Tesis doctoral

Funcionalización superficial de polímeros por PECVD para uso biomédico

Antonia Terriza Fernández

Instituto de Ciencia de Materiales de Sevilla (U. de Sevilla-CSIC)

Octubre de 2013

Funcionalización superficial de polímeros por PECVD para uso biomédico

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Química,

desarrollado en el grupo de Nanotecnología de Superficies del Instituto de Ciencia de Materiales de Sevilla (U. de Sevilla-CSIC)

Sevilla, Octubre de 2013

Antonia Terriza Fernández

Directores:

Dr. Agustín Rodríguez González-Elipe
Profesor de Investigación del CSIC

Dr. Francisco Yubero Valencia
Investigador Científico del CSIC

Tutor:

Dr. Alfonso Caballero Martínez

“Para las personas creyentes, Dios esta al principio.

Para los científicos está al final de todas sus reflexiones”

Max Planck.

A mis padres y hermanos

A José Manuel

"Más importante que encontrar el camino es

tener en quien pensar mientras se busca"

Francisco Céspedes.

Índice.

Índice de Figuras.....1
Índice de Tablas.....7

Capítulo I. Inroducción general 11
1. Funcionalización superficial de materiales.....12
2. Polímeros en biomedicina.....13
3. Funcionalización superficial de polímeros 14
3.1. Técnicas de plasma para la funcionalización superficial de polímeros.....15
3.2. Funcionalización superficial para el control de la mojabilidad de materiales poliméricos.....17
4. Aplicaciones biomédicas de polímeros funcionalizados por técnicas de plasma 18
4.1. Funcionalización superficial y adherencia bacteriana 18
4.2. Funcionalización superficial y regeneración ósea 19
5. Objetivos generales de esta tesis.....20
6. Esquema de trabajo.....22
7. Referencias 23

Bloque 1. Funcionalización superficial de polímeros con recubrimientos fluorocarbonados 29

Capítulo II. Influencia de las condiciones de plasma en las propiedades de películas fluorocarbonadas.....31
1. Introducción 32
1.1. Recubrimientos de carbono y de carbono-flúor 32
1.2. Análisis de plasmas que contienen flúor 33
2. Objetivos de este capítulo 35
3. Procedimiento experimental 36

3.1. Preparación y caracterización de películas fluorocarbonadas 37
3.2. Caracterización del plasma 40
4. Resultados y discusión 41
4.1. Velocidad de deposición y química de las películas fluorocarbonadas en función del potencial autoinducido 41
4.2. Estructura de enlace de los diferentes recubrimientos: influencia del potencial de autopolarización 46
4.3. Análisis del plasma 50
4.3.1. Caracterización de plasmas de *c*-C_4F_8 para la deposición a 200 V 50
4.3.2. Efecto del potencial autoinducido en las propiedades del plasma 55
4.3.3. Caracterización de la descarga de plasma en función del precursor de flúor empleado: CF_4 frente a *c*-C_4F_8 57
5. Resumen y conclusiones 59
6. Referencias 60

Capítulo III. Propiedades de mojado de materiales fluorocarbonados 67
1. Introducción 68
1.1. Mojabilidad superficial 68
1.2. Modelado de la mojabilidad superficial 73
1.3. Rugosidad superficial 77
2. Objetivos de este capítulo 80
3. Procedimiento experimental y resultados 82
Parte A. Preparación de sustratos con rugosidad superficial controlada 82
A.1. Procedimiento experimental 83
A.2. Resultados y discusión 84
A.2.1. Tratamientos de desbastado químico con un plasma de O_2: influencia del tiempo de tratamiento 84
A.2.2. Tratamientos de desbastado químico por plasma: influencia del tipo de descarga 89
Parte B: Funcionalización superficial con recubrimientos de fluorocarbono 90

B.1. Procedimiento experimental 90
B.1.1. Preparación de láminas delgadas fluorocarbonadas 90
B.1.2. Caracterización de los recubrimientos obtenidos 92
B.2. Resultados y discusión 93
Parte C: Mojado de las superficies fluorocarbonadas 96
C.1. Procedimiento experimental 96
C.2. Resultados y discusión 97
C.2.1. Mojabilidad de recubrimientos fluorocarbonados de baja rugosidad (RMS < 1 nm): efecto de la química superficial 97
C.2.2. Mojabilidad de los recubrimientos fluorocarbonados rugosos (RMS > 10 nm): efecto de la rugosidad superficial 99
C.2.3. Interpretación de los resultados: modelos de mojado 101
C.2.3.1. Descripción del mojado de superficies fluorocarbonadas de acuerdo con el modelo de Wenzel 102
C.2.3.2. Aplicación del modelo de Cassie-Baxter 108
4. Resumen y conclusiones 110
5. Referencias 111

Bloque 2. Funcionalización superficial de polímeros para su uso en implantes 119

Capítulo IV. Recubrimientos antibacterianos para implantes de cadera 121
1. Introducción 122
1.1. Uso de UHMWPE en prótesis de cadera 122
1.2. Problemas de las prótesis de cadera 123
1.3. Funcionalización superficial y adherencia bacteriana 126
1.3.1. Química superficial 128
1.3.2. Rugosidad 128
1.3.3. Propiedades de mojado 128
2. Objetivos de este capítulo 129

3. Procedimiento experimental 130
3.1. Recubrimientos fluorocarbonados: preparación, química, rugosidad y propiedades de mojado 131
3.2. Estudio de adherencia bacteriana 131
3.2.1. Cepas bacterianas 132
3.2.2. Procedimiento de siembra 133
3.2.3. Determinación de la adherencia bacteriana 133
3.2.4. Análisis estadístico de los resultados 134
4. Resultados y discusión 134
4.1. Recubrimientos fluorocarbonados: caracterización de la química y la rugosidad superficial de las muestras 135
4.2. Ángulos de contacto y tensión superficial de las superficies estudiadas 137
4.3. Adherencia bacteriana sobre UHMWPE y los recubrimientos preparados 138
5. Resumen y conclusiones 145
6. Referencias 146

Bloque 3. Preparación de membranas polimérico-inorgánicas para regeneración ósea 153

Capítulo V. Adhesión de osteoblastos sobre membranas no reabsorbibles funcionalizadas con dióxido de titanio 155
1. Introducción. 156
1.1. Crecimiento y desarrollo de osteoblastos *in vitro*. 159
1.2. Uso del titanio en biomedicina. 161
1.3. Efecto de la luz ultravioleta en las propiedades superficiales del dióxido de titanio. 162
2. Objetivos de este capítulo. 164
3. Materiales y métodos. 165
3.1. Deposición de láminas delgadas de TiO_2. 165
3.2. Caracterización de las muestras de PET y TiO_2/PET. 169

3.3. Estudio de adhesión de osteoblastos. 170
3.3.1. Siembra de células. 171
3.3.2. Desarrollo celular. 171
3.3.3. Análisis estadístico. 172
4. Resultados y discusión. 173
4.1. Composición química y topografía superficial de las muestras de PET y TiO_2/PET. 173
4.2. Mojabilidad y fotoactividad de muestras iluminadas con luz UV. 176
4.3. Crecimiento de osteoblastos sobre muestras de PET y TiO_2/PET irradiadas con luz UV. 179
4.4. Análisis estadístico de los resultados. 186
5. Resumen y conclusiones. 189
6. Referencias. 190

Capítulo VI. Adhesión de osteoblastos sobre membranas reabsorbibles funcionalizadas con dióxido de silicio 199
1. Introducción. 200
1.1. Uso del ácido poli (láctico-*co*-glicólico) en biomedicina. 200
1.2. Uso del dióxido de silicio en biomedicina. 202
2. Objetivos de este capítulo. 203
3. Materiales y métodos. 204
3.1. Preparación de membranas de PLGA y deposición de láminas delgadas de SiO_2. 204
3.2. Caracterización de las muestras de PLGA y SiO_2/PLGA. 207
3.3. Estudio de adhesión de osteoblastos. 208
3.3.1. Siembra de células. 208
3.3.2. Desarrollo celular. 208
3.3.3. Análisis estadístico. 209
4. Resultados y discusión. 210
4.1. Caracterización superficial y degradabiliad de las muestras. 210

4.2. Evaluación del crecimiento de osteoblastos sobres las superficies estudiadas. 214
4.3. Análisis estadístico de los resultados. 219
5. Resumen y conclusiones. 224
6. Referencias 226

Capítulo VII. Conclusiones generales 233
1. Fabricación y propiedades de películas delgadas fluorocarbonadas preparadas mediante PECVD. 234
2. Recubrimientos fluorocarbonados antibacterianos para implantes de cadera. 236
3. Adhesión de osteoblastos sobre membranas polimérico-inorgánicas. 236
4. Publicaciones relacionadas con esta tésis. 237
5. Otras publicaciones. 238
6. Artículos pendientes de publicación. 239

Anexo I. Técnicas de caracterización 241
1. Técnicas de caracterización química. 242
2. Técnicas de caracterización de plasma. 243
3. Técnicas de caracterización del espesor de las capas. 244
4. Otras técnicas de análisis superficial. 244
5. Técnicas biomédicas. 246
6. Referencias 247

Índice de Figuras.

Figura I.1. Esquema de trabajo de la tesis 23

Figura II.1. Esquema (a) y fotografía (b) del reactor de plasma de placas paralelas usado para la deposición de películas delgadas fluorocarbonadas..... 38

Figura II.2. Espectro de fotoemisión para cada uno de los recubrimientos estudiados preparados con un potencial autoinducido de a) 200 V y b) 100 V 42

Figura II.3. Señal de fotoemisión correspondiente a C 1s de las películas delgadas de a) DLC, b) DLC-F y c) CF_X preparadas a un potencial autoinducido de 200 V (izquierda) y 100 V (derecha) descompuesta en sus componentes. Entre paréntesis se muestran los porcentajes de cada componente 45

Figura II.4. Espectros de Raman e láminas delgadas de DLC, DLC-F y CF_X preparadas a un potencial autoinducido de a) 200 V y b) 100 V..... 47

Figura II.5. Espectros de FT-IR de láminas delgadas de DLC, DLC-F y CF_X preparadas a un potencial autoinducido de a) a 200 V y b) a 100 V..... 49

Figura II.6. Análisis de la descarga de plasma durante la deposición de CF_X a 200 V: a) curva I-V y su b) primera derivada y c) segunda derivada. d) Función de distribución de la energía de los electrones 52

Figura II.7. Espectros de emisión óptica correspondientes a láminas delgadas de DLC, DLC-F y CF_X preparadas a un potencial autoinducido de 200 V..... 53

Figura II.8. Espectros de masas de las especies a) neutras y b) iónicas detectadas en el plasma durante la preparación de recubrimientos de DLC, DLC-F y CF_X a un potencial autoinducido de 200 V 54

Figura II.9. Espectros de masas de las especies a) neutras y b) iónicas detectadas en el plasma durante la preparación de recubrimientos de DLC-F a diferentes potenciales de autopolarización..... 57

Figura II.10. Espectros de masas de las especies a) neutras y b) iónicas detectadas en el plasma durante la preparación de recubrimientos de DLC-F a un potencial de autopolarización de 200 V con c-C_4F_8 y CF_4 .. 58

Figura II.11. Espectros de masas de las especies a) neutras y b) iónicas detectadas en el plasma durante la preparación de recubrimientos de CF_X con un potencial de autopolarización de 200 V con c-C_4F_8 y CF_4 ... 59

Figura III.1. Representación del ángulo de contacto de una gota depositada sobre un sólido y esquema de la relación entre tensiones superficiales, ángulo de contacto y ecuación de Young 69

Figura III.2. Ángulo a) de avance y b) de retroceso determinados por variaciones de volumen de una gota y c) gráfica para su visualización. d) Ángulos de avance y retroceso determinados por deslizamiento sobre una superficie inclinada..... 71

Figura III.3. Ángulo de avance y retroceso que aparecen en a) una superficie homogénea y rugosa y b) una superficie heterogénea y lisa. 72

Figura III.4. Representación de los modelos de a) Wenzel, b) Cassie y c) Cassie-Baxter..... 76

Figura III.5. Perfil de línea de una superficie, que muestra los conceptos de línea media, altura media ($\bar{h}$), rugosidad media (R_a) y rugosidad cuadrática media (RMS)..... 78

Figura III.6. Variación de la rugosidad cuadrática media con la escala de medida..... 80

Figura III.7. Imágenes de AFM de 5 µm x 5 µm y perfiles de línea de las muestras de PET a) sin tratamiento y sometidas a etching por plasma de O_2 durante b) 10 min, c) 15 min, d) 20 min, e) 30 min y f) 45 min. Nótese la diferencia de escala en los perfiles de línea 85

Figura III.8. Imágenes de AFM de una muestra de PET sometida a etching durante 45 min con escalas de observación de a) 10 µm x 10 µm, b) 5 µm x 5 µm, c) 2.5 µm x 2.5 µm y d) 1 µm x 1 µm 85

Figura III.9. Representación de los valores de a) RMS y b) RMS normalizados determinados a partir de imágenes de AFM obtenidas a diferentes

escalas para las muestras de PET estudiadas. En (b), las curvas están desplazadas en vertical conforme aumenta el tiempo para mayor claridad 86

Figura III.10. Valores de RMS obtenidos por AFM a una escala de 5 µm x 5 µm para muestras de PET sometidas a etching con plasma de O_2 a un potencial autoinducido de 200 V durante periodos de tiempo crecientes 88

Figura III.11. Dependencia de RMS con la resolución de medida para PET sometido a un tratamiento de etching con plasma de O_2 durante 20 min. La escala de medida es de 5 µm x 5 µm 88

Figura III.12. Topografía superficial (AFM) y perfiles lineales de PET sometido a etching con plasma de Ar (a) y O_2 (b) y de UHMWPE sometido a etching con plasma de Ar (c) y O_2 (d) 89

Figura III.13. Imágenes de AFM a 5 µm x 5 µm y 1 µm x 1 µm (imágenes superpuestas) de láminas delgadas de a) DLC, b) DLC-F y c) CF_X preparadas sobre obleas de silicio pulido durante 10 min 94

Figura III.14. Evolución de la rugosidad de los diferentes recubrimientos en función del tiempo de deposición 95

Figura III.15. Variación de RMS con la longitud de observación de películas de DLC, DLC-F y CF_X depositadas sobre UHMWPE sometido a etching con plasma de Ar y de O_2. La rugosidad inicial del sustrato previamente a los tratamientos de desbastado químico es del orden de 15 nm 96

Figura III.16. Ángulos de a) avance y b) retroceso en función de la rugosidad para recubrimientos de DLC, DLC-F y CF_X depositados sobre silicio y sobre PET y UHMWPE sometidos a etching con plasma de Ar y de O_2 100

Figura III.17. Variación de r_W con la escala de medida en las muestras de DLC, DLC-F y CF_X depositadas sobre UHMWPE sometido a etching con plasma de Ar y de O_2 103

Figura III.18. Dependencia de r_W con la resolución de medida para un recubrimiento de tipo CF_X depositado sobre UHMWPE sometido a etching con plasma de O_2. La escala de medida es de 5 µm x 5 µm 104

Figura IV.1.a) Implantación en el organismo y b) esquema de los componentes de una prótesis de cadera 123

Figura IV.2.a) Espectro general y b) pico de C 1s obtenido por análisis por XPS de la muestra de UHMWPE original..... 135

Figura IV.3. Imágenes topográficas tomadas por AFM, valores de RMS y perfiles de línea de las superficies estudiadas: a) UHMWPE, b) DLC/UHMWPE, c) DLC-F/UHMWPE y d) CF_X/UHMWPE..... 136

Figure IV.4. Imágenes de fluorescencia empleadas para determinar el porcentaje de superficie cubierta por la cepa de colección de S. aureus sobre a) UHMWPE, b) DLC/UHMWPE, c) DLC-F/UHMWPE y d) CF_X/UHMWPE 138

*Figure IV.5. Porcentaje de superficie cubierta (media ± desviación estándar) por las diferentes cepas de S. aureus (arriba) y S. epidermidis (abajo) de las muestras de UHMWPE, DLC/UHMWPE, DLC-F/UHMWPE y CF_X/UHMWPE. Las diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.001$) con respecto a UHMWPE se marcan con **.....* 139

Figura V.1. Regeneración ósea guiada promocionada por membranas bioactivas para la colocación de a) una prótesis de cadera y b) un implante dental 157

Figura V.2. Fases iniciales del desarrollo de osteoblastos sobre una superficie..... 159

Figura V.3. Esquema de una prótesis de cadera 162

Figura V.4. Esquema (a) y fotografía (b) del reactor de plasma usado para la deposición de películas delgadas de TiO_2 sobre polímeros 167

Figura V.5.a) Fórmula semidesarrollada y estructural del precursor TTIP y b) esquema del sistema de burbujeo para su introducción en la cámara de reacción..... 168

Figura V.6. Espectros de fotoemisión general (a) y señales de C 1s (b), O 1s (c) y Ti 2p (d) de las muestras de PET y TiO_2/PET 174

Figura V.7. Topografía superficial de las muestras de a) PET y b) TiO_2/PET en escalas de 5 µm x 5 µm y 1 µm x 1 µm (imágenes superpuestas) y valores de rugosidad a 5 µm x 5 µm 176

Figura V.8. Evolución del ángulo de contacto en las muestras de PET desnudo y TiO_2/PET a) por exposición a luz UV durante periodos de tiempo creciente y b) durante almacenamiento al aire en oscuridad 177

Figura V.9. Evolución de la concentración normalizada de moléculas de colorante durante experimentos de fotodegradación con láminas delgadas de TiO_2 amorfo y en fase anatasa, respecto del blanco sin material fotocatalítico 178

Figura V.10. Micrografías de contraste de fases de a) PET-UV y b) TiO_2/PET-UV 48 h después de la siembra de osteoblastos. Las flechas indican filopodios/lamelopodios 179

Figura V.11. Imágenes del citoesqueleto de actina de osteoblastos crecidos durante a) 24 h y b) 48 h sobre PET inmediatamente después de la irradiación con UV (PET-UV) (magnificación 40x) 180

Figura V.12. Imágenes del citoesqueleto de actina de osteoblastos crecidos durante a) 24 h y b) 48 h sobre PET almacenado en oscuro durante 4 semanas tras la irradiación con UV (PET-Oscuro) (magnificación 40x) 181

Figura V.13. Imágenes del citoesqueleto de actina (rojo) y de los contactos focales (verde) de osteoblastos crecidos durante a) 24 h y b) 48 h sobre TiO_2/PET inmediatamente después de la irradiación con UV (TiO_2/PET-UV) (magnificación 40x) 183

Figura V.14. Imágenes del citoesqueleto de osteoblastos crecidos durante a) 24 h y b) 48 h sobre TiO_2/PET almacenado en oscuro durante 4 semanas tras la irradiación con UV (TiO_2/PET-Oscuro) (magnificación 40x) 184

Figura V.15. Gráfica Box-Wisker del número de adhesiones focales 187
Figura VI.1. Proceso de biodegradación de membranas de regeneración ósea paralelo a la formación de hueso 201
Figura VI.2. Esquema de la preparación de membranas de PLGA funcionalizadas con SiO_2 205
Figura VI.3. Esquema (a) y fotografía (b) del reactor de plasma usado para la deposición de películas delgadas de SiO_2 sobre polímeros 206
Figura VI.4. Fórmula semidesarrollada y estructural del precursor de silicio HDMSO 207
Figura VI.5. Espectros de fotoemisión a) completo y señales de b) C 1s, c) O 1s y d) Si 2p de las muestras de PLGA y PLGA funcionalizado con SiO_2 211
Figura VI.6. Espectros de FT-IR de las membranas de PLGA y SiO_2/PLGA 212
Figura VI.7. Topografía superficial de las membranas de a) PLGA y b) SiO_2/PLGA medidas a escalas de 5μm x 5 μm y 1 μm x 1 μm (imágenes superpuestas) 213
Figura VI.8. Degradación de PLGA en PBS incubado a 36.5 ºC 214
Figura VI.9. Micrografías de contraste de fases de osteoblastos crecidos durante a) 24 h y b) 48 h sobre PLGA. Las flechas indican filopodios/lamelopodios 214
Figura VI.10. Imágenes de inmunomarcaje del citoesqueleto de actina obtenidas por microscopía confocal de osteoblastos crecidos durante 48 h sobre PLGA 215
Figura VI.11. Imágenes de inmunomarcaje del citoesqueleto de actina (rojo) y de los sitios de adhesión (verde) obtenidas por microscopía confocal de osteoblastos crecidos durante 72 h sobre PLGA 215
Figura VI.12. Micrografías de contraste de fases de osteoblastos crecidos durante a) 24 h y b) 48 h sobre SiO_2/PLGA. Las flechas indican filopodios/lamelopodios 216
Figura VI.13. Imágenes de inmunomarcaje del citoesqueleto de actina (rojo) y de los sitios de adhesión (verde) obtenidas por microscopía confocal

de osteoblastos crecidos durante 48 h sobre SiO_2/PLGA. Las imágenes anaranjadas resultan de la superposición de las imágenes roja y verde; las zonas anaranjadas se corresponden con zonas donde coincide el citoesqueleto de actina con los sitios positivos en vinculina 217

Figura VI.14. Imágenes de inmunomarcaje del citoesqueleto de actina (rojo) y de los sitios de adhesión (verde) obtenidas por microscopía confocal de osteoblastos crecidos durante 72 h sobre SiO_2/PLGA. Las imágenes anaranjadas resultan de la superposición de las imágenes roja y verde; las zonas anaranjadas se corresponden con zonas donde coincide el citoesqueleto de actina con los sitios positivos en vinculina 218

Figura VI.15. Gráfica Box-Wisker del número de adhesiones focales 220

Índice de Tablas.

Tabla II.1. Velocidad de crecimiento de de las capas finas de DLC, DLC-F y CF_X preparadas a un potencial autoinducido de 200 V y 100 V 42

Tabla II.2. Porcentajes atómicos relativos determinados por XPS y relación F/C de las capas finas de DLC, DLC-F y CF_X preparadas a 200 V y 100 V .. 43

Tabla II.3. Características de los espectros de Raman de las capas finas de DLC, DLC-F y CF_X preparadas a un potencial autoinducido de 200 V y 100 V 47

Tabla II.4. Densidad electrónica (Ne), temperatura electrónica (Te) y potencia de la descarga de plasma durante la deposición de capas finas de DLC, DLC-F y CFX preparadas a un potencial de autopolarización de 200 V y 100 V..... 51

Tabla II.5. Intensidad relativa de los diferentes iones detectados por espectrometría de masas en plasmas a un potencial autoinducido de 200 V 55

Tabla III.1. Valores de RMS de los sustratos de silicio pulido y de PET sin tratamiento determinados a diferentes escalas de medida 84

Tabla III.2. Condiciones experimentales para la preparación de los diferentes tipos de recubrimiento en muestras de diferente rugosidad 92

Tabla III.3. Resumen de la caracterización química realizada en el Capítulo II para capas finas de DLC, DLC-F y CF_X preparadas a 100 V 93

Tabla III.4. Valores de RMS a 1 µm x 1 µm y 5 µm x 5 µm de capas finas de DLC, DLC-F y CF_X depositadas sobre obleas de silicio pulido durante 10 min 94

Tabla III.5. Ángulos de contacto de avance (θ'_{av}) y retroceso (θ'_{re}) con agua e histéresis ($\Delta\theta'$) de los diferentes recubrimientos depositados sobre obleas de silicio pulido durante periodos de tiempo crecientes 98

Tabla III.6. Histéresis y diferencia de los cosenos de θ'_{av} y θ'_{re} para muestras de DLC, DLC-F y CF_X preparadas sobre sustratos de diferente rugosidad 101

Tabla III.7. r_W determinado a 5 µm x 5 µm con resolución máxima (512 x 512 píxeles), ángulos experimentales de avance (θ'_{av}) y retroceso (θ'_{re}), y ángulos intrínsecos ($\theta_{i,av}$ (WN) y $\theta_{i,re}$ (WN)) calculados para capas de CF_X depositadas sobre sustratos con rugosidad creciente. Los valores entre paréntesis se corresponden con los r_W a 20 µm x 20 µm e igual resolución 105

Tabla III.8. r_W determinado a 5 µm x 5 µm con resolución máxima (512 x 512 píxeles), ángulos experimentales de avance (θ'_{av}) y retroceso (θ'_{re}), y ángulos intrínsecos ($\theta_{i,av}$ (WN) y $\theta_{i,re}$ (WN)) calculados para capas de DLC depositadas sobre sustratos con rugosidad creciente. Los valores entre paréntesis se corresponden con los r_W a 20 µm x 20 µm e igual resolución 106

Tabla III.9. r_W determinado a 5 µm x 5 µm con resolución máxima (512 x 512 píxeles), ángulos experimentales de avance (θ'_{av}) y retroceso (θ'_{re}), y ángulos intrínsecos ($\theta_{i,av}$ (WN) y $\theta_{i,re}$ (WN)) calculados para capas de DLC-F depositadas sobre sustratos con rugosidad creciente. Los valores entre paréntesis se corresponden con los r_W a 20 µm x 20 µm e igual resolución 107

Tabla III.10. Promedio entre los ángulos experimentales de avance y retroceso (θ'_{medio}) y ángulos intrínsecos (θ_i (WN)) calculados a partir de éstos para capas de DLC, DLC-F y CF_X depositadas sobre sustratos con rugosidad creciente 108

*Tabla III.11. f_{CB} determinado a escalas de observación de 5 µm x 5 µm con resolución máxima (512 x 512 píxeles) y ángulos intrínsecos de muestras de DLC, DLC-F y CF_X depositadas sobre sustratos con rugosidad creciente. El símbolo * indica los casos en los que el ángulo intrínseco no puede calcularse matemáticamente* 109

Tabla IV.1. Cepas bacterianas sometidas a estudio 132

Tabla IV.2. Ángulo de contacto estático con agua (θ'_A) y con diiodometano (θ'_D), tensión superficial (γ_T) y componentes polar y dispersiva (γ_p y γ_d) de UHMWPE, DLC/UHMWPE, DLC-F/UHMWPE y CF_X/UHMWPE 137

Tabla IV.3. Parámetros estadísticos del análisis de regresión lineal de las variables "Bacteria" y "Superficie" 141

Tabla IV.4. Parámetros estadísticos del análisis de regresión lineal de las variables "Superficie por bacteria" y "Bacteria por superficie" 143

Tabla V.1. Porcentaje atómico de los elementos que componen la superficie de las muestras de PET y TiO_2/PET recién preparado, irradiado con luz UV (TiO_2/PET-UV) y guardado en oscuridad durante 4 semanas tras la irradiación (TiO_2/PET-Oscuro) 175

Tabla V.2. Características de los osteoblastos crecidos durante 48 h sobre las diferentes muestras 182

Tabla V.3. Parámetros descriptivos del análisis estadístico del número de adhesiones focales 187

Tabla V.4. Análisis estadístico de las variaciones en el número de adhesiones focales con los tests de Levene, Kruskal-Wallis y Jonckheere-Terpstra 188

Tabla VI.1. Descripción de los principales factores morfométricos analizados para los osteoblastos crecidos sobre las diferentes membranas 210

Tabla VI.2. Parámetros descriptivos del análisis estadístico del número de adhesiones focales 219

Tabla VI.3. Análisis estadístico de las variaciones en el número de adhesiones focales con los tests de Kruskal-Wallis, ANOVA de doble vía y post-hoc Scheffé 221

Tabla VI.4. Matriz de correlación entre las variables morfométricas. Los superíndices T, RS y E indican a qué índice se corresponde cada correlación (T: tamaño, RS: redondez sólida y E: elongación). Se considera que existe correlación para valores absolutos > 0.3 222

Tabla VI.5. Matriz de factores de carga, dados como la relación entre las variables originales y los factores experimentales. Se consideran sólo las correlaciones cuyo factor de carga presenta un valor absoluto > 0.3 222

Tabla VI.6. Análisis ANOVA de doble vía aplicado a los diferentes parámetros estadísticos definidos 224

Capítulo I.
Introducción general

1. Funcionalización superficial de materiales.

La modificación superficial de materiales es una estrategia empleada frecuentemente para la adaptación de un material a un uso concreto. Este proceso de modificación superficial se denomina funcionalización superficial, y puede llevarse a cabo mediante una gran diversidad de métodos: procesos térmicos, fotoquímicos, y mecánicos, técnicas en vía líquida, tecnologías de plasma, etc. Hay que tener en cuenta que la funcionalización superficial de un material pretende modificar de forma controlada sólo su zona más externa, sin deterioro de las propiedades másicas del mismo. Por tanto, la elección del método de funcionalización está condicionada por la naturaleza del material de partida (sea un metal, una aleación, una cerámica, un polímero o un material compuesto) debido a que ésta determina sus características, limitando la aplicación de ciertos tipos de técnicas. Así, por ejemplo, propiedades como la degradabilidad del material por la acción de disolventes, su sensibilidad a la irradiación o su falta de resistencia a temperaturas elevadas, pueden impedir el uso de técnicas en vía líquida, fotoquímicas o térmicas, respectivamente.

En el caso de materiales poliméricos, se utiliza la modificación superficial como una vía muy útil para la adaptación de éstos a diversas aplicaciones. La inmensa variedad de polímeros que se conoce actualmente, junto con el control de sus propiedades superficiales por procesos de funcionalización, hacen que este tipo de materiales se emplee en un amplio abanico de áreas. Por ello, actualmente se emplean grandes esfuerzos en la investigación orientada a desarrollar nuevos materiales poliméricos adecuados a diversos fines.

Entre los campos de aplicación de los materiales poliméricos se encuentra la biomedicina. En este marco se encuentran parte de los trabajos expuestos en la presente memoria, donde se describe el estudio y la fabricación de materiales híbridos polimérico-inorgánicos para uso biomédico, formados por un sustrato polimérico sobre el que se deposita un recubrimiento inorgánico en forma de lámina delgada.

2. Polímeros en biomedicina.

La utilización de polímeros en biomedicina es un área de aplicación de gran importancia en la actualidad. Dentro de este campo, se encuentra la ingeniería tisular, que promueve el reemplazamiento de tejidos u órganos que no desempeñan su función correctamente por biomateriales capaces de suplir estas carencias. En este contexto, se define biomaterial como aquel material diseñado para entrar en contacto con el organismo y evaluar, tratar, mejorar o reemplazar tejidos, órganos o funciones del cuerpo,[1] o para su uso en procedimientos terapéuticos y de diagnóstico, tanto en el ámbito de la medicina como en veterinaria.[2] Se trata, por tanto, de materiales que mimetizan la arquitectura, composición y/o funcionamiento del tejido original. Los biomateriales pueden ser de naturaleza diversa, ya sean polímeros, metales y aleaciones o materiales cerámicos. La elección del tipo de material se realiza dependiendo de las funcionalidades requeridas en cada caso.

Los polímeros, en general, presentan una serie de cualidades ventajosas a la hora de diseñar un biomaterial, como su estabilidad térmica (dentro del rango biológico), baja densidad y fricción reducida. Sin embargo, la inercia química y la baja tensión superficial de este tipo de compuestos empeoran propiedades como la capacidad de mojado, la permeabilidad o la biocompatibilidad. Teniendo esto en cuenta, existe un número limitado de polímeros adecuados para introducirse en el organismo, por su buena biocompatibilidad, baja citotóxicidad y alto nivel de pureza (que evita que la presencia de elementos no deseados pueda ser perjudicial). En este trabajo, en concreto, se seleccionan dos polímeros no biodegradables, el politereftalato de etileno (PET) y el polietileno de ultra-alto peso molecular (UHMWPE), y uno biodegradable, el ácido poli (láctico-*co*-glicóico) (PLGA), todos ellos con aplicaciones biomédicas, como se describe en los capítulos correspondientes. Dada la escasez de polímeros de aplicabilidad en biomedicina, se debe recurrir a su funcionalización para mejorar la idoneidad de un determinado polímero a un uso determinado o, incluso, adaptarlo a una aplicación dada para la que originalmente no era adecuado.

3. Funcionalización superficial de polímeros.

Como para cualquier otra aplicación, la utilidad de un biomaterial polimérico está condicionada por sus propiedades tanto másicas como superficiales. Por un lado, las propiedades másicas del material (como son la resistencia mecánica, resistencia térmica, flexibilidad, etc.) dependen de la naturaleza del mismo, influyendo enormemente en la elección del tipo de material. Por otra parte, las propiedades superficiales, si bien varían de un polímero a otro, pueden ser menos decisivas a la hora de seleccionar un material debido a que éstas, en general, pueden modificarse por numerosos métodos de funcionalización.

El proceso de funcionalización superficial de polímeros puede llevarse a cabo por diferentes vías, como la transformación de las especies químicas presentes en la superficie por oxidación/reducción, la adición de nuevas especies a la misma, cambios de rugosidad o la deposición de una lámina delgada de un material con las propiedades requeridas. Con esto, se logra variar las características químicas superficiales del material, así como sus propiedades de mojado, rugosidad, bioactividad, toxicidad, etc., pudiéndose obtener polímeros aplicables a usos muy diversos.

Pese a las ventajas de la funcionalización superficial de polímeros en el campo biomédico, hay que tener en cuenta que los polímeros son materiales “vivos”, es decir, que no presentan estructuras estáticas, sino que éstas pueden sufrir modificaciones con las condiciones ambientales y el tiempo (fenómeno conocido como envejecimiento). El envejecimiento influye en la funcionalización superficial generada, de forma que se producen cambios en la química y la tensión superficial del material tratado,[3-6] lo que puede conducir a una evolución no deseada de las propiedades superficiales que limite la vida útil del material preparado[7, 8] y comprometa su biocompatibilidad.[9]

3.1. Técnicas de plasma para la funcionalización superficial de polímeros.

La funcionalización superficial de materiales poliméricos puede realizarse con tratamientos fotoquímicos y químicos en vía líquida, térmicos, mecánicos y con técnicas de plasma. Estas últimas técnicas se constituyen como una opción muy adecuada para modificar las propiedades de superficie de los polímeros debido a que permiten realizar tratamientos a temperatura ambiente, evitando el deterioro que puedan sufrir a altas temperaturas. Estos procedimientos, además, sólo modifican las capas más superficiales del polímero, de forma homogénea y reproducible, de manera que las propiedades másicas permanecen inalteradas. Otra característica favorable es que permiten modificar la química y/o la topografía del material de forma independiente, posibilitando la generación de superficies con la composición y rugosidad deseadas.

Cuando se expone la superficie de un material a un plasma, las especies activas (átomos, radicales, iones, electrones) generadas en la descarga del plasma pueden interaccionar con ésta de tres formas diferentes para lograr una modificación efectiva:[10] i) deposición de una lámina delgada, ii) desbastado químico (*etching*) de la superficie y iii) adición de grupos funcionales a la superficie. En función de estas interacciones, el tratamiento con plasma de la superficie del polímero puede dar lugar a la modificación de los grupos funcionales superficiales o a la introducción de otros nuevos (que modifican su reactividad química), al cambio de la morfología superficial (considerándose en este apartado la cristalinidad y la rugosidad superficiales) y al aumento de su energía superficial y, en consecuencia, a un cambio en su hidrofilicidad/hidrofobicidad.[11] Además, se puede producir la eliminación de los contaminantes superficiales, la esterilización del material polimérico y la modificación de la movilidad de especies químicas y de la difusión interfacial (haciendo posible la generación de recubrimientos barrera contra la difusión de elementos indeseados).[12-14]

Con la funcionalización mediante tecnologías de plasmas, se puede inducir una serie de transformaciones a nivel de superficie causadas por las interacciones plasma-polímero que, a su vez, repercuten en las interacciones biológicas del material preparado. El control del proceso de funcionalización es imprescindible para diseñar superficies con propiedades adecuadas, tales como la actividad biocida o de antiadherencia de bacterias, la capacidad promotora de la adhesión y crecimiento celular, la hemocompatibilidad, la mejora del comportamiento tribológico, etc.[12-15] Por tanto, es necesario controlar y comprender el proceso de tratamiento y analizar adecuadamente la influencia de los parámetros del plasma (composición, potencia, etc.) en las propiedades superficiales finales del material preparado.

El proceso de envejecimiento de los polímeros también afecta a la funcionalización por plasma. Esta reestructuración ocurre en la superficie de un polímero activado con plasma, pero también en la intercara polímero-recubrimiento en el caso de la deposición de láminas delgadas: para recubrimientos muy finos, puede provocar el enterramiento de los nuevos grupos funcionales, recuperándose las propiedades iniciales del polímero; cuando los recubrimientos son de mayor espesor, los efectos en la intercara sustrato-capa no generan cambios importantes en la superficie, pero sí tienen lugar procesos de relajación de la lámina delgada preparada por plasma que pueden modificar sus propiedades.

En esta tesis de desarrollan dos conjuntos diferentes de materiales en función de su posterior aplicación, todos ellos fabricados mediante técnicas de deposición por plasma. Por un lado, se preparan recubrimientos de compuestos de carbono tipo diamante (DLC) y compuestos fluorocarbonados (en concreto, DLC dopado con flúor, o DLC-F, y un polímero tipo teflón, o CF_X). En el contexto de esta tesis, su fabricación está orientada al desarrollo de recubrimientos que reduzcan la adherencia de bacterias sobre polímeros de uso médico. Por otro lado, se obtienen láminas delgadas de óxidos biocompatibles y bioactivos (concretamente, dióxido de titanio, TiO_2, y dióxido de silicio, SiO_2) con el fin de desarrollar materiales que favorezcan la formación de hueso.

3.2. Funcionalización superficial para el control de la mojabilidad de materiales poliméricos.

La mojabilidad superficial depende de la composición y estructura química de la superficie expuesta al líquido y de su topografía. Las técnicas de plasma, como se comenta anteriormente, permiten la modificación independiente de la química y la rugosidad del polímero, constituyéndose como estrategias adecuadas para el control del mojado. Esto es de suma importancia a la hora de preparar sistemas biocompatibles, donde la actividad biológica de un material está muy condicionada por su química. Por consiguiente, los cambios en la mojabilidad deben generarse, más que por cambios químicos, por modificaciones de la rugosidad.

La capacidad de mojado de la superficie de un polímero puede ejercer una gran influencia en su aplicación en biomedicina. Por ejemplo, no se requieren las mismas características para la fabricación de vasos sanguíneos artificiales o para membranas de regeneración ósea (para lo que se necesita una buena interacción con la sangre y demás fluidos biológicos y buenas propiedades de mojado) que para la obtención de superficies antibacterianas (donde es conveniente que se dé una interacción débil con los fluidos biológicos que puede verse favorecida por una baja capacidad de mojado). Con esto se pone de manifiesto que la mojabilidad de una superficie es un factor que ha de controlarse correctamente a la hora de diseñar un material.

En este marco, se realizan experimentos para el control de la mojabilidad de polímeros basados en cambios en la química superficial y/o en la rugosidad. En el caso de materiales fluorocarbonados, primero se realiza un estudio exhaustivo de cómo afecta la incorporación de flúor a la mojabilidad del material preparado por técnicas de plasma. En segundo lugar, se determina la influencia de la rugosidad del sistema en su capacidad de mojado. Cabe mencionar que los aumentos de rugosidad se inducen igualmente por acción de plasmas. Finalmente, se analiza el efecto de los cambios en la mojabilidad de estos materiales en la adherencia bacteriana. En cuanto a los óxidos de titanio (IV) y silicio (IV), se analizan los cambios que produce su incorporación en la hidrofobicidad/hidrofilicidad de diferentes polímeros, a fin de relacionar este parámetro con cambios en la adhesión de osteoblastos.

4. Aplicaciones biomédicas de polímeros funcionalizados por técnicas de plasma.

Tras exponer la idoneidad de las técnicas de plasma para la modificación superficial de polímeros con aplicaciones médicas, a continuación se describe la funcionalización de polímeros con dos finalidades concretas: la reducción de la adherencia bacteriana y el aumento de la adhesión de osteoblastos.

4.1. Funcionalización superficial y adherencia bacteriana.

La introducción de cualquier material en el organismo a través de una intervención quirúrgica trae consigo el riesgo de infección por bacterias. Lógicamente, el dispositivo a implantar ha de ser capaz de soportar procesos de esterilización sin perder las cualidades que lo hacen adecuado para una aplicación. Si, adicionalmente, se trata de una superficie antiadherente, el riesgo de infección decrece al dificultarse la unión de las bacterias causantes de la infección. Las interacciones sustrato-bacteria responsables de la adherencia bacteriana dependen de diferentes propiedades del material, que pueden controlarse mediante su modificación superficial.

En la bibliografía pueden encontrarse estudios *in vitro* de adherencia bacteriana sobre materiales recubiertos con moléculas biológicas o compuestos,[16, 17] así como ensayos *in vivo* sobre las propiedades antiadherentes de dispositivos médicos recubiertos[17, 18] que muestran que esta estrategia parece ser una vía útil para prevenir la infección. Una opción muy extendida es el uso de recubrimientos intrínsecamente antiadherentes,[19] como los recubrimientos de carbono tipo diamante (DLC) y DLC dopados con diferentes elementos bactericidas, entre ellos, el flúor (DLC-F).[20] Éstos presentan también una alta dureza y un bajo coeficiente de fricción, una elevada inercia química y una alta biocompatibilidad, propiedades que les otorga una gran utilidad como recubrimientos protectores de diversos biomateriales,[21-26] entre los que se encuentran las piezas de las prótesis de cadera. Con todo esto, la utilidad de este tipo de recubrimientos es triple: por una parte,

reducen la capacidad de adherencia bacteriana de las superficies poliméricas; por otra, mejoran las propiedades de desgaste y dureza; y, finalmente, reducen la biocorrosión producida por la acción del medio biológico.

4.2. Funcionalización superficial y regeneración ósea.

En numerosas ocasiones, se producen daños en determinados huesos, bien sea por una fractura, la retirada de una pieza dentaria, la osteoporosis, etc. Aunque en el caso de un paciente sano, generalmente la reconstrucción del hueso se realiza de forma natural, en determinadas ocasiones se requiere la colocación de materiales que guíen su crecimiento, como clavos, tornillos, etc. Sin embargo, puede ocurrir que en el lugar del defecto óseo se necesite colocar un implante, para lo cuál se requiere la formación de nuevo hueso de buena calidad, sin invasión de tejidos blandos. Es por esto que actualmente se investiga la obtención de biomateriales que sustituyan al hueso o faciliten su crecimiento y que presenten unas características adecuadas, entre las que se encuentran la biocompatibilidad, la capacidad de osteogénesis, y, como caso ideal, la bioabsorbibilidad.[27-29]

Una forma de abordar este problema es el uso de membranas poliméricas funcionalizadas con materiales que promuevan la formación de hueso. Éstos pueden ser de diferente naturaleza, como el óxido de titanio (IV) y el óxido de silicio (IV). En el contexto de la regeneración ósea, las láminas delgadas o los andamiajes fabricados con ambos óxidos son biocompatibles y se conoce que favorecen el crecimiento celular de osteoblastos.[30, 31] Las membranas a desarrollar han de

Nota aclaratoria.- Los conceptos de "adherencia" y "adhesión" son sinónimos y se emplean indistintamente en la bibliografía para la unión tanto de bacterias como de osteoblastos a una superficie. No obstante, puesto que en el caso de bacterias esta unión es negativa, mientras que con osteoblastos es positiva, en esta memoria se emplean los términos "adherencia bacteriana" y "adhesión de osteoblastos" para enfatizar las diferentes connotaciones del mismo fenómeno.

presentar unas propiedades superficiales que faciliten la adhesión de osteoblastos, que posteriormente se unan entre sí y se propaguen y diferencien, formando, en última instancia, tejido óseo.

Por otra parte, en regeneración ósea es favorable el uso de polímeros biodegradables, que se asimilan por el organismo en un periodo de tiempo adecuado para la regeneración ósea, de forma que una vez producido el crecimiento de hueso no se requiere retirar el material, acelerando el proceso de recuperación del paciente y reduciendo los costes económicos del proceso.[32, 33]

5. Objetivos generales de esta tesis.

La investigación expuesta en los siguientes capítulos tiene tres finalidades principales: i) determinar las propiedades de diferentes recubrimientos fluorocarbonados en relación a las características de la descarga de plasma utilizada en cada caso, ii) fabricar recubrimientos antibacterianos y iii) preparar recubrimientos promotores de la formación de tejido óseo. Los objetivos generales son los siguientes:

- Analizar características superficiales de diferentes recubrimientos fluorocarbonados preparados por técnicas de plasma en función de las características de la descarga de plasma.

Los materiales fluorocarbonados (DLC, DLC con diferentes dopantes y materiales poliméricos de tipo teflón) son un grupo de compuestos de gran importancia que se utilizan en numerosas aplicaciones, fundamentalmente por sus características tribológicas. En esta tesis se lleva a cabo la preparación mediante técnicas de plasma de recubrimientos de DLC y DLC-F, y de un material polimérico de tipo CF_X. Se determina su composición y estructura química, así como su rugosidad y sus propiedades de mojado en diferentes condiciones de preparación.

Por otro lado, se realiza el estudio de los parámetros característicos del plasma (temperatura electrónica, densidades electrónica e iónica y especies iónicas y neutras

presentes en el plasma) en las condiciones de preparación de los distintos recubrimientos fluorocarbonados para relacionarlo posteriormente con las propiedades de las láminas delgadas depositadas. Este estudio se justifica por la escasez de trabajos en esta línea, por lo que se intenta esclarecer cómo se pueden controlar las propiedades del material en función de los parámetros característicos de la descarga de plasma utilizada para su funcionalización.

- Desarrollar recubrimientos con capacidad antibacteriana/antiséptica.

Con el fin de mejorar las propiedades antisépticas de piezas de UHMWPE utilizadas, por ejemplo, en prótesis de cadera, se fabrican recubrimientos de DLC, DLC-F y CF_X, mencionados en el apartado anterior.

En este trabajo de tesis se hacen análisis de adherencia bacteriana con diferentes especies de bacterias comúnmente relacionadas con infecciones protésicas. En este contexto, se describe un procedimiento para la determinación de la adherencia bacteriana adecuado a las muestras analizadas.

Por otra parte, se realiza un estudio crítico de la relación entre el comportamiento frente a la adherencia bacteriana de las muestras preparadas y sus propiedades superficiales: química superficial y estructura de enlace, rugosidad y mojabilidad (que, a su vez, depende de las propiedades anteriores).

- Desarrollar recubrimientos para la regeneración ósea.

Se pretende obtener membranas, reabsorbibles o no, que faciliten la formación de nuevo hueso en sitios donde aparezca un defecto óseo. Para ello, en la presente tesis se describe la fabricación de membranas híbridas constituidas por un sustrato polimérico funcionalizado con una lámina delgada de un óxido inorgánico bioactivo (en este caso, TiO_2 y SiO_2).

En primer lugar, se preparan membranas no biodegradables de PET recubierto con una lámina delgada de TiO_2. Como se conoce que la capacidad de mojado de las superficies de TiO_2 puede modificarse por la acción de la luz UV (frecuentemente empleada para la esterilización de las muestras) y que se producen procesos de

relajación que lleven a la recuperación de las condiciones iniciales (envejecimiento), se evalúa la mojabilidad de las muestras de PET y PET recubierto con TiO_2 sometidas a luz UV y guardadas en oscuro. Posteriormente, se desarrolla un procedimiento para la determinación de la adhesión y desarrollo de osteoblastos *in vitro*. A continuación, se determina la capacidad de las diferentes superficies para promover la regeneración del tejido óseo dañado en función de sus propiedades superficiales, tales como la mojabilidad o la presencia/ausencia de la lámina de óxido.

En segundo lugar, se fabrican membranas bioabsorbibles de PLGA recubiertas de SiO_2. Por una parte, se evalúa la degradación de las membranas de PLGA mediante un ensayo *in vitro* estándar. Por otro lado, al igual que en el caso anterior, se evalúa la adhesión de osteoblastos en la superficie del polímero funcionalizado frente al PLGA desnudo.

6. Esquema de trabajo.

Los trabajos incluidos en la presente memoria se estructuran en tres bloques principales. En el Bloque 1, se realizan estudios básicos dentro del marco de la Ciencia de Materiales, orientados a obtener un conocimiento profundo de los recubrimientos fluorocarbonados, tanto de sus características químicas en relación a las propiedades del plasma (Capítulo II), como de sus propiedades de mojado y rugosidad (Capítulo III). Los Bloques 2 y 3 recogen las aplicaciones biomédicas de diferentes sistemas fabricados. El Bloque 2 se centra en recubrimientos de tipo diamante para la obtención de superficies antibacterianas (Capítulo IV), mientras que el Bloque 3 realiza un estudio acerca de membranas para la regeneración ósea, tanto no-reabsorbibles (Capítulo V) como reabsorbibles (Capítulo VI). El esquema de trabajo de esta memoria puede verse en la *Figura I.1*.

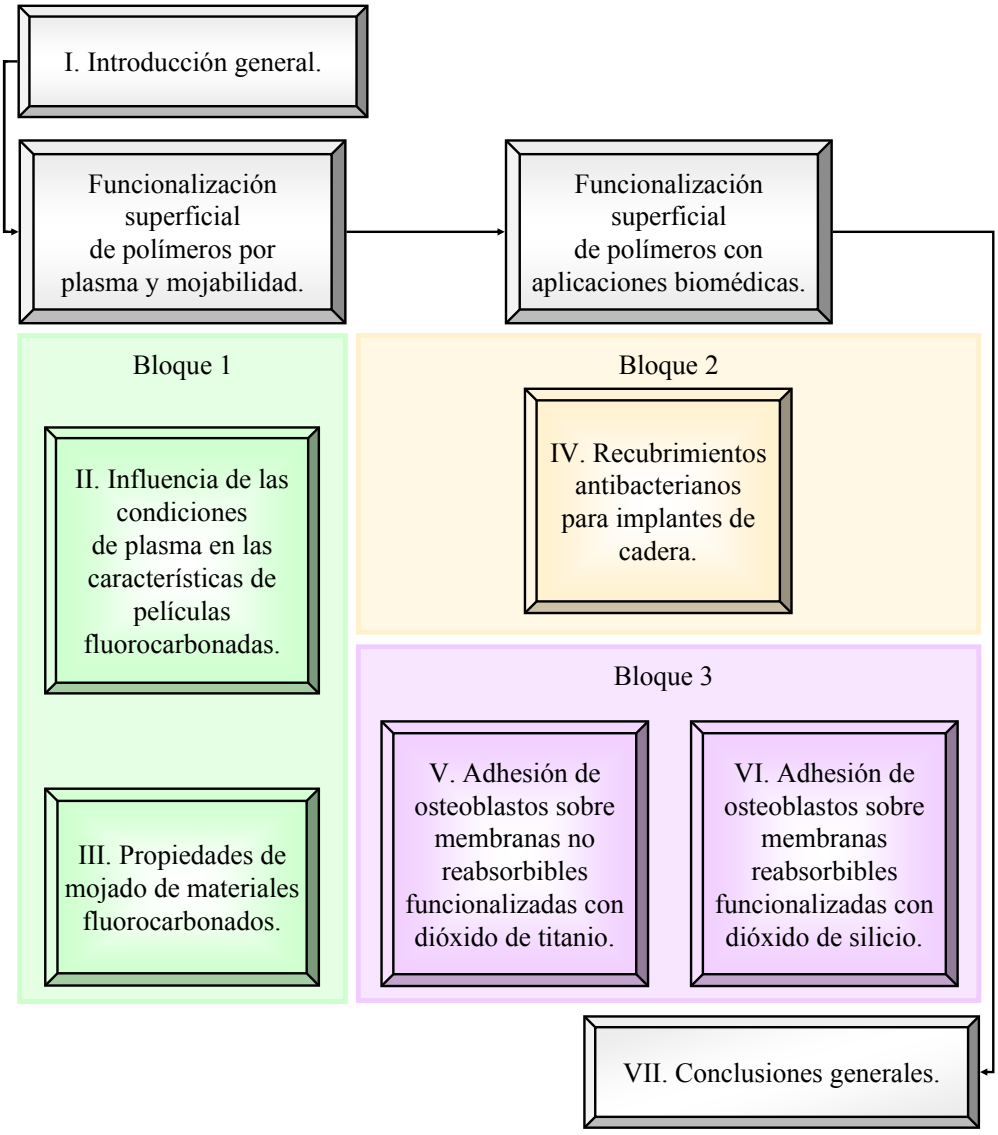


Figura I.1. Esquema de trabajo de la tesis.

7. Referencias.

[1] D. F. Williams. "The Williams Dictionary of Biomaterials". University Press, Liverpool, UK (1999).

[2] D. F. Williams. “On the nature of biomaterials”. Biomaterials, 30:5897-5909 (2009).

[3] N. De Geyter, R. Morent, C. Leys, L. Gengembre, E. Payen. “Treatment of polymer films with a dielectric barrier discharge in air, helium and argon at medium pressure”. Surface and Coatings Technology, 201:7066-7075 (2007).

[4] P. Esena, C. Riccardi, S. Zanini, M. Tontini, G. Poletti, F. Orsini. “Surface modification of PET film by a DBD device at atmospheric pressure”.Surface and Coatings Technology, 200:664-667 (2005)

[5] (23 MCLS) M. Morra, E. Ochiello, F. Garbassi. “Knowledge about polymer surfaces from contact angle measurements”. Advances in Colloid and Interface Science, 32:79-116 (1990).

[6] B. Gupta, J. Hilborn, C. H. Hollenstein, C. J. G. Plummer, R. Houriet, N. Xanthopoulos. “Surface modification of polyester films by RF plasma”. Journal of Applied Polymer Science, 78: 1083-1091 (2000).

[7] H. J. Griesser, R. C. Chatlier, T. R. Gengenbach, G. Johnson, J. G. Steele. “Growth of human cells on plasma polymers: putative role of amine and amide groups”. Journal of Biomaterials Science (Polymer Edition), 5(6):531-54 (1994).

[8] J. M. Grace, L. J. Gerenser. “Plasma treatment of polymers”. Journal of Dispersion Science and Technology, 24:305-341 (2003).

[9] J. Hyun. “A new approach to characterize crystallinity by observing the mobility of plasma treated polymer surfaces”. Polymer, 42:6473-6477 (2001).

[10] C. M. Chan, T. M. Ko, H. Hiraoka. “Polymer surface modification by plasmas and photons”. Surface Science Reports, 24:1-54 (1996).

[11] N. Dumitrascu. “Dielectric barrier discharge technique in improving the wettability and adhesion properties of polymer surfaces”. IEEE Transactions on Plasma Science, 33:1710-1714 (2005).

[12] H. Chen, L. Yuan, W. Song, Z. Wu, D. Li. "Biocompatible polymer materials: Role of protein–surface interactions". Progress in Polymer Science, 33:1059-1087(2008).

[13] V. Kotal, V. Svorcik, P. Slepicka, P. Sajdl, O. Blahova, P. Sutta, V. Hnatowicx. "Gold coating of poly(ethylene terephthalate) modified by argon plasma". Plasma Processes and Polymers, 4:69-76 (2007)

[14] M. Noeske, J. Degenhardt, S. Strudthoff, U. Lommatzsch. "Plasma jet treatment of five polymers at atmospheric pressure: surface modifications and the relevance for adhesion". International Journal of Adhesion and adhesives, 24:171-177 (2004).

[15] R. J. Goldston, P. H. Rutherford. "Introduction to Plasma Physics (Plasma Physiscs Series)". Institute of Physics Publishing, Dirac House, Temple Back, Bristol, UK (1997).

[16] J. R. Keogh, J. W. Eaton. "Albumin binding surfaces for biomaterials". Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 124:537-545 (1994).

[17] T. J. Kinnari, L. I. Peltonen, P. Kuusela, J. Kivilahti, M. Kononen, J. Jero. "Bacterial adherence to titanium surface coated with human serum albumin". Otology and Neurotology, 26:380-384 (2005).

[18] Y. H. An, J. Bradley, D. L. Powers, R. J. Friedman. "The prevention of prosthetic infection using a cross-linked albumin coating in a rabbit model". Journal of Bone and Joint Surgery British Volume, 79:816-819 (1997).

[19] M. Katsikogianni, Y. F. Missirlis. "Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions". European Cells and Materials, 8:37-57 (2004).

[20] Nurhaerani, K. Arita, Y. Shinonaga, M. Nishino. "Plasma-based fluorine ion implantation into dental materials for inhibition of bacterial adhesion". Dental Materials Journal, 25:684-692 (2006).

[21] H. Li, T. Xu, C. Wang, J. Chen, H. Zhou, H. Liu. "Humidity dependence on the friction and wear behavior of diamond-like carbon film in air and nitrogen environments". Diamond and Related Materials, 15:1585-1592 (2006).

[22] K. Ozeki., K. K. Hirakuri. The effect of nitrogen and oxygen plasma on the wear properties and adhesion strength of the diamond-like carbon film coated on PTFE. Applied Surface Science, 254:1614-1621 (2008).

[23] S. C. H. Kwok, J. Wang , P. K. Chu. "Surface energy, wettability, and blood compatibility phosphorus doped diamond-like carbon films". Diamond and Related Materials, 14:78-85 (2005).

[24] P. Yang, S. C. H. Kwok, R. K. Y. Fu, Y. X. Leng, J. Wang, N. Huang, Y. Leng, P. K. Chu. "Structure and properties of annealed amorphous hydrogenated carbon (a-C:H) films for biomedical applications". Surface and Coatings Technology, 177/178:747-751 (2004).

[25] G. Thorwarth, B. Saldamli, F. Schwarz, P. Jürgens, C. Leiggener, R. Sader, M. Haeberlen, W. Assmann, B. Stritzker. "Biocompatibility of doped diamond-like carbon coatings for medical implants". Plasma Processes and Polymers, 4:S364-S368 (2007).

[26] A. Shirakura, M. Nakaya, Y. Koga, H. Kodama, T. Hasebe, T. Suzuki. "Diamond-like carbon films for PET bottles and medical applications". Thin Solid Films, 494:84-91 (2006)

[27] J. M. Lane, E. Tomin, M. O. G. Bostrom. "Byosynthetic bone grafting". Clinical Orthopaedics and Related Research, 367S:107-117 (1999).

[28] B. K. B. Tay, V. V. Patel, D. S. Bradford. "Calcium sulfate and calcium fosfate based bone substitutes. Mimicry of the mineral phase of bone". Orthopedic Clinics of North America, 30:615-623 (1999).

[29] S. R. Winn, H. Udulag, J. O. Hollinger. "Carrier systems for bone morphogenetic proteins". Clinical Orthopaedics and Related Research, 367S:95-106 (1999).

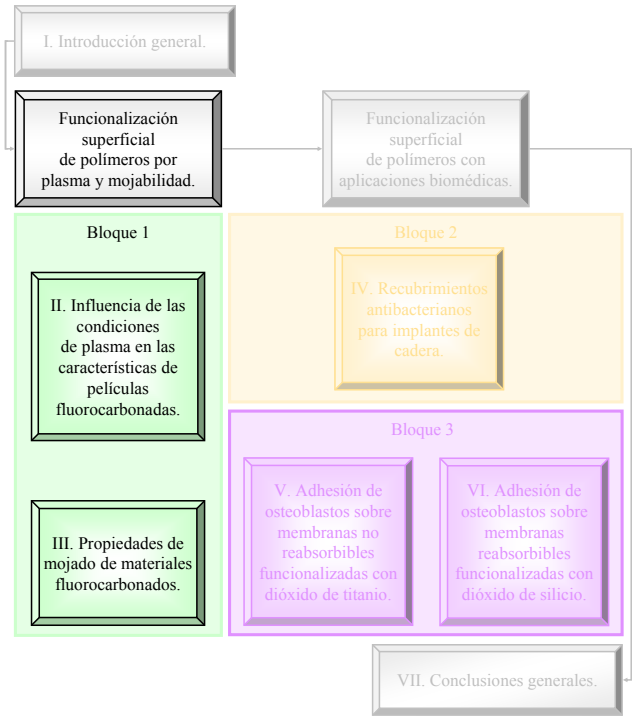
[30] R. Detsch, H. Mayr, G. Ziegler. "Formation of osteoclast-like cells on HA and TCP ceramics". Acta Biomaterialia, 4:139-148 (2008).

[31] S. S. Homaeigohar, M. A. Shokrgozar, A. Khavandi, A. Y. Sadi. "*In vitro* biological evaluation of beta-TCP/HDPE--A novel orthopedic composite: a survey using human osteoblast and fibroblast bone cells". Journal of Biomedical Materials Research A, 84:491-499 (2008).

[32] P. Gentile, V. Chiono, Ch. Tonda-Turo., A. M. Ferreira, G. Ciardelli. "Polymeric membranes for guided bone regeneration". Biotechnology Journal, 6:1187–1197 (2011).

[33] T. Tirri, J. Rich, J. Wolke, J. Seppälä, A. Yli-Urpo, T. O. Närhi. "Bioactive glass induced *in vitro* apatite formation on composite GBR membranes". Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 19:2919-2923 (2008).

Bloque 1.
Funcionalización superficial de polímeros con recubrimientos fluorocarbonados



Capítulo II.
Influencia de las condiciones de plasma en las propiedades de películas fluorocarbonadas

1. Introducción.

La utilización de recubrimientos funcionales es una estrategia muy eficaz para modificar las propiedades superficiales de un material. Con este procesado puede mejorarse su funcionalidad, dotándole de unas características beneficiosas a nivel de superficie sin perder aquéllas propiedades másicas que puedan resultar adecuadas a un uso concreto. Además, esto puede suponer una reducción de costes económicos debido a que en muchas ocasiones sólo se requiere una fina capa de material con las propiedades superficiales adecuadas para alcanzar las prestaciones deseadas, lo que permite construir dispositivos con materiales de menor valor que, al funcionalizarse, presenten buenas propiedades superficiales.

Un grupo de recubrimientos comúnmente empleados por sus buenas propiedades tribológicas y antisépticas y por su inercia química son los llamados recubrimientos de carbono tipo diamante, conocidos generalmente por sus siglas inglesas, DLC (Diamond Like Carbon).

1.1. Recubrimientos de carbono y de carbono-flúor.

Debido a sus propiedades, los compuestos de carbono tipo diamante son buenos candidatos tanto para su uso en biomedicina como para la fabricación de recubrimientos duros y anticorrosión. Por este motivo, existen muchas publicaciones relativas a DLC. Al importante trabajo publicado por Robertson y su grupo en 2002[1] acerca de la preparación de DLC por deposición química desde fase vapor asistida por plasma (PECVD, de *Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition*), hay que sumar numerosos estudios posteriores llevados a cabo por un enorme número de investigadores, que aúnan esfuerzos a esclarecer los principios básicos de la deposición de estos compuestos, a conocer sus propiedades, a desarrollar herramientas avanzadas para su caracterización y a buscar nuevos campos de aplicación.[2-5]

Además del carbono tipo diamante, en los últimos años los recubrimientos fluorocarbonados han suscitado un gran interés debido a sus excepcionales

propiedades tribológicas (que les hacen idóneos para aplicaciones en las que el material sobre el que se deposite deba soportar cargas elevadas o se encuentre sometido a fricción), además de a sus excelentes propiedades de mojado y actividad biocida.[6-10] Por una parte, se encuentran los DLC dopados con flúor (denotados en el texto como DLC-F), que consisten en una estructura similar a la de DLC donde se introducen algunos átomos de halógeno. En el otro extremo, se encuentran estructuras de tipo polimérico con una alta concentración de flúor directamente enlazado a carbono con una hibridación mayormente sp^3 (denominados CF_X), que difícilmente recuerdan a las estructuras de tipo diamante. Éstas últimas, a veces llamadas películas tipo teflón, se preparan con mezclas de gases muy diferentes a las anteriores. Los recubrimientos de DLC-F y de CF_X se preparan por su baja fricción y alta hidrofobicidad.[11-15] Así, dependiendo de la cantidad relativa de flúor/hidrógeno y del grado de enlace sp^3, las películas obtenidas pueden presentar propiedades similares a las de DLC o a las de polímeros fluorados másicos como el teflón.[16]

Dadas las grandes ventajas que presentan los métodos de deposición por plasma frente a otras vías de síntesis, frecuentemente se recurre a estas técnicas para preparar los recubrimientos mencionados. Una ventaja destacable para el desarrollo de esta tesis, como se menciona en el Capítulo I, es la posibilidad de realizar la funcionalización superficial de polímeros a temperatura ambiente y sin el uso de disolventes, evitando el deterioro que se produce en éstos cuando se someten a altas temperaturas o a procesos en vía líquida. Así, la pulverización catódica (que suele denominarse *magnetron sputtering*) y la deposición asistida por plasma son dos métodos comunes de preparación de películas de fluorocarbono.[12, 13, 17, 18]

1.2. Análisis de plasmas que contienen flúor.

La composición química, estructura y morfología de una lámina delgada dependen fuertemente de las características del plasma que genera su deposición. Parámetros como la densidad electrónica e iónica y la temperatura electrónica del plasma o la presencia de especies intermedias que se forman por fragmentación de

los precursores empleados por acción del plasma tienen una gran influencia en las propiedades finales del material preparado, que pueden condicionar sus campos de uso. A pesar del extenso conocimiento del que se dispone acerca de los métodos de síntesis con tecnologías de plasma y la caracterización de compuestos preparados por esta metodología, son pocas las investigaciones destinadas a correlacionar las características del plasma y los parámetros de deposición con las propiedades de las capas obtenidas. Entre las publicaciones disponibles a este respecto, destacan los trabajos de Baby *et al*.,[19, 20] que estudian exhaustivamente el efecto de la presión en el reactor y del potencial autoinducido en las capas de DLC generadas utilizando argón y acetileno (C_2H_2) o metano (CH_4) como precursor en reactores de radiofrecuencias (RF). En estos estudios se correlacionan las propiedades de las películas (dureza, relación entre las bandas Raman D y G, velocidad de deposición, etc.) con características del plasma, como las diferentes especies químicas presentes y la energía del mismo.

Por otro lado, los plasmas que contienen flúor generados en equipos de RF suelen emplearse en procesos de desbastado químico (o *etching*) de SiO_2, así como para la obtención de recubrimientos de DLC fluorado por métodos de plasma. El compuesto típicamente utilizado para realizar *etching* es el tetrafluorometano (CF_4),[21-25] por lo que pueden encontrarse estudios de este tipo de plasmas. También se dispone de información acerca de la deposición de películas de DLC fluorado usando CF_4 como precursor, que se centran en la caracterización de los materiales obtenidos, más que en la caracterización del plasma.[26-28] Por otra parte, gracias a Biederman *et al*., se encuentran disponibles datos de espectroscopía de masas de las especies producidas durante el proceso de deposición por *magnetron sputtering* empleando un blanco de teflón.[29] Otro compuesto fluorado utilizado para procesos de *etching* es el octafluorociclobutano (*c*-C_4F_8, también nombrado en ocasiones como C_4F_8), cuya descomposición se lleva a cabo en plasmas de Ar puro[30-33] o en mezclas Ar/O_2.[34] Aunque este sistema está menos estudiado, se dispone de un modelo global para los plasmas de *c*-C_4F_8, incluyendo las cinéticas de reacción en la superficie de las paredes del reactor.[35]

2. Objetivos de este capítulo.

El estudio desarrollado en este capítulo está destinado a relacionar las características de recubrimientos fluorocarbonados preparados con metodologías de deposición por plasma con las propiedades de éste. Así, se varían la mezcla de gases del plasma (el contenido en flúor, hidrógeno y acetileno), el potencial de preparación y el precursor empleado. Los objetivos concretos se describen a continuación.

- Preparar y caracterizar láminas delgadas de compuestos fluorocarbonados.

Se lleva a cabo la deposición de láminas delgadas de DLC, DLC-F y CF_X mediante PECVD, empleando como precursor de flúor *c*-C_4F_8 como precursor. El DLC (sin contenido en flúor) se utiliza como material de referencia, y se preparan dos compuestos fluorados con diferente contenido en flúor e hidrógeno. Los tres tipos de películas se caracterizan químicamente, determinando tanto su composición como su estructura de enlace.

- Evaluar el efecto del potencial autoinducido en las propiedades del material.

Una característica de los reactores de RF capacitivos como el empleado en el presente capítulo es el desarrollo de un potencial autoinducido o de autopolarización (self-bias) en el electrodo activo, que presenta menor área efectiva.[1] Este potencial se genera debido a la aparición de una vaina con carga positiva con un exceso de iones como consecuencia de las diferencias en la movilidad de los electrones y los iones en el plasma. En películas delgadas de DLC preparadas mediante esta técnica se conoce que éste es un parámetro muy influyente en la estructura de enlace (relación de enlaces sp^3/sp^2) y composición (relación H/C) del material, variando, además, sus propiedades tribológicas.[1] A potenciales bajos se obtienen capas finas con marcado carácter polimérico y baja dureza. No obstante, a partir de 150-200 V se generan materiales de alta dureza, un efecto atribuido a que las especies de carbono que se incorporan en la capa de DLC se aceleran a unos 100 eV por el

potencial de la vaina del plasma, como se describe en el modelo de subimplantación.[36, 37] A fin de determinar la influencia del potencial autoinducido en las características de los depósitos, se preparan los tres tipos de muestras en dos condiciones diferentes, una por debajo y otra por encima del potencial umbral.

- Realizar un análisis del plasma empleado para la deposición de películas delgadas fluorocarbonadas.

Para relacionar las características del plasma con las propiedades de los recubrimientos preparados, se realiza un análisis del plasma empleado para depositar los tres tipos de recubrimientos mencionados. Asimismo, se comparan las características de los plasmas a diferentes potenciales autoinducidos (por ejemplo, las especies intermedias formadas por descomposición de los precursores en el plasma en función del potencial autoinducido) para relacionarlas con los cambios producidos en las capas depositadas (contenido en flúor, estructura de enlace y velocidad de deposición de las capas preparadas).

- Analizar la descarga de plasma en función del precursor de flúor empleado: *c*-C_4F_8 frente a CF_4.

Como se comenta en apartados anteriores, un compuesto comúnmente empleado para la producción de plasmas fluorados y, por ende, extensamente estudiado, es el CF_4. En el presente capítulo, se realiza un análisis comparativo entre los plasmas de este compuesto y los de *c*-C_4F_8 empleados para la fabricación de las muestras.

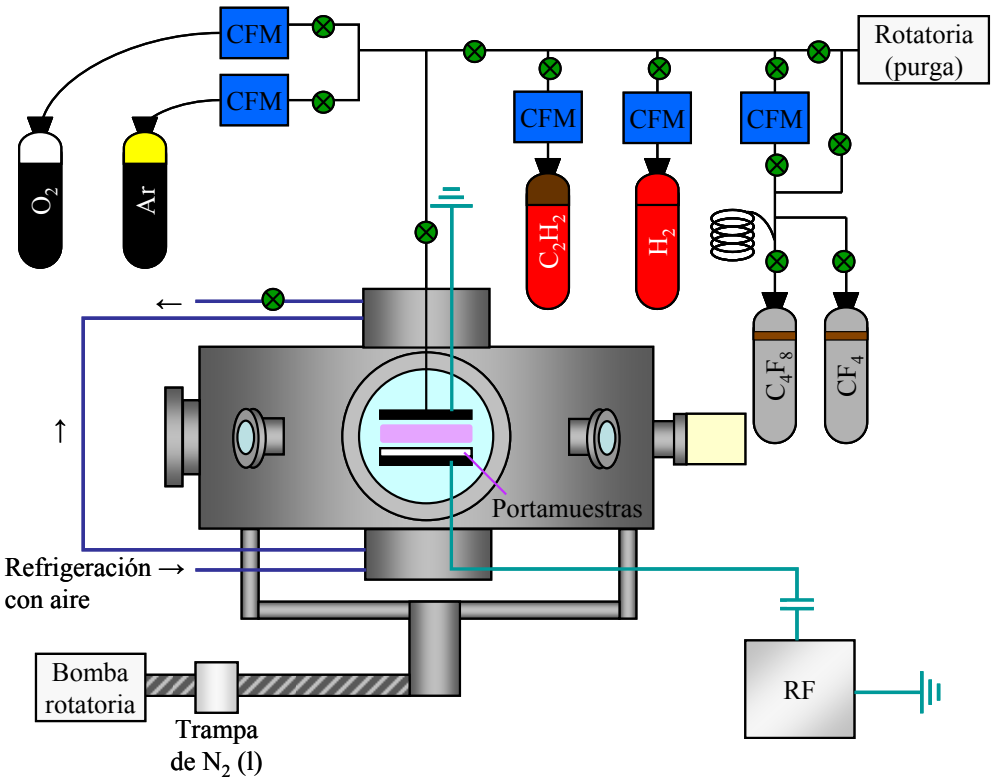
3. Procedimiento experimental.

El trabajo expuesto en el presente capítulo abarca desde la preparación de películas delgadas fluorocarbonadas hasta su caracterización química, relacionando las propiedades de los recubrimientos empleados con las características del plasma de síntesis en cada caso.

3.1. Preparación y caracterización de películas fluorocarbonadas.

Con el fin de estudiar diferentes compuestos fluorocarbonados de interés, se preparan tres tipos de películas: DLC (que no contiene flúor), DLC-F (con un porcentaje de flúor relativamente bajo con estructura de DLC) y CF_X (material polimérico con un alto contenido en flúor). La deposición de las diferentes capas finas se realiza en un reactor de plasma capacitivo de placas paralelas alimentado por una fuente de radiofrecuencia que trabaja a una frecuencia de 13.56 MHz, cuyo esquema se muestra en la *Figura II.1*, junto con una fotografía del mismo.[38] Este reactor consta de dos electrodos cilíndricos de 10 cm de diámetro separados entre sí 2 cm. La potencia de RF se aplica en el electrodo inferior, que actúa como cátodo y sirve de portamuestras. El electrodo superior está conectado al reactor, de forma que su área efectiva es superior a la del inferior, por lo que en este último se genera una corriente de polarización autoinducida negativa que depende de la potencia aplicada en el plasma.[1] El modo de trabajo utilizado consiste en imponer un valor concreto de potencial de autopolarización, de manera que la fuente de radiofrecuencia ajuste la potencia aplicada para conseguir el potencial seleccionado. Los gases de plasma se inyectan en la zona de descarga a través de una serie de orificios hechos en el electrodo superior, controlando el flujo de gases con controladores de flujo másico (Bronkhorst HIGH-TECH B.V., Holanda). Pueden encontrarse más detalles del reactor en trabajos previos.[38, 39]

a)



b)

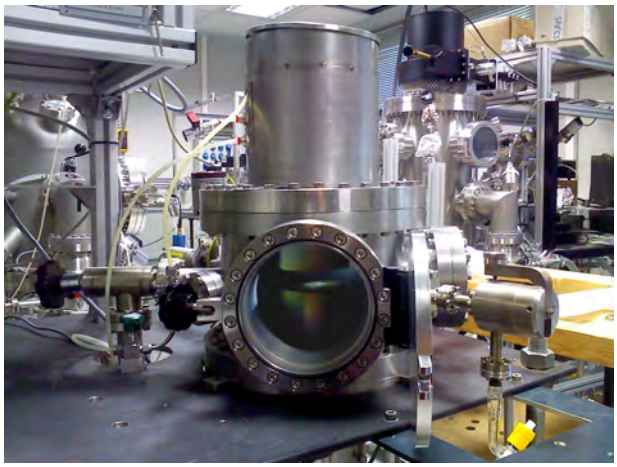


Figura II.1. Esquema (a) y fotografía (b) del reactor de plasma de placas paralelas usado para la deposición de películas delgadas fluorocarbonadas.

Para la deposición de DLC se utiliza una mezcla de acetileno (10 %), hidrógeno (80 %) y argón (10 %), trabajando a una presión de 0.15 mbar y fijando el potencial autoinducido a 200 V. Las láminas de DLC-F se preparan en condiciones de trabajo similares, añadiendo octafluorociclobutano a la mezcla de gases, quedando una mezcla de *c*-C_4F_8 (15 %), acetileno (14 %), hidrógeno (57 %) y argón (14 %), que dan una presión de 0.1 mbar. Por último, las láminas de CF_X se preparan eliminando el hidrógeno y el acetileno de la mezcla gaseosa y ajustando la composición de plasma a *c*-C_4F_8 (50 %) y argón (50 %), con una presión en la cámara de 0.05 mbar.

El efecto del potencial autoinducido se evalúa por comparación con muestras preparadas a 100 V con las mismas mezclas de gases y presiones que en el caso anterior. Se seleccionan estos potenciales debido a que están por encima (200 V) y por debajo (100 V) de la energía umbral propuesta por el modelo de subimplantación de Robertson para este tipo de materiales.[36]

También se preparan muestras de DLC-F y CF_X empleando CF_4 como precursor para ver qué diferencias se producen. Hay que tener en cuenta que si se añade la misma proporción de CF_4, se tiene en el plasma una cantidad de carbono cuatro veces menor que en las preparaciones con *c*-C_4F_8 y la mitad de flúor. Para reducir estas diferencias, se reajustan los porcentajes de precursor. Si se introduce un flujo cuatro veces mayor de CF_4 para tener la misma cantidad de carbono que en el caso anterior, la cantidad de flúor adicionada es el doble que al emplear *c*-C_4F_8; por otra parte, si se añade el doble de CF_4 que de *c*-C_4F_8, se introduce la misma cantidad de flúor, pero la mitad de carbono. Con estas consideraciones, se opta por un flujo de CF_4 tres veces superior al de *c*-C_4F_8. Las mezclas de gases en estos casos son: 33 % de CF_4, 11 % de acetileno, 45 % de hidrógeno y 11 % de argón para DLC-F; y 75 % de CF_4 y 25 % de argón para CF_X.

En todos los casos, los sustratos empleados son obleas de silicio (dopado e intrínseco), que permiten la caracterización de los recubrimientos por Raman y por FT-IR sin interferencia de la señal de sustrato.

La composición química superficial de las películas preparadas se determina mediante espectroscopía de fotoemisión de rayos-X (XPS). Las señales de C 1s

obtenidas pueden dividirse en diferentes componentes atribuibles a diferentes tipos de enlace de carbono a carbono y/o flúor en la capa.

La estructura química se estudia mediante espectroscopías de Raman e infrarrojo (FT-IR). La primera permite conocer la relación de enlaces sp^3/sp^2 de las capas finas; la segunda proporciona información de los diferentes grupos funcionales presentes en las mismas.

Por último, se estima la velocidad de deposición mediante el cociente entre el espesor de las películas y el tiempo de preparación. El espesor se determina por microscopía electrónica de barrido en sección transversal.

Estas técnicas experimentales se describen en el Anexo I.

3.2. Caracterización del plasma.

Se determinan las densidades electrónica e iónica y la temperatura del plasma con las diferentes composiciones mediante medidas con una sonda de Langmuir de dos puntas. Con una punta se aplica una corriente y se recoge la corriente generada entre las dos puntas como resultado de la interacción con el plasma, de manera que puede obtenerse una curva de intensidad-voltaje (I-V). A partir del análisis de esta curva pueden determinarse los valores de temperatura y densidades mencionados aplicando los modelos de Maxwell y de Druyvestein.

Por otra parte, se realiza espectroscopía de emisión óptica (OES), una técnica que analiza la luz emitida por el plasma para detectar las bandas características de diferentes transiciones atribuidas a determinadas especies. Para el tipo de plasmas analizados, se detectan las bandas correspondientes a hidrógeno y/o flúor en cada caso.

Además, se detectan las diferentes especies que se producen en el plasma por fragmentación de los gases introducidos en la cámara mediante espectroscopía de masas. Así, pueden detectarse especies neutras y especies iónicas presentes en la descarga de plasma.

Los detalles experimentales de estas técnicas se recogen en el Anexo I.

4. Resultados y discusión.

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la experimentación llevada a cabo: química superficial y estructura de enlace de los recubrimientos preparados, velocidad de deposición y análisis del plasma para cada mezcla de gases, y el efecto del potencial autoinducido aplicado durante la deposición tanto en las características del plasma como en las de las láminas delgadas obtenidas. Finalmente, se añade una comparación entre plasmas generados con *c*-C_4F_8 y con CF_4 a un único potencial de 200 V.

4.1. Velocidad de deposición y química de las películas fluorocarbonadas en función del potencial autoinducido.

La velocidad de deposición es un parámetro importante a la hora de preparar láminas delgadas. Como puede verse en la *Tabla II.1*, se obtienen valores similares en DLC y CF_X, ligeramente mayores en este último caso, independientemente del potencial autoinducido empleado en la preparación. Las velocidades de deposición correspondientes a las películas de DLC-F son significativamente mayores a las de DLC y CF_X, hecho que podría deberse a un efecto sinérgico de C_2H_2 y *c*-C_4F_8 para promover las reacciones en el plasma que dan lugar a la deposición de la película, además de que en este caso la cantidad de carbono disponible para la deposición de la capa es mayor que en los oros casos. Cabe mencionar que no se observan cambios importantes en los valores obtenidos al disminuir el potencial autoinducido de 200 V a 100 V, apreciándose sólo un leve descenso. Las diferencias en la velocidad de deposición están relacionadas con las características del plasma, como se ve en apartados posteriores. Hay que tener en cuenta que las conclusiones sobre la velocidad de deposición deben tomarse con precaución, debido a que durante la preparación de los tres tipos de compuestos no se dispone de la misma cantidad de carbono y la presión es diferente.

Tabla II.1. Velocidad de crecimiento de las capas finas de DLC, DLC-F y CF_X preparadas a un potencial autoinducido de 200 V y 100 V.

Velocidad de crecimiento (nm/min)	**DLC**		**DLC-F**		**CF_X**	
	200 V	100 V	200 V	100 V	200 V	100 V
	12.8	9.1	22.6	22.3	15.0	14.1

La composición química de los recubrimientos se evalúa a partir de los espectros de XPS. Como puede observarse en los espectros de XPS de la *Figura II.2.a*, en las muestra aparecen los picos característicos de carbono y flúor (este último sólo en el caso de DLC-F y CF_X), además de las señales de oxígeno. Mientras que el carbono y el flúor son los elementos que constituyen las películas formadas, el oxígeno presente es atribuible a contaminación superficial generada tanto en la fabricación de las muestras como en la posterior manipulación al aire.[42] Por otra parte, el espectro de las muestras crecidas a 100 V (*Figura II.2.b*) no presenta cambios notables con respecto a las anteriores, salvo una disminución en la señal de C 1s en la muestra de DLC-F en favor de la señal de F 1s.

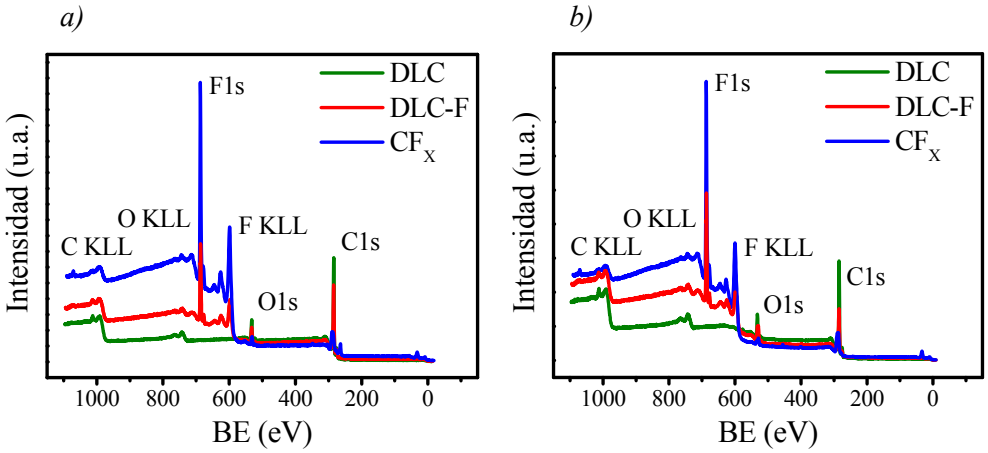


Figura II.2. Espectro de fotoemisión para cada uno de los recubrimientos estudiados preparados con un potencial autoinducido de a) 200 V y b) 100 V.

La composición atómica de cada superficie se estima a partir del área de los picos de fotoemisión de cada uno de los elementos. La *Tabla II.2* reúne los resultados obtenidos para cada tipo de recubrimiento a ambos potenciales. Cabe mencionar que estas cifras son porcentajes relativos que no tienen en cuenta el contenido en hidrógeno (que puede variar notablemente de una muestra a otra) y, por tanto, pueden resultar engañosos a la hora de comparar la composición de los recubrimientos. Por ello, la forma más clara y directa de ver la cantidad de flúor incorporada es la relación F/C, también incluida en la *Tabla II.2*. Con esto se ve claramente que en CF_X se incorpora una cantidad mucho mayor de flúor que en DLC-F. También se observa que la cantidad de oxígeno procedente de contaminación superficial decrece con la adición de flúor en el plasma. Si se comparan las capas preparadas a diferentes potenciales, puede verse que la cantidad de flúor que se incorpora a la capa es notablemente mayor al bajar el potencial autoinducido de 200 V a 100 V; además, la cantidad de oxígeno contaminante disminuye, especialmente en CF_X.

Tabla II.2. Porcentajes atómicos relativos determinados por XPS y relación F/C de las capas finas de DLC, DLC-F y CF_X preparadas a 200 V y 100 V.

Elemento	**DLC**		**DLC-F**		**CF_X**	
	200 V	**100 V**	**200 V**	**100 V**	**200 V**	**100 V**
C (%)	91	93	71	56	43	35
F (%)	0	0	23	39	54	64
O (%)	9	7	6	5	3	1
F/C	0.00	0.00	0.33	0.68	1.25	1.83

En la *Figura II.3* se incluyen los picos de C 1s de los recubrimientos de DLC, DLC-F y CF_X preparados a 200 V y 100 V. Los espectros de DLC (*Figura II.3.a*) presentan una única banda a ambos potenciales. Hay que resaltar que este pico es el resultado de la suma de las señales correspondientes a enlaces C–C y C–H,[43] pero

ambas contribuciones no pueden resolverse, por lo que se consideran conjuntamente como un solo pico, denotado en la figura como C–C(H).

Las señales de C 1s de los compuestos que contienen flúor son más complejas. Como se reporta en diversos trabajos sobre superficies fluorocarbonadas,[10, 44, 45] los picos de C 1s se deben a la suma de las contribuciones de los picos correspondientes a los diferentes tipos de enlace presentes en las capas más superficiales del material. Estos enlaces presentan un grado de polaridad diferente, que se pone de manifiesto mediante variaciones en su energía de enlace. Así, descartando la contribución de enlaces C-O (que es razonable debido al bajo porcentaje de oxígeno presente en la superficie de las muestras, *Tabla II.2*), en la señal de C 1s pueden identificarse varias contribuciones: átomos de carbono unidos directamente a carbono y/o hidrógeno (C–C(H), a 284.6 eV), átomos de carbono unidos a átomos de carbono enlazados, a su vez, a átomos de flúor (C–CF, a 286-287 eV) y átomos de carbono unidos directamente a uno, dos o tres átomos de flúor (C–F, a 288-289 eV; $–CF_2$, a 291-292; y $–CF_3$, a 293 eV). A partir de la deconvolución de las distintas contribuciones que originan la señal de C 1s, se obtiene el porcentaje relativo de cada tipo de carbono, que se incluye entre paréntesis en la *Figura II.3*. En las muestras preparadas a 200 V (*Figuras II.3.b* y *II.3.c (izquierda)*) se observa que en DLC-F aparece una gran cantidad de enlaces C–C(H) y una pequeña proporción de grupos fluorados de tipo –CF y $–CF_2$, predominando los primeros. Por su parte, en CF_X la mayor parte de los átomos de carbono se encuentran unidos a flúor, formándose una proporción elevada de grupos con más de un átomo de flúor (esto es, $–CF_2$ y $–CF_3$). Al disminuir el potencial autoinducido a 100 V (*Figuras II.3.b* y *II.3.c derecha*), la proporción de especies fluoradas aumenta tanto en DLC-F como en CF_X, especialmente los grupos con más de un átomo de flúor, hecho coherente con la mayor incorporación de flúor que tiene lugar en estas condiciones.

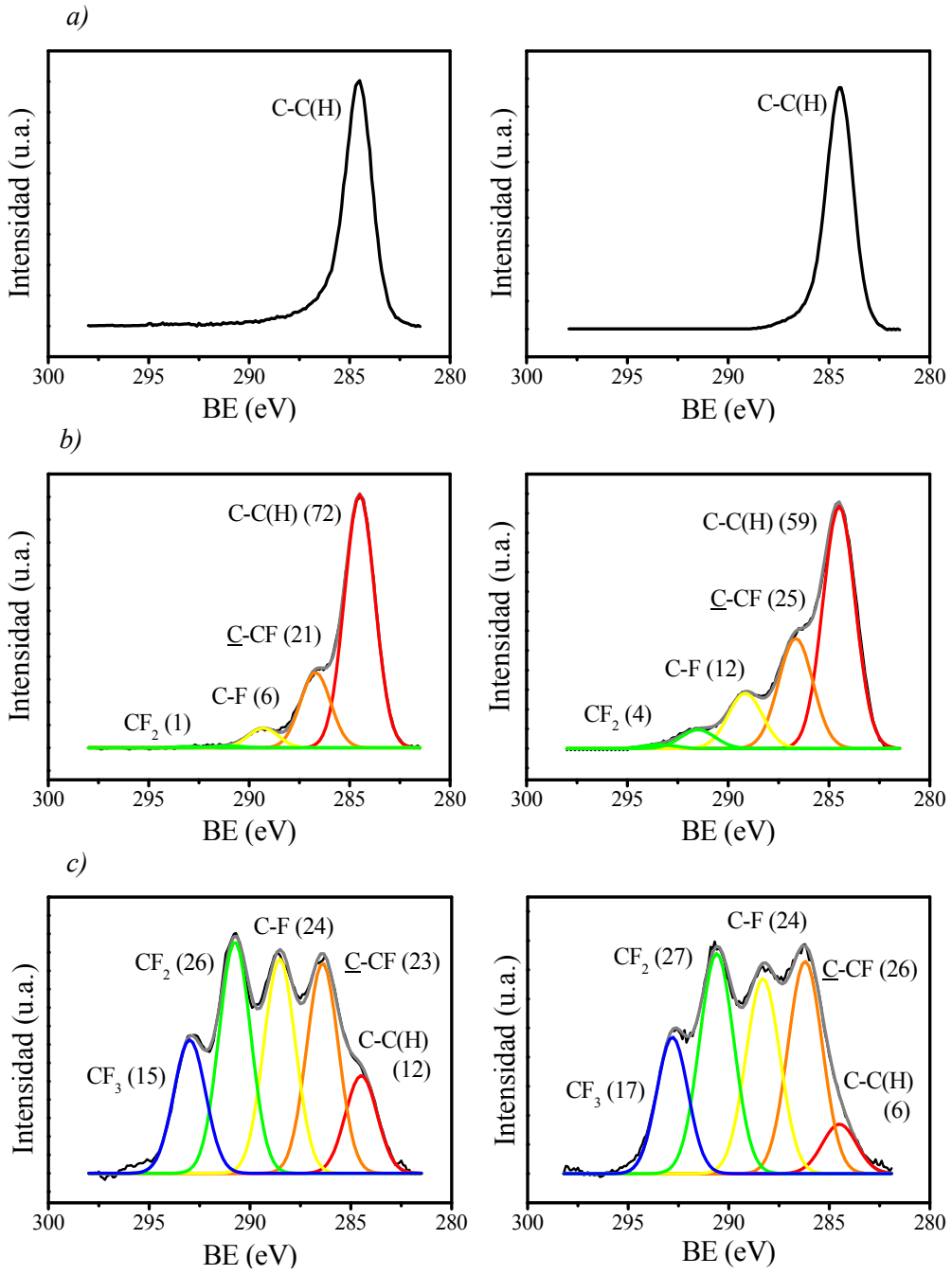


Figura II.3. Señal de fotoemisión correspondiente a C 1s de las películas delgadas de a) DLC, b) DLC-F y c) CF_X preparadas a un potencial autoinducido de 200 V (izquierda) y 100 V (derecha) descompuesta en sus componentes. Entre paréntesis se muestran los porcentajes de cada componente.

4.2. Estructura de enlace de los diferentes recubrimientos: influencia del potencial de autopolarización.

La estructura de enlace de las muestras se determina por espectroscopías Raman y FT-IR, de manera que pueden detectarse los cambios estructurales provocados por los cambios composicionales que se observan por XPS. Los espectros de Raman de las muestras depositadas a 200 V (*Figura II.4.a*) presentan diferencias con la composición de la capa. La forma de éstos es similar a la de espectros reportados para muestras de DLC amorfo hidrogenado (*a*-C:H),[1] de DLC-F[28] y de CF_X.[15] En el espectro de DLC se identifican dos bandas bien definidas situadas a 1376 cm^{-1} y 1578 cm^{-1} debidas a modos de vibración de sitios sp^2, que se designan en la bibliografía como bandas D (1338-1375 cm^{-1}, originada por los modos de respiración de anillos) y G (1580-1600 cm^{-1}, debida a tensiones de enlaces tanto en anillos como en cadenas).[1, 3, 4] La relación de intensidades I(D)/I(G) se determina mediante el ajuste de la curva a dos Gaussianas centradas en las posiciones de las bandas D y G. En el caso de DLC, se puede calcular de forma aproximada el porcentaje de sp^3 presente en la película utilizando el valor de I(D)/I(G) y el desplazamiento de la banda G,[1] obteniéndose los datos de la *Tabla II.3*. Este ajuste proporciona un valor de I(D)/I(G) de 0.6, que se corresponde con una estructura de carbono formada por una proporción relativamente elevada de enlaces sp^2,[3,4] (en torno al 65 %). Este dato, junto con el bajo contenido en hidrógeno (que se conoce por caracterizaciones previas), son indicios de que se trata de un DLC de alta dureza.[1] Por otro lado, la muestra de DLC-F presenta un espectro prácticamente idéntico al anterior, típico de este compuesto,[28] de donde se deduce que la estructura química debe ser similar a la de DLC; las diferencias químicas entre ellos residen en la sustitución de parte de los átomos de hidrógeno por átomos de flúor sin alterar la estructura tridimensional del compuesto.[46, 47] La estimación del porcentaje de sp^3 descrita en la literatura se corresponde estrictamente con DLC, sin contenido en flúor,[1] pero puede extrapolarse a DLC-F y, con mayor precaución, a CF_X para obtener un dato aproximado de la proporción de enlaces sp^3 (datos incluidos en la *Tabla II.3*). En cuanto al CF_X, se observan cambios importantes tanto en la posición

de las bandas como en la forma del espectro, coherente con los resultados reportados.[15] Así, mientras que la banda G se ensancha, la banda D sufre un desplazamiento importante hacia menor número de ondas, además de la disminución drástica de su intensidad relativa, consecuente con una estructura formada por pequeñas cadenas poliméricas con enlaces sp^3 donde la mayor parte de los átomos de carbono se encuentran enlazados a átomos de flúor. Si se realiza un cálculo similar a los anteriores, se observa un porcentaje de sp^2 muy pequeño, que confirma el carácter polimérico de este compuesto.

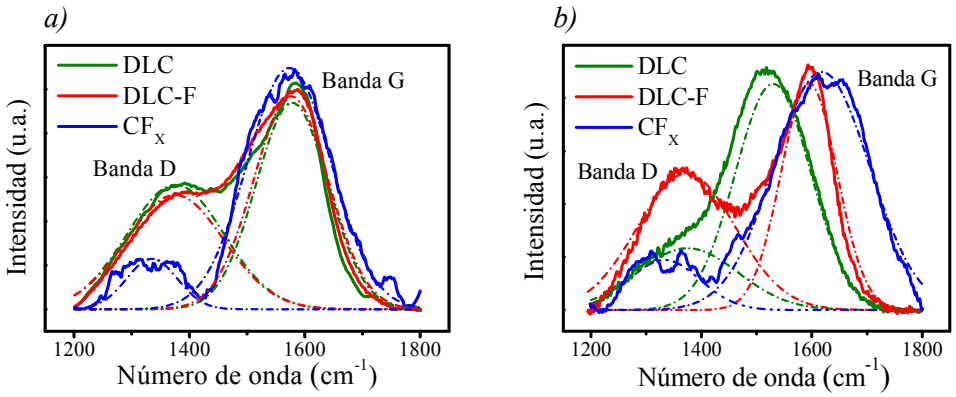


Figura II.4. Espectros de Raman de láminas delgadas de DLC, DLC-F y CF_X preparadas a un potencial autoinducido de a) 200 V y b) 100 V.

Tabla II.3. Características de los espectros de Raman de las capas finas de DLC, DLC-F y CF_X preparadas a un potencial autoinducido de 200 V y 100 V.

Elemento	DLC		DLC-F		CF_X	
	200 V	100 V	200 V	100 V	200 V	100 V
Posición D (cm-1)	1376	1375	1375	1375	1335	1333
Posición G (cm-1)	1578	1530	1576	1580	1573	1618
Relación de áreas	0.94	0.39	0.97	1.04	0.11	0.13
I(D)/I(G)	0.60	0.28	0.54	0.52	0.21	0.21
sp^3 (%)	35	55	35	35	>85	>85

Cuando las muestras se preparan con un potencial autoinducido de 100 V, se producen cambios significativos en el espectro de Raman (*Figura II.4.b*), que se manifiestan en los datos recogidos en la *Tabla II.3*. En primer lugar, en DLC se observa un desplazamiento de la banda G hacia valores inferiores y una disminución importante en la intensidad de la banda D, resultando un mayor porcentaje de enlaces sp^3 que en el caso anterior. Esto es indicativo de un carácter más polimérico del compuesto. En segundo lugar, se observa que el espectro de DLC-F cambia de forma presentando picos más estrechos, con un desplazamiento importante de la banda G y un aumento sensible de la relación I(D)/I(G). Estas observaciones son acordes con los cambios en los espectros que se producen al incorporar una mayor cantidad de flúor en este tipo de compuestos.[28] Por último, el espectro de la muestra de CF_X presenta un desplazamiento de la banda G, que se sitúa ahora a 1618 cm^{-1}, consecuencia de la mayor adición de flúor observada.[15] Por su parte, la relación de intensidades D/G y el porcentaje de enlaces sp^3 (*Tabla II.3*) se mantienen prácticamente constantes, de forma que no se observan cambios estructurales a pesar de la fluoración más efectiva que tiene lugar para estos valores de autopolarización.

El espectro de FT-IR de las muestras se recoge en la *Figura II.5* junto con la asignación de las diferentes bandas de acuerdo con la literatura.[48-50] Los datos obtenidos a 200 V (*Figura II.5.a*) apoyan las conclusiones arrojadas por los espectros de Raman. Las estructuras de enlace sp^2 (bandas $CH_xF_y = CH_xF_y$ alrededor de 1700 cm^{-1} y $CH_x = CH_x$ a unos 2900 cm^{-1}) presentan diferentes evoluciones. Las bandas de $CH_x = CH_x$ son mucho más intensas en las capas de DLC que en las de DLC-F debido a la mayor cantidad de enlaces C–H presentes en la primera estructura,[48-50] y prácticamente inexistentes en CF_X. Por otro lado, las bandas de $CH_xF_y = CH_xF_y$ son más intensas en DLC-F que en CF_X puesto que en este último existe un porcentaje muy bajo de enlaces sp^2 correspondientes a dobles enlaces. Sin embargo, la banda correspondiente a la estructura $–CF_2$ es mucho más intensa en el caso de CF_X (dato coherente con el mayor porcentaje de este grupo mostrado en la *Figura II.3.c*) y se sitúa a 1266 cm^{-1}. La anchura de esta última banda en DLC-F, localizada en este caso a 1102 cm^{-1}, indica una cierta heterogeneidad en su entorno local.

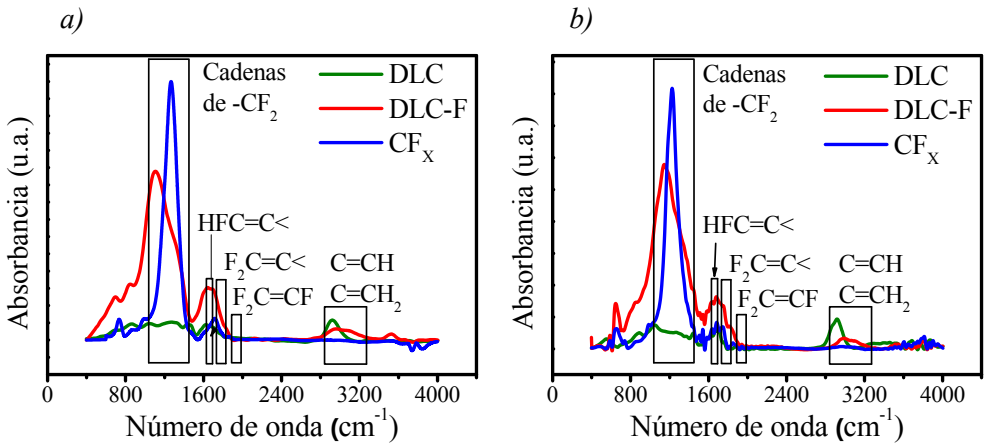


Figura II.5. Espectros de FT-IR de láminas delgadas de DLC, DLC-F y CF_X preparadas a un potencial autoinducido de a) 200 V y b) 100 V.

En contraposición con lo sucedido en los espectros de Raman, al disminuir el potencial autoinducido (*Figura II.5.b*) no se aprecian modificaciones importantes en el espectro de FT-IR de las muestras obtenidas. En este caso, sólo se observan pequeñas variaciones en la intensidad de las bandas y un desplazamiento en la posición de la banda de $–CF_2$ tanto en CF_X (1226 cm^{-1}) como en DLC-F (1160 cm^{-1}), siendo esta última un poco más estrecha que en las condiciones anteriores.

Con los resultados conjuntos de XPS, Raman y FT-IR se llega a la conclusión de que tanto las muestras de DLC como las de DLC-F presentan estructuras tridimensionales sp^3/sp^2 típicas de DLC hidrogenado. Esto evidencia que al introducir flúor en la composición del plasma se produce la sustitución de cierta cantidad de átomos de hidrógeno de la estructura por átomos de flúor, sin alterar en gran medida las posiciones de los átomos de carbono en la estructura de DLC. Por su parte, las películas de CF_X están formadas por cadenas relativamente cortas con estructuras de tipo sp^3 y un alto porcentaje de grupos $–CF_2$ y $–CF_3$ terminales. Además, modificando el potencial autoinducido aplicado durante la deposición se pueden modificar la composición y estructura de los recubrimientos. Se demuestra así que es posible modificar la composición y estructura de recubrimientos fluorocarbonados preparados por PECVD controlando la relación carbono/hidrógeno/flúor en el plasma y el potencial autoinducido de preparación.

4.3. Análisis del plasma.

En este apartado, se presentan los resultados del análisis de los plasmas empleados durante la deposición de los tres tipos de películas delgadas con un potencial autoinducido de 200 V. Se muestran, además, los cambios que se producen cuando el potencial autoinducido disminuye a 100 V y cuando el *c*-C_4F_8 se sustituye por CF_4.

4.3.1. Caracterización de plasmas de *c*-C_4F_8 para la deposición a 200 V.

La densidad electrónica del plasma (N_e) determinada a partir de medidas con la sonda de Langmuir varía con la composición de la mezcla de gases introducida en el reactor de plasma. A 200 V, la mayor densidad electrónica se obtiene para las condiciones de preparación de láminas de CF_X ($8 \cdot 10^{15}$ m^{-3}) y decrece con la cantidad de flúor presente, en el orden CF_X > DLC-F > DLC, siendo los valores correspondientes a DLC y DLC-F muy similares entre sí (en torno a $4 \cdot 10^{15}$ m^{-3}). Estos valores corresponden a medidas realizadas en el espacio interelectrodo, y son significativamente mayores a los encontrados en las zonas externas, probando que el plasma está bien concentrado entre los electrodos. Las densidades iónicas medidas en estas condiciones (N_i, datos no mostrados) son levemente mayores que las correspondientes densidades electrónicas, siguiéndose la misma tendencia, de lo que se deduce que el plasma se encuentra en condiciones de no equilibrio. La temperatura electrónica sigue la misma tendencia que N_e y N_i, con valores que varían desde 2.5 eV para CF_X hasta 0.5 eV para DLC. Adicionalmente se observa que la potencia aplicada para mantener el potencial autoinducido (mostrada en la electrónica de control de la fuente) varía en la misma dirección. Estos datos se recogen en la *Tabla II.4*.

Tabla II.4. Densidad electrónica (N_e), temperatura electrónica (T_e) y potencia de la descarga de plasma durante la deposición de capas finas de DLC, DLC-F y CF_X preparadas a un potencial de autopolarización de 200 V y 100 V.

Tipo de capa	**200 V**			**100 V**		
	N_e (m^{-3})	T_e (eV)	Potencia (W)	N_e (m^{-3})	T_e (eV)	Potencia (W)
DLC	$3.8 \cdot 10^{15}$	0.5	8	$1.2 \cdot 10^{15}$	0.7	3
DLC-F	$4.3 \cdot 10^{15}$	1.9	15	$1.8 \cdot 10^{15}$	3.0	10
CF_X	$8 \cdot 10^{15}$	2.5	27	$2.5 \cdot 10^{15}$	4.0	20

En la *Figura II.6* se incluye, a modo de ejemplo, el análisis llevado a cabo para la determinación de estos parámetros en condiciones de preparación de CF_X a 200 V. Las *Figuras II.6.a, II.6.b y II.6.c* muestran la curva I-V del plasma y su primera y segunda derivada, respectivamente. Integrando estas curvas puede obtenerse la función de distribución de energía de los electrones FDEE que, como muestra la *Figura II.6.d*, puede describirse más adecuadamente por el modelo de Druyvesteyn que por el de Maxwell, tratándose, por tanto, de un plasma que no se encuentra en equilibrio. A partir de este modelo, pueden calcularse la densidad y la temperatura electrónicas (véase Anexo I).

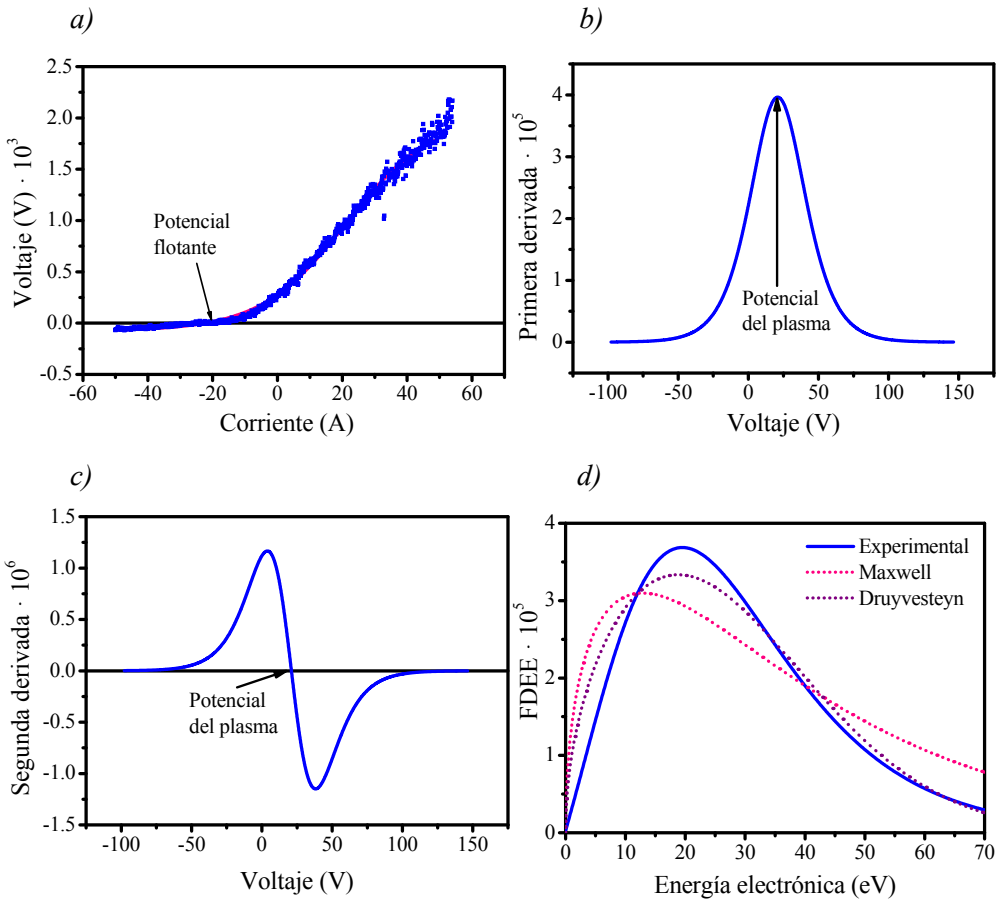


Figura II.6. Análisis de la descarga de plasma durante la deposición de CF_X a 200 V: a) curva I-V y su b) primera derivada y c) segunda derivada. d) Función de distribución de la energía de los electrones.

La intensidad del plasma varía con la composición de la mezcla de gases. Estas diferencias van en paralelo a la potencia del plasma y pueden analizarse mediante espectroscopía de emisión óptica. Los espectros de OES registrados durante la deposición de los tres tipos de capas a este potencial se muestran en la *Figura II.7*. En la zona espectral analizada aparecen las transiciones características atribuidas a especies CF (a valores de 220-265 nm) y CF_2 (245-325 nm), así como la transición de hidrógeno H_β que aparece a 486 nm.[51] Además de estas bandas bien definidas, se detectan algunas bandas de baja intensidad debido a átomos de flúor para CF_X y DLC-F en la zona de 685 a 735 nm (zona no mostrada en la figura), aunque su

atribución no es clara ya que en esta región también se detectan transiciones de argón.[51] De estos espectros se concluye que la adición del precursor *c*-C_4F_8 en el plasma produce la aparición de radicales CF y CF_2 cuyas bandas presentan mayor intensidad en las condiciones de deposición de CF_X. Por su parte, las especies H* aparecen en las capas de DLC y DLC-F, y están ausentes en CF_X.

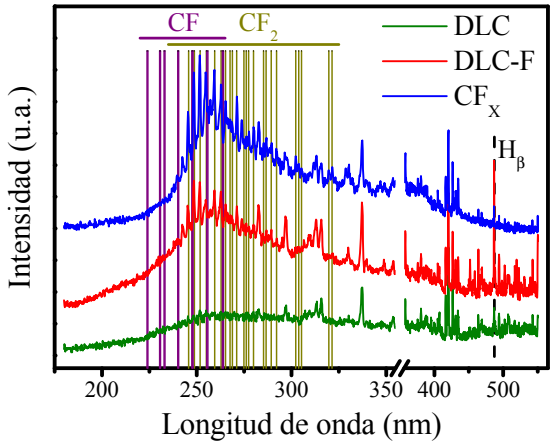


Figura II.7. Espectros de emisión óptica correspondientes a láminas delgadas de DLC, DLC-F y CF_X preparadas a un potencial autoinducido de 200 V.

El análisis por espectrometría de masas proporciona información adicional de la química del plasma en las diferentes condiciones de preparación. Las *Figuras II.8.a* y *II.8.b*, muestran las diferencias en la intensidad relativa de las especies (neutras e iónicas, respectivamente) presentes en el plasma durante la deposición de los tres tipos de películas. Para mayor simplicidad, se reduce el número de picos representando los fragmentos que incluyen átomos de hidrógeno (condiciones de preparación de DLC y DLC-F) conjuntamente con los correspondientes grupos sin hidrógeno, de forma que se suman sus intensidades para obtener la intensidad de cada barra (por ejemplo, el pico de CF_2H se incluye en el pico de CF_2). Esta simplificación es aceptable dado que los fragmentos que contienen hidrógeno presentan intensidades mucho menores que sus especies parentales. Como muestran estos espectros, se producen cambios importantes en las especies generadas en el plasma y su proporción relativa al cambiar la composición de gases introducidos en el reactor.

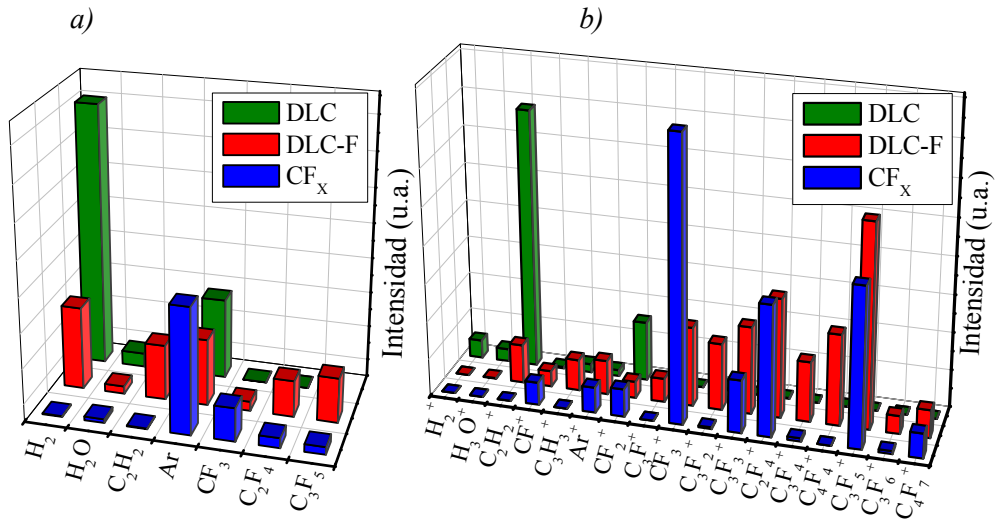


Figura II.8. Espectros de masas de las especies a) neutras y b) iónicas detectadas en el plasma durante la preparación de recubrimientos de DLC, DLC-F y CF_X a un potencial autoinducido de 200 V.

En la *Tabla II.5* se incluyen las intensidades relativas referenciadas a Ar^+ de los iones que aparecen para las tres composiciones de plasma empleando un potencial autoinducido de 200 V. En ella se observa que los picos de H/H_2 y C_2H_x son bastante abundantes en las condiciones de fabricación de DLC y DLC-F, mientras que en las de CF_X no se detectan masas inferiores a 27 uma. En el plasma de DLC, no se encuentran especies por encima de 27 uma, pero en los plasmas con flúor aparecen una serie de picos que se atribuyen a especies CF_2 y CF (unidas o no a hidrógeno), hecho consistente con los datos obtenidos por OES (*Figura II.7*). En estos casos aparecen, además, una serie de fragmentos de C_xF_y con x = 2, 3, 4 con intensidades variables que se forman en las primeras etapas de fragmentación del precursor *c*-C_4F_8. En el caso de DLC-F, estos últimos fragmentos, además de las especies C_2H_x, se relacionan con las altas velocidades de deposición encontradas para este material (reportadas en la *Tabla II.1*). La menor intensidad de los picos de mayor masa en CF_X provocada por una mayor disociación del precursor, se debe a que en DLC-F se produce una competencia entre C_2H_2/H_2 y *c*-C_4F_8 por los electrones durante los estados iniciales de las reacciones en cadena del plasma.

Finalmente, la observación conjunta de la *Figura II.7* y la *Tabla II.5* muestra una alta intensidad de las especie CF_3 y CF_3^+, principalmente en CF_X. La mayor intensidad de estas especies y de la especie CF_2^+ en plasmas de CF_X es coherente con la mayor concentración de grupos $–CF_2$ y $–CF_3$ presentes en las capas de CF_X respecto a DLC-F (*Figura II.3*). El perfil patrón de los fragmentos fluorados detectados durante la deposición de DLC-F y CF_X está de acuerdo con la fragmentación de moléculas de *c*-C_4F_8 en plasma descrita en estudios previos.[31-35]

Tabla II.5. Intensidad relativa de los diferentes iones detectados por espectrometría de masas en plasmas a un potencial autoinducido de 200 V.

Ión	**DLC**	**F-DLC**	**CF_X**	**Ión**	**DLC**	**F-DLC**	**CF_X**
H_2^+	3.00	0	0.00	- Continuación -			
H_3O^+	2.08	0.01	0.00	$C_3F_2^+$	0.00	1.96	0.06
$C_2H_2^+$	43.33	1.13	0.00	$C_3F_3^+$	0.00	2.56	2.05
CF^+	0.00	0.45	0.88	$C_2F_4^+$	0.00	3.50	5.11
$C_3H_3^+$	1.40	0.91	0.00	$C_3F_4^+$	0.00	1.76	0.12
Ar^+	***1.00***	***1.00***	***1.00***	$C_4F_4^+$	0.00	2.67	0.00
$C_4H_y^+$/ CF_2^+	9.91	0.48	1.09	$C_3F_5^+$	0.00	6.00	6.26
C_3F^+	0.00	0.69	0.06	$C_3F_6^+$	0.00	0.53	0.12
CF_3^+	0.00	2.32	11.11	$C_4F_7^+$	0.00	0.82	0.97

4.3.2. Efecto del potencial autoinducido en las propiedades del plasma.

Como reflejan los resultados reportados en los Apartados 4.1 y 4.2 del presente capítulo, la disminución del potencial autoinducido de 200 V a 100 V durante la preparación de láminas delgadas de DLC, DLC-F y CF_X provoca una serie de

cambios composicionales y estructurales, que deben estar relacionados con modificaciones en el plasma.

En primer lugar, con el descenso de potencial autoinducido se observa un decrecimiento importante de las densidades electrónicas respecto a las condiciones anteriores, en el mismo orden CF_X > DLC-F > DLC ($2.5 \cdot 10^{15}$ m^{-3}, $1.8 \cdot 10^{15}$ m^{-3} y $1.2 \cdot 10^{15}$ m^{-3}, respectivamente, como se observan en la *Tabla II.4*). Las densidades iónicas son ligeramente superiores a las electrónicas (datos no mostrados), y ambos parámetros disminuyen en paralelo con la disminución del potencial autoinducido. La temperatura electrónica es mayor en este caso, variando desde 0.7 eV para DLC hasta 4.0 eV para CF_X. En cuanto a la potencia aplicada, por su parte, disminuye con el potencial autoinducido, siendo de 3 W, 10 W y 20 W para las condiciones de DLC, DLC-F y CF_X, respectivamente. Cabe mencionar también que, a pesar de la menor densidad de especies y potencia en el plasma a 100 V y su mayor temperatura electrónica, las velocidades de crecimiento no son mucho menores que las registradas a 200 V (véase *Tabla II.1*). Este dato podría atribuirse al hecho de que en el crecimiento de láminas delgadas intervienen dos fenómenos en competencia, la deposición y el desbastado: a 200 V la deposición probablemente sea más importante que a 100 V, pero también se intensifica el *etching* debido a la acción con los iones altamente energéticos acelerados por el potencial de la vaina.[1]

Los espectros de emisión óptica registrados a un potencial de autopolarización de 100 V son prácticamente idénticos a los representados en la *Figura II.7*.

Por su parte, los espectros de masas difieren notablemente al cambiar el potencial de autopolarización, especialmente en las muestras que contienen flúor. En estos casos, el descenso de potencial produce un aumento en la intensidad relativa de los fragmentos fluorados con mayor número másico, como ejemplifican los espectros de la *Figura II.9* correspondientes a plasmas de deposición de DLC-F. Esta figura muestra que a menor voltaje la intensidad de los picos correspondientes a masas mayores ($C_2F_4/C_2F_4^+$, $C_3F_5/C_3F_5^+$, $C_4F_4^+$, $C_4F_5^+$, $C_3F_6^+$ y $C_4F_7^+$) es mayor, lo que da idea de la menor fragmentación producida en estas condiciones, coherente con un descenso en la densidad electrónica observada. Los espectros de CF_X muestran resultados análogos (datos no mostrados).

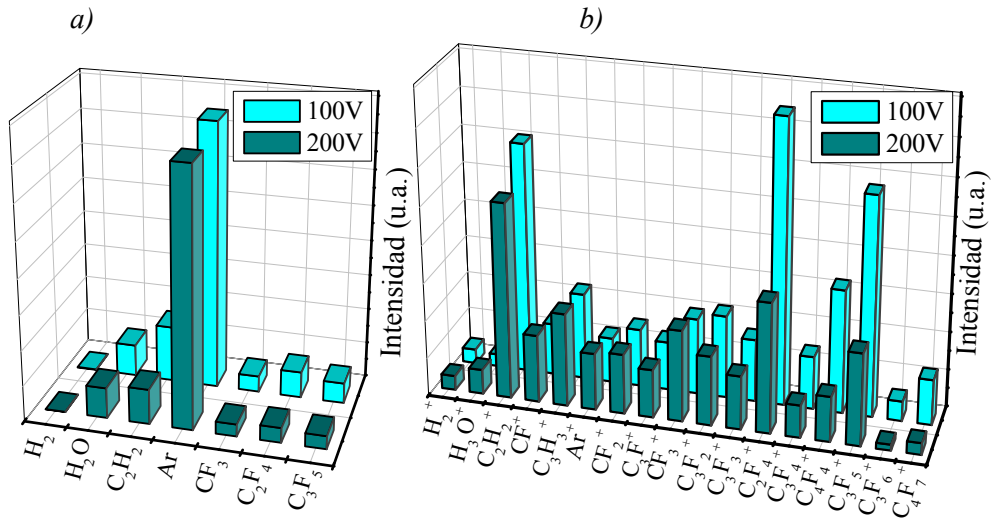


Figura II.9. Espectros de masas de las especies a) neutras y b) iónicas detectadas en el plasma durante la preparación de recubrimientos de DLC-F a diferentes potenciales de autopolarización.

La alta intensidad de unidades estructurales fluoradas de alta masa a 100 V produce una estructura de cadenas, que refuerzan el carácter polimérico (con una proporción elevada de enlaces sp^3) observado en estos materiales frente a sus homólogos preparados a 200 V, como se presenta en el análisis estructural realizado anteriormente (Apartado 4.2). Por otra parte, a menor voltaje deben reducirse los efectos del bombardeo iónico, incluyendo algún *sputtering* preferencial de átomos de flúor, hecho que explica el incremento en el contenido de éste (*Tabla II.2*).

4.3.3. Caracterización de la descarga de plasma en función del precursor de flúor empleado: CF_4 frente a *c*-C_4F_8.

Según los resultados arrojados por el análisis del plasma, la deposición de películas de DLC-F y de CF_X está vinculada fundamentalmente a la presencia de fragmentos C_xF_y ($x \geq 2$) en el mismo. Para comprobar el efecto de estas especies se preparan láminas delgadas de DLC-F y CF_X empleando CF_4 como precursor. Con este compuesto la velocidad de deposición de las películas de CF_X es prácticamente

despreciable, mientras que la capa de DLC-F se forma a velocidades de crecimiento inferiores a las obtenidas con *c*-C_4F_8. El análisis de los espectros de masas registrados en condiciones de preparación de DLC-F y CF_X persigue explicar estos fenómenos. En las condiciones de preparación de DLC-F empleando CF_4 como precursor (*Figura II.10*), se observa que existe una alta proporción las especies CF, CF_2 y, especialmente, CF_3, mientras que no se detectan (o tienen una intensidad muy baja) especies de tipo C_xF_y o C_2H_y, que sí están presentes con *c*-C_4F_8. En condiciones de preparación de CF_X (*Figura II.11*), al utilizar CF_4 desaparecen las especies de más de un átomo de carbono (que sí aparecen con *c*-C_4F_8), quedando sólo especies de tipo CF, CF_2 y, sobre todo, CF_3. Estas diferencias en los patrones de fragmentación pueden ser la causa de la menor capacidad de CF_4 para depositar capas finas, unida al efecto de desbastado químico producido por especies fluoradas, especialmente CF_2[52] formadas por la fragmentación de CF_4.

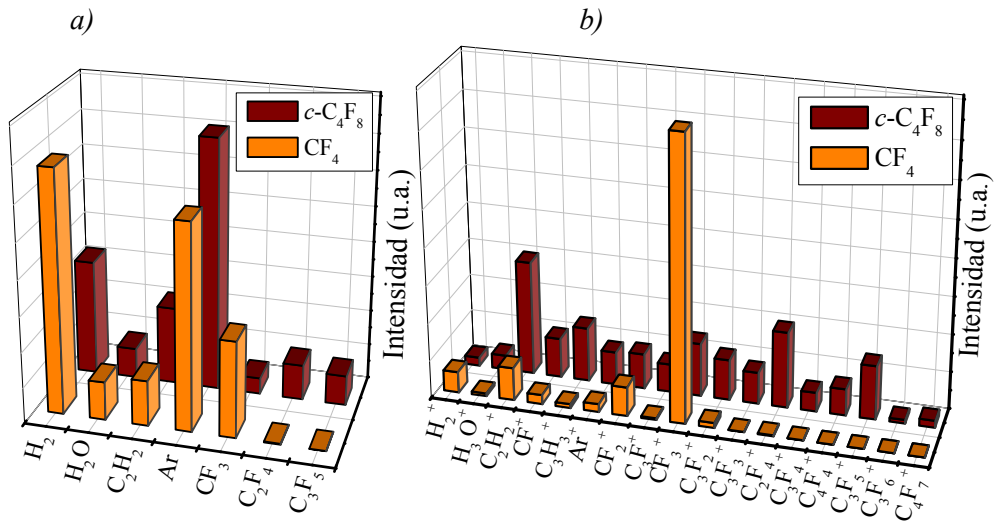


Figura II.10. Espectros de masas de las especies a) neutras y b) iónicas detectadas en el plasma durante la preparación de recubrimientos de DLC-F a un potencial de autopolarización de 200 V con c-C_4F_8 y CF_4.

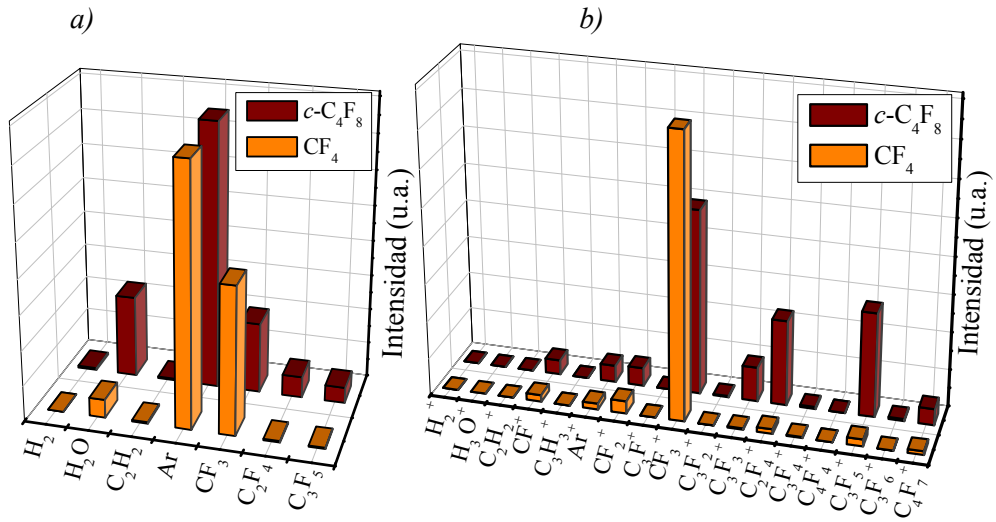


Figura II.11. Espectros de masas de las especies a) neutras y b) iónicas detectadas en el plasma durante la preparación de recubrimientos de CF_X a un potencial de autopolarización de 200 V con c-C_4F_8 y CF_4.

5. Resumen y conclusiones.

En el presente capítulo se muestra que pueden prepararse materiales fluorocarbonados con diferente relación F/C dependiendo de la mezcla de gases empleada en el proceso de PECVD. En concreto, en un plasma de argón con acetileno e hidrógeno se obtienen capas con estructuras tridimensionales con enlaces sp^3 y sp^2 típicas de DLC. Al introducir un precursor de flúor en el reactor de plasma, estas estructuras presentan sustitución de átomos de hidrógeno por flúor sin variaciones estructurales significativas (estructuras de tipo DLC-F). En ausencia de hidrógeno y acetileno en el plasma, se producen capas fluorocarbonadas de CF_X con una estructura de carácter polimérico formada por cadenas cortas con numerosos grupos de tipo $–CF_2$ y $–CF_3$.

Las diferencias entre las distintas muestras se correlacionan con variaciones en las características del plasma empleado durante la preparación. El análisis de la descarga de plasma de DLC muestra la presencia de una cantidad importante de

hidrógeno en el plasma, con densidades electrónicas e iónicas relativamente bajas. En DLC-F se observa una disociación poco eficaz de *c*-C_4F_8 debido a la competencia de éste con C_2H_2/H_2, además de un aumento en la densidad electrónica e iónica respecto a las condiciones anteriores. También se detecta una alta proporción de especies de tipo C_xF_y ($x \geq 2$) y C_2H_x responsables de la alta velocidad de crecimiento de este tipo de películas. Las descargas de plasma generadas para la deposición de capas de CF_X presentan mayor potencia que las utilizadas para preparar DLC-F y en ellas se produce una mayor fragmentación del precursor fluorado, lo que produce láminas delgadas poliméricas formadas por cadenas cortas con alto contenido en grupos altamente fluorados.

Al disminuir el potencial autoinducido se obtienen plasmas con mayor T_e y menor potencia, que conducen a una menor fragmentación de los gases introducidos. Estas condiciones producen N_e y N_i menores y una mayor proporción de fragmentos fluorados de alta masa que conducen a un aumento en el carácter polimérico de las capas. Por otra parte, se produce un aumento de la cantidad de flúor incorporada, probablemente debido a una reducción del desbastado iónico preferencial de flúor que tiene lugar a potenciales elevados. Además, el descenso de la capacidad de deposición compensa la reducción del *etching* producido por las especies del plasma, obteniéndose velocidades de crecimiento similares a 100 V y a 200 V.

Por último, se comprueba que al emplear CF_4 como precursor fluorado no se producen especies del tipo C_xF_y y C_2H_y, que conllevan una reducción de la velocidad de crecimiento de películas fluorocarbonadas, quedando demostrado el papel que ejercen estos grupos en la formación de recubrimientos. Además, aparece una mayor cantidad de CF, CF_2 y CF_3. Se conoce que las especies de CF_2 producen *etching*, dificultando aún más el desarrollo de películas con CF_4.

6. Referencias.

[1] J. Robertson. “Diamond-like amorphous carbon”. Materials Science and Engineering Research, 37:129-281 (2002).

[2] F. Truica-Marasescu, M. R. Wertheimer. "Nitrogen-rich plasma-polymer films for biomedical applications". Plasma Processes and Polymers, 5:44-57 (2008).

[3] A. C. Ferrari, J. Robertson. "Interpretation of Raman spectra of disordered and amorphous carbon". Physical Review B, 61:14095-14107 (2000).

[4] A. C. Ferrari, J. Robertson. "Resonant Raman spectroscopy of disordered, amorphous, and diamondlike carbon". Physical Review B, 64:075414 (2001).

[5] H. R. Aryal, S. Adhikari, S. Adhikary, H. Uchida, M. Umeno. "Characteristics of nitrogen doped diamond-like carbon thin films grown by microwave surface-wave plasma CVD". Diamond and Related Materials, 15:1906-1908 (2006).

[6] S. C. Trippe, R. D. Mansano, F. M. Costa, R. F. Silva. "Mechanical properties evaluation of fluor-doped diamond-like carbon coatings by nanoindentation". Thin Solid Films, 446:85-90 (2004).

[7] H. Ji, A. Coté, D. Koshel, B. Terreault, G. Abel, P. Ducharme, G. Ross, S. Savoie, M. Gagné. "Hydrophobic fluorinated carbon coatings on silicate glaze and aluminum". Thin Solid Films 405:104-108 (2002).

[8] D. K. Sarkar, M. Farzaneh, R. W. Paynter. "Wetting and superhydrophobic properties of PECVD grown hydrocarbon and fluorinated-hydrocarbon coatings". Applied Surface Science, 256:3698-3701 (2010).

[9] P. Gonon, A. Sylvestre. "Dielectric properties of fluorocarbon thin films deposited by radio frequency sputtering of polytetrafluoroethylene". Journal of Applied Physics, 92:4584-4589 (2002).

[10] K. Ozeki, I. Nagashima, K. K. Hirakuri. "Adsorptive properties of albumin, fibrinogen, and *c*-globulin on fluorinated diamond-like carbon films coated on PTFE". Journal of Materials Science-Materials in Medicine, 21:1641-1648 (2010).

[11] H. Biederman, S. M. Ojha, L. Holland. "The properties of fluorocarbon films prepared by r.f. sputtering and plasma polymerization in inert and active gas". Thin Solid Films, 41:329-339 (1977).

[12] G. Tang, X. Ma, M. Sun, X. Li. "Mechanical characterization of ultra-thin fluorocarbon films deposited by R.F. magnetron sputtering". Carbon, 43:345-350 (2005).

[13] D. Koshel, H. Ji, B. Terreault, A. Coté, G. G. Ross, G. Abel, M. Bolduc. "Characterization of CF_X films plasma chemically deposited from C_3F_8/C_2H_2 precursors". Surface and Coatings Technology, 173:161-171 (2003).

[14] A. Milella, R. di Mundo, F. Palumbo, P. Favia, F. Fracassi, R. d'Agostino. "Plasma nanostructuring of polymers: different routes to superhydrophoblicity". Plasma Processes and Polymers, 6:460-466 (2009).

[15] S. Schmidt, G. Greczynski, C. Goyenola, G. K. Gueorguiev, Zs. Czigány, J. Jensen, I. G. Ivanov, L. Hultman. "CF_X thin solid films deposited by high power impulse magnetron sputtering: Synthesis and characterization". Surface and Coatings Technology, 206:646-653 (2011).

[16] R. S. Butter, D. R. Waterman, A. H. Lettington, R. T. Ramos, E. J. Fordham. "Production and wetting properties of fluorinated diamond-like carbon coatings". Thin Solid Films, 311:107-113 (1997).

[17] H. Kim, J.-K. Shin, D. H. Kwon, H. I. Seo, G. S. Lee. "Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition growth of fluorinated amorphous carbon thin films using C_4F_8 and Si_2H_6/He for low-dielectric-constant intermetallic-layer dielectrics". Japanese Journal of Applied Physics, 44:4886-4890 (2005).

[18] M. Hakovirta, R. Verda, X. M. Xe, M. Nastasi. "Heat resistance of fluorinated diamond-like carbon films". Diamond and Related Materials, 10:1486-1490 (2001).

[19] A. Baby, C. M. O. Mahony and P. D. Maguire. "Acetylene-argon plasmas measured at a biased substrate electrode for diamond-like carbon deposition: Part 1: Mass spectrometry". Plasma Sources Sci. Technol. 20:015003 (2011).

[20] A. Baby, C. M. O. Mahony, P. Lemoine and P. D. Maguire. "Acetylene - argon plasmas measured at a biased substrate electrode for diamond-like carbon deposition. Part 2: Ion Energy Distributions". Plasma Sources Science and Technology, 20:015004 (2011).

[21] E. Kawamura, V. Vahedi, M. A. Lieberman, C. K. Birdsall. "Ion energy distributions in rf sheaths; review, analysis and simulation". Plasma Sources Science and Technology, 8:R45-R64 (1999).

[22] W. Guo, H. H. Sawin. "Review of profile and roughening simulation in microelectronics plasma *etching*". Journal of Physics D-Applied Physics, 42:194014 (2009).

[23] H. Janseny, H. Gardeniers, M. de Boer, M. Elwenspoek, J. Fluitman. "A survey on the reactive ion *etching* of silicon in microtechnology". Journal of Micromechanics and Microengineering, 6:14-28 (1996).

[24] F. Bailly, T. David, T. Chevolleau, M. Darnon, N. Posseme, R. Bouyssou, J. Ducote, O. Joubert, O. Cardinaud. "Roughening of porous SiCOH materials in fluorocarbon plasmas". Journal of Applied Physics, 108:14906 (2010).

[25] H. Ito, T. Kuwahara, Y. Higuchi, N. Ozawa, S. Samukawa, M. Kubo. "Chemical reaction dynamics of SiO_2 *etching* by CF_2 radicals: tight-binding quantum chemical molecular dynamics simulations". Japanese Journal of Applied Physics, 52:026502 (2013).

[26] L. Valentini, E. Braca, J. M. Kenny, L. Lozzi, S. Santucci. "Relationship between the optical and mechanical properties of fluorinated amorphous carbon thin films". Journal of Non-Crystlline Solids, 291:153-159(2001).

[27] A. Lamperti, C. E. Bottani, P. M. Ossi. "Elemental distribution in fluorinated amorphous carbon thin films". Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 16:126-131 (2005).

[28] C. E. Bottani, A. Lamperti, L. Nobili, P. M. Ossi. "Structure and mechanical properties of PACVD fluorinated amorphous carbon films". Thin Solid Films, 433:149-154 (2003).

[29] O. Kylián, M. Drábik, O. Polonskyi, J. Čechvala, A. Artemenko, I. Gordeev, A. Choukourov, I. Matolínová, D. Slavínská, H. Biederman. "Deposition of nanostructured fluorocarbon plasma polymer films by RF magnetron sputtering of polytetrafluoroethylene". Thin Solid Films, 519:6426-6431 (2011).

[30] H. Kazumi, R. Hamasaki, K. Tago. "Model prediction of radical composition in C_4F_8 plasmas and correlation with measured etch characteristics of silicon dioxide". Plasma Sources Science and Technology. 5:200-209 (1996).

[31] X. Li, L. Ling, X. Hua, G. S. Oehrlein, Y. Wang, A. V. Vasenkov, M. J. Kushner. "Properties of C_4F_8 inductively coupled plasmas. I. Studies of Ar/*c*-C_4F_8 magnetically confined plasmas for *etching* of SiO_2". Journal of Vacuum Science and Technology A, 22:500-510 (2004).

[32] W. Guo, H. H. Sawin. "*Etching* of SiO_2 in C_4F_8/Ar plasmas. I. Numeric kinetics modeling and Monte Carlo simulation in a three-dimensional profile simulator". Journal of Vacuum Science and Technology A, 28:250-258 (2010).

[33] W. Guo, H. H. Sawin. "*Etching* of SiO_2 in C_4F_8/Ar plasmas. II. Simulation of surface roughening and local polymerization". Journal of Vacuum Science and Technology A, 28:259-270 (2010).

[34] A. V. Vasenkov, X. Li, G. S. Oehrlein, M. J. Kushner. "Properties of *c*-C_4F_8 inductively coupled plasmas. II. Plasma chemistry and reaction mechanism for modeling of Ar/*c*-C_4F_8/O_2 discharges". Journal of Vacuum Science and Technology A, 22:511-530 (2004).

[35] G. Kokkoris, A. Goodyear, M. Cooke, E. Gogolides. "Global model for C_4F_8". Journal of Physics D: Applied Physics, 41:195211 (2008).

[36] J. Robertson. "Deposition mechanisms for promoting sp^3 bonding in diamond-like carbon". Diamond and Related Materials, 2:984-989 (1993).

[37] C. A. Davis. "A simple model for the formation of compressive stress in thin films by ion bombardment". Thin Solid Films 226:30-34 (1993).

[38] V. J. Rico, F. Yuber, J. P. Espinós, J. Cotrino, A. R. González-Elipe, D. Garg, S. Henry. "Determination of the hydrogen content in diamond-like carbon and polymeric thin films by reflection electron energy loss spectroscopy". Diamond and Related Materials, 16:107-111 (2007).

[39] F. Yubero, V. J. Rico, J. P. Espinós, J. Cotrino, A. R. González-Elipe. "Quantification of the H content in diamondlike carbon and polymeric thin films by reflection electron energy loss spectroscopy". Applied Physics Letters, 87:084101 (2005).

[40] M. Filippi, L. Calliari. "On the use of elastic peak electron spectroscopy (EPES) tomeasure the H content of hydrogenated amorphous carbon films" Surface and Interface Analysis, 40:1469-1474 (2008).

[41] S. Tougard. "Universality Classes of inelastic electron scattering cross-sections". Surface and Interface Analysis, 25:137-154 (1997).

[42] C. López-Santos, F. Yubero, J. Cotrino, L. Contreras, A. Barranco, A. R. González-Elipe. "Formation of nitrogen functional groups on plasma treated DLC". Plasma Processes and Polymers, 6:555-565 (2009).

[43] C. K. Park, S. M. Chang, H. S. Uhm, H. S. Seo, J. S. Park. "XPS and XRR studies on microstructures and interfaces of DLC films deposited by FCVA method". Thin Solid Films, 420:235-240 (2002).

[44] G. Nansé, E. Papirer, P. Fioux, F. Moguet, A. Tressaud. "Fluorination of carbon blacks: An X-ray photoelectron spectroscopy study: I. A literature review of XPS studies of fluorinated carbons. XPS investigation of some reference compounds". Carbon, 35:175-194 (1997).

[45] A. M. Ferraria, J. Lopes da Silva, A. M. Botelho do Rego. "XPS studies of directly fluorinated HDPE: problems and solutions". Polymer, 44:7241-7249 (2003).

[46] A. Bendavid, P. J. Martin, L. Randeniya, M. S. Amin. “The properties of fluorine containing diamond-like carbon films prepared by plasma-enhanced chemical vapour deposition”. Diamond and Related Materials, 18:66-71 (2009).

[47] F.R. Marciano, E.C. Almeida, D.A. Lima-Oliveira, E.J. Corat, V.J. Trava-Airoldi. “Improvement of DLC electrochemical corrosion resistance by addiction of fluorine”. Diamond and Related Materials, 19:537-540 (2010).

[48] M. Drabik, O. Polonskyi, O. Kylian, J. Cechvala, A. Artemenko, I. Gordeed, A. Choukourov, D. Slavinska, I. Matolinova, H. Biederman. “Super-hydrophobic coatings prepared by RF magnetron sputtering of PTFE”. Plasma Processes and Polymers, 7:544-551 (2010).

[49] B. Lopes, W. Schriner, C. U. Davanzo, S. F. Durrant. “Effects of helium ion irradiation on fluorinated plasma polymers”. Surface and Coating Technology, 204:3059-3063 (2010).

[50] J. E. Chase, F. J. Boerio. “Deposition of plasma polymerized perfluoromethylene-dominated films showing oil-repellency”. Journal of Vacuum Science and Technology A, 21:607-615 (2003).

[51] R. W. B. Pearse, A. G. Gayton. “The identification of molecular spectra”. Wiley & Sons Inc., New York, fourth edition (1976).

[52] M. J. Barela, H. M. Anderson, G. S. Oehrlein. “Role of C_2F_4, CF_2, and ions in C_4F_8/Ar plasma discharges under active oxide etch conditions in an inductively coupled GEC cell reactor”. Journal of Vacuum Science and Technology A, 23:408-416 (2005).

Capítulo III.
Propiedades de mojado de materiales fluorocarbonados

1. Introducción.

Las propiedades de mojado de una superficie pueden ser un factor clave para determinar sus posibles aplicaciones, pudiendo condicionar la aptitud de un material para un uso concreto. Un ejemplo de ello se da en biomedicina, ya que las diferencias en la capacidad de mojado de una superficie ejercen una gran influencia en su bioactividad (como la adherencia bacteriana o la adhesión de osteoblastos). Por tanto, la correcta determinación e interpretación de estas propiedades, así como el control de las mismas son de suma importancia a la hora de diseñar un material. El mojado se expresa normalmente en valores de ángulo de contacto del material (con uno o varios líquidos) u otros parámetros que pueden calcularse a partir de estos valores (por ejemplo, la tensión superficial, la energía de adhesión, etc).

1.1. Mojabilidad superficial.

El ángulo de contacto de un líquido con una superficie (representado por la letra griega θ) se define como el ángulo que forma la tangente del perfil de una gota depositada sobre ésta hacia el lado del líquido en el punto donde confluyen las fases sólido, líquido y vapor.[1] A pesar de ser un parámetro sencillo de entender y fácilmente medible, su interpretación no es trivial. Debido a que las condiciones de medida de este parámetro (volumen de la gota, velocidad de adición de líquido, etc.) pueden influir significativamente en el resultado obtenido, los ángulos de contacto suelen tomarse, más que como una cualidad atribuible de forma absoluta al material, como una herramienta de comparación de unas superficies con otras.

Para cada superficie pueden definirse diferentes tipos de ángulo de contacto, tales como el ángulo de equilibrio, el estático, el de avance, el de retroceso, etc. De todos ellos, el más ampliamente utilizado es el ángulo de equilibrio (θ_{eq}), que puede definirse como el ángulo de contacto de una superficie con un líquido en condiciones de equilibrio termodinámico, es decir, en el mínimo absoluto de energía del sistema. Mediante la bien conocida ecuación de Young (ecuación *III.1*)[2] puede relacionarse el ángulo de contacto de equilibrio de una superficie (que en esta

ecuación se denomina ángulo de contacto de Young, θ_Y,) con las tensiones superficiales presenten en el punto triple:

$$\gamma_{SV} - \gamma_{SL} = \gamma_{LV} \cos(\theta_Y) \qquad (III.1)$$

donde γ_{SV}, γ_{SL} y γ_{LV} son las tensiones superficiales de sólido-vapor, sólido-líquido y líquido-vapor, respectivamente. Esta ecuación sólo es aplicable a superficies ideales, es decir, homogéneas, planas, rígidas, no porosas e inertes. Esto implica que en superficies reales no es posible determinar experimentalmente el ángulo de Young. La *Figura III.1* representa visualmente el concepto de ángulo de contacto y la relación propuesta por Young, resultado del balance de fuerzas según la descripción termodinámica del mojado.

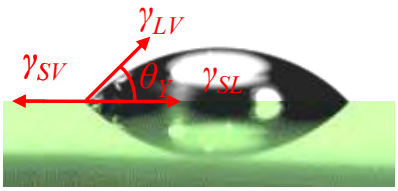


Figura III.1. Representación del ángulo de contacto de una gota depositada sobre un sólido y esquema de la relación entre tensiones superficiales, ángulo de contacto y ecuación de Young.

En el caso de superficies reales, suele definirse el ángulo de contacto intrínseco (θ_i), que es el equivalente al ángulo de contacto de Young para superficies no ideales. En el caso de superficies homogéneas y rugosas, este ángulo se corresponde con el que tiene la superficie debido a su naturaleza química, sin considerar la rugosidad; para superficies heterogéneas, las diferencias químicas entre diferentes puntos de la superficie conducen a la aparición de diversos ángulos intrínsecos. Los ángulos intrínsecos no son accesibles experimentalmente. Así, en la práctica se determinan mediante cálculos realizados a partir de ángulos observables (θ'), que son aquellos medidos experimentalmente en unas condiciones concretas. Debido al efecto de la rugosidad y/o la heterogeneidad química superficial, los ángulos observables no tienen porqué coincidir con los intrínsecos, por lo que los primeros también se denominan ángulos de contacto aparentes.

Los diferentes modelos para el cálculo del ángulo intrínseco se formulan para su uso con el ángulo de equilibrio. La determinación directa del ángulo de equilibrio es compleja, y para ello suele someterse el sistema a vibración para forzar su relajación hasta el estado de equilibrio, método conocido como *Vibration Induced Equilibrium Contact Angle* o VIECA.[3-5] Por este motivo, el ángulo de equilibrio suele asimilarse con el ángulo de contacto estático, que es el medido en una gota de líquido en reposo depositada sobre la superficie no inclinada (generalmente, se dejan unos segundos para que el sistema se relaje antes de tomar la medida). Por tanto, el ángulo intrínseco suele determinarse empleando los ángulos de contacto estáticos.

En la bibliografía existen numerosos estudios que hacen hincapié en la necesidad de utilizar medidas de ángulos de contacto dinámicos (esto es, ángulos de avance θ'_{av} y de retroceso θ'_{re}) para caracterizar la mojabilidad de un material determinado.[6-8] Esto se debe a que el ángulo de contacto estático es poco reproducible, de forma que difícilmente pueden obtenerse valores que caractericen la mojabilidad de un material. Los ángulos de avance y retroceso son más reproducibles y se corresponden con el ángulo de contacto mayor y menor respectivamente que puede presentar una superficie. A partir de los ángulos de contacto dinámicos se puede realizar una determinación indirecta del ángulo de equilibrio para la aplicación de los modelos de mojado. Así, para superficies rugosas homogéneas, se sigue la aproximación de la media de los ángulos;[9] para superficies planas heterogéneas, se utiliza la aproximación de la media de los cosenos[10] (ecuaciones *III.2* y *III.3* respectivamente).

$$\theta_{eq} = \frac{\theta'_{av} + \theta'_{re}}{2} \qquad (III.2)$$

$$\cos(\theta_{eq}) = \frac{\cos(\theta'_{av}) + \cos(\theta'_{re})}{2} \qquad (III.3)$$

El ángulo de avance es aquél que forma la tangente del perfil de una gota con la superficie cuando el líquido avanza sobre una superficie seca. Este valor puede tomarse como el ángulo máximo estacionario que se alcanza al aumentar el volumen de una gota sésil sobre una superficie sólida (*Figura III.2.a* y *III.2.c*), o como el

ángulo formado en la parte inferior de una gota cuando comienza a deslizarse sobre una superficie inclinada (*Figura III.2.d*). El ángulo de retroceso es el ángulo que forma la tangente del perfil de una gota con la superficie cuando el líquido retrocede en favor del área seca. Este ángulo es el valor constante mínimo que se alcanza cuando se disminuye el volumen de una gota depositada sobre una superficie (*Figuras III.2.b* y *III.2.c*); también se corresponde con el valor superior de una gota inclinada en el momento en que comienza a deslizarse sobre un sólido inclinado (*Figura III.2.d*). La diferencia entre los ángulos de avance y retroceso se denomina histéresis ($\Delta\theta'$), y da idea de la energía de adhesión del líquido sobre una superficie, que comúnmente se considera proporcional a la diferencia $\cos(\theta'_{re}) - \cos(\theta'_{av})$.[11]

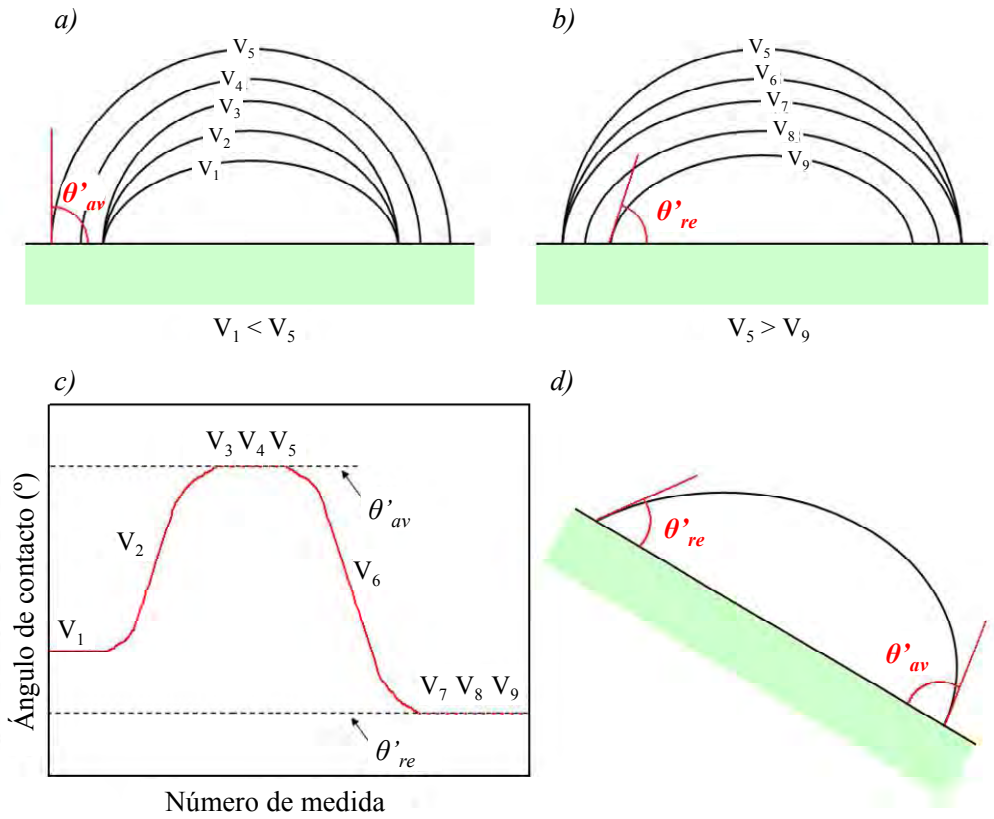


Figura III.2. Ángulo a) de avance y b) de retroceso determinados por variaciones de volumen de una gota y c) gráfica para su visualización. d) Ángulos de avance y retroceso determinados por deslizamiento sobre una superficie inclinada.

La interpretación de los ángulos de contacto de avance y retroceso determinados para superficies reales es compleja. Tal y como se representa en la *Figura III.3*, en superficies rugosas de composición homogénea, estos ángulos se relacionan con las pendientes locales máximas presentes en la superficie;[12-14] para superficies heterogéneas y lisas pueden asociarse a los valores máximos y mínimos presentes debido a las diferencias composicionales.[15, 16]

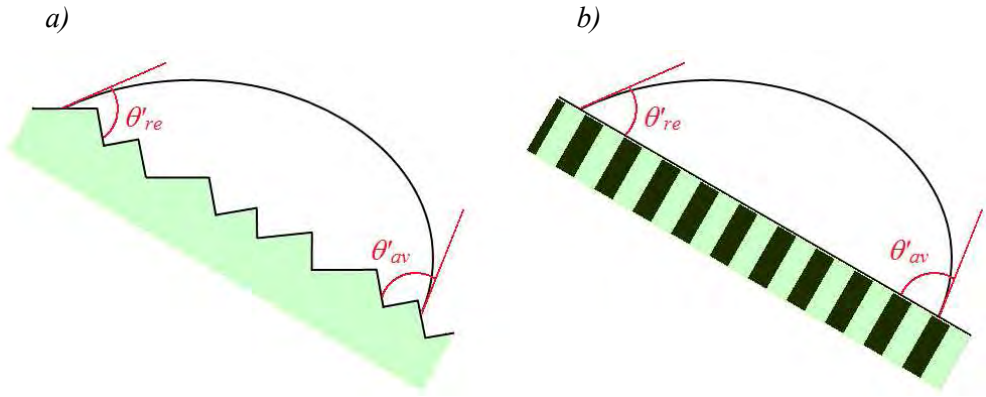


Figura III.3. Ángulo de avance y retroceso que aparecen en a) una superficie homogénea y rugosa y b) una superficie heterogénea y lisa.

Si el líquido empleado es agua, las superficies pueden clasificarse según su mojabilidad en hidrofílicas (si el valor del ángulo de contacto estático es menor de 90 º) o hidrofóbicas (si el ángulo es mayor de 90 º).

Muchas de las posibles aplicaciones de los materiales requieren unas propiedades de repulsión o adherencia al agua excepcionales. Es por esto que en la actualidad existe un gran interés en desarrollar superficies superhidrofóbicas o superhidrofílicas,[17-23] que se caracterizan por valores de ángulo de contacto estáticos con agua mayores a 150 º y energías de adhesión bajas, o ángulos inferiores a 10 º y energías de adhesión altas, respectivamente.

La mojabilidad de un material depende tanto de su composición como de su estructura química superficial de manera que, según las especies químicas y el tipo de enlaces presentes en la superficie que estará en contacto con el líquido, podrán establecerse interacciones sólido-líquido más o menos fuertes que harán que el

ángulo de contacto pueda presentar valores distintos. Sin embargo, la química superficial no es el único factor que puede afectar al mojado de un material. Existen diversos estudios que muestran la influencia de la rugosidad de la superficie en el ángulo de contacto y en la histéresis entre el ángulo de contacto de avance y de retroceso.[6, 7]

En el caso de materiales fluorocarbonados, en general, se asume que un alto contenido en flúor tiende a dar un carácter hidrofóbico a la superficie debido a que la baja reactividad de los enlaces C–F expuestos a la superficie proporciona valores pequeños de tensión superficial.[24-26] Por otro lado, como la rugosidad del material exalta el comportamiento de mojado de las superficies (es decir, aumenta el ángulo de contacto de las superficies hidrofóbicas y disminuye el de las hidrofílicas),[27] un incremento de la rugosidad en este tipo de materiales podría conducir a la generación de superficies superhidrofóbicas. En este sentido, se están llevando a cabo numerosas investigaciones orientadas a la búsqueda de superficies superhidrofóbicas artificiales que consisten en sustratos poliméricos muy rugosos recubiertos por películas de carbono fluorado depositado por diversos métodos, entre los que se incluyen los métodos de plasma.[7, 28-31] Además, se ha demostrado que una forma muy apropiada de inducir rugosidad en los sustratos poliméricos empleados con este propósito es el desbastado químico por acción de un plasma. Este método permite un control eficaz de la nano- e, incluso, microrrugosidad superficial y, por tanto, de la mojabilidad de este tipo de sistemas.[32]

1.2. Modelado de la mojabilidad superficial.

Como se comenta anteriormente, existe una relación directa entre la mojabilidad de una superficie y su rugosidad. En la bibliografía clásica sobre análisis de mojabilidad se proponen diversos modelos que intentan relacionar los ángulos de contacto de equilibrio θ_{eq} de una superficie real (con una rugosidad determinada) con el ángulo de contacto que tendría una superficie idealmente plana de igual composición (es decir, su ángulo intrínseco, θ_i). Esta relación se establece a través

de factores de rugosidad específicos de cada modelo[27, 32-35] que se calculan a partir de los datos topográficos que proporcionan las medidas de microscopía de fuerzas atómicas (AFM, de *Atomic Force Microscopy*). Teniendo en cuenta que la determinación mediante esta técnica de la rugosidad superficial (y otros parámetros morfológicos relacionados con la topografía) depende de factores experimentales, una determinación no adecuada de esta propiedad podría dificultar la interpretación del comportamiento de mojado de las superficies rugosas. Hay que tener en cuenta que cada modelo de mojado es aplicable a un tipo de superficie (según sea una superficie homogénea o heterogénea, lisa o rugosa, etc.). Por tanto, que un modelo sea adecuado a una superficie determinada puede dar una idea de las características de la misma.

A menos que se conozcan con gran exactitud las características superficiales de un material y se intuya, por tanto, qué tipo de comportamiento puede presentar, lo más razonable puede ser comenzar con los modelos teóricos de mojado más simples y fáciles de interpretar. Entre los modelos más sencillos se encuentran los modelos de Wenzel,[27] Cassie[32] y Cassie-Baxter.[33]

El modelo de Wenzel se aplica a superficies homogéneas y rugosas para poner de manifiesto el efecto de la rugosidad en el mojado.[27] Este modelo relaciona el ángulo de contacto de equilibrio de una superficie rugosa (θ_{eq}) con el de una superficie plana de igual composición θ_i a través del factor de rugosidad de Wenzel, r_W. La ecuación del modelo es la siguiente:

$$\cos(\theta_{eq}) = r_W \cdot \cos(\theta_i) \qquad (III.4)$$

donde r_W se define como la relación entre el área real de una superficie y su área proyectada (es decir, el área geométrica). En el caso de superficies perfectamente planas se tiene que $r_W = 1$; en superficies rugosas, puesto que el área real tiene que describir el contorno de los picos y valles, se cumple que $r_W > 1$.

El efecto de la heterogeneidad superficial se describe con el modelo propuesto por Cassie.[32] Se trata de un modelo aplicable sólo a superficies heterogéneas y lisas, cuya expresión matemática es de la forma:

$$\cos(\theta_{eq}) = \sum_{n} f_n \cdot \cos(\theta_{i,n}) \qquad (III.5)$$

donde f_n es la fracción de área de una composición caracterizada por un ángulo de contacto intrínseco $\theta_{i,n}$. Se cumple que $\Sigma\, f_n = 1$. Así se relaciona el coseno del ángulo de contacto de la superficie real con la media ponderada con las concentraciones de los cosenos de los ángulos intrínsecos de cada material/fase diferente presente en la superficie. Hay que mencionar que este modelo no permite calcular el ángulo intrínseco a partir de un valor experimental, sino que se puede estimar el valor experimental de una superficie a partir de los valores ideales de las diferentes especies y su concentración relativa. Esto indica que su aplicación práctica es limitada.

El modelo de Cassie-Baxter surge del estudio conjunto de la influencia que ejercen la rugosidad y la heterogeneidad superficiales sobre la mojabilidad.[33] Aplicando conjuntamente las ecuaciones de Wenzel y de Cassie se obtiene la expresión:

$$\cos(\theta_{eq}) = \sum_{n} f_n \cdot r_{W,n} \cdot \cos(\theta_{i,n}) \qquad (III.6)$$

donde f_n es la fracción de superficie correspondiente a un tipo de material, $r_{W,n}$ su factor de Wenzel y $\theta_{i,n}$ su ángulo de contacto intrínseco. Se tiene que $\Sigma\, f_n \cdot r_{W,n} = r_W$ y $\Sigma\, f_n = 1$. En el caso particular de que en una superficie homogénea se formen burbujas de aire ocluido entre la gota y la superficie debido a sus características de rugosidad, se considera un sistema formado por dos componentes: la superficie sólida (que es el componente 1, que ocupa una fracción en la intercara líquido-material $f_1 = f_{CB}$ y se caracteriza por un ángulo de contacto $\theta_1 = \theta$) y las burbujas de aire ocluido (con un ángulo de contacto $\theta_2 = 180$ º y una fracción $f_2 = 1 - f_{CB}$). Con estas consideraciones, la ecuación *III.4* queda de la siguiente forma:

$$\cos(\theta_{ap}) = f_{CB} \cdot r_W \cdot \cos(\theta_1) + f_{CB} - 1 \qquad (III.7)$$

Esta última ecuación es la base del modelo de Cassie-Baxter.[33]

En la *Figura III.4* se ilustran los diferentes comportamientos mencionados.

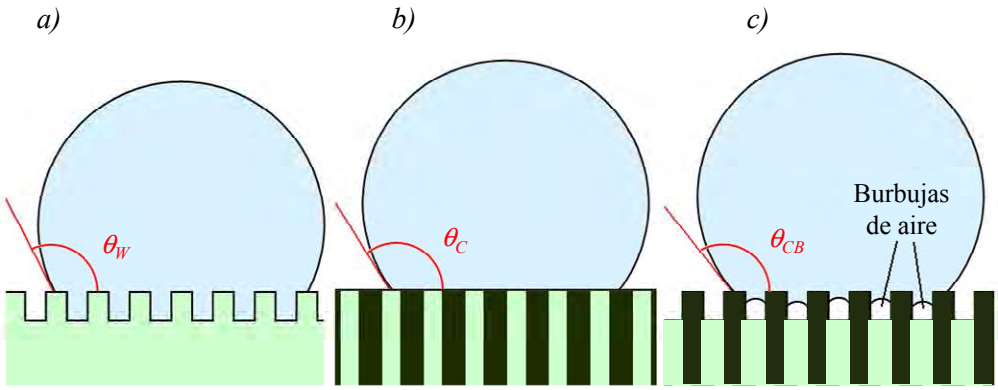


Figura III.4. Representación de los modelos de a) Wenzel, b) Cassie y c) Cassie-Baxter.

Los modelos de Wenzel[27] y de Cassie-Baxter,[33] así como otros modelos similares[32, 24, 35] se han usado tradicionalmente para relacionar la rugosidad superficial con las propiedades de mojado. Un ejemplo de la aplicabilidad de los modelos de mojado en el estudio de superficies es el llevado a cabo para superficies de TiO_2,[36] donde se encuentra que el modelo más adecuado para mostrar la dependencia del ángulo de contacto con la rugosidad es el de Miwa-Hashimoto,[34] que formalmente es una combinación de los modelos de Wenzel y Cassie-Baxter (que, a su vez, es una combinación del modelo de Wenzel y de Cassie-Baxter).

Hay que mencionar que la formulación de los modelos mencionados anteriormente se deduce a partir de situaciones de equilibrio termodinámico, que relacionan los ángulos de equilibrio medibles (bien directamente o asimilándolos con los observables) con los ángulos intrínsecos (que no pueden medirse de forma directa).[27, 32-34] Se debe tener en cuenta, además, que se trata de aproximaciones sólo aplicables en los casos en los que el tamaño de la superficie en contacto con el líquido es varios órdenes de magnitud superior al tamaño de los motivos topográficos superficiales. Por ello, mientras que algunos autores rechazan su validez,[37, 38] otros aceptan su aplicabilidad.[39, 40] Incluso atendiendo a diversas consideraciones llevadas a cabo por McCarthy y colaboradores,[41, 42] la aplicación de estos modelos es controvertida debido a que utilizan la ecuación de Young considerando las tensiones superficiales, no como fuerzas en equilibrio como se

hace en su formulación original, sino como escalares. Sin embargo, suelen usarse para estimar, de manera grosera, la relación entre la rugosidad y los ángulos de contacto. Para la aplicación práctica de los modelos, las ecuaciones de Wenzel (*III.4*) y Cassie-Baxter (*III.7*) quedan de la siguiente forma:

$$\cos(\theta') = r_W \cdot \cos(\theta_i) \qquad (III.8)$$

$$\cos(\theta') = f_{CB} \cdot r_W \cdot \cos(\theta_i) + f_{CB} - 1 \qquad (III.9)$$

donde θ' se asimila con el ángulo de contacto observable, ya sea el estático o la media de los ángulos/cosenos dinámicos, comos se describe anteriormente. En este capítulo, los modelos se aplican a los ángulos de avance y retroceso y a la media de los ángulos, por tratarse de superficies rugosas homogéneas.

1.3. Rugosidad superficial.

Dada la relación existente entre la rugosidad y la mojabilidad de una superficie, es importante conocer qué significa este concepto y cómo se determina experimentalmente. La rugosidad de una superficie puede definirse como el conjunto de elevaciones y depresiones que presenta una superficie respecto a una superficie idealmente plana. Este parámetro suele determinarse a partir de medidas de microscopía de fuerzas atómicas, y puede expresarse con diferentes parámetros. Entre ellos destaca la rugosidad media (R_a) y la rugosidad cuadrática media (R_q o, más comúnmente, RMS).

La rugosidad media de una línea de longitud L es la media aritmética de las alturas de cada punto de la superficie. Se calcula como la suma de las áreas encerradas entre el perfil superficial y la línea media, en valores absolutos, dividida entre la longitud de medida, siendo $|Z(x)|$ la expresión de la altura en función de la posición en x.

$$R_a = \frac{1}{L}\int_0^L |Z(x)|\,dx \qquad (III.10)$$

La línea media citada es la línea paralela al sustrato situada a una altura $\bar{h}$ de forma que la suma de las áreas superiores, comprendidas entre esta línea y el perfil, es igual a la suma de las áreas inferiores, tal y como se observa en la *Figura III.5*.

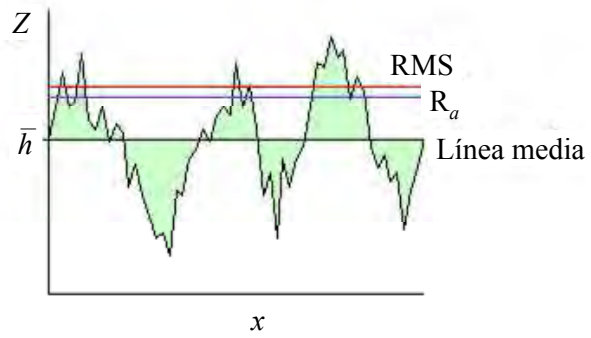


Figura III.5. Perfil de línea de una superficie, que muestra los conceptos de línea media, altura media ($\bar{h}$), rugosidad media (R_a) y rugosidad cuadrática media (RMS).

Por otro lado, la rugosidad cuadrática media es la desviación cuadrática media de los valores de altura. Este valor coincide con la desviación estándar de la distribución de las alturas de la superficie, y se expresa como:

$$RMS = \sqrt{\frac{1}{L}\int_0^L |Z(x)|^2\,dx} \qquad (III.11)$$

Este último parámetro tiene un valor estadístico y es más sensible a los cambios topográficos, por lo que su uso para describir la rugosidad de una superficie está muy extendido. La rugosidad de la superficie se calcula a partir de todas las rugosidades lineales. La *Figura III.5* muestra gráficamente los conceptos de línea media, R_a y RMS.

Un hecho a tener en cuenta es que, en la práctica, no se conoce la función *Z(x)* sino que sólo se tiene acceso al valor de altura h_i en determinados puntos, por lo que

la integral de la ecuación *III.11* se sustituye en la práctica por un sumatorio de términos. Así, para una línea de longitud *L* se tiene:

$$\mathrm{RMS} = \sqrt{\frac{1}{L}\sum_{\mathrm{i}=0}^{L}\left(h_{\mathrm{i}} - \bar{h}\right)^2} \qquad (III.12)$$

Si en la línea de longitud *L* se dispone de *N* puntos, la ecuación *III.12* queda finalmente de la forma:

$$\mathrm{RMS} = \sqrt{\frac{\sum_{\mathrm{i}=1}^{N}\left(h_{\mathrm{i}} - \bar{h}\right)^2}{N-1}} \qquad (III.13)$$

Con todo esto, se está asumiendo que la rugosidad de una superficie se caracteriza por un único valor de RMS. Sin embargo, tanto los datos obtenidos empíricamente en diversos estudios[36, 43] como los deducidos con los principios de la teoría de escalado dinámico (TED), que se aplica para describir procesos de crecimiento de láminas delgadas,[44-46] contradicen dicha afirmación. Por una parte, la teoría de escalado dinámico afirma que la rugosidad superficial es una magnitud autoafín (esto es, que presenta un tipo de comportamiento fractal) y que los valores de RMS medidos pueden crecer con la escala de medida hasta alcanzar un valor umbral a partir del cuál se satura, permaneciendo invariable; por otra, resultados experimentales (como por ejemplo, los descritos en un estudio previo acerca de la mojabilidad de una serie de capas finas de TiO_2 con diferente rugosidad y espesores crecientes)[36] demuestran que el RMS obtenido por AFM puede ser diferente dependiendo de la escala de observación y que sólo cuando la rugosidad se determina en una escala de observación mayor que el umbral de saturación, los valores de RMS pueden considerarse representativos de la rugosidad real del sistema. En este contexto, se concluye que las longitudes umbrales de observación *L* necesarias para alcanzar la saturación de la rugosidad pueden obtenerse experimentalmente utilizando medidas de rugosidad superficial de diferentes áreas de observación de *L* x *L*. La *Figura III.6* muestra una curva típica de rugosidad en función de la escala.

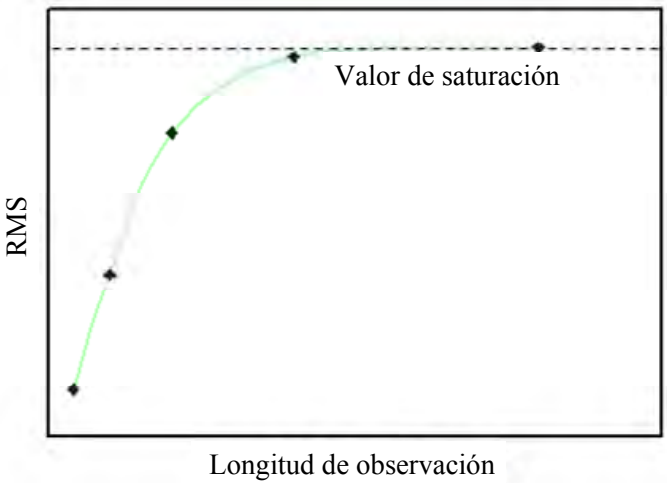


Figura III.6. Variación de la rugosidad cuadrática media con la escala de medida.

Como se comenta con anterioridad, al observar la topografía mediante microscopía de fuerza atómica sólo se pueden examinar un número limitado de puntos. Conforme aumenta la resolución de la medida (entendida como el número de puntos medidos en un área determinada), se tiene más información de la rugosidad superficial y el perfil medido se aproxima más al real. Por tanto, se plantea la cuestión de si la resolución de la medida afecta a la determinación de la rugosidad y de otros factores topográficos.

2. Objetivos de este capítulo.

Los experimentos mostrados en este capítulo se orientan a la determinación de las propiedades de mojado de los recubrimientos fluorocabonados preparados y a evaluar la relación de éstas con su química y rugosidad superficiales. Los objetivos concretos de este capítulo son los descritos a continuación.

- Estudiar la dependencia de la mojabilidad con la química superficial.

Para evaluar la influencia de la composición química superficial y la estructura de enlace de un material en su mojabilidad se presentan los resultados

correspondientes a láminas delgadas de DLC, DLC-F y CF_X, descritas en el Capítulo II. Para minimizar los posibles efectos de la rugosidad, estos estudios se realizan en películas depositadas sobre sustratos planos.

- Estudiar la influencia de la rugosidad superficial sobre el mojado.

La dependencia de la mojabilidad con la rugosidad de las diferentes superficies fluorocarbonadas se establece mediante un estudio del ángulo de contacto de los tres tipos de láminas delgadas depositadas sobre sustratos de diferente rugosidad. Se comparan los datos obtenidos para cada tipo de película depositada sobre sustrato plano y sobre sustratos poliméricos comerciales sometidos previamente a diferentes tratamientos para incrementar su rugosidad superficial.

Como caso particular, se fabrican muestras fluorocarbonadas con una alta rugosidad para promover el aumento del ángulo de contacto con la intención de alcanzar propiedades de mojado típicas de materiales superhidrofóbicos.

- Evaluar la validez de los modelos de mojado más comunes para el estudio de la mojabilidad de materiales fluorocarbonados.

Para probar la validez de los modelos de mojado de Wenzel[27] y Cassie-Baxter[33] para cada tipo de superficie se realiza un análisis crítico de los valores de ángulo de contacto intrínsecos obtenidos a partir de las ecuaciones de cada modelo.

- Preparar sustratos poliméricos con rugosidad superficial controlada utilizando procesos de desbastado mediante plasma.

Los sustratos poliméricos de rugosidad creciente que se requieren para ver el efecto de la rugosidad en el mojado se preparan mediante tratamientos de desbastado o *etching*.

Como primera opción, se realizan tratamientos de *etching* mediante un plasma de oxígeno a sustratos de politereftalato de etileno (PET) durante diferentes periodos de tiempo. Se determina la variación de rugosidad conforme aumenta el tiempo de

tratamiento y la influencia de la escala de medida y de la resolución en los valores de RMS que se obtienen.

Además del tiempo de tratamiento, se compara cómo afecta a la rugosidad el cambio en las condiciones de *etching* aplicado a PET y a polietileno de ultra-alto peso molecular (UHMWPE). Se eligen estos polímeros por sus aplicaciones biomédicas.[47-49]

- Estudiar la influencia de la resolución experimental y la escala de medida en la determinación de RMS y r_w por AFM.

Con el fin de determinar cómo influye en la rugosidad la escala de medida por AFM, se realizan medidas de superficies de rugosidad variable a diferentes escalas con la misma resolución. Por otro lado, la influencia de la resolución de la medida se pone de manifiesto tomando imágenes de igual escala con diferente resolución. Un estudio análogo se lleva a cabo para el parámetro de Wenzel, r_W.

3. Procedimiento experimental y resultados.

Para una mayor claridad, los resultados presentados en este capítulo se dividen en tres partes:

- Parte A: Preparación de sustratos con rugosidad superficial controlada.
- Parte B: Funcionalización superficial con recubrimientos de fluorocarbono.
- Parte C: Mojado de las superficies flurocarbonadas.

Parte A. Preparación de sustratos con rugosidad superficial controlada.

Para poder realizar los estudios propuestos (inferir conclusiones acerca de la influencia de la rugosidad en la mojabilidad superficial, comprobar la validez de los modelos de mojado en superficies rugosas, obtener superficies superhidrofóbicas...), es necesario disponer de superficies con rugosidades diferentes. Se conoce que el

tratamiento de polímeros con plasma posibilita modificar su rugosidad de manera controlada,[30] por lo que ésta es una vía de obtención de superficies de mayor rugosidad sin tener que recurrir a cambios en la naturaleza química superficial.

A.1. Procedimiento experimental.

Para los propósitos presentados en este capítulo, se toman como superficies planas ideales aquéllas con un RMS inferior a 1 nm. Los sustratos planos escogidos son obleas de silicio pulido y PET comercial (Goodfellow Ltd., Cambridge, Reino Unido).

Las superficies rugosas se obtienen por diferentes tratamientos de desbastado químico mediante plasma aplicados a dos polímeros comerciales: PET y polietileno de ultra alto peso molecular (UHMWPE) pulido, del tipo del empleado para implantes de cadera; estas últimas muestras se obtienen por mecanizado de una hoja de UHMWPE GUR 1050® moldeada por compresión (Orthiplastics Ltd., Reino Unido). El primero posee una rugosidad inicial de décimas de nanómetros, mientras que el UHMWPE tiene rugosidades dos órdenes de magnitud superiores. Los tratamientos de *etching* se realizan en el mismo reactor de plasma empleado para la deposición de películas fluorocabonadas (véase *Figura II.1*).

Se preparan dos series de sustratos diferentes. En primer lugar se someten los sustratos de PET a un tratamiento con un plasma de O_2 puro con un voltaje autoinducido de 200 V durante periodos crecientes de tiempo que varían desde 10 hasta 45 min para ver el efecto del tiempo de tratamiento en la rugosidad. En segundo lugar, se tratan sustratos de PET y UHMWPE con dos tratamientos de plasma durante 10 min variando tanto la composición del gas plasmógeno (Ar y O_2) como el potencial de autopolarización aplicado (200 V y 400 V, respectivamente).

La topografía superficial se determina mediante AFM. Para mostrar la variación de la rugosidad con la escala de mediada y la resolución, se registran imágenes de AFM de cada una de las muestras con escalas de observación desde 1 μm x 1 μm hasta 10 μm x 10 μm y resolución de 38 x 38 píxeles a 512 x 512 píxeles.

A.2. Resultados y discusión.

La rugosidad cuadrática media medida para muestras virtualmente planas, es decir, PET sin tratar y obleas de silicio pulido, se muestra en la *Tabla III.1*, dónde puede verse que este parámetro prácticamente no varía con la escala de medida.

Tabla III.1. Valores de RMS de los sustratos de silicio pulido y de PET sin tratamiento determinados a diferentes escalas de medida.

Escala de medida	**RMS (nm)**	
	Silicio	PET original
1 µm x 1 µm	0.18	0.25
2.5 µm x 2.5 µm	0.20	0.90
5 µm x 5 µm	0.20	0.94

A continuación se realizan medidas de la topografía de PET y UHMWPE sometidos a diferentes tratamientos de plasma.

A.2.1. Tratamientos de desbastado químico con un plasma de O_2: influencia del tiempo de tratamiento.

En primer lugar, se preparan muestras de PET sometido a diferentes tiempos de *etching* con plasma de oxígeno con un potencial autoinducido de 200 V para ver cómo afecta el tiempo de tratamiento a la rugosidad superficial. La *Figura III.7* muestra las imágenes de AFM a una escala de 5 µm x 5 µm de las diferentes muestras analizadas, junto con sus perfiles de línea. En ella se observa que la rugosidad del polímero aumenta conforme aumenta el tiempo de tratamiento. Los perfiles de línea, además de volverse más profundos (nótese la diferencia en la escala), presentan una mayor frecuencia de pico a pico debido a la clara transformación de la superficie por efecto del plasma.

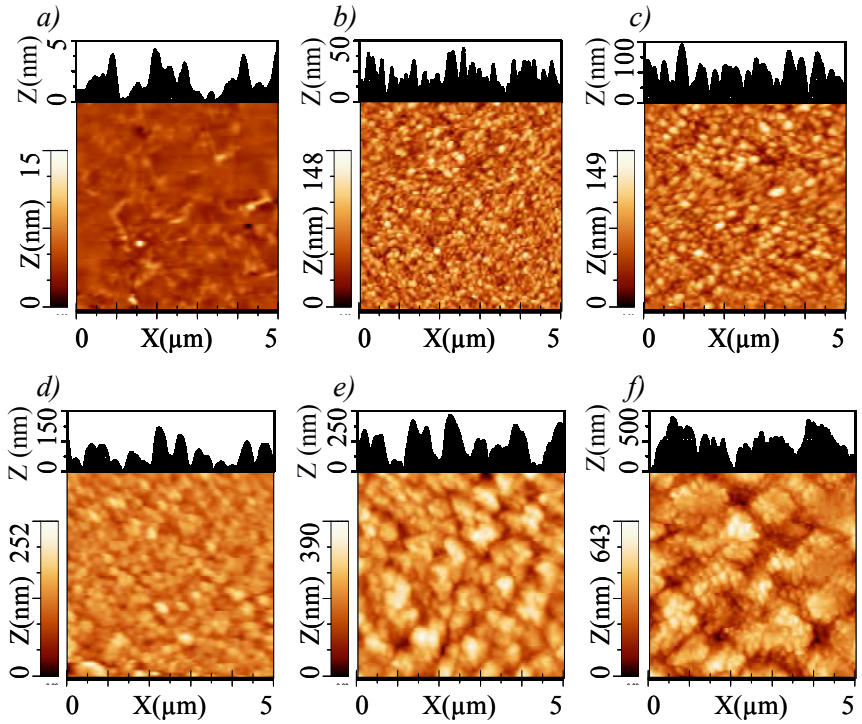


Figura III.7. Imágenes de AFM de 5 μm x 5 μm y perfiles de línea de las muestras de PET a) sin tratamiento y sometidas a etching por plasma de O_2 durante b) 10 min, c) 15 min, d) 20 min, e) 30 min y f) 45 min. Nótese la diferencia de escala en los perfiles de línea.

Para cada muestra, se realizan medidas a diferentes escalas. En la *Figura III.8* se incluyen, a modo de ejemplo, imágenes obtenidas para la muestra más rugosa.

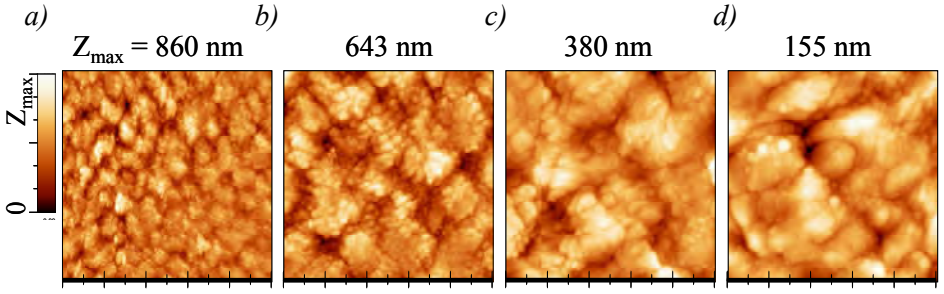


Figura III.8. Imágenes de AFM de una muestra de PET sometida a etching durante 45 min con escalas de observación de a) 10 μm x 10 μm, b) 5 μm x 5 μm, c) 2.5 μm x 2.5 μm y d) 1 μm x 1 μm.

A partir de estas medidas, se determina el valor de RMS de las diferentes muestras, datos que se representan en función de la escala de observación en la *Figura III.*9. La observación de esta gráfica corrobora el hecho anteriormente mencionado de que los valores de rugosidad determinados a escalas superiores son mayores que los obtenidos a pequeñas escalas, diferencia que se acentúa conforme aumenta la rugosidad. De esta representación se deduce que la escala a la que tiene lugar la saturación de la rugosidad medida se sitúa en 2.5 µm x 2.5 µm para las muestras más planas (es decir, las correspondientes a tratamientos de 0, 10 y 15 min) y en 5 µm x 5 µm para las muestras de mayor rugosidad (correspondientes a 20, 30 y 45 min de tratamiento). Para mayor simplicidad se puede afirmar que, para este tipo de muestras, la longitud *L* común a la cuál se alcanza la saturación es de 5 µm.

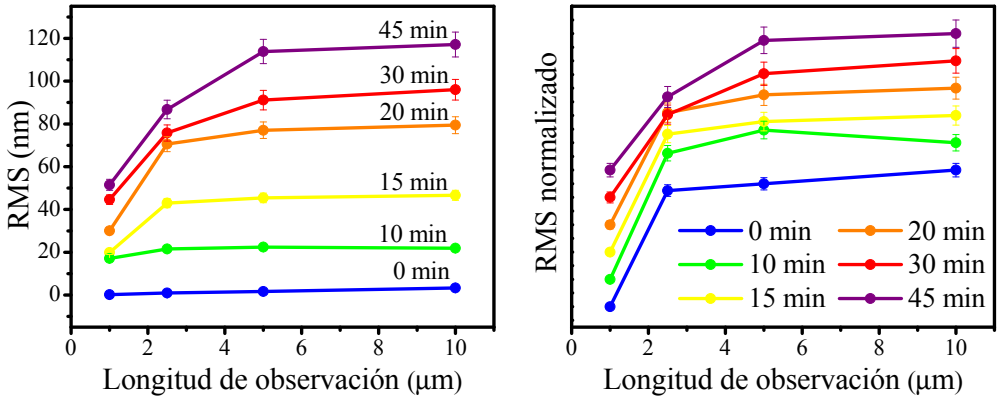


Figura III.9. Representación de los valores de a) RMS y b) RMS normalizados determinados a partir de imágenes de AFM obtenidas a diferentes escalas para las muestras de PET estudiadas. En (b), las curvas están desplazadas en vertical conforme aumenta el tiempo para mayor claridad.

Las diferencias de RMS mostradas en la *Figura III.9* pueden explicarse mediante una observación más profunda de la *Figuras III.7* y *III.8*. Si, para mayor simplicidad, no se tienen en cuenta efectos como la convolución punta-muestra inherente a las medidas de AFM.[50] se observa que los perfiles de línea mostrados son el resultado de varias contribuciones de diferente frecuencia, existiendo unas características topográficas superficiales que se correlacionan a corto alcance y

otras, de mayor intensidad, con una correlación a largo alcance. Debido a las longitudes de correlación elevadas, a escalas pequeñas (del orden de la longitud de correlación) el área de medida no es suficientemente elevada como para registrar estas oscilaciones de alto periodo, por lo que se obtienen valores de RMS menores.

Estos datos ponen de manifiesto que la asignación de un valor de RMS a una superficie rugosa es más compleja que en el caso de superficies relativamente planas. Mientras que estas últimas presentan una saturación de la rugosidad a escalas relativamente pequeñas (como es el caso del silicio y de las muestras sometidas a *etching* durante tiempos pequeños, es decir, $t \leq 15$ min), los valores de saturación para superficies con alta rugosidad pueden ser superiores, de forma que hay que ser cauteloso a la hora de elegir la escala de medida para poder determinar valores de RMS que describan adecuadamente la topografía de la superficie. Como se comenta en la introducción del presente capítulo, tanto numerosas evidencias empíricas[36, 43] como los principios de la teoría de escalado dinámico[44-46] indican claramente que la saturación en la rugosidad puede ocurrir a escalas de varias micras para superficies con alto RMS. Por tanto, antes de atribuir un determinado valor de rugosidad a cada superficie, se requiere realizar un estudio crítico de cómo afecta la escala de observación a la rugosidad de un determinado tipo de superficies. Se demuestra, por tanto, que la escala de medida es un factor crucial para identificar la rugosidad superficial, no sólo para láminas delgadas como se predice con la TED, sino también para cualquier otro tipo de superficies rugosas.

De las *Figuras III.7* y *III.9.a* puede deducirse que la rugosidad superficial aumenta con el tiempo de desbastado por efecto del plasma. En la *Figura III.10* se representan los valores de RMS de las diferentes muestras de PET en función del tiempo de tratamiento. En esta gráfica puede verse que existe una relación aproximadamente lineal entre el RMS medido y el tiempo de tratamiento (con un coeficiente de correlación lineal de 0.97), de forma que se puede controlar eficazmente la rugosidad superficial con el tiempo de tratamiento de *etching* con O_2 a 200 V en el reactor de RF capacitivo. De esta forma, se puede estimar la duración de tratamiento necesaria para preparar muestras con la rugosidad deseada.

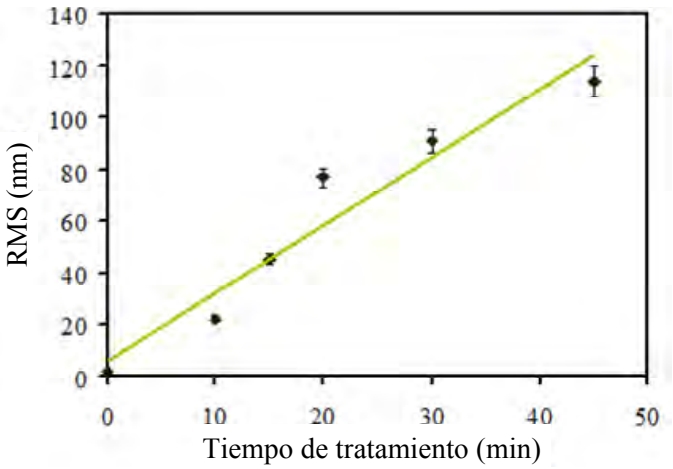


Figura III.10. Valores de RMS obtenidos por AFM a una escala de 5 µm x 5 µm para muestras de PET sometidas a etching con plasma de O_2 a un voltaje autoinducido de 200 V durante periodos de tiempo crecientes.

Finalmente, se analiza la influencia de la resolución de medida en las rugosidades calculadas. La *Figura III.11* muestra como ejemplo los valores de RMS de la muestra tratada durante 20 min (RMS ~80 nm) obtenidos a 5 µm x 5 µm en función de la resolución. En esta gráfica se ve que la rugosidad es independiente de la resolución en el rango estudiado, de 38 x 38 píxeles (donde el tamaño de píxel es de unos 132 nm^2) a 512 x 512 píxeles (con un tamaño de píxel de unos 10 nm).

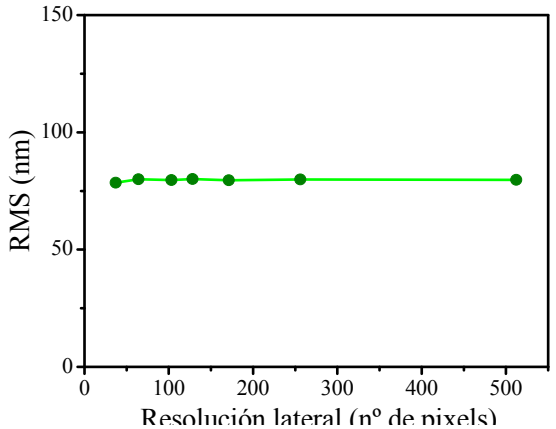


Figura III.11. Dependencia de RMS con la resolución de medida para PET sometido a un tratamiento de etching con plasma de O_2 durante 20 min. La escala de medida es de 5 µm x 5 µm.

A.2.2. Tratamientos de desbastado químico por plasma: influencia del tipo de descarga.

Para ver el efecto de las condiciones del plasma en tratamientos de igual duración, se tratan sustratos de PET y UHMWPE durante 10 min en dos condiciones diferentes: Ar con un potencial autoinducido de 100 V, y O_2 a 400 V. Con esto se obtienen muestras de diferente topografía, como se observa en la *Figura III.12*.

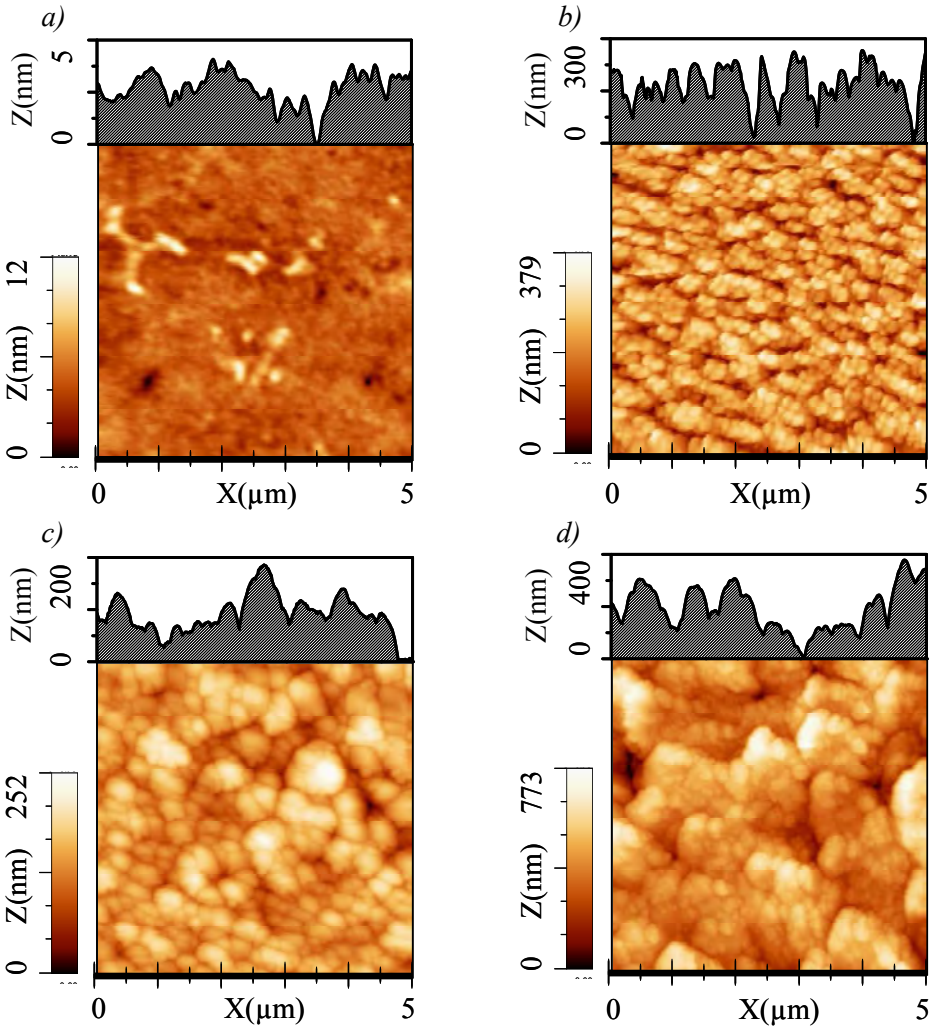


Figura III.12. Topografía superficial (AFM) y perfiles lineales de PET sometido a etching con plasma de Ar (a) y O_2 (b) y de UHMWPE sometido a etching con plasma de Ar (c) y O_2 (d).

Como puede verse, los diferentes tratamientos generan una topografía notablemente diferente, con motivos de mayor tamaño en el caso del plasma de oxígeno, además de importantes variaciones en la rugosidad (nótese las diferencias en la escala de los perfiles de línea). Estas imágenes prueban que se pueden conseguir superficies altamente rugosas mediante variaciones en las condiciones del plasma, sin tener que emplear largos periodos de tratamiento.

Parte B: Funcionalización superficial con recubrimientos de fluorocarbono.

Una vez que se conoce cómo preparar sustratos de rugosidad variable, se procede a la preparación de los diferentes recubrimientos basados en carbono y flúor y a su caracterización química.

B.1. Procedimiento experimental.

En este apartado se describe brevemente la preparación de los tres tipos de recubrimientos estudiados y su caracterización.

B.1.1. Preparación de láminas delgadas fluorocarbonadas.

Se preparan películas delgadas de DLC, DLC-F y CF_X sobre diferentes sustratos: obleas de silicio pulido, PET y UHMWPE. El silicio es un sustrato plano donde se espera obtener una lámina delgada fluorocarbonada con una rugosidad muy baja (del orden de las décimas del nm), por lo que se pueden considerar superficies virtualmente planas. Además, posibilitan la caracterización de las películas por Raman e infrarrojos sin interferencia de la señal del sustrato. Los dos sustratos poliméricos, por su parte, son superficies susceptibles de sufrir un *etching* por la acción del plasma (véase la Parte A), haciendo posible la preparación de muestras de

DLC, DLC-F y CF_X con rugosidad controlada. Finalmente, se preparan recubrimientos de diferentes espesores sobre silicio para poder comprobar el efecto del espesor en la rugosidad de las muestras obtenidas.

Las diferentes láminas delgadas se fabrican por PECVD mediante el procedimiento descrito en el capítulo anterior, empleando un potencial de 100 V. Se selecciona este voltaje debido a que se necesita poder preparar muestras de espesor elevado sobre silicio para evaluar el efecto del espesor en la rugosidad y, por motivos experimentales, las muestras preparadas a 200 V presentan mayores tensiones que dan lugar a su delaminación. Como, además de las muestras planas se requiere la fabricación de muestras de rugosidades variables, se utilizan, sustratos de PET y UHMWPE tratados previamente con plasma en las condiciones expuestas en el Apartado A.2.2. En la *Tabla III.2* se resumen las condiciones experimentales de preparación de las muestras estudiadas, incluyendo el pretratamiento y la deposición de las películas de fluorocarbono. El espesor de las láminas, aunque varía según la composición dadas las diferentes velocidades de crecimiento de cada compuesto (véase *Tabla II.1*), es de al menos 200 nm para estar seguros de que la superficie queda completamente cubierta por el material, salvo para las muestras de silicio preparadas con menores tiempos de deposición.

Tabla III.2. Condiciones experimentales para la preparación de los diferentes tipos de recubrimientos en muestras de diferente rugosidad.

Sustratos		Si (cuarzo)	PET, UHMWPE
Pretratamiento (10 min)	*Etching* suave	100 % Ar 200 V 0.03 mbar	100 % Ar 200 V 0.03 mbar
	Etching agresivo	-	100 % O_2 400 V 0.07 mbar
Tiempo de deposición		5, 10, 15, 20 min	20 min
Condiciones de deposición	DLC	C_2H_2 (10 %) + H_2 (80 %) + Ar (10 %) 100 V 0.15 mbar	
	DLC-F	C_2H_2 (14 %) + H_2 (57 %) + Ar (14 %) + C_4F_8 (15 %) 100 V 0.1 mbar	
	CF_X	Ar (50 %) + C_4F_8 (50 %) 100 V 0.05 mbar	

B.1.2. Caracterización de los recubrimientos obtenidos.

Se analiza la química de los recubrimientos por XPS y espectroscopías Raman y FT-IR. Se realiza un análisis crítico del efecto del espesor de los recubrimientos preparados sobre silicio en la rugosidad superficial, así como de la influencia de la escala de medida en las muestras preparadas sobre sustratos poliméricos de diferente rugosidad.

B.2. Resultados y discusión.

En el capítulo anterior se realiza un análisis exhaustivo de los recubrimientos de DLC, DLC-F y CF_X. La *Tabla III.3* resume las principales conclusiones obtenidas en dicho estudio. Es de destacar que se obtienen valores de composición idénticos independientemente del sustrato empleado y del espesor de las capas depositadas sobre silicio en el rango estudiado (de 50 a 400 nm aproximadamente, según el tipo de recubrimiento).

Tabla III.3. Resumen de la caracterización química realizada en el Capítulo II para capas finas de DLC, DLC-F y CF_X preparadas a 100 V.

Técnica	**DLC**	**DLC-F**	**CF_X**
XPS	- Compuesto de carbono	- Incorporación moderada de F (relación F/C = 0.68) - Proporción baja de grupos $–CF_2$ (4 %)	- Mayor incorporación de F (relación F/C = 1.83) - Alta proporción de grupos $–CF_2$ (27 %) y $–CF_3$ (17 %)
Raman/ FT-IR	- Estructura tridimensional - Alta proporción sp^3 (carácter polimérico)	- Estructura tridimensional - Menor proporción sp^3	- Cadenas poliméricas cortas - Alta proporción sp^3

A continuación, se realizan medidas topográficas mediante AFM para determinar la rugosidad superficial de los recubrimientos de DLC y de los dos materiales fluorocarbonados depositados sobre obleas de silicio pulido. Los valores de RMS incluidos en la *Tabla III.4* muestran que en los tres casos se obtienen superficies relativamente planas, si bien se aprecia un ligero aumento de la rugosidad en las muestras preparadas en presencia de flúor en el plasma, posiblemente debidas al desbastado químico producido por especies fluoradas.[51] En esta tabla también se observa que, dado que la rugosidad medida en este tipo de muestras prácticamente

no cambia con la escala de medida, la saturación de la rugosidad se alcanza para escalas de medida del orden de 1 µm x 1 µm.

Tabla III.4. Valores de RMS a 1 µm x 1 µm y 5 µm x 5 µm de capas finas de DLC, DLC-F y CF_X depositadas sobre obleas de silicio pulido durante 10 min.

Escala de medida	**RMS (nm)**		
	DLC	DLC-F	CF_X
1 µm x 1 µm	0.23	0.49	0.42
5 µm x 5 µm	0.23	0.48	0.48

En la *Figura III.13* se muestran las micrografías de AFM empleadas para la determinación de los valores de RMS incluidos en la *Tabla III.4*. De la observación de éstas se deduce que el tamaño de granos crece conforme se adiciona flúor en la superficie, siguiendo el orden DLC < DLC-F < CF_X.

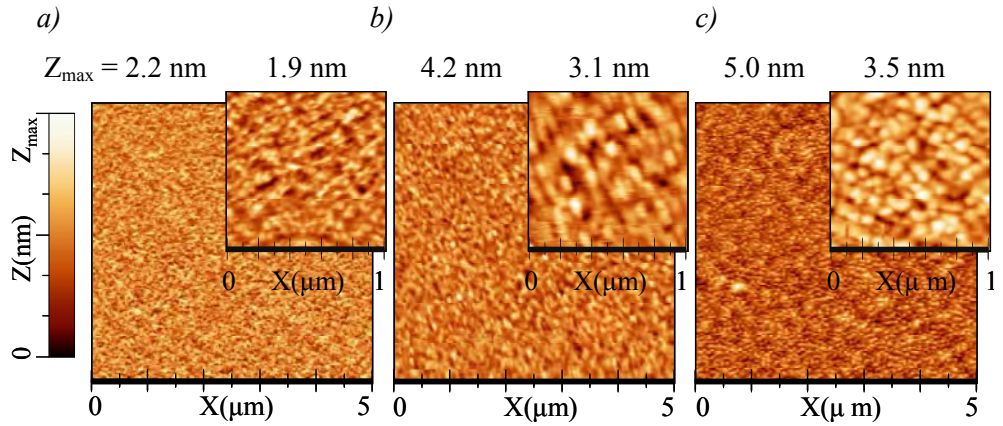


Figura III.13. Imágenes de AFM a 5 µm x 5 µm y 1 µm x 1 µm (imágenes superpuestas) de láminas delgadas de a) DLC, b) DLC-F y c) CF_X preparadas sobre obleas de silicio pulido durante 10 min.

Por otra parte, se determina la dependencia de la rugosidad superficial con el espesor de las capas mediante una representación logarítmica de los valores de RMS

frente al tiempo de deposición (*Figura III.14*). Con esto, se pone de manifiesto que la rugosidad aumenta levemente con el espesor de la capa depositada.

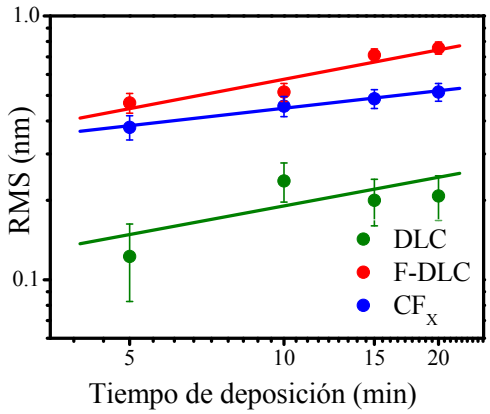


Figura III.14. Evolución de la rugosidad de los diferentes recubrimientos en función del tiempo de deposición.

Finalmente, se estudia la topografía de los recubrimientos preparados sobre sustratos poliméricos (PET y UHMWPE) con rugosidad variable controlada por ataque con plasma. Como prueban los resultados de la Parte A, para poder asignar un valor de RMS a las muestras de PET-Ar/O_2 y UHMWPE-Ar/O_2 recubiertas con DLC, DLC-F y CF_X, es necesario determinar la escala de saturación. Los resultados de este análisis aplicado a sustratos de UHMWPE se representan en la *Figura III.15*, donde puede verse que para las muestras más planas (con valores de RMS en saturación inferiores a unos 80 nm, correspondientes a los pretratamientos con plasma de Ar a 200 V) la saturación se alcanza a longitudes de observación de 5 µm o incluso inferiores, mientras que las muestras más rugosas (preparadas con un pretratamiento con plasma de O_2 a 400 V) han de medirse con longitudes de observación de, al menos, 10 µm. Teniendo en cuenta que las muestras preparadas sobre PET son menos rugosas que las homólogas sobre UHMWPE y, por tanto, la saturación se alcanza a menores escalas (curvas no mostradas), se infiere que para las muestras fluorocarbonadas descritas en este capítulo es conveniente realizar medidas de AFM con una escala de 10 µm x 10 µm o superior para estar seguros de que se alcanza la saturación y poder dar un valor de RMS representativo.

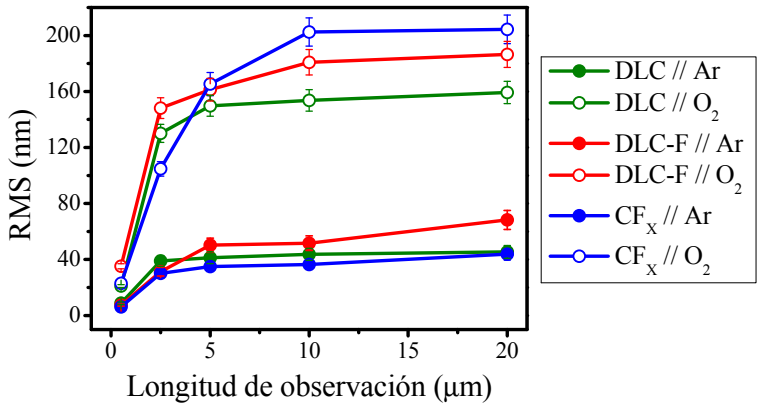


Figura III.15. Variación de RMS con la longitud de observación de películas de DLC, DLC-F y CF_X depositadas sobre UHMWPE sometido a etching con plasma de Ar y de O_2. La rugosidad inicial del sustrato previamente a los tratamientos de desbastado químico es del orden de 15 nm.

Parte C: Mojado de las superficies fluorocarbonadas.

Finalmente, tras conocer la química y la rugosidad superficiales de los recubrimientos fluorocarbonados desarrollados en este capítulo, se realiza un estudio de cómo afectan estos factores a su mojabilidad superficial.

C.1. Procedimiento experimental.

La mojabilidad superficial se caracteriza, en este caso, por los ángulos de contacto de avance y retroceso con agua mQ (desionizada y bidestilada) determinados por el método de variación del volumen (véase *Figura III.2*). Además, se prueba la validez de los modelos de Wenzel y de Cassie-Baxter para describir las variaciones en el ángulo de contacto de las muestras con la rugosidad. Para ello, se calculan los coeficientes r_W y f_{CB} a partir de un análisis de imágenes de AFM de cada muestra con el programa WSxW de Nanotec.

C.2. Resultados y discusión.

A continuación se muestran los resultados del análisis de la mojabilidad, diferenciando entre las muestras planas (es decir, las de rugosidad inferior a 1 nm) y las muestras rugosas. Después se muestra la aplicación de los modelos de mojado a todas las muestras analizadas.

C.2.1. Mojabilidad de recubrimientos fluorocarbonados de baja rugosidad (RMS < 1 nm): efecto de la química superficial.

Con el objetivo de determinar cómo afecta el tipo de recubrimiento a la mojabilidad se realizan medidas de los ángulos de contacto de avance y retroceso de muestras de DLC, DLC-F y CF_X crecidas sobre silicio con diferentes espesores. Estos datos se incluyen en la *Tabla III.5*, que muestra los valores en función del tiempo de deposición (en lugar de en función del espesor de los recubrimientos debido a las diferencias en la velocidad de deposición de los diferentes recubrimientos mostrados en la *Tabla II.1*). Si se comparan los ángulos de contacto obtenidos para las diferentes composiciones superficiales con espesores equivalentes, se observa que tanto los ángulos de avance como los de retroceso aumentan con el porcentaje de flúor incorporado (CF_X > DLC-F > DLC). Esto sustenta la convención extendida de que las superficies que contienen enlaces C–F en su superficie presentan un carácter más hidrofóbico que el DLC. Puesto que estas muestras, debido a su baja rugosidad, pueden considerarse como virtualmente planas con respecto a la mojabilidad, se puede concluir que una fluoración limitada del DLC (es decir, muestras de DLC-F) conduce a incrementos en los ángulos de contacto poco importantes y que se requiere una fluoración más extensiva de la superficie con la formación de una alta proporción de grupos $–CF_2$ y $–CF_3$ (véase *Tabla III.3*) para lograr valores de ángulo de contacto significativamente mayores a los de DLC.

Tabla III.5. Ángulos de contacto de avance (θ'_{av}) y retroceso (θ'_{re}) con agua e histéresis ($\Delta\theta'$) de los diferentes recubrimientos depositados sobre obleas de silicio pulido durante periodos de tiempo crecientes.

Tiempo de preparación (min)	**DLC**			**DLC-F**			**CF_X**		
	θ'_{av} (º)	θ'_{re} (º)	$\Delta\theta'$ (º)	θ'_{av} (º)	θ'_{re} (º)	$\Delta\theta'$ (º)	θ'_{av} (º)	θ'_{re} (º)	$\Delta\theta'$ (º)
5	78	50	28	83	72	11	105	74	31
10	78	55	23	84	74	10	106	76	30
15	78	59	19	84	75	9	107	76	31
20	79	60	19	84	76	8	108	78	30

En cuanto a la influencia del espesor, se observa que el ángulo de avance (θ'_{av}) en todos los casos permanece prácticamente constante con el espesor salvo para CF_X, donde se registra un aumento de 2-3 º. Por su parte, el ángulo de retroceso (θ'_{re}) aumenta para todas las muestras. Según se muestra en la *Figura III.14*, el valor de RMS aumenta con el espesor, de forma que las variaciones en el ángulo de contacto de avance de CF_X, aunque pequeñas, están de acuerdo con la afirmación ampliamente reportada de que la rugosidad superficial incrementa los ángulos de contacto de muestras hidrofóbicas.[7, 20-23, 28, 29, 52-57] No obstante, dado que las variaciones en la rugosidad con el espesor son tan limitadas, es un hecho coherente que los ángulos de contacto sufran un aumento poco significativo, que está, en algunos casos, dentro del error estimado para estas medidas. Sin embargo, el aumento de los ángulos de retroceso es contradictorio, ya que un aumento en la rugosidad debería conducir a una disminución en el ángulo de contacto.

La combinación de las variaciones de θ'_{av} y θ'_{re} dan como resultado que la histéresis en el caso de DLC decrezca alrededor de 10 º al aumentar el espesor. En las muestras de DLC-F, la histéresis presenta un valor muy pequeño, con un descenso poco marcado conforme crece el espesor de la capa (si bien, la diferencia

no es significativa, ya que está dentro del error experimental). Para CF_X, la histéresis es alta y prácticamente no varía en el rango de espesores estudiado. Este valor elevado de histéresis concuerda con los valores que pueden encontrarse en algunos trabajos sobre la mojabilidad de superficies de teflón y tipo teflón preparadas por PECVD[58, 59] que presentan, por tanto, una alta adhesión superficial con las gotas de agua.[11] El alto valor de $\Delta\theta$' de CF_X debe de estar relacionado con algún tipo de interacción irreversible de la gota con los grupos funcionales fluorados y no con grandes variaciones en la topografía superficial.[28, 58]

C.2.2. Mojabilidad de los recubrimientos fluorocarbonados rugosos (RMS > 10 nm): efecto de la rugosidad superficial.

Se realiza un estudio análogo sobre las muestras de DLC y los dos compuestos fluorados depositados sobre sustratos poliméricos rugosos, que proporciona los resultados que aparecen en la *Figura III.16*. En ella se representan los valores de los ángulos de avance y retroceso en función de la rugosidad determinada para las muestras preparadas con un tiempo de deposición de 10 min tanto en sustratos plano (datos de la *Tabla III.4*) como en los polímeros tratados (valores de RMS en saturación obtenidos a partir de las gráficas de la *Figura III.15* y su análoga para PET). En los tres materiales se produce un aumento considerable de θ'_{av} y θ'_{re} a medida que la rugosidad va creciendo. La comparación de las superficies de DLC y DLC-F muestra que, mientras que para las muestras más planas los ángulos de contacto son superiores en el compuesto fluorado, la tendencia se invierte para altas rugosidades. El comportamiento observado hace que la afirmación de que cualquier superficie de DLC-F tiene que ser más hidrofóbica que las de DLC sea discutible. Estos resultados corroboran que se pueden controlar las propiedades de mojado controlando la rugosidad, hecho reportado en diversos trabajos.[20-23, 52-54] Las muestras de CF_X, por su parte, presentan ángulos de contacto superiores a las anteriores independientemente de su rugosidad.

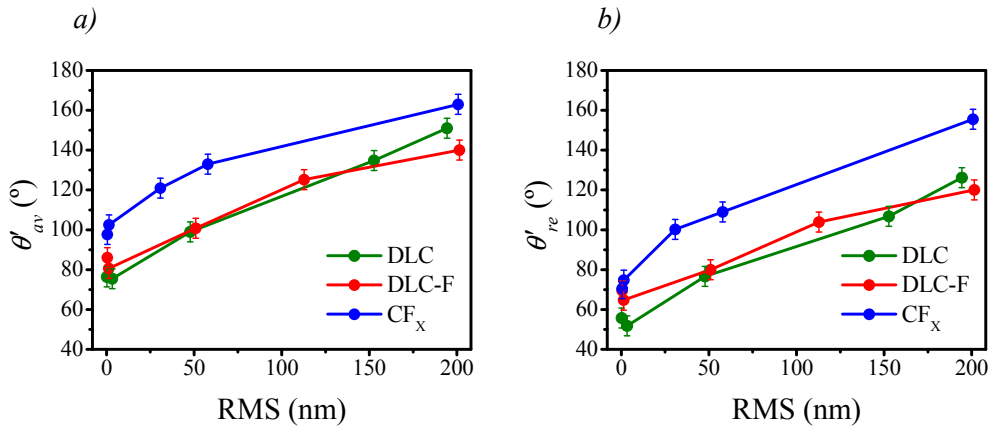


Figura III.16. Ángulos de a) avance y b) retroceso en función de la rugosidad para recubrimientos de DLC, DLC-F y CF_X depositados sobre silicio y sobre PET y UHMWPE sometidos a etching con plasma de Ar y de O_2.

A partir de los datos representados en la *Figura III.16*, se pueden calcular los valores de histéresis $\Delta\theta'$ y hacer una estimación de la energía de adhesión. Los resultados obtenidos se muestran en la *Tabla III.6*. Atendiendo a los valores correspondientes sólo a las muestras más rugosas (esto es, las muestras preparadas sobre UHMWPE-O_2), se observan valores de histéresis relativamente altos para las superficies de DLC y DLC-F y un valor muy bajo para la superficie de CF_X. Una evaluación de la variación de la histéresis con la rugosidad superficial muestra un aumento relativamente pequeño en DLC y DLC-F, mientras que en el caso de CF_X, aparece una notable disminución, que contradice la hipótesis ampliamente aceptada de que una alta heterogeneidad superficial (entendida como cambios topográficos) genera valores relativamente altos de $\Delta\theta'$.[6] Este resultado indica que la rugosidad oculta el efecto sobre la histéresis asociado a las interacciones irreversibles de los grupos $–CF_2$/$–CF_3$ con el agua mencionado anteriormente.

Una tendencia similar se observa para la estimación cualitativa de las energías de adhesión: los valores de $\cos(\theta'_{re})$- $\cos(\theta'_{av})$ (denotados en la tabla como $|\Delta \cos(\theta')|$) de DLC y DLC-F varían poco con la rugosidad y son relativamente altos (0.3-0.4), mientras que en CF_X se da una disminución considerable al aumentar la rugosidad, alcanzándose valores muy bajos (0.05) en la muestra más rugosa.

Tabla III.6. Histéresis y diferencia de los cosenos de θ'_{av} y θ'_{re} para muestras de DLC, DLC-F y CF_X preparadas sobre sustratos de diferente rugosidad.

Sustrato	**DLC**		**DLC-F**		**CF_X**	
	$\Delta\theta'$(º)	$\lvert\Delta \cos(\theta')\rvert$	$\Delta\theta'$(º)	$\lvert\Delta \cos(\theta')\rvert$	$\Delta\theta'$(º)	$\lvert\Delta \cos(\theta')\rvert$
Si	19	0.31	8	0.14	29	0.50
PET-Ar	24	0.37	16	0.26	28	0.48
UHMWPE-Ar	22	0.39	21	0.36	21	0.34
PET-O_2	28	0.42	21	0.34	15	0.22
UHMWPE-O_2	25	0.28	20	0.27	8	0.05

De los resultados incluidos la *Figura III.16* y la *Tabla III.*6 puede inferirse que las películas delgadas de CF_X depositadas sobre sustratos muy rugosos poseen las propiedades típicas de superficies superhidrofóbicas: ángulos de contacto superiores a 150 º[17-19] y un bajo valor de histéresis asociado a una baja energía de adhesión.[11] Se logra, por tanto, obtener materiales superhidrofóbicos basados en superficies fluorocarbonadas preparadas sobre sustratos poliméricos modificados, en la línea de diversos trabajos publicados por D'Agostino *et al*. y otros autores.[7, 28-31]

C.2.3. Interpretación de los resultados: modelos de mojado.

Se realiza un análisis de la mojabilidad de las películas preparadas utilizando los modelos de Wenzel y Cassie-Baxter para comprobar la aptitud de éstos para describir la dependencia de los ángulos de contacto con la rugosidad. Para ello, previamente se realiza un análisis crítico de la influencia de la resolución y la escala de observación en la determinación de los parámetros de rugosidad de cada modelo. Hay que mencionar que en este capítulo, como se comenta con anterioridad, los modelos de mojado no se aplican a ángulos de contacto estáticos (para los cuáles se formulan estos modelos) sino a dinámicos por ser éstos más reproducibles.

C.2.3.1. Descripción del mojado de superficies fluorocarbonadas de acuerdo con el modelo de Wenzel.

El modelo de Wenzel, como se describe en la introducción del presente capítulo, se basa en suponer superficies rugosas de composición homogénea (*Figura III.4.a*).

Para obtener el factor de Wenzel (r_W) se calcula el cociente entre el área real (valor experimental proporcionado por el programa WSxM) y el área proyectada para cada superficie (que es el área de observación de la medida). Hay que tener en cuenta que, aunque el factor de Wenzel es mayor para superficies rugosas que para superficies planas, no existe una relación directa entre r_W y el valor de la rugosidad RMS, de forma que dos superficies pueden presentar igual RMS y diferente área. El factor de Wenzel varía con los factores experimentales de medida de AFM. La *Figura III.17* muestra las variaciones del factor de Wenzel con la escala de medida para las diferentes capas depositadas sobre los sustratos poliméricos tratados. De esta representación se deduce que el factor de rugosidad varía con la escala pero, a diferencia del valor RMS (*Figuras III.9* y *III.15*), el parámetro r_W no presenta una tendencia creciente con el tamaño de observación hasta un valor de saturación, sino que alcanza un valor máximo en la escala de 5 µm x 5 µm. Este máximo es un efecto de convolución entre el tamaño de los píxeles y la longitud de observación: a escalas pequeñas, donde el tamaño de píxeles es muy pequeño, se obtiene una información muy detallada de la superficie (que aumenta el valor de área real determinado) pero se pierde información topográfica debido a que la longitud de medida sólo permite evaluar las oscilaciones de corto alcance; a medida que aumenta la escala, el tamaño de píxeles crece y se obtiene menor información de la superficie por unidad de superficie, pero se registran motivos correlacionados a longitudes mayores, con lo que el área medida aumenta hasta de 5 µm x 5 µm; a partir de esta escala, se evalúan las características topográficas correlacionadas a largo alcance, pero el tamaño de píxeles es muy elevado, de forma que se pierden datos sobre oscilaciones de muy baja frecuencia, disminuyendo el valor de área obtenido. En cualquier caso, el máximo observado a longitudes de medida de 5 µm no debe considerarse como el valor real de r_W de la superficie, sino el más cercano

(aunque inferior) al que puede accederse con medidas de AFM. Sin embargo, dado que experimentalmente no puede conocerse el valor del área real de la superficie, en la práctica se toma este valor máximo para hacer estimaciones de los ángulos equivalentes a los de la superficie plana.

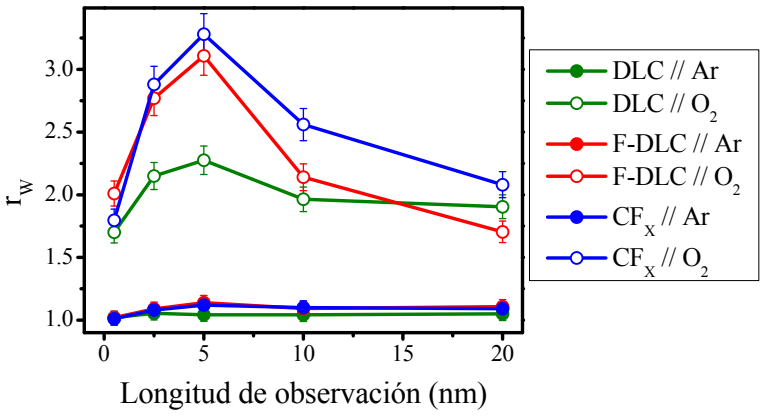


Figura III.17. Variación de r_W con la escala de medida en las muestras de DLC, DLC-F y CF_X depositadas sobre UHMWPE sometido a etching con plasma de Ar y de O_2.

Contrariamente a lo observado para los valores de RMS (véase *Figura III.11*), el parámetro r_W sí se ve afectado por la resolución de la medida de AFM, tal y como se muestra en la *Figura III.18*, correspondiente a CF_X. Para una longitud de observación dada, el área real determinada y, por tanto, r_W, crecen con la resolución de la medida. Por tanto, el factor de Wenzel más adecuado es aquél determinado para la máxima resolución de medida, teniendo en cuenta que siempre se están cometiendo errores por defecto.

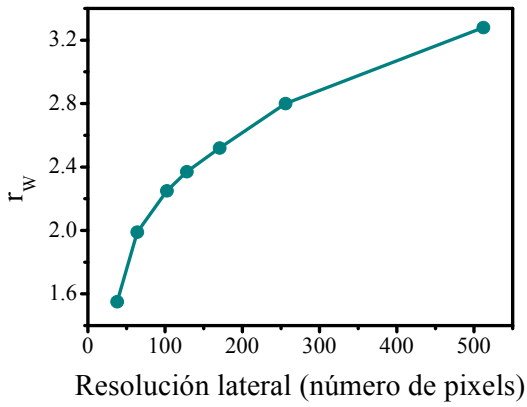


Figura III.18. Dependencia de r_W con la resolución de medida para un recubrimiento de tipo CF_X depositado sobre UHMWPE sometido a etching con plasma de O_2. La escala de medida es de 5 µm x 5 µm.

A partir de la evaluación conjunta de las *Figuras III.17* y *III.18* se concluye que el parámetro r_W más cercano al real que ha de emplearse para aplicar el modelo de Wenzel a estas superficies es el determinado con la máxima resolución (concretamente, 512 x 512 píxeles) y a una escala de observación elevada (en este caso, 5 µm x 5 µm) que, en contraste a lo propuesto previamente,[36, 43] no tiene por qué coincidir con la escala de saturación (10 µm x 10 µm). Cualquier interpretación del modelo de Wenzel deducida empleando valores de r_W inferiores puede conducir a conclusiones erróneas.

Para cada muestra, a partir de los valores de r_W (obtenidos de imágenes de AFM de 5 µm x 5 µm y 512 x 512 píxeles) y de los ángulos de contacto medidos experimentalmente (*Tabla III.5* y *Figura III.16*), se calcula el ángulo de contacto intrínseco aplicando la ecuación del modelo de Wenzel (*III.4*). Primero se comenta la muestra que arroja datos más coherentes, es decir, la de CF_X, cuyos resultados se incluyen en la *Tabla III.7*, además del r_W a 20 µm x 20 µm (valores entre paréntesis). En esta tabla se puede ver que para las muestras planas (es decir, las depositadas sobre silicio y PET-Ar) los valores intrínsecos θ_i coinciden con los experimentales θ', de forma que estas superficies pueden considerarse como virtualmente planas con respecto a la mojabilidad. Se puede asumir, por tanto, que los recubrimientos de

CF_X se caracterizan por ángulos θ'_{av} y θ'_{re} de 105 º y 77 º, respectivamente. Atendiendo al ángulo de avance, se observa que conforme aumenta la rugosidad, los ángulos de contacto medidos se hace mayores debido a que la rugosidad exalta el carácter hidrofóbico de la muestra, tal y como predice el modelo. Sin embargo, el modelo predice que en superficies con un ángulo menor a 90 º, como es el caso de los ángulos de retroceso de CF_X, el ángulo decrece al aumentar la rugosidad, contrariamente a los resultados mostrados en la *Tabla III.7*. Teniendo en cuenta que los modelos son aplicables a los ángulos estáticos y que en superficies hidrofóbicas éste es prácticamente igual al ángulo de avance, el hecho de que la tendencia se cumpla para θ'_{av} y no para θ'_{re} es razonable. Además, los valores de ángulo de Wenzel obtenidos para los ángulos de avance (asimilables a los estáticos) son muy similares independientemente de la muestra, lo que significa que el modelo de Wenzel parece explicar el comportamiento de mojado de las superficies recubiertas con CF_X, tomando como válidos los ángulos de contacto de avance.

Tabla III.7. r_W determinado a 5 µm x 5 µm con resolución máxima (512 x 512 píxeles), ángulos experimentales de avance (θ'_{av}) y retroceso (θ'_{re}), y ángulos intrínsecos ($\theta_{i,av}$ (WN) y $\theta_{i,re}$ (WN)) calculados para capas de CF_X depositadas sobre sustratos con rugosidad creciente. Los valores entre paréntesis se corresponden con los r_W a 20 µm x 20 µm e igual resolución.

Sustrato	**CF_X**				
	r_W	θ'_{av} (º)	$\theta_{i,av}$ (WN) (º)	θ'_{re} (º)	$\theta_{i,re}$ (WN) (º)
Si	1.00 (1.00)	108	108	78	78
PET-Ar	1.01 (1.01)	103	102	75	75
UHMWPE-Ar	1.12 (1.12)	121	117	100	99
PET-O_2	1.84 (1.69)	129	110	115	103
UHMWPE-O_2	3.28 (2.17)	163	107	156	106

Si se hace un análisis equivalente para los recubrimientos de DLC y DLC-F (*Tablas III.8* y *III.9*) se comprueba que los ángulos θ_{av} /θ_{re} de equilibrio de estas superficies son de 78 º/56 º (tomando el valor promedio para las dos superficies más planas) y 82 º/70 º para DLC y DLC-F, respectivamente. Partiendo de ángulos inferiores a 90 º se espera que un aumento de la rugosidad genere una disminución en los ángulos de contacto. No obstante, tanto los ángulos de avance como los de retroceso en ambas muestras aumentan con la rugosidad, hecho que pone de manifiesto la no aplicabilidad del modelo. Adicionalmente, los ángulos de Wenzel varían de unas muestras a otras, por lo que el modelo es claramente no aplicable para describir el mojado de las muestras de DLC y DLC-F, sin olvidar que no se está aplicando a ángulos estáticos sino a dinámicos.

Tabla III.8. r_W determinado a 5 µm x 5 µm con resolución máxima (512 x 512 píxeles), ángulos experimentales de avance (θ'_{av}) y retroceso (θ'_{re}), y ángulos intrínsecos ($\theta_{i,av}$ (WN) y $\theta_{i,re}$ (WN)) calculados para capas de DLC depositadas sobre sustratos con rugosidad creciente. Los valores entre paréntesis se corresponden con los r_W a 20 µm x 20 µm e igual resolución.

Sustrato	**DLC**				
	r_W	θ'_{av} (º)	$\theta_{i,av}$ *(WN)* (º)	θ'_{re} (º)	$\theta_{i,re}$ *(WN)* (º)
Si	1.00 (1.00)	79	79	60	60
PET-Ar	1.02 (1.02)	76	76	52	53
UHMWPE-Ar	1.06 (1.06)	99	99	77	77
PET-O_2	3.66 (2.63)	135	101	107	95
UHMWPE-O_2	2.28 (1.88)	151	113	126	105

Tabla III.9. r_W determinado a 5 µm x 5 µm con resolución máxima (512 x 512 píxeles), ángulos experimentales de avance (θ'_{av}) y retroceso (θ'_{re}), y ángulos intrínsecos ($\theta_{i,av}$ (WN) y $\theta_{i,re}$ (WN)) calculados para capas de DLC-F depositadas sobre sustratos con rugosidad creciente. Los valores entre paréntesis se corresponden con los r_W a 20 µm x 20 µm e igual resolución.

Sustrato	**DLC-F**				
	r_W	θ'_{av} (º)	$\theta_{i,av}$ *(WN)* (º)	θ'_{re} (º)	$\theta_{i,re}$ *(WN)* (º)
Si	1.00 (1.00)	84	84	76	76
PET-Ar	1.00 (1.00)	81	81	65	65
UHMWPE-Ar	1.14 (1.02)	101	100	80	81
PET-O_2	2.00 (2.00)	125	107	104	97
UHMWPE-O_2	3.11 (1.71)	140	104	120	99

Si se utiliza la aproximación de la media de los ángulos, se obtienen tendencias similares a los casos anteriores: en el caso de CF_X, los ángulos intrínsecos calculados no difieren mucho entre sí, mientras que para DLC y DLC-F hay variaciones enormes con el aumento de rugosidad (*Tabla III.10*).

Tabla III.10. Promedio entre los ángulos experimentales de avance y retroceso (θ'_{medio}) y ángulos intrínsecos (θ_i (WN)) calculados a partir de éstos para capas de DLC, DLC-F y CF_X depositadas sobre sustratos con rugosidad creciente.

Sustrato	DLC		DLC-F		CF_X	
	θ'_{medio} (º)	θ_i (WN) (º)	θ'_{medio} (º)	θ_i (WN) (º)	θ'_{medio} (º)	θ_i (WN) (º)
Si	69.5	70	80	80	93	93
PET-Ar	64.5	65	73	73	89	89
UHMWPE-Ar	88	88	90.5	90	110.5	108
PET-O_2	115	98	114.5	102	122	107
UHMWPE-O_2	128	109	130	102	159.5	107

Como último comentario a la aplicación del modelo de Wenzel, es de destacar que las diferencias entre los valores de θ_i (WN) se minimizan cuando se emplean factores de rugosidad r_W máximos. Por tanto, las discrepancias en los ángulos calculados pueden deberse, en parte, a que los valores de área calculados a partir de medidas de AFM son, probablemente, menores a los reales, especialmente para las muestras de mayor rugosidad.

C.2.3.2. Aplicación del modelo de Cassie-Baxter.

El modelo de Cassie-Baxter se aplica a superficies rugosas de composición heterogénea, donde pueden aparecer burbujas de aire (véase *Figura III.4.c*).

Consecuentemente con los resultados del apartado anterior, el factor de rugosidad de Cassie-Baxter (f_{CB}) se determina empleando micrografías de AFM con una escala de medida de 5 µm x 5 µm y una resolución de 512 x 512 píxeles. Este parámetro se determina haciendo uso del programa WSxM, que permite calcular fracción de

material en contacto con el líquido (f_{CB}) mediante la estimación de la superficie ocupada por zonas donde puedan formarse burbujas de aire ($1 - f_{CB}$). Los valores obtenidos se recogen en la *Tabla III.11*, junto con los ángulos intrínsecos calculados por el modelo de Cassie-Baxter. Las enormes variaciones en los ángulos intrínsecos (además de no poder aplicarse a ciertas muestras por arrojar resultados matemáticamente inconsistentes) muestran claramente que el modelo no es adecuado para describir el comportamiento de mojado de las superficies analizadas. Sin entrar en discusiones más profundas sobre el modelo, su no aplicabilidad parece coherente ya que con el tipo de topografía observado (*Figuras III.12* y *III.13*) la formación de burbujas de aire es poco probable.

*Tabla III.11. f_{CB} determinado a escalas de observación de 5 µm x 5 µm con resolución máxima (512 x 512 píxeles) y ángulos intrínsecos de muestras de DLC, DLC-F y CF_X depositadas sobre sustratos con rugosidad creciente. El símbolo * indica los casos en los que el ángulo intrínseco no puede calcularse matemáticamente.*

Sustrato	**DLC**			**DLC-F**			**CF_X**		
	f_{CB}	$\theta_{i,av}$ *(CB)* (º)	$\theta_{i,re}$ *(CB)* (º)	f_{CB}	$\theta_{i,av}$ *(CB)* (º)	$\theta_{i,re}$ *(CB)* (º)	f_{CB}	$\theta_{i,av}$ *(CB)* (º)	$\theta_{i,re}$ *(CB)* (º)
Si	0.50	*	57.4	0.51	*	*	0.52	71	*
PET-Ar	0.47	*	52.9	0.53	*	*	0.52	61	*
UHMWPE-Ar	0.47	41	81.2	0.47	51	79. 3	0.46	87	45
PET-O_2	0.51	97	68.2	0.50	94	59.8	0.50	98	85
UHMWPE-O_2	0.49	109	94.7	0.53	100	82.0	0.51	106	105

En este caso, la aproximación de la media de los ángulos arroja resultados igualmente inconsistentes, que no se adjuntan en esta memoria.

4. Resumen y conclusiones.

En el presente capítulo se muestra cómo influye la química superficial en la mojabilidad de diferentes recubrimientos fluorocarbonados. Los resultados expuestos muestran que los diferentes recubrimientos de DLC, DLC-F y CF_X depositados sobre superficies planas de silicio presentan una rugosidad similar, con pequeñas variaciones en el sentido DLC < DLC-F < CF_X debido al efecto de desbastado químico que ejercen las especies de flúor (C_xF_y) presentes en la descarga de plasma (véase el Capítulo II); se demuestra, además, que la rugosidad aumenta ligeramente conforme aumenta el tiempo de deposición. En estas muestras, en las que el efecto de la rugosidad es despreciable, se comprueba que sólo se produce un aumento efectivo del ángulo de contacto con agua en condiciones en las que se incorpora una alta cantidad de flúor en superficie, con la formación de grupos de tipo $–CF_2$ y $–CF_3$, es decir, las muestras de tipo CF_X.

Se deduce que también existe una relación entre el ángulo de contacto y la rugosidad superficial analizando muestras de DLC, DLC-F y CF_X de diferentes rugosidades. Para las muestras analizadas, el aumento de rugosidad conduce a un incremento en el ángulo de contacto de las muestras. Con esto, los recubrimientos de CF_X formados pueden llegar a presentar superhidrofobicidad si se depositan sobre sustratos muy rugosos. La superficie superhidrofóbica así generada presenta ángulos de contacto de avance y retroceso de 163 º y 156 º respectivamente y una baja histéresis asociada a una baja adhesión superficial que favorece el deslizamiento de las gotas de agua sobre la superficie. La fabricación de las superficies de diferente rugosidad se realiza mediante tratamientos de *etching* por plasma aplicados a polímeros, que se establecen como una herramienta eficaz para el control de la rugosidad en superficies poliméricas. Estos procesos de modificación de la topografía superficial de polímeros unidos a la deposición de recubrimientos constituyen una vía sencilla para fabricar superficies de composición y rugosidad deseadas.

Por otro lado, se concluye que para los recubrimientos fluorocarbonados estudiados, el RMS determinado por AFM no depende de la resolución de medida,

pero sí presenta una enorme dependencia con la escala de observación. Si la rugosidad es baja, este efecto no es importante. Sin embargo, para superficies muy rugosas la longitud de saturación es muy elevada, haciendo necesario el uso de escalas de hasta 10 y 20 μm para obtener valores de rugosidad representativos de la superficie. Además, con el estudio de muestras de PET sometidas a *etching* se ha puesto de manifiesto que este fenómeno no sólo se produce en láminas delgadas, como se reporta en numerosos trabajos, sino que es común a cualquier otro tipo de superficies rugosas.

Por último, se comprueba que la aplicación del modelo de Wenzel requiere la determinación del factor de rugosidad r_w con los parámetros experimentales de medida de AFM adecuados. En el estudio realizado se determina que las mejores condiciones de medida son la resolución máxima (512 x 512 píxeles) y una longitud de observación de 5 μm. Con los resultados obtenidos de la aplicación del modelo puede explicarse la mojabilidad de las superficies de CF_X si se consideran sólo los ángulos de contacto de avance; para el resto de muestras, la aplicación del modelo no es adecuada. En cuanto al modelo de Cassie-Baxter, se descarta su uso para este tipo de superficies.

5. Referencias.

[1] M. G. Donoso Morcillo. "Energía libre superficial de biomateriales metálicos: diferentes aproximaciones a partir de la goniometría de ángulo de contacto". Trabajo de Grado, Universidad de Extremadura (2004).

[2] T. Young. "An essay on the cohesion of fluids". Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 95:65-87 (1805).

[3] C. Della Volpe, M. Brugnara, D. Maniglio, S. Siboni, T. Wangdu. "About the possibility of experimentally measuring an equilibrium contact angle and its theorical and practical consequences". ContactAngle, Wettability and Adhesion, 4:79-99 (2006).

[4] X. Noblin, A. Buguin, F. Brochard-Wyart. “Vibrations of sessile drops”. The European Physical Journal, 166:7-10 (2009).

[5] T. S. Meiron, A. Marmur, I. S. Saguy. “Contact angle measurement on rough surfaces”. Journal of Colloid and Interface Science, 274:637-644 (2004).

[6] M. Strobel, Ch. S. Lyons. “An essay on contact angle measurements”. Plasma Processes and Polymers, 8:8-13 (2011).

[7] R. Di Mundo, F. Palumbo. “Comments regarding «An essay on contact angle measurements»”. Plasma Processes and Polymers, 8:14-18 (2011).

[8] M. Müller, Ch. Oehr. “Comments on «An essay on contact angle measurements» by Strobel and Lyons”. Plasma Processes and Polymers, 8:19-24 (2011).

[9] E. L. Decker, B. Frank, Y. Suo, S. Garoff. “Physics of contact angle measurement”. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 156:177-189 (1999).

[10] C. Andrieu, C. Sykes, F. Brochard. “Average spreading parameter on heterogeneous surfaces”. Langmuir, 10:2077-2080 (1994).

[11] C. G. L. Furmidge. “Studies at phase interfaces I. The sliding of liquid drops on solid surfaces and a theory for spray retention”. Journal of Colloid Science, 17:309-324 (1962).

[12] R. Shuttleworth, G. L. J. Bailey. “The spreading of a liquid over a rough solid”. Discussions of the Faraday Society 3:16-22 (1948).

[13] E. Bayramli, T. G. M. Van der Ven, S. G. Mason. “Tensiometric studies on wetting. I. Some effects of surfaces roughness (theorical)”. Canadian Journal of Chemistry, 59:1954-1961 (1981).

[14] T. Cubaud, A. Fermigier. “Advancing contact lines on chemically patterned surfaces”. Journal of Colloid and Interface Science, 269:171-177 (2004).

[15] A. Marmur. "Contact-angle hysteresis on heterogeneous smooth surfaces: theorical comparison of the captive bubble and drop methods". Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 136:209-215 (1998).

[16] M. A. Rodríguez-Valverde, F. J. Montes, M. Cabrerizo-Vílchez. "Wetting on axially-patterned heterogeneous surfaces". Advances in Colloid and Interface Science, 138:84-100 (2008).

[17] D. Bonn, J. Eggers, J. Indekeu, J. Meunier, E. Rolley. "Wetting and spreading". Reviews of Modern Physics, 81:739-805 (2009).

[18] T. Sun, L. Feng, X. Gao, L. Jiang. "Bioinspired surfaces with special wettability". Accounts of Chemical Research, 38:644-652 (2005).

[19] A. Nakajima, K. Hashimoto, T. Watanabe. "Recent Studies on Super-Hydrophobic Films". Monatshefte für Chemie, 132:31-41 (2001).

[20] A. Lafuma, D. Queré. "Superhydrophobic states". Nature Materials, 2:457-460 (2003).

[21] D. Queré. "Non-sticking drops". Reports on Progress in Physics, 68:2495-2533 (2005).

[22] K. K. C. Ho, S. Lamoriniere, G. Kalinka, E. Schulz, A. Bismarck. "Interfacial behavior between atmospheric-plasma-fluorinated carbon fibers and poly(vinylidene fluoride)". Journal of Colloid and Interface Science, 313:476-484 (2007).

[23] Ch. Aulin, A. Shchukarev, J. Lindqvist, E. Malmström, L. Wågberg, T. Lindström. "Wetting kinetics of oil mixtures on fluorinated model cellulose surfaces". Journal of Colloid and Interface Science, 317:556-567 (2008).

[24] M. Rubio Roy. "Surface properties of hard fluorinated amorphous carbon films deposited by pulsed-DC discharges". Ph.D. Thesis, Universitat de Barcelona, (2010).

[25] A. Zdziennicka, B. Janczuk, W. Wójcik. "Wettability of polytetrafluoroethylene by aqueous solutions of two anionic surfactant mixtures". Journal of Colloid and Interface Science, 268:200-207 (2003).

[26] A. Zdziennicka, B. Janczuk, W. Wójcik. "The wettability of polytetrafluoroethylene by aqueous solutions of sodium dodecyl sulfate and propanol mixtures". Journal of Colloid Interface Science, 281:465-472(2005).

[27] R. N. Wenzel. "Resistance of solid surfaces to wetting by water". Industrial and Engineering Chemistry, 28:988-994 (1936).

[28] M. Drabik, O. Polonskyi, O. Kylian, J. Cechvala, A. Artemenko, I. Gordeed, A. Choukourov, D. Slavinska, I. Matolinova, H. Biederman. "Super-hydrophobic coatings prepared by RF magnetron sputtering of PTFE". Plasma Processes abd Polymers, 7:544-551 (2010).

[29] A. Milella, R. di Mundo, F. Palumbo, P. Favia, F. Fracassi, R. d'Agostino. "Plasma nanostructuring of polymers: Different routes to superhydrophobicity". Plasma Processes and Polymers, 6:460-466 (2009).

[30] R. Di Mundo, F. Palumbo, R. D'Agostino. "Nanotexturing of Polystyrene surface in fluorocarbon plasmas: from sticky to slippery superhydrophobicity". Langmuir, 24:5044-5051 (2008).

[31] R. Di Mundo, R. Gristina, E. Sardella, F. Intranuovo, M. Nardulli, A. Milella, F. Palumbo, R. D'Agostino, P. Favia. "Micro-/nanoscale structuring of cell-culture substrates with fluorocarbon plasmas". Plasma Processes and Polymers, 7:212-223 (2010).

[32] A. B. D. Cassie. "Contact angles". Discussions of the Faraday Society, 3:11-16 (1948).

[33] A. B. D. Cassie, S. Baxter. "Wettability of porous surfaces". Transactions of the Faraday Society, 40:546-551 (1944).

[34] M. Miwa, A. Nakajima, A. Fujishima, K. Hashimoto, T. Watanabe. "Effects of the surface roughness on sliding angles of water droplets on superhydrophobic surfaces". Langmuir, 16:5754-5760 (2000).

[35] J. Xu, M. Li, Y. Zhao, Q. Lu. "Control over the hydrophobic behavior of polystyrene surface by annealing temperature based on capillary template wetting method". Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 302:136-140 (2007).

[36] A. Borrás, A.R. González-Elipe. "Wetting properties of polycrystalline TiO_2 surfaces: A scaling approach to the Roughness Factors". Langmuir, 26:15875-15882 (2010).

[37] L. Gao, T. J. McCarthy. "How Wenzel and Cassie-Baxter were wrong". Langmuir, 23:3762-3765 (2007).

[38] L. Gao, T. J. McCarthy. "An attempt to correct the faulty intuition perpetuated by the Wenzel and Cassie «laws»". Langmuir, 25:7249-7255 (2009).

[39] A. Marmur, E. Bittoun. "When Wenzel and Cassie are right: reconciling local and global considerations". Langmuir, 25:1277-1281 (2009).

[40] G. McHale. "Cassie and Wenzel: Were they really so wrong?". Langmuir, 23:8200-8205 (2007).

[41] L. Gao, T. J. McCarthy, X. Zhang. "Wetting and superhydrophobicity". Langmuir, 25:14100-14104 (2009).

[42] L. Gao, T. J. McCarthy. "Wetting 101 º". Langmuir, 25:14105-14115 (2009).

[43] A. Borrás, A. Yanguas-Gil, A. Barranco, J. Cotrino, A.R. González-Elipe. "Relationship between scaling behavior and porosity of plasma-deposited TiO_2 thin films". Physical Review B, 76:235303 (2007).

[44] M. Pelliccione, T.-M. Lu. "Evolution of Thin Films Morphology. Modelling and Simulations". Springer Verlag, Heidelberg (2008).

[45] A. L. Barabasi, H. E. Stanley. “Fractal Concepts in Surface Growth”. Cambridge University Press, Cambridge, UK (1994).

[46] S. J. Fang, S. Haplepete, W. Chen, C. R. Helms, H. Edwards. “Imaging flaws in magnetically permeable structures using the truncated generalized inverse on leakage fields”. Journal of Applied Physics, 82:5891-5898 (1997).

[47] (9 OST) S. Dimitrievska, A. Petit, C. J. Doillon, L. Epure, A. Ajji, L. Yahia, M. N. Bureau. “Effect of sterilization on non-woven polyethylene terephthalate fiber structures for vascular grafts”. Macromolecular Bioscience, 11:13-21 (2011).

[48] M. C. Sobieraj, C. M. Rimnac. “Ultra high molecular weight polyethylene: Mechanics, morphology, and clinical behavior”. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2:433-443 (2009).

[49] S. M. Kurtz, O. K. Muratoglu, M. Evans, A. A. Edidin. “Advances in the processing, sterilization, and crosslinking of ultra-high molecular weight polyethylene for total joint arthroplasty”. Biomaterials, 20:1659-1688 (1999).

[50] J. Aué, J. Th. M. De Hosson. “Influence of atomic force microscope tip-sample interaction on the study of scaling behavior”. Applied Physics Letters, 71:1347-1349 (1997).

[51] M. J. Barela, H. M. Anderson, G. S. Oehrlein. “Role of C_2F_4, CF_2, and ions in C_4F_8/Ar plasma discharges under active oxide etch conditions in an inductively coupled GEC cell reactor”. Journal of Vacuum Science and Technology A, 23:408-416 (2005).

[52] Y. Wu, H. Sugimura, Y. Inoue, O. Takai, Chem. “Thin films with nanotextures for transparent and ultra water-repellent coatings produced from trimethylmethoxysilane by microwave plasma CVD”. Chemical Vapor Deposition, 8:47-50 (2002).

[53] W. Lee, M. K. Jin, W. Ch. Yoo, E. S. Jang, J. H. Choy, J. H. Kim, K. Char, J. K. Lee. "Nanostructured metal surfaces fabricated by a nonlithographic template method". Langmuir, 20:287-290 (2004).

[54] M. Morra, E. Occhiello, F. Garbassi. "Knowledge about polymer surfaces from contact angle measurements". Advances in Colloid and Interface Science, 32:79-116 (1990).

[55] S. A. Kulinich, M. Farzaneh. "On wetting behavior of fluorocarbon coatings with various chemical and roughness characteristics ". Vacuum, 79:255-264 (2005).

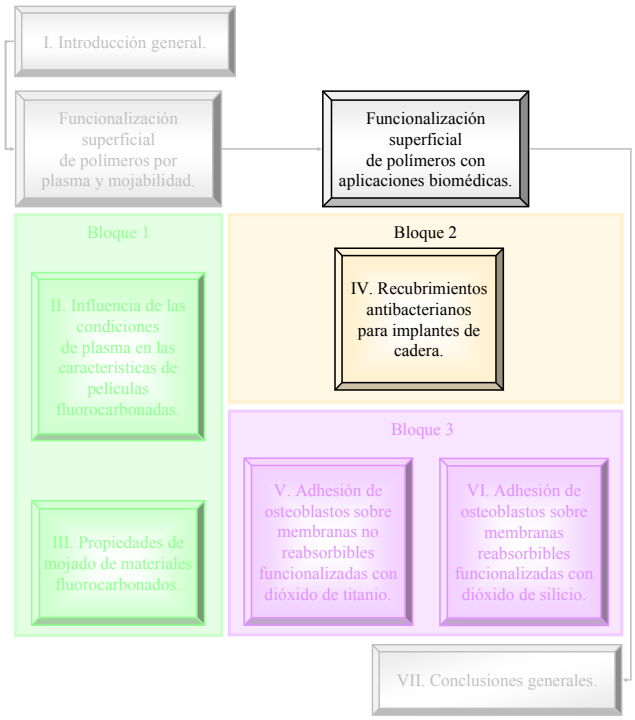
[56] T. Sun, L. Feng, X. Gao, L. Jiang. "Bioinspired surfaces with special wettability". Accounts of Chemical Research, 38:644-652 (2005).

[57] E. Bormashenko. "General equation describing wetting of rough surfaces". Journal of Colloid and Interface Science, 360:317-319 (2011).

[58] K. Gotoh, Y. Nakata, M. Tagawa, M. Tagawa. "Wettability of ultraviolet excimer-exposed PE, PI and PTFE films determined by the contact angle measurements". Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 224:165-173 (2003).

[59] R. Di Mundo, F. Palumbo, R. D'Agostino. "Influence of Chemistry on wetting dynamics of nanotextured hydrophobic surfaces". Langmuir, 26:5196-5201 (2010).

Bloque 2. Funcionalización superficial de polímeros para su uso en implantes



Capítulo IV.
Recubrimientos antibacterianos para implantes de cadera

1. Introducción.

El uso de prótesis e implantes es un tratamiento muy extendido que mejora la calidad de vida de numerosas personas. Estos dispositivos están diseñados para desempeñar una determinada función que el organismo ha perdido o desempeña de forma defectuosa. Se han desarrollado diferentes tipos de prótesis que se construyen con materiales de naturaleza diversa: metales, cerámicas, polímeros, etc. Un ejemplo de ello es la prótesis de cadera que se fabrica con diversos materiales según el tipo de dispositivo, siendo comunes las prótesis fabricadas con aleaciones metálicas de cobalto, cromo o titanio, acero inoxidable, materiales cerámicos y un polímero: el polietileno de ultra-alto peso molecular, UHMWPE.

1.1. Uso de UHMWPE en prótesis de cadera.

La articulación de la cadera está formada por la cabeza del fémur y una cavidad del hueso de la cadera llamada cotilo, ambas con forma semiesférica. Los extremos de estos huesos están recubiertos por un cartílago articular. La articulación se rodea por la membrana sinovial que produce un lubricante natural (el líquido sinovial), que amortigua las fuerzas que actúan sobre los huesos y reduce la fricción y el desgaste óseo. La articulación puede deteriorarse por diversos motivos: artrosis, artritis reumática, necrosis de cabeza femoral, fracturas desplazadas de cuello femoral (frecuentes en ancianos), tumores de cadera, etc. En estos casos se hace necesaria una artroplastia primaria para la implantación de una prótesis que subsane el daño y le devuelva su funcionalidad. Dependiendo del estado de los huesos que componen la articulación, se pueden usar prótesis parciales (en las que sólo se sustituye la cabeza del fémur) o prótesis totales (en las que se sustituye tanto la cabeza del fémur como el cotilo). La *Figura IV.1.a* muestra la sustitución de la articulación de la cadera por una prótesis total. La prótesis mostrada como ejemplo en la *Figura IV.1.b* se compone de: un vástago metálico, que se ancla dentro del fémur; una esfera metálica o cerámica, que hará las veces de cabeza del fémur; una pieza semiesférica, que se inserta en la cadera y actúa como cotilo; y una pieza semiesférica,

generalmente de UHMWPE, que se coloca entre la cabeza femoral y el cotilo. Esta pieza polimérica reduce el desgaste de las piezas metálicas por rozamiento, como un "cartílago auricular artificial".

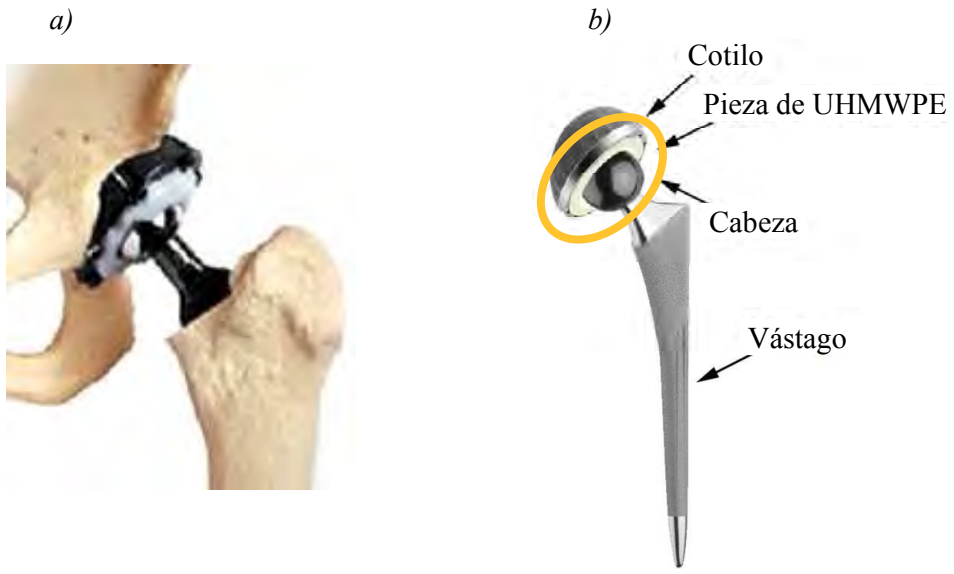


Figura IV.1.a) Implantación en el organismo y b) esquema de los componentes de una prótesis de cadera.

1.2. Problemas de las prótesis de cadera.

La prótesis de cadera puede presentar fundamentalmente cuatro problemas: problemas asociados con la integración ósea, infección, desgaste y biocorrosión.

- Problemas asociados con la integración ósea de la prótesis.

La prótesis integrada en el hueso puede sufrir un aflojamiento debido a la interacción entre éste y el material protésico, provocado por micromovimientos que se producen en la unión con el fémur y con la cadera. Esto hace que frecuentemente al cabo de unos años la prótesis deba reemplazarse por otra, generalmente de mayor tamaño, en la llamada intervención de revisión. En algunas ocasiones se puede llegar a producir la luxación o desencaje de la prótesis o, incluso, su rotura.

- Infección.

Los microorganismos se adhieren sobre cualquier material que se introduzca en el cuerpo, pudiendo ocasionar una infección. Hoy en día los problemas relacionados con la infección bacteriana son la segunda causa de retirada de implantes, con tasas de incidencia del 0.5 al 5 % para artroplastia primaria y que pueden aumentar considerablemente tras la revisión clínica.[1] Además de los problemas de salud provocados por la infección, normalmente la única forma de erradicarla es la extracción del implante por vía quirúrgica y un tratamiento con antibióticos para, finalmente, reinsertar una nueva prótesis en una tercera operación. Todo esto evidencia la importancia de desarrollar tecnologías que minimicen los riesgos de infección durante la cirugía, tanto por las tasas de morbilidad y mortalidad que produce como por los costes económicos derivados de la misma.[2-4]

El primer paso para la producción de una infección tras la colocación de una prótesis es la adherencia bacteriana, es decir, el anclaje de las bacterias responsables de la infección a su superficie, que ocurre previamente a la proliferación.[2] Este proceso conlleva una compleja serie de interacciones fisicoquímicas entre la superficie de acreción y el microorganismo patógeno. La adherencia bacteriana y subsecuente formación de biopelícula son fenómenos espontáneos y naturales con un alto impacto en la medicina moderna,[5, 6] que dependen de múltiples factores incluyendo el microorganismo causante, el tamaño de inóculo, las condiciones fisicoquímicas ambientales, la disponibilidad de nutrientes, las fuerzas hidrodinámicas y la naturaleza del sustrato de acreción.[7] Algunos de estos factores no pueden modificarse, como las propiedades del microorganismo o las condiciones fisicoquímicas y la disponibilidad de nutrientes (que dependerán de la zona donde se vaya a colocar el material y del estado del paciente); otros, por su parte, dependen del estado de asepsia del entorno quirúrgico (el tamaño del inóculo y las diferentes especies bacterianas presentes, teniendo en cuenta que las bacterias pueden provenir de una infección anterior a la intervención situada en cualquier otra parte del cuerpo). Con todo esto se pone de manifiesto que de todos los factores que controlan la adherencia bacteriana, el más fácilmente controlable es la superficie de acreción.

Hay que tener en cuenta que la capacidad de adherencia no es la misma para todas las especies bacterianas, dependiendo de la estructura de su envoltura celular (si son Gram-positivas o Gram-negativas, de la carga superficial de la bacteria, etc.). Por esto, los estudios de adherencia no son universales y, en general, extrapolables a distintos tipos de bacteria. Se requiere, por tanto, un estudio que incluya un elevado número de cepas de las especies aisladas mayoritariamente en material protésico retirado por infección: *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.[8-11]

- Desgaste.

En una prótesis de cadera, la pieza que sufre rozamiento y es, por tanto, susceptible a desgaste, es la de UHMWPE que se encuentra entre la cabeza de la prótesis y el cotilo artificial. El UHMWPE presenta una serie de propiedades físicas, químicas y mecánicas, además de una buena biocompatibilidad que le convierten en un material muy adecuado para proporcionar una superficie de apoyo en el reemplazamiento total de una articulación.[12, 13] Este polímero se somete a radiación gamma para aumentar su entrecruzamiento, pero en el proceso se producen radicales libres[14] que causan la oxidación del polímero y lo hacen susceptible de sufrir problemas de desgaste y degradación mecánica a largo plazo, generando el desprendimiento de escombros.[12, 15] Cabe mencionar que el UHMWPE puede desgastarse en la zona articular por movimientos macroscópicos, pero también por la zona no articular (es decir, la zona de unión con el cotilo), donde se generan micromovimientos que, aunque en menor medida, también producen desgaste.

- Biocorrosión.

El contacto de la prótesis de cadera con los fluidos corporales produce la biocorrosión de los materiales constituyentes del implante a largo plazo. Esta corrosión es especialmente importante para las piezas poliméricas, que presentan cierta permeabilidad a los fluidos biológicos. Esto puede provocar la pérdida de las buenas propiedades mecánicas que presenta el UHMWPE por procesos de oxidación tanto superficial como interna del material.

1.3. Funcionalización superficial y adherencia bacteriana.

Las interacciones sustrato-bacteria responsables de la adherencia bacteriana dependen de diferentes propiedades del material, que pueden controlarse mediante su modificación superficial. Un claro ejemplo es la esterilización del material quirúrgico mediante irradiación UV o tratamientos de gas plasma, que modifica las propiedades de las capas más externas del material. Además, se propone el uso de recubrimientos con determinada naturaleza química como una forma eficaz de generar superficies biocidas.[16] Con esto, puede reducirse el riesgo de infección, llegándose a generar incluso (en el caso óptimo) superficies intrínsecamente antibacterianas, previniendo la unión de bacterias y la formación de biopelículas sobre dispositivos médicos.[6, 17] Pueden encontrarse estudios *in vitro* de superficies recubiertas con diferentes moléculas biológicas o compuestos,[18, 19] además de ensayos experimentales *in vivo*[20, 21] que muestra la validez de esta estrategia.

El desarrollo de superficies intrínsecamente antibacterianas tiene una gran importancia en el ámbito médico. Además, es necesario desarrollar recubrimientos que mejoren las propiedades de desgaste del UHMWPE usado en implantes de cadera. Para ello se propone la fabricación de recubrimientos de DLC y DLC dopado con diferentes elementos (DLC-F, DLC-Si, DLC-Ag), que combinan unas buenas cualidades antiadherentes,[16, 22-24] con unas propiedades de dureza, resistencia al desgaste y fricción adecuadas, típicas de este tipo de estructuras. Todo ello, unido a su inercia química y su buena biocompatibilidad, hace que este tipo de superficies sean idóneas para su uso en implantes.[25, 26]

La incorporación de flúor, debido a su carácter bactericida,[27] parece una opción satisfactoria para reducir el riesgo de infección. Adicionalmente, se conoce que los recubrimientos de DLC-F presentan, por ejemplo, propiedades anticoagulantes cuando se emplean en dispositivos que están en contacto con la sangre,[28] aunque su rendimiento de desgaste es inferior al de DLC. Con todo esto, si se comprueba que la adición de flúor mejora la capacidad antiadherente del material, podría optarse por la preparación de láminas delgadas de DLC que acaben en DLC-F para mejorar las propiedades mecánicas y tener, al mismo tiempo, superficies antibacterianas.

Es destacable que el tipo de DLC preparado para los estudios que aquí se describen presenta unas buenas propiedades de dureza y desgaste,[26] evitando el desgaste del UHMWPE sobre el que se deposita. Además, debido a su alta elasticidad, se adapta a la deformación que sufre el UHMWPE con el uso de la prótesis. Sin embargo, cuando se alcanza una deformación elevada, el recubrimiento se quiebra, produciendo escombros que son fatales para el desgaste de la prótesis. Descartado su uso para la parte articular del UHMWPE en el implante, (unión con la cabeza de fémur artificial) se conoce que es adecuado para proteger la parte no articular (unión con el cotilo),[26] donde se producen micromovimientos.

Por otro lado, los recubrimientos tipo DLC son inertes y pueden considerarse buenos candidatos como protectores de corrosión por el medio biológico. Por todo esto, se deduce que el recubrimiento de UHMWPE con láminas delgadas fluorocarbonadas puede ser una buena estrategia para solventar los principales problemas de las prótesis de cadera relativos al material polimérico, es decir, los problemas de infección, de desgaste y de biocorrosión.

Algunos trabajos muestran estudios del efecto del flúor en la adherencia a otros materiales,[29] pero en estos casos se analiza la fase física del proceso de adherencia donde el efecto antibacteriano del flúor probablemente sea mínimo. Posiblemente se necesiten tiempos de incubación mayores a los descritos en estos trabajos para evaluar el efecto del flúor tanto en la adherencia bacteriana como en el desarrollo de biopelícula. Recientemente, estudios de recubrimientos de DLC-Ni y DLC-Si muestran una mejora en la capacidad antiadherente comparada con el DLC, que se relaciona con una disminución de la rugosidad superficial y con un incremento en la tensión superficial, proporcionando de hecho un menor ángulo de contacto con agua.[23] Además se sabe que la presencia de cargas en la superficie bacteriana,[30] o incluso el medio de cultivo (que puede modificar tanto la superficie como la carga bacteriana[31]) son factores influyentes en la adherencia. Es decir, a la hora de fabricar recubrimientos antibacterianos, se deben controlar propiedades como la composición y estructura química, la mojabilidad y la rugosidad superficiales, ya que éstas pueden tener un efecto importante en el comportamiento del material frente a la adherencia bacteriana.

1.3.1. Química superficial.

Dependiendo del tipo de recubrimiento, el material expone a la superficie determinados grupos funcionales con los que pueden interaccionar las diferentes bacterias. Esto hace que se requiera un estudio de la química superficial para poder predecir si la adherencia será mayor o menor en función de las características de las bacterias a analizar.

1.3.2. Rugosidad.

La rugosidad de la superficie del implante puede ser determinante para el proceso de adherencia. Así, el aumento de la rugosidad incrementa el anclaje bacteriano y la generación de biopelícula, tanto en superficies metálicas (como obleas de silicio sometidas a diversos tratamientos)[32] como en sustratos poliméricos.[33] Una explicación ampliamente aceptada es que las muestras de mayor rugosidad exponen mayor área susceptible a la adherencia de bacterias y los valles que aparecen en la superficie proporcionan, además, sitios de colonización más favorables.[6]

Un punto a considerar es el tipo de rugosidad superficial, es decir, el tamaño de los picos/valles que aparecen en el material. Puesto que el tamaño de las bacterias es de 0.5 a 5 μm, sólo motivos superficiales de este orden pueden afectar, a priori, a la adherencia bacteriana. En general, se encuentra que en superficies planas (con rugosidad del orden de pocos nanómetros) el tamaño bacteriano es varios órdenes de magnitud superior a la rugosidad de la muestra, mientras que esto no se cumple para superficies de mayor rugosidad,[22] cuyos espacios intersticiales o irregulares representan un sitio de anclaje preferente.[34]

1.3.3. Propiedades de mojado.

Las propiedades de mojado superficial de un determinado material puede influir notablemente en la adherencia bacteriana, por lo que pueden mejorarse sus

características antiadherentes mediante la manipulación de la hidrofobicidad empleando, por ejemplo, recubrimientos con diferente mojabilidad. Existen estudios que ponen de manifiesto que la adherencia bacteriana de varias especies de *Staphylococcus* y *Streptococcus* puede reducirse mediante el aumento de la hidrofobicidad de la superficie.[6, 22, 35] Por tanto, el carácter hidrofóbico/hidrofílico de una superficie puede ayudar en cierta forma a predecir la avidez de un tipo concreto de bacteria por un material dependiendo de su naturaleza química.[34]

Estas consideraciones deben tomarse con cuidado. Debido a que las propiedades de mojado superficiales se rigen por las tensiones superficiales, cambios en la tensión superficial y sus componentes polar y dispersiva conllevan modificaciones en la carga de la superficie y, por tanto, en la interacción entre la bacteria y la superficie.[17] En algunas publicaciones se concluye que la concentración de nutrientes puede verse favorecida por superficies apolares, hecho que puede asociarse a un incremento en la adherencia bacteriana cuando se realizan ensayos *in vitro* con un medio desprovisto de nutrientes, como el tampón fosfato (PBS).[7] Además, la adherencia bacteriana se reduce en superficies con alta tensión superficial total,[22] de forma que pueden existir superficies altamente hidrofóbicas que presenten una alta adherencia provocada por una baja tensión superficial.

2. Objetivos de este capítulo.

En este capítulo se pretende analizar la adherencia bacteriana a superficies de UHMWPE funcionalizadas con recubrimientos fluorocarbonados y relacionarla con las propiedades superficiales de las muestras preparadas.

- Desarrollar recubrimientos que mejoren la respuesta antibacteriana de la superficie de UHMWPE utilizado en prótesis de cadera.

Se determina la influencia de diferentes funcionalizaciones superficiales en la capacidad adherente de muestras de UHMWPE. Primeramente, se evalúa la adherencia bacteriana de varias cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* sobre piezas de

UHMWPE sin modificar. Posteriormente, este sustrato se recubre con láminas delgadas de DLC para ver cómo afecta a la adherencia la presencia de este tipo de estructuras químicas. El efecto de la incorporación de flúor en el material se determina a partir del estudio de muestras recubiertas con DLC-F.

Además, se estudia una cuarta superficie altamente fluorada (CF_X). Aunque las propiedades de dureza de este material son menos adecuadas debido a su naturaleza química, el análisis de la adherencia es interesante debido a que permite explorar la hipótesis generalmente aceptada de que, dado que la incorporación de flúor tiene efectos antisépticos,[27] una mayor cantidad de flúor superficial propicia un descenso en la adherencia bacteriana. Puesto que este tipo de estructuras, como se comenta en el Capítulo III, presenta ángulos de contacto mucho mayores que los materiales anteriores (pudiendo alcanzar incluso el estado de superhidrofobicidad), también permite determinar el efecto de las propiedades de mojado en la adherencia.

- Relacionar la adherencia bacteriana y las propiedades superficiales del material.

Se evalúa el efecto que tienen sobre la adherencia bacteriana las características de la superficie del material. Para ello, se compara la química superficial del polímero sin recubrir y de cada tipo de recubrimiento preparado. Por otro lado, se registran imágenes de AFM para conocer la influencia de la rugosidad en la capacidad adherente de las muestras. Finalmente se valoran cómo afectan la hidrofobicidad y la tensión superficial de las superficies a la adherencia.

3. Procedimiento experimental.

A continuación se describe brevemente la preparación y caracterización química de las diferentes superficies, incluidas con mayor detalle en el Capítulo II. Además, se analiza la topografía superficial y las propiedades de mojado de las muestras.

3.1. Recubrimientos fluorocarbonados: preparación, química, rugosidad y propiedades de mojado.

Las superficies estudiadas son UHMWPE sin tratar y el mismo polímero recubierto de DLC, DLC-F y CF_X. Las muestras recubiertas se denotan como DLC/UHMWPE, DLC-F/UHMWPE y CF_X/UHMWPE, respectivamente. Como sustratos se utilizan piezas de UHMWPE GUR 1050® de 10 x 10 mm^2 y 600 μm de espesor (Orthoplastic Ltd., Lancashire, Reino Unido), que sirven como muestras de referencia para los estudios de adherencia y como sustratos para los recubrimientos fluorocarbonados.

Se fabrican recubrimientos de DLC, DLC-F y CF_X sobre las láminas de UHMWPE en condiciones análogas a las descritas en el Capítulo II. Los sustratos se someten a un pretratamiento de 10 min con un plasma de Ar ($3 \cdot 10^{-2}$ mbar, 200 V) y la deposición se lleva a cabo durante 10 min a 200 V. Se emplea este voltaje debido a que proporciona superficies de DLC y DLC-F de alta dureza.[36]

Se determina la composición y estructura química de los recubrimientos (procedimiento realizado en el Capítulo II). La rugosidad se determina mediante medidas de AFM de 5 μm x 5 μm y resolución de 512 x 512 píxeles. En cuanto a las propiedades de mojado, se realizan medidas de ángulo de contacto estático con 3 μl de agua mQ 24 h después del tratamiento con plasma para minimizar los efectos del envejecimiento. Para determinar la tensión superficial total de cada muestra y sus componentes polar y dispersiva, se llevan a cabo, además, medidas de ángulo de contacto con gotas de 3 μl de diiodometano. El cálculo se realiza utilizando el método de Young-Dupré [37] (véase el Anexo I).

3.2. Estudio de adherencia bacteriana.

Se determina la adherencia de diferentes cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* sobre las superficies de UHMWPE, DLC/UHMWPE, DLC-/UHMWPE y CF_X/UHMWPE. El procedimiento a seguir es la siembra e incubación de las bacterias y la determinación de su adherencia a los diferentes sustratos, realizando

un tratamiento estadístico de los resultados. Este proceso se realiza en la Fundación Jiménez Díaz de Madrid por el grupo de investigación del doctor Jaime Esteban.

3.2.1. Cepas bacterianas.

Para los estudios de adherencia bacteriana se utilizan cepas de colección de *Staphylococcus* de dos especies distintas: *S. aureus* (15981[38]) y *S. epidermidis* (ATCC 35984). Además de estas cepas, se examinan seis cepas clínicas de *S. aureus* y cinco de *S. epidermidis*, todas ellas involucradas en infecciones ortopédicas y productoras de biopelícula en ensayos *in vitro*.[39, 40] La *Tabla IV.1* muestra el nombre y tipo de cada cepa y, en el caso de cepas clínicas, su fuente de aislamiento.

Tabla IV.1. Cepas bacterianas sometidas a estudio.

Especie	Cepa	Tipo	Fuente de aislamiento
S. aureus	15981	Colección	-
	P1	Clínica	Material de osteosíntesis
	P2	Clínica	Prótesis de cadera
	P4	Clínica	Prótesis de cadera
	P61.T4	Clínica	Clavos y tornillos
	P18	Clínica	Prótesis de cadera
	P95	Clínica	Prótesis de cadera
S. epidermidis	ATCC 35984	Colección	-
	P6.5	Clínica	Clavos y tornillos
	P53B	Clínica	Prótesis de cadera
	P55	Clínica	Prótesis de cadera
	P74	Clínica	Prótesis de cadera
	P101	Clínica	Prótesis de cadera

3.2.2. Procedimiento de siembra.

Se prepara un inóculo de 10^7-10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) por ml de acuerdo con el método descrito previamente por Kinnari *et al*,[21] que se expone a continuación: se realizan cultivos de las diferentes bacterias durante toda la noche a 37 ºC en caldo de soja tríptica (Tryptic-Soy Broth, bioMerieux Spain SA, Madrid, España), se centrifugan y los concentrados obtenidos se lavan tres veces con PBS (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Estados Unidos); posteriormente, a partir de los concentrados se realiza una suspensión bacteriana en PBS de 0.5 McFarland de turbidez, obteniéndose los inóculos. El tamaño del inóculo se confirma por conteos seriados de bacterias en agar de soja tríptica (Tryptic-Soy Agar) suplementado con un 5 % de sangre de oveja (bioMerieux Spain SA, Madrid, España).

Para la siembra se utilizan seis placas de cultivo (Iwaki, Asashi Glass Co. LTD, Japón), previamente esterilizadas con un tratamiento de gas plasma, donde se fijan las diferentes muestras. Se añade un volumen final de inóculo de 4 ml por placa y se incuba durante 90 minutos a 37 ºC. Seguidamente, se retira el inóculo y las superficies se limpian tres veces con PBS para eliminar las bacterias no adheridas. Por último, las muestras se incuban a 4 ºC durante 24h.

Las muestras se tiñen para posibilitar la visualización de las bacterias adheridas. Para ello, se ponen en contacto con 4 ml de naranja de acridina (AO, Becton Dickinson and Company, Spars Maryland, Estados Unidos) durante 2 min a temperatura ambiente. Se realizan dos lavados con agua destilada para eliminar el exceso de tinción y las muestras se secan al aire.

3.2.3. Determinación de la adherencia bacteriana.

La adherencia bacteriana se visualiza por microscopia de fluorescencia (véase Anexo I) tras la tinción con naranja de acridina con un aumento de 40x y se toman imágenes de 10-20 campos por superficie.

Los ensayos se hacen por triplicado. Para las cepas de colección, el número de observaciones es de 12 para UHMWPE sin recubrir y 20 para las muestras

recubiertas; mientras que para las cepas clínicas se realizan 21 observaciones por cada cepa y material. El porcentaje de superficie cubierta se determina con un análisis de las imágenes con el programa Image J, dándose el valor medio de todas las determinaciones y su desviación estándar.

3.2.4. Análisis estadístico de los resultados.

Se analizan individualmente las diferencias en la adherencia bacteriana entre las distintas superficies y entre las distintas cepas aplicando un test *t* no pareado (usando el programa Graphpad QuickCalcs). Mediante el programa R se realizan modelos de regresión lineal para evaluar la influencia en la adherencia de las especies bacterianas, del tipo de superficie de acreción, y del tipo de superficie de acreción en relación a las especies de bacterias. También se evalúan las interacciones significativas entre las bacterias y la superficie de acreción. Para cada caso, se elige una referencia y se determinan los valores del factor de corrección (f.c.) para cuantificar la diferencia entre las variables experimentales y la referencia. El signo de este coeficiente indica un aumento (valor de f.c. positivo) o una disminución (valor de f.c. negativo) en la adherencia bacteriana. El intervalo de confianza aplicado es del 95 % y se consideran diferencias estadísticamente significativas para valores de $p \leq 0.001$.

Se evalúa el rendimiento de adherencia usando un test *t* pareado (para comparar dos materiales) y un test Kruskal-Wallis (para todos los materiales, para ver si el conjunto de datos pertenece a la misma población y pueden considerarse, por tanto, como una única muestra, como un ANOVA aplicado a distribuciones no paramétricas).

4. Resultados y discusión.

En este apartado se describen la capacidad de adherencia de las muestras preparadas en función a sus propiedades superficiales.

4.1. Recubrimientos fluorocarbonados: caracterización de la química y la rugosidad superficial de las muestras.

La *Figura IV.2.a* presenta el espectro general de XPS correspondiente al UHMWPE sin recubrir. En este pueden verse los picos correspondientes a carbono (93 % atómico), que constituye este polímero y a oxígeno (7 %) procedente de contaminación superficial.[41] En la *Figura IV.2.b* se observa el pico de C 1s, que presenta una sola contribución debida a enlaces de tipo C–C y C–H.

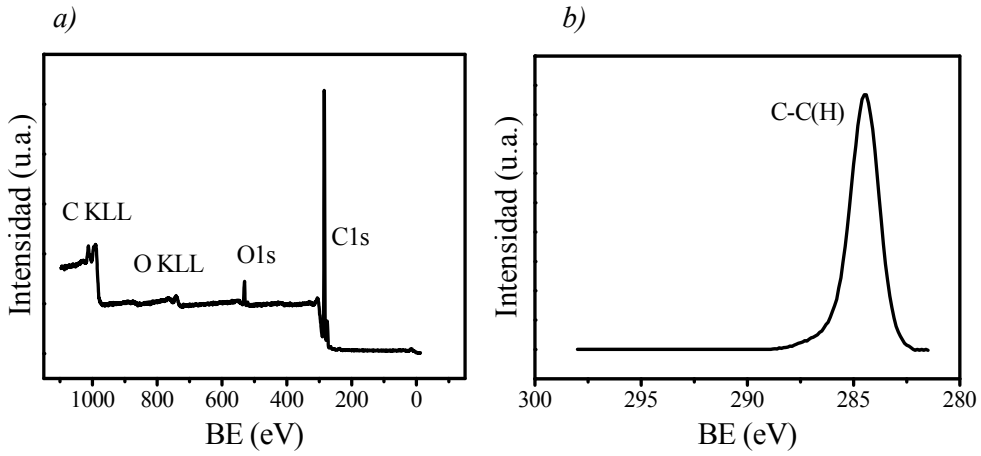


Figura IV.2.a) Espectro general y b) pico de C 1s obtenido por análisis por XPS de la muestra de UHMWPE original.

Como se muestra en el estudio por XPS realizado en el Capítulo II, para muestras fluorocarbonadas depositadas en condiciones análogas a las del presente capítulo se tiene que, sin considerar la contaminación por oxígeno, el DLC está formado sólo por C (e H), con enlaces de tipo C–C y C–H; la capa de DLC-F presenta una relación F/C de 0.33, con enlaces de carbono de tipo C–C(H) (72 %) C–CF (21 %), C–F (6 %) y CF_2 (1 %); en la capa de CF_X la incorporación de F es mucho mayor (F/C = 1.25), con el consiguiente aumento de grupos altamente fluorados; los tipos de carbono presentes son C-C(H) (12 %), C–CF (23 %), C–F (24 %), $–CF_2$ (26 %) y $–CF_3$ (15 %).

La *Figura IV.3* muestra la topografía determinada por AFM, el valor de RMS y los perfiles de línea tanto de la muestra original de UHMWPE como de las muestras

funcionalizadas. Estas imágenes prueban que la rugosidad del polímero aumenta con la deposición de las diferentes capas, especialmente en los recubrimientos preparados en presencia de flúor en el plasma. Este incremento en la rugosidad puede deberse a un proceso de desbastado químico inducido por las especies fluoradas presentes en la descarga de plasma durante la deposición.[42]

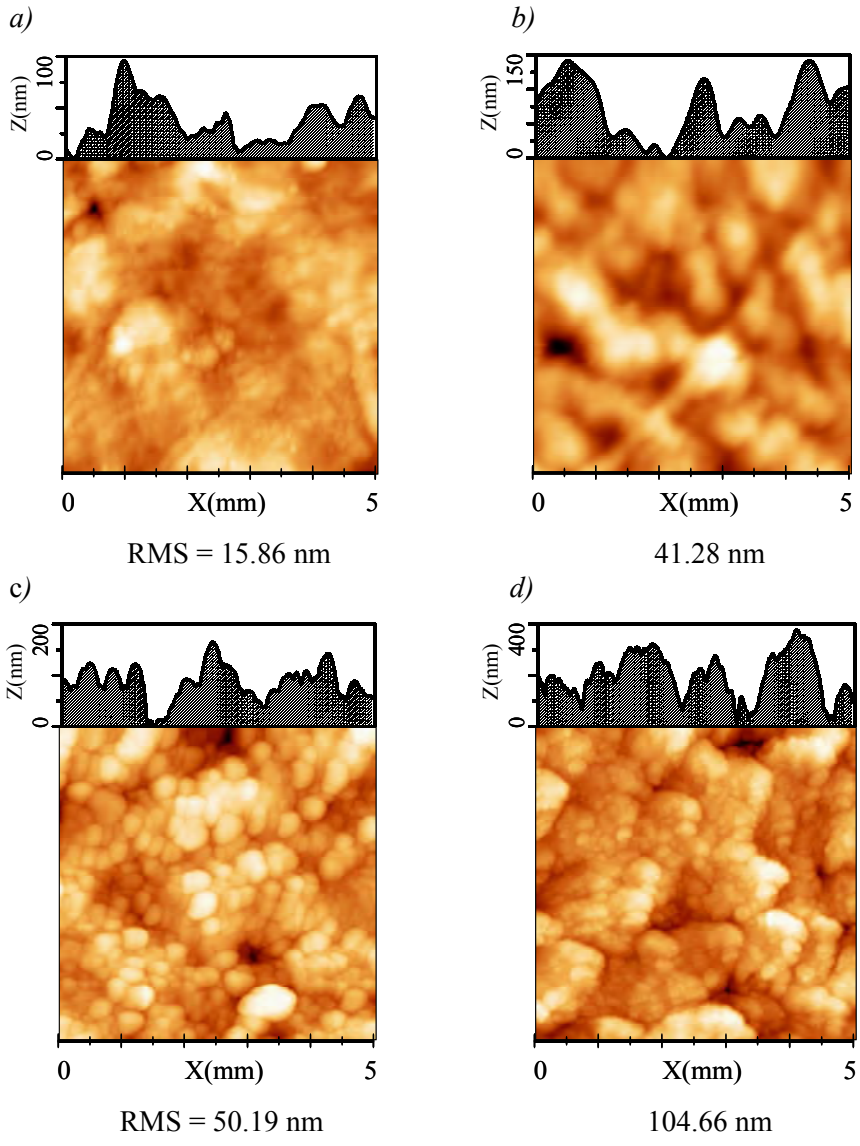


Figura IV.3. Imágenes topográficas tomadas por AFM, valores de RMS y perfiles de línea de las superficies estudiadas: a) UHMWPE, b) DLC/UHMWPE, c) DLC-F/UHMWPE y d) CF_X/UHMWPE.

4.2. Ángulos de contacto y tensión superficial de las superficies estudiadas.

Los valores de ángulo de contacto estático de cada muestra medido con agua (θ'_A) y con diiodometano (θ'_D) se recogen en la *Tabla IV.2*, junto con las tensiones superficiales calculadas a partir de éstos. En esta tabla puede verse que el polímero no tratado presenta un carácter hidrofóbico ($\theta'_A > 90$ º). Por su parte, las muestras de DLC/UHMWPE y DLC-F/UHMWPE son parcialmente hidrofóbicas (θ'_A ~90 º), siendo este DLC ligeramente más hidrofóbico que otros reportados.[43, 44] Por su parte, la muestra de CF_X/UHMWPE presenta un ángulo de contacto muy superior, con un valor cercano a la superhidrofobicidad. Estos datos concuerdan con los incluidos en la *Figura III.16* para superficies fluorocarbonadas de rugosidad similar.

Comparadas con el UHMWPE, la tensión superficial de DLC/UHMWPE aumenta notablemente, así como su componente dispersiva, con una reducción importante de la componente polar. La muestra de DLC-F/UHMWPE presenta valores similares a los de la superficie no tratada, con un ligero aumento en la tensión total. Finalmente, CF_X/UHMWPE muestra un valor de tensión total mucho menor que el resto de muestras, con una componente dispersiva prácticamente nula.

Tabla IV.2. Ángulo de contacto estático con agua (θ'_A) y con diiodometano (θ'_D), tensión superficial (γ_T) y componentes polar y dispersiva (γ_p y γ_d) de UHMWPE, DLC/UHMWPE, DLC-F/UHMWPE y CF_X/UHMWPE.

Parámetro	**UHMWPE**	**DLC/UHMWPE**	**DLC-F/UHMWPE**	**CF_X/UHMWPE**
θ'_A (º)	95	89	90	135
θ'_D (º)	57	25	52	138
$\gamma_T \pm \sigma$ (mN/m)	30 ± 3	47 ± 1	33 ± 2	1.6 ± 0.8
$\gamma_p \pm \sigma$ (mN/m)	1.2 ± 0.7	0.5 ± 0.4	2 ± 1	1.1 ± 0.6
$\gamma_d \pm \sigma$ (mN/m)	29 ± 2	46 ± 1	31 ± 1	0.5 ± 0.2

4.3. Adherencia bacteriana sobre UHMWPE y los recubrimientos preparados.

Previamente a los ensayos de adherencia bacteriana, se determina que el tamaño de los diferentes inóculos preparados es de 7.67 ± 0.15 a 8.28 ± 0.10 log UFC/ml. Mediante el proceso de siembra y visualización de la adherencia bacteriana descritos anteriormente, se obtienen los diferentes porcentajes de superficie recubierta por bacterias en los cuatro tipos de muestra. La *Figura IV.4* presenta, a modo de ejemplo, las imágenes de fluorescencia obtenidas para la determinación de la adherencia de la cepa de colección de *S. aureus* sobre los cuatro tipos de superficies estudiadas. Los porcentajes de adherencia de las diferentes bacterias sobre cada superficie se muestran en la *Figura IV.5*.

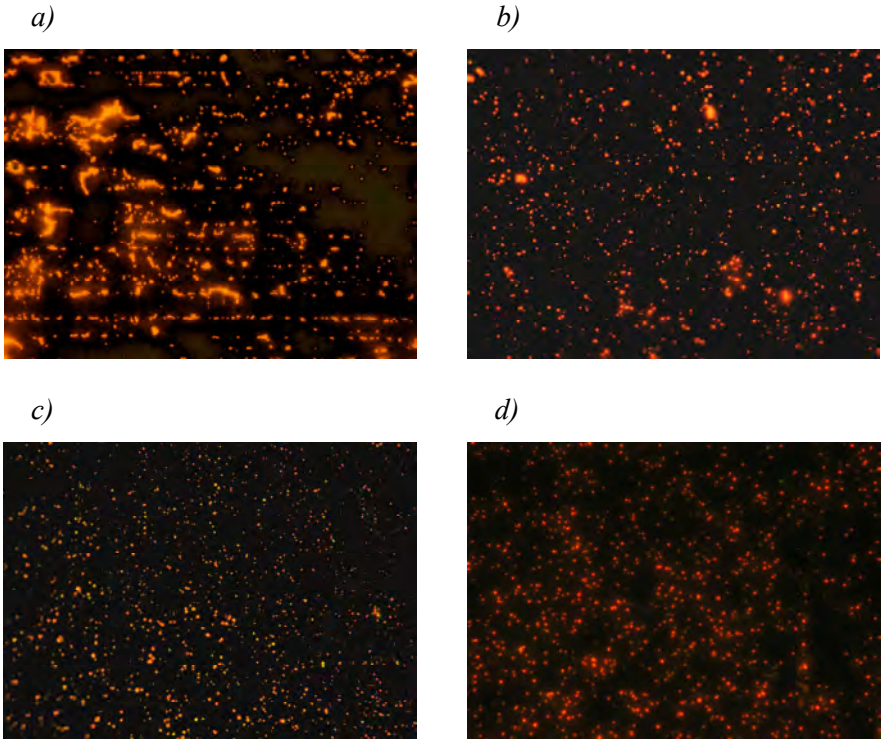


Figura IV.4. Imágenes de fluorescencia empleadas para determinar el porcentaje de superficie cubierta por la cepa de colección de S.aureus sobre a) UHMWPE, b) DLC/UHMWPE, c) DLC-F/UHMWPE y d) CF_X/UHMWPE.

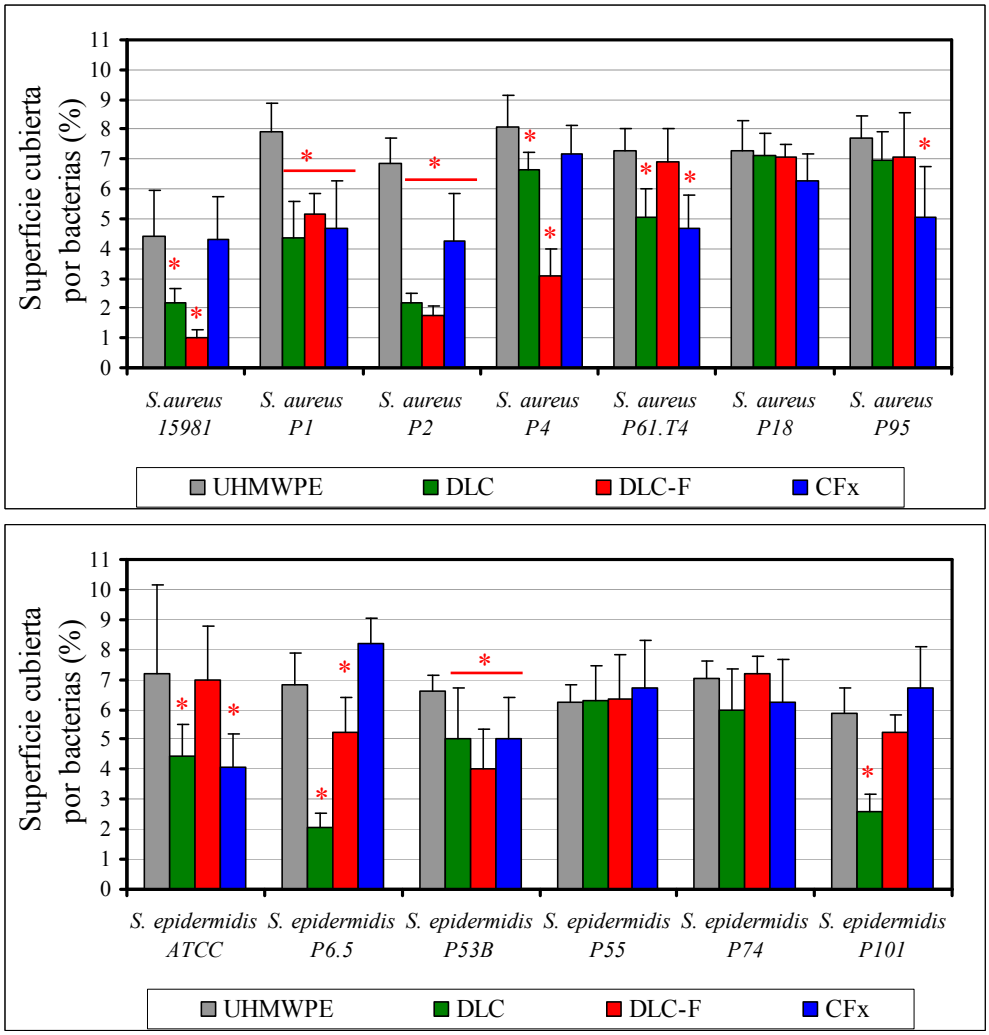


*Figura IV.5. Porcentaje de superficie cubierta (media ± desviación estándar) por las diferentes cepas de S. aureus (arriba) y S. epidermidis (abajo) de las muestras de UHMWPE, DLC/UHMWPE, DLC-F/UHMWPE y CF_X/UHMWPE. Las diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.001$) con respecto a UHMWPE se marcan con *.*

Como se indica anteriormente, *S. aureus* y *S. epidermidis* intervienen mayoritariamente en infecciones protésicas[8-11] y son células adherentes y formadoras de biopelícula sobre biomateriales.[40] Se observa que todas las cepas de *Staphylococcus* seleccionadas son capaces de adherirse fuertemente sobre

superficies de UHMWPE en un periodo de tiempo de 90 min (que es el periodo de exposición de la superficie al inóculo).

En primer lugar se evalúa la adherencia de los diferentes tipos de bacterias (es decir, *S. aureus* y *S. epidermidis*) sobre el polímero no tratado. Si se consideran sólo las cepas de colección, *S. epidermidis* ATCC 35984 es significativamente más adherente que *S.aureus* 15981 sobre el UHMWPE original, dato reportado con anterioridad.[45] Sin embargo, en las cepas clínicas, la situación cambia, siendo superior la adherencia de *S. aureus*. En conjunto, la adherencia de *S. aureus* es mayor que la de *S. epidermidis* (de 4.43 ± 1.50 a 8.09 ± 1.05 % y de 5.89 ± 0.81 a 7.21 ± 2.95 %, respectivamente), si bien es destacable que la cepa menos adherente es la cepa de colección *S. aureus* 15981 (4.43 ± 1.50 %). Estos resultados sugieren diferencias intraespecie en el patrón de adherencia de las cepas de colección y de las clínicas, hecho reportado previamente en estudios de otras modificaciones de UHMWPE.[46] De este modo, resulta evidente la gran importancia de incluir cepas clínicas en este tipo de experimentos *in vitro*, ya que el estudio de cepas de colección puede arrojar resultados que carezcan de utilidad práctica a la hora de predecir las superficies más adecuadas al uso clínico.

En segundo lugar, se evalúa el efecto que tienen las diferentes funcionalizaciones superficiales comparando los valores de adherencia obtenidos para cada muestra funcionalizada con los del UHMWPE sin recubrir. En DLC/UHMWPE se observa una reducción estadísticamente significativa en nueve de las once cepas estudiadas (cinco de *S. aureus* y cuatro de *S. epidermidis*). En DLC-F/UHMWPE y CF_X/UHMWPE se produce una disminución estadísticamente significativa en seis cepas (cuatro de *S. aureus* y dos de *S. epidermidis*). Además, las cepas de *S. aureus* P1 y P2 presentan reducciones significativas en todas las superficies cubiertas.

Para ver la mejora que supone la incorporación de flúor en superficie se toma como referencia la adherencia sobre la superficie de DLC/UHMWPE. De este modo se observa que el DLC-F provoca una reducción significativa en la adherencia de tres cepas de *S. aureus* (15981, P2 y P4), pero, por otra parte, aumenta significativamente en una cepa de *S. aureus* (P61.T4) y tres *S. epidermidis* (P6, P101 y ATCC 35984). El recubrimiento de CF_X sólo produce la disminución en la

adherencia en la cepa *S. aureus* P95. Los menores valores de adherencia se obtienen con las cepas de *S. aureus* 15981 y P2 sobre la muestras de DLC-F, con valores de 1.02 ± 0.27 y 1.76 ± 0.32 %, respectivamente.

Los resultados del análisis de regresión lineal para las variables "Bacteria" y "Superficie" se muestran en la *Tabla IV.3*, considerando de forma global todas las cepas de cada especie. Si se consideran conjuntamente los cuatro tipos de materiales (variable: Bacteria), se observa que la adherencia de *S. aureus* es mayor que la de *S. epidermidis* (f.c. 0.1989, unas 0.2 veces mayor), con diferencias no significativas.

Al comparar las superficies independientemente del tipo de bacteria analizada (variable: Superficie), se encuentra que la funcionalización con los tres tipos de compuestos provoca una reducción significativa en la adherencia con respecto a UHMWPE, en el orden DLC < DLC-F < CF_X. De entre los recubrimientos preparados, el DLC es menos adherente que F-DLC, con diferencias prácticamente significativas (p = 0.0017). El recubrimiento con mayor adherencia es el de CF_X, presentando un aumento significativo con respecto a la muestra de DLC/UHMWPE.

Tabla IV.3. Parámetros estadísticos del análisis de regresión lineal de las variables "Bacteria" y "Superficie".

Variable		**f.c.**	**Valor de *p***	**Significancia estadística**
Bacteria (Referencia: *S. epidermidis*)	*S. aureus*	0.1989	0.1159	Aumento no significativo
Superficie (Referencia: UHMWPE)	DLC/UHMWPE	-2.2512	<0.001	Reducción significativa
	F-DLC/UHMWPE	-1.7385	<0.001	Reducción significativa
	CF_X/UHMWPE	-1.4573	<0.001	Reducción significativa
Superficie (Referencia: DLC/ UHMWPE)	F-DLC/UHMWPE	0.5128	0.0017	Aumento no significativo
	CF_X/UHMWPE	0.7940	<0.001	Aumento significativo

Análisis previos (cuyos resultados no se incluyen en esta memoria) demuestran la presencia de interacciones significativas (estadísticamente hablando) entre las bacterias y la superficie, por lo que es lícito analizar separadamente tanto el efecto de cada superficie en función del tipo de bacteria (variable: Superficie por bacteria) como el de cada bacteria en función de la superficie (variable: Bacteria por superficie). El análisis de estas variables se incluye en la *Tabla IV.4*.

Con respecto al efecto de la superficie para cada uno de los dos tipos de bacterias (variable: Superficie por bacteria), se encuentran reducciones significativas en la adherencia de ambas especies sobre las superficies cubiertas con respecto al polímero no tratado. La muestra de DLC/UHMWPE presenta valores de adherencia similares para ambas especies bacterianas (f.c. -2.2768 para *S. aureus* y f.c. -2.2380 para *S. epidermidis*), hecho que sugiere que la inhibición de la adherencia bacteriana causada por este material puede ser especie-independiente. Otro resultado que se obtiene es que *S. aureus* se adhiere de forma similar sobre todas las superficies funcionalizadas (con valores de f.c. entre -2.0624 y -2.6563), mientras que la reducción en la adherencia de *S. epidermidis* de DLC-F/UHMWPE y CF_X/UHMWPE (f.c. -0.6838 y -0.7702, respectivamente) es mucho menor que la de DLC/UHMWPE; en estos casos, el efecto de reducción de la adherencia sí dependen de la especie bacteriana. Es destacable que las superficies fluoradas presentan una inhibición de la adherencia limitada para *S. epidermidis*, mostrando aumentos con respecto a la superficie de DLC/UHMWPE. Este es un fenómeno previamente probado por Katsikiogani *et al*. al testar la misma cepa de colección de *S. epidermidis* sobre superficies de PVC.[39] Las diferencias registradas para esta especie en función de la superficie explican por qué en el análisis conjunto de todas las cepas de cada especie, este microorganismo es más adherente que *S. aureus*.

Por último, al analizar el efecto de la especie bacteriana sobre cada una de las cuatro superficie (variable: Bacteria por superficie) se encuentra que la adherencia de *S. epidermidis* es menor que la de *S. aureus* para las dos primeras muestras (con un valor de $p \leq 0.001$ para UHMWPE y de $p = 0.0156$ para DLC/UHMWPE); en las muestras de DLC-F y CF_X la tendencia se invierte ($p \leq 0.001$ y $p = 0.0024$, respectivamente).

Tabla IV.4. Parámetros estadísticos del análisis de regresión lineal de las variables "Superficie por bacteria" y "Bacteria por superficie".

Variable			**f.c.**	**Valor de *p***	**Significancia estadística**
Superficie por bacteria (Referencia: UHMWPE)	*S. aureus*	DLC/UHMWPE	-2.2768	<0.001	Reducción significativa
		F-DLC/UHMWPE	-2.6563	<0.001	Reducción significativa
		CF_X/UHMWPE	-2.0624	<0.001	Reducción significativa
	S. epidermidis	DLC/UHMWPE	-2.2380	<0.001	Reducción significativa
		F-DLC/UHMWPE	-0.6838	0.0014	Reducción no significativa
		CF_X/UHMWPE	-0.7702	<0.001	Reducción significativa
Bacteria por superficie (Referencia: *S. epidermidis*)	*S. aureus*	UHMWPE	-0.6430	<0.001	Reducción significativa
		DLC/UHMWPE	-0.6043	0.0156	Reducción no significativa
		F-DLC/UHMWPE	1.3295	<0.001	Aumento significativo
		CF_X/UHMWPE	0.6492	0.0024	Aumento no significativo

Como puede comprobarse, existen diferencias en la adherencia bacteriana sobre los diferentes materiales. Si se tienen en cuenta las características de cada superficie puede verse, en primer lugar, que los cambios en la química y la rugosidad superficial conducen a cambios en el comportamiento de mojado de las diferentes muestras analizadas, con una hidrofobicidad similar en UHMWPE, DLC/UHMWPE

y DLC-F/UHMWPE, y mucho mayor en CF_X/UHMWPE. Sin embargo, pese a que ésta última superficie llega a ser prácticamente superhidrofóbica, no se disminuye la adherencia bacteriana, con lo que se demuestra que no necesariamente la superficie más hidrofóbica ha de presentar la menor adherencia. Por otro lado, el aumento de la rugosidad que se da en las muestras de DLC-F/UHMWPE y CF_X/UHMWPE, puede ejercer una influencia en el incremento de adherencia bacteriana observado, aunque este efecto debe de ser limitado a juzgar por el pequeño aumento en la adherencia mostrado por este último a pesar de su elevada rugosidad.

Comparado con el UHMWPE original, el recubrimiento con DLC incrementa notablemente tanto la tensión superficial total como su componente dispersiva, con una reducción importante de su componente polar, que se relaciona con una disminución de la adherencia. Mientras que el efecto beneficioso del aumento de la tensión total concuerda con los datos reportados,[22] la baja adherencia en una superficie principalmente apolar va en contra de los resultados obtenidos en trabajos previos.[7] El comportamiento adecuado de DLC/UHMWPE puede deberse en parte a su menor rugosidad y, sobre todo, a la repulsión electrostática entre la superficie y la bacteria, que puede favorecerse por el incremento en la componente dispersiva de la tensión superficial. La muestra de DLC-F presenta valores muy similares a los de la superficie no tratada, con un ligero aumento en la tensión total que podría explicar la disminución en la adherencia presentada por esta superficie; la mayor adherencia de *S. epidermidis* sobre DLC-F puede deberse a la moderada hidrofobicidad de esta especie[30, 47] que se une con gran afinidad sobre superficies apolares.[8, 30] La muestra recubierta con CF_X muestra un valor de tensión total mucho menor que el resto de muestras, con una componente dispersiva muy reducida. Este valor tan pequeño de la tensión total podría explicar por qué una superficie tan hidrofóbica como esta presenta valores de adherencia superiores a las muestras de menor ángulo de contacto.

5. Resumen y conclusiones.

Los experimentos expuestos en el presente capítulo muestran que el UHMWPE puede funcionalizarse con recubrimientos de DLC, DLC-F y CF_X mediante deposición por plasma generado por radiofrecuencia, mejorando los rendimientos antibacterianos en relación al sustrato polimérico. De este modo, se pueden generar superficies con enlaces $–CF_n$, en diferentes proporciones, todas ellas menos adherentes que UHMWPE sin tratar para las cepas estudiadas.

En general, *S. epidermidis* es menos adherente que *S. aureus* en las diferentes muestras recubiertas. La menor adherencia bacteriana se obtiene en la muestra de DLC/UHMWPE, seguida de DLC-F/UHMWPE y CF_X/UHMWPE, si se consideran las dos especies a la vez. No obstante, si se hacen distinciones entre los dos tipos de bacterias, se observa que el mejor y el peor resultado se obtienen para la muestra de DLC-F con *S. aureus* y *S. epidermidis* respectivamente. El DLC, además, muestra una capacidad antiadherente que parece ser especie-independiente, un efecto no observado con los otros compuestos. A este respecto, el comportamiento de las dos superficies fluoradas es similar.

Los resultados favorables obtenidos con DLC pueden relacionarse con un aumento notable de la tensión total y su componente dispersiva. Por otro lado, la incorporación de cantidades crecientes de flúor con la aparición de grupos altamente fluorados conlleva un aumento de la hidrofobicidad de la muestra. La adición de flúor, además, incrementa la rugosidad superficial por procesos de desbastado químico llevados a cabo por las especies fluoradas presentes en el plasma, contribuyendo también al aumento del ángulo de contacto con agua observado en CF_X. En DLC-F la cantidad de flúor es reducida, pero suficiente para presentar valores de adherencia bacteriana mayores que los de la estructura de DLC sin flúor, que se puede atribuir al pequeño aumento de la rugosidad y a la disminución de la tensión superficial. La superficie de CF_X, a pesar de su elevado ángulo de contacto, presenta peores resultados de adherencia que los recubrimientos de DLC y DLC-F. Esto puede estar relacionado con su reducido valor de la tensión superficial, pero también con su alta rugosidad. Por tanto, en las condiciones de trabajo no puede

descartarse el efecto del flúor debido a que no se analizan muestras que sólo difieran en su composición, sino también en su rugosidad y estructura química. Esto pone de manifiesto que sólo la evaluación conjunta de todas estas propiedades puede ayudar a predecir el comportamiento antibacteriano de una superficie.

Una conclusión importante que se deduce de los resultados mostrados en este capítulo es el buen comportamiento antiadherente de recubrimientos de DLC, que podría suponer una gran ventaja si se demuestra que su adherencia bacteriana es especie-independiente, dada la etiología múltiple de infecciones protésicas.

Aunque estos resultados suponen un paso adelante para la prevención de infecciones protésicas, se requieren estudios adicionales que determinen el comportamiento de las muestras preparadas a largo plazo y el efecto real del flúor en el proceso de adherencia, así como experimentos *in vivo* para evaluar la incidencia de la infección en intervenciones quirúrgicas.

6. Referencias.

[1] M. A. Cataldo, N. Petrosillo, M. Cipriani, R. Cauda, E. Tacconelli. "Prosthetic joint infection: recent developments in diagnosis and management". Journal of Infection, 61:443-448 (2010).

[2] S. M. Kurtz, E. Lau, J. Schmier, K. L. Ong, K. Zhao, J. Parvizi. "Infection burden for hip and knee arthroplasty in the United States". Journal of Arthroplasty, 23:984-991 (2008).

[3] J. R. Azanza. "What is the cost of a prosthesis infection?". Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica, 19:44-45 (2001).

[4] L. A. Poultsides, L. L. Liaropoulos, K. N. Malizos. "The socioeconomic impact of musculoskeletal infections". Journal of Bone and Joint Surgery: American Volume, 92:e13 1-12 (2010).

[5] R. M. Donlan, J. W. Costerton. "Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms". Clinical Microbiology Reviews, 15:167-193 (2002).

[6] Y. H. An, R. J. Friedman. "Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces". Journal of Biomedical Materials Research, 43: 338-348 (1998).

[7] R. M. Donlan. "Biofilms: Microbial life on surfaces". Emerging Infectious Diseases, 8:881-90 (2002).

[8] L. G. Harris, R. G. Richards. "Staphylococci and implant surfaces: A review". Injury, 37 (Suppl 2):S3-S14 (2006).

[9] S. H. Dougherty. "Pathobiology of infection in prosthetic devices". Reviews Of Infectious Diseases, 10:1102-1117 (1988).

[10] M. C. Hudson, W. K. Ramp, K. P. Frankenburg. "*Staphylococcus aureus* adhesion to bone matrix and bone-associated biomaterials". FEMS Microbiology Letters, 173:279-284 (1999).

[11] W. Ziebuhr, S. Hennig, M. Eckart, H. Kranzler, C. Batzilla, S. Kozitskaya. "Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen". International Journal Antimicrobial Agents, 28(Suppl 1):S14-S20 (2006).

[12] M. C. Sobieraj, C. M. Rimnac. "Ultra high molecular weight polyethylene: Mechanics, morphology, and clinical behavior". Journal of the Mechanical Behavior of Biomedicals Materials, 2:433-443 (2009).

[13] S. M. Kurtz, O. K. Muratoglu, M. Evans, A. A. Edidin. "Advances in the processing, sterilization, and crosslinking of ultra-high molecular weight polyethylene for total joint arthroplasty". Biomaterials, 20:1659-1688 (1999).

[14] V. Premnath, W. H. Harris, M. Jasty, E. W. Merrill. "Gamma sterilization of UHMWPE articular implants: an analysis of the oxidation problem". Biomaterials 17(18):1741-1753 (1996).

[15] D. J. Kilgus, J. R. Moreland, G. A. Finerman, T. T. Funahashi, J. S. Tipton. "Catastrophic wear of tibial polyethylene inserts". Clinical Orthopaedics and Related Research, 273:223-231 (1991).

[16] M. Katsikogianni, Y. F. Missirlis. "Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions". European Cells and Materials, 8:37-57 (2004).

[17] Y. H. An, B. K. Blair, K. L. Martin, R. J. Friedman. "Macromolecule Surface Coating for Preventing Bacterial Adhesion". In: Y. H. An, R. J. Friedman, editors, "Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods, and Applications". Humana Press, Totowa, New Jersey (2000).

[18] J. R. Keogh, J. W. Eaton. "Albumin binding surfaces for biomaterials". Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 124:537-545 (1994).

[19] T. J. Kinnari, L. I. Peltonen, P. Kuusela, J. Kivilahti, M. Kononen, J. Jero. "Bacterial adherence to titanium surface coated with human serum albumin". Otology and Neurotology, 26:380-384 (2005).

[20] Y. H. An, J. Bradley, D. L. Powers, R. J. Friedman. "The prevention of prosthetic infection using a cross-linked albumin coating in a rabbit model". Journal of Bone and Joint Surgery: British Volume, 79:816-819 (1997).

[21] T. J. Kinnari, A. Soininen, J. Esteban, N. Zamora, E. Alakoski, V. P. Kouri, R. Lappalainen, Y. T. Konttinen, E. Gómez-Barrena, V. M. Tiainen. "Adhesion of staphylococcal and Caco-2 cells on diamond-like carbon polymer hybrid coating". Journal of Biomedical Materials Research: Parte A, 86:760-768 (2008).

[22] T. J. Kinnari, J. Esteban, N. Zamora, R. Fernandez, C. López-Santos, F. Yubero, D. Mariscal, J. A. Puértolas, E. Gómez-Barrena. "Effect of surface roughness and sterilization on bacterial adherence to ultra-high molecular weight polyethylene". Clinical Microbiology and Infection, 16:1036-1041 (2010).

[23] C. Liu, Q. Zhao, Y. Liu, S. Wang, E. W. Abel. "Reduction of bacterial adhesion on modified DLC coatings". Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 61:182-187 (2008).

[24] R. K. Roy, K. R. Lee. “Biomedical applications of diamond-like carbon coatings: A review”. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 83:72-84 (2007).

[25] E. Alakoski, V. M. Tiainen, A. Soininen, Y. T. Konttinen. “Load-bearing biomedical applications of diamond-like carbon coatings-Current status”. The Open Orthopaedic Journal, 2:43-50 (2008).

[26] J. A. Puértolas, V. Martıínez-Nogués, M. J. Martínez-Morlanes, M. D. Mariscal, F. J. Medel, C. López-Santos, F. Yubero. “Improved wear performance of ultra high molecular weight polyethylene coated with hydrogenated diamond like carbon”. Wear, 269(5-6):458-465 (2010).

[27] Nurhaerani, K. Arita, Y. Shinonaga, M. Nishino. “Plasma-based fluorine ion implantation into dental materials for inhibition of bacterial adhesion”. Dental Materials Journal, 25:684-692 (2006).

[28] T. Hasebe, S. Yohena, A. Kamijo, Y. Okazaki, A. Hotta, K. Takahashi, T. Suzuki. “Fluorine doping into diamond-like carbon coatings inhibits protein adsorption and platelet activation”. Journal of Biomedical Research Part A, 83:1192-1199 (2007).

[29] C. Pérez-Jorge, A. Conde, M. A. Arenas, R. Pérez-Tanoira, E. Matykina, J. J. de-Damborenea, E. Gómez-Barrena, J. Esteban. “*In vitro* assessment of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* adhesion on TiO_2 nanotubes on Ti-6Al-4V alloy”. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 100A:1696-1705 (2012).

[30] H. C. van der Mei, R. Bos, H. J. Busscher. “A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles”. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 1998;11:213-221.

[31] P. J. Kiers, R. Bos, H. C. van der Mei, H. J. Busscher. “The electrophoretic softness of the surface of *Staphylococcus epidermidis* cells grown in a liquid medium and on a solid agar”. Microbiology, 147(Part 3):757-762 (2001).

[32] R. Müller, G. Gröger, K.-A. Hiller, G. Schmalz, S. Ruhl. "Fluorescence-based bacterial overlay method for simultaneous in situ quantification of surface-attached bacteria". Applied and Environmental Microbiology, 73:2653-2660 (2007).

[33] R. L. Taylor, J. Verran, G. C. Lees, and A. J. P. Ward. "The influence of substratum topography on bacterial adhesion to polymethyl methacrylate". Journal of Material Science: Materials in Medicine, 9:17-22 (1998).

[34] L. D. Renner, D. B. Weibel. "Physicochemical regulation of biofilm formation". MRS Bulletin, 36:347-355 (2011).

[35] P. Tang, W. Zhang, Y. Wang, B. Zhang, H. Wang, Ch. Lin, L. Zhang. "Effect of superhydrophobic surface of titanium on *Staphylococcus Aureus* adhesion". Journal of Nanomaterials, 2011:178921 (2011).

[36] J. Robertson. "Resonant Raman spectroscopy of disordered, amorphous, and diamondlike carbon". Materials Science and Engineering Research, 37:129-281 (2002).

[37] R. N. Shimizu, N. R. Demarquette. "Evaluation of surface energy of solid polymers using different models". Journal of Applied Polymer Science, 76: 1831-1845 (2000).

[38] J. Valle, A. Toledo-Arana, C. Berasain, J. M. Ghigo, B. Amorena, J. R. Penades, I. Lasa. "SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*". Molecular Microbiology, 48:1075-1087 (2003).

[39] J. Esteban, D. Molina-Manso, I. Spiliopoulou, J. Cordero-Ampuero, R. Fernandez-Roblas, A. Foka, E. Gómez-Barrena. "Biofilm development by clinical isolates of *Staphylococcus spp*. from retrieved orthopedic prostheses". Acta Orthopaedica, 81:674-679 (2010).

[40] C. C. P. M. Verheyen, W. J. A. Dhert, J. M. A. de Blieck-Hogervorst, T. J. K. van der Reijden, P. L. C. Petit, K. de Groot. "Adherence to a metal, polymer and composite by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*". Biomaterials, 14:383-391 (1993).

[41] C. López-Santos, F. Yubero, J. Cotrino, L. Contreras, A. Barranco, A.R. González-Elipe. "Formation of nitrogen functional groups on plasma treated DLC". Plasma Processes and Polymers, 6:555-565 (2009).

[42] M. J. Barela, H. M. Anderson, G. S. Oehrlein. "Role of C_2F_4, CF_2, and ions in C_4F_8/Ar plasma discharges under active oxide etch conditions in an inductively coupled GEC cell reactor". Journal of Vacuum Science and Technology A, 23:408-416 (2005).

[43] D. S. Jones, C. P. Garvin, D. Dowling, K. Donnelly, S. P. Gorman. "Examination of surface properties and *in vitro* biological performance of amorphous diamond-like carbon-coated polyurethane". Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 78:230-236 (2006).

[44] H.-G. Kim, S.-H. Ahn, J.-G. Kim, S. J. Park, K.-R. Lee. "Electrochemical behavior of diamond-like carbon films for biomedical applications". Thin Solid Films 475:291-297 (2005).

[45] E. Barth, Q. M. Myrvik, W. Wagner, A. G. Gristina. "*In vitro* and *in vivo* comparative colonization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* on orthopaedic implant materials". Biomaterials, 10:325-328 (1989).

[46] E. Gómez-Barrena, J. Esteban, D. Molina-Manso, H. Adames, M. Martínez-Morlanes, A. Terriza, F. Yubero, J. A. Puértolas. "Bacterial adherence on UHMWPE with vitamin E: an *in vitro* study". Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 22:1701-1706 (2011).

[47] M. Sudagidan, I. Erdem, C. Cavusoglu, M. Ciftcloglu. "Investigation of the surface properties of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from biomaterials". Mikrobiyology Bulteni, 44:93-103 (2010).

Bloque 3.
Preparación de membranas polimérico-inorgánicas para regeneración ósea

Capítulo V.
Adhesión de osteoblastos sobre membranas no reabsorbibles funcionalizadas con dióxido de titanio

1. Introducción.

En determinadas ocasiones se producen daños en los huesos que no pueden repararse de manera natural. Puede ocurrir, además, que se necesite colocar un implante en la zona del defecto óseo, por lo que es necesario reparar el daño con la producción de hueso de buena calidad para poder llevar a cabo esta labor. En estos casos, se recurre al uso de materiales que posibiliten un correcto crecimiento óseo para poder acelerar el proceso de regeneración. En esta línea se vienen desarrollando en los últimos años una gran variedad de andamiajes óseos y membranas sintéticos y/o naturales que posibiliten el cultivo de células osteoprogenitoras en condiciones óptimas y, en definitiva, potencien el buen crecimiento del hueso *in vivo*.[1] El objetivo final es conseguir la unión estructural y funcional correcta entre el hueso vivo y la superficie del implante, proceso denominado osteointegración.

Los trabajos aquí expuestos se llevan a cabo en el contexto de la fabricación de membranas mediante la funcionalización de un sustrato polimérico con un recubrimiento superficial bioactivo, de manera que se pueda conseguir reparar el hueso dañado con una pequeña cantidad de material, reduciendo los residuos que podrían liberarse. El uso de este tipo de estructuras impide que el defecto óseo sea invadido por tejido conectivo fibroso, promoviendo, al mismo tiempo, el crecimiento del hueso.[2-5] Este proceso, enmarcado en el campo de la Regeneración Tisular Guiada, se conoce como Regeneración Ósea Guiada (ROG), término introducido en los años 1980 por Nyman y Gottlow,[6] quienes lograron detener la migración celular de tejidos blandos (conectivo y epitelial) hacia defectos periodontales mediante el uso de barreras oclusivas. Actualmente, se usan frecuentemente mallas y membranas barrera en cirugía oral y craneofacial, para la fijación de injertos e implantes en periodontología o para favorecer la cicatrización de tejidos.

Los biomateriales que se usan han de ser biocompatibles y bioactivos,[1] es decir, materiales que no produzcan reacciones adversas en el organismo y que, además, promuevan la formación de nuevo hueso. Así, estos materiales pueden presentar capacidad de osteoconducción (esto es, que proporcionen una superficie que actúe

como andamiaje y posibilite la fijación y crecimiento de hueso) y/o de osteoinducción (que induzcan la diferenciación de células progenitoras en células formadoras de hueso, llamadas osteoblastos). Además de esto, deben soportar los procesos de esterilización sin deteriorase y mantener su integridad durante el periodo de tiempo necesario para una regeneración efectiva del hueso.

La *Figura V.1* muestra esquemáticamente el proceso de regeneración necesario previamente a la colocación de una prótesis de cadera o dental en el supuesto caso de que el hueso que ha de soportar la carga (el fémur o la mandíbula, respectivamente) no esté en buen estado y presente un defecto óseo, bien por problemas de osteoporosis o por cualquier otra causa.

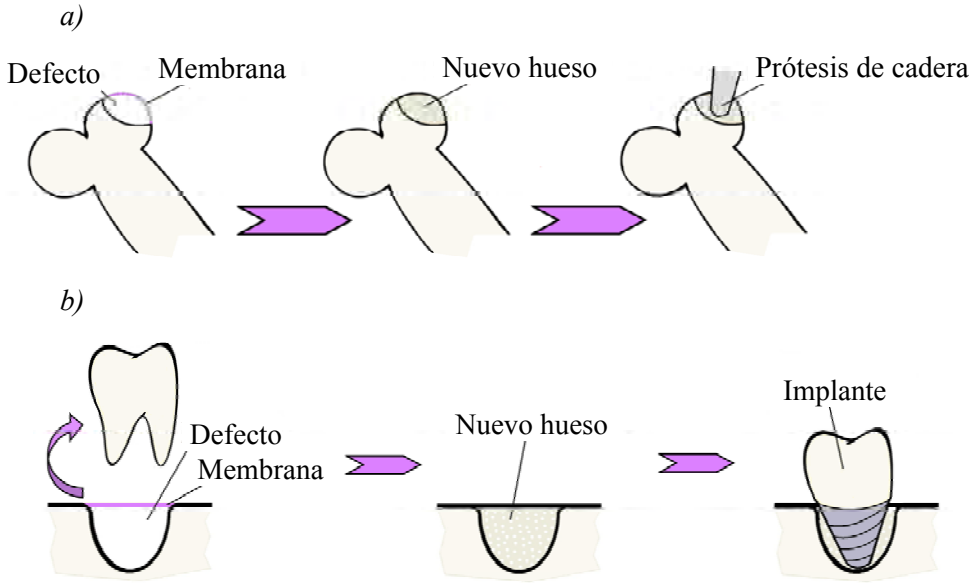


Figura V.1. Regeneración ósea guiada promocionada por membranas bioactivas para la colocación de a) una prótesis de cadera y b) un implante dental.

Las membranas pueden fabricarse con materiales reabsorbibles o no reabsorbibles. Las membranas no reabsorbibles mantienen su forma y estructura, pero han de retirarse del organismo en una segunda intervención quirúrgica. Por su parte, las membranas biodegradables, que deben presentar una velocidad de degradación acorde con la duración del periodo de regeneración ósea, no necesitan

retirarse, por lo que se reducen las molestias al paciente y los riesgos de complicaciones quirúrgicas, así como los costes médicos.[7, 8]

Entre los materiales bioactivos utilizados se encuentran el óxido de titanio (IV) (o dióxido de titanio, TiO_2), el óxido de silicio (IV) (o dióxido de silicio, SiO_2) y la hidroxiapatita ($Ca_5(PO_4)_3(OH)$, un compuesto de la familia de los fosfatos de calcio muy similar al hueso natural). En esta tesis se desarrollan sistemas constituidos por sustratos poliméricos recubiertos por dióxido de titanio y dióxido de silicio.

Llegados a este punto, hay que mencionar que en el desarrollo experimental de esta tesis se comienza con estudios de adhesión de osteoblastos sobre sistemas modelo formados por un polímero comercial no biodegradable (PET, con una rugosidad muy baja, con el que se tiene una amplia experiencia en el grupo de investigación) funcionalizado con una lámina delgada de TiO_2 o SiO_2. Estos primeros ensayos pretenden, además de mostrar la fabricación de membranas con posible utilidad biomédica, desarrollar una metodología para el estudio de la adhesión de osteoblastos sobre sustratos poliméricos funcionalizados que puedan aplicarse a membranas biodegradables, más difíciles de preparar y manipular. Dado que se requiere el desarrollo de técnicas de esterilización para este tipo de muestras, así como de técnicas de análisis del crecimiento celular sobre las mismas, el uso de dos sistemas diferentes es inviable. Tras corroborar que una metodología de esterilización adecuada es el uso de radiación UV, se opta por el TiO_2 debido a que éste presenta cambios superficiales por la acción de la luz UV, que han de evaluarse previamente a los análisis de crecimiento de osteoblastos. Una vez conocidas las condiciones adecuadas para la esterilización y el estudio de este tipo de muestras, se procede a realizar estudios análogos sobre un polímero biodegradable (ácido poli (láctico-*co*-glicólico), PLGA). Estos estudios se aplican a muestras funcionalizadas tanto con SiO_2 como con TiO_2. No obstante, debido a la falta de un estudio profundo de la membrana funcionalizada con dióxido de titanio (del que sólo se dispone de resultados preliminares), en el Capítulo VI de la presente memoria sólo se incluyen los resultados correspondientes al dióxido de silicio.

1.1. Crecimiento y desarrollo de osteoblastos *in vitro*.

El primer paso para la formación de hueso es la adhesión de células diferenciables en osteoblastos sobre la superficie en cuestión. Posteriormente, tiene lugar la propagación celular, con cambios fenotípicos como la emisión de prolongaciones (filopodios y lamelopodios) y, transcurrido el tiempo necesario, la diferenciación en osteoblastos. La *Figura V.2* muestra esquemáticamente estas etapas. El hecho de que, sin adhesión, no puedan ocurrir los posteriores procesos, hace que el entendimiento y control de las interacciones célula-biomaterial sean de suma importancia en el contexto de la ingeniería tisular para lograr una adhesión exitosa de las células al biomaterial en el menor tiempo posible.

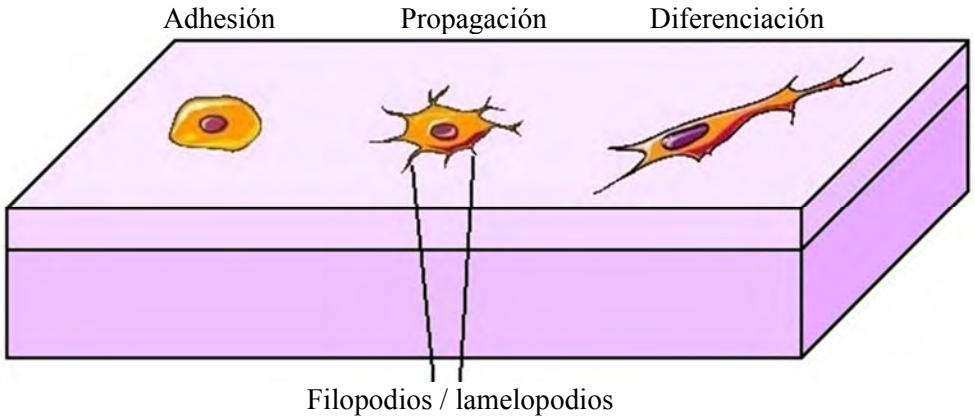


Figura V.2. Fases iniciales del desarrollo de osteoblastos sobre una superficie.

Hay que tener en cuenta que el comportamiento de los osteoblastos sobre una superficie depende de las señales mecánicas, químicas y topográficas procedentes del microentorno. Estas señales dependen, a su vez, de las características del biomaterial, de forma que pueden modificarse mediante su funcionalización superficial. Si las señales producidas por el microentorno son favorables, se producen fenómenos, observables en experimentos *in vitro*, como el crecimiento celular, la diferenciación, la migración, la adhesión, la expresión génica y la transducción de señales; en caso contrario, tiene lugar la apoptosis (es decir, la muerte celular).[9, 10] Por tanto, una forma de evaluar la bondad de un material para su uso en ROG es la realización de estudios *in vitro* de adhesión de osteoblastos.

Este tipo de análisis, además de ser relativamente sencillos, son la antesala de los ensayos *in vivo*, por lo que sólo los materiales que muestren un comportamiento adecuado en los primeros se testan en animales y, a más largo plazo, en pacientes humanos. Los ensayos *in vitro* constan de un proceso inicial de siembra de osteoblastos, el posterior marcaje con los colorantes adecuados y, finalmente, la visualización al microscopio de las células crecidas y el análisis de las imágenes adquiridas.

Los factores que dan idea del desarrollo de los osteoblastos a diferentes tiempos de siembra pueden analizarse a partir de las micrografías obtenidas. En general, las células que se desarrollan adecuadamente presentan tamaños mayores (dada su alta afinidad por la superficie) y formas más alargadas, con emisión de prolongaciones para "buscar" nuevos sitios de adhesión. Estas células presentan un citoesqueleto formado por fibras de estrés numerosas y orientadas con una dirección preferente, que indican que la célula es robusta y crece favorablemente. Además, se detectan un elevado número de puntos de anclaje célula-superficie, denominados contactos focales o adhesiones focales, parámetro que puede utilizarse como marcador para evaluar la capacidad de osteoconducción de una superficie. Estas adhesiones focales sirven de sitios para la transducción de señales y actúan como transportadores de fuerzas mecánicas hacia los núcleos a través de la formación de la red citoesqueletal.[11-14] En estadios avanzados, pueden encontrarse células poligonales, un indicativo de que ya han alcanzado un alto desarrollo. Por el contrario, las células crecidas en superficies que no favorecen su desarrollo en general presentan un menor tamaño, con formas más redondeadas y escasas adhesiones focales y fibras de estrés, que aparecen poco orientadas. Como las características morfométricas del área de propagación celular (tamaño y forma), así como el número, tamaño, forma y distribución de las placas de adhesión focal son decisivos para la migración de las células y su proliferación, diferenciación y anclaje, puede realizarse un análisis cuantitativo de estas propiedades a partir de un examen exhaustivo de las imágenes obtenidas.[12, 13, 15-18]

Los experimentos *in vitro*, aparte de conclusiones de aplicación práctica, proporcionan información sobre los eventos moleculares que tienen lugar en el

citoesqueleto. Esta información es esencial tanto para entender las cascadas de señales bioquímicas inducidas por el ambiente que originan estos cambios celulares, como para establecer las bases moleculares de mecanotransducción.[19, 20] Estos conocimientos básicos pueden ayudar a diseñar materiales cada vez más adecuados y eficaces para el crecimiento celular.

1.2. Uso del titanio en biomedicina.

El titanio es un elemento utilizado en numerosos ámbitos, ya sea en forma metálica o formando aleaciones o diversos compuestos. Entre sus usos se encuentra la fabricación de dispositivos y piezas para la industria (titanio metálico y aleaciones para la industria aeronáutica, energética, automovilística, etc), la elaboración de objetos para su uso ornamental (decoración, joyería y relojería), la obtención de pigmentos (TiO_2) y la obtención de sistemas con fines biomédicos.

El titanio metálico presenta unas propiedades que lo hacen apropiado para su implantación en el organismo. Primeramente, es un material biocompatible e inerte frente a los fluidos biológicos, que puede introducirse en el organismo sin producir reacciones adversas del sistema inmune. Además, se trata de un material osteoconductor y osteoinductor, que posibilita el proceso de osteointegración. En realidad, estas características superficiales se deben a la formación de una capa pasivante de dióxido de titanio (TiO_2) cuando el titanio se expone al aire, que lo convierte en un material bioinerte e induce una mayor biocompatibilidad y capacidad de osteointegración.[21] Todo esto, unido a sus buenas propiedades mecánicas (un módulo elástico similar al del hueso y alta dureza y resistencia, que le permiten soportar grandes cargas), así como su ligereza le convierten en un material muy útil para fabricar componentes de prótesis de cadera y rodilla, tornillos óseos, placas antitrauma, implantes dentales, material quirúrgico, etc. Además, pueden realizarse tratamientos superficiales que favorezcan la osteointegración y, por tanto, aumenten la funcionalidad biológica de este tipo de dispositivos.[21-23] La *Figura V.3* muestra una prótesis de cadera, cuyo vástago (y, en ocasiones, también el cotilo)

está constituido por titanio. En este tipo de implantes, si el hueso de partida está sano, la unión del implante al hueso se produce por crecimiento de hueso alrededor del vástago y del cotilo, que pueden recubrirse previamente con hidroxiapatita para mejorar la osteointegración; en caso contrario, se utiliza un cemento que actúa como pegamento.

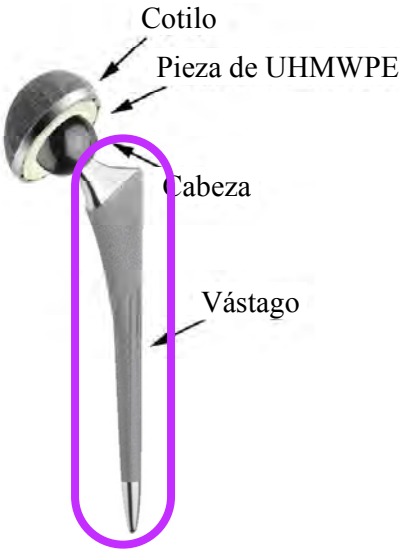


Figura V.3. Esquema de una prótesis de cadera.

1.3. Efecto de la luz ultravioleta en las propiedades superficiales del dióxido de titanio.

La irradiación con luz ultravioleta (UV) es un método estándar para esterilizar material de laboratorio y muestras a analizar, además de material quirúrgico y dispositivos implantables. La exposición del TiO_2 a este tipo de proceso tiene una influencia positiva para la adsorción de proteínas y la migración, fijación y proliferación de las células osteogénicas, tanto *in vitro*[24, 25] como *in vivo*,[26] además de influir en el crecimiento y la adhesión celular y mejorar su bioactividad.[23-25] Por esto, se propone la fotofuncionalización de este óxido como un método eficaz para mejorar la osteoconductividad de implantes de titanio.[27, 28] Efectos similares se observan en los procesos de esterilización con luz UV.[27, 29] Algunos trabajos

proponen que este comportamiento se relaciona con alteraciones de la química superficial y la mojabilidad,[24, 26, 28, 30] como la incorporación de grupos polares de tipo carbonilo, carboxilo y, especialmente, hidroxilo que favorecen la proliferación celular y proporcionan a la superficie hidrofilicidad.[31-34]

Los estudios de crecimiento de osteoblastos suelen emplear anatasa, que es la fase cristalina más común del TiO_2, especialmente cuando se manipula el material al aire a altas temperaturas. Esta fase cristalina del TiO_2 presenta una intensa actividad fotocatalítica, por lo que el aumento de la bioactividad (tanto de anatasa, como de materiales recubiertos por ésta, incluyendo el titanio puro) suele atribuirse a su capacidad para fotocatalizar la oxidación de moléculas orgánicas y restos carbonosos.[24, 26] Por otro lado, la luz UV produce un cambio en la mojabilidad de la anatasa, convirtiendo su superficie parcialmente hidrofóbica en superhidrofílica, hecho que parece mejorar la adhesión de osteoblastos.[35] En el caso del óxido amorfo, el efecto de la irradiación UV en su comportamiento frente a la formación de hueso puede ser diferente, ya que, aunque también se da la transformación al estado superhidrofílico, su actividad fotocatalítica es mucho menor.[35]

La transformación al estado superhidrofílico por luz UV es común a diversas formas del TiO_2. Sin embargo, dependiendo de la microestructura y la estructura cristalográfica, la cinética de recuperación al estado parcialmente hidrofóbico es diferente, de forma que el estado original vuelve a alcanzarse en un periodo de tiempo que puede variar desde unas horas hasta varios días. Estos cambios en la cinética de recuperación de las propiedades de mojado pueden repercutir en los estadios iniciales de la adhesión de osteoblastos, debido a su dependencia con el ángulo de contacto. Aunque se conoce que la luz UV mejora las propiedades osteoconductoras del TiO_2,[27, 28] aún no se conoce el mecanismo molecular que provoca esta mejora ni por qué los cambios químicos y de mojado superficiales influyen en esta transformación.

2. Objetivos de este capítulo.

El trabajo descrito en este capítulo está orientado a incrementar la bioactividad de superficies de PET. Para ello, se recurre a su funcionalización con una lámina delgada de óxido de titanio (IV) y su posterior fotoactivación. Los objetivos concretos de este capítulo son:

- Funcionalizar sustratos poliméricos con dióxido de titanio.

Se describe la preparación de recubrimientos de TiO_2 amorfo por PECVD a temperatura ambiente, un método muy adecuado para la fabricación de óxidos sobre sustratos sensibles al calor[36] que además evita el deterioro que pueden sufrir los polímeros por tratamientos en vía líquida. El sustrato empleado es el politereftalato de etileno (PET). Se selecciona este material polimérico por sus aplicaciones médicas en injertos vasculares, hilos de sutura, prótesis de articulaciones artificiales[37] y, recientemente, como sustratos de cultivo para ingeniería tisular.[38] El PET presenta una baja mojabilidad y pobre adhesión celular que lo hacen poco bioactivo,[38, 39] por lo que es un sustrato adecuado para estudiar el efecto de la funcionalización con TiO_2 en el crecimiento celular.

- Determinar la química superficial, la rugosidad y las propiedades de mojado de las muestras funcionalizadas.

Se determina la química superficial de las muestras de PET y PET funcionalizado (TiO_2/PET) por XPS, así como sus propiedades de mojado y su topografía superficial. En el caso de la muestra recubierta con TiO_2, se determina la actividad fotocatalítica mediante experimentos de fotodegradación de colorantes con luz UV.

- Analizar cómo varían las propiedades superficiales por efecto de la irradiación con luz UV.

Se determina por XPS la composición de las superficies de TiO_2/PET tras su exposición a luz UV y a las 4 semanas de almacenamiento en oscuro tras de la

irradiación . Asimismo, se evalúan los cambios en la mojabilidad de las muestras de PET y TiO_2/PET por acción de la luz UV durante diferentes tiempos, así como la posterior evolución del ángulo de contacto cuando se mantienen en oscuro hasta 4 semanas.

- Estudiar el crecimiento de osteoblastos sobre PET funcionalizado con dióxido de titanio y efecto de la fotoactivación superficial.

Se realizan estudios *in vitro* sobre el desarrollo celular en las muestras de PET y la influencia de la luz UV sobre el mismo. Estos resultados se comparan con aquellos obtenidos para las muestras de TiO_2/PET. Para determinar la adhesión y el desarrollo de osteoblastos se analizan de forma cualitativa diferentes propiedades celulares, tales como la forma, la cantidad y orientación de las fibras de estrés, etc., y se realiza un análisis estadístico de las adhesiones focales.

- Relacionar los cambios superficiales con el desarrollo celular.

A la luz de los resultados anteriores, se realiza un análisis crítico de la influencia de las propiedades superficiales en la adhesión de osteoblastos, evaluando el número de contactos focales.

3. Materiales y métodos.

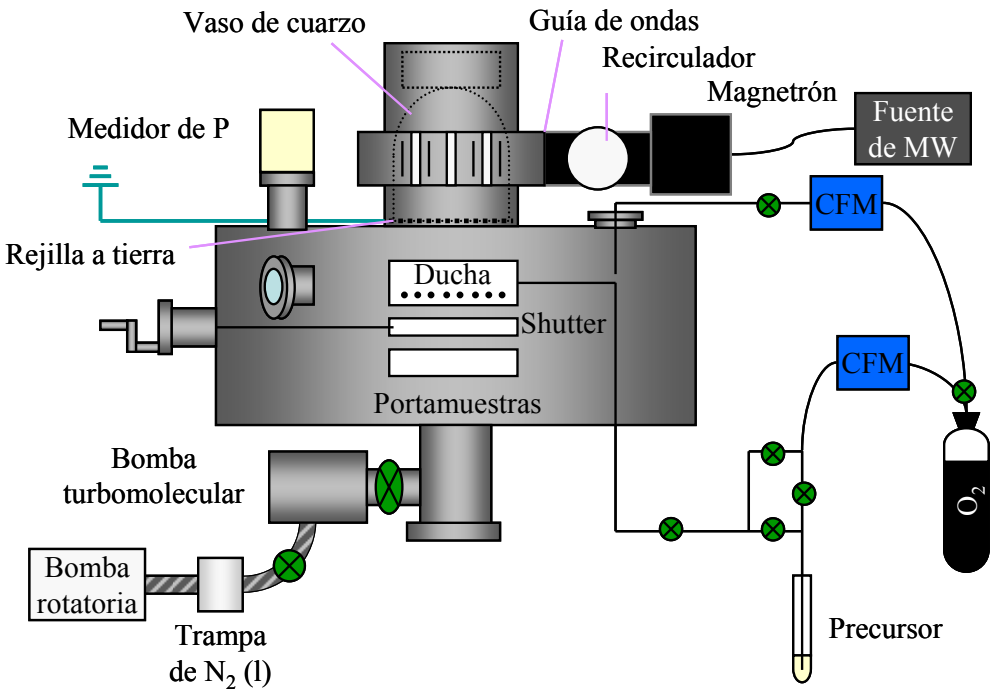
A continuación se describe la preparación de los recubrimientos de óxido de titanio (IV), su caracterización y los ensayos de crecimiento de osteoblastos.

3.1. Deposición de láminas delgadas de TiO_2.

Los recubrimientos de TiO_2 crecidos sobre sustratos de PET (Goodfellow Ltd, Cambridge) se preparan mediante PECVD. El sistema experimental consta de un sistema de vacío acoplado en configuración remota a una fuente de plasma, según se

presenta en la *Figura V.4*. El plasma se genera en un vaso de cuarzo mediante una fuente externa de microondas (que actúa a 2.45 GHz) tipo SLAN I (Plasma Consult, GmbH, Alemania). Este tipo de fuente presenta una guía de ondas anular rodeando al vaso de cuarzo en cuya cara interna se encuentran unas ranuras equiespaciadas a través de las cuáles se induce el plasma en el vaso de cuarzo. Además de las ranuras, existen una serie de imanes que posibilitan trabajar en condiciones de ECR (*Electron Ciclotron Resonance*).[40] La fuente de plasma se separa de la cámara de reacción por una rejilla conectada a tierra para evitar el calentamiento del sustrato por la radiación de microondas, la cual podría provocar el deterioro de los sustratos poliméricos. Los sustratos se colocan en un portamuestras situado en la cámara de deposición, a 10 cm de la rejilla. A fin de controlar de forma precisa el momento de inicio y fin de la deposición, se usa un obturador o *shutter* de aluminio accionado por una manivela que cubre o descubre los sustratos a conveniencia. Los detalles del reactor pueden encontrarse en publicaciones anteriores.[41] La preparación se lleva a cabo aplicando una potencia de 500 W a una presión de $5 \cdot 10^{-3}$ mbar, empleando O_2 puro como gas plasmógeno.[42, 43]

a)



b)

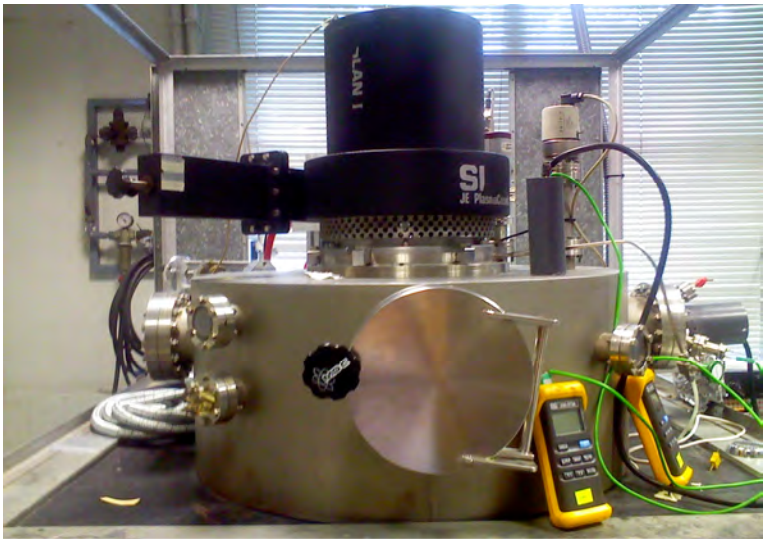


Figura V.4. Esquema (a) y fotografía (b) del reactor de plasma usado para la deposición de películas delgadas de TiO_2 sobre polímeros.

El precursor utilizado para la deposición de TiO_2 es el tetraisopropóxido de titanio (TTIP, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Estados Unidos). Como se muestra en la *Figura V.5.a*, esta molécula está formada por un átomo de titanio unido a través de enlaces Ti-O a cuatro cadenas alifáticas. Debido a que este compuesto no es volátil a temperatura ambiente, se calienta el bulbo que lo contiene y se burbujea O_2 a su través para arrastrar los vapores de precursor hacia el interior del sistema (*Figura V.5.b*). Esta operación permite introducir el precursor de manera controlada en la cámara de reacción. Además, este sistema presenta un bypass por donde circula oxígeno en los periodos de tiempo en los que no se desea introducir TTIP para mantener la presión en el reactor. El precursor se dosifica dentro de la cámara mediante una ducha con 16 salidas con el fin de lograr una distribución lo más homogénea posible. Todos los conductos por lo que circula el TTIP se calientan para evitar su condensación en ellos. La proporción entre el gas plasmógeno y el precursor es de 91 % y 9 % respectivamente, que se controla mediante controladores de flujo másico (Bronkhorst HIGH-TECH B.V., Holanda).

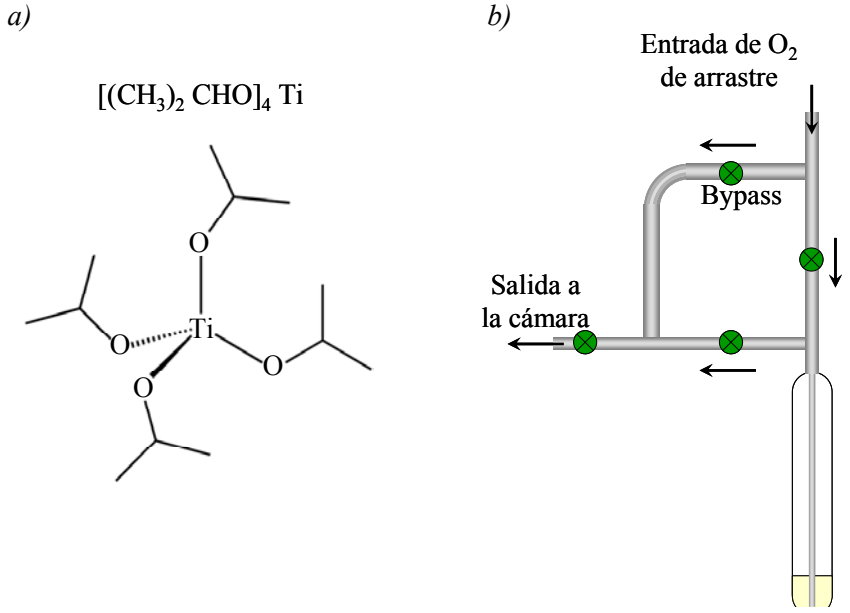


Figura V.5.a) Fórmula semidesarrollada y estructural del precursor de titanio TTIP y b) esquema del sistema de burbujeo para su introducción en la cámara de reacción.

Previamente a la deposición de la capa de TiO_2, la superficie del PET se activa mediante un plasma de oxígeno puro durante 1 min, lo cuál favorece la adhesión del óxido en la superficie del polímero. Después, se añade el precursor de titanio, que se descompone por acción del plasma generando una lámina delgada de TiO_2 de 100 nm de espesor. El espesor de óxido del depositado se controla mediante una balanza de cuarzo calibrada. Tanto para la activación del sustrato previa a la deposición como para la preparación de la película de óxido, los gases utilizados se dejan fluir al menos 30 min para garantizar su pureza dentro de la cámara.

3.2. Caracterización de las muestras de PET y TiO_2/PET.

La química superficial de las muestras de PET y TiO_2/PET recién preparadas se determina mediante XPS. Para evaluar la eficiencia de la luz UV para eliminar parte del carbono contaminante acumulado en la superficie de la capa de TiO_2, la muestra de TiO_2/PET se ilumina durante 40 minutos a través de una ventana de cuarzo en la precámara del espectrómetro de XPS a una presión de 20 Torr de O_2 (muestra denominada TiO_2/PET-UV). Estas condiciones de irradiación permiten reproducir los cambios producidos en la superficie por el proceso de esterilización con luz UV, ampliamente utilizado tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. Posteriormente, la muestra irradiada se almacena en oscuro durante 4 semanas y, transcurrido este tiempo, vuelve a analizarse por XPS (muestra denotada como TiO_2/PET-Oscuro)

Además, se realizan medidas de AFM para analizar la topografía superficial de PET y TiO_2/PET. Por otro lado, se realizan medidas del ángulo de contacto estático con agua para conocer las características de mojado de las superficies del polímero original y recubierto con TiO_2.

Uno de los experimentos desarrollados consiste en determinar la variación del ángulo de contacto en función del tiempo de iluminación con luz UV. Para ello, se usa una lámpara de descarga de Xe que proporciona una intensidad de fotón para todo el espectro de 2 W/cm^2 en la posición de las muestras. Para prevenir el calentamiento y deterioro de las muestras, se coloca un filtro de infrarrojos entre la

lámpara y éstas. El ángulo de contacto se determina tras irradiar durante periodos de tiempo sucesivos, de manera que la escala de las gráficas correspondientes se refiere al tiempo acumulado en cada punto. Para detener la irradiación y poder realizar la medida del ángulo de contacto se utiliza una lámina metálica como obturador.

Se lleva a cabo una evaluación comparativa de la actividad fotocatalítica de las capas finas de TiO_2 amorfo preparadas respecto a una capa de anatasa depositada sobre silicio a 523 K por PECVD (en el mismo reactor de plasma) mediante experimentos de degradación de colorantes.[35] Para ello, se emplea una oblea de silicio como blanco para descartar efectos de degradación del colorante debidos exclusivamente a su exposición a la luz UV. Los ensayos se realizan con un dispositivo experimental diseñado para tal fin.[44] El sistema está formado por una cubeta de cuarzo de 3 cm^3 de capacidad, donde se coloca la muestra depositada sobre silicio (1 x 0.8 cm^2) y se añaden 2 cm^3 de naranja de metilo a una concentración de $3.5 \cdot 10^{-5}$ M. La muestra se irradia frontalmente y se recoge el espectro de la disolución mediante dos fibras ópticas conectadas a un espectrofotómetro UV-visible colocadas en las caras opuestas de la cubeta. La disolución se burbujea con O_2 y la cubeta se cubre con una tapa de teflón para evitar la evaporación del agua. El sistema experimental completo se refrigera con agua corriente. La intensidad de la radiación en la posición de la celda es de 1.8 W y el área de iluminación se define con una apertura de 1 cm^2.

3.3. Estudio de adhesión de osteoblastos.

Este estudio consta de varios pasos: la siembra de células, la evaluación cualitativa del desarrollo celular y un análisis estadístico de las características celulares. Estos ensayos se llevan a cabo en la Facultad de Medicina de la Universidad de Cádiz por el grupo de los doctores Mercedes Salido y José Vilches.

3.3.1. Siembra de células.

Primero, se esterilizan al menos 12 muestras de cada tipo por exposición a luz UV durante 20 min por cara en una campana de flujo laminar. La mitad de las muestras se siembra tras la esterilización (muestras PET-UV y TiO_2/PET-UV en el texto) y el resto se guardan en oscuro en un entorno estéril durante 4 semanas (muestras PET-Oscuro y TiO_2/PET-Oscuro), según protocolos descritos previamente.[29]

Posteriormente, se procede a la siembra de osteoblastos humanos HOB® (Promocell, Heidelberg, Alemania), que no excedan de 10 duplicaciones de población. Para ello, se colocan las muestras en placas petri estériles y se siembran con una densidad de 5000 células/cm^2, incubándose en medio de crecimiento (Promocell) suplementado con un 10 % de suero bovino fetal (Promocell) a 37 ºC y 5 % de CO_2 (para mantener el pH). El medio de cultivo se cambia cada tres días.

3.3.2. Desarrollo celular.

Las muestras se visualizan a diario en un microscopio de contraste de fases para evaluar la morfología, el alineamiento y las fases iniciales de adhesión celular.

Transcurridos 1, 2 y 7 días desde la siembra, se procede a observar las características celulares. Por un lado, una de las muestras se lava con agua destilada y se realiza la tinción con azul de toluidina para observar los cambios fenotípicos y la distribución y propagación celular mediante microscopía óptica.

Por otro lado, se realiza el inmunomarcaje del resto de las muestras. Para esto, en primer lugar se lavan con PBS precalentado a pH 7.4 y se fijan con paraformaldehído al 3.7 % a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavan nuevamente y se impermeabilizan con una disolución Triton X-100 al 0.1 % (Sigma-Aldrich). A continuación, se preincuban con seroalbúmina bovina al 1 % en PBS (Sigma-Aldrich) durante 20 min y se realiza el inmunomarcaje durante 20 min con dos marcadores: rodamina faloidina (Sigma-Aldrich), para ver el citoesqueleto de actina, y antivinculina monoclonal conjugada con isotiocianato de fluoresceína

(Sigma-Aldrich) para detectar las adhesiones focales. Finalmente, las muestras se lavan con PBS precalentado y se montan en portaobjetos con medio de montaje Vectashield® (Vector Burlingame, Canadá).

Una vez realizado el inmunomarcaje, se visualizan al menos cinco muestras de cada grupo mediante microscopía confocal. Utilizando los filtros adecuados, se puede observar el citoesqueleto de actina (en color rojo, que muestra la organización del citoesqueleto, las fibras de estrés, la polarización celular y la morfología) o las zonas con adhesiones focales (en color verde). Se realiza un conteo de adhesiones focales a partir de imágenes de 40x (véase Anexo I). El tamaño de las muestras se determina por conteo del número de imágenes en cada grupo (*N*).

3.3.3. Análisis estadístico.

Se realiza un análisis estadístico del número de adhesiones focales para las cuatro superficies estudiadas. En primer lugar, se compara la distribución de los diferentes conjuntos de datos mediante una gráfica Box-Wisker (o Caja-Bigotes). Además, se hace una prueba de Levene para comprobar la homogeneidad de las varianzas y, de esta forma, verificar si los datos siguen una distribución paramétrica. Dados los resultados negativos de esta prueba, se realizan dos análisis no paramétricos para comprobar la hipótesis de que los tratamientos de las muestras generan diferencias a partir de la comparación de la mediana de las diferentes poblaciones. Las pruebas realizadas son la de Kruskal-Wallis (K-W) y la de Jonckheere-Terpstra (J-T). La primera permite discernir si un conjunto de datos pertenece a la misma población, es decir, si las muestras pueden considerarse como una única muestra (combinada) de la misma población, donde se cumple que las medianas no son iguales (equivalente a un ANOVA sin asumir una distribución normal y usando categorías en vez de datos); la segunda permite conocer si existe un orden entre las clases y si los datos presentan la misma distribución.

4. Resultados y discusión.

A continuación se muestran los resultados obtenidos mediante la caracterización de la química, topografía y mojabilidad de las diferentes muestras (PET y TiO_2/PET), incluyendo los cambios producidos por la fotoactivación con luz UV. Además, se recogen los datos de adhesión de osteoblastos observados en cada uno de los cuatro casos con el fin de poder relacionar éstos con la funcionalización y la fotoactivación del sustrato polimérico.

4.1. Composición química y topografía superficial de las muestras de PET y TiO_2/PET.

El espectro general de XPS de la muestra de PET (*Figura V.6.a*) muestra las señales correspondientes a oxígeno y carbono, que son los elementos constitutivos del material. Atendiendo a los porcentajes atómicos mostrados en la *Tabla V.1*, puede verse que la cantidad de carbono es algo superior a la que correspondería al PET (~56 %), hecho que puede deberse a un enriquecimiento de la superficie en este elemento debido a la contaminación por la manipulación de las muestras al aire. El espectro de C 1s (*Figura V.6.b*) se caracteriza por picos y hombros correspondientes a carbono enlazado a carbono y/o hidrógeno (pico C–C(H) que aparece a 284.6 eV), y a los diferentes enlaces C–O presentes en la superficie (hombro a 285.4 eV atribuido a C–OH, hombro a 286.2 eV debido a C=O y pequeña banda de –COO a 288.6 eV). El espectro de O 1s (*Figura V.6.c*) se caracteriza por dos banda a 531.9 y 532.9 eV que se corresponden con enlaces dobles y simples de oxígeno con átomos de carbono.[45]

En las muestras recubiertas, el espectro general mostrado en la *Figura V.6.a* indica que la superficie está formada por titanio y oxígeno, elementos que componen la lámina depositada, y una cierta cantidad de carbono superficial, atribuible a restos carbonosos del precursor TTIP y a contaminación por exposición de las muestras al aire. El pico de C 1s (*Figura V.6.b*) presenta además un pequeño hombro situado a ~289.5 eV debido a diferentes especies de carbono. Por su parte, el espectro de O 1s

(*Figura V.6.c*) se caracteriza por un pico principal a 529.8 eV procedente de la capa de óxido de titanio y un hombro a ~531.8 eV debido a grupos hidroxilo superficiales y/o al oxígeno de especies de carbono superficiales. Por último, el espectro del pico principal de titanio (*Figura V.6.d*) se encuentra a un valor de energía de ligadura de 458.4 eV para la componente Ti $2p^{3/2}$, que se corresponde con un estado de oxidación de Ti^{4+} y, por tanto, es coherente con que la capa de óxido de titanio es TiO_2. En la *Tabla V.1* se incluye la composición atómica de esta muestra. Comparando los espectros de PET y TiO_2/PET puede concluirse que, como no se observan los picos de O 1s y C 1s característicos de PET, la lámina delgada de TiO_2 cubre completamente la superficie del polímero.

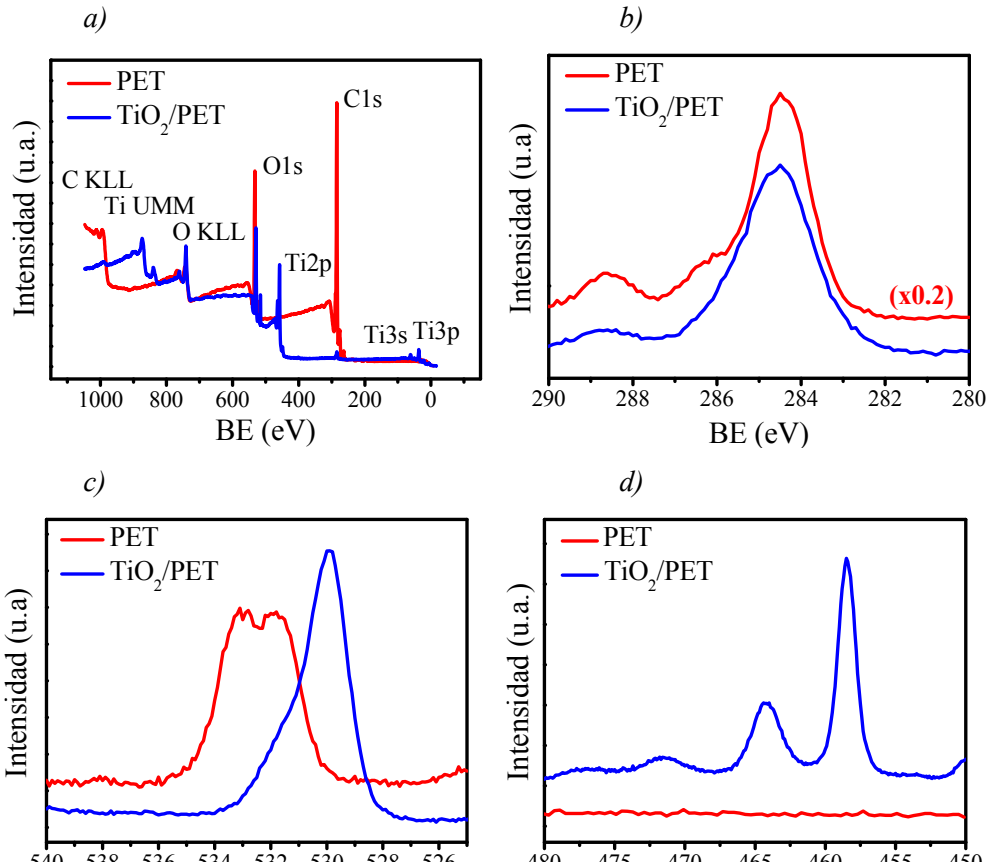


Figura V.6. Espectros de fotoemisión general (a) y señales de C 1s (b), O 1s (c) y Ti 2p (d) de las muestras de PET y TiO_2/PET.

Tabla V.1. Porcentaje atómico de los elementos que componen la superficie de las muestras de PET y de TiO_2/PET recién preparado, irradiado con luz UV (TiO_2/PET-UV) y guardado en oscuridad durante 4 semanas tras la irradiación (TiO_2/PET-Oscuro).

Muestra	Ti (%)	O (%)	C (%)
PET	-	23	77
TiO_2/PET	25	62	13
TiO_2/PET-UV	27	64	9
TiO_2/PET-Oscuro	26	63	11

Para conocer los cambios químicos que se producen en la superficie de TiO_2 por la acción de la radiación UV empleada para la esterilización de las muestras, la superficie de TiO_2/PET se irradia con lux UV en presencia de O_2 durante 40 min en la precámara del espectrómetro de XPS. Se determina el estado químico superficial inmediatamente después de este tratamiento (TiO_2/PET-UV) y tras el almacenamiento al aire de la muestra durante 4 semanas en condiciones de oscuridad (TiO_2/PET-Oscuro). Los resultados de este análisis se incluyen en la *Tabla V.1*. La muestra irradiada presenta una menor cantidad de C, lo que indica que la luz UV es capaz de eliminar cierta proporción de contaminación de carbono de la superficie del TiO_2, aunque la mayor parte de la contaminación inicial permanece. Por otro lado, durante el almacenamiento en oscuro nuevamente se incorpora una pequeña cantidad de C, si bien no se alcanza el porcentaje inicial.

En la *Figura V.7* se muestra la topografía superficial de de PET y TiO_2/PET determinada por AFM a escalas de 1 µm x 1 µm y 5 µm x 5 µm, junto con los valores de rugosidad obtenidos para cada muestra en la escala mayor. El polímero presenta una rugosidad inferior a 1 nm, que aumenta ligeramente (hasta ~2.5 nm) con la deposición de la lámina de óxido. Además, la superficie de TiO_2/PET presenta una morfología resultante de la agregación de los granos de la capa de óxido (del orden de 100 nm), que cubren completamente la superficie del polímero.

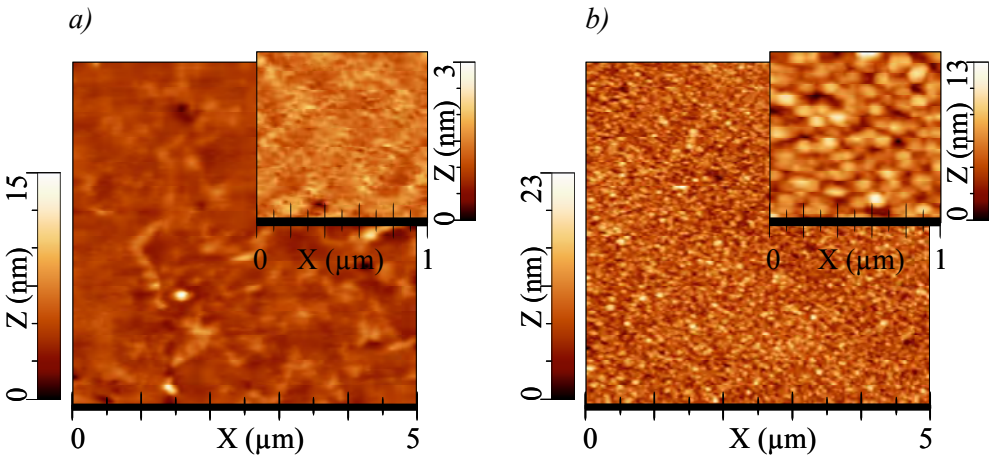


Figura V.7. Topografía superficial de las muestras de a) PET y b) TiO_2/PET en escalas de 5 µm x 5 µm y 1 µm x 1 µm (imágenes superpuestas) y valores de rugosidad a 5 µm x 5 µm.

El examen de la muestra por espectroscopía Raman o por difracción de rayos-X (gráficas no incluidas en esta memoria) muestra que la lámina de TiO_2 depositada en las condiciones descritas es amorfa, puesto que no aparece ninguna señal en estos espectros.[46]

4.2. Mojabilidad y fotoactividad de muestras iluminadas con luz UV.

En este apartado se muestran los cambios producidos en la mojabilidad de las muestras cuando se irradian con luz UV. Adicionalmente, se realiza un estudio de la fotoactividad de la lámina de TiO_2 amorfo depositada sobre PET para esclarecer las causas de las variaciones en el ángulo de contacto de este tipo de muestras.

El ángulo de contacto de las muestras de PET y TiO_2/PET puede modificarse mediante la irradiación con luz UV, como se muestra en la *Figura V.8.a*. El sustrato no recubierto experimenta un descenso moderado del ángulo de contacto desde valores algo superiores a 90 º hasta ~50 º, con lo que la superficie pasa de ser ligeramente hidrofóbica a ser moderadamente hidrofílica. Como se reporta en

trabajos anteriores,[47] si este tipo de muestras se almacena en oscuridad, tal valor permanece prácticamente constante en un periodo de 30 días (*Figura V.8.b*). En la muestra TiO_2/PET, el descenso del ángulo de contacto por la acción de la luz UV es mucho mayor, convirtiendo a la superficie de parcialmente hidrofóbica a un estado de superhidrofilicidad (es decir, con un ángulo de contacto cercano a 0 º). En oscuridad, se produce un fenómeno de recuperación del ángulo de contacto con una cinética lenta, de forma que, al cabo de 30 días, aunque no se reestablece el valor inicial, se produce un aumento considerable del ángulo de contacto a un valor cercano a 60 º, muy similar al de PET en iguales condiciones.

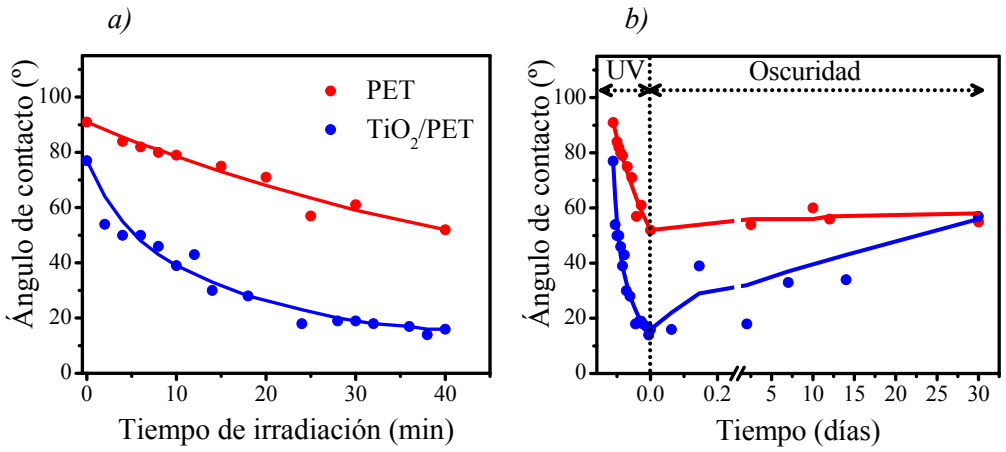


Figura V.8. Evolución del ángulo de contacto en las muestras de PET desnudo y TiO_2/PET a) por exposición a luz UV durante periodos de tiempo creciente y b) durante su almacenamiento al aire en oscuridad.

El descenso limitado en el ángulo de contacto de PET se atribuye a procesos de activación que sufren los polímeros cuando se irradian con luz UV. Estos procesos consisten en la rotura de cadenas poliméricas y la formación de grupos funcionales oxigenados producidos por reacción entre radicales generados a causa de la interacción de la radiación UV con el oxígeno y/o la humedad ambientales.[48, 49] En el caso de las muestras de TiO_2/PET, la transformación de las propiedades de mojado es un fenómeno todavía no bien explicado en la bibliografía, que suele relacionarse con la hidroxilación de ciertos dominios (generando una superficie

anfifílica), o con la eliminación fotocatalítica de restos carbonosos.[47] Para dilucidar cuál de las dos explicaciones es más adecuada, se realiza una prueba para comparar la actividad fotocatalítica del TiO_2 amorfo con la de la fase anatasa (*Figura V.9*). En ella se observa la concentración normalizada de colorante en función del tiempo de exposición a la luz UV. El descenso observado en el blanco se debe a la degradación espontánea del colorante por la acción de la radiación UV. En presencia de TiO_2, la concentración de colorante disminuye de forma más acusada, especialmente cuando se encuentra en fase anatasa, debido a su mayor fotoactividad. Aunque el test se realiza en disolución, los resultados obtenidos pueden extrapolarse a la fotoactividad al aire. Así, puede concluirse que la baja fotoactividad del material amorfo respecto a la anatasa probablemente no es suficiente para eliminar una cantidad importante del carbono contaminante que explique el cambio de hidrofilicidad en las muestras de TiO_2/PET. Así, el hecho de que tanto en el óxido amorfo como en la fase anatasa (datos no incluídos) se alcance un estado de superhidrofilicidad superficial por acción de la luz UV, sugiere que un cambio en el estado de hidroxilación superficial es la explicación más plausible para este fenómeno.

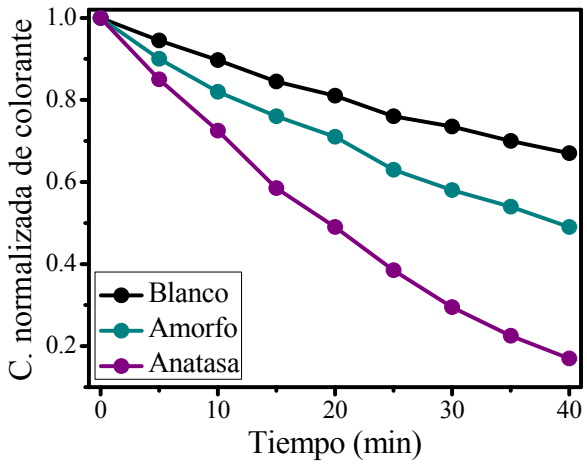


Figura V.9. Evolución de la concentración normalizada de moléculas de colorante durante experimentos de fotodegradación con láminas delgadas de TiO_2 amorfo y en fase anatasa, respecto del blanco sin material fotocatalítico.

4.3. Crecimiento de osteoblastos sobre muestras de PET y TiO_2/PET irradiadas con luz UV.

La observación por microscopía de contraste de fases del crecimiento de osteoblastos sobre PET tras la irradiación con luz UV (PET-UV, *Figura V.10.a*) muestra una morfología relativamente alargada, con células poco unidas entre sí, en contraste con la disposición celular observada en TiO_2/PET-UV (*Figura V.10.b*).

a) *b)*

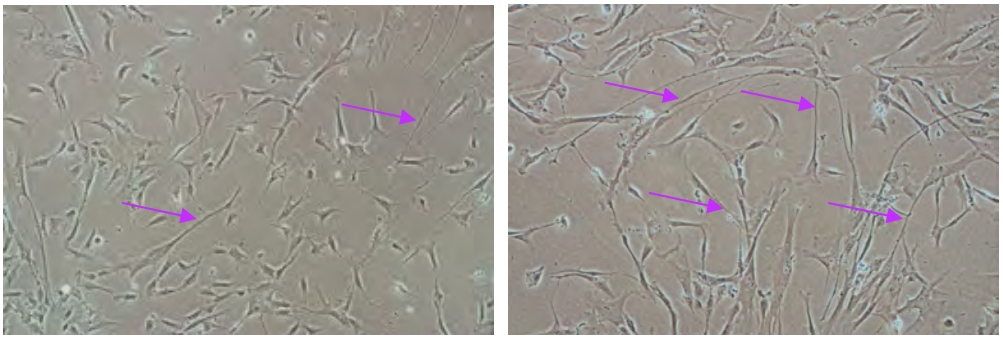
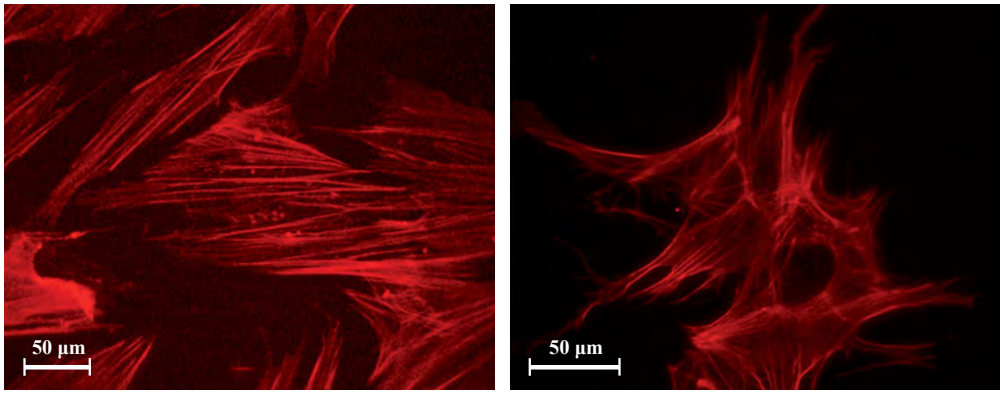


Figura V.10. Micrografías de contraste de fases de a) PET-UV y b) TiO_2/PET-UV 48 h después de la siembra de osteoblastos. Las flechas indican filopodios/lamelopodios.

Un análisis más profundo de estas muestras mediante microscopía confocal tras el inmunomarcaje del citoesqueleto de actina (*Figura V.11*) muestra que la morfología celular es alargada tanto a las 24 h (*Figura V.11.a*) como a las 48 h (*Figura V.11.b*) de siembra, sin emisión significativa de filopodios y lamelopodios. A la semana de la siembra (imágenes no adjuntadas), se observa un incremento en la propagación celular, aunque no llega a alcanzarse el estado de confluencia.

a)



b)

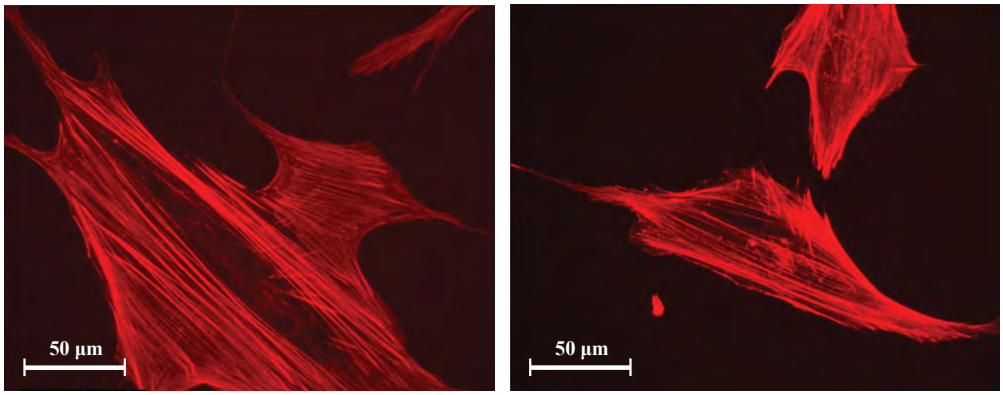
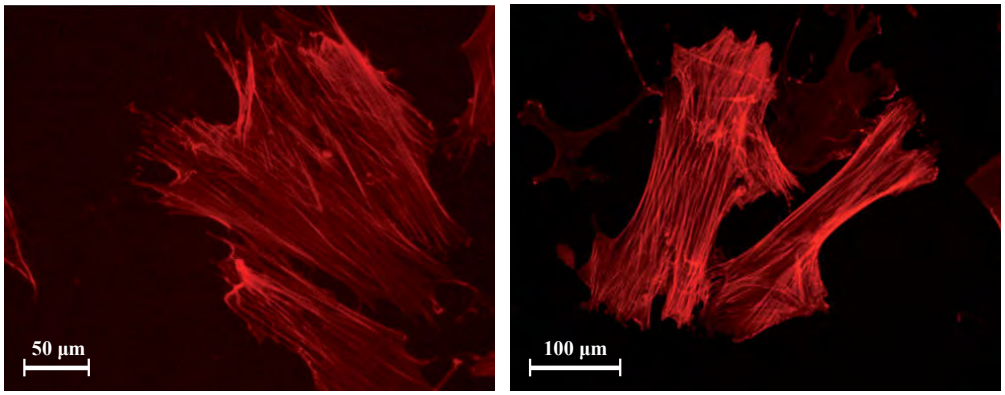


Figura V.11. Imágenes del citoesqueleto de actina de osteoblastos crecidos durante a) 24 h y b) 48 h sobre PET inmediatamente después de la irradiación con UV (PET-UV) (magnificación 40x).

Se obtienen resultados similares para la muestra de PET-Oscuro, con células alargadas con un citoesqueleto poco desarrollado. Esto puede observarse en las micrografías de la *Figura V.12*.

a)



b)

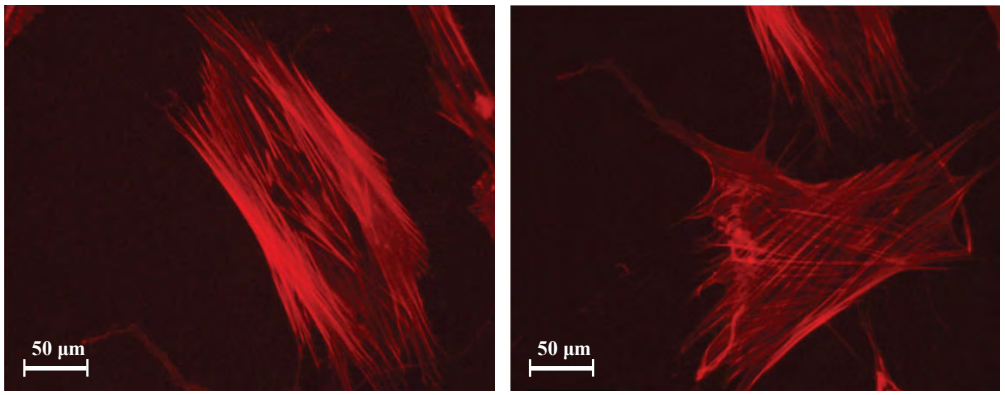


Figura V.12. Imágenes del citoesqueleto de actina de osteoblastos crecidos durante a) 24 h y b) 48 h sobre PET almacenado en oscuro durante 4 semanas tras la irradiación con UV (PET-Oscuro) (magnificación 40x).

La disposición del citoesqueleto y el desarrollo celular en ambos casos (PET-UV y PET-Oscuro) es bastante similar, presentando una débil expresión de la proteína de adhesión focal vinculina, que revela un número de contactos focales similar a las 48 h de siembra (*Tabla V.2*).

Tabla V.2. Características de los osteoblastos crecidos durante 48 h sobre las diferentes muestras.

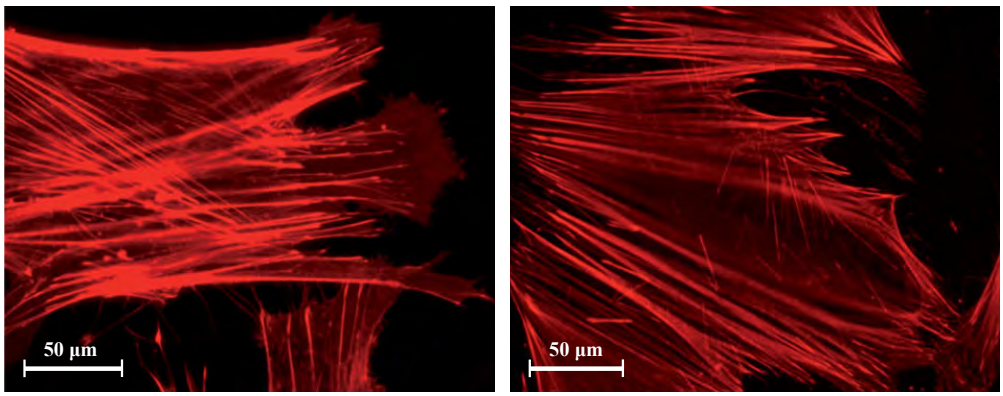
Muestra	PET-UV	PET-Oscuro	TiO_2/PET-UV	TiO_2/PET-Oscuro
Forma de los osteoblastos	Elongada	Elongada	Elongada	Redondeada
Área celular (μm^2)*	~8000	~8000	~10000	~5000
Filopodios-lamelopodios	No	No	Sí	No
Confluencia (7 días)	No	No	Sí	No
Citoesqueleto de actina	Poco orientado	Poco orientado	Orientado	Poco orientado
Contactos focales (48 h)	96 ± 32	87 ± 12	217 ± 62	104 ± 30

* Valores estimados.

En el caso de las muestras funcionalizadas con TiO_2 sí se observan diferencias notables entre las muestras recién irradiadas y las que se mantienen en oscuro durante 4 semanas tras la irradiación. Tras un periodo de 24 h desde la siembra, se detecta un anclaje exitoso de osteoblastos sobre la superficie de TiO_2/PET-UV (*Figura V.13.a*). En estas imágenes se observa una morfología más alargada que en los casos anteriores, con cambios fenotípicos evidentes, como la emisión de filopodios y lamelopodios orientados fundamentalmente en la dirección de elongación celular. A las 48 h (*Figura V.13.b*), aumenta la propagación hasta alcanzar un estado cercano al de confluencia. En este punto pueden verse osteoblastos bien adheridos tanto a la superficie como a las células vecinas, observándose una alta polarización celular, con la formación de numerosas fibras de estrés. En las imágenes correspondientes también puede observarse una localización

intensiva y extensiva de vinculina en el citoplasma, con el desarrollo de un número de adhesiones focales (que aparecen como puntos verdes brillantes en la figura) muy superior que en los casos anteriores (*Tabla V.2*). Tras una semana (imágenes no mostradas), la mayor parte de las muestras presentan confluencia.

a)



b)

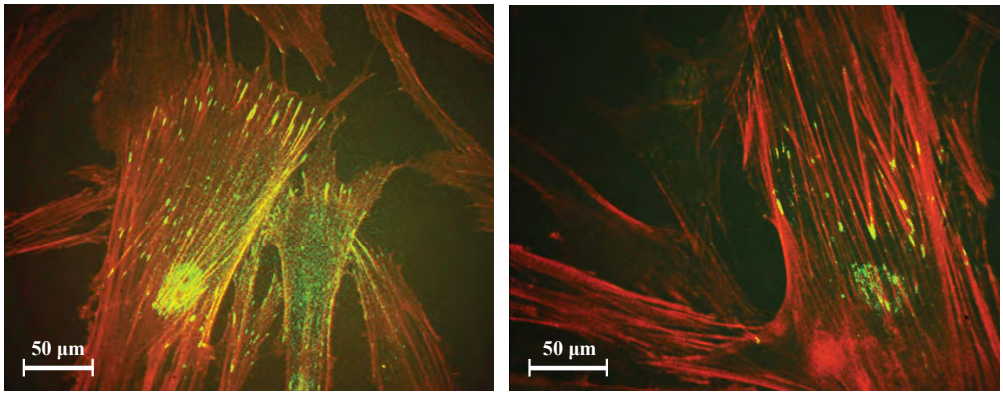
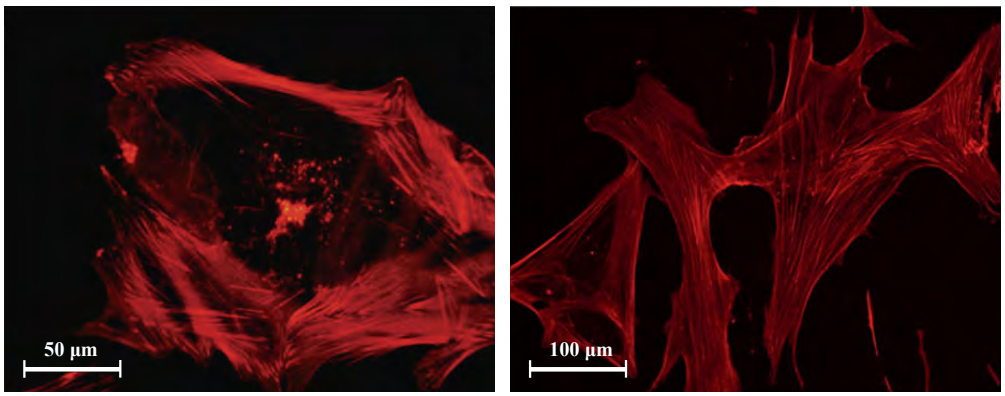


Figura V.13. Imágenes del citoesqueleto de actina (rojo) y de los contactos focales (verde) de osteoblastos crecidos durante a) 24 h y b) 48 h sobre TiO_2/PET inmediatamente después de la irradiación con UV (TiO_2/PET-UV) (magnificación 40x).

En la muestra TiO_2/PET-Oscuro, tras 24 h y 48 h desde la siembra (*Figura V.14*), así como transcurrida una semana (imágenes no incluidas), se encuentran células redondeadas poco desarrolladas y poco polarizadas, que no presentan emisión de

filopodios o lamelopodios y con escasas fibras de estrés. En esta figura, pueden verse células adheridas a la superficie, aunque no se observa propagación celular significativa. Además, el número de adhesiones focales es muy inferior al caso anterior.

a)



b)

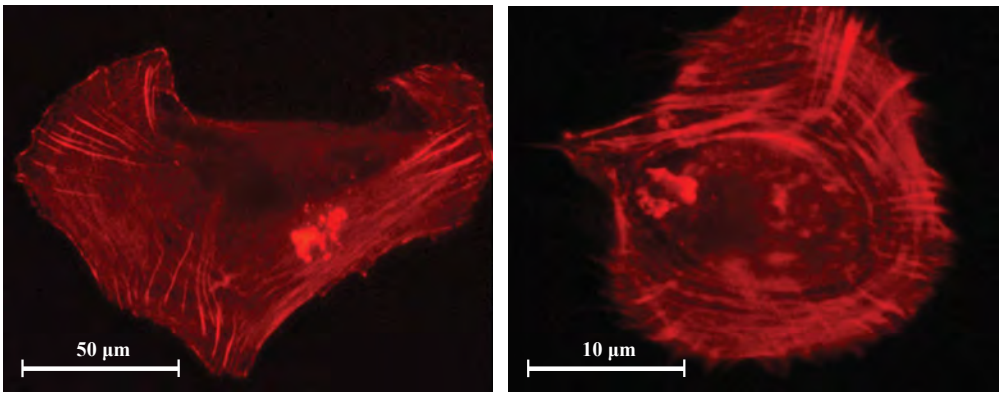


Figura V.14. Imágenes del citoesqueleto de actina de osteoblastos crecidos durante a) 24 h y b) 48 h sobre TiO_2/PET almacenado en oscuro durante 4 semanas tras la irradiación con UV (TiO_2/PET-Oscuro) (magnificación 40x).

Si se comparan los resultados de las muestras de PET y TiO_2/PET, puede verse que, mientras que en el caso de superficies sembradas inmediatamente después de la esterilización con UV existen enormes diferencias en el desarrollo de osteoblastos

(mucho más desarrollados en el polímero funcionalizado), las muestras almacenadas en oscuridad presentan características muy similares, correspondientes a células poco desarrolladas. La *Tabla V.2* incluye las principales diferencias observadas en el desarrollo de osteoblastos en las muestras analizadas. Puesto que el aumento de rugosidad que se produce con la funcionalización es reducido y los tamaños celulares (del orden de 10^2-10^4 μm^2) son muy superiores al tamaño de los motivos topográficos observados, la topografía no ejerce un efecto importante en la adhesión de osteoblastos. Atendiendo a la mojabilidad de las muestras, se observa que la superficie superhidrofílica de TiO_2/PET-UV favorece la adhesión celular en mayor medida que el resto de muestras, todas ellas con un ángulo de contacto con agua similar (~50 º-60 º).

Los resultados favorables al desarrollo celular de la superficie de TiO_2/PET recién irradiada son similares a aquéllos obtenidos en experimentos análogos realizados sobre implantes de titanio metálico recubiertos con TiO_2 o en piezas másicas de este compuesto sometidos a irradiación UV. En estos casos se atribuye la mejora en el desarrollo de osteoblastos a la eliminación fotocatalítica de las impurezas de carbono que se encuentran presentes en cualquier superficie de óxido expuesta al aire.[24-26] Este es el caso de un estudio realizado por Aita *et al*.,[26] donde se indica que es la eliminación fotocatalítica de carbono, y no los cambios en la hidrofilicidad, la causa responsable de la mejor adsorción de proteínas y el desarrollo de osteoblastos detectados en superficies de TiO_2 previamente iluminadas. No obstante, en este caso la superficie contiene una contaminación superficial de carbono del orden del 50 % y el óxido se presenta en forma de anatasa cristalina. Considerando que el TiO_2 analizado en el presente capítulo es amorfo (cuya actividad fotocatalítica es del orden de la mitad de la de la anatasa, como se ve en la *Figura V.9*) y que se consigue una eliminación de carbono muy limitada en el experimento de fotooxidación realizado (*Tabla V.1*), no parece que puedan extrapolarse las conclusiones reportadas por Aita a los resultados aquí expuestos. Por tanto, en las condiciones de trabajo empleadas aquí, aunque la eliminación de carbono por fotocatálisis puede tener cierto efecto en la mejora en el crecimiento de

osteoblastos sobre la superficie de TiO_2/PET-UV, el factor más influyente en este comportamiento es el cambio en la mojabilidad superficial que se produce.

Con todo esto se puede concluir que es posible generar superficies que favorezcan el anclaje y la propagación de osteoblastos mediante la funcionalización de PET con TiO_2 y su posterior fotoactivación por irradiación UV. Los procesos de irradiación con UV que se realizan para la esterilización bastan para inducir la fotoactivación del óxido.

4.4. Análisis estadístico de los resultados.

Las enormes diferencias encontradas en el número de contactos focales son determinantes a la hora de evaluar la capacidad osteoconductora de un material. Esto se debe a que las adhesiones focales intervienen en la regulación de la adhesión de la matriz extracelular a la superficie y en la distribución de las fibras de estrés en función de las propiedades superficiales, ambos procesos responsables de controlar la orientación y la organización celular interna.[50, 51] Hay que tener en cuenta que estas uniones se establecen en lugares preferentes del material, de manera que actúan como mecanosensores que reconocen las características bioquímicas y biofísicas de una superficie.[50, 52, 53] Esta relación se ha puesto de manifiesto en un trabajo previo donde se establece con claridad la dependencia entre este comportamiento y un incremento importante en la bioenergética mitocondrial de los osteoblastos, polarizada hacia los sitios de adhesión focal.[54] Los contactos focales se forman al comienzo de la adhesión celular y se rompen y forman de nuevo continuamente durante el desplazamiento de la célula sobre la superficie. La maduración posterior de las adhesiones focales posibilita una firme adhesión con la superficie.[55, 56]

La estrecha relación existente entre el número de contactos focales y el desarrollo de osteoblastos justifica la realización de un análisis estadístico exhaustivo de esta variable. La *Tabla V.3* presenta el número de imágenes consideradas (*N*), junto a los principales parámetros estadísticos determinados para esta variable.

Tabla V.3. Parámetros descriptivos del análisis estadístico del número de adhesiones focales.

Muestra	*N*	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	σ
1 PET-Oscuro	12	56	98	87.08	90.50	12.034
2 PET-UV	15	39	153	96.40	96.00	32.122
3 TiO_2/PET-Oscuro	19	59	170	104.00	96.00	29.957
4 TiO_2/PET-UV	10	120	348	217.30	214.00	62.363

El diagrama de Box-Wisker (o caja-bigotes, *Figura V.15*) revela que sobre la muestra TiO_2/PET-UV se produce un número mucho mayor de adhesiones con la superficie que en el resto de grupos.

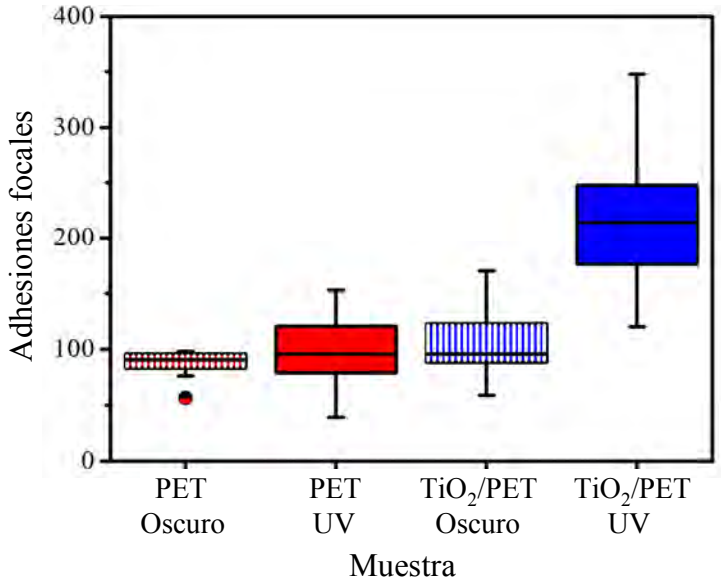


Figura V.15. Gráfica Box-Wisker del número de adhesiones focales.

La *Tabla V.4* incluye los valores resultantes de aplicar las diferentes pruebas estadísticas tomando como variable el número de contactos focales. La prueba de Levene arroja un valor de $L = 4.472$, con un valor de significancia $p < 0.05$, por lo que existen diferencias significativas en las varianzas siendo necesaria, por tanto, la aplicación de métodos no paramétricos para el estudio estadístico de esta variable.

Las pruebas de Kruskal-Wallis y de Jonckheere-Terpstra aplicadas a las cuatro muestras indican que hay diferencias entre los diferentes tratamientos superficiales y que, además, los valores medianos se encuentran ordenados de menor a mayor. Teniendo en cuenta los resultados de los análisis descriptivos de las diferentes muestras, es apropiado aplicar ambas pruebas a los tres primeros grupos. De este análisis se infiere que no hay diferencias significativas entre ellos, deduciéndose además que, puesto que la prueba de J-T da un valor de *p* cercano a 0.05, existe cierto orden en las medianas. La aplicación de las pruebas a las muestras de PET sin recubrimiento indican que no hay diferencias significativas ni ningún orden específico entre las muestras PET-UV y PET-Oscuro. Con todo esto se concluye que la muestra TiO_2/PET-UV establece un número de adhesiones focales significativamente mayor que el resto de muestras, entre las cuáles prácticamente no se observan diferencias. Es decir, para mejorar la adhesión de osteoblastos no es suficiente la funcionalización con TiO_2 del polímero o su fotoactivación, sino que se requiere la realización sucesiva de ambos procesos.

Tabla V.4. Análisis estadístico de las variaciones en el número de adhesiones focales con las pruebas de Levene, Kruskal-Wallis y Jonckheere-Terpstra.

Muestras	**Prueba**	**Parámetro**	**Valor de *p***	**Significancia estadística**
1-4	Levene	$L = 4.472$	< 0.05	Varianzas significativamente diferentes
1-4 (g.l. = 3)	K-W	$H = 24.092$	< 0.05	Diferencias significativas
	J-T	$J = 4.396$	< 0.05	Medianas ordenadas de menor a mayor
1-3 (g.l. = 2)	K-W	$H = 2.740$	0.254	Diferencias no significativas
	J-T	$J = 1.604$	0.055	Cierto orden (no significativo)
1-2 (g.l. = 1)	K-W	$H = 1.052$	0.305	Diferencias no significativas
	J-T	$J = 1.026$	0.161	No existe orden

Por último, cabe mencionar que en la bibliografía existen estudios de crecimiento de células de médula de rata en diversas muestras de titanio (recubrimientos preparados por sputtering sobre vidrio, placas tratadas con UV[25] y discos de titanio mecanizados, desvastados con ácido o con chorro de arena[24, 56, 57]). Sin embargo, no se dispone de datos sobre el crecimiento de osteoblastos en láminas de TiO_2/PET preparadas por PECVD y activadas con UV. Por tanto, los estudios realizados en este capítulo proporcionan los primeros datos publicados en este campo.[58]

5. Resumen y conclusiones.

En el presente capítulo se expone un estudio *in vitro* de adhesión de células osteogénicas humanas sobre sustratos de PET y PET funcionalizado con láminas delgadas de dióxido de titanio, en el que se evalúan diversas características celulares que dan idea de su desarrollo en cada superficie. Así, en las fases iniciales del crecimiento celular se analizan los cambios fenotípicos que se producen (forma, tamaño, emisión de filopodios y lamelopodios), la formación de fibras de estrés, la organización del citoesqueleto de actina y el desarrollo de contactos focales.

Los resultados obtenidos muestran que sobre PET no recubierto (tanto recién irradiado con luz UV como tras su almacenamiento en oscuro durante 4 semanas) el crecimiento de osteoblastos se ve poco favorecido. Por el contrario, la deposición sobre este polímero de una capa fina de TiO_2 amorfo y su posterior iluminación con luz UV tiene un efecto positivo en el desarrollo celular, mejora que desaparece cuando se mantienen estas muestras funcionalizadas en oscuro.

Asimismo, se analizan propiedades superficiales de las muestras (química, rugosidad, mojabilidad), así como los cambios que se producen por la irradiación con luz UV de su superficie. La superficie de PET no sufre cambios importantes en su química por acción de la luz, pero sí se detecta un descenso en su ángulo de contacto hasta un estado moderadamente hidrofílico. La muestra funcionalizada sufre una transformación desde parcialmente hidrofóbico a superhidrofílico relacionada con la hidroxilación superficial, y una notable recuperación tras

almacenar las muestras en la oscuridad. Por otro lado, se observa que el TiO_2 amorfo preparado presenta una fotoactividad reducida comparada con la de la anatasa, de forma que se elimina una pequeña proporción de la contaminación de carbono superficial que podría ejercer cierto efecto en el mejor anclaje de osteoblastos. Esto justifica la necesidad de fotoactivar la superficie de TiO_2/PET para poder lograr una mejora en la adhesión de osteoblastos considerable. Dado que el aumento en la rugosidad superficial que genera la funcionalización es muy pequeño y que los motivos topográficos presentan un tamaño mucho menor que el tamaño celular, la topografía no parece ejerce ningún efecto apreciable en la adhesión de osteoblastos.

Así, se ha puesto en evidencia que la biocompatibilidad y osteoconducción de una superficie inicialmente poco activa de PET pueden modificarse mediante la deposición de una lámina de TiO_2 y su fotoactivación con luz UV. La preparación del óxido se realiza mediante un proceso de PECVD a temperatura ambiente. Este método es extrapolable a cualquier sustrato polimérico, ya que permite preparar capas de óxido bien adheridas al sustrato sin que se produzca deterioro del mismo durante la deposición. Es importante tener en cuenta que la modificación de las propiedades superficiales inducidas por la acción de la luz UV depende del tiempo transcurrido tras el tratamiento, de forma que se deben estudiar los cambios que se producen en función del tiempo para poder determinar las características idóneas para el uso de este tipo de materiales con fines biomédicos.

6. Referencias.

[1] B. M. Whited, J. R. Whitney, M. C. Hofmann, Y. Xu, M. N. Rylander. "Preosteoblast infiltration and differentiation in highly porous apatitecoated PLLA electrospun scaffolds". Biomaterials, 32:2294-2304 (2011).

[2] T.-S. Jang, E.-J. Lee, J.-H. Jo, J.-M. Jeon, M.-Y. Kim, H.-E. Kim, Y.-H. Koh. "Fibrous membrane of nano-hybrid poly-L-lactic acid/silica xerogel for guided bone regeneration". Journal of Biomedical Materials Research Part B, 100B:321-330 (2012).

[3] S. H. Teng, E. J. Lee, P. Wang, D. S. Shin, H. E. Kim. "Three-layered membranes of collagen/hydroxyapatite and chitosan for guided bone regereration". Journal of Biomedical Materials Research Part B, 87:132-138 (2008).

[4] J. H. Song, H. E. Kim, H. W. Kim. "Collagen-apatite nanocomposite membranes for guided bone regeneration". Journal of Biomedical Materials Research Part B, 83:248-257 (2007).

[5] S. H. Oh, J. H. Kim, J. M. Kim, J. H. Lee. "Asymmetrically porous PLGA/ Pluronic F127 membrane for effective guided bone regeneration". Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition, 17:1375-1387 (2006).

[6] J. Gottlow, S. Nyman, T. Karring, J. Lindhe. "Treatment of localized gingival recessions with coronally displaced flaps and citric acid. An experimental study in the dog". Journal of Clinical Periodontology, 13: 57-63 (1986).

[7] P. Gentile, V. Chiono, Ch. Tonda-Turo, A. M. Ferreira, G. Ciardelli. "Polymeric membranes for guided bone regeneration". Biotechnology Journal, 6:1187-1197 (2011).

[8] T. Tirri, J. Rich, J. Wolke, J. Seppälä, A. Yli-Urpo, T. O. Närhi. "Bioactive glass induced *in vitro* apatite formation on composite GBR membranes". Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 19:2919-2923 (2008).

[9] R. A. Gittens, T. McLachlan, R. Olivares-Navarrete, Y. Cai, S. Berner, R. Tannenbaum, Z. Schwartz, K. H. Sandhage, B. D. Boyan. "The effects of combined micron/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation". Biomaterials, 32:3395-3403 (2011).

[10] A. D. Rape, W. H. Guo, Y. L. Wang. "The regulation of traction force in relation to cell shape and focal adhesions". Biomaterials, 32:2043-2051 (2011).

[11] M. J. P. Biggs, M. J. Dalby. "Focal adhesions in osteoneogenesis". Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine, 224:1441-1453 (2010).

[12] L. Bacáková, E. Filová, F. Rypácek, V. Švorcík, V. Starý. "Cell Adhesion on Artificial Materials for Tissue Engineering". Physiological Research, 53(Suppl. 1):S35-S45 (2004).

[13] M. J. Biggs, R. G. Richards, N. Gadegaard, R. J. McMurray, S. Affrossman, C. D. Wilkinson, R. O. Oreffo, M. J. Dalby. "Interactions with nanoscale topography: adhesion quantification and signal transduction in cells of osteogenic and multipotent lineage". Journal of Biomedical Materials Research Part A, 91:195-208 (2009).

[14] T. Orita, M. Tomita, K. Kato. "Regulation of cellular responses to macroporous inorganic films prepared by the inverse-opal method". Colloids and Surfaces Part B: Biointerfaces, 84:187-97 (2011).

[15] F. Intranuovo, P. Favia, E. Sardella, C. Ingrosso, M. Nardulli, R. d'Agostino, R. Gristina. "Osteoblast-like cell behavior on plasma deposited micro/nanopatterned coatings". Biomacromolecules, 12:380-387 (2011).

[16] M. J. Biggs, R. G. Richards, M. J. Dalby. "Nanotopographical modification: a regulator of cellular function through focal adhesions". Nanomedicine, 6:619-33 (2010).

[17] L. E. McNamara, T. Sjöström, K. E. V. Burgess, J. J. W. Kim, E. Liu, S. Gordonov, P. V. Moghe, R. M. Meek, R. O. Oreffo, B. Su, M. J. Dalby. "Skeletal stem cell physiology on functionally distinct titania nanotopographies". Biomaterials, 32:7403-7410 (2011).

[18] C. J. Bettinger, R. Langer, J. T. Borenstein. "Engineering substrate topography at the micro- and nanoscale to control cell function". Angewandte Chemie: International Edition in English, 48:5406-5415 (2009).

[19] M. J. Dalby. "Topographically induced direct cell mechanotransduction". Medical Engineering and Physics,7:730-742 (2005).

[20] K. Hata, K. Ikebe, M. Wada, T. Nokubi. "Osteoblast response to titanium regulates transcriptional activity of Runx2 through MAPK pathway". Journal of Biomedical Matererials Research Part A, 81:446-452 (2007).

[21] K. Das, V. K. Balla, M. Bandyopadhyay, S. Bose. "Surface modification of laser-processed porous titanium for load-bearing implants". Scripta Materialia, 59:822-825 (2008).

[22] M. Geetha, A. K. Singh, R. Asokamani, A. K. Gogia. "Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants: A review". Progress in Materials Science, 54:397-425 (2009).

[23] N. Tsukimura, M. Yamada, F. Iwasa, H. Minamikawa, W. Att, T. Ueno, L. Saruwatari, H. Aita, W. A. Chiou, T. Ogawa. "Synergistic effects of UV photofunctionalization and micro-nano hybrid topography on the biological properties of titanium". Biomaterials, 32:4358-4368 (2011).

[24] W. Att, N. Hori, F. Iwasa, M. Yamada, T. Ueno, T. Ogawa. "The effect of UV photo functionalization on the time-related bioactivity of titanium and chromium-cobalt alloys". Biomaterials, 30:4268-4276 (2009).

[25] T. Miyauchi, M. Yamada, A. Yamamoto, F. Iwasa, T. Suzawa, R. Kamijo, K. Baba, T. Ogawa. "The enhanced characteristics of osteoblast adhesion to photo functionalized nanoscale TiO_2 layers on biomaterials surfaces". Biomaterials, 31:3827-3839 (2010).

[26] H. Aita, N. Hori, M. Takeuchi, T. Suzuki, M. Yamada, M. Anpo, T. Ogawa. "The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone". Biomaterials, 30:1015-1025 (2009).

[27] L. Zhao, S. Mei, W. Wang, P. K. Chu, Z. Wu, Y. Zhang. "The role of sterilization in the cytocompatibility of titania nanotubes". Biomaterials, 31:2055-2063 (2010).

[28] Y. Han, D. Chen, J. Sun, Y. Zhang, K. Xu. "UV-enhanced bioactivity and cell response of micro-arc oxidized titania coatings". Acta Biomaterialia, 4:1518-1529 (2008).

[29] M. Salido, A. Terriza, D. Torres, E. de la Orden, A. Barranco, M. A. Díaz-Cuenca, J. Vilches. "Nanolayers of PECVD TiO_2 suitability for human osteoblasts growth for tissue engineering". Histology and Histopathology, 26(Supp1):55-56 (2011).

[30] A. M. Gallardo-Moreno, M. A. Pacha-Olivenza, L. Saldaña, C. Pérez-Giraldo, J. M. Bruque, N. Vilaboa, M. L. González-Martín. "*In vitro* biocompatibility and bacterial adhesion of physico-chemically modified Ti6Al4V surface by means of UV irradiation". Acta Biomaterialia, 5:181-192 (2009).

[31] H. Chen, L. Yuan, W. Song, Z. Wu, D. Li. "Biocompatible polymer materials: Role of protein–surface interactions". Progress in Polymer Science, 33:1059-1087 (2008).

[32] G. Legeay, F. Poncin-Epaillard. "Polymers used as biomaterials. Surfaces and interfaces". Le Vide, 52:179-253 (1996).

[33] J. G. Steele, G. Jonhson, C. McFarland, B. A. Dalton, T. R. Gengenbach, R. C. Chatelier, P. A. Underwood, H. J. Griesser. "Roles of serum vitronectin and fibronectin in initial attachment of human vein endothelial cells and dermal fibroblasts on oxygen- and nitrogen-containing surfaces made by radiofrequency plasmas". Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition, 6:511-532 (1994).

[34] H. J. Griesser, R. C. Chatelier, T. R. Gengenbach, G. Jonhson, J. G. Steele. "Growth of human cells on plasma polymers: Putative role of amine and amide groups". Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition, 5:531-554 (1994).

[35] V. Rico, P. Romero, J. L. Hueso, J. P. Espinós, A. R. González-Elipe. "Wetting angles and photocatalytic activities of illuminated TiO_2 thin films". Catalysis Today, 143:347-354 (2009).

[36] J. Yun, S. Lee, T. S. Bae, Y. Yun, S. Lee, J. D. Kwon, G. H. Lee. "Adhesive and structural failures of oxide costaings on plasma treated polymers". Plasma Processes and Polymers, 8:815-831 (2011).

[37] S. Dimitrievska, A. Petit, C. J. Doillon, L. Epure, A. Ajji, L. Yahia, M. N. Bureau. "Effect of sterilization on non-woven polyethylene terephthalate fiber structures for vascular grafts". Macromolecular Bioscience, 11:13-21 (2011).

[38] H. T. Sasmazel, S. Manolache, M Gümüşderelioğlu. "Functionalization of nonwoven PET fabrics by water/O_2 plasma for biomolecule mediated cell cultivation". Plasma Processes and Polymers, 7:588-600 (2010).

[39] B. Reisinger, M. Fahrner, I. Frischauf, S. Yakunin, V. Svorcik, H. Fiedorowicz, A. Bartnik, C. Romanin, J. Heitz. "EUV micropatterning for biocompatibility control of PET". Applied Physics A: Materials Science and Processing, 100:511-516 (2010).

[40] A. Borrás, J. Cotrino, A. R. González-Elipe. "Type of plasmas and microstructures of TiO_2 thin films prepared by plasma enhanced chemical vapor deposition" Journal of. Electrochemical Society, 154:152-157 (2007).

[41] J. Cotrino, A. Palmero, V. Rico, A. Barranco, J. P. Espinós, A. R. González-Elipe.J. "Electron temperature measurement in a slot antenna 2.45 GHz microwave plasma source". Vacuum Science and Technology B, 19:410-414 (2001).

[42] J. R. Sánchez-Valencia, A. Borrás, A. Barranco, V. J. Rico, J. P. Espinós, A. R. González-Elipe. "Preillumination of TiO_2 and Ta_2O_5 photoactive thin films as a tool to tailor the synthesis of composite materials". Langmuir, 24:9460-9469 (2008).

[43] A. Borrás, J. Cotrino, A. R. González-Elipe. "Type of plasmas and microstructures of TiO_2 thin films prepared by plasma enhanced chemical vapor deposition". Journal of Electrochemical Society, 154:152-157 (2007).

[44] P. Romero-Gómez, S. Hamad, J. C. González, A. Barranco, J. P. Espinós J. Cotrino, A. R. González-Elipe. "Band gap narrowing versus formation of electronic states in the gap in N-TiO_2 thin films". Journal of Physical Chemistry C, 114:22546-22557 (2010).

[45] C. López-Santos, F. Yubero, J. Cotrino, A. Barranco, A. R. González-Elipe. "Plasmas and atom beam activation of the surface of polymers". Journal of Physics D: Applied Physics, 41:225209-225221 (2008).

[46] P. Romero-Gómez, V. Rico, A. Borrás, A. Barranco, J. P. Espinós, J. Cotrino, A. R. González-Elipe. "Chemical state of nitrogen and visible surface and schottky barrier driven photoactivities of N-doped TiO_2 thin films". Journal of Physical Chemistry C, 113:13341-13351 (2009).

[47] A. Yasukawa, Y. Kobayashi. "Wettability characteristics of PET films treated by atmospheric pressure plasma and ultraviolet excimer light". Polymer Journal, 43:545-551 (2011).

[48] D. Praschak, T. Bahners, E. Schollmeyer. "PET surface modifications by treatment with monochromatic excimer UV lamps". Applied Physics A: Materials Science and Processing, 66:69-75 (1998).

[49] J. Peeling, G. Courval, M. S. Jazzar. "ESCA and contact-angle studies of the surface modification of poly(ethylene terephthalate) film: photooxidation and aging". Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition, 22:419-428 (1984).

[50] A. Diener, B. Nebe, F. Lüthen, P. Becker, U. Beck, H. G. Neumann, J. Rychly. "Control of focal adhesion dynamics by material surface characteristics". Biomaterials, 26:383-392 (2005).

[51] M. Salido, J. I. Vilches, J. L. Gutiérrez, J. Vilches. "Actin cytoskeletal organization in human osteoblasts grown on different dental titanium implant surfaces". Histology and Histopathology, 22:1355-1364 (2007).

[52] B. Geiger, J. P. Spatz, A. D. Bershadsky. "Environmental sensing through focal adhesions". Nature Reviews Molecular Cell Biology, 10:21-33 (2009).

[53] A. Pathak, V. S. Deshpande, R. M. McMeeking, A. G. Evans. "The simulation of stress fibers and focal adhesion development in cells on patterned substrates". Journal of the Royal Society Interface, 6:507-524 (2008).

[54] M. Salido, J. I. Vilches-Pérez, J. L. González, J. Vilches. "Mitochondrial bioenergetics and distribution in living human osteoblasts grown on implant surfaces". Histology and Histopathology, 24:1275-1286 (2009).

[55] E. Lamers, R. van Horssen, J. te Riet, F. C. van Delft, R. Luttge, X. F. Walboomers, J. A. Jansen. "The influence of nanoscale topographical cues on initial osteoblast morphology and migration". European Cells and Materials, 20:329-343 (2010).

[56] J. Vlacic-Zischke, S. M. Hamlet, T. Friis, M. S. Tonetti, S. Ivanovski. "The influence of surface microroughness and hydrophilicity of titanium on the up-regulation of TGFb/BMP signalling in osteoblasts". Biomaterials, 32:665-671 (2011).

[57] H. Aita, W. Att, T. Ueno, M. Yamada, N. Hori, F. Iwasa, N. Tsukimura, T. Ogawa. "Ultraviolet light-mediated photofunctionalization of titanium to promote human mesenchymal stem cell migration, attachment, proliferation and differentiation". Acta Biomaterialia, 5:3247-3257 (2009).

[58] A. Terriza, A. Díaz-Cuenca, F. Yubero, A. Barranco, A. R. González-Elipe, J. L. González Caballero, J. Vilches, M. Salido. "Light induced hydrophilicity and osteoblast adhesion promotion on amorphous TiO_2". Journal of Biomedical Materials Research: Part A, 101A:1026-1035 (2013).

Capítulo VI.
Adhesión de osteoblastos sobre membranas reabsorbibles funcionalizadas con dióxido de silicio

1. Introducción.

Como se expone en la introducción del Capítulo V, una opción factible para fabricar dispositivos de regeneración ósea guiada es el uso de materiales poliméricos funcionalizados con materiales bioactivos. En el capítulo anterior se realiza un estudio del crecimiento de osteoblastos sobre un sistema modelo compuesto por un polímero no biodegradable (PET) recubierto por una lámina delgada de dióxido de titanio preparado por PECVD. En la misma línea, en el presente capítulo se exponen los resultados obtenidos con una membrana diseñada para su uso biomédico, compuesta por un polímero reabsorbible recubierto con dióxido de silicio preparado por el mismo método.

Las membranas utilizadas en medicina están constituidas por diversos materiales poliméricos, tanto biodegradables como no biodegradables. Los biopolímeros naturales constituyen una buena opción para la constitución de membranas por su comportamiento biomimético debido a su similitud con los tejidos humanos. Por este motivo, actualmente el diseño y estudio de superficies biomiméticas para mejorar las membranas comúnmente utilizadas es una actividad en auge.[1, 2]

1.1. Uso del ácido poli (láctico-*co*-glicólico) en biomedicina.

El ácido poli (láctico-*co*-glicólico), conocido por sus siglas inglesas PLGA, es uno de los pocos polímeros sintéticos apto para uso biomédico. De hecho, está aprobado por la FDA (Food and Drug Administration, de Estados Unidos) y otros organismos regulatorios para su implantación en humanos.[3] La aptitud del PLGA para uso médico viene dada por su biocompatibilidad, su procesabilidad relativamente sencilla, sus adecuadas propiedades mecánicas y su biodegradabilidad, que puede controlarse por modificación de la forma que adopta el material, grosor, tratamientos superficiales, etc. Por todo ello, el PLGA se usa para la construcción de andamiajes utilizados en ingeniería tisular ósea, para la fabricación de dispositivos dentales y ortopédicos, en ingeniería de tejidos blandos[4-6] y, gracias a su capacidad de degradarse, para la liberación de fármacos, entre los que se incluyen factores de

crecimiento y hormonas que participan en el proceso de regeneración del hueso. Además, este polímero es capaz de soportar diversos procesos de esterilización convencionales.[2, 7-9]

No obstante, pese a sus buenas cualidades mecánicas y a su biodegradabilidad, presenta el inconveniente de ser poco bioactivo, de forma que no induce una respuesta significativa en las células formadoras de hueso.[6, 10] Esto se debe a sus propiedades superficiales, esto es, a su relativamente alta hidrofobicidad comparada con la de la matriz extracelular natural, a su incapacidad de interactuar específicamente con las células y a que carece de grupos funcionales para la unión de moléculas biológicamente activas. Estas cualidades hacen del PLGA un material poco adecuado como soporte para el crecimiento celular[11-14] y, por consiguiente, para su uso en el campo de la Regeneración Ósea Guiada. Estos inconvenientes pueden subsanarse con una funcionalización adecuada de su superficie para lograr unas buenas propiedades de osteoconducción y osteoinducción.

De lo comentado anteriormente, se concluye que la adecuada funcionalización superficial del polímero puede solucionar los problemas de bioactividad que presenta el PLGA conservando sus ventajosas cualidades másicas. Por tanto, pueden generarse andamiajes que sean absorbibles por el organismo en un periodo de tiempo adecuado, de forma que el fenómeno de regeneración ósea transcurra en paralelo al de degradación de la membrana, evitándose así la necesidad de una nueva intervención quirúrgica para la retirada de la misma. En la *Figura VI.1* se muestra gráficamente cómo el proceso de regeneración ósea ocurre simultáneamente a la degradación de las membranas.

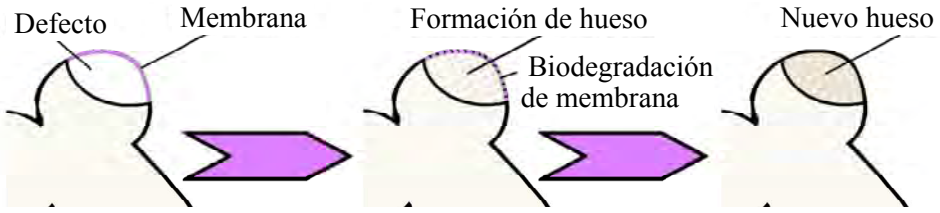


Figura VI.1. Proceso de biodegradación de membranas de regeneración ósea paralelo a la formación de hueso.

1.2. Uso del dióxido de silicio en biomedicina.

Como se expone en el Capítulo V, existen una serie de compuestos inorgánicos que favorecen la actividad de los osteoblastos sobre determinadas superficies.

En el capítulo anterior se demuestra la capacidad de transformar una superficie inactiva de PET en bioactiva mediante su funcionalización superficial con TiO_2 amorfo. En este caso, se pretende investigar el comportamiento del SiO_2 para este cometido. La elección de este óxido se basa en que participa activamente en el proceso de formación de hueso, influyendo en la estimulación metabólica de la deposición de calcio. Además, este compuesto promueve la diferenciación de células progenitoras en osteoblastos, con un efecto morfogenético beneficioso en la formación de hidroxiapatita, tal y como se presenta en estudios recientes de biología molecular.[15-19]

En determinados sistemas se conoce que la presencia de trazas de sílice contribuye de manera importante al fortalecimiento de los huesos, favoreciendo su formación y mejorando la síntesis de colágeno, especialmente durante el envejecimiento.[20] Un estudio reciente de crecimiento celular *in vitro* de Wang *et al*.[21] sugiere una actividad osteoinductora y osteogénica mediante la regulación génica necesaria para la diferenciación y proliferación de células osteogénicas.[8, 15] Por tanto, el dióxido de silicio se presenta como un buen candidato para promover la bioactividad del PLGA.

Otro punto a tener en cuenta es que sólo se requiere funcionalizar la cara de la membrana que estará en contacto con el defecto óseo, para lo cuál la metodología de plasma es adecuada. Así, se favorece la formación de nuevo hueso en la cara en contacto con el defecto sin necesidad de recubrir ambas caras, reduciéndose los costes del proceso. Para finalizar, cabe mencionar que los espesores de material depositados en este capítulo son muy pequeños (del orden de los 15 nm) para que la membrana continúe siendo permeable a fluidos y nutrientes y, además, se libere una cantidad muy pequeña de SiO_2 cuando se produzca la degradación de la membrana.

2. Objetivos de este capítulo.

Los trabajos recogidos en el presente capítulo se desarrollan con el fin de lograr diseñar una membrana reabsorbible con utilidad biomédica. Para ello es necesaria tanto la preparación de las membranas como la realización de una serie de pruebas que demuestren su adecuación a este uso. Los objetivos específicos perseguidos se describen a continuación.

- Preparar membranas reabsorbibles de PLGA.

La fabricación de membranas de PLGA se lleva a cabo por procesos clásicos de síntesis en vía líquida basados en el método de disolución-evaporación, ampliamente reportado.[22-24] Se ajustan las cantidades tanto de disolvente como de polímero para lograr el espesor deseado, comprobando la degradabilidad de la membrana obtenida.

- Describir un método de preparación de dióxido de silicio adecuado a sustratos poliméricos biodegradables para la preparación de membranas de regeneración ósea.

Se preparan recubrimientos de SiO_2 sobre PLGA por PECVD a temperatura ambiente, método adecuado para la funcionalización de este sustrato.[25] De esta forma, se evitan los problemas provocados por la funcionalización por procesos clásicos de sol-gel u otras rutas químicas en vía líquida, debido a la sensibilidad del material frente a la exposición a medio líquido o a altas temperaturas.[26-32]

- Determinar las propiedades de las muestras.

Se analiza la química superficial de las muestras de PLGA y PLGA recubierto con sílice (denotada como SiO_2/PLGA) por XPS y se determinan sus propiedades de mojado y su topografía superficial mediante microscopía de fuerzas atómicas. Para evaluar los posibles daños sufridos por el sustrato durante la deposición se realizan medidas de FT-IR.

- Evaluar los cambios en el crecimiento de osteoblastos en relación a las modificaciones superficiales generadas por la funcionalización superficial.

Se realizan estudios *in vitro* del comportamiento de osteoblastos sembrados sobre las muestras de PLGA y SiO_2/PLGA para determinar la mejora en la biocompatibilidad y bioactividad que proporciona la capa fina depositada. La adhesión y desarrollo celular se evalúa mediante la observación de las características inducidas en los osteoblastos, como son la forma, el tamaño, la organización del citoesqueleto, el número de contactos focales, etc. Finalmente, se discute la relación existente entre los cambios superficiales que genera la funcionalización y la mejora en el desarrollo de los osteoblastos.

3. Materiales y métodos.

En este apartado se describe la metodología empleada para la preparación de las muestras y su caracterización, así como los estudios de adhesión de osteoblastos llevados a cabo.

3.1. Preparación de membranas de PLGA y deposición de láminas delgadas de SiO_2.

Las membranas de PLGA empleadas en los ensayos realizados se fabrican mediante el método de disolución-evaporación. Para ello, se preparan 10 ml de una disolución de PLGA (PURASORB®, Purac Biomaerials) en diclorometano al 1.5 % en peso y se vierte en un molde de teflón cuyo diámetro interno es de 7 cm. La concentración y la cantidad de disolución añadida se verifica previamente, de manera que se obtenga una película con consistencia adecuada y con un espesor de 50 µm aproximadamente. La *Figura VI.2* muestra esquemáticamente la preparación de las membranas de PLGA, incluyendo la funcionalización superficial con dióxido de silicio.

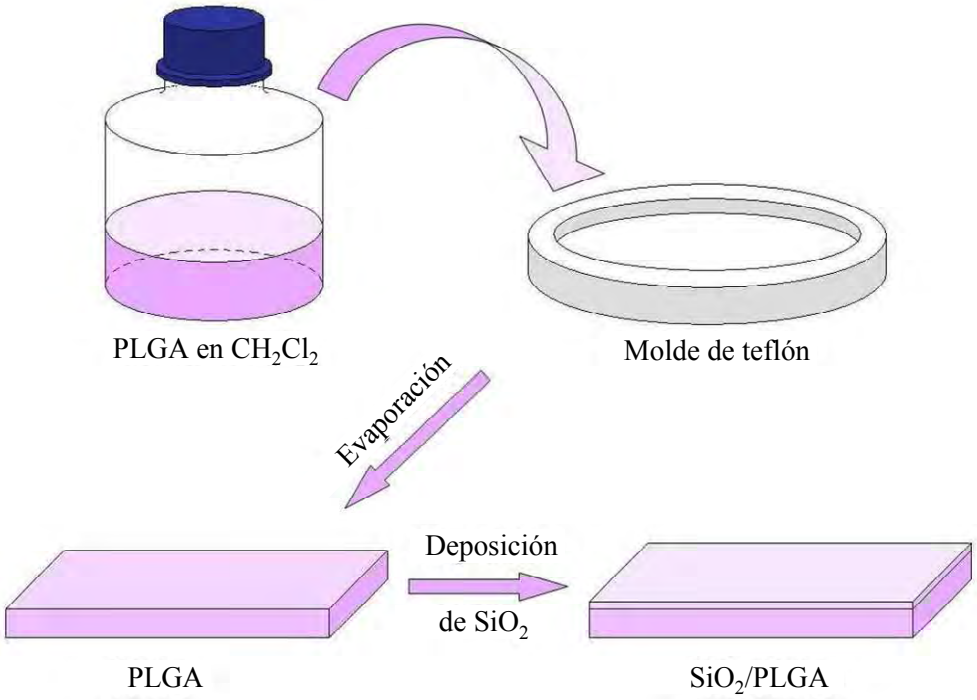
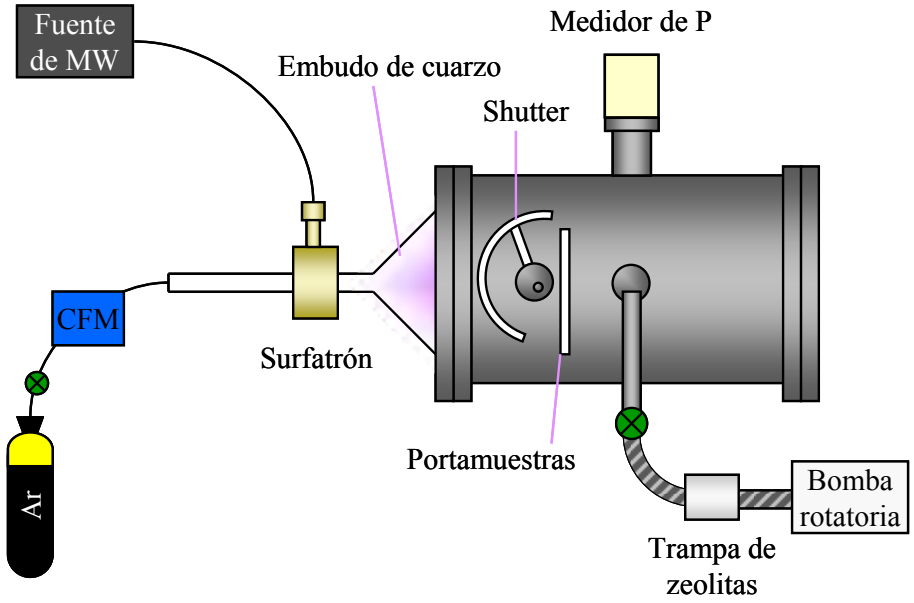


Figura VI.2. Esquema de la preparación de membranas de PLGA funcionalizadas con SiO_2.

La funcionalización del PLGA con una capa fina de SiO_2 se realiza mediante PECVD. El dispositivo experimental se compone de un sistema de vacío unido a una cámara de deposición en configuración remota respecto a una fuente de plasma (*Figura VI.3*). La cámara de deposición es un cilindro de acero inoxidable dispuesto en horizontal, en cuyo interior se coloca el portamuestras en vertical de cara a una apertura situada en una de las bases del cilindro. En esta apertura se acopla un embudo de cuarzo, donde se genera el plasma por la acción de un aplicador de ondas de superficie (surfatrón, de Sairem, Francia) situado alrededor del tubo, que actúa en el rango de las microondas (2.45 GHz). La distancia entre el tubo de cuarzo y las muestras es de 5 cm. La deposición se controla con un *shutter* de aluminio semiesférico accionado por un rotador. Pueden encontrarse más detalles del sistema experimental en la tesis doctoral de M. C. López Santos.[33] Se trabaja a una potencia de 60 W y a 0.4 mbar de presión, usando argón puro como gas plasmógeno. En estas condiciones la densidad típica de plasma es de alrededor de $1 \cdot 10^{11}$ cm^{-3}.

a)



b)

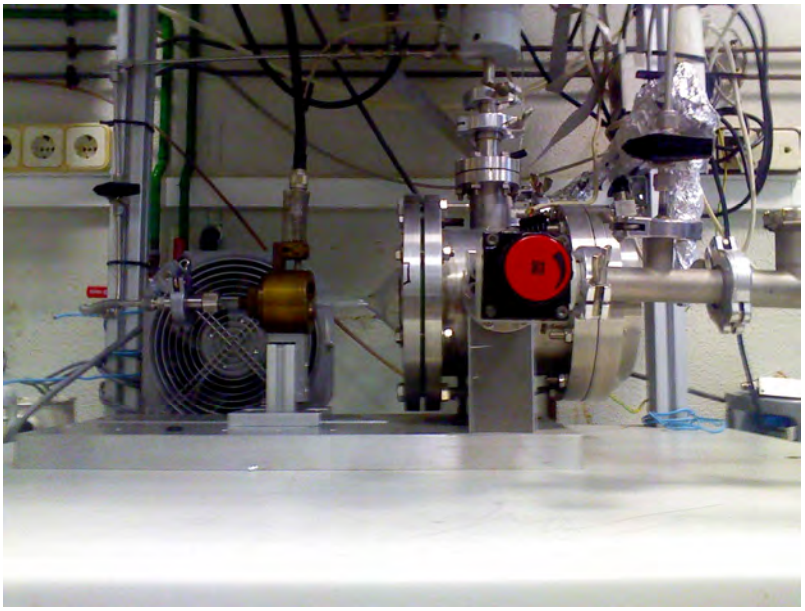


Figura VI.3. Esquema (a) y fotografía (b) del reactor de plasma usado para la deposición de películas delgadas de SiO_2 sobre polímeros.

Los gases se introducen en la cámara a través de conductos de acero. El precursor de silicio empleado es el hexametildisiloxano (HDMSO), cuya fórmula semidesarrollada y estructural pueden verse en la *Figura VI.4*. Debido a su volatilidad, este precursor puede introducirse por calentamiento a 323 K del bulbo que lo contiene. Además, las conducciones por las que pasa el precursor se calientan a esta temperatura para evitar que condense en las paredes de acero. El flujo tanto de precursor como de argón se controla mediante controladores de flujo másico (Bronkhorst HIGH-TECH B.V., Holanda). La proporción entre el gas plasmógeno y el precursor es de 60 % y 40 % respectivamente.

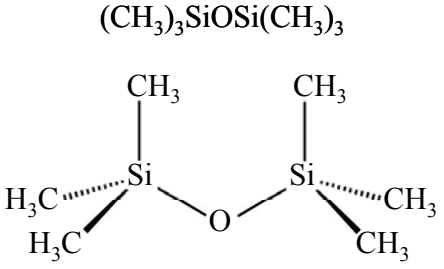


Figura VI.4. Fórmula semidesarrollada y estructural del precursor de silicio HDMSO.

El sustrato se activa con un plasma de argón puro durante 2 min a 0.3 mbar de presión para favorecer la adhesión de la capa de óxido. Antes de cada tratamiento se mantiene el flujo de la mezcla de gases correspondiente durante, al menos, 30 min para asegurar la pureza del gas en el reactor.

3.2. Caracterización de las muestras de PLGA y SiO_2/PLGA.

Se examina la composición química superficial de las muestras mediante XPS, la topografía superficial por AFM y su capacidad de mojado midiendo el ángulo de contacto con agua. Para determinar si se mantiene la integridad de la membrana de PLGA tras el proceso de deposición del óxido de silicio (IV), se examinan las muestras por FT-IR. El espesor de las láminas delgadas de SiO_2 se calibran a partir de medidas de SEM en sección tranversal.

Por otra parte, la degradabilidad de las membranas de PLGA se evalúa por inmersión en tampón fosfato salino, comúnmente empleado en este tipo de ensayos ya que reproduce la cinética de degradación en el organismo. Para ello se introducen muestras de 15 x 15 mm^2 en tubos falcon que contienen 20 ml de PBS y se incuban a 36.5 ºC con agitación (60 rpm) hasta 24 semanas. Una vez por semana, se reemplaza el 75 % del líquido por PBS limpio preincubado a 36.5 ºC. Cada 2 semanas, se extraen muestras para su análisis.

3.3. Estudio de adhesión de osteoblastos.

El estudio de adhesión de osteoblastos comienza con la siembra de células, seguido de un análisis cualitativo y cuantitativo (estadístico) de las características celulares. Estos ensayos se llevan a cabo en la Facultad de Medicina de la Universidad de Cádiz por el grupo de José Vilches y Mercedes Salido.

3.3.1. Siembra de células.

Se realiza la esterilización de, al menos, 6 muestras de PLGA y 6 de SiO_2/PLGA y se realiza la siembra en condiciones análogas a las descritas en el Capítulo V.

3.3.2. Desarrollo celular.

Cada día se evalúan el estado de desarrollo y adhesión de los osteoblastos en cada superficie mediante microscopía de contraste de fases. Transcurridas 24, 48 y 72 h se tratan las muestras y se realiza el inmunomarcaje con rodamina faloidina (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Estados Unidos) y con antivinculina monoclonal conjugada con isotiocianato de fluoresceína (Sigma-Aldrich). Se visualizan y toman imágenes de un mínimo de 5 muestras de cada grupo con un microscopio confocal (véase el Anexo I).

3.3.3. Análisis estadístico.

Tomando como variable el número de adhesiones focales entre las células y la superficie, se lleva a cabo un análisis estadístico considerando cuatro grupos diferentes de muestras: PLGA a 48 h, SiO_2/PLGA a 48 h, PLGA a 72 h y SiO_2/PLGA a 72 h. Con este planteamiento se pretende conocer la influencia en el desarrollo de osteoblastos de la funcionalización del polímero y del tiempo de siembra, es decir, cómo afectan estos factores experimentales al potencial de osteconducción de las superficies testadas. Primero, se compara la distribución de los cuatro grupos mediante una gráfica de Box-Wisker. A la luz de los resultados de la prueba de Levene, se aplica la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comprobar si la funcionalización y/o el tiempo de siembra generan diferencias en la adhesión celular. Se realiza también una ANOVA de doble vía,[34] proceso que se propone en la bibliografía para este tipo de análisis, si bien esto conlleva una serie de aproximaciones y la asunción de ciertas condiciones (por ejemplo, que los datos sigan una distribución normal). Finalmente, se lleva a cabo un contraste de *post-hoc* Scheffé para evaluar la homogeneidad de cada grupo experimental y las diferencias entre ellos.

Por otra parte, se realiza un análisis de los factores de forma más importantes (área, perímetro, circularidad, relación de aspecto, redondez y solidez), cuya descripción se incluye en la *Tabla VI.1*.[17, 35-39] Dado que analizar estas 6 variables simultáneamente resulta muy complejo para la comparación de las diferentes muestras, en primer lugar, se realiza un análisis factorial para reducir el número de variables a tener en cuenta mediante la agrupación de los factores en varios índices. Esta agrupación se basa en un análisis de las correlaciones entre los factores morfométricos considerados. Una vez obtenidos los diferentes índices, se aplica una prueba ANOVA de doble vía para evaluar los efectos de la funcionalización y el tiempo en éstos.

Todos estos análisis se realizan con el programa de análisis estadístico SPSS, de IBM.

Tabla VI.1. Descripción de los principales factores morfométricos analizados para los osteoblastos crecidos sobre las diferentes membranas.

Correlación	Definición	Significado	Fórmula
Área (μm^2)	Superficie que ocupa la célula	-	-
Perímetro (µm)	Longitud del contorno celular	-	-
Circularidad	Grado de similitud a la forma circular	$1 \Rightarrow$ Círculo perfecto $\approx 0 \Rightarrow$ Forma alargada	$\frac{4\pi \cdot \text{Área}}{\text{Perímetro}^2}$
Relación de aspecto	Relación entre el largo y el ancho	Valores altos indican células más alargadas	$\frac{\text{Eje mayor}}{\text{Eje menor}}$
Redondez	Relación entre el ancho y el largo	Valores altos indican células más redondeadas	$\frac{1}{\text{Relación de aspecto}}$
Solidez	Cuantificación de los huecos	Valores altos indican pocos huecos	$\frac{\text{Área}}{\text{Área convexa}}$

4. Resultados y discusión.

En este apartado se incluyen los principales resultados obtenidos de la caracterización de las muestras y del análisis de los osteoblastos crecidos sobre ellas.

4.1. Caracterización superficial y degradabilidad de las muestras.

En el espectro de XPS de la membrana de PLGA (*Figura VI.5.a*) se observan los picos característicos de carbono y oxígeno que componen el polímero. El pico correspondiente a C 1s (*Figura VI.5.b*) muestra las diferentes componentes situadas a 284.6, 286.4 y 288.6 eV, atribuidas a especies de C–C(H), C–O y >C=O/COOH,[23, 24] respectivamente. La *Figura VI.5.c* muestra un pico ancho debido a la convolución de los diferentes estados del oxígeno en el PLGA.

La superficie de la membrana de SiO_2/PLGA se compone de silicio, oxígeno y carbono, tal y como se observa en la *Figura VI.5.a*. Mientras que los dos primeros elementos componen la capa de óxido, el carbono se atribuye a contaminación. En este caso, el pico de C 1s sólo presenta una componente a 284.6 eV, atribuido a restos carbonosos, y la señal de O 1s es mucho más estrecha y se sitúa a 533.0 eV; la pérdida de la forma típica de los picos de C 1s y O 1s del PLGA demuestra que la superficie se encuentra totalmente recubierta por SiO_2, pese al pequeño espesor (del orden de 15 nm) de la lámina de óxido. El pico de Si 2p (*Figura VI.5.d*) aparece a 103.9 eV, que corresponde a un estado de oxidación Si^{4+} propio de la sílice.[40, 41]

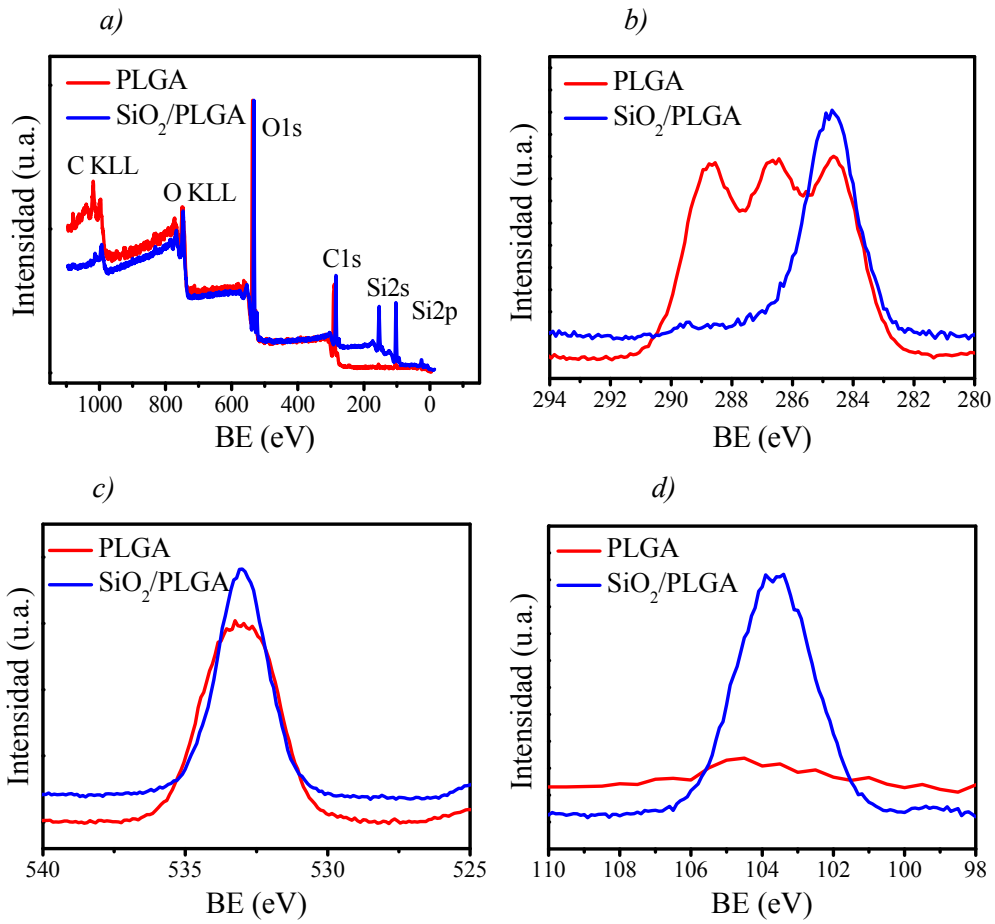


Figura VI.5. Espectros de fotoemisión a) completo y señales de b) C 1s, c) O 1s y d) Si 2p de las muestras de PLGA y PLGA funcionalizado con SiO_2.

La comparación del espectro de FT-IR de las membranas de PLGA y SiO_2/PLGA (*Figura VI.6*) muestra pocos cambios. En ambos casos se observan las bandas de absorción características del PLGA; éstas son: 2994, 2946 y 2840 cm^{-1} (tensión de C–H); 1753 cm^{-1} (tensión de C=O del éster); 1460, 1428, 1371 y 754 cm^{-1} (flexión de C–H); y 1185 y 1080-980 cm^{-1} (tensión de C–O).[42, 43] Considerando que el espesor analizado es de decenas de micras, la equivalencia de resultados obtenidos demuestra que la deposición por PECVD conserva las propiedades másicas originales del polímero. Los cambios poco importantes que se aprecian tras la funcionalización con SiO_2 se deben al pequeño espesor de óxido depositada es muy inferior al de la membrana de PLGA (15 nm frente a 50 µm). En cualquier caso, se observa un aumento en la intensidad del pico situado a 1050 cm^{-1} en la muestra funcionalizada, hecho que puede atribuirse a la contribución de las vibraciones de tensión de Si–O–Si de la red de dióxido de silicio.[44]

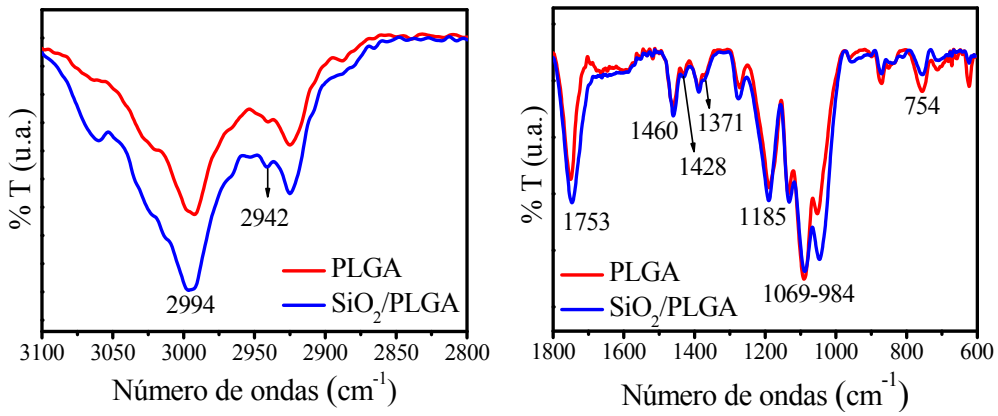


Figura VI.6. Espectros de FT-IR de las membranas de PLGA y SiO_2/PLGA.

Las imágenes de AFM de las dos superficies presentadas en la *Figura VI.7* revelan que la deposición de SiO_2 aumenta levemente la rugosidad superficial, aunque causa una reducción de la granulometría. Puede verse también que las láminas delgadas de óxido preparadas por ese método presentan una microestructura homogénea y un crecimiento conformal.

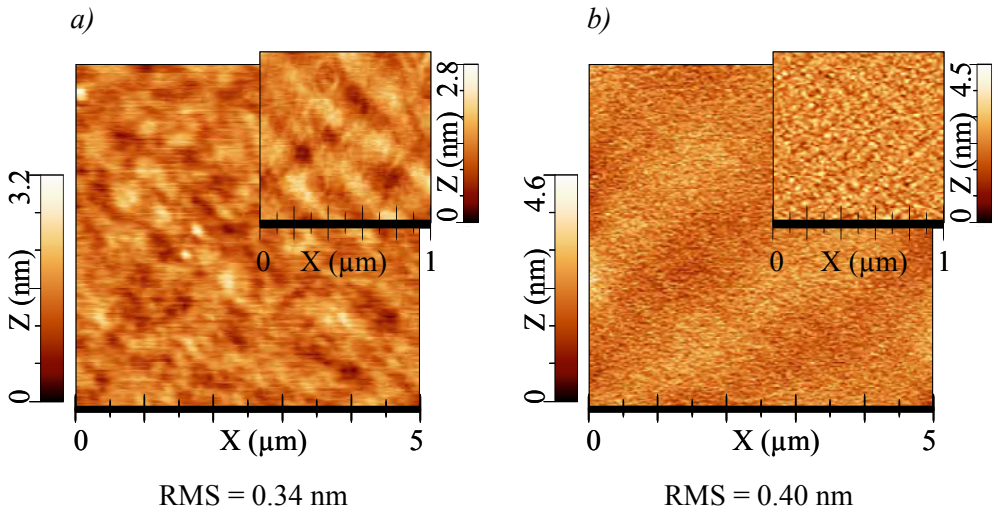


Figura VI.7. Topografía superficial de las membranas de a) PLGA y b) SiO_2/PLGA medidas a escalas de 5μm x 5 μm y 1 μm x 1 μm (imágenes superpuestas).

Como se pone de manifiesto en el capítulo anterior y en diversos trabajos,[45-47] la mojabilidad y la tensión superficial son parámetros que influyen notablemente en el desarrollo celular sobre un material. Por tanto, en este capítulo se determina el ángulo de contacto con agua de las dos muestras para relacionarlo con la adhesión de osteoblastos. El valor es muy similar para PLGA y SiO_2/PLGA (99.3 y 93.8 º respectivamente).

En cuanto a la degradabilidad de las membranas de PLGA en PBS, puede verse una clara degradación al cabo de 20 semanas (*Figura VI.8*), que se manifiesta en cambios de color (de incoloro a blanquecino), pérdida de integridad física, etc. No obstante, los primeros signos de degradación se observan a alrededor de una semana de inmersión, con la disminución del brillo y un ligero cambio de color, además de cierta pérdida de la forma original. El análisis de las muestras por FT-IR, AFM y XPS tras 72 h en PBS y secado suave al aire (datos no incluidos) demuestra que no se produce degradación química significativa de las muestras en este periodo de tiempo, por lo que la duración de los ensayos es igual o inferior a 72 h para evitar el posible efecto de la degradación en el crecimiento de los osteoblastos. Además, se comprueba que en medio de cultivo tampoco se produce degradación apreciable

mediante la observación diaria de las muestras. Adicionalmente, se comprueba la estabilidad de las membranas frente a la irradiación con luz UV empleada para los protocolos de esterilización previos a la siembra celular (imágenes no mostradas).

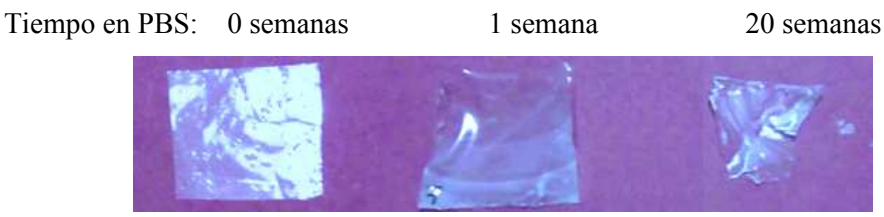


Figura VI.8. Degradación de PLGA en PBS incubado a 36.5 ºC.

4.2. Evaluación del crecimiento de osteoblastos sobres las superficies estudiadas.

Un análisis cualitativo de las imágenes de microscopía de contraste de fases de las membranas de PLGA reportadas en la *Figura VI.9* muestra células bien adheridas y propagadas homogéneamente sobre la superficie. En las primeras 24 h (*Figura VI.9.a*) se produce la emisión de lamelopodios, aunque a a las 48 h de cultivo (*Figura VI.9.b*) aún no se alcanza un agrupamiento de osteoblastos efectivo.

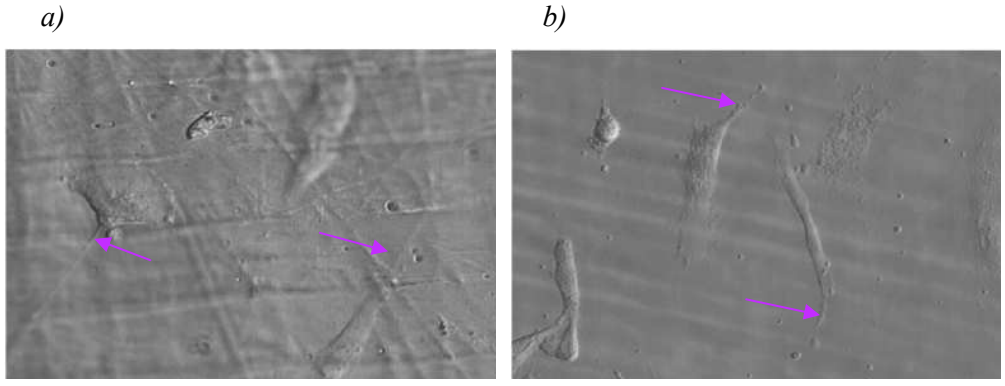


Figura VI.9. Micrografías de contraste de fases de osteoblastos crecidos durante a) 24 h y b) 48 h sobre PLGA. Las flechas indican filopodios/lamelopodios.

En las imágenes de inmunomarcaje registradas se observa que, tanto a las 48 h (*Figura VI.10*) como a las 72 h de cultivo (*Figura VI.11*), el citoesqueleto de actina de los osteoblastos está débilmente organizado y polarizado, con fibras de estrés poco numerosas orientadas aleatoriamente. Las células presentan un número limitado de sitios de adhesión, que se distribuyen aleatoriamente en la periferia celular y tiene lugar la emisión de algunos lamelopodios distribuidos sin una dirección preferente.

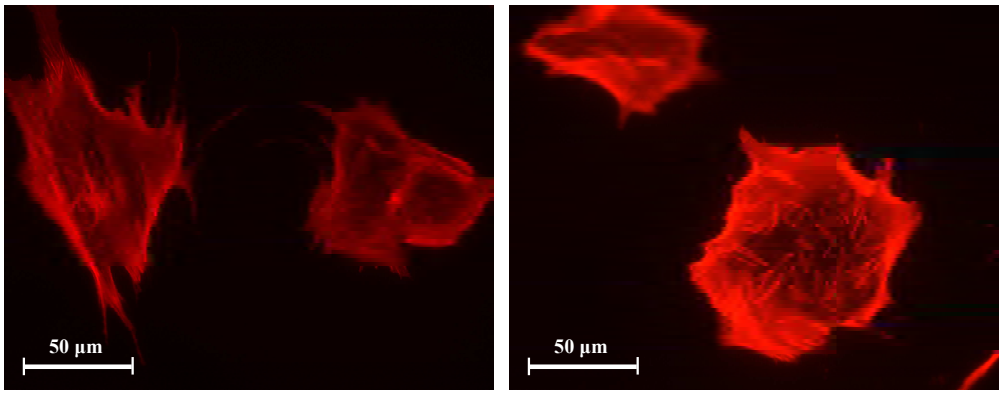


Figura VI.10. Imágenes de inmunomarcaje del citoesqueleto de actina obtenidas por microscopía confocal de osteoblastos crecidos durante 48 h sobre PLGA.

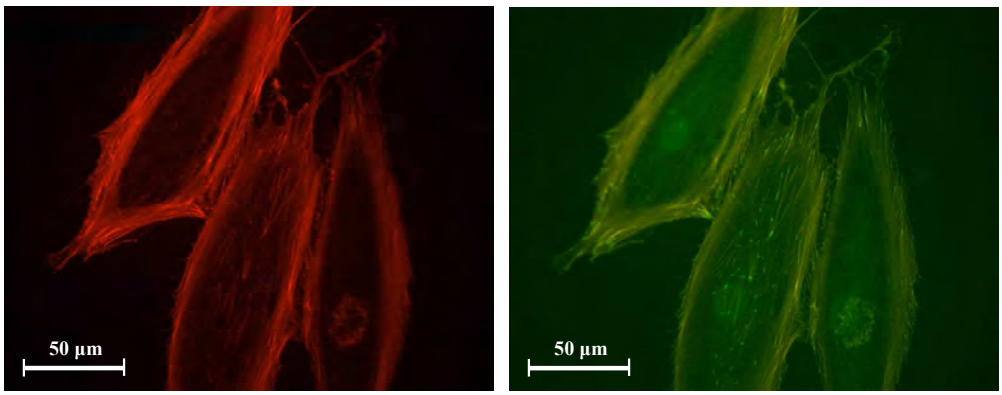


Figura VI.11. Imágenes de inmunomarcaje del citoesqueleto de actina (rojo) y de los sitios de adhesión (verde) obtenidas por microscopía confocal de osteoblastos crecidos durante 72 h sobre PLGA.

La observación de las imágenes de contraste de fases de la *Figura VI.12* revela que las membranas de SiO_2/PLGA promueven una propagación celular efectiva, con una clara elongación y mayor emisión de prolongaciones que en el caso anterior. A las 24 h (*Figura VI.12.a*) se intuye la formación de contactos celulares con la superficie de la membrana bien definidos (que aparecen como "granos" dentro de las células). Transcurridas 48 h (*Figura VI.12.b*), la aglomeración y elongación celular es evidente, dando lugar a un empaquetamiento en el cuál las células están fuertemente adheridas tanto a la superficie del material como a las células vecinas.

a) *b)*

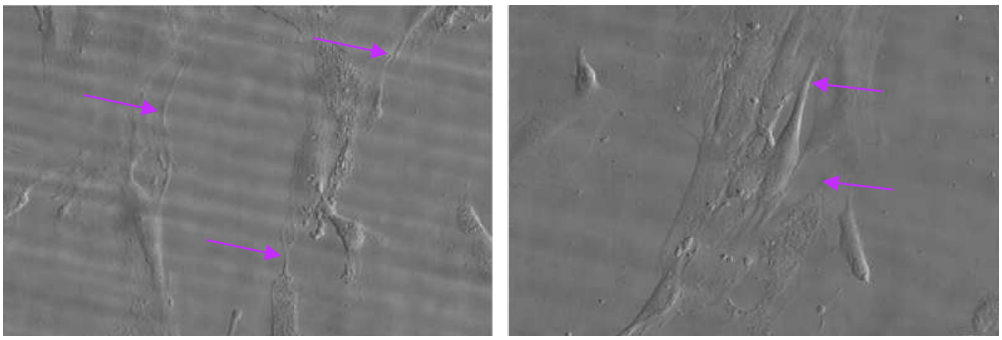


Figura VI.12. Micrografías de contraste de fases de osteoblastos crecidos durante a) 24 h y b) 48 h sobre SiO_2/PLGA. Las flechas indican filopodios/lamelopodios.

El inmunomarcaje celular de los osteoblastos crecidos sobre SiO_2/PLGA (*Figuras VI.13* y *VI.14*) revela la formación de numerosas fibras de estrés bien definidas, con una clara polarización del citoesqueleto de actina hacia los sitios positivos en vinculina, de lo que resulta una evidente orientación de los osteoblastos. Esta polarización se pone de manifiesto por la emisión de un gran número de lamelopodios que presentan adhesiones focales positivas en vinculina en el borde de avance, además de una red de actina altamente definida. La funcionalización propicia, además, un aumento en el número de contactos focales.

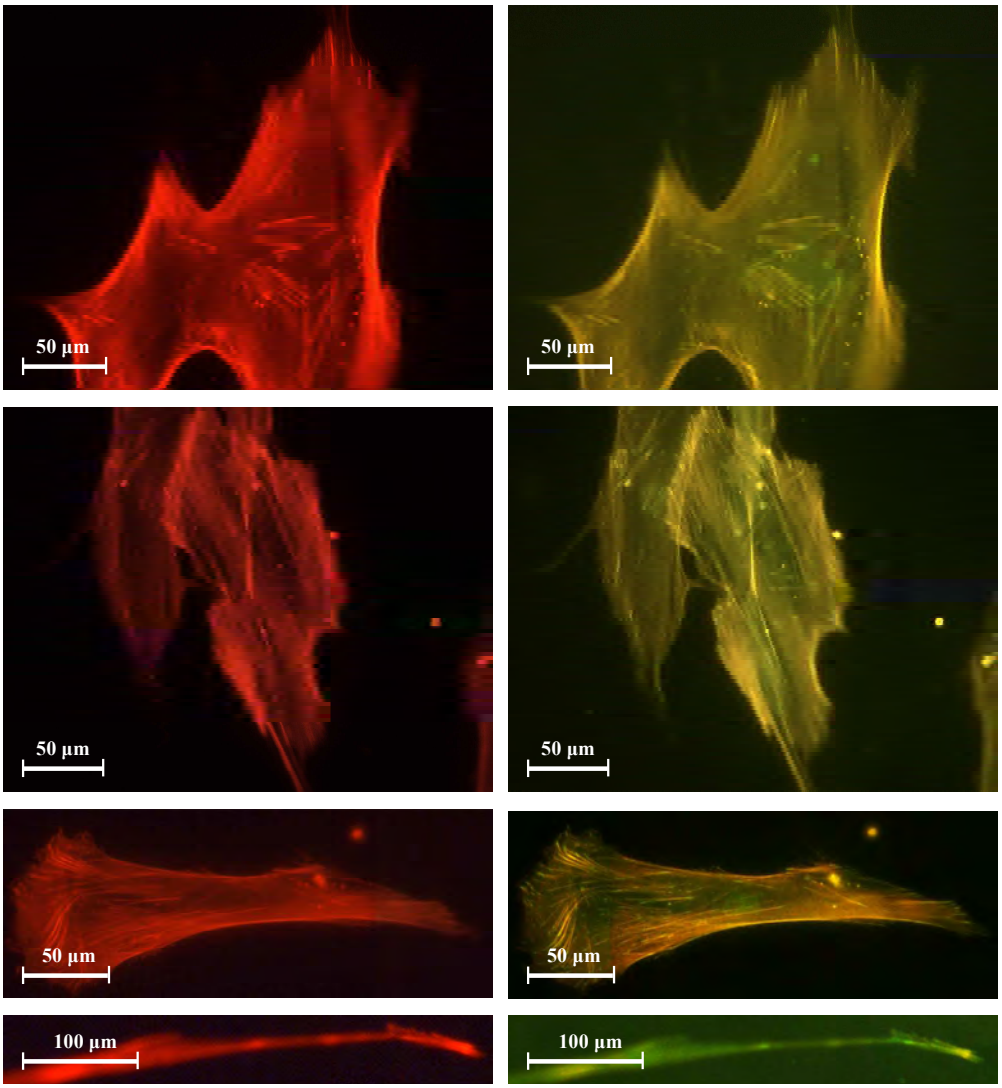


Figura VI.13. Imágenes de inmunomarcaje del citoesqueleto de actina (rojo) y de los sitios de adhesión (verde) obtenidas por microscopía confocal de osteoblastos crecidos durante 48 h sobre SiO_2/PLGA. Las imágenes anaranjadas resultan de la superposición de las imágenes roja y verde; las zonas anaranjadas se corresponden con zonas donde coincide el citoesqueleto de actina con los sitios positivos en vinculina.

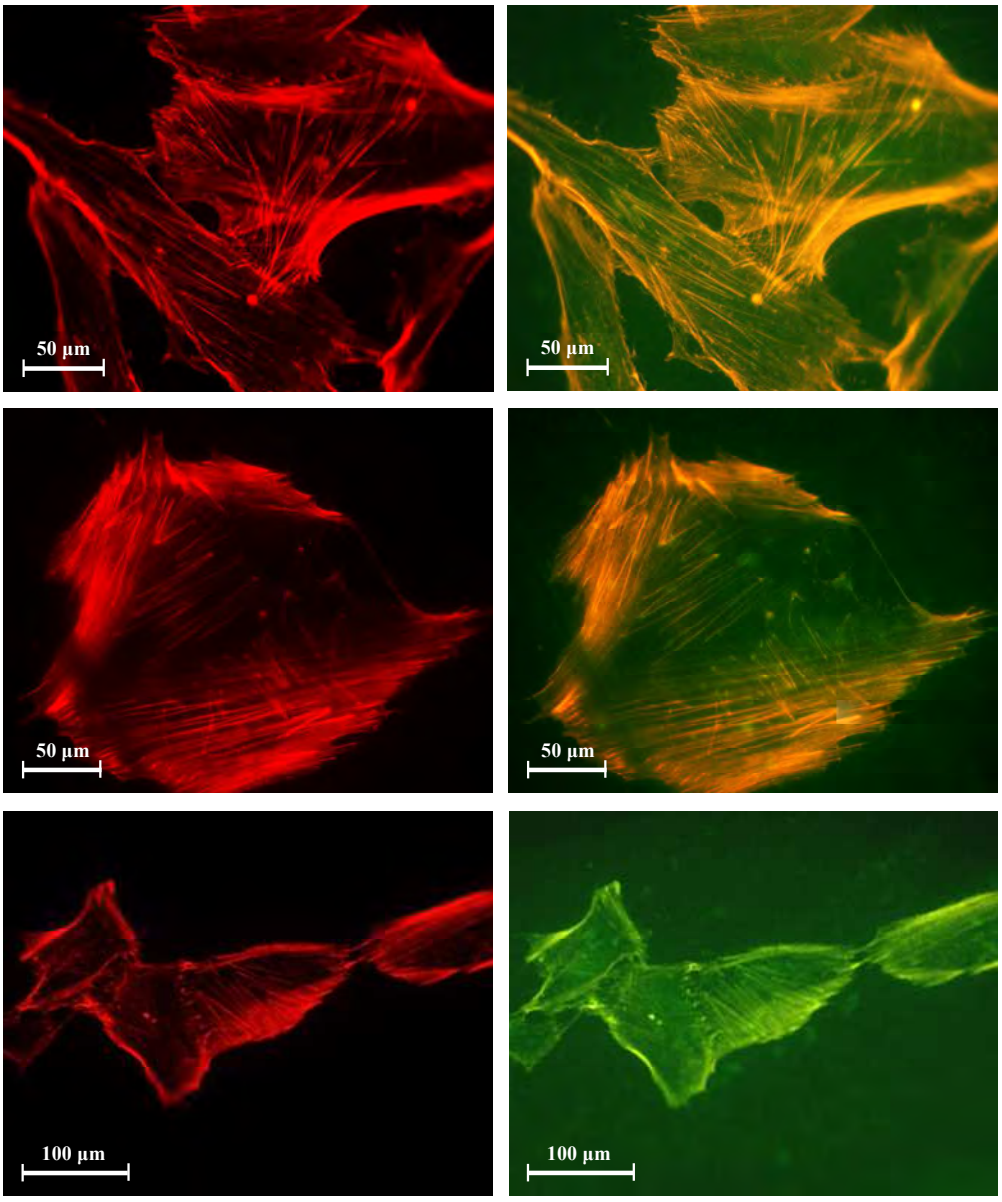


Figura VI.14. Imágenes de inmunomarcaje del citoesqueleto de actina (rojo) y de los sitios de adhesión (verde) obtenidas por microscopía confocal de osteoblastos crecidos durante 72 h sobre SiO_2/PLGA. Las imágenes anaranjadas resultan de la superposición de las imágenes roja y verde; las zonas anaranjadas se corresponden con zonas donde coincide el citoesqueleto de actina con los sitios positivos en vinculina.

Si se tienen en cuenta las propiedades superficiales de las muestras analizadas, puede concluirse que las diferencias detectadas en la adhesión de osteoblastos han de deberse a los cambios que produce la funcionalización en la química superficial y no a cambios en el ángulo de contacto o en la rugosidad, puesto que estas últimas propiedades no varían significativamente con la funcionalización superficial.

4.3. Análisis estadístico de los resultados.

Se lleva a cabo una valoración cuantitativa del desarrollo de los osteoblastos mediante el análisis estadístico del número de adhesiones focales. En la *Tabla VI.2* se incluyen el número de imágenes consideradas en el análisis (*N*), así como los principales parámetros estadísticos determinados para los cuatro grupos considerados (PLGA a 48h, SiO_2/PLGA a 48 h, PLGA a 72 h y SiO_2/PLGA a 72 h). El diagrama Box-Wisker (*Figura VI.15*) muestra que las membranas funcionalizadas desarrollan un mayor número de adhesiones focales en los dos intervalos de tiempo estudiados, por lo que la deposición favorece la adhesión celular a la superficie de PLGA. Además, puesto que con el tiempo los osteoblastos se encuentran menos adheridos a la superficie de PLGA y más a la de SiO_2/PLGA, las diferencias ocasionadas por la funcionalización se acentúan. De esto se deduce que existen dos factores experimentales a considerar: la funcionalización y el tiempo de siembra.

Tabla VI.2. Parámetros descriptivos del análisis estadístico del número de adhesiones focales.

Muestra	*N*	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	σ
1 PLGA 48 h	11	96	274	154.27	143	49.601
2 SiO_2/PLGA 48 h	11	159	311	230.73	229	46.866
3 PLGA 72 h	9	63	198	128.89	145	51.163
4 SiO_2/PLGA 72 h	10	194	340	250.50	241.5	46.049

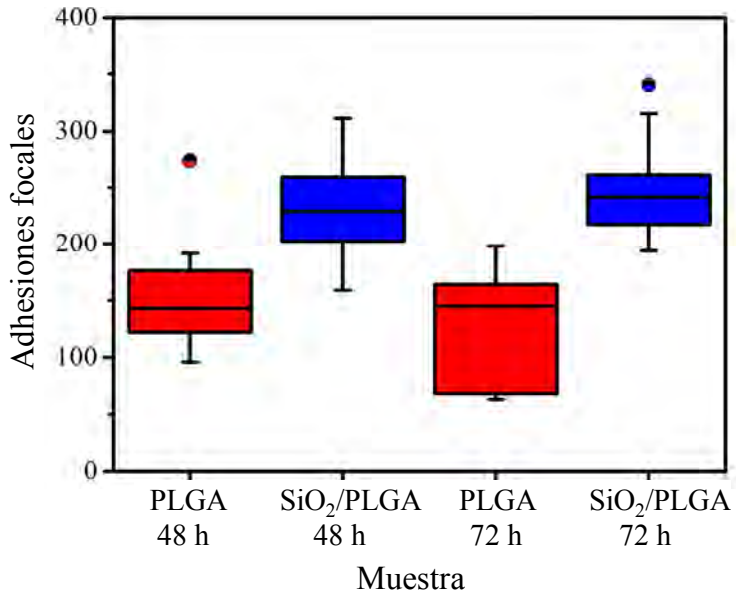


Figura VI.15. Gráfica Box-Wisker del número de adhesiones focales.

Con los datos obtenidos se realizan las diferentes pruebas estadísticas, cuyos resultados se recogen en la *Tabla VI.3*. En primer lugar, tras comprobar la idoneidad de los ensayos no paramétricos mediante la prueba de Levene (datos no incluidos), se aplica la prueba de Kruskal-Wallis para establecer si existen diferencias significativas entre los cuatro grupos de muestras. Dada la alta significancia del parámetro estadístico obtenido, puede concluirse que la deposición de SiO_2, el tiempo o ambos factores conjuntamente determinan el número de adhesiones focales establecidas entre la célula y el material. Se realiza un análisis ANOVA de doble vía para poder discernir el efecto de cada parámetro por separado y la interacción entre ambos. Con esto se deduce que la presencia de SiO_2 en la superficie mejora significativamente la respuesta celular, mientras que las variaciones observadas con el tiempo no producen cambios significativos. Por último, el análisis de *post-hoc* Scheffé indica que los grupos de PLGA, por una parte, y de SiO_2/PLGA por otra, pueden considerarse homogéneos y, además, diferentes entre sí. De estos datos se concluye que la funcionalización superficial favorece la formación de contactos focales, independientemente del tiempo transcurrido desde la siembra.

Tabla VI.3. Análisis estadístico de las variaciones en el número de adhesiones focales con los tests de Kruskal-Wallis, ANOVA de doble vía y post-hoc Scheffé.

Test	Parámetro	Valor de *p*	Significancia estadística
K-W	$H = 23.506$	< 0.05	Diferencias significativas
ANOVA de doble vía	SiO_2	< 0.05	Diferencias significativas
	Tiempo	0.929	Diferencias no significativas
Post-hoc Scheffé	SiO_2	0.819	Homogéneo
	Tiempo	0.873	Homogéneo

Una vez conocida la influencia de la deposición de SiO_2 y del tiempo de siembra en el número de adhesiones focales, se realiza un análisis de las variables morfométricas más importantes (véase *Tabla VI.1*) para establecer, de forma cuantitativa, el efecto de la funcionalización y del tiempo en el aspecto de las células. La evaluación conjunta de estas variables no permite establecer de forma clara la relación entre éstas y la presencia de SiO_2 y el tiempo (datos no incluidos), ya que al comparar el efecto de estos factores experimentales se observa el incremento de unas variables y la reducción de otras. Debido a esto y dada las relaciones existentes entre las diferentes variables, se procede a la unificación de las variables en diferentes índices que constituyan los factores significativos para relacionar los cambios observados en éstos con los factores "funcionalización con SiO_2" y "tiempo". La definición de estos índices permite analizar la relación entre los diferentes grupos de variables morfométricas y los factores experimentales. Para ello, se estudia la relación entre las diferentes variables, obteniéndose la matriz de correlación reportada en la *Tabla VI.4*, así como la matriz de factores de carga que permite relacionar los índices con las variables morfométricas originales (*Tabla VI.5*).

Tabla VI.4. Matriz de correlación entre las variables morfométricas. Los superíndices T, RS y E indican a qué índice se corresponde cada correlación (T: tamaño, RS: redondez sólida y E: elongación). Se considera que existe correlación para valores absolutos > 0.3.

Correlación	Área	Perímetro	Circularidad	Relación de aspecto	Redondez	Solidez
Área	1.000					
Perímetro	0.696^{T}	1.000				
Circularidad	-0.168	-0.706^{RS}	1.000			
Relación de aspecto	-0.091	0.211	-0.398^{E}	1.000		
Redondez	0.194	-0.097	0.408^{E}	-0.774^{E}	1.000	
Solidez	0.014	-0.597^{RS}	0.816^{RS}	-0.124	0.144	1.000

Tabla VI.5. Matriz de factores de carga, dados como la relación entre las variables originales y los factores experimentales. Se consideran sólo las correlaciones cuyo factor de carga presenta un valor absoluto > 0.3.

Correlación	Índice 1: Tamaño (T)	Índice 2: Redondez sólida (RS)	Índice 3: Elongación (E)
Área	0.912		
Perímetro	0.790	-0.591	
Circularidad		0.809	-0.353
Relación de aspecto			0.871
Redondez			-0.880
Solidez		1.000	

De estas tablas se deduce que pueden definirse tres índices. El primero, se relaciona positivamente con el área y el perímetro y es mayor para células mayores, por lo que puede interpretarse como el "Tamaño" (T). El segundo se relaciona positivamente con la circularidad y la solidez, y negativamente con el perímetro, por lo que este índice indica la "Redondez Sólida" (RS), presentando valores altos para células circulares y sin huecos y, por tanto, con perímetros bajos. El último índice se relaciona positivamente con la relación de aspecto y negativamente con la circularidad y la redondez, por lo que puede relacionarse con la "Elongación" de las células (E); valores altos de este índice corresponden a células muy alargadas.

Una vez establecidos los índices, las células pueden clasificarse según los valores de T, RS y E obtenidos para cada célula individual, y los resultados pueden analizarse mediante una prueba ANOVA de doble vía (*Tabla VI.6*). Los resultados obtenidos muestran que la deposición del óxido de silicio (IV) aumenta significativamente el valor de RS y disminuye el de E, sin diferencias significativamente estadísticas para el índice T. El tiempo de deposición disminuye de forma significativa el índice E, pero no modifica T ni RS. En cuanto a la interacción entre la presencia de SiO_2 y el tiempo, se observa que sólo aparecen diferencias significativas en el valor de T, presentando una disminución con el tiempo en las muestras de PLGA y un aumento en las de SiO_2/PLGA. Se puede concluir con esto que la funcionalización con SiO_2, independientemente del tiempo, genera células más redondeadas y con menos huecos; por otra parte, conforme aumenta el tiempo de crecimiento, las células se vuelven más redondeadas en ambos tipos de muestras y sufren un descenso en el tamaño en el polímero original, mientras que ocupan mayor superficie en las muestras sometidas al proceso de deposición del óxido.

Tabla VI.6. Análisis ANOVA de doble vía aplicado a los diferentes parámetros estadísticos definidos.

Factor	Índice	Valor de *p*	Intervalo de confianza (95 %)	Significancia estadística
SiO_2	*T*	> 0.05	-	Sin cambios significativos
	RS	< 0.05	(0.94, 1.71)	Aumento de la circularidad
	E	< 0.05	(-1.03, -0.11)	Disminución de la elongación
Tiempo	*T*	> 0.05	-	Sin cambios significativos
	RS	> 0.05	-	Sin cambios significativos
	E	< 0.05	(-1.06, -0.14)	Disminución de la elongación
Interacción SiO_2-Tiempo	*T*	< 0.05	PLGA: (-1.28, 0.65) SiO_2/PLGA: (0.32, 1.30)	Disminución del tamaño Aumento del tamaño
	RS	> 0.05	-	Sin cambios significativos
	E	> 0.05	-	Sin cambios significativos

5. Resumen y conclusiones.

En este capítulo se muestra la fabricación de una membrana reabsorbible de PLGA capaz de soportar los procesos de esterilización UV estándares. Se comprueba, además, la degradabilidad del PLGA en PBS a largo plazo (del orden de 20 semanas). Sin embargo, las membranas permanecen inalteradas tras 72 h de inmersión en PBS y medio de cultivo, por lo que para el análisis de crecimiento celular, llevado a cabo en este periodo de tiempo, puede considerarse que las membranas se conservan tal y como se preparan.

Debido a la pobre bioactividad del PLGA, se realiza la funcionalización de las membranas preparadas con dióxido de silicio mediante un proceso de PECVD con el fin de volver la superficie más activa. Por FT-IR se demuestra que la membrana mantiene su integridad tras la preparación del SiO_2. Con esto se prueba la idoneidad del proceso para la funcionalización de materiales altamente sensibles, en oposición a métodos en vía líquida o a altas temperaturas poco adecuados para este tipo de sustratos. La topografía superficial muestra que la funcionalización con dióxido de silicio prácticamente no altera la rugosidad inicial del PLGA y no se inducen daños superficiales, dato que apoya el uso de esta técnica de funcionalización.

Mediante la observación de las micrografías de contraste de fases y confocal de las células crecidas sobre las diferentes superficies tras el inmunomarcaje se concluye que la funcionalización con SiO_2 mejora notablemente el desarrollo de osteoblastos, tal y como prueban el mayor desarrollo y orientación del citoesqueleto observado, y la elevada emisión de filopodios y lamelopodios, así como los numerosos contactos focales y su distribución en toda la célula. Se conoce que la polimerización de actina y la orientación del citoesqueleto inducida por señales topográficas y químicas presentes en la superficie de crecimiento posibilitan la migración direccional y cambios morfológicos. En el presente capítulo, este fenómeno se pone de manifiesto con la reorganización espacio-dependiente del citoesqueleto y la formación de adhesiones focales promovidos por la lámina de SiO_2. Se observan una morfología notablemente distinta dependiendo del sustrato. La modificación de la química superficial es la causa del aumento de bioactividad que se produce entre PLGA y SiO_2/PLGA, mientras que las pequeñas variaciones en la mojabilidad y la rugosidad superficiales no influye de manera significativa.

Los análisis estadísticos realizados para el número de adhesiones focales prueban cuantitativamente el poder de osteoconducción de la capa de SiO_2 preparada. La observación de las características morfométricas, que dan idea de la eficacia del proceso de migración, propagación y diferenciación celular, apoyan esta evidencia experimental.

En resumen, tanto los cambios morfológicos observados como el mayor desarrollo de adhesiones focales en las membranas de SiO_2/PLGA demuestran una

mejora de la bioactividad comparada con las membranas de PLGA. Esta mejora es el resultado de la combinación de las señales de la nanotopografía celular con la incorporación de factores bioactivos proporcionados por los cambios superficiales.

Como conclusión final, puede afirmarse que la presencia de sílice tiene un efecto beneficioso en el desarrollo de osteoblastos y que, además, las membranas reabsorbibles de SiO_2/PLGA pueden ser buenas candidatas para aplicaciones quirúrgicas.

6. Referencias.

[1] E. Dimitriou, G. I. Mataliotakis, G. M. Calori, P. V. Giannoudis. "The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence". BMC Medicine, 10:81 (2012).

[2] V. Gribova, R. Auzely-Velty, C. Picart. "Polyelectrolyte multilayer assemblies on materials surfaces: from cell adhesion to tissue engineering". Chemstry of Materirals, 24:854-869 (2012).

[3] T. I. Croll, A. J. O'Connor, G. W. Stevens, J. J. "Cooper-white controllable surface modification of poly(lactic-*co*-glycolic acid) (PLGA) by hydrolysis or aminolysis I: physical, chemical, and theoretical aspects". Biomacromolecules, 5:463-473 (2004).

[4] C. W. Patrick. "Adipose tissue engineering: the future of breast andsoft tissue reconstruction following tumor resection". Seminars in Surgical Oncology, 19:302-311 (2000).

[5] Y. Cao, T. I. Croll, J. J. Cooper-White, A. J. O'Connor, G. W. Stevens. "Production and Surface Modification of Polylactide-based Polymeric Scaffolds for Soft Tissue Engineering". In: A. P. Hollander, P. V. Hatton, editors, "Biopolymer Methods in Tissue Engineering". Humana Press, Totowa, New Jersey (2003).

[6] Y. Cao, M. R. Davidson, J. J. Cooper-White, A. J. O'Connor, G. W. Stevens. "Architecture control of three-dimensional poly(D,Llactic-co-glycolic acid) scaffolds for soft tissue engineering I. Establishment and validation of numerical models". Journal of Biomedical Materials Research Part A, 71:81-89 (2004).

[7] M. Vandrovcova, L. Bacakova. "Adhesion, growth and differentiation of osteoblasts on surface-modified materials developed for bone implants". Physiological Research, 60:403-417 (2011).

[8] N. Takeuchi, M. Machigashira, D. Yamashita, Y. Shirakata, T. Kasuga, K. Noguchi, S. Ban. "Cellular compatibility of a gamma-irradiated modified siloxane-poly(lactic acid)-calcium carbonate hybrid membrane for guided bone regeneration". Dental Materials Journal, 30:730-738 (2011).

[9] H. Shearer, M. J. Ellis, S. P. Perera, J. B. Chaudhuri. "Effects of common sterilization methods on the structure and properties of poly(D,L lactic-*co*-glycolic acid) acaffolds". Tissue Engineering, 12:2717-2727 (2006).

[10] R. A. Quirk, M. C. Davies, S. J. B. Tendler, K. M. Shakesheff. "Surface engineering of poly(lactic acid) by entrapment of modifying species". Macromolecules, 33:258-260 (2000).

[11] R. A. Quirk, W. C. Chan, M. C. Davies, S. J. B. Tendler, K. M. Shakesheff. "Poly(L-lysine)-GRGDS as a biomimetic surface modifier for poly(lactic acid)". Biomaterials, 22:865-872 (2001).

[12] G. Khang, S. J. Lee, J. H. Jeon, J. H. Lee, H. B. Lee. "Interaction of fibroblast cell onto physicochemically treated PLGA surfaces". Polymer: Korea, 24:869-876 (2000).

[13] K. Y. Cai, K. D. Yao, Y. L. Cui, Z. M. Yang, X. Q. Li, H. Q. Xie, T. W. Qing, L. B. Gao. "Influence of different surface modification treatments on poly(D,L-lactic acid) with silk fibroin and their effects on the culture of osteoblast in vitro". Biomaterials, 23:1603-1611 (2002).

[14] J. Yang, G. Shi, J. Bei, S. Wang, Y. Cao, Q. Shang, G. Yang, W. Wang. "Fabrication and surface modification of macroporous poly-(L-lactic acid) and poly(L-lactic-*co*-glycolic acid) (70/30) cell scaffolds for human skin fibroblast cell culture". Journal of Biomedical Materials Research, 62:438-446 (2002).

[15] X. Wang, H. C. Schröder, M. Wiens, H. Ushijima, W. E. G. Müller. "Bio-silica and bio-polyphosphate: applications in biomedicine (bone formation)". Current Opinion in Biotechnology, 23:1-9 (2012).

[16] M. Vallet-Regi. "Revisiting ceramics for medical applications". Dalton Transactions, 28:5211-5220 (2006).

[17] F. Intranuovo, P. Favia, E. Sardella, C. Ingrosso, M. Nardulli, R. d'Agostino, R. Gristina. "Osteoblast-like cell behavior on plasma deposited micro/nanopatterned coatings". Biomacromolecules, 12:380-387 (2011).

[18] C. K. Choi, M. T. Breckenridge, C. S. Chen. "Engineered materials and the cellular microenvironment: a strengthening interface between cell biology and bioengineering". Trends in Cell Biology, 20:705-714 (2010).

[19] V. Puddu, C. C. Perry. "Peptide adsorption on silica nanoparticles: evidence of hydrophobic interactions". ACS Nano, 6:6356-6363 (2012).

[20] J. H. Song, H. E. Kim, H. W. Kim. "Collagen-apatite nanocomposite membranes for guided bone regeneration". Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Materials, 83:248-257 (2007).

[21] X. Wang, H. C. Schröder, M. Wiens, H. Ushijima, W. E. G. Müller. "Bio-silica and bio-polyphosphate: applications in biomedicine (bone formation)". Current Opinion in Biotechnology, 23:570-578 (2012).

[22] C. Witt, T. Kissel. "Morphological characterization of microspheres, flms and implants prepared from poly(lactide-*co*-glycolide) and ABA triblock copolymers: is the erosion controlled by degradation, swelling or diffusion?". European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 51:171-181 (2001).

[23] H. Shen, X. Hu, J. Bei, S. Wang. "The immobilization of basic fibroblast growth factor on plasma-treated poly(lactide-*co*-glycolide)". Biomaterials, 29:2388-2399 (2008).

[24] Y. Wan, X. Qu, J. Lu, C. Zhu, L. Wan, J. Yang, J. Bei, S. Wang. "Characterization of surface property of poly(lactide-*co*-glycolide) after oxygen plasma treatment". Biomaterials, 25:4777-4783 (2004).

[25] A. Barranco, J. Cotrino, F. Yubero, J. P. Espinós, J. Benítez, C. Clerc, A. R. González-Elipe. "Synthesis of SiO_2 and $SiO_xC_yH_z$ thin films by microwave plasma CVD". Thin Solid Films, 401:150-158 (2001).

[26] A. C. M. Grayson, M. J. Cima, R. Langer. "Size and temperature effects on poly(lactic co-glycolic acid) degradation and microreservoir device performance". Biomaterials, 26:2137-2145 (2005).

[27] H. Tsuji, Y. Tezuka, K. Yamada. "Alkaline and enzymatic degradation of L-lactide copolymers. II. Crystallized films of poly(L-lactide-*co*-D-lactide) and poly(L-lactide) with similar crystallinities". Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, 43:1064-1075 (2005).

[28] C. E. Holy, S. M. Dang, J. E. Davies, M. S. Shoichet. "In vitro degradation of a novel poly(lactide-*co*-glycolide) 75/25 foam". Biomaterials, 20:1177-1185 (1999).

[29] H. Kranz, N. Ubrich, P. Maincent, R. Bodmeier. "Physicomechanical properties of biodegradable poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-*co*-glycolide) films in the dry and wet states". Journal of Pharmaceutical Sciences, 89:1558-1566 (2000).

[30] J. Gao, L. Niklason, R. Langer. "Surface hydrolysis of poly(glycolic acid) meshes increases the seeding density of vascular smooth muscle cells". Journal of Biomedical Materials Research, 42:417-424 (1998).

[31] M. Källrot, U. Edlund, A. C. Albertsson. "Surface functionalization of degradable polymers by covalent grafting". Biomaterials, 27:1788-1796 (2006).

[32] S. C. J. Loo, C. P. Ooi, Y. C. F. Boey. "Degradation of poly(lactide-coglycolide) (PLGA) and poly(L-lactide) (PLLA) by electron beam radiation. Biomaterials, 26:1359-1367 (2005).

[33] M. C. López Santos. "Plasmas de nitrógeno y funcionalización superficial de materiales poliméricos y recubrimientos tipo diamante con aplicaciones biomédicas". Trabajo de Grado, Universidad de Sevilla (2009).

[34] D. A. Shah, L. V. Madden. "Nonparametric analysis of ordinal data in designed factorial experiments". Phytopathology, 94:33-43 (2004).

[35] L. Bacáková, E. Filová, F. Rypácek, V. Švorcík, V. Starý. "Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering". Physiological Research, 53 (Suppl. 1):S35-S45 (2004).

[36] M. J. Biggs, R. G. Richards, N. Gadegaard, R. J. McMurray, S. Affrossman, C. D. Wilkinson, R. O. Oreffo, M. J. Dalby. "Interactions with nanoscale topography: adhesion quantification and signal transduction in cells of osteogenic and multipotent lineage". Journal of Biomedical Materials Research Part A, 91:195-208 (2009).

[37] M. J. Biggs, R. G. Richards, M. J. Dalby. "Nanotopographical modification: a regulator of cellular function through focal adhesions". Nanomedicine, 6:619-33 (2010).

[38] L. E. McNamara, T. Sjöström, K. E. V. Burgess, J. J. W. Kim, E. Liu, S. Gordonov, P. V. Moghe, R. M. Meek, R. O. Oreffo, B. Su, M. J. Dalby. "Skeletal stem cell physiology on functionally distinct titania nanotopographies". Biomaterials, 32:7403-7410 (2011).

[39] C. J. Bettinger, R. Langer, J. T. Borenstein. "Engineering substrate topography at the micro- and nanoscale to control cell function". Angewandte Chemie: International Edition in English, 48:5406-5415 (2009).

[40] T. L. Barr. "An XPS study of Si as it occurs in adsorbents, catalysts, and thin films". Applied Surface Science, 15:1-35 (1983).

[41] J. Finster, D. Schulze, F. Bechstedt, A. Meisel. "Interpretation of XPS core level shifts and structure of thin silicon oxide layers". Surface Science, 152/153:1063-1070 (1985).

[42] M. M. Stevanovic, B. Jordovic, D. P. Uskokovic. "Preparation and characterization of poly(D,L-lactide-*co*-glycolide) nanoparticles containing ascorbic acid". Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2007:84965 (2007).

[43] Z. Y. Wang, Y. M. Zhao, F. Wang, J. Wang. "Syntheses of poly(lactic acid-*co*-glycolic acid) serial biodegradable polymer materials via direct melt polycondensation and their characterization". Journal of Applied Polymer Science, 99:244-252 (2006).

[44] A. Barranco, F. Yubero, J. Cotrino, J. P. Espinós, J. Benítez, T. C. Rojas, J. Allain, T. Girardeau, J. P. Riviere, A. R. González-Elipe. "Low temperature synthesis of dense SiO_2 thin films by ion beam induced chemical vapor deposition". Thin Solid Films, 396:9-15 (2001).

[45] A. Terriza, A. Díaz-Cuenca, F. Yubero, A. Barranco, A. R. González-Elipe, J. L. González Caballero, J. Vilches, M. Salido. "Light induced hydrophilicity and osteoblast adhesion promotion on amorphous TiO_2". Journal of Biomedical Materials Research Part A, 101A:1026-1035 (2013).

[46] W. Att, N. Hori, F. Iwasa, M. Yamada, T. Ueno, T. Ogawa. "The effect of UV-photofunctionalization on the time-related bioactivity of titanium and chromium-cobalt alloys". Biomaterials, 30:4268-4276 (2009).

[47] H. Aita, N. Hori, M. Takeuchi, T. Suzuki, M. Yamada, M. Anpo, T. Ogawa. "The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone". Biomaterials, 30:1015-1025 (2009).

Capítulo VII.
Conclusiones generales

A partir del trabajo de investigación expuesto en esta memoria de tesis doctoral pueden extraerse conclusiones acerca de las propiedades de diferentes compuestos fluorocarbonados (incluyendo la influencia de las condiciones de plasma en las mismas y su aplicación como recubrimientos antibacterianos) y de la capacidad de osteoconducción de los óxidos de titanio y silicio. Estas conclusiones se resumen a continuación.

1. Fabricación y propiedades de películas delgadas fluorocarbonadas preparadas mediante PECVD.

La composición y estructura de enlace de los recubrimientos fluorocarbonados preparados mediante PECVD en un reactor de RF capacitivo puede controlarse a partir de la composición de gases introducidos en la descarga del plasma y el potencial de autopolarización. A 200V, con mezclas de acetileno, hidrógeno y argón, se obtiene DLC con una estructura tridimensional sp^3/sp^2 formada por carbono e hidrógeno (este último detectable en la descarga de plasma). Esta estructura de enlace no se modifica significativamente al introducir *c*-C_4F_8 en el reactor, obteniéndose recubrimientos de DLC-F donde los átomos de flúor sustituyen a átomos de hidrógeno. En estas condiciones se produce poca fragmentación del precursor fluorado por competencia de éste con C_2H_2/H_2, lo que conlleva la aparición de una alta proporción de fragmentos de tipo C_xF_y ($x \geq 2$) y C_2H_x responsables de la alta velocidad de crecimiento de este compuesto comparada con las de DLC y CF_X. En ausencia de C_2H_2 y H_2, se produce una capa de CF_X de tipo teflón con un alto contenido en flúor y prácticamente carente de hidrógeno, cuya estructura de enlaces está formada por pequeñas cadenas poliméricas, unidas fundamentalmente por enlaces sp^3 con una elevada proporción de grupos fluorados de tipo $–CF_2$ y $–CF_3$ producidos por la alta fragmentación del *c*-C_4F_8 en el plasma. La densidad de especies y la energía del plasma aumenta con la cantidad de flúor.

Al disminuir el potencial a 100V se produce una menor fragmentación de los gases del plasma que conduce a un descenso en la densidad de especies, además de

una reducción de la potencia y un aumento de la temperatura electrónica. Estas características conducen a la generación de materiales más poliméricos y, probablemente, de menor dureza.

La rugosidad de los diferentes recubrimientos depositados sobre silicio varía ligeramente en el orden DLC < DLC-F < CF_X por efecto de *etching* del flúor y aumenta levemente en todos los casos con el tiempo de deposición. El análisis de estas superficies muestra que para lograr un aumento importante en el ángulo de contacto se requiere la alta concentración de grupos $–CF_2$ y $–CF_3$ presente en CF_X.

Se demuestra que pueden obtenerse muestras con rugosidades elevadas por tratamientos de desbastado con plasma aplicados a polímeros previamente a la deposición de los recubrimientos. Con éstas, se comprueba que el ángulo de contacto aumenta con la rugosidad superficial, pudiéndose obtener superficie superhidrofóbicas (con alto ángulo de contacto y baja adhesión) depositando recubrimientos poliméricos de CF_X sobre sustratos de alta rugosidad.

Por otro lado, se comprueba que los modelos comúnmente usados para describir el efecto de la rugosidad en la mojabilidad (esto es, los modelos de Wenzel y de Cassie-Baxter) no describen adecuadamente la mojabilidad de las superficies analizadas. Sólo se obtienen datos coherentes en el caso de las muestras de CF_X cuando se aplica el modelo de Wenzel, utilizando el ángulo de contacto de avance.

Adicionalmente, se observa que la determinación del valor de RMS tanto de polímeros sin recubrir como de muestras flurocarbonadas es independiente de la resolución de medida de AFM. Sin embargo, depende enormemente de la escala de observación, especialmente en superficies de rugosidad elevada, por lo que se debe elegir una escala de medida suficientemente elevada (de 5 μm x 5 μm e incluso de 10 μm x 10 μm) para sobrepasar la longitud umbral.

Finalmente, se observa que la capacidad de CF_4 para formar recubrimientos es más limitada que la de *c*-C_4F_8 por efecto de desbastado de las especies CF, CF_2 y CF_3 y la ausencia de especies de tipo C_xF_y y C_2H_y en el plasma.

2. Recubrimientos fluorocarbonados antibacterianos para implantes de cadera.

La adherencia bacteriana de *S. aureus* y *S. epidermidis* sobre UHMWPE puede reducirse notoriamente con la deposición de recubrimientos fluorocarbonados. En conjunto, la superficie menos adherente es DLC/UHMWPE (cuya adherencia parece ser especie-independiente), seguida de DLC-F/UHMWPE y CF_X/UHMWPE. Si se distingue entre las dos especies bacterianas, en general *S. aureus* es más adherente que *S. epidermidis*. La mayor adherencia se encuentra en *S. epidermidis* con DLC-F/UHMWPE; esta muestra, sin embargo, presenta el resultado más favorable fernte a *S. aureus*.

La menor adherencia observada en DLC/UHMWPE se relaciona con una elevada tensión total y su componente dispersiva, además de una rugosidad relativamente baja. El aumento de rugosidad observado en DLC-F/UHMWPE así como la disminución de la tensión superficial total pueden explicar por qué esta muestra se comporta menos adecuadamente que la anterior. Finalmente, la elevada rugosidad de la muestra de CF_X/UHMWPE y su baja tensión superficial proporcionan un comportamiento altamente adherente, a pesar de la alta hidrofobicidad que presenta.

3. Adhesión de osteoblastos sobre membranas polimérico-inorgánicas.

En primer lugar, se estudia la adhesión de osteoblastos sobre membranas no reabsorbibles de PET y TiO_2/PET. Los trabajos aquí expuestos muestran que la adhesión de osteoblastos sobre PET es reducida, y no se ve favorecida con la fotoactivación del polímero con luz UV. La funcionalización del polímero con una lámina delgada de TiO_2 amorfo no constituye una mejora apreciable; sin embargo, si la muestra TiO_2/PET se irradia con luz UV se produce un desarrollo de osteoblastos muy superior a los casos anteriores. Esto se pone de manifiesto por cambios fenotípicos celulares y se cuantifica mediante un análisis estadístico del número de adhesiones focales constituidas entre la célula y la superficie.

Esta mejora puede atribuirse a la transformación de la superficie en superhidrofílica por la acción de la radiación UV sobre el TiO_2. La baja actividad fotocatalítica de este compuesto hace que se descarte la eliminación fotocatalítica de restos carbonosos superficiales como el origen del aumento en la adhesión celular.

En segundo lugar, se lleva a cabo un estudio análogo con membranas reabsorbibles de PLGA y SiO_2/PLGA. La adhesión se evalúa de forma cualitativa mediante la observación de las características fenotípicas de los osteoblastos y se cuantifica mediante un análisis de las adhesiones focales, así como de diversos índices definidos tras un estudio de correlación de propiedades morfométricas.

La funcionalización con SiO_2 mejora considerablemente el desarrollo de osteoblastos sobre la superficie de PLGA, con la formación de un esqueleto de actina bien desarrollado y orientado y un alto número de contactos focales distribuidos por toda la célula. Por otra parte, el análisis de los índices morfométricos muestra que la migración, propagación y diferenciación de los osteoblastos parecen ser más efectiva en la muestra funcionalizada.

Finalmente, la capacidad de degradación de PLGA en el organismo (estimada mediante ensayos en PBS) junto con el alto poder de osteoconducción que presenta el óxido de silicio hace que las membranas de SiO_2/PLGA puedan ser adecuadas para su uso como membranas de regeneración ósea.

4. Publicaciones relacionadas con esta tesis.

- "Bacterial adherence on fluorinated carbon based coatings deposited on polyethylene surfaces". A. Terriza, G. del Prado, A. Ortiz Pérez, M. J. Martínez, J. A. Puértolas, D. Molina Manso, A. R. González-Elipe, F. Yubero, E. Gómez-Barrena, J. Esteban. Journal of Physics: Conference Series, 252:012013 (2010).

- "Comments on «An essay on contact angle measurements»: Determination of surface roughness and modeling of the wetting behavior". A. Terriza, R. Álvarez, F. Yubero, A. Borrás, A. R. González-Elipe. Plasma Processes and Polymers, 8:998–1002 (2011).
- "Roughness assessment and wetting behavior of fluorocarbon surfaces". A. Terriza, R. Álvarez, A. Borrás, J. Cotrino, F. Yubero, A. R. González-Elipe. Journal of Colloid and Interface Science, 376:274–282 (2012).
- "DLC coatings for UHMWPE: Relationship between bacterial adherence and surface properties". G. Del Prado, A. Terriza, A. Ortiz-Pérez, D. Molina-Manso, I. Mahillo, F. Yubero, J. A. Puértolas, M. Manrubia-Cobo, E. Gómez-Barrena, J. Esteban. Journal of Biomedical Materials Research A, 100A:2813–282 (2012).
- "Light induced hydrophilicity and osteoblast adhesion promotion on amorphous TiO_2". A. Terriza, A. Díaz-Cuenca, F. Yubero, A. Barranco, A. R. González-Elipe, J. L. González Caballero, J. Vilches, M. Salido. Journal of Biomedical Materials Research: Part A, 101A:1026-1035 (2013).

5. Otras publicaciones.

- "Bacterial adherence on UHMWPE with vitamin E: an in vitro study". E. Gómez-Barrena, J. Esteban, D. Molina-Manso, H. Adames, M. J. Martínez-Morlanes, A. Terriza, F. Yubero, J. A. Puértolas. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 22:1701–1706 (2011).
- "Characterization of highly crosslinked polyethylenes by colorimetry". M. J. Martínez-Morlanes, A. Terriza, F. Yubero, J. A. Puértolas. Polymer Testing, 31:841–847 (2012).
- "Quantification of low levels of fluorine content in thin films". F. J. Ferrer, J. Gil-Rostra, A. Terriza, G. Rey, C. Jiménez, J. García-López, F. Yubero. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 274:65–69 (2012)

- "Low refractive index SiOF thin films prepared by reactive magnetron sputtering". F. J. García-García, J. Gil-Rostra, A. Terriza, J. C. González, J. Cotrino, F. Frutos, F. J. Ferrer, A. R. González-Elipe, F. Yubero. Thin Solid Films, 542:332–337 (2013).

6. Artículos pendientes de publicación.

- "*c*-C_4F_8 plasmas for the deposition of fluorinated carbon films". A. Terriza, M. Macías-Montero, J. Cotrino, A. R. González-Elipe.
- "Staphylococcal biofilm formation on diamond-like-carbon coated uhmwpes: A first approach". G. del Prado, J. Pascual, A. Terriza, D. Molina-Manso, F. Yubero, J. A. Puértolas, E. Gómez-Barrena, J. Esteban.
- "Osteoblasts behavior on PLGA membranes functionalized with nanometric silica thin films". A. Terriza, A. Díaz-Cuenca, F. Yubero, A. Barranco, A. R. González-Elipe, J. L. González Caballero, J. Vilches, M. Salido.
- "Osteoblasts behavior on PLGA membranes functionalized with nanolayers of TiO_2". A. Terriza, A. Díaz-Cuenca, F. Yubero, A. Barranco, A. R. González-Elipe, J. L. González Caballero, J. Vilches, M. Salido.

Anexo I.
Técnicas de caracterización

La caracterización de las diferentes muestras preparadas a lo largo de esta tesis se realiza con diversas técnicas experimentales, que se encuentran descritas brevemente a continuación.

1. Técnicas de caracterización química.

- **Espectroscopía de fotoemisión de rayos X (XPS).**

Permite conocer la composición atómica y el estado químico de las especies presentes en las capas atómicas más externas de la superficie (1-3 nanómetros de profundidad), a excepción del hidrógeno y el helio. Los porcentajes atómicos de cada uno de los elemento presentes en la superficie se deteminan a partir del área de los picos principales de fotoemisión (C 1s, O 1s, F 1s, Ti 2p y Si 2p) tras la sustracción de un fondo de tipo Shirley, realizando una corrección teniendo en cuenta los valores de la sección eficaz de fotoexcitación proporcionados por Wagner de cada elemento.[1] Los porcentajes mostrados en todos los casos son relativos, ya que no se tienen en cuenta la cantidad de hidrógeno/helio presente.

Los espectros reportados en la presente memoria se recogen con un analizador de electrones PHOIBOS100-5MCD de SPECS trabajando con una energía de paso constante fijada en 20 eV. Como fuente de excitación se emplea la radiación Mg K_α. Los espectros se calibran con respecto a la componente principal del pico C 1s, a la que se asigna el valor de energía de ligadura (binding energy, BE) de 284.6 eV.

- ***Espectroscopía Raman.***

Da información acerca de la estructura de enlace del material. Los espectros Raman se miden con un espectrofotómetro Olimpos BX41 Horiba Jobin Yvon, HR 800 UV utilizando luz verde. Para la caracterización, se emplean muestras preparadas sobre silicio dopado.

- ***Espectroscopía de infrarrojos (FT-IR).***

Es una técnica complementaria a la anterior, que permite conocer la estructura de enlace del material. Los espectros se registran en modo transmisión con un aparato JASCO FT/IR 6200. Se utilizan muestras de referencia depositadas sobre silicio intrínseco.

2. Técnicas de caracterización de plasma.

- ***Espectroscopía de emisión óptica (OES).***

Mediante el análisis de la luz emitida por el plasma pueden detectarse las especies presentes en el mismo, ya que se observan las transiciones características de diferentes grupos químicos. Para ello se utiliza un espectroscopio de emisión óptica que consta de un monocromador (de CVI o de Avantes, según los casos) y su electrónica correspondiente.

- ***Espectrometría de masas.***

Utilizando un espectrómetro de masas pueden detectarse las especies presentes en el plasma, caracterizadas por su relación masa/carga, y conocer su concentración relativa. Para ello, se aplica un potencial de aceleración de las especies químicas para que lleguen al detector. Según el signo del potencial aplicado para acelerar las partículas para que lleguen al detector de masas, pueden colectarse especies neutras o iónicas. En este trabajo se emplea un analizador cuadrupolar electrostático EQP de Hiden Analytical Ltd.

- ***Análisis mediante la sonda de Langmuir .***

Esta técnica posibilita la determinación de propiedades como la densidad electrónica, la densidad iónica y la temperatura electrónica del plasma, basándose en el análisis de las curvas de corriente extraída del plasma en función de la tensión de polarización aplicada en la sonda (curvas IV).[2] La curva IV se relaciona con el

promedio espacio-temporal de la función de distribución de energía electrónica del plasma (FDEE) a través de su segunda derivada, de la cuál se puede extraer la densidad electrónica y la energía media de los electrones. Para ello suele emplearse el método maxweliano cuando se considera que las especies están en equilibrio térmico. La fórmula empleada para este método es la siguiente:

$$f_M(\varepsilon) = \frac{n_e}{2(\pi k_B T_e)^{3/2}} \varepsilon^{1/2} e^{-\frac{\varepsilon}{k_B T_e}} \qquad (AI.I)$$

Por otro lado, frecuentemente se emplea el modelo de Druyvesteyn,[3] cuya fórmula se muestra a continuación, para poner de manifiesto condiciones fuera del equilibrio termodinámico en el plasma. La sonda empleada en este caso es una sonda de Langmuir L2P comercial suministrada por Industrial Sensing Systems GmbH.

$$f_D(\varepsilon) = 0.2642\sqrt{\varepsilon} e^{-0.55\left(\frac{\varepsilon}{\langle\varepsilon\rangle}\right)^2} \qquad (AI.II)$$

3. Técnicas de caracterización del espesor de las capas.

- ***Microscopía electrónica de barrido (SEM).***

En este trabajo se emplea SEM en sección transversal para estimar el espesor depositado. Se toman imágenes de electrones secundarios en sección transversal de muestras preparadas sobre silicio. El equipo empleado es un HITACHI S4800.

4. Otras técnicas de análisis superficial.

- ***Microscopía de fuerzas atómicas (AFM).***

La microscopía de fuerzas atómicas permite conocer la topografía superficial de las muestras mediante medidas de las interacciones punta-muestra. Para esto se utiliza un microscopio Cervantes con un sistema de control Dulcinea (Nanotec,

Madrid-España) trabajando en modo de contacto intermitente o *tapping*. Las muestras depositadas sobre silicio se miden utilizando cantilevers PPP-NCHR fabricados con silicio n^+ con una frecuencia típica de 350 KHz, proporcionados por Nanosensors™. Para el análisis de las muestras poliméricas se emplean cantilevers NSC35 de AlBS con una frecuencia de 210 KHz, adquiridos de la compañía μmasch, Las imágenes se procesan con el programa de Nanotec de libre difusión WSxM. El error asoiciado a las medidas es del orden del 5 %. Las imágenes mostradas se toman a 512 x 512 píxeles.

- ***Medidas de mojabilidad.***

Con esta técnica se pueden determinar los ángulos de contacto de diferentes líquidos con una superficie determinada.

Los ángulos de contacto estáticos se determinan utilizando un goniómetro CAM100 (KSV Instruments Ltd, Finlandia) por el método de la gota sésil. El tamaño de gota empleado es de 3 μl. Los valores mostrados son la media de, al menos, siete medidas, y se estima un error de 2 º.

Los ángulos de avance y retroceso se determinan aplicando el método de Young con un goniómetro SCA20 de Data Physic Instruments utilizando gotas sésiles de agua miliQ de volumen variable. Las medidas se realizan aumentando el volumen de gota de 3 a 12 μl a una velocidad de 1 $\mu l \cdot s^{-1}$ para las medidas del ángulo de avance y disminuyéndolo de 12 a 1 μl a una velocidad de -0.1 $\mu l \cdot s^{-1}$ para el ángulo de retroceso. El valor de ángulo de avance y retroceso que se toma es el observado cuando se alcanza un estado estacionario (valor máximo y mínimo que se mantiene estable con la adición/retirada de agua, respectivamente). Los valores que se dan son la media de un mínimo de siete medidas realizadas sobre cada superficie estudiada, y se estima una barra de error de 2 º.

- ***Determinación de la tensión superficial.***

La tensión superficial y sus componentes polar y dispersiva se determinan por el método de Young-Dupré,[4] empleando agua mQ y diiodometano como líquidos de

contraste. Este método se basa en la ecuación homónima, que se muestra a continuación:

$$\gamma_L(1+\cos\theta) = 2\sqrt{\gamma_S^p \gamma_L^p} + 2\sqrt{\gamma_S^d \gamma_L^d} \qquad (AI.III)$$

donde γ_L^p y γ_L^d son las componentes polar y dispersiva respectivamente de la tensión del líquido, γ_S^p y γ_S^d son las componentes del sólido analizado y γ_L es la tensión total del líquido utilizado para la medida. Puesto que las tensiones superficiales de los líquidos y sus componentes están tabuladas (véase la *Tabla AI.1*), se plantea un sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas (γ_S^p y γ_S^d), cuya suma es la tensión total, γ_S. Se realizan un mínimo de siete medidas para cada muestra y líquido.

Tabla AI.1. Tensiones superficiales de líquido (γ_L) y sus componentes polar (γ_L^p) y dispersiva (γ_L^d) de agua destilada y diiodometano.

Líquido	γ_L **(mN/m)**	γ_L^p **(mN/m)**	γ_L^d **(mN/m)**
Agua mQ	72.8	51.0	21.8
Diiodometano	50.8	2.3	48.5

5. Técnicas biomédicas.

- ***Microscopía de fluorescencia (adherencia bacteriana).***

Tras la tinción de las bacterias con naranja de acridina, las superficies se analizan por microscopia de fluorescencia con un microscopio de Laborlux D.

- ***Microscopía confocal (desarrollo de osteoblastos).***

Permite analizar diferentes rasgos de los osteoblastos tras su inmunomarcaje. Las imágenes se obtienen con un microscopio confocal Leica TCS-SL con una apertura de 1 unidad Airy, poniendo en cada caso los filtros adecuados. Para evitar fotoblanqueo, se aplica durante un intervalo de tiempo no superior a 5 min la menor

potencia de láser posible para producir señal de fluorescencia. Se toman imágenes con una resolución de 512 x 512, con un tamaño medio de vóxel de 209.20 nm^3. El contaje de adhesiones focales se realiza a partir de imágenes de 40x, que se procesan por el programa Leica imaging. Las imágenes se analizan con el programa Leica imaging para la determinación de adhesiones focales y conel programa Image J para obtener datos morfométricos.

6. Referencias.

[1] C. D. Wagner, L. E. Davis, M. V. Zeller, J. A. Taylor, R. H. Raymond, L. H. Gale. "Empirical atomic sensitivity factors for quantitative analysis by electron spectroscopy for chemical analysis". Surface and Interface Analysis, 3:211-225 (1981).

[2] M. A. Liebergman, A. J. ichtenberg. "Principles of Plasma Discharges and Materials Processing". Wiley & Sons Inc., New York, second edition (2005).

[3] M. J. Druyvesteyn. "Der Niedervoltbogen". Zeitschrift fur Physik A- Hadrons and Nuclei, 64:781-798 (1930).

[4] R. N. Shimizu, N. R. Demarquette. "Evaluation of surface energy of solid polymers using different models". Journal of Applied Polymer Science, 76: 1831-1845 (2000).

Para comenzar, mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis, Agustín y Paco, por el gran interés mostrado siempre hacia mi trabajo y por haberme enseñado tantas cosas. Es gracias a vosotros que esta tesis ha visto la luz.

Gracias a mi tutor, Alfonso Caballero Martínez.

Quiero dar las gracias también a Jaime Esteban y su grupo de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid y al grupo de José Antonio Puértolas de la Universidad de Zaragoza por su colaboración en este trabajo.

Un agradecimiento especial a Mercedes Salido, Pepe Vilches y Emilio de la Orden de la Universidad de Cádiz por vuestro apoyo y el buen trato recibido.

Gracias también a los demás jefes del grupo (Pepe, Ana, Juan Pedro, Ángel y Alberto) por estar siempre dispuestos a ayudar en lo necesario.

Ahora tocan los becarios, que son los que más me han tenido que soportar...

A Pablo (bueno, Dr. Pablo). Por hacerme sentir una más desde el primer momento y por todo lo que me enseñaste sin perder nunca la sonrisa; eres “estupendo”. Tranquilo, no te guardo rencor por tirarme por la ventana.

A María. Por estar ahí siempre que te he necesitado y por haberme espabilado en más de una ocasión. Has hecho por mí más de lo que crees. Un millón de gracias.

A mis tres compis de mesa. A Manuel Macías, por esa confianza que me has dado siempre, aunque nos hayamos peleado alguna vez... A Manuel Oliva, tienes la habilidad de hacerme sentir bien. Y a Pedro, del que he aprendido mucho sobre la vida, a pesar de tus 19 añitos recién cumplidos...

A Julián, porque siempre tienes una palabra amable y una anécdota de Valdepeñas de Jaén que contar.

A Youssef, ¡cuánto ha llovido desde el máster! Ánimo, que ya falta menos.

A Nicolás, un poco “peligroso”, pero muy buena gente. Un placer haber coincidido contigo.

A Noé, por hacer más entretenidas las tardes de AFM encendiendo las rotatorias.

A Antonio Méndez, aunque coincidimos poco, siempre me regalas una sonrisa.

A Eva y Jose. Ha sido poco tiempo, pero me habéis dejado buenos recuerdos.

A los doctores, Fran y Víctor y a las nuevas adquisiciones: Lola (son ya muchos

años) y Jorge (gracias por ayudarme con la “burrocracia”). A Rafa, por conseguir lo imposible: que pelearte con el AFM resultara divertido. Eres un encanto; a Carmen, te fuiste casi cuando yo llegué y te vuelves cuando me voy, se nota que me huyes... Me has ayudado mucho y nunca olvidaré aquella tarde en el “estudio de grabación”.

A los que se fueron del ICMS: a Juanra y a Curro, espero que os vaya muy bien en vuestro postdoc. A Juan Carlos González, gracias por esos raman y por preparar cebiche (muy rico, por cierto). A Patricia, que sufriste conmigo el XPS.

Fuera del grupo, a mis chicos del máster: Antonio, Lourdes y Fátima. Siempre os tendré un cariño especial. A mis compañeros de facultad y a mis amigos de siempre: gracias por hacer más feliz la vida y por el apoyo en los malos momentos.

Gracias a todo el personal del ICMS. Todos sois necesarios.

A todas las personas que han contribuido de alguna forma en esta etapa.

Para acabar, el principio.

Nunca podría haber llegado hasta aquí de no ser por mis padres. A vosotros os debo saber que en la vida nadie te da nada y que se puede con todo. A mi padre, por trabajar tanto para darnos unos estudios que tú no pudiste tener; habrías llegado a donde hubieras querido. Ahora toca descansar y disfrutar de la vida, que ya era hora. A mi madre, por educarnos y cuidarnos y aguantar las pataletas y demás, tú trabajo no ha sido menos. Sois un ejemplo a seguir. Me siento orgullosa de que seáis mis padres. No tengo palabras para agradecéroslo lo bastante.

A mis hermanos, por haber cuidado de mí, que para eso soy la “peque”. Ojalá la vida os dé al menos la mitad de lo que os merecéis. José Luis, a ver cuándo tengo un libro tuyo entre las manos, con su código de barras y todo (aunque a mí me lo regalarás, ¿no?). Nieves, sencillamente mi mejor amiga.

A toda mi familia, incluyendo a la política. Gracias.

Y finalmente, a la persona que más ha sufrido esta tesis: José Manuel. Gracias por apoyarme en todo momento y ocuparte de todo cuando lo he necesitado; la casa se habría venido abajo de no ser por ti. Espero que todas mis historias empiecen siempre con tu nombre.

Gracias de corazón.