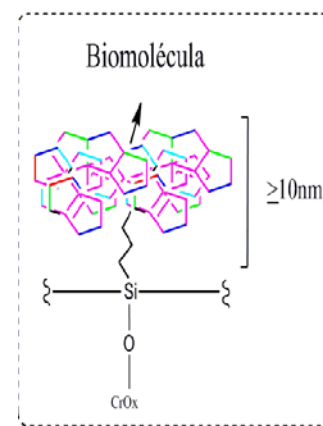
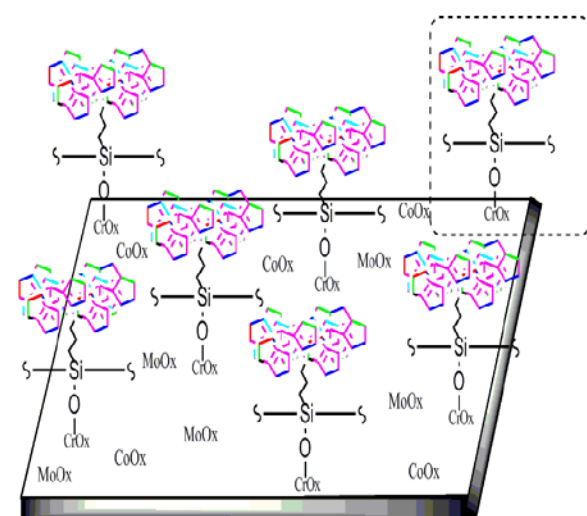
# Resultados: Inmovilización de Biomoléculas

## Caracterización Química

Picos	GPTES	G+R	G+F	G+P	G+RF	G+RP
<b>C1s</b>	33±1.7	38±1.1	42±2.7	33±1.0	39±1.9	47±3.1
<b>N1s</b>	2±0.2	3±0.4	8±0.7	3±0.1	7±0.6	5±0.3
<b>O1s</b>	44±0.9	43±1.8	37±1.4	46±2.7	39±1.5	37±2.1
<b>Si2s</b>	2±0.1	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0
<b>S2p</b>	0±0.0	1±0.1	1±0.1	1±0.3	1±0.2	3±0.4
<b>Cr2p</b>	14±0.6	0±0.0	1±0.1	0±0.0	1±0.0	0±0.0
<b>Co2p</b>	4±0.0	11±0.2	8±0.7	13±0.7	10±0.9	6±0.4
<b>Mo3d</b>	1±0.0	4±0.2	3±0.1	4±0.3	3±0.1	2±0.1

Picos	AP+Ma	AM+R	AM+F	AM+P	AM+RF	AM+RP
<b>C1s</b>	59±3.1	50±2.3	48±1.7	46±2.1	47±3.6	45±1.9
<b>N1s</b>	9±0.7	6±0.4	6±0.2	6±0.5	6±0.4	6±0.4
<b>O1s</b>	25±1.7	32±2.1	35±1.3	36±2.3	37±2.7	37±2.2
<b>Si2s</b>	7±0.5	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0
<b>S2p</b>	0±0.0	5±0.2	5±0.3	5±0.5	4±0.3	5±0.4
<b>Cr2p</b>	0±0.0	1±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0
<b>Co2p</b>	0±0.0	4±0.2	4±0.1	5±0.3	5±0.3	5±0.4
<b>Mo3d</b>	0±0.0	2±0.1	2±0.2	2±0.1	1±0.2	2±0.2

## Óxido de Cr



Matinlinna et al (2004); el  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  es el principal responsable del enlace Cr-O-Si

# Resultados: Inmovilización de Biomoléculas con GPTES

## Caracterización Química

Picos			GPTES	G+R	G+F	G+P	G+RF	G+RP
<b>C1s</b>			<b>33±1.7</b>	<b>38±1.1</b>	<b>42±2.7</b>	<b>33±1.0</b>	<b>39±1.9</b>	<b>47±3.1</b>
	C1	C=C, C-H	20.3	25.5	22.7	20.1	21.4	27.7
	C2	C=O, C-OH,	7.0	7.2	<b>10.5</b>	6,9	<b>9.0</b>	<b>10.3</b>
	C3	CH <sub>2</sub> O, C-S	2.4	2.3	3.8	2.0	3.5	3.4
	C4	Dipéptido	3.3	3.0	<b>5.0</b>	<b>4.0</b>	<b>5.1</b>	<b>5.6</b>
		COOH, C-N, C=O						
		Guanidina						
<b>N1s</b>			<b>2±0.2</b>	<b>3±0.4</b>	<b>8±0.7</b>	<b>3±0.1</b>	<b>7±0.6</b>	<b>5±0.3</b>
	N1	C=NH, C-N	0.9	0.8	0.5	1.0	0.6	<b>1.5</b>
	N2	Guanidina Amida	1.1	<b>2.2</b>	<b>7.5</b>	<b>2.0</b>	<b>6.4</b>	<b>3.5</b>
<b>O1s</b>			<b>44±0.9</b>	<b>43±1.8</b>	<b>37±1.4</b>	<b>46±2.7</b>	<b>39±1.5</b>	<b>37±2.1</b>
	O1	O <sup>2-</sup> , CoO, MoO <sub>3</sub> ,	20.0	16.3	14.4	20.2	15.4	14.0
		CrO <sub>3</sub> , Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>						
	O2	OH, COOH	15.9	17.6	16.8	18.4	16.8	15.2
		Dipéptido						
	O3	C=O, -C-O	8.1	9.1	5.8	7.4	6.8	7.8
		SO <sub>4</sub>						

**C4 y O2** Enlace Péptidico  $\text{C}=\text{O}-\text{NH}$

**C4 y N2** Grupo Guanidina  $\text{HN}-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}_2$

**C4 y O2** Grupo Carboxílicos  $\text{C}=\text{O}-\text{OH}$

**N2** Grupo Amida  $\text{R}_2-\text{C}(\text{O})-\text{N}-\text{R}_1$

# Resultados: Inmovilización de Biomoléculas con APTES+Ma

Picos			AP+Ma	AM+R	AM+F	AM+P	AM+RF	AM+RP
<b>C1s</b>			<b>59±3.1</b>	<b>50±2.3</b>	<b>48±1.7</b>	<b>46±2.1</b>	<b>47±3.6</b>	<b>45±1.9</b>
	C1	C=C, C-H	30.4	310	28.8	25.8	27.3	25.2
	C2	C=O, C-OH,	19.5	13.0	13.0	13.8	14.1	14.4
	C3	CH <sub>2</sub> O, C-S	4.9	4.0	4.3	4.1	3.8	3.6
		Grupo Imida						
	C4	Dipéptido	4.2	2.0	1.9	2.3	1.8	1.8
		COOH, C-N, C=O						
		Guanidina						
<b>N1s</b>			<b>9±0.7</b>	<b>6±0.4</b>	<b>6±0.2</b>	<b>6±0.5</b>	<b>6±0.4</b>	<b>6±0.4</b>
	N1	C=NH, C-N	0.0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
	N2	N-H	9.0	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8
		Guanidina Amida						
<b>O1s</b>			<b>25±1.7</b>	<b>32±2.1</b>	<b>35±1.3</b>	<b>36±2.3</b>	<b>37±2.7</b>	<b>37±2.2</b>
	O1	O <sup>2-</sup> , CoO, MoO <sub>3</sub> ,	1.5	7.7	6.5	9.0	10.0	10.0
		CrO <sub>3</sub> , Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>						
	O2	OH, COOH	7.0	9.6	10.9	10.0	11.8	10.0
		Grupo Imida						
		Dipéptido						
	O3	C=O, -C-O	16.5	13.7	18.6	16.0	15.2	17.0
		SO <sub>4</sub>						

**C4 y O2** Enlace Péptidico  $\text{C}^{\text{O}}-\text{NH}$

**C4 y N2** Grupo Guanidina  $\text{HN}-\text{C}^{\text{NH}}-\text{NH}_2$

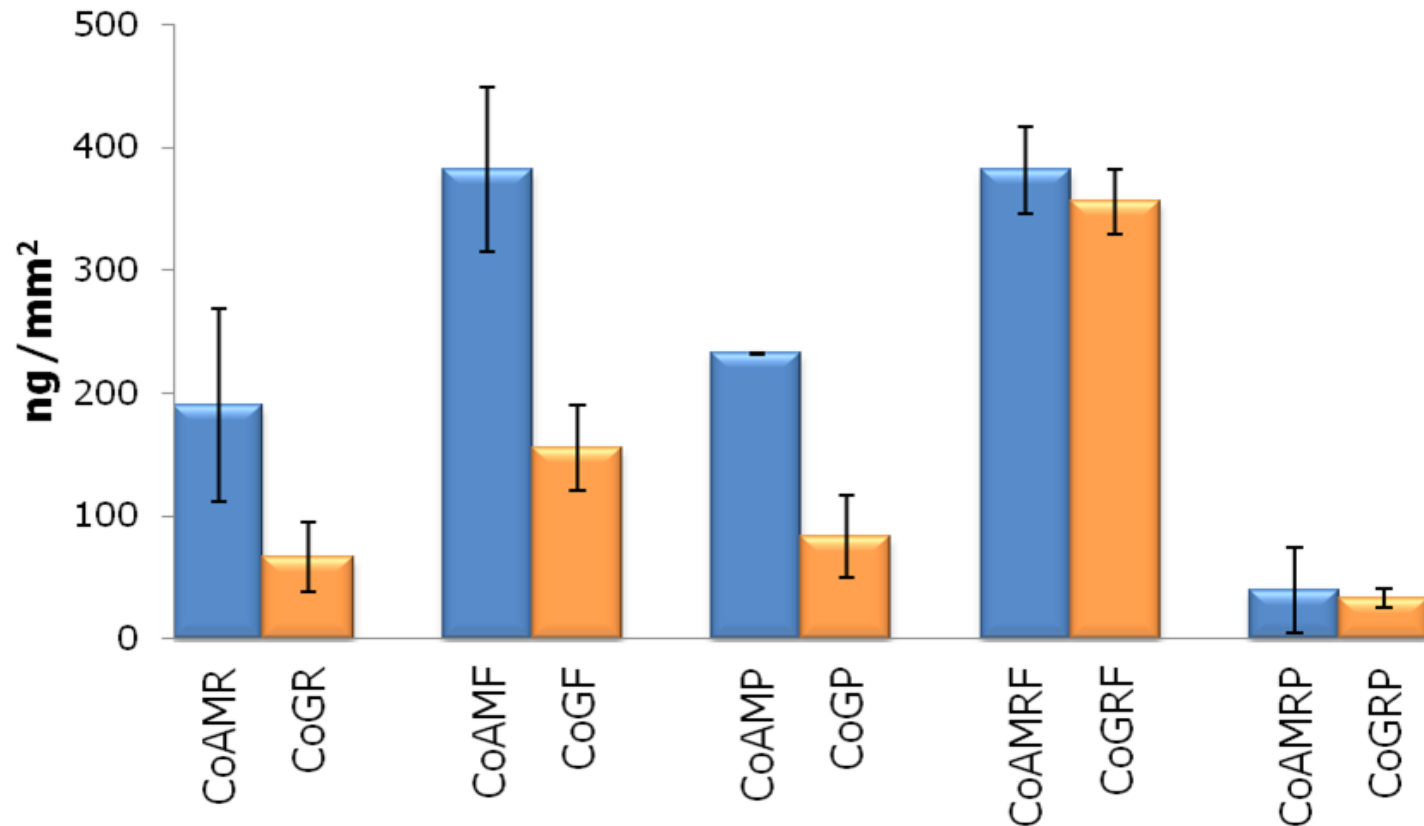
**C4 y O2** Grupo Carboxílicos  $\text{C}^{\text{O}}-\text{OH}$

**N2** Grupo Amida  $\text{R}_2-\text{C}^{\text{O}}-\text{N}-\text{R}_1$

# Resultados: Concentración de Péptido Adherido

Espectrofotometría UV-Visible

## Adhesión de Péptido sobre CoCr



A mayor concentración de silano, mayor adhesión de biomoléculas

# Resumen de la Inmovilización de Biomoléculas

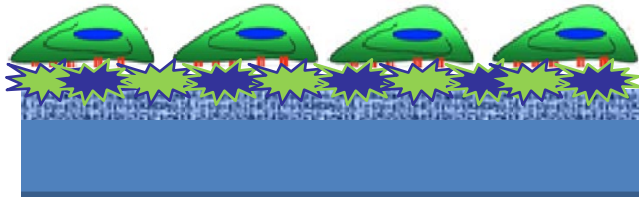
---

## Secuencias Peptídicas

- Fue adecuada la selección de la Cys , para la identificación de las secuencias peptídicas.
  - Las secuencias peptídicas se encuentran sobre las superficies de CoAM y de CoG.
  - En términos de densidad de péptido los mejores resultados se obtuvieron con APTES+Ma.
-

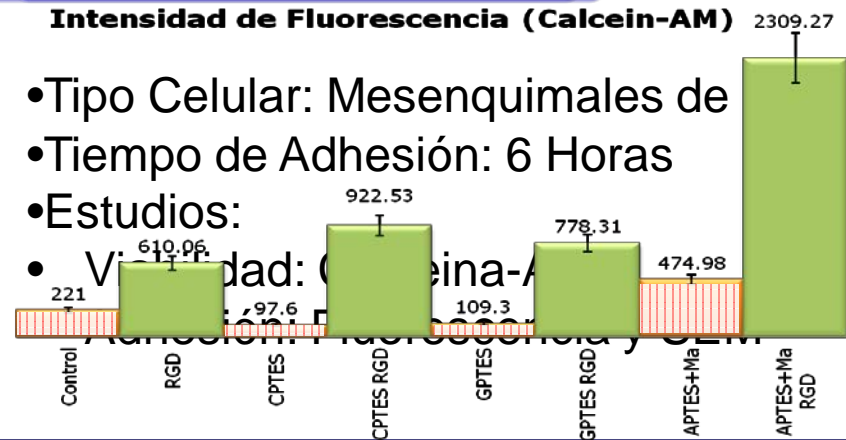
# Respuesta Celular In Vitro

## Viabilidad de Ensayo

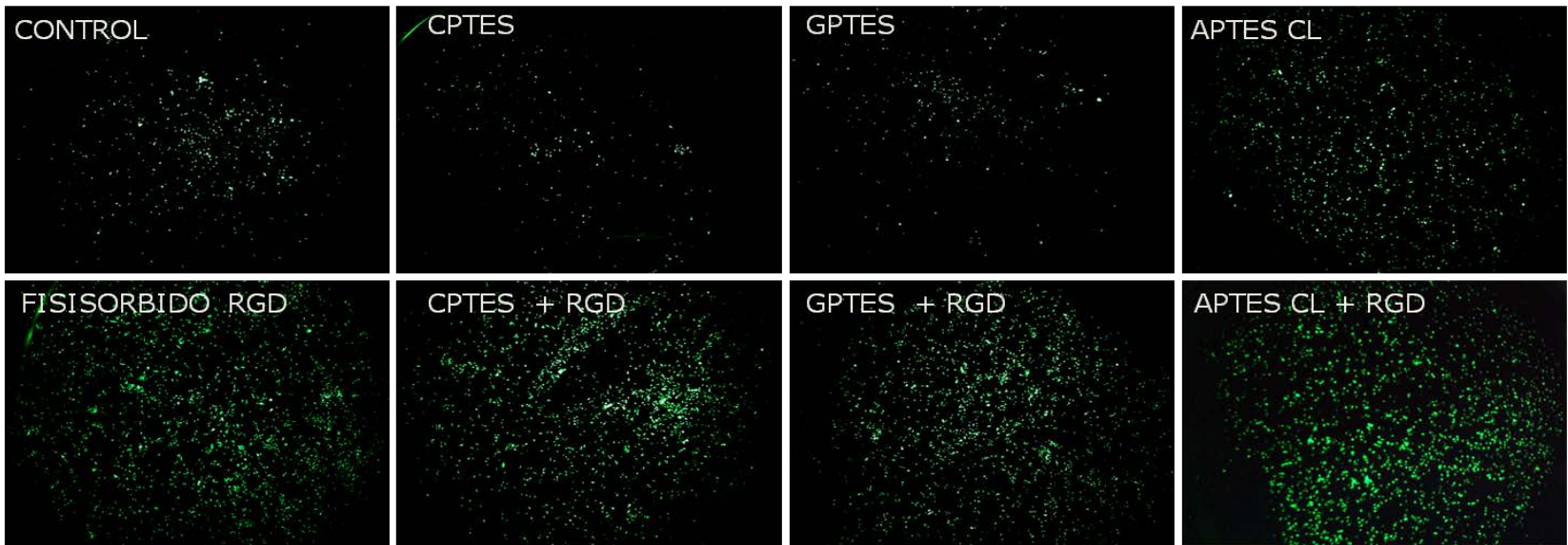


### Intensidad de Fluorescencia (Calcein-AM)

- Tipo Celular: Mesenquimales de
- Tiempo de Adhesión: 6 Horas
- Estudios:
- Viabilidad: Calceina-AM



## Viabilidad

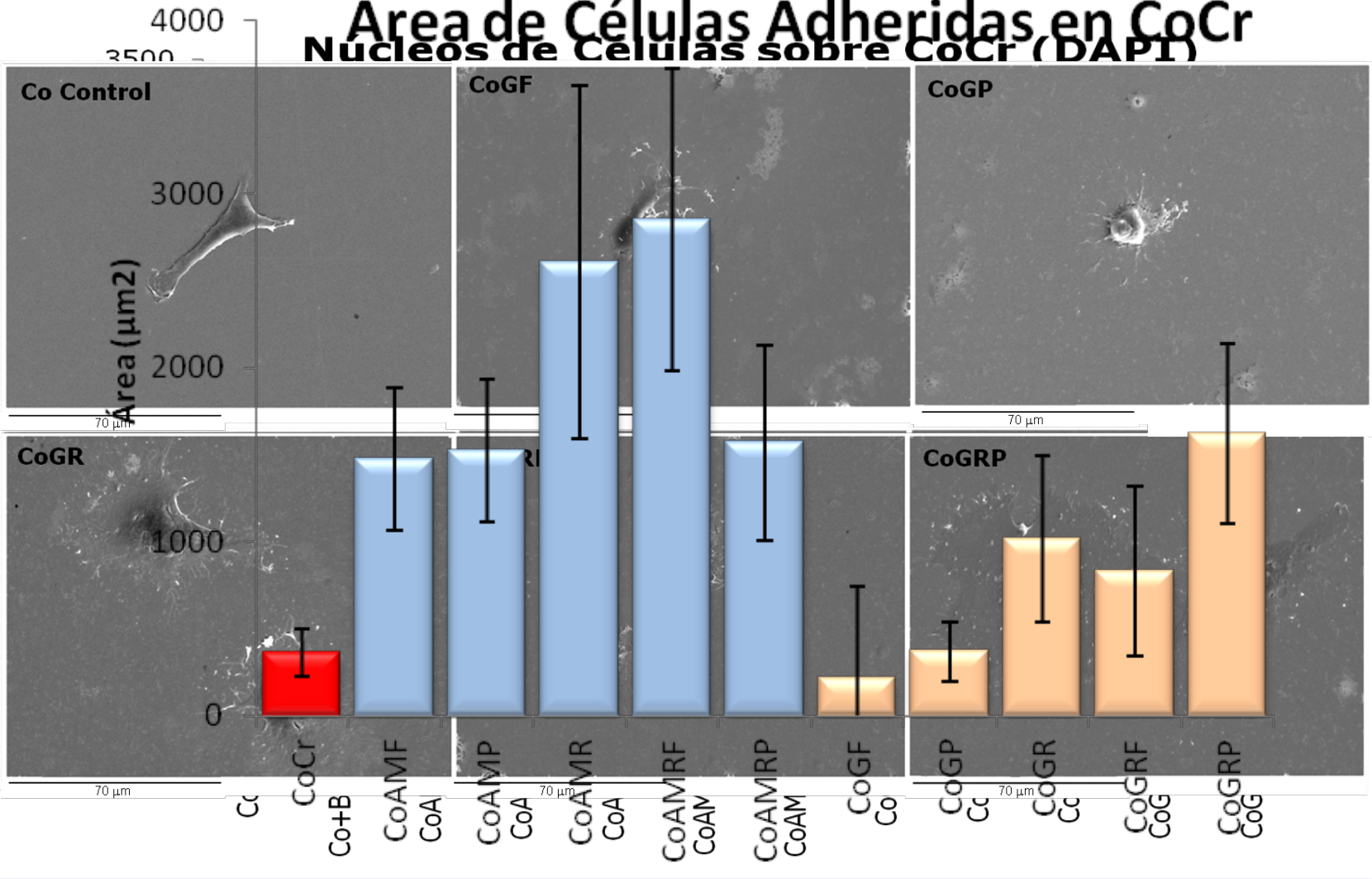




# Respuesta Celular In Vitro

## Adhesión Celular

### Área de Células Adheridas en CoCr Núcleos de Células sobre CoCr (DAPI)



# Resumen de la Respuesta Celular In Vitro

---

## Viabilidad y Adhesión

- Las superficies biofuncionalizadas pueden ser consideradas no citotóxicas o biocompatibles.
  - Las muestras que contienen RGD, solo o en mezclas, son las que presentan mejores resultados (densidad de células, morfología y área).
  - La concentración de biomolécula adsorbida sobre la superficie es una variable dependiente del proceso de adhesión celular; a mayor cantidad de péptido, mejor respuesta celular.
  - Se proponen como trabajos futuros, estudios de proliferación y diferenciación celular.
- 
-

# Conclusiones Generales: Aleación de CoCr

---

## Limpieza y Activación

- El tratamiento con ácido nítrico ha resultado ser más eficiente que el PO en términos de cantidad de grupos  $\text{OH}^-$  y de la ratio  $\text{OH}^-/\text{O}^{2-}$

## Silanización

- Los silanos se enlazaron mayoritariamente al  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ .
- El APTES+Ma, presentó los mejores resultados en términos de la estabilidad química, térmica y mecánica.

## Inmovilización de Biomoléculas

- El APTES+Ma como posee mayor densidad de silano, consigue una mayor adhesión de secuencias peptídicas.

## Respuesta Celular

- Las muestras de APTES+Ma que contienen RGD, solo o en mezclas, son las que presentan mejores resultados, deduciendo que a mayor cantidad de péptido, mejor respuesta celular.
-

# Conclusiones Generales: Aleación de TiHfNb

---

## Limpieza y Activación

- El tratamiento con PO ha resultado ser mas eficiente que el PI en términos de cantidad de grupos OH<sup>-</sup> y de la ratio OH<sup>-</sup>/O<sup>2-</sup>.

## Silanización

- El APTES+Ma, presentó los mejores resultados en términos de la estabilidad química, térmica y mecánica.

## Inmovilización de Biomoléculas

- El APTES+Ma al contener mayor densidad de silano, consigue una mayor adhesión de secuencias peptídicas.

## Respuesta Celular

- Las muestras con APTES+Ma que contienen RGD, solo o en mezclas, son las que presentan mejores resultados, corroborando que a mayor cantidad de péptido, mejor respuesta celular
-

# Conclusiones Generales

---

## Limpieza y Activación

- La selección del mejor tratamiento ha de hacerse en términos de cantidad de grupos  $\text{OH}^-$  y de la ratio  $\text{OH}^-/\text{O}^{2-}$  y dependerá de la composición química de la superficie.

## Silanización

- La detección del Si, y el estudio de la estabilidad química, térmica y mecánica, son parámetros óptimos para la selección del mejor organosilano.

## Inmovilización de Biomoléculas

- A mayor densidad de silano enlazado se consigue una mayor adhesión de secuencias peptídicas.

## Respuesta Celular

- A mayor cantidad de péptido, mejor respuesta de adhesión celular
-

# Málaga

CIUDAD







*Departamento de Química Inorgánica  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Málaga  
castellon@uma.es*

**Muchas gracias**