



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

BIOCOMPATIBILIDAD Y RESISTENCIA A LA CORROSIÓN DE RECUBRIMIENTOS DE TITANATO DE BISMUTO CON UN ABORDAJE DESDE LA PERSPECTIVA DE LA BIOÉTICA

Zully Ximena Rojas Ortiz

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Derecho, Ciencias Políticas y Sociales
Departamento de Derecho
Maestría en Biociencias y Derecho
Bogotá D.C., Colombia
2016

BIOCOMPATIBILIDAD Y RESISTENCIA A LA CORROSIÓN DE RECUBRIMIENTOS DE TITANATO DE CON UN ABORDAJE DESDE LA PERSPECTIVA DE LA BIOÉTICA

Zully Ximena Rojas Ortiz

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Biociencias y Derecho

Director:

Ph.D., M.Sc., Ing. Jhon Jairo Olaya Flórez

Codirectora:

Dr. M.Sc. Dianney Clavijo Grimaldo

Línea de Investigación:

Ciencias, materiales y superficies

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Derecho, Ciencias Políticas y Sociales
Departamento de Derecho
Maestría en Biociencias y Derecho
Bogotá D.C., Colombia
2016

*“Nunca consideres el estudio como una obligación,
sino como una oportunidad para penetrar
en el bello y maravilloso mundo del saber”.*

Albert Einstein

En la medida que el hombre se eduque

La sociedad se transforma

Z.X. Roort

A mí querido abuelito, mi héroe,

A mis Padres

A Mis Hermanas

A Mis Sobrinos

Agradecimientos

A Dios dador de vida, porque estoy convencida que su voluntad es quien dirige mi camino.

A mis padres, María Elsy Ortiz y Yesid Evelio Rojas quienes siempre han apoyado mis proyectos, mis sueños y me han acompañado incondicionalmente hasta lograrlos.

Al Ingeniero Jhon Jairo Olaya Flórez, por su colaboración, por brindarme la oportunidad de desarrollar este proyecto con su grupo de investigación.

A la Doctora Dianney Clavijo Grimaldo, por su colaboración y apoyo en este proyecto.

Al Profesor José Edgar Alfonso Orjuela, quien me ha brindado la oportunidad de adquirir nuevos conocimientos y por su amable colaboración en la consecución de los objetivos de este trabajo.

Al Doctor Fabio Rivas Muñoz, por sus valiosos aportes y gran colaboración para lograr objetivos específicos de este trabajo

A Manuel Pinzón, compañero de investigación quien siempre estuvo dispuesto a compartirme sus conocimientos, aclararme inquietudes y cooperó significativamente con el desarrollo de esta investigación.

A Karen Velásquez y a la profesora Adriana Fontanilla de la Facultad de Ciencias, por su colaboración con la pruebas de biocompatibilidad.

A mis compañeros, Fabio Vallejo, Giovany Orozco, Ariel Amaya quienes me ayudaron desinteresada y gratamente en el cumplimiento de los objetivos.

Al proyecto COLCIENCIAS 2013: "Caracterización Estructural Y Química Mediante Haces De Iones De Recubrimientos Nanoestructurados Con Aplicaciones Tecnológicas".

A los técnicos encargados de los laboratorios de tratamientos térmicos, metalografía y SEM.

Al Centro Internacional de Física (CIF)

Resumen

En este trabajo se depositaron recubrimientos nanoestructurados de Bi_2TiyO_3 mediante la técnica Sputtering Magnetron RF a partir de un blanco de $\text{Bi}_4\text{Ti}_3\text{O}_{12}$, utilizando como sustrato acero inoxidable 316L, con el propósito de evaluar la biocompatibilidad y hacer un abordaje desde la perspectiva bioética. Se tuvo como variable la temperatura del sustrato para ello se utilizaron tres diferentes temperaturas: Rango de Temperatura (RT) sin suministro adicional de temperatura dentro de la cámara, el cual, oscila entre 353°K y 368°K; 473°K y 673°K. El flujo de argón, la potencia aplicada al blanco, la presión final de trabajo y el tiempo de depósito fueron condiciones fijas. Para este fin, se evaluaron características de microestructura, espesor, rugosidad, morfología, composición química y corrosión.

La microestructura de los recubrimientos se analizó mediante XRD (X ray diffraction), con el que se evidenció que la estructura cristalina para recubrimientos nanoestructurados de Bi_2TiyO_3 , se logra a una temperatura de 673°K. La rugosidad y el espesor de capa se evaluaron con un equipo Bruker Contour GT, donde se observó superficies con baja rugosidad; la variación topográfica para las películas crecidas a Temperatura de Deposito (TD) fue en promedio de 14,6 nm para las películas crecidas a 473°K fue de 18,7 nm y para las películas crecidas a 673°K fue de 19,6 nm; para las tres temperaturas los resultados de corrosión evidenciaron menor actividad electroquímica de las películas con respecto al sustrato acero inoxidable 316L, el cual, presentó la menor densidad de corriente de corrosión (Icorr). El espesor de capa promedio de las películas crecidas a Temperatura de Deposito (RT) fue de 337,7 nm, para las películas crecidas a 473°K fue de 360,2 nm y para las películas crecidas a 673°K fue de 387,8 nm.

La morfología de la capa delgada obtenida de Bi_2TiyO_3 y la composición química, se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia de dispersión de energía (EDX). Se realizaron pruebas de biocompatibilidad indirecta mediante la técnica "Bone Like" utilizando solución SBF (Solución similar a los fluidos biológicos), se evaluó los resultados mediante la técnica de espectroscopia de dispersión de energía, (EDX) y se hizo el análisis de Viabilidad Celular MTT.

La resistencia a la corrosión del recubrimiento obtenido, se evaluó por medio de la técnica de polarización potenciodinámica, para ello, se utilizaron como electrolitos soluciones de: cloruro de sodio (NaCl) al 3,5%, solución Ringer y solución Hank's. Los resultados de corrosión sugieren que las películas delgadas de titanato de bismuto tiene un buen comportamiento cuando son sometidas a electrolitos que simulan fluidos corporales y a medios corrosivos más agresivos.

Finalmente, se hizo un abordaje desde la perspectiva bioética con un breve esbozo histórico desde sus primeros conceptos hasta el concepto que hoy se aplica, con la

observancia de principios y lineamientos que propone esta ciencia, cuando se hace propuestas investigativas como esta, donde se plantean posibles soluciones a una necesidad en el área de la medicina.

Palabras clave: Biocompatibilidad, Biomaterial, Titanato de Bismuto, Sputtering Magnetron RF, Películas Delgadas, Bioética.

Abstract

In this work, nanostructured coatings of $\text{Bi}_2\text{Ti}_2\text{O}_7$ were deposited using the Sputtering Magnetron RF technique from a blank of $\text{Bi}_4\text{Ti}_3\text{O}_{12}$, using as substrate 316L stainless steel, in order to evaluate the biocompatibility and to approach from the bioethical perspective. The temperature of the substrate was used as a variable for which three different temperatures were used: Temperature Range (RT) without additional temperature supply inside the chamber, which varies between 353°K and 368°K ; 473°K and 673°K . The argon flow, the power applied to the target, the final working pressure and the deposition time were fixed conditions. For this purpose, microstructure, thickness, roughness, morphology, chemical composition and corrosion characteristics were evaluated.

The microstructure of the coatings was analyzed by XRD (X ray diffraction), which showed that the crystalline structure for nanostructured coatings of $\text{Bi}_2\text{Ti}_2\text{O}_7$, is achieved at a temperature of 673°K . The roughness and the layer thickness were evaluated with a Bruker Contour GT, where surfaces with low roughness were observed; The topographic variation for the films grown at Storage Temperature (TD) was on average 14.6 nm for films grown at 473°K was 18.7 nm and for films grown at 673°K it was 19.6 nm ; For the three temperatures the corrosion results showed lower electrochemical activity of the films with respect to the substrate 316L stainless steel, which had the lowest corrosion current density (I_{corr}) as well as corrosion potential (E_{corr}). The average layer thickness of the films grown at Storage Temperature (RT) was 337.7 nm , for films grown at 473°K it was 360.2 nm and for films grown at 673°K it was 387.8 nm .

The morphology of the thin layer obtained from $\text{Bi}_2\text{Ti}_2\text{O}_7$ and the chemical composition was analyzed by scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersion spectroscopy (EDX). Indirect biocompatibility tests were performed using the Bone Like technique using a solution similar to biological fluids (SBF), the results were evaluated using the energy dispersion spectroscopy (EDX) technique and the Cell Viability analysis MTT.

The corrosion resistance of the obtained coating was evaluated using the potentiodynamic polarization technique. For this purpose, solutions of: 3.5% sodium chloride (NaCl), Ringer solution and Hank's solution were used as electrolytes. Corrosion results suggest that thin films of bismuth titanate perform well when subjected to electrolytes that mimic body fluids and more aggressive corrosive media.

Finally, an approach was taken from the bioethical perspective with a brief historical sketch from its first concepts to the concept that is applied today, with the observance of principles and guidelines proposed by this science, when making research proposals such as this, where they arise Possible solutions to a need in the area of medicine.

Keywords: Biocompatibility, Biomaterial, Bismuth Titanate, RF Magnetron Sputtering Thin Film, Bioethic.

Contenido

	Pág.
Resumen	VII
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XVI
Lista de gráficas	XVIII
Introducción	1
Objetivos	5
1. Antecedentes	6
<u>1.1 Nacionales</u>	6
<u>1.2 Internacionales</u>	8
2. Fundamentos Teóricos	11
<u>2.1 Biomaterial</u>	11
<u>2.2 Biocompatibilidad</u>	13
<u>2.3 Recubrimientos</u>	14
<u>2.3.1 Sustrato Acero Inoxidable 316L</u>	14
<u>2.3.2 Titanato de Bismuto</u>	15
<u>2.4 Técnicas de producción de películas delgadas</u>	15
<u>2.2.1 Sputtering</u>	15
<u>2.5 Técnicas de caracterización</u>	17
<u>2.5.1 Difracción de Rayos X (XRD)</u>	17
<u>2.5.2 Espectroscopia De Fotoelectrones XPS</u>	18
<u>2.5.3 Rugosidad</u>	19
<u>2.5.4 Espesor de Capa</u>	20
<u>2.5.5 Espectroscopia Electrónica De Barrido SEM</u>	21
<u>2.6 Técnicas para evaluación de la resistencia a la corrosión</u>	222
<u>2.6.1 Polarización Potenciodinámica (Tafel)</u>	233
<u>2.7 Técnicas para la evaluación de biocompatibilidad</u>	225
<u>2.7.1 Viabilidad Celular (MTT)</u>	235
<u>2.7.2 Formación de Hidroxiapatita Técnica Bone Like</u>	237

3.	Bioética.....	29
3.1	Antecedentes	29
3.2	Concepto.....	30
3.3	Características	31
3.4	Principios de la bioética	32
3.5	Aplicaciones.....	33
3.6	Bioetica y biomateriales	33
3.7	Investigador y bioética	35
3.8	Principio Beneficencia En Estudios De Biocompatibilidad.....	36
4.	Desarrollo experimental	39
4.1	Preparación de Sustratos	39
4.2	Producción de películas delgadas.....	39
4.3	Técnicas de caracterización.....	43
4.3.1	Difracción de Rayos X (XRD).....	43
4.3.2	Espectroscopia fotoelectronica (XPS)	44
4.3.3	Perfilometría Óptica	45
4.3.4	Microscopia electrónica de barrido (SEM)	45
4.4	Evaluación de la resistencia a la corrosión.....	46
4.4.1	Electrolitos	46
4.4.2	Polarización Potenciodinámica (PP).....	47
4.5	Evaluación de biocompatibilidad.....	48
4.5.1	Viabilidad Celular (MTT)	48
4.5.2	Formación de Hidroxiapatita Técnica Bone Like	50
5.	Resultados y discusión	53
5.1	Caracterización Estructural de difracción RX (XRD).....	53
5.2	Espectrometro XPS	56
5.3	Rugosidad	57
5.4	Espesor de capa.....	60
5.5	Morfología por microscopia electrónica de barrido.....	65
5.6	Composición química por EDX.....	68
5.7	Evaluación de la resistencia a la corrosión.....	73
5.7.1	Polarización Potenciodinámica (PP).....	73
5.7.2	Microscopia electrónica de barrido (SEM)	79
5.8	Evaluación de biocompatibilidad.....	80
5.8.1	Análisis de Viabilidad Celular (MTT)	80
5.8.2	Formación de Hidroxiapatita Técnica Bone Like	83
5.9	Perspectiva desde la bioética	88
6.	Conclusiones y recomendaciones	95
6.1	Conclusiones	95
6.2	Recomendaciones	95
	Bibliografía	97

Lista de figuras

	Pág.
Figura 2.1 Materiales usados para implantes	11
Figura 2.2 Proceso Sputtering	16
Figura 2.3 Proceso Sputtering reactivo	17
Figura 2.4 Incidencia de los Rayos X.....	18
Figura 2.5 Diagrama del proceso fotoelectronico	19
Figura 2.6 Imagen tridimensional de evaluación de rugosidad	20
Figura 2.7 Esquema de Espectroscopia Electrónica De Barrido SEM	21
Figura 2.8 Celda electroquímica	22
Figura 2.9 Diagrama para determinar densidad de corriente de la corrosión	23
Figura 2.10 Curva de polarización Potenciodinámica (Tafel)	24
Figura 2.11 Reacción de MTT a formazan por acción del metabolismo mitocondrial.....	26
Figura 2.12 Vista microscópica de osteoblastos	26
Figura 2.13 A. Hidroxapatita obtenida mediante microscopio electrónico de barrido. B. Estructura química de la hidroxapatita]. C. Estructura jerárquica de un hueso típico en varias escalas de longitud.....	28
Figura 4.1 Preparación del sustrato	39
Figura 4.2 Equipo CIT-Alcatel HS 2000 para producción de películas delgadas mediante la técnica de sputtering magnetrón RF.....	40

Figura 4.3 Cámara para producción de películas delgadas equipo CIT-Alcatel HS 2000	40
Figura 4.4 Flujometros Equipo CIT-Alcatel HS 2000	41
Figura 4.5 Blanco de titanato de bismuto	41
Figura 4.6 Plasma formado por la ionización del argon	42
Figura 4.7 Equipo de difracción de rayos X.....	43
Figura 4.8 Equipo de espectroscopia fotoelectrónica	44
Figura 4.9 Equipo Perfilometría Óptica	45
Figura 4.10 Equipo microscopía electrónica de barrido.....	45
Figura 4.11 Equipo Equipo de Corrosión Potenciostato Gamry 600	47
Figura 4.12 Equipo Espectrometria	48
Figura 4.13 A. Cristales de formazan B. Cámara de 96 pozos para MTT	50
Figura 5.1 Patron de difracción de rayos X sustrato acero 316L.....	54
Figura 5.2 Patrones de difracción de rayos de las películas depositadas a 673°K55	
Figura 5.3 Composición química de la película de titanato de bismuto, RT, 473°K y 673°K	56
Figura 5.4 Rugosidad de películas delgadas de Titanato de Bismuto A. RT B. 473°K C. 673°K.....	57
Figura 5.5 Rugosidad en 3D de películas delgadas de Titanato de Bismuto A. RT B. 473°K C. 673°K	59
Figura 5.6 Espesor de capa de películas delgadas de Titanato de Bismuto A. RT B. 473°K C. 673°K	61
Figura 5.7 Espesor de Capa en 3D de películas delgadas de Titanato de Bismuto A. RT B. 473°K C. 673°K	64
Figura 5.8 Morfología de las películas de titanato de bismuto a 10000X: A. RT B. 473°K C. 673°K.....	65
Figura 5.9 Morfología de las películas de titanato de bismuto a 20000X: A. RT B. 473°K C. 673°K.....	67

Figura 5.10 Composición química del sustrato Acero 316L	69
Figura 5.11 Composición química de las películas delgadas de titanato de bismuto A. RT B. 473°K C. 673°K.....	70
Figura 5.12 Montaje para el ensayo de corrosión	73
Figura 5.13 Curvas de polarización de películas de titanato de bismuto depositadas sobre acero 316L a temperatura: RT, 473°K y 673°K analizadas en Solución Hank´s.....	74
Figura 5.14 Curvas de polarización de películas de titanato de bismuto depositadas sobre acero 316L a una temperatura: RT, 473°K y 673°K analizadas en Solución Ringer	75
Figura 5.15 Curvas de polarización de películas de titanato de bismuto depositadas sobre acero 316L a una temperatura: RT, 473°K y 673°K analizadas en Cloruro de Sodio 3.5%.....	76
Figura 5.16 Microscopia electrónica de barrido, después de someter las películas al ensayo de corrosión	79
Figura 5.17 Vista microscópica de viabilidad MTT con reducción a formazan	80
Figura 5.18 Composición Química del sustrato acero inoxidable 316L, por la técnica de dispersión de energía, EDX.....	83
Figura 5.19 Composiciones Químicas de películas delgadas de Titanato de Bismuto, por EDX depositados A. TD B.: 273°K C. 673°K	84

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2.1 Composición química del acero 316L.....	14
Tabla 2.2 Propiedades del acero 316L.....	15
Tabla 2.3 Composición del medio Dulbecco modificado de Eagle (DMEM).....	27
Tabla 4.1 Parámetros experimentales para el crecimiento de películas delgadas de titanato de bismuto.	43
Tabla 4.2 Composición química de Solución NaCl.....	46
Tabla 4.3 Composición química de Solución Hank's	47
Tabla 4.4 Composición química de Solución Ringer	47
Tabla 4.5 Composición química de Solución SBF (Fluido Corporal Simulado)....	50
Tabla 5.1 Parámetros de depósito para la obtención de películas delgadas de Titanato de Bismuto.....	53
Tabla 5.2 Espesor de capa de las películas de titanato de bismuto para cada una de las temperaturas utilizadas en el crecimiento	63
Tabla 5.3 Composición química de las películas delgadas de titanato de bismuto a: RT, 473°K y 673°K	72
Tabla 5.4 Parámetros electroquímicos obtenidos en las pruebas de Polarización Potenciodinámica (TAFEL), con cada uno de los electrolitos.....	74
Tabla 5.5 Densidad de corriente de corrosión (I _{corr}) obtenido en las pruebas de Polarización Potenciodinámica (TAFEL), con cada uno de los electrolitos	77
Tabla 5.6 Valores de absorbancia a 570 nm.....	81
Tabla 5.7 Viabilidad de crecimientos celular en las películas crecidas a diferentes temperaturas	82

Tabla 5.8 Porcentaje de Ca y P obtenido en cada una de las películas delgadas de titanato de bismuto obtenidas a diferentes temperaturas 86

Tabla 5.9 Relación molar Ca:P para las películas depositadas a diferentes temperaturas y sometidas a ensayo Bone Like 87

Lista de gráficas

	Pág.
Gráfica 5.1 Espesor de capa de las películas de titanato de bismuto para cada una de las temperaturas utilizadas en el crecimiento.....	63
Gráfica 5.2 Composición química de las películas delgadas de titanato de bismuto A. RT B. 473°K C. 673°K.....	72
Gráfica 5.3 Graficas de barras de películas de titanato de bismuto depositadas sobre acero 316L a diferentes temperaturas y analizadas en A. Solución Ringer B. Cloruro de Sodio 3.5% C. Solucion Hank's.....	78
Gráfica 5.4 Graficas de barras de la absorbancia a 570 nm	81
Gráfica 5.5 Viabilidad de crecimientos celular en las películas crecidas a diferentes temperaturas	82
Gráfica 5.6 Grafica de producción de calcio, de las películas delgadas obtenidas a diferentes temperaturas y ensayadas Bone Like	86

Introducción

Utilizar biomateriales para reconstruir, corregir o reemplazar partes del cuerpo humano es una práctica que data de muchos años atrás, hallazgos antropológicos han evidenciado que pueblos como los etruscos, romanos, chinos, fenicios e incluso aztecas utilizaban diversos materiales para estos fines [1,2]. El mismo hecho de prolongar la vida humana, ha hecho que la ciencia esté en la búsqueda constante de nuevas posibilidades que contrarresten los inconvenientes que afectan la salud humana, así, en 1829, Levert realizó los primeros estudios para determinar biocompatibilidad de materiales para implantes teniendo como objeto de estudio perros. Posteriormente en 1931, un cirujano de Boston, Marius Smith Petersen desarrolla un dispositivo de vidrio destinado a la aplicación en prótesis parciales de cadera y clavos para la fijación de huesos, más adelante en 1936, gracias a los trabajos de Venable y Stuck se introducen las aleaciones a base de cobalto para cirugía ortopédica. A principios de la década del 50, se inició con el desarrollo de las aleaciones a base de titanio, de igual forma, en esa misma década comienzan a ser implantadas las caderas de acero inoxidable [1,2,3]. De esta manera el concepto de biomaterial ha cambiado puesto que se ha venido acoplando a los avances tecnológicos y científicos que se desarrollan desde las diferentes áreas de la medicina, así como como las necesidades que se suscitan en esta misma área.

En las últimas décadas, la ciencia ha orientado sus trabajos de investigación a mejorar las propiedades no sólo físicas sino también biológicas de los biomateriales, esto, teniendo en cuenta que el biomaterial debe cumplir unos mínimos requerimientos de acuerdo a la destinación específica que se le vaya a dar, apuntando a mejorar por un lado la durabilidad y por otra la biocompatibilidad, exigencias que requieren hoy en día los biomateriales [2,4].

Los implantes ortopédicos constituyen una de las aplicaciones más predominantes de los biomateriales, esto, a causa de que existen enfermedades que afectan la estructura de las articulaciones como cadera, rodilla, fémur, codo, hombro entre otras; además de las lesiones causadas por accidentes. Así, el uso apropiado de los biomateriales ha hecho posible el reemplazo y restauración de las articulaciones en mención y la recuperación de los pacientes en lo concerniente a la movilidad [2]. Actualmente, para este fin, es utilizado el Titanio, que tiene alta resistencia a la corrosión y gran resistencia mecánica; este metal tiene propiedades biocompatibles, teniendo en cuenta que los tejidos del organismo asimilan su presencia, razón por la cual, es posible la fabricación de diversas prótesis e implantes con este metal [5]. Sin embargo, su aplicabilidad suele ser de carácter restringido por su alto costo. Entre los metales, los aceros

inoxidables son materiales altamente utilizados también para este propósito, tienen aplicaciones diversas las cuales varían de acuerdo a su composición química, como también a la modificación superficial, gracias a esta última característica son empleados ampliamente en la industria metalúrgica, porque mejoran la resistencia a la corrosión de los materiales metálicos que están sometidos a ambientes agresivos como el agua salina y ambientes industriales [4,6].

El desarrollo constante en el área médica con respecto a materiales para fabricar elementos para aplicaciones biomédicas, ha buscado mejorar sus propiedades. Así, biomateriales que favorezcan la adhesión celular y la osteointegración han sido objeto de estudio, en recientes investigaciones, donde lo que se ha buscado es hacer modificaciones superficiales que generen una morfología apta para estos fines [7].

En el caso particular, se ha notado que los materiales más usados son titanio y aleaciones de este, debido a su alta resistencia a la corrosión causada por el ambiente fisiológico y su estabilidad mecánica durante todo el proceso de cicatrización [8], de igual forma, el niobio, el tantalio, el circonio, el vanadio, el aluminio y el molibdeno han mostrado ser materiales favorables para ser usados en aleaciones de titanio con fines biomédicos [9]. Sin embargo, existen materiales que pueden tener la misma aplicabilidad, siendo mejorados superficialmente; es el caso del acero inoxidable AISI 316L recubierto con titanato de bismuto, esta alternativa podría ser una solución de cobertura, teniendo en cuenta que la salud, considerada como derecho fundamental, tiene gran relevancia dentro de nuestro ordenamiento jurídico. La Ley Estatutaria 1751 de 2015, por medio de la cual se regula el derecho fundamental a la salud y se dictan otras disposiciones, hace referencia al tema así: “El derecho fundamental a la salud es autónomo e irrenunciable en lo individual y en lo colectivo. Comprende el acceso a los servicios de salud de manera oportuna, eficaz y con calidad para la preservación, el mejoramiento y la promoción de la salud” [10].

La modificación superficial de los materiales se hace con el fin de mejorar las propiedades físicas, químicas y biológicas. Dependiendo de la composición química y la microestructura, un recubrimiento puede presentar bajos coeficientes de fricción, elevada dureza, buena adhesión y resistencia a la abrasión, aumentar la resistencia a la corrosión y dar tonalidades de colores brillantes y decorativos, debido a estas propiedades, los recubrimientos son ampliamente usados en la industria de alimentos, metalmecánica, aeronáutica, electrónica, petroquímica y como biomaterial [11]. De este proceso, se ha observado que la durabilidad de un material depende principalmente de sus características superficiales; el tiempo de protección está determinado por el método de preparación superficial del metal antes de ser recubierto a la vez que del tipo de ambiente donde son expuestos, del espesor y porosidad del recubrimiento [12].

Son diversos los materiales que en la actualidad, se usan como material de deposición para generar recubrimientos superficiales, por diversas técnicas. Así, los compuestos de Titanato de bismuto (Bi_2TiO_7) por sus propiedades ópticas son objeto de estudio, lo que ha permitido la fabricación de dispositivos ópticos,

y debido a sus propiedades ferroeléctricas ha sido posible la elaboración de memorias y sensores libres de plomo [13,14]. Dentro de las diferentes estructuras cristalinas que presenta el titanato de bismuto la de Aurivillius, debido a las propiedades ferroeléctricas que presenta, es utilizado para la fabricación de memorias no volátiles y memorias dinámicas para ordenadores [15]. La producción de esta configuración de titanato de bismuto cubre un gran número de técnicas, entre las que se encuentra la deposición física en fase de vapor (PVD) y la deposición química en fase de vapor (CVD). Es de mencionar que las presentaciones de este material abarcan desde las películas delgadas hasta formas cerámicas de espesores mayores como microesferas [16,17].

Otra estructura del titanato de bismuto es la pirocloro, la cual, ha sido de interés en muchas investigaciones para la producción de nanocables, nanoesferas, nanopartículas, nanotubos [18]. Sin embargo, la investigación en aplicaciones de esta fase del titanato de bismuto se centra en la fotocatalisis, esto, teniendo en cuenta que se ha evidenciado que es capaz de descomponer contaminantes orgánicos e inorgánicos al igual que materiales tóxicos, lo que resultaría benéfico para resolver problemas ambientales y energéticos en el futuro [19]. No obstante, el estudio de las propiedades de resistencia a la corrosión con solución SBF (Solución similar a los fluidos biológicos) y de biocompatibilidad de recubrimientos de $\text{Bi}_x\text{Ti}_y\text{O}_z$ aún no ha sido objeto de estudio.

A pesar del incremento comercial de los recubrimientos, y un gran volumen de literatura científica disponible, existe aún un restringido uso en relación con los biomateriales. Una excelente forma para estudiar sus posibles aplicaciones a nivel médico, es a través de ensayos de biocompatibilidad como son adhesión celular, citotoxicidad, proliferación y biomineralización, esto, teniendo en cuenta que el uso de los biomateriales es indispensable en la regeneración y sustitución de articulaciones [20]. Es de mencionar que este tipo de materiales no son perjudiciales implantados en el cuerpo humano; es así, que en el estado de Washington, en los Estados Unidos de Norteamérica, hace algún tiempo encontraron un individuo, al que se lo conoce como “El Hombre de Kennewick”, quien fue descrito físicamente como una persona alta, saludable y activa; y que se movilizaba con la punta de una flecha clavada en su cadera. La herida había cicatrizado y la presencia de esa flecha en su cuerpo, aparentemente, no le impedía desarrollar su vida cotidiana. Este implante, aunque no deseado da muestra de la capacidad que tiene el cuerpo humano para asimilar materiales extraños [2].

Para la regeneración de tejido óseo y la adhesión se han utilizado diversos biomateriales, que con el paso del tiempo tienden a mostrar situaciones adversas, motivo por el cual, se ha venido incentivando la investigación en la modificación superficial de los biomateriales que den respuesta a estas necesidades y que favorezcan tanto la adhesión como la biocompatibilidad, teniendo en cuenta que el cuerpo humano tiene buen comportamiento ante la presencia de estos materiales. Es así que el propósito general de esta investigación fue el de extender el conocimiento en el uso de recubrimientos de $\text{Bi}_x\text{Ti}_y\text{O}_z$, evaluando la resistencia a la corrosión en soluciones SBF y la biocompatibilidad. Del mismo modo por revestir de gran importancia la bioética en el desarrollo científico y tecnológico actual, se hace un abordaje con la

finalidad de observar los principios y lineamientos que propone esta ciencia en el desarrollo científico, más aun cuando las investigaciones van orientadas al uso humano. Es de mencionar, que en el área médica con los avances exorbitantes, este tema no puede quedar de lado y sus principios orientadores deben tenerse en cuenta desde el mismo momento en que surge la propuesta.

Para el desarrollo de esta investigación, en el Capítulo I, se describen antecedentes nacionales, donde se evidencia que la Universidad Nacional De Colombia en los últimos años ha incursionado fuertemente en la propuesta de modificación superficial de diferentes materiales para luego evaluar sus características físicas y químicas, de la misma manera se describe la revisión a nivel internacional, donde se determinó, que hasta el momento no hay trabajos donde los recubrimiento de $\text{Bi}_x\text{Ti}_y\text{O}_z$ hayan sido sometidos a evaluación de biocompatibilidad y corrosión en SBF.

En el Capítulo II, se encuentran los fundamentos teóricos necesarios para el desarrollo de este trabajo de investigación, de esta manera se aborda el tema de biomaterial, haciendo una breve reseña desde el momento en que se tiene conocimiento de su uso para restauración y sustitución de partes humanas, hasta el concepto que actualmente se emplea. Posteriormente se hace alusión a la biocompatibilidad como característica fundamental de los biomateriales. De igual manera se hace referencia al acero 316L usado como sustrato y al recubrimiento $\text{Bi}_x\text{Ti}_y\text{O}_z$; por último se describen las caracterizaciones que se evaluaron a la película delgada obtenida.

En el Capítulo III, se hace un abordaje desde la perspectiva bioética, donde se describen los antecedentes que dieron origen a esta ciencia, también se describe allí los principios rectores y para finalizar se hace énfasis en la labor del investigador, donde se sugiere los requerimientos que ha de tener en cuenta en el desarrollo de su propuesta.

A continuación en el Capítulo IV, se presenta el desarrollo experimental, haciendo una descripción de los materiales, procesos y equipos de laboratorio empleados en la caracterización de la película delgada de titanato de bismuto sobre acero inoxidable AISI 316L, obtenida por la técnica pulverización catódica de vapor Sputtering con magnetron RF.

En el Capítulo V, se encuentra los resultados obtenidos con la respectiva discusión de la evaluación del recubrimiento obtenido de Titanato de Bismuto, como son la caracterización química y morfológica, la rugosidad y espesor de capa, así como la evaluación de la resistencia a la corrosión por la técnica de polarización potenciodinámica (Tafel); por último la evaluación de biocompatibilidad mediante el análisis de Viabilidad Celular MTT y la técnica Bone Like, con la respectiva evaluación de los resultados con la técnica de espectroscopia de dispersión de energía, (EDX) .

En el Capítulo VI, se hace la presentación de las conclusiones generales a partir de los resultados obtenidos con el desarrollo del trabajo de investigación, finalmente se hace el planteamiento de recomendaciones que han de tener en cuenta para futuros trabajos, relacionados con esta temática.

Objetivos

General

Determinar la biocompatibilidad del recubrimiento de titanato de bismuto ($\text{Bi}_x\text{Ti}_y\text{O}_z$), obtenido por la técnica de deposición física de vapor Sputtering magnetrón RF sobre acero inoxidable AISI 316L, con un abordaje desde la perspectiva de la bioética.

Específicos

- Determinar los parámetros óptimos de depósito de los recubrimientos de Titanato de Bismuto ($\text{Bi}_x\text{Ti}_y\text{O}_z$) sobre el sustrato de acero inoxidable AISI 316L, mediante la técnica de Sputtering magnetrón RF, para encontrar un recubrimiento que sea estable y reproducible.
- Depositar recubrimientos de Titanato de Bismuto ($\text{Bi}_x\text{Ti}_y\text{O}_z$) sobre acero inoxidable mediante la técnica de Sputtering magnetrón RF.
- Caracterizar la estructura de los recubrimientos depositados mediante DRX (difracción de rayos X).
- Determinar la rugosidad, el espesor de capa, morfología y la composición química de la película delgada de Titanato de Bismuto.
- Evaluar la resistencia a la corrosión de los recubrimientos de Titanato de Bismuto $\text{Bi}_x\text{Ti}_y\text{O}_z$ mediante la técnica de Polarización Potenciodinámica (Tafel), utilizando diferentes electrolitos que simulen los fluidos corporales.
- Evaluar la biocompatibilidad de los recubrimientos obtenidos de Titanato de Bismuto.
- Hacer un abordaje desde la perspectiva de la bioética, de la propuesta en la modificación superficial en biomateriales para la utilización en implantes humanos.

1. Antecedentes

Dentro de las aplicaciones y estudios que se han realizado de las diferentes estructuras cristalinas que presenta el titanato de bismuto, se encuentra la evaluación de propiedades ferroeléctricas y ópticas, en este capítulo se hace alusión a estas investigaciones. De la misma manera, se describe brevemente trabajos donde han realizado crecimiento de películas delgadas con la evaluación de diversas caracterizaciones.

1.1 Nacionales

Se hizo una revisión del estado del arte en el ámbito nacional, donde, se encontró investigaciones realizadas en la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, de películas delgadas de Titanato de Bismuto por el método de Sputtering con magnetrón balanceado. Del mismo modo, se evidenció el desarrollo de estudios de investigación en las que se evalúan diferentes propiedades de las películas delgadas obtenidas.

En esta revisión no se encontraron investigaciones publicadas con relación a la evaluación de la biocompatibilidad del recubrimiento de Titanato de Bismuto. En el marco del desarrollo de los materiales a nivel nacional, la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, ha influido de forma significativa en el estudio e investigación de materiales y procesos para satisfacer las necesidades del sector.

Es así, como las propuestas en el mejoramiento de las propiedades de los materiales, mediante la aplicación de recubrimientos, no han sido ajenas al interés tanto industrial como académico. Muestra de ello son los estudios realizados por los diferentes grupos de investigación tanto de la Facultad de Ingeniería, como de la Facultad de Ciencias en la Universidad Nacional de Colombia.

P. J. Arango y colaboradores, hicieron crecimiento de películas delgadas de nitruro de titanio sobre acero inoxidable 316L, mediante la técnica PVD por arco pulsado, con el fin de evaluar la hemocompatibilidad cuando se varía la temperatura. Para este fin se hicieron pruebas sobre el acero sin recubrir y sobre los recubrimientos, con el propósito de determinar la hemocompatibilidad y definir su relación con la microestructura y la rugosidad. Los resultados evidenciaron que la baja rugosidad y una estructura amorfa tiene mayor hemocompatibilidad, lo cual muestra que estas características son relevantes e incidentes en el objetivo principal de esta investigación [21].

R. Olivares y colaboradores en el año 2005, realizaron una investigación, en la que utilizando la técnica de sputtering con magnetrón desbalanceado, depositaron recubrimientos de niobio de aproximadamente 150 nm de espesor sobre sustratos de acero inoxidable AISI 316L y luego evaluaron la biocompatibilidad con pruebas *in vitro* con células obtenidas del hueso alveolar humano. Los resultados del estudio muestran una mayor adhesión y proliferación de las células que fueron puestas en el acero inoxidable recubierto con niobio que en el acero sin recubrir. También se concluyó que no hay una respuesta tóxica, lo que indica que el recubrimiento de niobio aumenta la biocompatibilidad del acero inoxidable AISI 316L [22].

En 2007, A. Pareja López y colaboradores, evaluaron la adherencia celular y biocompatibilidad del acero inoxidable AISI 316L modificado con recubrimientos inorgánicos, cerámicos o vítreos, aplicados por el método sol-gel. Se evaluaron los efectos citotóxico por medio de la técnica MTT, y genotóxico por electroforesis en gel de células individuales, sobre células de la línea celular CHO. Los resultados muestran que a los 30 días de envejecimiento en medio MEM no se generó ningún efecto citotóxico [23]

De manera complementaria M.F. Ortiz Bastos, en 2012, mediante la técnica Sputtering con magnetrón desbalanceado D.C. pulsado depositó películas de bismuto usando como sustratos acero inoxidable 316L, aleación de titanio Ti_6Al_4V , vidrio y silicio. En esta investigación se evaluaron las propiedades ópticas de las películas a partir de medidas de absorbancia y transmitancia; además realizó un estudio de la resistencia a la corrosión mediante las técnicas electroquímicas Polarización Potenciodinámica y espectroscopia de impedancias electroquímicas (EIS), por último con el propósito, de determinar los mecanismos de corrosión realizó un estudio estructural de los productos obtenidos, en el proceso de corrosión mediante la técnica de microscopia electrónica de barrido (MEB) [24].

Un estudio, que hace caracterizaciones de películas delgadas de titanato de bismuto es el de C.M. Bedoya Hincapié en 2012, quien, centro su trabajo en modelar y simular las propiedades ferroeléctricas. El sistema fue modelado utilizando un Hamiltoniano, donde se tienen en cuenta por un lado la interacción dipolar y por otro la influencia del campo eléctrico externo. Esta propuesta evalúa intrínsecamente la anisotropía de polarización, teniendo en cuenta dos direcciones cristalográficas preferenciales, que da a lugar la polarización espontánea [25].

J.P. Parra Sua, en 2014 realizó la evaluación de la resistencia a la corrosión de películas delgadas de titanato de bismuto obtenidas por la técnica pulverización catódica sputtering RF, teniendo como variable la temperatura. La resistencia a la corrosión se determinó mediante la técnica de pérdida de masa y el comportamiento de las capas delgadas de titanato de bismuto como barrera térmica se evaluó mediante análisis morfológico superficial y químico. Los resultados determinaron que a altas temperaturas el recubrimiento se fractura y se pierde la película depositada como protección del sustrato [26].

1.2 Internacionales

En el ámbito internacional se hizo una revisión del estado del arte, no se encontraron investigaciones donde se evalué la biocompatibilidad del recubrimientos de titanato de bismuto, sin embargo, si existen estudios de biocompatibilidad realizadas sobre otras películas delgadas. Con referencia a otras propiedades del titanato de bismuto se encontraron estudios donde se evalúan las propiedades ópticas principalmente.

Bordjih y colaboradores, en 1996, realizaron un estudio de biocompatibilidad utilizando células humanas de osteoblastos y fibroblastos. En esta investigación emplearon acero inoxidable 316L como sustrato, para depositar tres películas superficiales, esto, con el propósito de optimizar la resistencia a la corrosión; y de mejorar la dureza y la resistencia al desgaste. Los resultados obtenidos mostraron que el acero inoxidable 316L si mejora sus propiedades, también se evidencio la necesidad de una morfología de la superficie que favorezca la adhesión y el crecimiento celular [27].

Z. Shai Hong y colaboradores en 2005, determinaron la biocompatibilidad del acero 316L por comparación con aleaciones de titanio; la evaluación de biocompatibilidad de acero inoxidable 316L, se realizó mediante adhesión celular donde, el porcentaje de células se detectó mediante citometría de flujo, y se comparó con implantes de titanio de aplicación médica. Para este propósito los materiales se implantaron en animales y se realizaron pruebas histopatológicas. Los resultados obtenidos muestran que no hay diferencias significativas entre los materiales, por lo que se concluye que el acero inoxidable 316L tiene una buena biocompatibilidad [28].

Otra investigación, orientada con propósitos similares es la de Eisenbarth y colaboradores en 2006, donde evaluaron la biocompatibilidad de los elementos que estabilizan las aleaciones de titanio (Al, Mo, Nb, Ta, Zr) comparándolos con el acero inoxidable AISI 316L y el titanio CP (grado 2). Evaluaron la resistencia a la corrosión de estos elementos, proliferación, actividad mitocondrial, morfología y tamaño de las células después de siete días de incubación. Los resultados concluyen que en orden de biocompatibilidad se agrupan de la siguiente manera: están en el primer grupo el niobio y el tantalio, seguidos del titanio, y por último agrupados el zirconio, el aluminio, el acero 316 y el molibdeno [29].

M. Martinesi, en 2007, realizó una comparación de acero 316L recubierto tratado por nitruración, para determinar la resistencia a la corrosión y la biocompatibilidad. Para determinar la biocompatibilidad utilizaron células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) y células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Con este estudio se determinó que el acero tratado tiene una mejor resistencia a la corrosión y mayor dureza de la superficie en comparación con el acero sin tratar, por otro lado la adhesión celular vascular molécula-1 (VCAM-1) y E-selectina se incrementó en presencia de todos los tipos de muestras sin excepción alguna [30].

P.N. Rojas Peláez, en 2015, evaluó electroquímicamente películas delgadas de NbO_x , TiO_x , TaO_x , ZrO_x , depositadas sobre acero 316L, mediante la técnica de pulverización catódica, con la finalidad de determinar la resistencia a la corrosión al ser sometido en fluido similares a los corporales, donde se pudo evidenciar que en general el acero recubierto tiene buena resistencia a la corrosión, sin embargo, el de mejor comportamiento lo mostro el TiO_x [1].

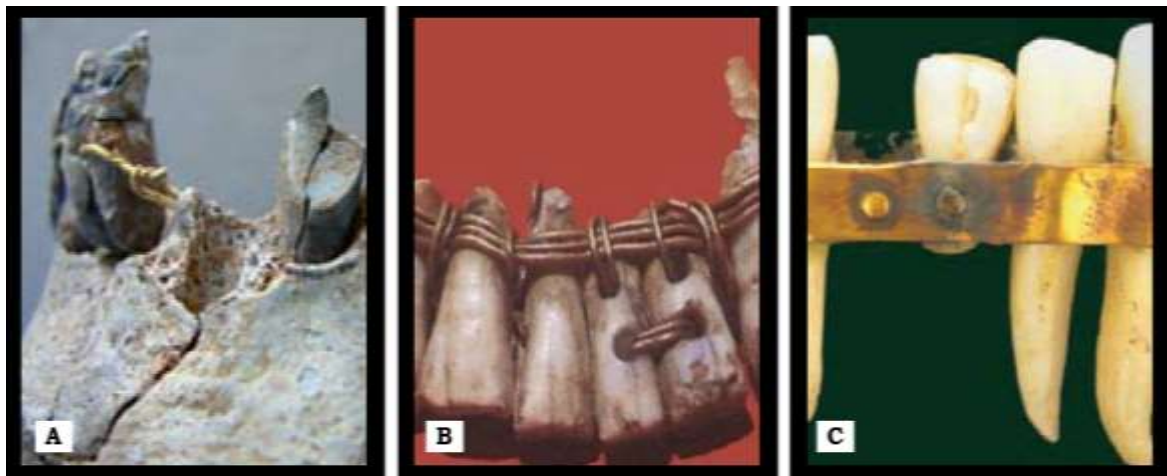
2. Fundamentos Teóricos

En este capítulo se desarrolla los temas fundamentales que fueron necesarios para el desarrollo de este trabajo de investigación, de esta forma se presentan los conceptos teóricos en los que se basan las técnicas de caracterización empleadas en el desarrollo experimental.

2.1 Biomaterial

Utilizar biomateriales para reconstruir, corregir o reemplazar partes del cuerpo humano es una práctica que data de muchos años atrás, hallazgos antropológicos han evidenciado que pueblos como los etruscos, romanos, chinos, fenicios e incluso aztecas utilizaban diversos materiales para reparar o sustituir partes del cuerpo, así, por ejemplo emplearon el oro en cirugía dental, de igual forma conforme a la Figura 2.1A, se muestra dientes de madera unidos entre sí por alambre de oro de origen romano; en la Figura 2.1B, se observa una prótesis dental fenicia que data del período 400-600 a.C.; por último en la Figura 2.1C, se presenta una prótesis dental de origen etrusco del año 300 a.C. [1,2].

Figura 2.1: Materiales usados para implantes [2]



En el año 1931, un cirujano de Boston, Marius Smith Petersen desarrolla un dispositivo de vidrio con la finalidad de ser utilizado como prótesis parciales de cadera y clavos para la fijación de huesos; más adelante en 1936, gracias a los trabajos de Venable y Stuck se introducen las aleaciones a base de cobalto para

cirugía ortopédica, convirtiéndose en las más populares dentro del campo de la ortopedia. Posteriormente, a principios de la década del 50, se inició con el desarrollo de las aleaciones a base de titanio, las cuales, aún siguen vigentes y empleándose constantemente en implantes, de igual forma, en esa misma década, las caderas de acero inoxidable comienzan a ser utilizadas de manera significativa [1,2,3].

Sin embargo, y aun cuando el uso de los materiales en medicina habían tenido una amplia cobertura, el termino biomaterial, solo es introducido a partir de los simposios llevados a cabo en la Universidad de Clemson en Carolina del Sur, Estado Unidos, en el año de 1969. Estos simposios dieron lugar a la formación de la Sociedad de Biomateriales de los Estados Unidos de América, quien llevó a cabo su primera reunión en 1975, donde ya se contaba con investigadores e ingenieros que diseñaban materiales con un criterio específico y científicos que exploraban la naturaleza de la biocompatibilidad [2].

Actualmente, los biomateriales se definen a nivel general, como materiales diseñados para intervenir en un sistema biológico con la finalidad de restaurar, tratar o reemplazar alguna articulación, algún tejido o suplir una función del cuerpo. La principal característica es que deben ser biocompatibles, de acuerdo a su propósito, se espera que sea bioinerte, es decir, que su interacción con el medio biológico al cual está sometido sea nula, sin embargo, también hay biomateriales que se espera que sean bioactivos donde debe existir una interacción con el organismo, favoreciendo la regeneración de los tejidos; o bien que sean biotolerantes, los cuales inducen alteraciones a los tejidos y son aislados por los tejidos fibrosos; el que tengan cualquiera de estas características, depende fundamentalmente de su aplicación [31].

Es así, como un biomaterial usado con fines odontológicos, se espera que su respuesta no sea tóxica, al estar en medio húmedo constante, no deben generar degradación ni mucho menos corroerse, no deben mostrar susceptibilidad a la temperatura, por el contrario, el hilo usado para suturas internas se espera que una vez cumplida su función, sea absorbido y degradado por el mismo organismo; de esta manera, el biomaterial tiene una relación directa con el tejido, durante un periodo de tiempo, mientras cumple su función, por ello no debe, causar efectos adversos al resto del organismo, de la misma forma, éste no debe afectarlo [32,33].

La Conferencia de Desarrollo de Consenso de las Instituciones Nacionales de Salud, definió como biomaterial a cualquier sustancia diferente a los fármacos, o combinaciones de sustancias de origen sintético o natural, que pueden ser usadas por un largo periodo de tiempo, como un complemento o una parte de un sistema que reemplaza o restaura a algún tejido, órgano o función del cuerpo [34].

Las características principales que son evaluadas en un biomaterial que va a ser implantado son:

- Biocompatibilidad
- Resistencia a la corrosión

- Estabilidad química
- Adhesión celular
- No presentar efectos citotóxicos
- Tener buena resistencia mecánica
- Optimo tiempo de fatiga [4,35,36]

La utilización de metales en implantes biomédicos ortopédicos y odontológicos se fundamenta en las exigencias mecánicas extremas a las que éstos están sometidos en el momento en que entran en servicio. Con respecto a los biomateriales bioinertes, se esperaría, que no presente ningún tipo de actividad en el cuerpo humano, sin embargo, ocasionalmente sucede así [35]. Es de mencionar que los fluidos orgánicos son extremadamente agresivos para los materiales metálicos y su efecto sobre los implantes puede ser perjudicial [6]. Sin embargo, aunque estos materiales son susceptibles de corrosión, tienen la capacidad de formar una película protectora que es capaz de mantener los niveles de corrosión en valores aceptables, lo que permite su óptima aplicación. La eficacia de la película superficial que se forma naturalmente depende esencialmente de la resistencia de las capas de pasivación originada de forma espontánea y natural del mismo material.

Con relación a los biomateriales bioactivos, estos pueden ser de origen natural o de origen sintético, su función primordial es estimular el crecimiento del tejido. De acuerdo a la naturaleza del biomaterial, se pueden clasificar como cerámicos, metálicos, poliméricos o como combinaciones de estos tres [36]. Así, el desarrollo de biomateriales con miras a producir una respuesta biológica específica es una necesidad de investigación científica, que permite tener una gran variedad de biomateriales.

2.2 Biocompatibilidad

En el año 1829, Levert realizó los primeros estudios tendientes a determinar la biocompatibilidad de materiales para implantes, ensayando plata, oro, plomo y platino en perros. Se consideró la biocompatibilidad como la habilidad que tiene un sustrato para dar un soporte adecuado a la actividad celular, incluyendo la facilitación de sistemas de señales para optimizar la regeneración tisular, sin producir una respuesta indeseable a nivel local o sistémico en un huésped eventual [2].

Sin embargo, se hace necesario redefinir la biocompatibilidad como la habilidad de un biomaterial para llevar a cabo una función requerida con respecto a una terapia médica, sin producir efectos indeseables locales o sistémicos en el beneficiario de esta terapia, generando una respuesta apropiada y benéfica en una situación específica y a la vez optimizando el rendimiento clínico, el cual, es relevante para esa terapia [37,38].

En las últimas décadas, la ciencia ha orientado sus trabajos de investigación a mejorar las propiedades físicas y biológicas de los biomateriales. En la década del 70, comienza el uso de materiales porosos para asegurar el crecimiento del hueso alrededor del implante y, en la siguiente década, se mejoran, sustancialmente, tanto los materiales como las técnicas quirúrgicas. En 1984, el cirujano William Harris, en colaboración con el MIT (Massachusetts Institute of Technology) desarrolla el equipamiento necesario para medir *in vivo*, en el cuerpo de un ser vivo, la presión real a la que es sometida una cadera funcional; y, finalmente, en ese mismo año, se introduce el sistema modular de reemplazo de cadera que consistía en una prótesis formada por varias partes cambiables [39].

2.3 Recubrimiento

2.3.1 Sustrato Acero Inoxidable 316L

Los aceros inoxidable son aleaciones de hierro con un mínimo de 10,5% de cromo. Sus características de resistencia a la corrosión se obtienen mediante la formación de una película adherente e invisible de óxido de cromo. La aleación 316L es un acero inoxidable austenítico de uso general con una estructura cúbica de caras centradas. Es esencialmente no magnético en estado recocido y sólo puede endurecerse en frío. Se añade molibdeno para aumentar la resistencia a la corrosión especialmente en entornos que contienen cloruros. El bajo contenido en carbono de la aleación 316L otorga una mejor resistencia a la corrosión en estructuras soldadas [40].

El acero inoxidable 316L, es considerado como un acero de elevada resistencia a la corrosión, teniendo en cuenta que el alto contenido de cromo, tiene gran afinidad con el oxígeno, lo que hace que reaccione con él formando una capa pasivadora, evitando así la corrosión del hierro. El acero tipo 316L es una modificación de bajo carbono para minimizar la formación de carburos durante el proceso de soldadura [41].

La composición química que presenta el acero inoxidable 316L se encuentra resumida en la Tabla 2.1. y las propiedades principales que presenta este acero se exponen en la Tabla 2.2.

Tabla 2.1. Composición química del acero 316L [41]

COMPOSICIÓN QUÍMICA 316L		
Carbono	C max. 0.03%	Si max. 1.00%
Manganeso	Mn max. 2.00%	Cr 16.00 / 18.00%
Fósforo	P max. 0.045%	Ni 10.00% / 14.00%
Azufre	S max. 0.030%	Mo 2.00% / 3.00%

Tabla 2.2. Propiedades del acero 316L [41]

	RESISTENCIA A LA TENSION (Kg/cm ²)	PUNTO DE CEDENCIA (Kg/cm ²)	% ELOGACION EN 50.8 m.m.	REDUCCION DE AREA	DUREZA BRINELL
Recocido (1070°C) 1"Ø	6025	2530	70	80	150
Estirado en frío 1"Ø	7240	5200	50	75	150

Kg/cm² x 14.22 = lbs/pulg²

2.3.2 Titanato de Bismuto

Los compuestos de bismuto están clasificados dentro de una familia denominada Aurivillus, donde su característica principal es que se puede describir mediante la fórmula $Mn^{+1}BnO_{3n+1}$, esta es una estructura laminar, donde M y B son iones con radio iónico y valencia apropiados, entre los cuales se encuentra Bi^{+3} , Pb^{+2} , Ba^{+2} , entre otros, para M; y Ti^{+4} , Nb^{+5} , Ta^{+5} , entre otros para B. Otra característica hace referencia a las propiedades ferroeléctricas que se consiguen a temperaturas relativamente elevadas mayores de 500°C. Entre ellos el $Ti_4Bi_3O_{12}$, es uno de los más estudiados. Su estructura está formada por dos unidades de $(Bi_2Ti_3O_{10})_2$ tipo pseudoperovskita intercaladas con capas $(Bi_2O_2)^{2+}$ situadas paralelamente [42]

Es de mencionar, que también se encuentra otras fase del Titanato de Bismuto como es la fase meta-estable $Bi_2Ti_4O_{11}$ y la Bi_2OTiO_{32} , también está la Sillenita que está formulada como $Bi_{12}TiO_{20}$ entre otras [43].

2.4 Técnica de producción de películas delgadas

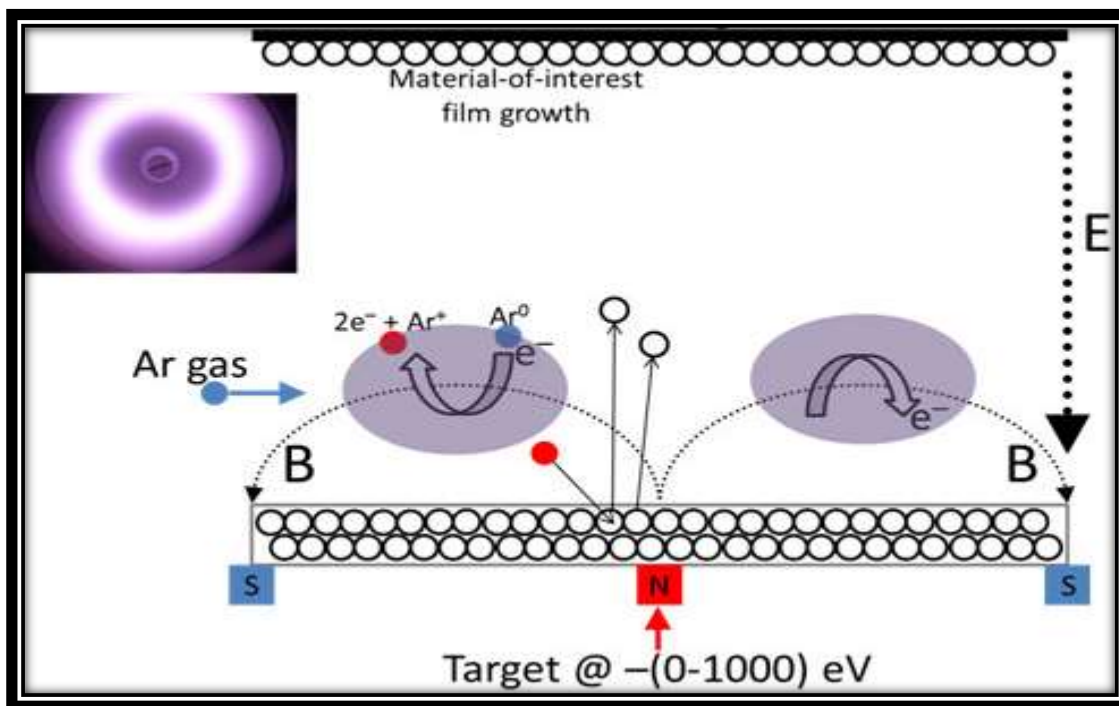
2.4.1 Sputtering

El Sputtering es una técnica de deposición física en fase de vapor, que consiste en bombardear el material de aporte en forma atómica, el cual, se encuentra inicialmente en una superficie de un sólido denominado blanco o target. Esto es posible gracias al intercambio de momentum que se genera por un bombardeo iónico con partículas cargadas energéticamente, las cuales, son iones de un gas noble, en su generalidad argón (Ar) [44].

Este fenómeno de Sputtering fue observado en 1852 por Grove, quien se dio cuenta que los iones energéticos desprendidos en la descarga de gas, se depositaron en la superficie del cátodo de un tubo de descarga de la misma manera el material del cátodo se depositó en el tubo de descarga en la pared interna de este; esta situación no era deseable por el contrario solía ser

altamente perjudicial, por cuanto, causaba serio daños a los equipos. Sin embargo, actualmente esta técnica tiene diferentes finalidades, entre las que se encuentran el depósito de películas delgadas, la limpieza y ataque de superficies, el análisis superficial y fuentes de iones. En la Figura 2.2 se muestra el esquema de pulverización catódica en fase vapor [44].

Figura 2.2. Proceso Sputtering [44]



Esta técnica de deposición es necesario que se lleva a cabo dentro de una cámara de vacío, allí los sustratos se han de colocar frente al target, de donde se desprenden las partículas que son interceptadas y adheridas al sustrato.

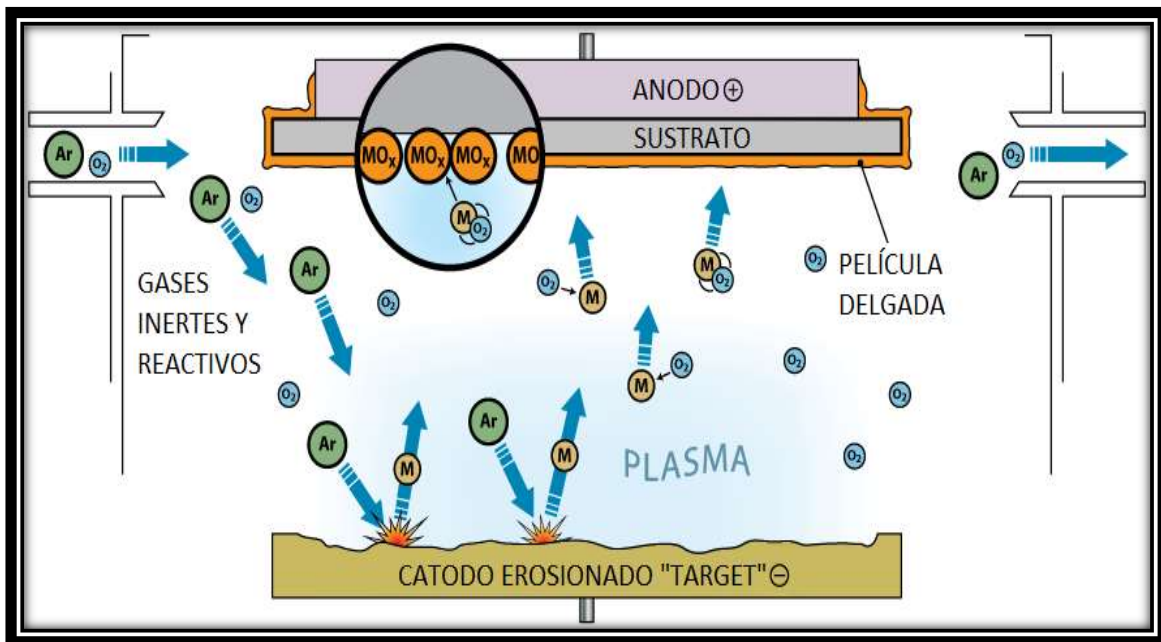
Inicialmente la cámara es evacuada a presiones de $5E-4$ mbar y $5E-7$ mbar, con la finalidad de proporcionar una atmósfera descontaminada, es decir, que no haya intervención de gases ambientales, los cuales son perjudiciales, por un lado, puede causar contaminación del Target causándole alteración en su composición química y por otro de la superficie de los sustratos. Posterior a este proceso, la cámara se debe llenar con gas de trabajo, el cual, en su generalidad es Argón, se introduce hasta alcanzar presiones de entre $1E-2$ mbar y $1E-3$ mbar. Una vez llegado a este punto se ha de iniciar la descarga eléctrica, donde, se aplican diferencias de potencial entre los electrodos, que generalmente se encuentran en el rango entre 500 y 5000V, y se utilizan tanto corrientes directas como corrientes alternas. Así iniciada la descarga la función de electrodo negativo o cátodo será desempeñada por el Target, y la función de electrodo positivo o ánodo le corresponderá desempeñarla a los sustratos [45].

En la medida que el material del target sea un buen conductor eléctrico, es decir sea metal, se han de utilizar corrientes directas, por el contrario si el material

del target es un aislante o tiene una conductividad eléctrica muy baja se deben utilizar corrientes alternas, esto con el propósito que no se acumule carga en la superficie del Target.

Adicionalmente, la técnica de Sputtering, puede ser modificada mediante un proceso denominado Sputtering reactivo, el cual consiste en la introducción de otros gases como: oxígeno y nitrógeno, los cuales, se pueden introducir conjuntamente o introducir por separado; este proceso se hace con el objetivo que los gases reactivos interaccionan con el material que se desprende del target formando un compuesto que posteriormente se depositara en la superficie del sustrato, este proceso es conocido como Sputtering reactivo, en la Figura 2.3 se observa este proceso [45].

Figura 2.3. Proceso sputtering reactivo.



La técnica de Sputtering reactivo, es usada para la producción de películas delgadas de materiales que cuentan con una composición compleja, donde los resultados suelen ser óptimos y con diversas aplicaciones.

2.5 Técnicas de caracterización

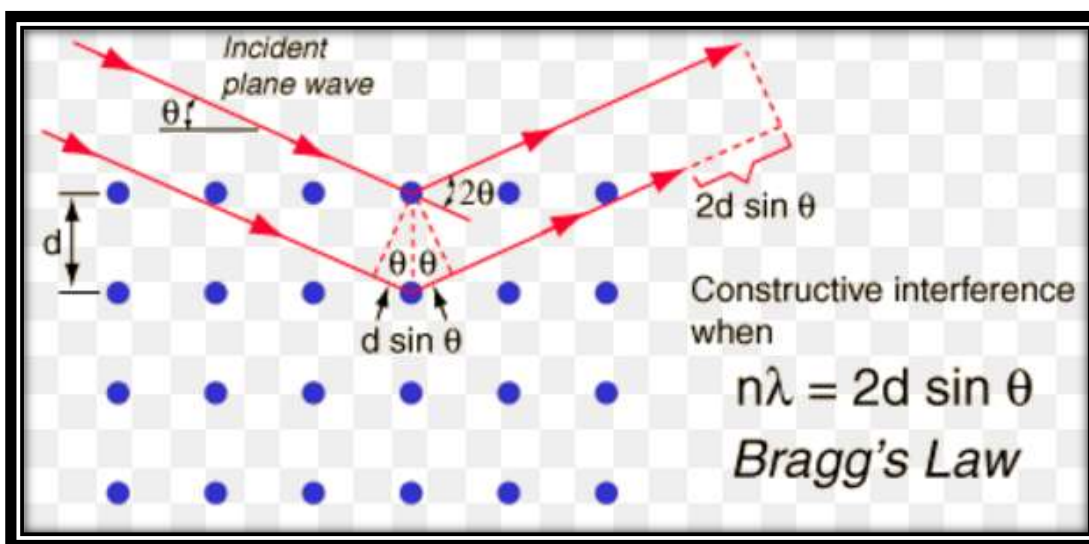
2.5.1 Difracción de Rayos X (XRD)

La difracción de rayos X (XRD) X-Ray Diffraction por sus siglas en inglés es una técnica muy versátil ya que es un ensayo no destructivo y en muchos casos no requiere de preparación en la muestra. Esta técnica se encuentra regida por la ley de Bragg quien observó que las sustancias cristalinas dan lugar a patrones

de rayos X reflejados muy característicos y con picos intensos. Bragg considero que los rayos X deben reflejarse especularmente en cada plano y que los rayos reflejados por cada plano deben interferir constructivamente [46, 47].

Los rayos reflejados en dos planos se encuentran separados por una distancia d , la cual determina la diferencia de fase de los campos eléctricos y por lo tanto la posibilidad de obtener interferencia constructiva. En la Figura 2.4 se observa la incidencia de los rayos X, si θ es el ángulo de incidencia la diferencia de camino óptico es $2d\sin\theta$, para que la interferencia provocada por los rayos sea constructiva la diferencia entre los planos debe ser un número entero de veces la longitud de onda incidente. Por lo tanto $n\lambda=2d\sin\theta$ [48].

Figura 2.4. Incidencia de los Rayos X [49].



2.5.2 Espectroscopia De Fotoelectrones XPS

La Espectroscopia De Fotoelectrones XPS, es un método de caracterización que debido a que la información que proporciona es obtenida de las primeras capas atómicas es considerada como espectroscopia de superficie. Usa como fundamento la medición de electrones arrojando información cualitativa y cuantitativa de todos los elementos presente en la muestra de análisis [50].

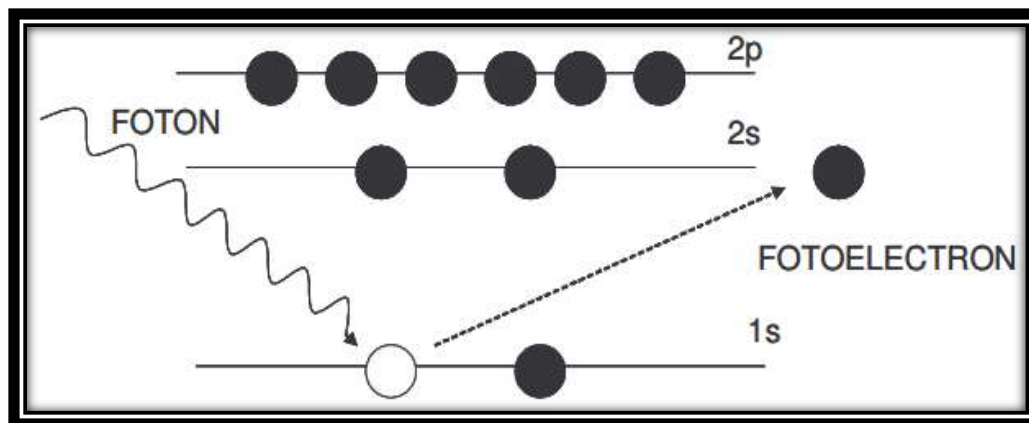
Entre las aplicaciones que se derivan de este método de caracterización se encuentran las siguientes las cuales son realizadas en los primeros 10 nm de la superficie [51]:

- Identificación de todos los elementos presentes excepto H_2 , He, en concentraciones mayores al 0.1%.
- Determinación semicuantitativa de la composición elemental de la superficie (error $< \pm 10 \%$).

- Información acerca del entorno molecular: estado de oxidación, átomos enlazantes, orbitales moleculares.
- Información sobre estructuras aromáticas o insaturadas a partir de las transiciones $\Pi^* \rightarrow \Pi$.
- Información de grupos orgánicos utilizando reacciones de derivatización.
- Perfiles de profundidad de 10 nm no destructivos y destructivos de profundidades de varios cientos de nanómetros.
- Variaciones laterales en la composición de la superficie.
- Estudio sobre superficies hidratadas (congeladas).

Para la técnica XPS es necesario tener en cuenta el efecto fotoeléctrico y de fotoemisión, donde el fotón interacciona con electrón de un orbital atómico con una transferencia total de la energía del fotón hacia el electrón, ocurriendo la emisión del electrón del átomo [52].

Figura 2.5. Diagrama del proceso fotoelectrónico [53].



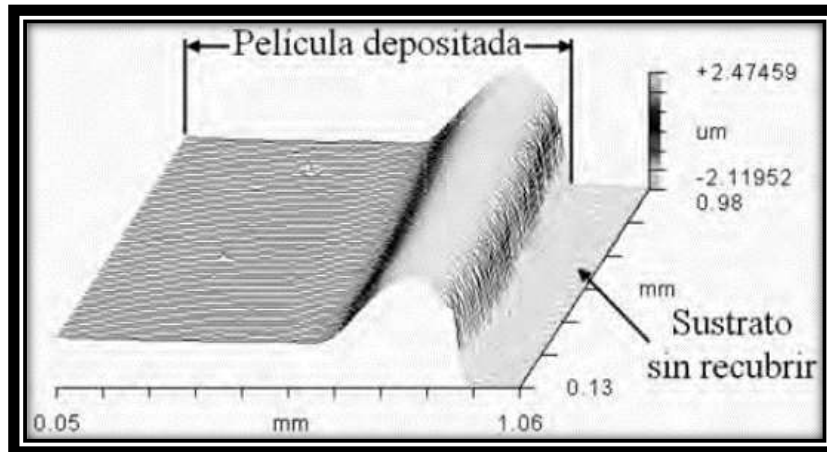
2.5.3 Rugosidad

La rugosidad es una caracterización que se realiza a las capas delgadas, que reviste de gran importancia, teniendo en cuenta que a partir de allí se definen propiedades del material y se determina su utilidad.

La rugosidad está definida como la medida del relieve topográfico de una superficie; existen diferentes métodos para hacer un análisis de rugosidad entre los que se encuentran la medida del perfil de una superficie y medida de dispersión óptica. Con relación a la primera técnica se usan métodos en los cuales se mide el perfil topográfico, y la segunda se fundamenta en el análisis de la dispersión de la luz causada por la rugosidad de la superficie [50]. En la

Figura 2.6 se muestra una imagen tridimensional de evaluación de rugosidad, tomada y modificada mediante un perfilómetro óptico.

Figura 2.6. Imagen tridimensional de evaluación de rugosidad [54].



2.5.4 Espesor de capa

El espesor de capa es una medida de gran importancia, en la caracterización de capas delgadas, teniendo en cuenta, que con esta medición se definen propiedades del material, de hecho se ha constituido como una variable a controlar, puesto que la variación es constante, normalmente se encuentra en el rango nanométrico.

Para la medición del espesor de capa existen diversos métodos, entre los que se encuentra el método de pesada, el cual se fundamenta en determinar de manera directa la masa depositada en forma de capa delgada, para ello es necesario conocer la densidad del material. Otro método que es altamente empleado es el resonador de cuarzo, el cual, consiste en un cristal de cuarzo que se ha recubierto en sus caras con metal los cuales actúan como electrodos; este método permite la medición del espesor de la capa durante el crecimiento de la película [50].

Entre los métodos eléctricos para determinar el espesor de capa se encuentra la medida de la resistencia eléctrica mediante un puente Wheatstone, aquí se tiene en cuenta la relación entre el espesor de capa con la resistencia. La medida de la capacidad es usada para películas de materiales y dieléctricos. Dentro de esta categoría se encuentra la ionización, en la que se mide la velocidad de deposición mediante la ionización de haz de átomos [50].

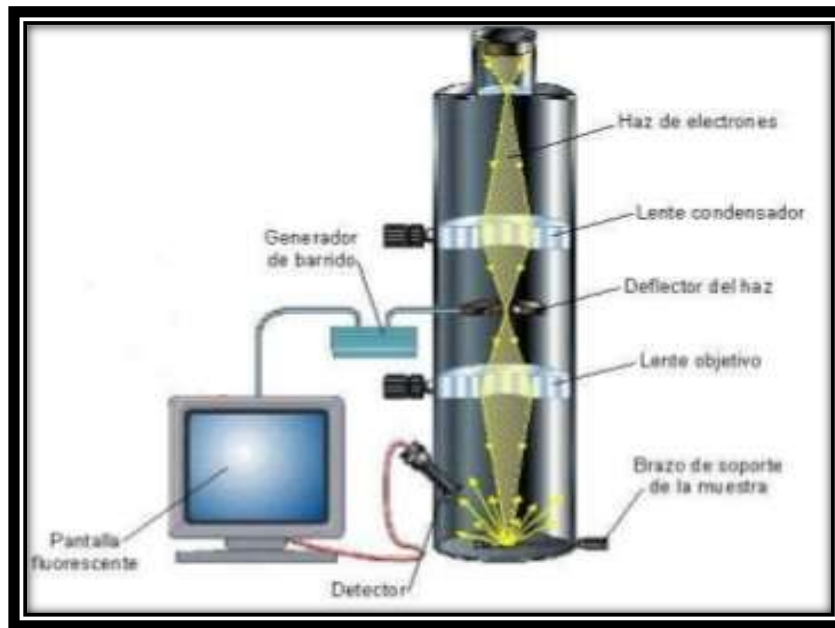
Por último están los métodos ópticos como son los basados en la medida del coeficiente de absorción donde se hace incidir un haz de luz de longitud de onda y de intensidad determinada sobre la película delgada. Métodos basados en la interferencia de la luz donde se tiene en cuenta el ángulo de incidencia sobre la película delgada. El uso del perfilómetro el cual consta de una punta de

diamante que hace contacto con la superficie con un movimiento vertical dado por las irregularidades de la superficie la cual es convertida en una señal eléctrica [50].

2.5.5 Espectroscopia Electrónica De Barrido SEM

La espectroscopia electrónica de barrido es una técnica óptica que se fundamenta en un haz de electrones para formar una imagen. Se caracteriza por tener una profundidad de campo amplia, lo que permite que se enfoque una gran parte de la muestra produciendo imágenes de alta resolución, de forma tal que las características más mínimas de la muestra pueden ser examinadas con gran amplificación. Esta técnica permite observar los aspectos morfológicos y las irregularidades de zonas microscópicas de los materiales, por medio del procesamiento y análisis de las imágenes obtenidas [51]. En la figura 2.7 se encuentra el proceso para Espectroscopia Electrónica De Barrido SEM, donde se puede observar detalladamente.

Figura 2.7. Esquema de Espectroscopia Electrónica De Barrido SEM [55].



Con relación a la preparación de las muestras es un procedimiento que resulta sencillo, teniendo en cuenta, que la mayoría de los SEM sólo requieren que las muestras a analizar sean conductoras. De esta forma, una muestra no conductora es recubierta con una capa de carbono o una capa delgada de un metal como el oro para conferirle carácter conductor.

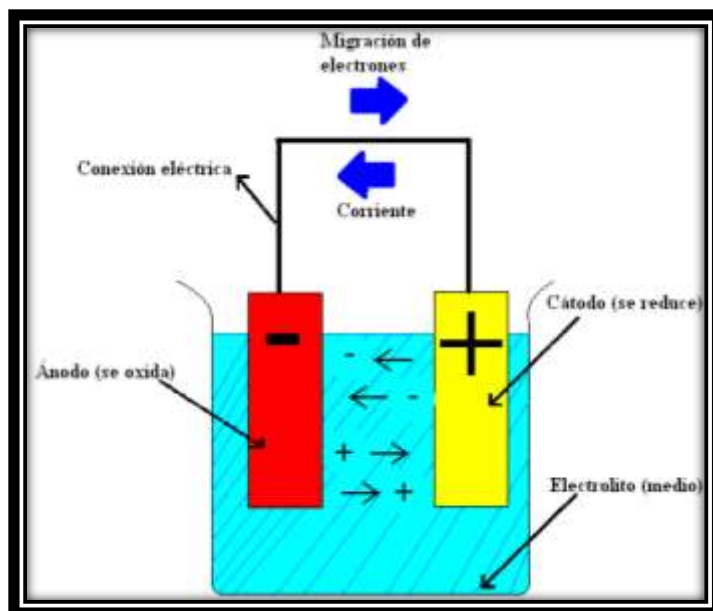
Para llevar a cabo el análisis por espectroscopia electrónica de barrido, el equipo dispone de un cañón de electrones y de una cámara, donde se ubican las muestras, por medio de un barrido los electrones acelerados viajan a través del cañón, donde se encuentran ubicados los detectores para las diferentes señales

generadas por la interacción entre los electrones y la muestra, allí se mide la cantidad e intensidad de electrones que devuelve la muestra, siendo capaz de mostrar figuras en tres dimensiones mediante imagen digital. Su resolución está entre 4 y 20 nm, dependiendo del microscopio [56].

2.6 Técnicas para la evaluación de la resistencia a la corrosión

La corrosión electroquímica generalmente sucede en un medio acuoso. Para este propósito es definitivo la presencia de tres elementos fundamentales y la ausencia de alguno de ellos hace que el fenómeno no ocurra. Estos tres elementos son un ánodo, donde se lleva a cabo el fenómeno de corrosión, un cátodo y un electrolito, al ánodo y al cátodo también se les suele denominar electrodos. En la corrosión electroquímica los átomos del metal son oxidados dejando la red del metal como iones, lo cual, genera un exceso de electrones en la superficie del metal. Estos electrones pueden ser transferidos a una especie activa en el electrolito produciéndose la reacción de reducción [57]. En la Figura 2.8 se encuentra el esquema de una celda electroquímica, donde se puede observar los elementos esenciales para que se lleve a cabo el proceso corrosivo.

Figura 2.8. Celda electroquímica [58].



En el ánodo se da la migración de electrones hacia el cátodo, motivo por el cual, quedan libres iones que se unirán a los presentes en el electrolito, esta es la reacción de oxidación. Mientras tanto, en el cátodo se lleva a cabo la reacción de reducción. Teniendo en cuenta que la corriente fluye del electrolito hacia el cátodo cerrando de esta manera el circuito [59,60].

Con relación al electrolito, este puede ser cualquier solución que tenga la capacidad de conducir el flujo de corriente, es decir, que sea un ambiente corrosivo.

La reacción de corrosión se conoce como reacción anódica y las áreas del electrodo donde ocurre se les llama ánodos. Las áreas donde ocurre la reacción catódica se denominan cátodos [59,60].

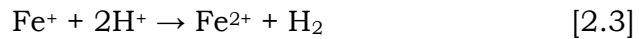
En el caso del acero, la reacción anódica que tiene lugar es:



Consecuentemente, una reacción catódica tiene lugar para iniciar y mantener la corrosión metálica. Un ejemplo de reacción catódica es la reducción de protones.



La reacción de corrosión total será la suma de ambas reacciones.

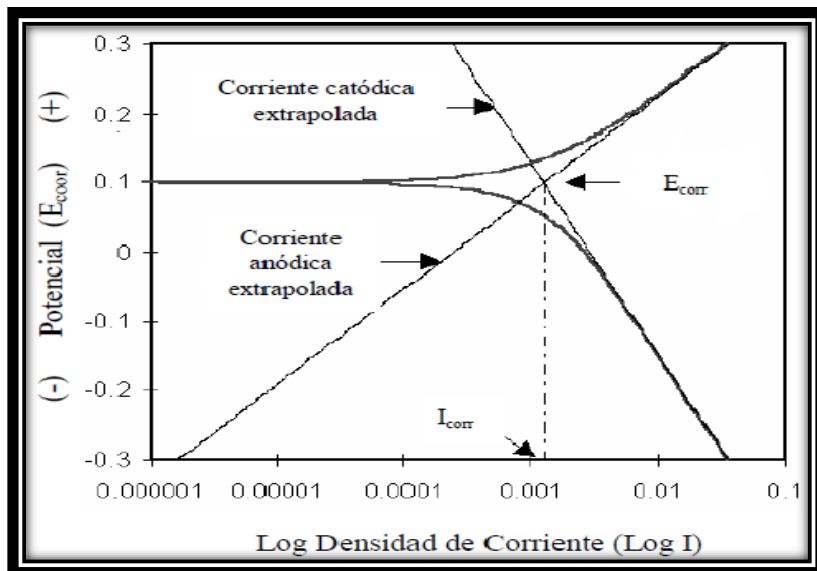


Tanto la reacción anódica como catódica dan lugar a corrientes llamadas anódica y catódica respectivamente y la corriente total sumada de ambos procesos es proporcional a la velocidad de corrosión [60].

2.6.1 Polarización Potenciodinámica (Tafel)

Este método implica la determinación de las pendientes de Tafel β_a y β_c , teniendo en cuenta, que ayudan a determinar las características activas y pasivas del sistema de corrosión, tales como el potencial de corrosión, la corriente de corrosión y la velocidad de corrosión [59]. En la Tabla 2.9 se observa el diagrama modificado de Polarización Potenciodinámica (Tafel) para determinar densidad corriente de la corrosión, allí se muestran las diferentes zonas características de estas curvas.

Figura 2.9. Diagrama para determinar densidad de corriente de corrosión [61].

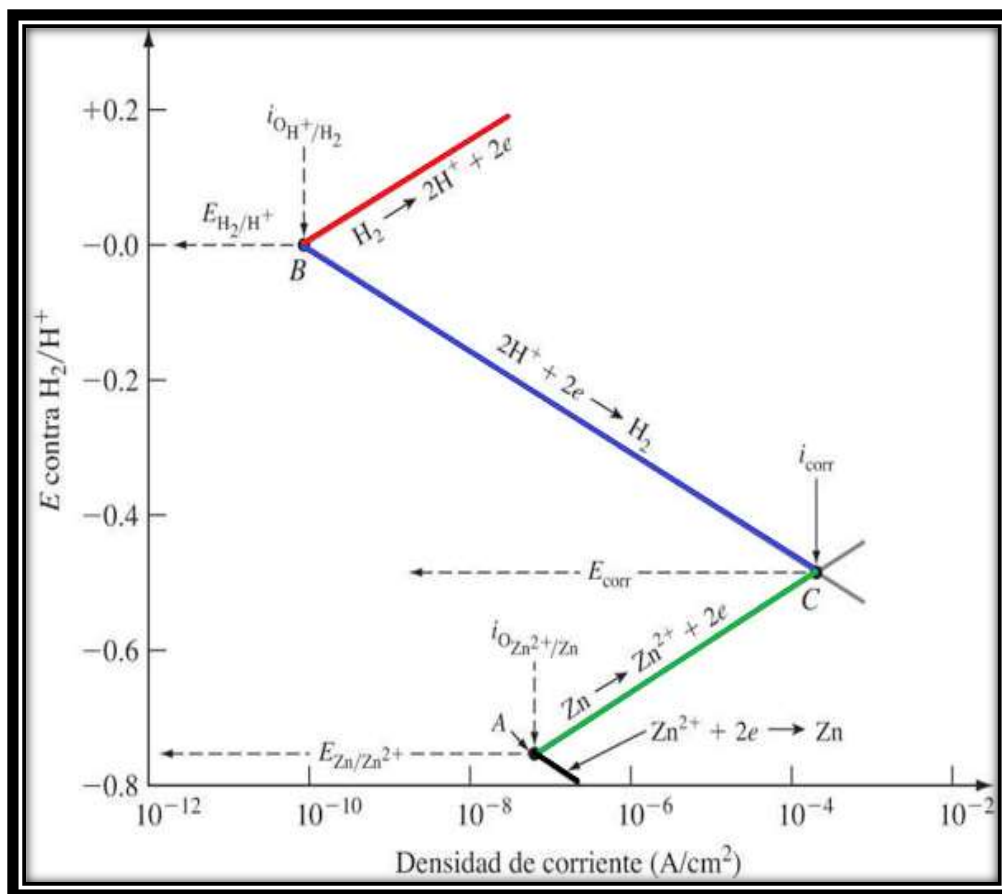


También, se encuentran las densidades de corriente $i_{o,H}$ y $i_{o,M}$ y sus contrapartes los potenciales $E_{o,H}$ y $E_{o,M}$. Para la evolución del hidrógeno y la oxidación del metal, respectivamente. Estos potenciales son conocidos como circuitos abiertos de potencial. Más allá, el límite de la densidad de corriente i_L para la polarización catódica, se incluye como una información adicional que se puede extraer de la curva de polarización [59].

El potencial de corrosión corresponde a un potencial mixto en el cual la velocidad de la reacción anódica es igual a la velocidad de la reacción catódica y la corriente neta es 0. En este punto el sistema está cambiando y el metal se está disolviendo y pierde masa [62].

La corriente de corrosión $I_{\text{corr}} = I_a = -I_c$ indica la corriente que se obtiene en los diagramas de Evans cuando se produce el cambio de comportamiento del sistema o también cuando las pendientes de Tafel tienen su intersección. A partir de la corriente de corrosión y el área afectada por el fenómeno corrosivo se puede hallar la densidad de corriente de corrosión. En la figura 2.10 se observa la Curva de polarización.

Figura 2.10. Curva de polarización Potenciodinámica (Tafel) [63].



2.7 Técnicas para la evaluación de biocompatibilidad

La biocompatibilidad, es un análisis imprescindible para lograr determinar si un material es biológicamente viable o no. Existen dos clases de ensayos experimentales que se suelen realizar *in vitro* e *in vivo*, para determinación de la biocompatibilidad. En el primer grupo se encuentran diferentes ensayos, entre las que se pueden destacar: La inmersión del material en soluciones similares a los fluidos biológicos, ángulo de contacto, resistencia a la corrosión, proliferación celular. Con relación a los ensayos *in vivo*, se llevan a cabo con animales [64].

Entre las técnicas usadas *in vitro* e *in vivo* para determinar la viabilidad de los materiales se suelen hacer pruebas preliminares entre las que se encuentran [64]:

- Citotoxicidad
- Hemólisis
- Potencial de mutación
- Transformación celular

El estudio de biocompatibilidad reviste de gran importancia entre los materiales destinado a uso biológico, por cuanto existen diferentes reacciones adversas que se pueden presentar como consecuencia del uso de biomateriales, entre las que pueden considerarse [64]:

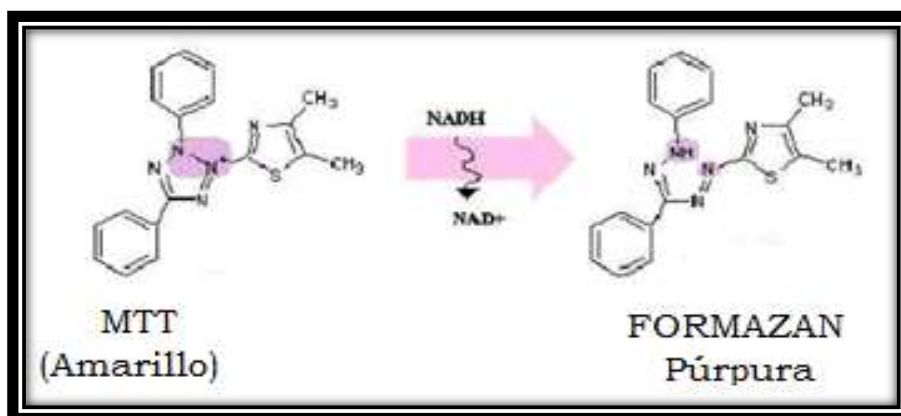
- Irrigación
- Inflamación
- Toxicidad sistémica
- Sensibilización
- Mutagenicidad
- Carcinogenicidad
- Interacción con la sangre
- Reacción a partículas extrañas

2.7.1 Viabilidad celular MTT

Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983 siendo modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang, y se fundamenta principalmente en la cantidad de células vivas que son proporcionales a la cantidad de formazán producido.

Esta técnica se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), el cual, es de color amarillo, esta reducción realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color púrpura característico del formazán, permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células evaluadas. Este procedimiento ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular [65,66]. En la figura 2.11 se describe la reacción de MTT a formazán por acción del metabolismo mitocondrial

Figura 2.11. Reacción de MTT a formazan por acción del metabolismo mitocondrial [67].



La reducción de MTT, depende esencialmente de NAD (P) H-dependiente de las enzimas oxidorreductasa en gran parte en el compartimento citosólico de la célula. Las células con un metabolismo bajo como timocitos y esplenocitos reducen muy poco el reactivo MTT. En contraste, las células que se dividen rápidamente exhiben altas tasas de reducción de MTT [65,66].

Para el desarrollo de esta técnica en esta investigación se utiliza osteoblastos, que por microscopia óptica se caracterizan por presentar un núcleo redondo, un citoplasma basófilo y un aparato de Golgi prominente, además de presentar complejos de unión entre ellos [68]. A partir de la célula osteógena se obtiene el osteoblasto que es la célula formadora del tejido óseo, el cual, es mantenido por los osteocitos; esto, se puede observar en la parte izquierda de la Figura 2.12; en la parte derecha se presenta la vista microscópica de células óseas.

Figura 2.12. Vista microscópica de osteoblastos [69].



Los cultivos in vitro de osteoblastos se realizan en medios suplementados como el Dulbecco modificado de Eagle (DMEM), de acuerdo al Tabla 2.3., medio Iscove modificado de Dulbecco (IMDM) suplementados con suero fetal bovino (SFB),

aminoácidos esenciales, piruvato de sodio y antibióticos como el Clavamox a temperatura de 37°C y 5% CO₂ [70].

Tabla 2.3. Composición del medio Dulbecco modificado de Eagle (DMEM) [71].

COMPOSICIÓN	
Componentes	mg/L
Glucosa	1000
Bicarbonato de sodio	3.7
L-Glutamina	0.5

El medio Dulbecco además contiene Rojo de fenol Indicador de pH, amarillo: pH < 6.8 y rojo fucsia pH > 8.2, Piridoxina (vitamina B2) 10x, Sales inorgánicas CaCl₂, KCl, MgSO₄, NaCl y NaH₂PO₄, Otras vitaminas Nicotinamida (vitamina B12) y ácido fólico (vitamina B9) [71]

El conteo celular se hace de manera directa a partir de las células vivas en una cámara Neubauer utilizando azul de tripán, buffer fosfatos salino BFS pH 7,4 y una cantidad determinada de solución de células resuspendidas. Se utiliza el azul de tripán que es un colorante azoico que puede atravesar la membrana celular de células muertas pero no la de las vivas, ya que la membrana celular de estas últimas es selectiva. Esto permite diferenciar entre células viables y no viables. La fórmula usada para determinar la concentración de células viables en una suspensión por conteo en cámara Neubauer es [72]:

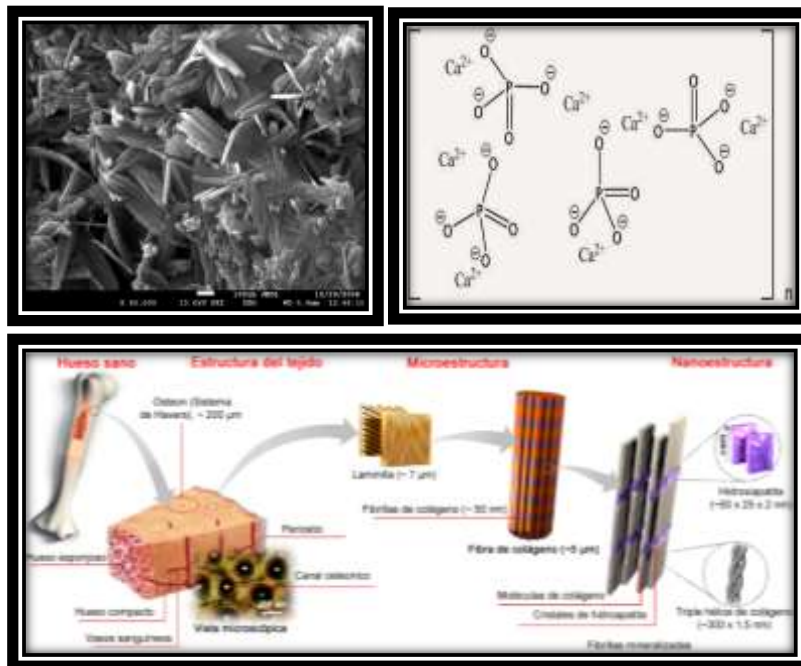
$$\text{Concentración células mL} = \frac{\text{No. células totales} \times 10000 \times \text{factor de dilución}}{\# \text{ cuadros contados cámara Neubauer}}$$

2.7.2 Formación de hidroxiapatita técnica Bone Like

Entre las sales de CaP, se encuentra la hidroxiapatita (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂), que es la fase cristalina termodinámicamente más estable de CaP en el líquido del cuerpo, es el principal constituyente mineral de los huesos y de los dientes de los vertebrados. Las nanopartículas de HAP pueden aumentar significativamente la biocompatibilidad y bioactividad de los biomateriales artificiales [73].

En la Figura 2.13., imagen A, en la parte superior derecha se puede apreciar hidroxiapatita obtenida mediante microscopio electrónico de barrido, en la imagen B, en la parte izquierda, se observa la estructura química. Se ha logrado determinar que la HAP puede promover el crecimiento del hueso, a través de un mecanismo denominado osteoconducción, sin causar ninguna toxicidad local o sistémica, ni inflamación o respuesta a cuerpos extraños. De acuerdo a la Figura 2.13, imagen C, parte inferior, muestra la estructura jerárquica de un hueso típico en varias escalas de longitud. La microestructura del hueso cortical o compacto consiste en sistemas de Havers la cual consiste en círculos de sección transversal y vista microscópica, con canales osteonícos y laminillas, y en la nanoescala, se observa el marco estructural, el cual, está compuesto por fibras de colágeno de haces de fibrillas de la misma proteína, mineralizadas [73].

Figura 2.13. A. Hidroxipatita obtenida mediante microscopio electrónico de barrido [74]. B. Estructura química de la hidroxipatita [75]. C. Estructura jerárquica de un hueso típico en varias escalas de longitud. [76]



La técnica de Bone Like, es utilizada para evaluar la biocompatibilidad de los biomateriales, mediante la formación de cristales de hidroxipatita sobre la superficie; este método consiste, en sumergir el biomaterial a evaluar en una solución que simula los fluidos corporales, la cual, contiene principalmente sales de calcio y fósforo, a una temperatura promedio de 37°C y a un pH de 7.4. [77].

Son diversas las técnicas empleadas para la caracterización de los cristales de HAP, obtenidos por la técnica Bone Like, como lo son: difracción de rayos X, Espectrometría XPS, microscopía de barrido electrónico SEM, espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDX) [78].

3. Bioética

3.1 Antecedentes

La palabra bioética es nombrada por primera vez por el protestante, teólogo, filósofo y educador alemán Fritz Jahr, quien usó la combinación Bio-Ethik en un artículo haciendo referencia a la relación entre el ser humano, las plantas y los animales [79]. Posteriormente Van Rensselaer Potter, biólogo estadounidense, considerado como el padre de la bioética hace referencia a este término utilizándolo como puente entre las ciencias humanas y las ciencias puras [80,81]. Para Potter era claro que debía existir un límite de los avances que a nivel científico se pudiera lograr a beneficio del hombre sin llegar a transgredir la ética humana, esta, era exactamente la finalidad de esta nueva ciencia. Así, la ciencia debía empezar a cuestionarse como era la forma en que se estaba interviniendo sobre la naturaleza, sobre la vida humana; eso precisamente eran los objetivos que Potter percibía para la nueva ciencia, pero no llegó a definir problemas éticos en concreto y por ello esta nueva ciencia quedaba sujeta a tener un significado muy amplio con contenidos no muy explícitos [82].

No obstante, con estas bases, se constituyen diversos centros de Bioética en diferentes partes del mundo, los cuales fueron fundamentales para el desarrollo de esta ciencia, de hecho en Colombia, los institutos de bioética son los que le han dado desarrollo no sólo a nivel médico y científico, sino que ha abierto sus fronteras a otras áreas [79].

Si bien es cierto, en Colombia la bioética tiene una historia muy reciente, sin embargo, se encuentra en constate auge; sus antecedentes se han establecido por etapas, la primera está comprendida entre los años 1975 a 1992. Aunque en este período no se estable en concreto un concepto de bioética, si se evidencian actos significativos que comienza a promover esta nueva ciencia, esto, teniendo en cuenta, que surge una preocupación del sentir del paciente no solo a nivel físico sino moral; así, por medio de seminarios basados en los derechos del paciente se empiezan a tratar temas complejos como el de muerte digna. También se evidencia una preocupación de los pacientes que se encuentran en la unidad de Cuidados Intensivos, pues, se empieza a evaluar los procedimientos a seguir para la toma de decisiones en esta área, de acuerdo a la situación concreta del paciente [83].

En el año de 1978, aunque es clara la falta de recursos tecnológicos y humanos se realizan procedimientos de gran interés para la ciencia médica como lo son los

trasplantes de riñón, donde es claro que el objetivo principal es atacar a la enfermedad, por lo que surge inquietud del uso de los recursos técnicos los cuales resultan ser muy costosos. En este mismo año, se funda la Escuela Nacional de Medicina, donde se introducen temáticas que fueron dando origen a la bioética, esto como parte de la formación humana del médico, de igual forma se adopta el concepto de bioética [83].

La primera publicación sobre bioética, se hace hacia el año 1981, titulada ¿Bioética o matando el miedo? en Universitas Medica. Posteriormente en 1989 Alfonso Llano publica en Actualidades medicas: Salud en Colombia un artículo titulado “Nace la Bioética en Colombia”, no obstante, ninguno de estos escritos tiene gran trascendencia, esto, porque aparecen como publicaciones aisladas sin continuidad [83].

Sin embargo, son los inicios del camino de la bioética como ciencia en Colombia, y lo que constituirá el segundo periodo el cual se ha comprendido entre 1995 y 1997, este, ha sido denominado, la Normalización. Aquí se llevan a cabo las primeras publicaciones con trascendencia, surgen las primeras especializaciones; al igual que los primeros institutos y junto con ellos las primeros profesionales que se dedicarían a esta área, principalmente los relacionados con la medicina [83].

A partir de 1997 y hasta la fecha se encuentra la tercera parte de la historia de la bioética en Colombia, aquí se evidencian aportes significativos, con la llegada del profesor Carlos Maldonado a la Universidad el Bosque, quien logra ampliar el marco de aplicación de la bioética, puesto que estuvo limitada al área de la salud, así se comienza a estudiar la relación de la bioética con el medio ambiente, con la ciencia, con la tecnología entre otros [83].

Con estos valiosos aportes, se ha ido consolidando la Bioética como una ciencia interdisciplinar, que apoya y coopera de manera significativa a otras áreas del conocimiento, acentuando así, la visión de la necesidad de que ciencias humanas y ciencias puras dirijan sus miradas al mismo objetivo.

3.2 Concepto

Van Rensselaer Potter, hacia la década de los 70, utilizó el término bioética para referirse a los problemas que se suscitaban entre el acelerado desarrollo de la tecnología aplicado a la ciencia y los valores humanos que entraban en crisis. Esta compleja situación hacía que fuera necesario que se buscaran soluciones acertadas para superar la ruptura que se estaba creando entre la ciencia y las humanidades [80,84].

El Programa Regional de Bioética ha definido la bioética como el uso creativo del diálogo para formular, articular y en lo posible resolver los dilemas que plantea la investigación y la intervención sobre la vida, la salud y el medio ambiente [80,82].

Era evidente que el desarrollo tecnológico empezaba a traspasar fronteras nunca antes vistas hasta el punto que el hombre empezó a manipular su propia naturaleza y alterar el medio con una marcada ausencia de responsabilidad, es de mencionar, que los objetivos planteados por la ciencia se dirigían únicamente a dar respuestas a necesidades humanas, por tanto, no era de interés evaluar que afecciones se estaban generando a nivel ético.

Así, las cosas, era indispensable que los logros obtenidos a nivel científico dirigidos a ser beneficio para el hombre debían tener una visión más amplia y no agredir su integridad ni su humanidad, como tampoco deteriorar el entorno natural. Entonces, surge la bioética como un medio de solución para establecer un puente entre ciencias puras y ciencias humanas. Pues, con la bioética se espera que mediante la formulación de principios y su plena observancia se afronte con responsabilidad la labor científica.

En la *Encyclopaedia of Bioethics*: la definición de bioética es: “estudio sistemático de la conducta humana en el ámbito de las ciencias de la vida y de la salud, analizada a la luz de los valores y principios morales” [85]. Por tanto, la bioética implica la valoración de la responsabilidad humana, cada vez que su actuar involucre aspectos de la vida.

La bioética para su aplicación se divide en una parte general o fundamental y en una parte especial o aplicada. La bioética general se basa en los fundamentos éticos, en los valores y en los principios que han de dirigir el juicio ético. La bioética especial o aplicada trata los casos puntuales, tanto a nivel médico como los relacionados al campo tecnológico, económico, político, social y cultural [86].

Siempre que el actuar humano implique la vida, la bioética estará presente, por ello, la bioética debe ser concebida como aquella parte de la ética o filosofía moral que estudia la licitud o no licitud de las intervenciones sobre la vida del hombre, particularmente de aquellas relacionadas con la práctica y el desarrollo de las ciencias médicas y biológicas [87].

3.3 Características

La bioética como lazo de unión y como ciencia generadora de respuestas a las necesidades que se suscitan en la generación de nuevo conocimiento científico, en la manipulación biológica, además de llevar a cabo, la evaluación de la responsabilidad humana al desarrollar estos eventos, tiene las siguientes características [82]:

- Global: es universal
- Científica y sistemática
- Interdisciplinaria: tiene relación con varias disciplinas
- Secular: no tiene directrices religiosas
- Prospectiva: promueve el desarrollo continuo
- Práctica: su naturaleza es aplicada

- Promueve la humanización.
- Abierta: está a la expectativa de nuevo conocimiento
- Creativa [82]

3.4 Principios de la bioética

Los principios fundamentales de la bioética, universalmente reconocidos planteados por Beauchamp y Childress son [84, 86]:

- Beneficencia
- No Maleficencia
- Autonomía
- Justicia

Beneficencia: se refiere a la obligación de prevenir el daño o aliviarlo, hacer el bien o proporcionar beneficios, los intereses de carácter particular no se contemplan por el contrario se ha de tener como pilar la ayuda a los demás. Se busca el mayor beneficio posible. Los elementos que contempla este principio son todos aquellos que implican una acción de beneficio que haga o fomente el bien, prevenga o contrarreste el mal o daño; adicionalmente, todos los que implican la omisión o la ausencia de actos que pudiesen ocasionar un daño o perjuicio [84, 86].

Principio de no maleficencia: este principio hace referencia a no causar daño, es la formulación negativa del principio de beneficencia, el cual, obliga a promover el bien. Las obligaciones derivadas, de este principio consisten en realizar un análisis del riesgo generado y del beneficio proporcionado [84, 86].

Principio de autonomía: consiste en que cada persona es autodeterminante para decidir de acuerdo a sus propias razones, motivaciones y convicciones, es decir, que al hacer uso de la autonomía, cada quien conduce su vida en concordancia con sus intereses, deseos y creencias. [84, 86].

De acuerdo con John Stuart Mill al hombre le pertenece plenamente aquella parte de sus actos que no afecten a los otros, y sobre la cual la sociedad no debe interferir, esto, teniendo en cuenta que la autonomía constituye la esfera de la libertad humana. Se puede definir como la obligación de respetar los valores y opciones personales de cada individuo en aquellas decisiones básicas que le atañen vitalmente. Supone el derecho incluso a equivocarse a la hora de hacer uno mismo su propia elección [88]

Principio de justicia: este principio está relacionado con la norma moral de dar a cada quien lo que necesita, de la cual se derivan diversas obligaciones disponer de los recursos indispensables para garantizar una apropiada atención de salud. Así la justicia debe entenderse como equidad, que a su

vez significa la utilización racional de los recursos de acuerdo con las necesidades [84, 86].

3.5 Aplicaciones

La Bioética ha ampliado su campo de aplicación dentro del desarrollo de la ciencia en las últimas décadas. En lo referente a las investigaciones con células madre en concreto, se han promovido diversos debates a fin de que no se transgreda la naturaleza humana, pues, ha de considerarse que toda actividad científica orientada a dar soluciones en el área de la medicina, debe tener total observancia de principios y lineamientos bioéticos que garanticen una beneficencia a nivel humano primordialmente, científico y médico. Estos debates se han llevado a cabo, desde que surgieron los primeros estudios con las células madre embrionarias hasta la actualidad, en que se están desarrollando investigaciones con células madre adultas, esto se han hecho con el propósito de evitar las implicaciones morales que se suscitan con el empleo de embriones humanos [89]. Así, la Bioética considerada como una ciencia, tiende a dar soluciones asertivas a los conflictos que se producen entre las ciencias humanas y las ciencias puras, es de mencionar que esta, ha venido tomando un campo fundamental en el desarrollo de la ciencia, pues ahora no solo se dan simples discursos sino que las mismas legislaciones han tendido que enmarcarse dentro de las exigencias que esta ciencia requiere para su aplicación, así en Colombia actualmente se cuenta con la Resolución 008430 de 4 de octubre de 1993, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, expedida por el Ministerio de Salud.

Las legislaciones se están actualizando constantemente y se están adaptando a los desarrollos científicos, por ello los investigadores tienen que hacer la observancia de las normas y leyes que surgen al respecto [89]. Es importante que exista una preocupación por empezar a llenar los vacíos normativos, existentes en esta área, pues, el Estado no puede ser ajeno al desarrollo investigativo como tampoco a los avances tecnológicos, toda vez que es éste el garante de los derechos fundamentales de los ciudadanos.

3.6 Bioética y Biomateriales

Los biomateriales son materiales sintéticos o naturales, los cuales, han sido modificados de acuerdo a su finalidad. Es de mencionar que actualmente se trabaja en este campo para mejorar sus propiedades físicas, químicas y mecánicas. Son utilizados en la medicina con el objetivo de restablecer ciertas estructuras o funciones del cuerpo [90,91]. De acuerdo a su destinación hay gran diversidad de biomateriales, así, los materiales metálicos más utilizados en la actualidad para la fabricación de implantes óseos son principalmente el titanio puro o aleado con otros metales, los aceros inoxidables y las aleaciones cobalto-cromo [2].

Los implantes médicos son dispositivos o tejidos que se colocan dentro o sobre la superficie del cuerpo. Muchos implantes son prótesis, destinados a sustituir partes del cuerpo. Otros implantes entregan medicamentos, monitorean las funciones del cuerpo, o prestan apoyo a los órganos y tejidos. Algunos implantes están hechos de piel, hueso u otros tejidos del cuerpo [92]. Otros están hechos de metal, plástico, cerámica u otros materiales. Los implantes se pueden colocar de forma permanente o pueden ser retirados una vez que ya hayan cumplido su función. Los biomateriales por su finalidad están en contacto con el entorno biológico en que se encuentran, por lo que es posible que el implante modifique sus propiedades al interactuar con el medio biológico, y este último puede verse alterado cuando el material se degrada [91]. Ha de tenerse en cuenta que los implantes realizados con biomateriales no siempre dan los resultados esperados, teniendo en cuenta, que en muchos casos se producen fallas en su aplicación tales como: desgaste, corrosión, liberación de sustancias químicas al organismo, pérdida de la unión con los tejidos óseos y de la transmisión de esfuerzos a los tejidos circundantes [2]. Motivo por el cual, se hace necesario que se cumplan unas condiciones y unos requisitos mínimos que garanticen su uso sin generar estos efectos secundarios adversos.

Es por ello, que constantemente en el área de la investigación en ingeniería de biomateriales se trabaja para contrarrestar de manera significativa estos riesgos. Una de las propuestas más utilizadas en los últimos tiempos direccionada a este fin es la modificación superficial de biomateriales mediante la utilización de diversas técnicas tendientes a mejorar el comportamiento de biocompatibilidad. Incluso se dispone de tecnologías que hacen viable que la superficie del sustrato metálico sea bioactiva, lo que posibilita su unión con los tejidos circundantes y minimiza los riesgos significativamente [2].

No se puede negar que los avances a nivel científico han sido de gran importancia en el área de la medicina para contrarrestar situaciones que afectan la salud humana en general y problemas como el mencionado, y es precisamente esta la razón primordial del empleo de biomateriales, pues son utilizados para reemplazar o ayudar en la regeneración de tejido blando o duro que ha sido deteriorado bien sea por una patología o de manera accidental [2]. Sin embargo, ha de tenerse en cuenta, que es tipo de materiales debe tener una característica fundamental, ser biocompatible, lo cual se refiere a la habilidad de un material para ser aceptado por el cuerpo sin necesidad que irrite a los tejidos circundantes, además que no provoque una respuesta inflamatoria, no produzca reacciones alérgicas y que no tenga efectos carcinogénicos, [2]. Así para establecer si un dispositivo es apto para ser usado en humanos, debe seguir unos protocolos.

Si bien es cierto la experimentación en seres humanos tiene como propósito brindar respuestas a necesidades médicas tanto de diagnóstico como de resultado, sin transgredir la dignidad humana como tampoco vulnerar sus derechos, por ello estas investigaciones deben sujetarse a protocolos y normas protectoras, que salvaguarden estos aspectos [93]. Por ello las normas éticas han expresado contundentemente que en primera medida se debe hacer ensayos en animales y, según los efectos presentados por estos, por analogía, se podrían

emplear en seres humanos [93]. Y previo a que un animal sea objeto de estudio los biomateriales deben ser ensayados y cumplir con unos requisitos. El primer requisito para su utilización es que deben ser tolerados por el organismo, para ellos se realiza pruebas de biocompatibilidad en *in vitro*, con esta, se obtiene resultados que permiten ver la viabilidad para ser usados. Otro requisito también imprescindible es que tengan una buena resistencia a la corrosión, esto es, que no se degraden por efecto del medio que los rodea. Ha de tenerse en cuenta que la corrosión es un problema que presentan en general los metales, más aún si están expuestos en un medio tan hostil como es el organismo humano, y a temperaturas del orden de 37 °C, por ello esta prueba resulta fundamental, a la hora de evaluar un biomaterial [2]. El cumplimiento de estos requisitos mínimos supone una consideración de la bioética desde el inicio del desarrollo de una propuesta investigativa, porque permite reflexionar si un biomaterial cumple las condiciones requeridas para poder ser ensayado en un animal y continuar con el camino hasta llegar a la valoración en humanos, o por el contrario hacer una reconsideración de la propuesta modificándola o excluyéndola por completo.

Así, el desarrollo de los biomateriales requiere conocimientos de las ciencias naturales pues, la Bioética, como ciencia, constituye un propósito de extensión del pensamiento médico social no solo a nivel medico sino investigativo. En ningún momento, la necesidad de dar respuestas a los requerimientos médicos de manera efectiva puede primar sobre el respeto a la dignidad y demás derechos de las personas, al bienestar y equilibrio social; y sobre estas bases deben edificarse los principios éticos de los científicos [91].

3.7 Investigador y Bioética

Siempre que el actuar humano implique la vida, la bioética estará presente. En la sociedad actual se hace necesario hacer algunas reflexiones debido al acrecentado avance tecnológico y científico ya que para muchos investigadores y científicos pareciera que prima lo científico tecnológico y lo económico por encima de los valores fundamentales de la vida [93]. Es de mencionar que los intereses de los investigadores y las necesidades de la sociedad no están contrapuestos por el contrario lo uno justifica lo otro. Es así, que el desarrollo de protocolos, guías de buena práctica y recomendaciones éticas favorecerá el reconocimiento y la confianza de la sociedad en la honestidad de la investigación y en sus fines solidarios [94].

JAMA ha establecido unas características esenciales que deben ser observadas y claramente descritas en los proyectos de investigación, buscando garantizar unos mínimos éticos, tales como [95]:

- Valor social de la investigación
- Validez científica
- Selección justa de sujetos
- Balance favorable riesgo beneficio

- Revisión independiente a través de un comité de ética ajeno a los intereses del investigador
- Consentimiento informado
- Respeto a los participantes

Es así, que el investigador, es quien inicialmente debe enmarcar su proyecto de investigación utilizando protocolos que promuevan orientaciones éticas, teniendo como base la finalidad de su propuesta [95]. De esta manera se propone establecer un equilibrio entre ciencia y bioética, así, en la medida que se pase a otra etapa significativa será más sencilla de evaluar por parte de los Comité quienes son los responsables de velar por los derechos de los sujetos de investigación a través de argumentaciones éticas. Función que es ajena y debe estar mediada por la independencia de estos cuerpos colegiados respecto a los investigadores [95].

Es de recalcar que no es fácil la misión que los Comités de Etica Científica tienen con relación al avance de la ciencia y la tecnología; en ocasiones suelen ser valorados como impedimento para el investigador, sin embargo, es el proceso investigativo el que debe evidenciar su validez, la cual, debe ser clara y precisa desde su inicio, es así que la principal labor que tiene el investigador es hacer su proceso consciente y bioéticamente responsable, de tal forma que para el Comité, sea claro la observancia y protección de los derechos de su objeto de estudio, así el proceso resultara más sencillo y favorable.

Las propuestas científicas que vayan encaminadas a dar respuesta a una necesidad médica o plantear un avance tecnológico, deben tener como pilar la observancia de los principios y lineamientos bioéticos, con el propósito de buscar un equilibrio entre las ciencias puras y las ciencias humanas, pues, estas deben ir en la misma dirección, teniendo en cuenta, que van a suplir una misma necesidad para beneficio humano, por tanto convergen en el mismo fin.

El investigador en el desarrollo de su labor científica además de enmarcarse dentro de unas exigencias técnicas debe contemplar las exigencias bioéticas que su labor le sugiere, esto, con el fin de direccionar desde el inicio el camino científico que debe llevar a cabo cuando se hace una propuesta investigativa, que si bien es cierto en sus inicio no tienen el carácter riguroso de exigible en su totalidad, en la media que se avanza en el camino se hace imprescindible. No tendría validez dar pasos significativos a nivel científico, si esta tarea no se ha llevado a cabo con responsabilidad.

3.8 Principio Beneficencia En Estudios De Biocompatibilidad

La beneficencia desde la tradición hipocrática ha sido fundamento de la ética médica. Este principio se ha venido aplicando durante mucho tiempo, ha sido cuestionado en la medida que se le ha venido dando relevancia a la autonomía de la persona, abarcando un campo de investigación amplio, no solamente desde la perspectiva bioética y médica sino también desde la científica. Por ello, este

principio ha de observarse en la generación de conocimiento más aún cuando este va destinado a uso humano.

De acuerdo al sentido que se le otorga al principio de beneficencia, existe una distinción en el acto en concreto, es decir, como virtud y como la obligación moral de actuar en beneficio de los otros [96]. Por otra parte sobresalen dos elementos dentro del principio de beneficencia, el primero que hace referencia a la beneficencia positiva, donde es clara la obligación de proporcionar un beneficio; y el segundo se refiere a la utilidad que sería una prolongación necesaria del anterior para aquellos casos en los que entran en juego riesgos y beneficios.

Esto hace necesario que se realice una ponderación de beneficios e inconvenientes, con el objeto de conseguir el mejor resultado posible. En todo caso, este principio de utilidad no es el propio de las teorías utilitaristas, donde ocupa la primacía del juicio moral. En este caso se trata de un principio *prima facie* al servicio de la beneficencia [97,98].

El principio de beneficencia incluye reglas más específicas, entre las cuales se puede destacar: proteger y defender los derechos de las personas, prevenir de un posible daño a otros; eliminar aquellas condiciones que lo pudieran provocar, ayudar a las personas incapacitadas, y rescatar a las personas en peligro. Debido a la naturaleza del principio de beneficencia, de obligatoriedad de cuidado, se evidencia una seria dificultad para concretar las reglas, en parte por el carácter de compromiso que posee el principio [97,99]. De ahí se deriva, entonces la necesidad de la observancia particular en el desarrollo de la labor de investigación y los resultados que se esperan, siguiendo la vía de la reciprocidad propia de la interacción social.

Aunque no es explícito la aplicabilidad del principio de beneficencia en estudios de biocompatibilidad, se observa claramente la intención de cuidado a no causar daños innecesarios, así, investigaciones hechas por Kokubo, donde propone el estudio de biocompatibilidad de materiales por el método de inmersión con Soluciones similar a los fluidos biológicos (SBF), hace aplicación de este principio de manera indirecta. Lo cual, corrobora en el año 2006, dando resultados importantes no solo para la ciencia sino también para la bioética, teniendo en cuenta, que logro determinar, que aplicar este método para la evaluación de biocompatibilidad de los materiales resulta de gran utilidad para predecir la bioactividad ósea *in vitro*; lo que reduce significativamente el uso de animales y el tiempo de estudio, *in vivo* [100,101].

4. Desarrollo experimental

4.1 Preparación del sustrato

El sustrato utilizado fue el biomaterial acero 316L; de una barra de 70cm de longitud con diámetro de 1/2", se obtuvieron discos de 2 mm de espesor, con cortadora Buehler; se hizo la preparación del pulido grueso con lijas 240, 320, 400, 600, 1000 y 1500 posteriormente el pulido fino en paño de billar con alúmina en suspensión de 5 micras. (Ver Figura 4.1)

La limpieza se hizo con acetona y alcohol isopropílico en el equipo de ultrasónico durante 5 minutos.

Figura 4.1. Preparación del sustrato [102]



4.2 Producción de películas delgadas

La producción de las películas delgadas de titanato de bismuto ($\text{Bi}_x\text{Ti}_y\text{O}_z$), utilizadas para la evaluación de la biocompatibilidad, caracterización objetivo de esta investigación, fueron producidas con el equipo CIT-Alcatel HS 2000 (Ver Figura 4.2), mediante la técnica de pulverización catódica de vapor Sputtering con magnetrón RF. El equipo, se encuentra ubicado en las instalaciones del Centro Internacional de Física (CIF), instituto adjunto a la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá [103].

Figura 4.2. Equipo CIT-Alcatel HS 2000 para producción de películas delgadas mediante la técnica de sputtering magnetrón RF



Este equipo está compuesto por una cámara de acero inoxidable (Ver Figura 4.3.), donde se encuentra ubicado el target y se colocan los sustratos; la cámara está conectada a una trampa de nitrógeno, una bomba mecánica y una turbomolecular, con este conjunto de elementos se produce vacío en la cámara, donde se logra obtener una de presión base de $4E-5$ mbar.

Figura 4.3: Cámara para producción de películas delgadas equipo CIT-Alcatel HS 2000



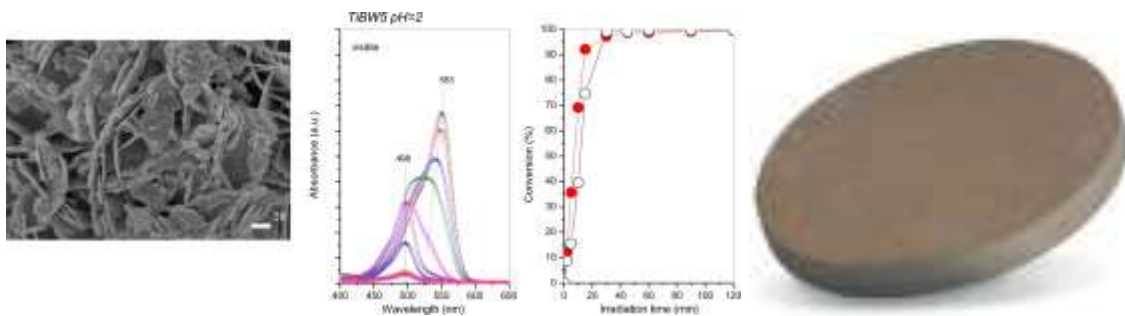
Para el control del flujo de entrada de los gases el equipo cuenta con flujo-metros (Ver Figura 4.4), tiene una fuente de radiofrecuencia de 13.56 MHz, un magnetrón balanceado de 4" (101.6 mm), para el calentamiento de los sustratos con una temperatura máxima de 673°K, cuenta con un horno y termocupla tipo K y un control integro-diferencial, además de sensores de presión pirani, pening y de cátodo frío.

Figura 4.4. Flujometros Equipo CIT-Alcatel HS 2000



Se utilizó un target de diámetro 4" y de espesor 1/4" como material de aporte con una pureza de 99.9% del titanato de bismuto ($\text{Bi}_4\text{Ti}_3\text{O}_{12}$) en la fase Aurivillus (Ver Figura 4.5).

Figura 4.5. Blanco de Titanato de Bismuto [104].



El proceso de crecimiento de películas delgadas mediante la técnica Sputtering magnetrón, se inicia con la disposición de los sustratos en el porta sustrato que se encuentra en la tapa que sella la cámara donde se produce el vacío; una vez cerrada la cámara en los depósitos que se necesite calentamiento se activa el horno con la temperatura que se requiera, posteriormente, se prende la mecánica, con la que se inicia el vacío, una vez alcance una presión de 5E-2 mbar se prende la refrigeración y se enciende la turbo molecular hasta el punto que la presión al interior de la cámara sea de 4E-5 mbar, en ese momento se

introduce Argón hasta alcanzar una presión de $6.3E-3$ mbar y de $7.4E-3$ mbar, momento en el cual se da inicio a la descarga mediante el encendido de la fuente de radiofrecuencia, a una potencia de 150 W, donde se da la formación del plasma por la ionización del Argón presente en la cámara (Ver Figura 4.6). El plasma generado afecta la potencia reflejada de la fuente de radiofrecuencia y la presión al interior de la cámara, por lo que es necesario controlar la fuente, con el objetivo de mantener la potencia refleja en 0 W, al igual que la válvula de tornillo micrométrico de entrada de gases con el fin de estabilizar la presión de trabajo.

Figura 4.6. Plasma formado por la ionización del argón [105].



En la producción de las películas delgadas se tienen en cuenta los siguientes parámetros experimentales:

- Temperatura
- Flujo de Argón
- Potencia
- Presión de trabajo
- Tiempo de depósito

Para este trabajo, donde se hizo crecimiento de películas delgadas de titanato de bismuto, los parámetros de: Presión de trabajo, flujo de argón, potencia sobre el blanco, tiempo de depósito fueron constantes para todos los depósitos, el parámetro de temperatura fue variable (Ver Tabla 4.1).

Los parámetros constantes se establecieron con base a experimentos realizados previamente, de igual forma se tuvo en cuenta la información recopilada de las bitácoras disponibles del equipo.

Tabla 4.1. Parámetros experimentales para el crecimiento de películas delgadas de titanato de bismuto.

DEPOSITO / PARÁMETRO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Temperatura (°K)	RT	RT	473	673	473	673	RT	RT	673	473	673
Flujo de Argón (sccm)	25										
Presión de trabajo (mbar)	7.4 E-3										
Tiempo de depósito (min)	45										
Potencia (W)	150										

Las películas delgadas de titanato de bismuto obtenidas bajo las condiciones mencionadas anteriormente, fueron evaluadas mediante caracterización estructural y química, adicionalmente se determinó el espesor de capa y rugosidad, se les realizó pruebas electroquímicas para evaluar su resistencia a la corrosión, y finalmente se les hizo pruebas de biocompatibilidad.

4.3 Técnicas de caracterización

4.3.1 Difracción de Rayos X (XRD)

Figura 4.7. Equipo de Difracción de rayos X.



Para la identificación de la estructura cristalina de las películas se utilizó un difractor Panalytical X'Pert PROX Ray, con el fin, de establecer las fases presentes donde se encuentra un tubo de cobre el cual genera una línea monocromática CuK α de longitud de onda $\lambda = 1.540998$. Las mediciones que se llevaron a cabo en este equipo fueron hechas en configuración Bragg-Brentano. El rango de ángulos en el que se obtuvieron los patrones de difracción de las muestras estuvo entre 10° y 90°.

De la misma manera, se pudo determinar el tamaño de cristalito utilizando la fórmula de Scherrer y el software Origin para ajustar los picos y hallar el ancho medio de cada pico, El equipo pertenece al laboratorio de difracción de rayos X del Departamento de Física, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia (Ver Figura 4.7).

4.3.2 Espectroscopia Fotoelectrónica (XPS)

Figura 4.8. Equipo de espectroscopia fotoelectrónica [106].



La técnica de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS), es una técnica semicuantitativa la cual permite establecer el estado químico y la estructura electrónica de los elementos presentes en un material, permite hacer un análisis cuantitativo de las primeras capas superficiales, proporcionando información acerca de la composición en el espacio en forma de espectros de áreas definidas.

Mediante este ensayo se evaluaron tres muestra depositadas a diferentes temperaturas: RT, 473°K y 673°K El equipo utilizado para este ensayo se encuentra ubicado en el Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, en la ciudad de Sao Jose Dos Campos (Brasil) (Ver Figura 4.8).

4.3.3 Espectroscopia Fotoelectrónica (XPS)

Figura 4.8. Equipo de espectroscopia fotoelectrónica [106].



La técnica de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS), es una técnica semicuantitativa la cual permite establecer el estado químico y la estructura electrónica de los elementos presentes en un material, permite hacer un análisis cuantitativo de las primeras capas superficiales, proporcionando información acerca de la composición en el espacio en forma de espectros de áreas definidas.

Mediante este ensayo se evaluaron tres muestra depositadas a diferentes temperaturas: RT, 473°K y 673°K El equipo utilizado para este ensayo se encuentra ubicado en el Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, en la ciudad de Sao Jose Dos Campos (Brasil) (Ver Figura 4.8).

4.3.4 Perfilometría Óptica

Figura 4.9. Equipo de Perfilometría Óptica



Para medición de espesor de la capa delgada de titanato de bismuto y caracterización de la rugosidad, se llevó a cabo la obtención de imágenes mediante microscopía con el equipo Bruker Contour GT, el cual, cuenta con un lente de 50X de aumento y líneas de diferente intensidad, proporcionando imágenes en 3D. El equipo utilizado para este ensayo pertenece al Laboratorio de Tratamientos Térmicos del Departamento de Ingeniería Mecánica y Mecatrónica, Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Colombia. (Ver Figura 4.9)

4.3.5 Microscopía Electrónica De Barrido (SEM)

Figura 4.10. Equipo de microscopía electrónica de barrido



Para la evaluación de la morfología del sustrato acero inoxidable 316L y de las películas producidas de titanato de bismuto, se tomaron imágenes de microscopía electrónica con el equipo VEGA 3 TESCAN Easy Probe, para este fin,

el equipo dispone de un cañón de electrones de cátodo de tungsteno, además de una cámara, donde se ubican las muestras, allí se encuentran ubicados los detectores para las diferentes señales generadas por la interacción entre los electrones y la muestra. Es de mencionar, que el microscopio cuenta con un sistema de vacío el cual, junto con la presión contenida en la cámara permiten que los electrones viajen con mínima obstrucción generada por las moléculas de los gases. Para la toma de imágenes los parámetros utilizados fueron: voltaje de aceleración 20kV, corriente de 4 pA, intensidad del haz de 5 y distancia entre el objetivo y el lente de 15 mm.

Con este mismo equipo se determinó la composición química del sustrato y de las películas delgadas de titanato de bismuto, mediante la técnica de espectroscopia de dispersión de energía (EDX), por cuanto esta técnica se utiliza acoplada a microscopios electrónicos de transmisión. La información que suministra se obtiene, teniendo en cuenta que las muestra sometidas a este ensayo son irradiadas con un haz de electrones, donde se generan rayos X, los cuales pueden ser detectados. El espectro de EDX se consigue después de recoger los fotones emitidos por la muestra durante un determinado periodo de tiempo, de esta manera permite identificar y cuantificar los diferentes elementos presentes en las capas delgadas evaluadas. El equipo utilizado para este ensayo pertenece al Departamento Física de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. (Ver Figura 4.10)

4.4 Evaluación de la resistencia a la corrosión

4.4.1 Electrolitos

Como electrolito para la evaluación de la resistencia a la corrosión de las películas de titanato de Bismuto obtenidas se prepararon tres soluciones de diferentes composiciones químicas: Cloruro de Sodio (NaCl) 3.5% Tabla 4.2, Solución Hank's Tabla 4.3, Solución Ringer Tabla 4.4; las dos últimas con el propósito de simular fluidos biológicos.

- Cloruro de Sodio (NaCl) al 3,5%

Tabla 4.2. Composición química de Solución NaCl

COMPOSICIÓN	
Componentes	g/L
NaCl	35
H ₂ O	1L

- Solución Hank's

Tabla 4.3. Composición química de Solución Hank's [107]

COMPOSICIÓN	
Componentes	g/L
NaCl	8.0
KCl	0.4
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2
CaCl ₂ H ₂ O	0.185
Na ₂ HPO ₄	0.046
KH ₂ PO ₄	0.06
Glucosa	1.0
NaHCO ₃	0.35

- Solución Ringer

Tabla 4.4. Composición química de Solución Ringer [108]

COMPOSICION	
Componentes	g/L
NaCl	8.5
KCl	4.0
CaCl ₂ 2H ₂ O	3.4

4.4.2 Polarización Potenciodinámica (PP)

Figura 4.11. Equipo de Corrosión Potenciostato Gamry 600



En la evaluación de la resistencia a la corrosión de las películas delgadas de titanato de bismuto obtenidas por la técnica de sputtering, se emplearon

técnicas electroquímicas de corriente directa, Polarización Potenciodinámica (TAFEL), la cual, se llevó a cabo en el Potenciostato GAMRY Instruments 600, con el que se utiliza el software Gamry Framework donde se adquiere las señales de los electrodos (Ver Figura 4.11).

Los electrodos se ubican en una celda de tres electrodos compuesta por un Electrodo de referencia denominado Calomel (S.C.E.) saturado con solución de Cloruro de Potasio (KCl), además cuenta con un electrodo auxiliar de platino, el cual, cumple la función de contra-electrodo y por último el sustrato recubierto que funciona como electrodo de trabajo.

Los diferentes electrolitos, cloruro de sodio (NaCl) al 3,5%, Solución Hank's y Solución Ringer, se colocaron en contacto con la superficie de la muestra; se inició con un período de estabilización del conjunto de potencial de circuito abierto, que tuvo un término de duración de 30 minutos aproximadamente, terminado este se iniciaba el ensayo, en donde por medio del software Gamry Framework se activaba el potenciostato, así, se generaba una perturbación que terminaba con el estado de estabilidad al sistema variando el potencial $\pm 500\text{mV}$ con respecto al potencial de circuito abierto, este proceso tenía una duración de 30 minutos aproximadamente.

El resultado final obtenido de este ensayo fueron unas graficas de polarización, las cuales, posteriormente fueron analizadas con el software Gamry Echem Analyst, donde se aplicó el método análisis Tafel de extrapolación, de donde se obtuvieron los parámetros electroquímicos de potencial de corrosión (E_{corr}), densidad de corriente de corrosión (I_{corr}) y pendientes de Tafel anódica y catódica (β_a y β_c).

4.5 Evaluación de biocompatibilidad del Recubrimiento

4.5.1 Análisis de viabilidad celular MTT

Figura 4.12. Equipo de espectrometría [109]



Para la evaluación de biocompatibilidad por análisis de viabilidad celular de las películas delgadas de titanato de bismuto, la línea celular de osteoblastos utilizada fue derivada de la bóveda craneal de ratón C57BL/6 del repositorio de células del Grupo de Hormonas, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia. Las células fueron cultivadas en una botella de plástico T25 con medio de cultivo Medio Eagle modificado de Dulbecco, el cual, fue suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% v/v, con el fin de utilizar estímulos de diferenciación celular se adiciono ácido ascórbico con una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, β -glicerofosfato (10 mM) y como antibiótico Clavamox 1x [72,110].

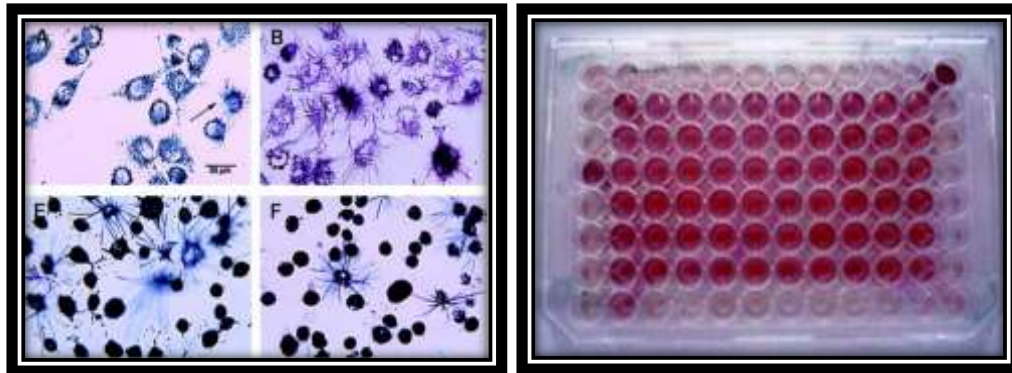
La viabilidad de las células adheridas se determinó mediante la técnica MTT bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio, este, es un ensayo colorimétrico estandarizado que mide la proliferación celular. El MTT de color amarillo al ser reducido presenta una coloración purpura al evidenciarse actividad mitocondrial, por lo que la cantidad de formazan producido guarda una relación directamente proporcional al número de células vivas. Para ello, el MTT es preparado en medio de cultivo suplementado en concentración de 0,2 a 0,5 mg/mL y al igual que las células fueron incubadas a 37°C y 5% CO₂. Se realizó cambio de medio cada 72 horas. Cuando las células tenían un 90% de confluencia, fueron removidas por tripsinización, usando 1,5 mL de solución de tripsina 0,25% en EDTA 0,02%, la incubación se realizó a 37°C y 5% CO₂ por 5 minutos, posteriormente fueron resuspendidas en 5,0 mL de nuevo medio suplementado, con el fin de evitar daño de los osteoblastos debido a la actividad enzimática de la tripsina. De esta manera se obtuvo la solución stock de osteoblastos 120000 células/mL [72].

Los sustratos de acero donde se crecieron las películas y uno sin recubrir fueron autoclavados, a continuación cada pieza fue colocada en una caja de 12 pozos y sobre la superficie de cada una se sembraron 120000 células, 100 μL de solución de osteoblastos, adicionando 1,5 mL de medio suplementado DMEM previamente preparado y luego, el conjunto fue incubado a 37°C y 5% CO₂ durante 72 horas. Como control se sembró la misma cantidad de osteoblastos en tres pozos sin muestras bajo las mismas condiciones. Después de este tiempo, el medio fue descartado y reemplazado por medio nuevo de 1,5 mL DMEM con 50 μL de reactivo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio (MTT) de concentración 50 mg/mL. Se incubó a 37°C por 4 horas [72].

Terminado este periodo de tiempo, mediante la técnica de microscopía óptica, se observó la presencia de cristales de formazan, estos fueron disueltos en 1,5 mL de SDS al 1% en HCl 0,01 M. Para hacer la medición de la absorbencia, la cual, se realizó en un espectrofotómetro ELISA Bio-Rad a 570 nm, 100 μL de solución de cada pozo de MTT fueron llevados a una caja de 96 pozos [72].

En la Figura 4.13 A, se observa la vista microscopica del formazan, obtenido por la reducción de MTT y en Figura 4.13 B, se muestra una imagen de una cámara de 96 pozos para MTT.

Figura 4.13. A. Cristales de formazan [111] B. Cámara de 96 pozos para MTT [112]



El porcentaje de viabilidad celular fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación

$$\% \text{viabilidad celular} = \frac{\text{Abs } 570\text{nm muestra} - \text{Abs } 570\text{nm blanco}}{\text{Abs } 570\text{nm control} - \text{Abs } 570\text{nm muestra}} \times 100 \quad [4.1]$$

4.5.2 Formación de hidroxiapatita técnica Bone Like

Para determinar la biocompatibilidad de las películas delgadas de titanato de bismuto, se usó la técnica Bone Like, teniendo en cuenta que esta prueba permite evaluar la capacidad de formación de apatita sobre la superficie de material cuando es sumergido en un fluido corporal simulado (SBF), con concentraciones de iones parecidos a los de plasma sanguíneo humano, durante un periodo de tiempo determinado.

Para este propósito se preparó una solución SBF, con la composición y concentraciones correspondientes, como se describe según la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Composición química Solución SBF (Fluido Corporal Simulado) [113]

COMPOSICIÓN	
Componentes	Cantidad
NaCl	8.035 g
NaHCO ₃	0.355 g
KCl	0.225 g
KH ₂ PO ₄ 3H ₂ O	0.231 g
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.311 g
CaCl ₂	0.292 g
Na ₂ SO ₄	0.072 g
Tris	6.118 g
HCl 1.0M	39.00 ml
Completar con H ₂ O	1000 ml

Se sumergieron los sustratos recubiertos, en la solución, las cuales se mantuvieron a temperatura ambiente durante un período de una semana. Después del periodo de inmersión, las muestras se lavaron sucesivamente con agua desionizada. Posteriormente se les hizo estudios de composición química con la técnica de dispersión de energía, EDX. Este análisis se realizó con el propósito de evaluar las propiedades de osteointegración y bioactividad de las películas de titanato de bismuto crecidas y de acero inoxidable 316L sin recubrir, utilizado como blanco [77].

Esta prueba aunque es de carácter indirecto, es de gran importancia, de acuerdo a lo expuesto por Kokubo en el año 2006, logro determinar, que esta evaluación es útil para predecir la bioactividad ósea *in vivo* de un material; lo que hace que en el momento de llevar a cabo la etapa siguiente, es decir, hacer estudios *in vivo*, el número de animales utilizados y la duración de los experimentos con los mismos pueden reducirse notablemente mediante el uso de este método [113].

5. Resultados y discusión

En el siguiente capítulo se exponen los resultados obtenidos en la evaluación y caracterización del recubrimiento obtenido de titanato de bismuto, como son: la estructura química, la morfología; la medición de espesor de capa y rugosidad; así, como la evaluación de la resistencia a la corrosión por la técnica Polarización Potenciodinámica (PP), la determinación de la biocompatibilidad mediante el análisis de viabilidad celular MTT y por la formación de hidroxiapatita con la técnica Bone Like seguida de la respectiva evaluación de composición química con la técnica de dispersión de energía, EDX. Por último, se desarrolla un abordaje desde la perspectiva de la bioética.

5.1 Caracterización Estructural Difracción de Rayos X (XRD)

En total se realizaron 11 depósitos los cuales se han referenciado con la letra D y el número correspondiente de depósito del número 1 al 11. Por cada depósito se crecieron películas sobre cuatro sustratos diferentes. La variable fue la temperatura, donde se utilizaron tres diferentes, la primera corresponde a la temperatura de la cámara sin suministro de temperatura adicional y esta referenciada como rango de temperatura (RT), el cual, oscila entre 353°K y 368°K; una segunda donde se proporcionó calor hasta que la temperatura interna de la cámara alcanzó 473°K y la tercera hasta lograr 673°K.

Tabla 5.1. Parámetros de depósito para la obtención de películas delgadas de Titanato de Bismuto

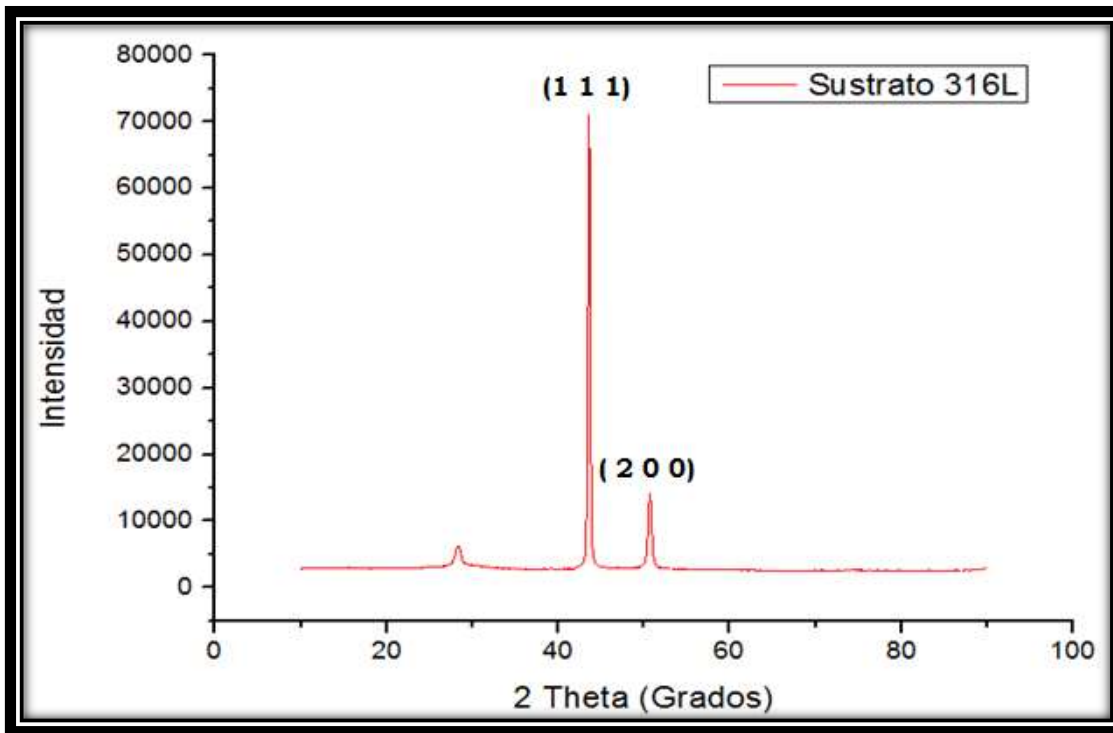
	PARÁMETROS	DEPÓSITOS	
	RT	D1 D2	D7 D8
	473°K	D3 D5	D10
	673°K	D4 D6	D9 D11
Constantes	Potencia	150 W	
	Tiempo de depósito	45 minutos	
	Flujo de Argón	25 sccm	
	Presión de Trabajo	7.4E-3 mbar	

La estructura cristalina, el tamaño de cristalito y la identificación de fases del titanato de bismuto presentes en las películas delgadas obtenidas a temperatura RT, 473°K y 673°K, fueron determinadas mediante difracción de rayos X (XRD). Estos resultados variaron para cada uno de las muestras evaluadas de acuerdo a la temperatura de crecimiento de las películas delgadas, según la **Tabla 5.1**.

Si bien es cierto, el blanco utilizado pertenece a la composición química del ($\text{Bi}_4\text{Ti}_3\text{O}_{12}$) en la fase Aurivillius, lo que se esperaría que esta composición fuera la encontrada en las películas delgadas, siendo este el material de aporte, sin embargo, el material depositado presenta otra estequiometría diferente, lo cual, está directamente relacionado con la interacción del material en la atmósfera interna de la cámara de deposición, donde se encuentra el material ionizado en el plasma; se ha de tener en cuenta que los enlaces entre los componentes del material base pueden ser descompuestos por colisiones con los iones de Ar^+ , generando la presencia de otro compuesto de baja cristalinidad.

Para determinar la estructura cristalina de las películas delgadas de titanato de bismuto, inicialmente, se evaluó el patrón que corresponde al sustrato acero inoxidable 316L, donde la señal más intensa que presenta, está orientada en el plano (1 1 1). Adicionalmente, se observa una segunda señal con orientación en el plano (2 0 0), esto, se muestra en la Figura 5.1.

Figura 5.1: Patrón de difracción de rayos X sustrato acero 316L.

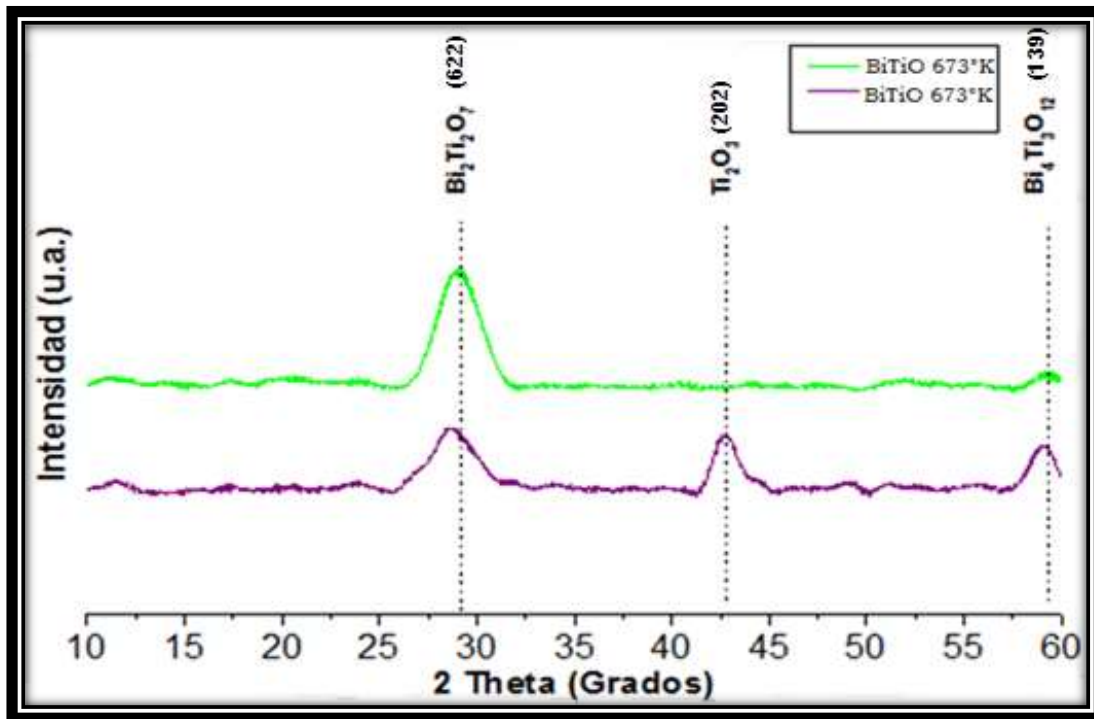


Posteriormente se hizo la evaluación (XRD) de los patrones, donde se evidenció que las películas obtenidas a RT y a 473°K presentan una estructura amorfa a diferencia de las películas depositadas a una temperatura de 673°K, donde el

(XRD) muestra la formación de la estructura cristalina de la fase tipo pirocloro del titanato de bismuto ($\text{Bi}_2\text{Ti}_2\text{O}_7$), que de acuerdo al PDF 32-0118, es una fase metaestable y se encuentra orientada a lo largo del plano (6 2 2), tal como se expone en la Figura 5.2.

Otros compuestos presentes en las películas crecidas a una temperatura de 673°K es el óxido de titanio (Ti_2O_3) que aparece en $2\theta = 42.697^\circ$ y que de acuerdo al PDF 00-010-0063 pertenece al plano (2 0 2) de la estructura Romboédrica de este compuesto. De igual manera se observa una señal sutil de la fase Aurivillius del titanato de bismuto ($\text{Bi}_4\text{Ti}_3\text{O}_{12}$) en $2\theta = 59.207^\circ$ que pertenece al plano de baja cristalinidad (1 3 9), esto, según el PDF 03-065-2527, la cual, presenta una estructura cristalina Ortorrómbica. Esto se observe en la Figura 5.2.

Figura 5.2. Patrones de difracción de rayos de las Películas depositadas a 673°K



Mediante los resultados obtenidos en la caracterización estructural de las películas delgadas de titanato de bismuto, se logró determinar, que la temperatura de depósito fue determinante, para la obtención de fase cristalina, teniendo en cuenta, que las películas en las cuales no se utilizó temperatura adicional de calentamiento en el interior de la cámara, presentaron estructura amorfa, al igual que las películas crecidas a temperatura de 473°K .

Se determinó el tamaño de cristalito el cual corresponde a $13,7\text{ nm}$, utilizando la fórmula de Scherrer y el software Origin para ajustar los picos y hallar el ancho medio de cada pico.

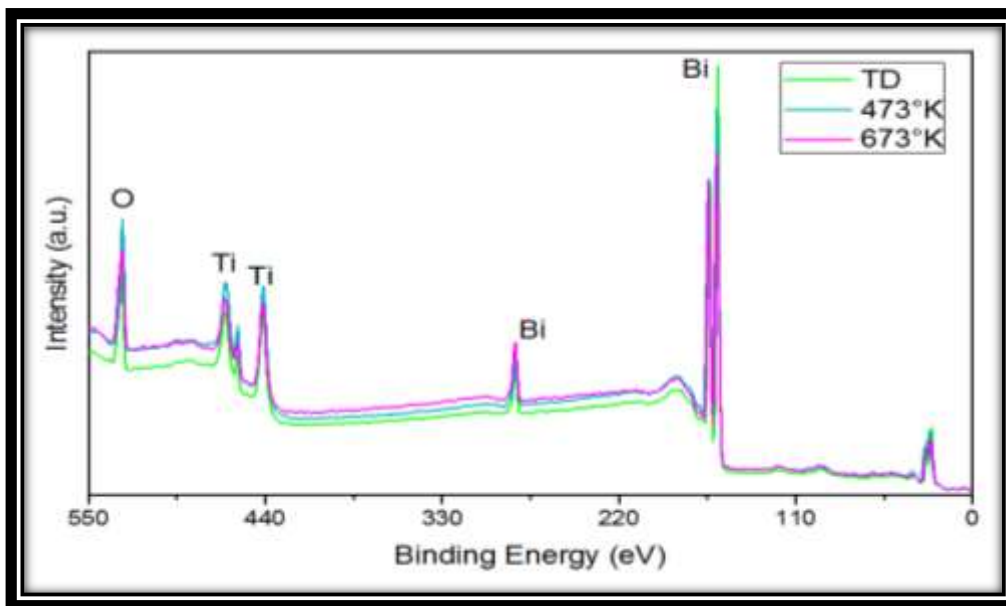
5.2 Espectrometría XPS

La composición química de los sustratos con películas delgadas de titanato de bismuto depositados a diferentes temperaturas: RT, 473°K y 673°K, se evaluaron mediante espectrometría XPS, para determinar los elementos que están presentes en la superficie, donde se observa que la capa depositada, presentan similar comportamiento en los tres casos, esto, de acuerdo a los resultados que se presentan en la Figura 5.3.

Los espectros generales de XPS para las películas de titanato de bismuto depositadas sobre acero inoxidable 316L bajo diferentes condiciones de temperatura, de acuerdo a la Tabla 5.1., muestran las señales características de los elementos Bismuto, Titanio y Oxígeno.

El espectro XPS fue evaluado considerando las siguientes contribuciones: una dominante situada en 530,1 eV, característico del oxígeno [114,115,116]. Para el titanio se encuentra un primer pico centrado en 453,7 eV y otro segundo pico centrado en 458,6 eV [117,118], contribuciones características para este elemento. La contribución predominante para bismuto se encuentra en 157.5 eV, particular del bismuto metálico [114].

Figura 5.3.: Composición química de la película de titanato de bismuto, RT, 473°K y 673°K.



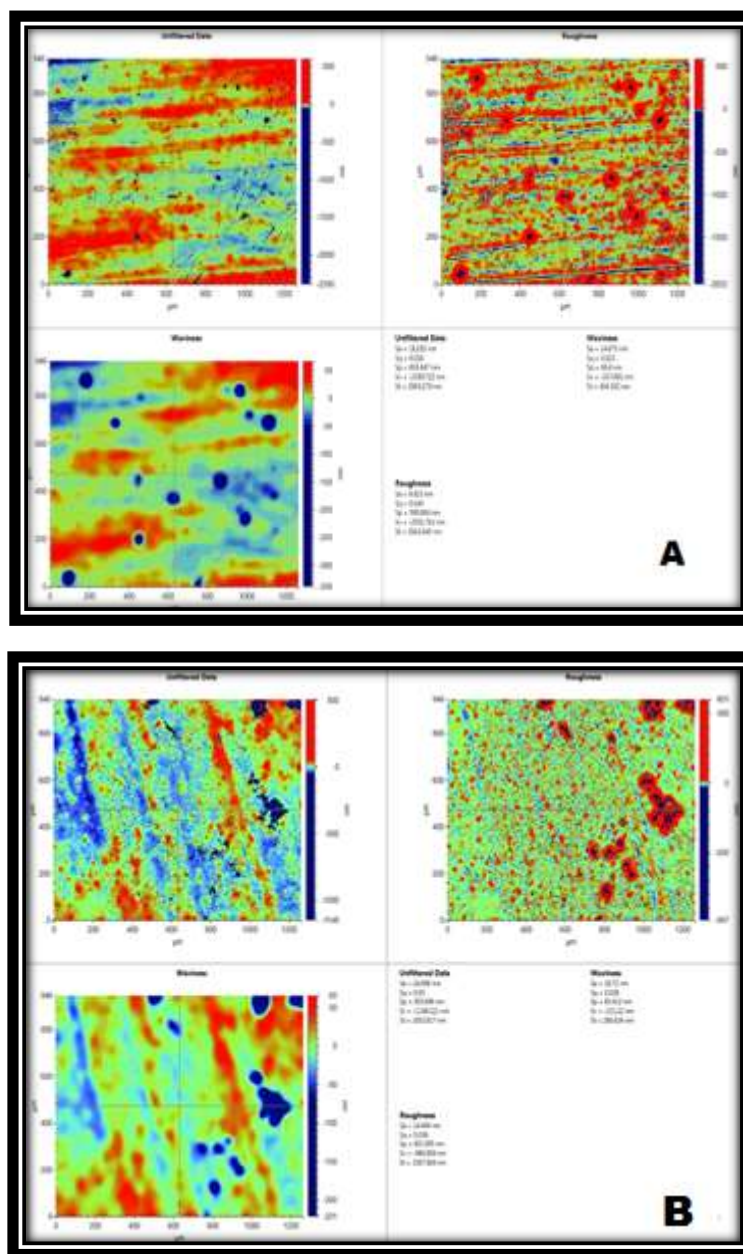
Los resultados obtenidos en la evaluación por XPS de las películas delgadas de titanato de bismuto, depositadas a diferentes temperaturas: RT, 473°K y 673°K, muestran similar comportamiento en cuanto a la composición química, teniendo en cuenta, que los picos para los elementos oxígeno, titanio y bismuto, son los característicos, para cada uno en esta técnica.

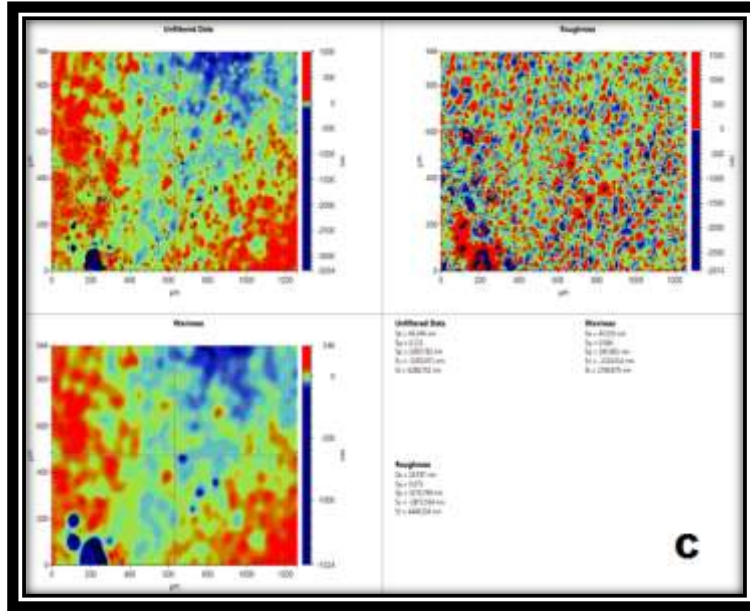
5.3 Rugosidad

Con el objetivo de encontrar los valores de rugosidad y espesor de las películas se realizaron medidas de microscopía óptica.

Las imágenes obtenidas por esta técnica muestran que la variación en rugosidad de las películas delgadas de titanato de bismuto depositadas sobre el sustrato acero inoxidable 316L obtenidos a diferentes temperaturas: RT, 473°K y 673°K, es mínima como se muestra en la Figura 5.4.

Figura 5.4. Rugosidad de películas delgadas de Titanato de Bismuto A. RT B. 473°K C. 673°K.





En la Figura 5.4A, se muestra la evaluación de la rugosidad para películas delgadas de titanato de bismuto crecidas a temperatura RT, de acuerdo a la escala colorimétrica, que se presenta al lado derecho de cada imagen, la cual, inicia en -338nm siendo este el valor más profundo y representado por el color azul hasta 50 nm que es el pico más alto, se determinó que esta película presenta una variación topográfica de 14,6 nm.

En la Figura 5.4B, se muestra la imagen para la determinación de la rugosidad de las películas delgadas de titanato de bismuto crecidas a 473°K, de acuerdo a la escala colorimétrica, y con el mismo fundamento utilizado para las películas crecidas a temperatura RT, se determina que el valor más profundo está a -221 nm y el pico más alto está a 65 nm, esta película presenta una variación topográfica 18,7 nm.

En la Figura 5.4C, se presenta la imagen para la evaluación de la rugosidad de las películas delgadas de titanato de bismuto crecidas a 673°K, de acuerdo a la escala colorimétrica, el valor más profundo está a -152 nm y a 24 nm está el pico más alto, esta película presenta una variación topográfica promedio de 19,6 nm.

Así, se observa que los cambios entre los picos más altos y los puntos más bajos que presentan cada una de las películas delgadas de titanato de bismuto obtenidas a diferentes temperaturas: RT, 473°K y 673°K y crecidas sobre el sustrato acero inoxidable 316L, son bajos, por lo que se puede determinar que la rugosidad en general de las películas es mínima, esto, se puede corroborar con las imágenes tomadas en tercera dimensión de cada uno de las películas y que se presentan en la Figura 5.5. Esta valoración aunque es cualitativa, por cuanto está sujeta a la observación de la escala topográfica que se muestra en la parte superior de cada imagen es importante y complementaria a las imágenes obtenidas en 2D, puesto que muestra los picos y los valles.

En la Figura 5.5A, se muestra en tercera dimensión la imagen para la evaluación cualitativa de la rugosidad para películas delgadas de titanato de bismuto crecidas a temperatura RT, para este fin se tiene en cuenta la escala topográfica que se muestra en la parte superior de la imagen, donde se evidencia que el cambio entre los puntos más bajos y más altos, es mínimo. De igual forma, en la Figura 5.5B se observa las películas obtenidas a 473°K y en la Figura 5.5C, las crecidas a 673°K, donde se puede determinar que los cambios entre picos y valles es bajo.

5.4 Espesor de capa

El espesor de capa es una medida fundamental en el crecimiento de películas delgadas, pues, de acuerdo a este se puede evaluar el rendimiento o yield, determinando que tanto de material de aporte se está depositando, sobre la superficie del material, este parámetro está relacionado directamente con el tiempo de depósito, el cual, fue de 45 minutos para las tres temperaturas diferentes que se utilizaron, este, fue determinado por experimentos previos con el fin, de seleccionar las variables óptimas de trabajo.

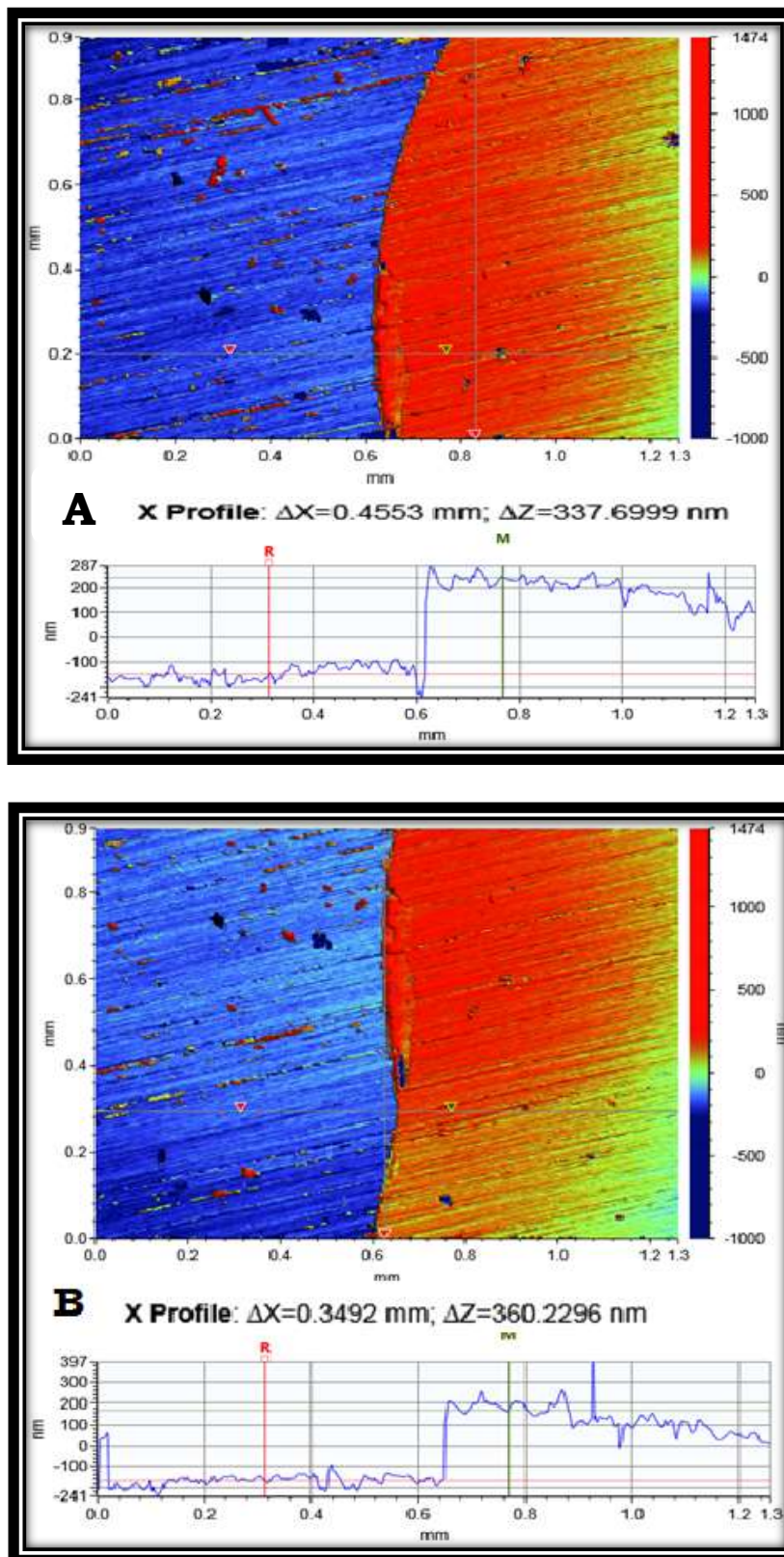
Este mismo parámetro es necesario evaluarlo, en el crecimiento de las películas, teniendo en cuenta que sin lugar a duda, el tiempo de depósito, incide en variaciones importantes no sólo en la obtención de espesor de capa, sino en cambios significativos y no deseables en la superficie, como es el caso de la delaminación cuando se excede en el tiempo de depósito.

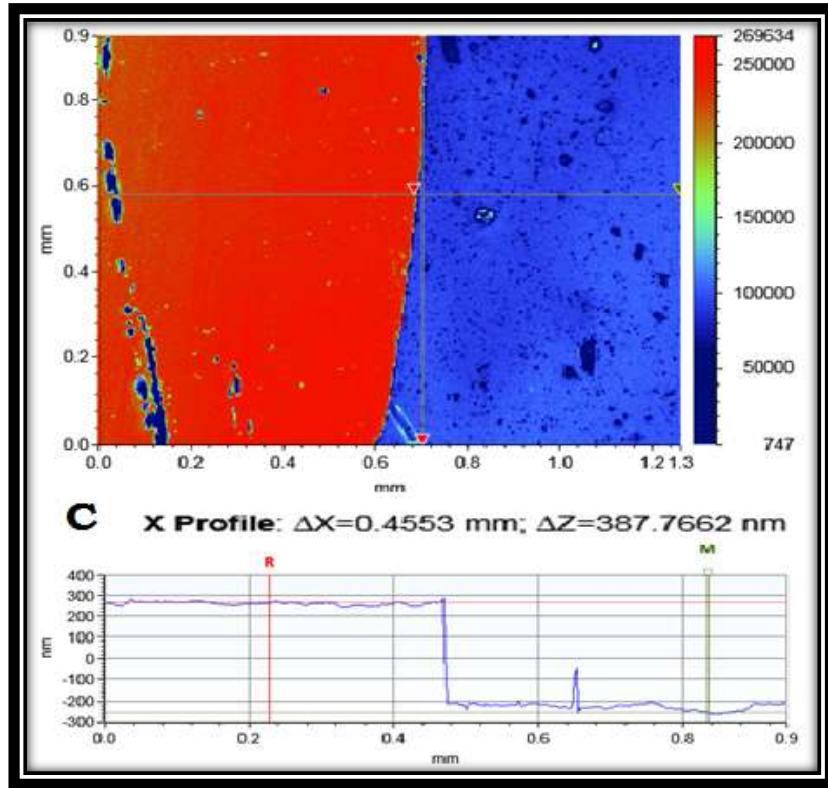
Es fundamental tener en cuenta el rango en el que se encuentra el valor de espesor de capa de las películas de titanato de bismuto que se logró por la técnica de sputtering, teniendo en cuenta, que éste en primer lugar determina si se trata de una película delgada o bien, si por el contrario se trata de una gruesa. Por ello, y como criterio más generalizado, se consideran valores de espesor inferiores a 1 micra, son recubrimientos de lámina delgada [119].

Por otro lado, esta medición, es relevante en los resultados obtenidos en otras caracterizaciones como lo son principalmente los de corrosión, teniendo en cuenta, que a espesores muy bajos el electrolito puede entrar en contacto con el sustrato, alterando significativamente los resultados esperados o desviándolos a propósitos no requeridos; adicionalmente la presencia de poros o grietas son más susceptibles que aparezcan en la medida que el espesor de capa disminuye. Una característica más, es la que tiene relación con la homogeneidad del compuesto obtenido entre menor espesor tenga la capa el compuesto depositado va a tener mayor variabilidad en la composición química, a medida que va aumentando el espesor mayor posibilidad de tener compuestos homogéneos.

Con el objetivo de encontrar los valores de espesor de capa de las películas delgadas de titanato de bismuto depositadas sobre el sustrato acero inoxidable 316L obtenidos a diferentes temperaturas: RT, 473°K y 673°K, se hizo la medición mediante microscopía, donde se obtuvo imágenes en 2D conforme se muestra en la Figura 5.6.

Figura 5.6. Espesor de capa de películas delgadas de Titanato de Bismuto A. RT B. 473°K C. 673°K.





Cada una de las imágenes obtenidas para la evaluación de espesor de capa presenta dos zonas claramente diferenciadas: Una zona de color azul que representa la parte más profunda y una zona roja que es la parte más alta. La diferencia en el punto más alto o pico y entre el punto más bajo o valle, es el valor que corresponde al espesor de capa. Cada una de estas imágenes, presenta en la parte inferior una escala nanométrica donde se evidencia claramente el escalón que finalmente es el que permite obtener el valor de espesor de capa.

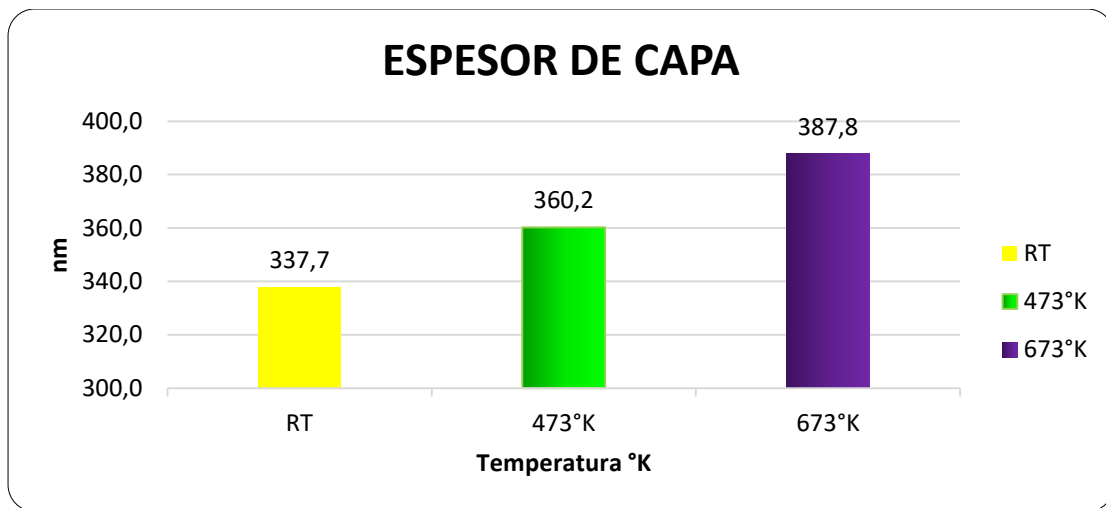
En la Figura 5.6, se muestra la medición de espesor de capa de las películas delgadas de titanato de bismuto crecidas a diferentes temperaturas, se utilizó la escala colorimétrica que se observa al lado derecho de cada imagen, se determinó que de acuerdo a: la Figura 5.6A la película obtenida a temperatura RT presenta un espesor de capa igual a 337,7 nm; la Figura 5.6B, las películas crecidas a temperatura de 473°K el espesor de capa es igual a 360,2 nm y en la Figura 5.6C, para las películas crecidas a 673°K, el valor de espesor de capa es igual a 387,8 nm.

Un resumen de los resultados obtenidos de espesor de capa para las diferentes temperaturas evaluadas en el crecimiento de las películas delgadas de titanato de bismuto se presenta en la Tabla 5.2, donde se hace una recopilación de los datos adicionalmente en la Gráfica 5.1, se muestra la gráfica en barras de los mismos resultados.

Tabla 5.2. Espesor de capa de las películas de titanato de bismuto para cada una de las temperaturas utilizadas en el crecimiento.

TEMPERATURA DE DEPÓSITO (°K)	ESPESOR DE CAPA (nm)
RT	337,7
473	360,2
673	387,8

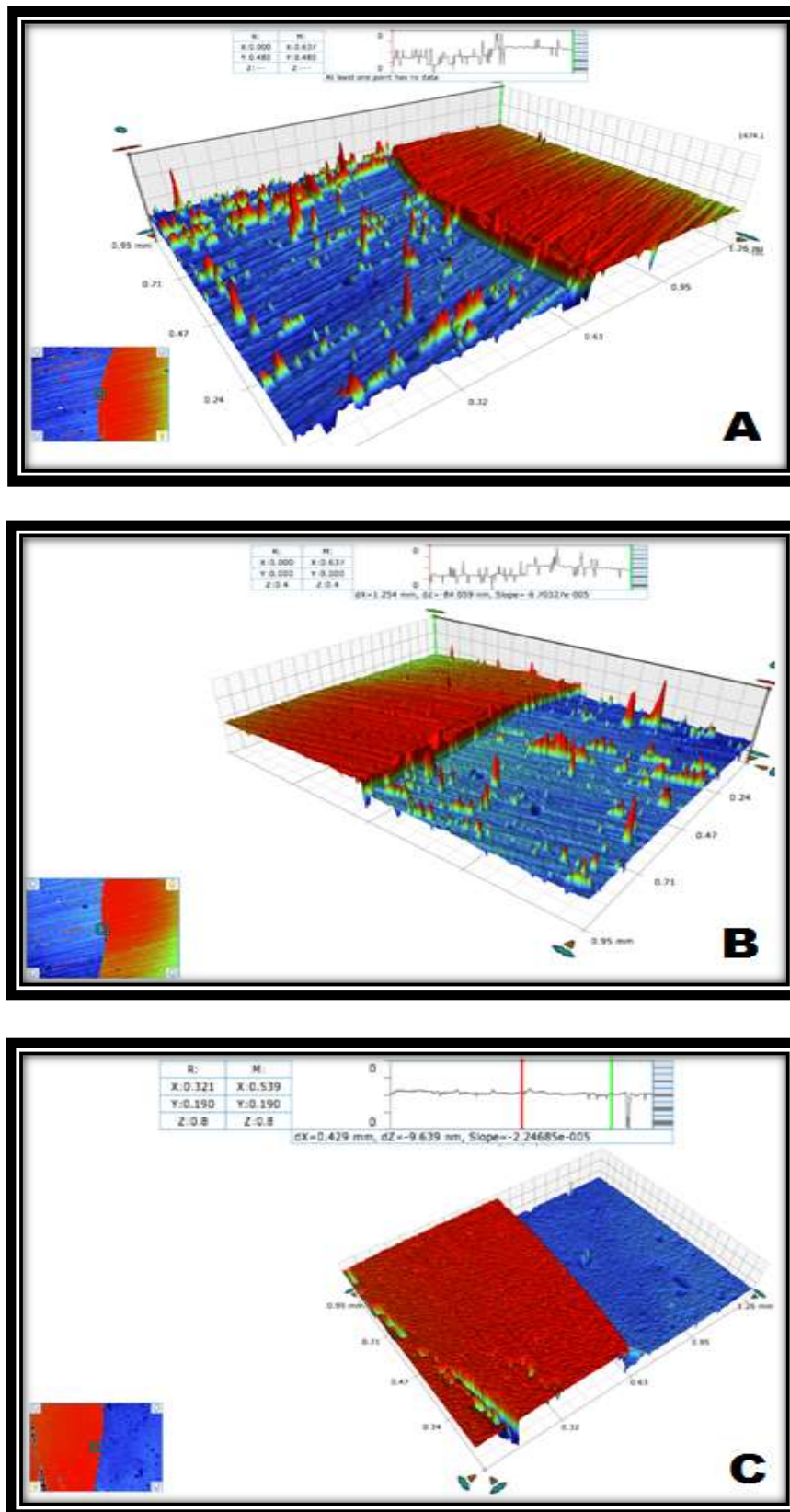
Gráfica 5.1. Espesor de capa de las películas de titanato de bismuto para cada una de las temperaturas utilizadas en el crecimiento.



De esta manera se evidencia, que el espesor de las películas delgadas de titanato de bismuto obtenidas a diferentes temperaturas: RT, 473°K y 673°K y crecidas sobre el sustrato acero inoxidable 316L, se ve favorecido con el incremento de la temperatura, de acuerdo al resumen presentado en la Tabla 5.2, donde se puede apreciar la variación del espesor de capa con respecto a la temperatura y se corrobora con la Gráfica 5.1. Así, El espesor de capa de las películas de titanato de bismuto va incrementando progresivamente en la medida en que la temperatura de depósito también aumenta.

De igual forma, para observar el espesor de capa se tomaron imágenes en tercera dimensión para cada una de películas delgadas de titanato de bismuto obtenidas a diferentes temperaturas, las cuales se presentan en la Figura 5.7. Esta valoración es de carácter cualitativo, por cuanto está sujeta a la observación de la escala topográfica que se muestra en la parte superior de cada imagen, sin embargo, en este caso las zonas son claramente diferenciadas lo que permite una mejor observación de la zona más alta que es de color rojo, con respecto a la más baja que es de color azul; de la misma manera es complementaria a las imágenes obtenidas en 2D, donde sí se obtiene un valor cuantitativo del espesor de capa, mediante la diferencia de pico y valle.

Figura 5.7. Espesor de Capa en 3D de películas delgadas de Titanato de Bismuto A. RT B. 473°K C. 673°K.



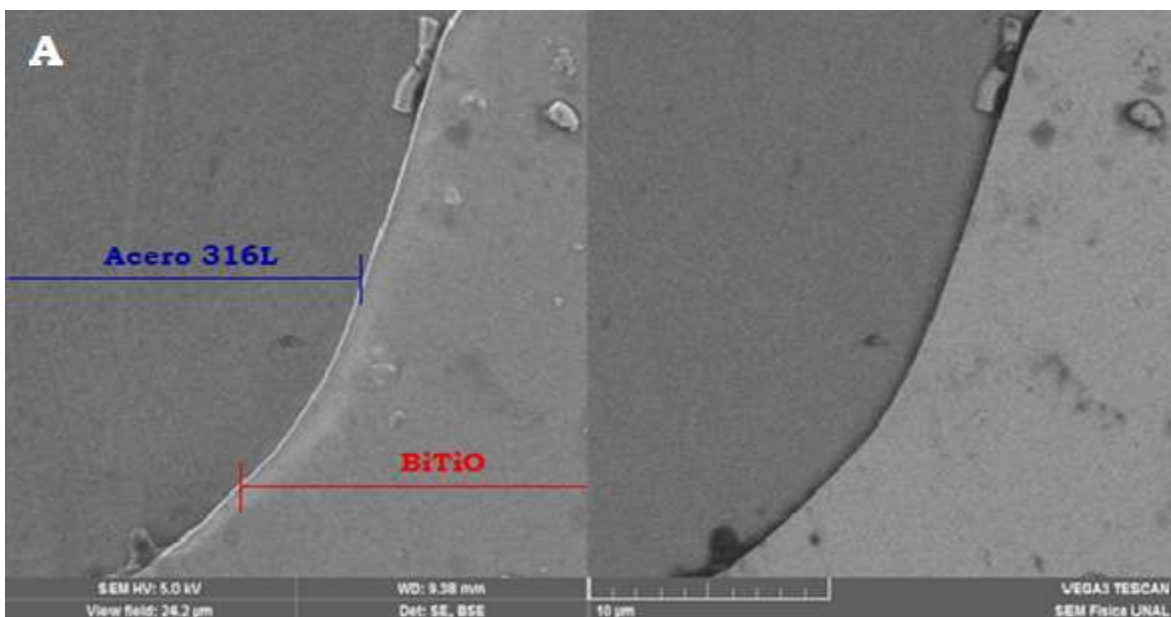
En la Figura 5.7A, se muestra en tercera dimensión la imagen para la evaluación cualitativa del espesor de capa para las películas delgadas de titanato de bismuto crecidas a temperatura RT, para este fin, se tiene en cuenta la escala topográfica que se muestra en la parte superior de la imagen, además de la zonas claramente diferenciadas donde la zona azul es la parte más profunda y la zona roja es la más alta, así se evidencia que el cambio entre el punto más bajo y punto más alto, es significativo. Con este mismo criterio de valoración, en la Figura 5.7B, se muestra la imagen para las películas crecidas a 473°K y en la Figura 5.7C, para las crecidas a 673°K, de acuerdo a la escala topográfica, se observa el paso determinante entre la zona más alta y las más profunda, lo cual hace posible determinar el espesor de capa.

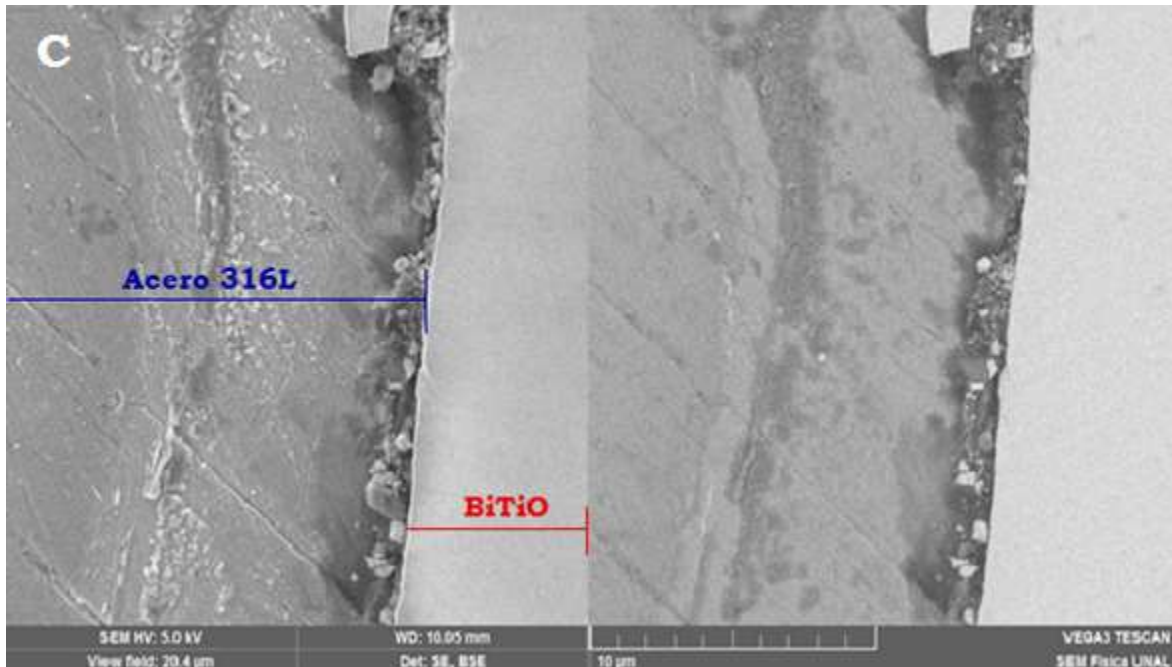
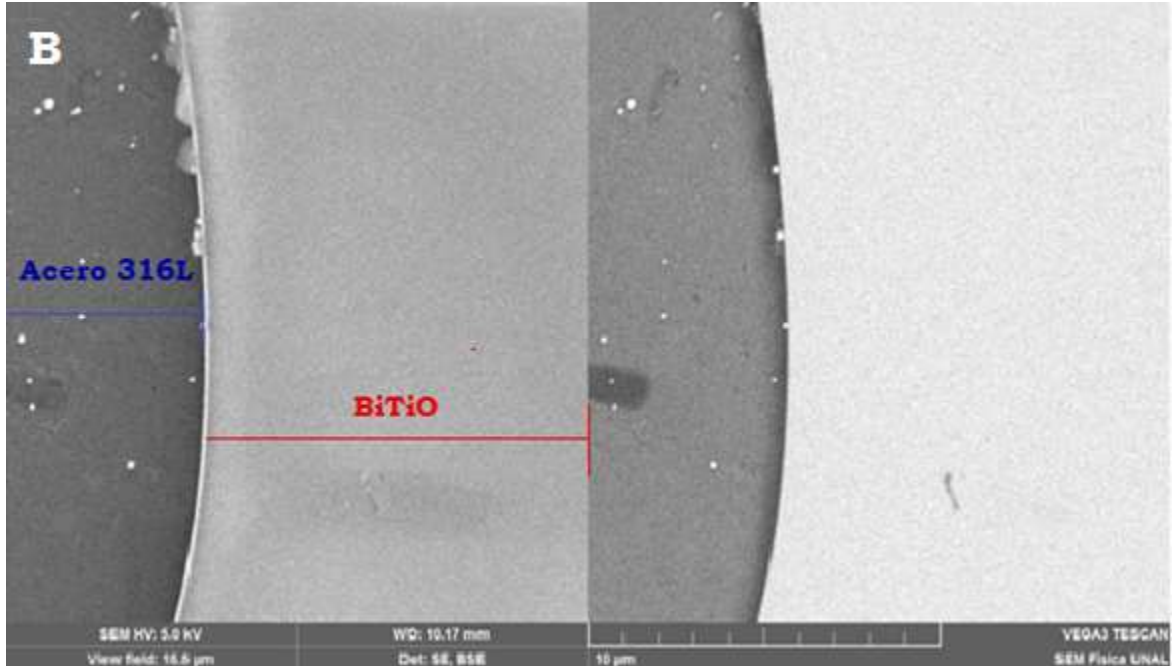
5.5 Morfología por microscopia electrónica de barrido

La morfología de las películas delgadas de titanato de bismuto depositadas sobre el sustrato acero inoxidable 316L obtenidos a diferentes temperaturas: RT, 473°K y 673°K, se obtuvieron mediante microfotografías de microscopia Electrónica de barrido SEM, en modo de electrones secundarios y en modo retro dispersados a 10000X y 20000X, así, se pudo observar las características de la superficie de los recubrimientos.

Cada una de la figuras para la evaluación de la morfología de las películas delgadas, presenta dos zonas claramente diferenciadas: una zona oscura que es la parte perteneciente al sustrato acero inoxidable 316L y una zona más clara que es la película de titanato de bismuto obtenida a diferentes temperaturas de depósito: RT, 473°K y 673°K.

Figura 5.8. Morfología de las películas de titanato de bismuto a 10000X: A. RT B. 473°K C. 673°K.

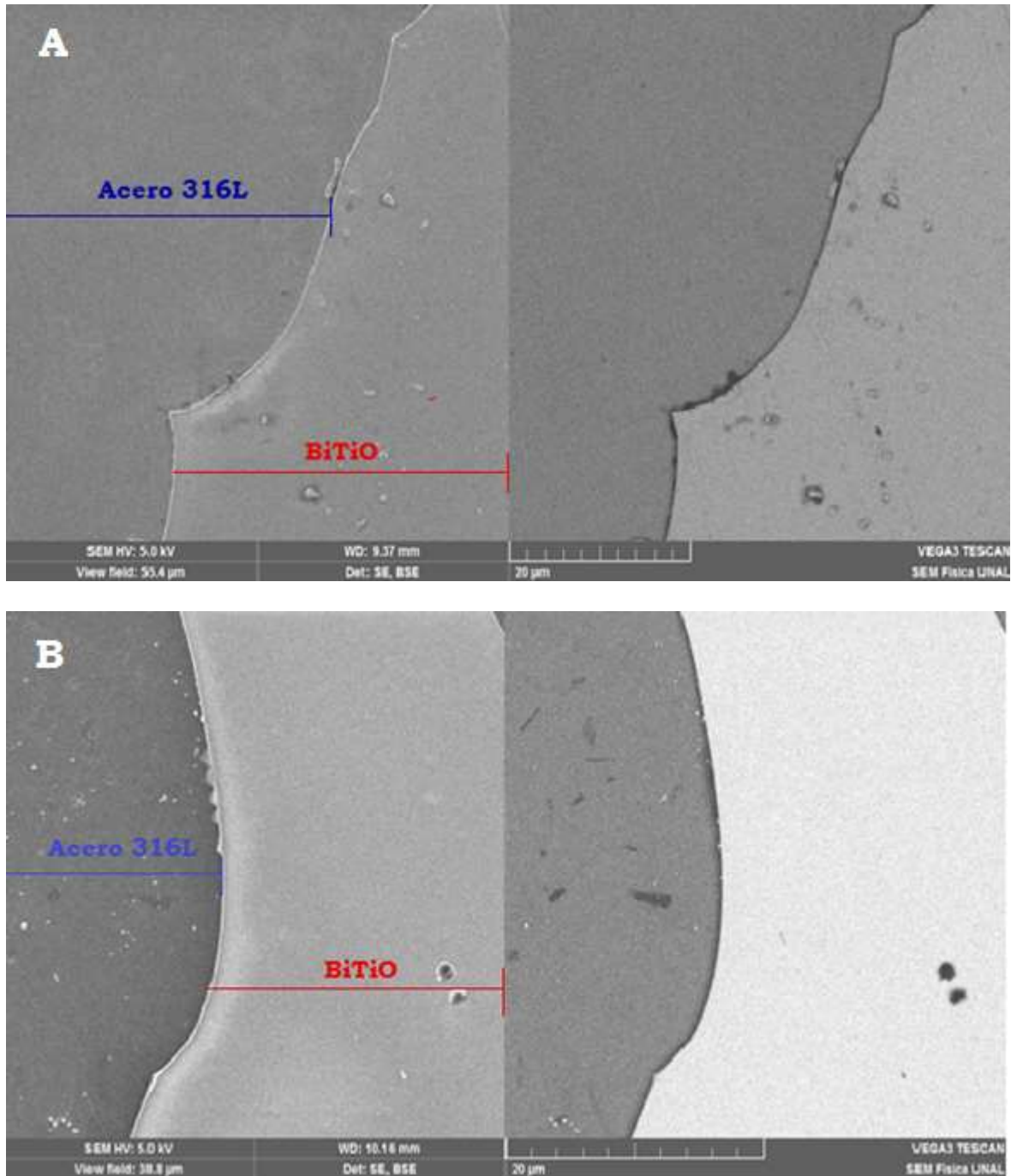


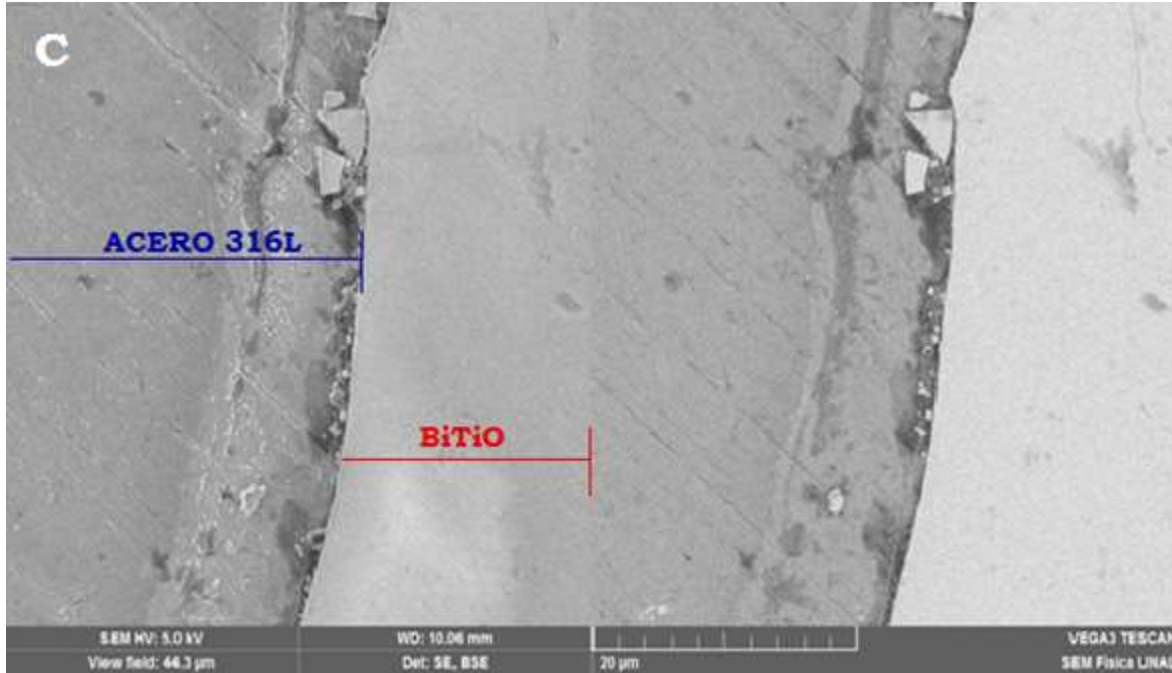


En la Figura 5.8, se observa la caracterización de las morfología de las capas delgadas de titanato de bismuto, mediante imágenes obtenidas a 10000x, en la Figura 5.8A, se muestra la imagen para películas delgadas de titanato de bismuto crecidas a temperatura RT; En la Figura 5.8B, se muestra la imagen de las películas delgadas de titanato de bismuto crecidas a 473°K; en la Figura 5.8C, se presenta la imagen de las películas delgadas de titanato de bismuto crecidas a 673°K. En la parte izquierda de cada imagen se encuentra en modo de electrones secundarios y la parte derecha en modo de retro dispersados, se

observa que para las tres muestras crecidas a diferentes temperaturas, las imágenes presentan superficie homogénea, sin de defectos superficiales, no hay presencia de poros ni de grietas.

Figura 5.9. Morfología de las películas de titanato de bismuto a 20000X: A. RT B. 473°K C. 673°K.





Para caracterizar mejor las morfologías de las capas delgadas de titanato de bismuto y corroborar lo observado en la micrografías a 10000x, se hicieron toma de imágenes a 20000X, en la Figura 5.9A, se muestra la imagen para películas delgadas de titanato de bismuto crecidas a temperatura RT; En la Figura 5.9B, se muestra la imagen de las películas delgadas de titanato de bismuto crecidas a 473°K; En la Figura 5.9C, se presenta la imagen de las películas delgadas de titanato de bismuto crecidas a 673°K. La parte izquierda de cada imagen se encuentra en modo de electrones secundarios y la parte derecha en modo de retro dispersados, se corrobora que para las tres muestras las imágenes en generalidad presentan superficie homogénea y sin defectos superficiales.

En general, se puede determinar que las películas, crecidas a diferentes temperaturas, presenta una morfología homogénea libre de poros y grietas, adicionalmente se observa buena adherencia, lo cual, se puede observar mediante las micrografías de microscopia Electrónica de barrido SEM, en modo de electrones secundarios y en modo retro dispersados a 10000X y 20000X, donde el límite entre película titanato de bismuto y sustrato acero inoxidable 316L, no presenta agrietamiento como tampoco separación.

5.6 Composición Química por EDX

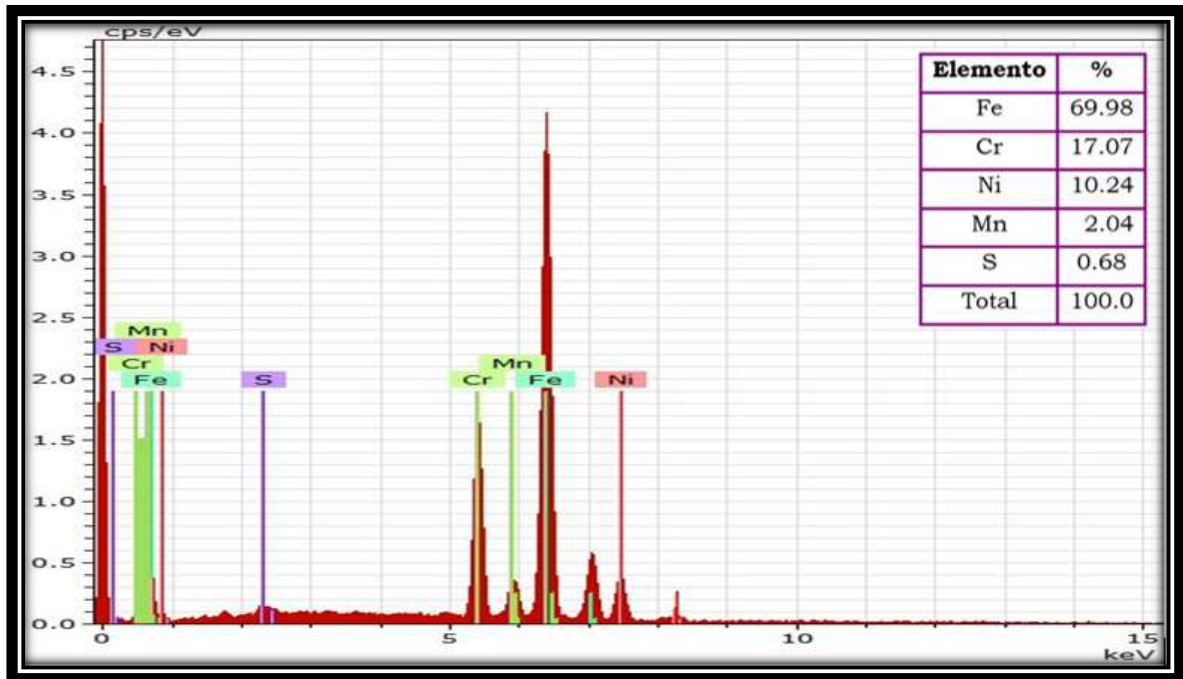
La composición química del sustrato acero 316L y de las películas delgadas de titanato de bismuto se obtuvieron mediante la técnica de espectroscopia de dispersión de energía (EDX) a 20000X. El espectro de EDX se obtiene al exponer la muestra durante un período determinado de tiempo a la irradiación de un haz de electrones, donde se recogen los fotones emitidos, esto permite identificar y

cuantificar los diferentes elementos presentes en el material con su respectiva concentración.

De acuerdo a la Figura 5.10 se muestra la composición química para el sustrato acero 316L; para las películas de titanato de bismuto depositado a diferentes temperaturas: RT, 473°K y 673°K, se pudo observar que la producción de titanio se ve favorecido con el aumento de temperatura en el crecimiento de la película, estos resultados se muestran en la Figura 5.11., resultados que corroboraron los obtenidos a partir de perfilometría.

En la Figura 5.10 se muestra el espectro para la evaluación de la composición química del sustrato acero inoxidable 316L; en él se observa los elementos presentes en el material y en la tabla ubicada en la parte superior derecha se encuentra la respectiva composición. Se evidencia que el porcentaje de Cromo equivalente al 17.07% está dentro del rango aceptado para este tipo de material el cual, esta entre 16.00% y 18.00% y el de Níquel 10.24%, igualmente se encuentra dentro de lo requerido, teniendo en cuenta que el rango esta entre 10.00% y 14.00%, esto de acuerdo a la Tabla 2.1 expuesta en el capítulo 2. Se hace referencia principalmente a estos dos elementos porque son los característicos de los aceros inoxidables de la serie 316.

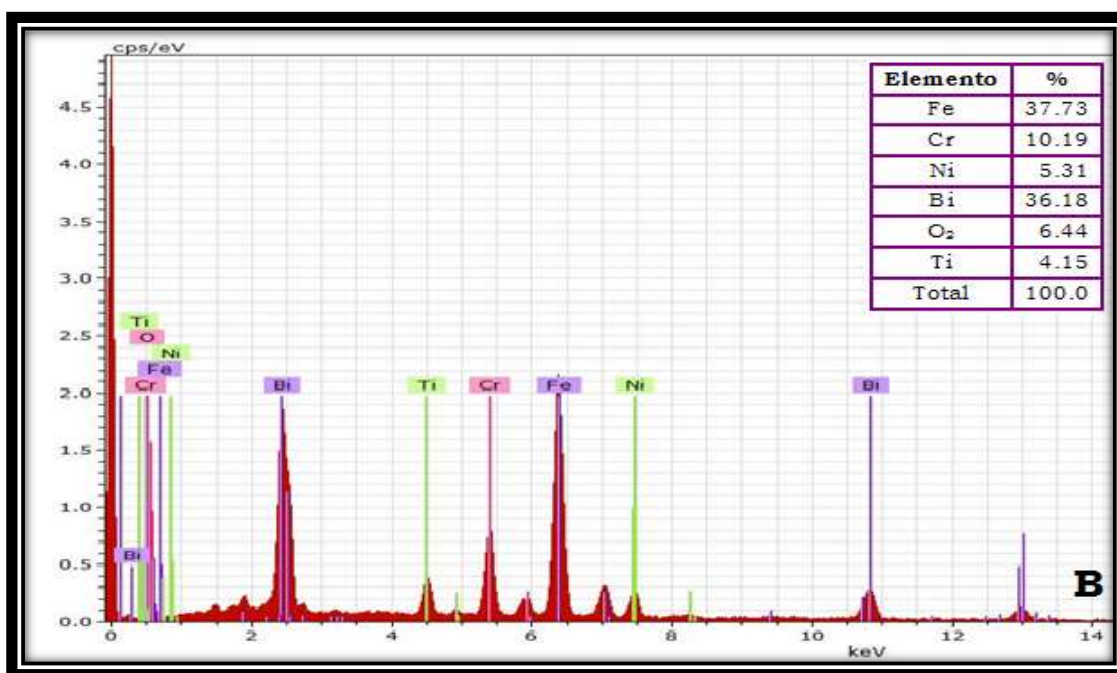
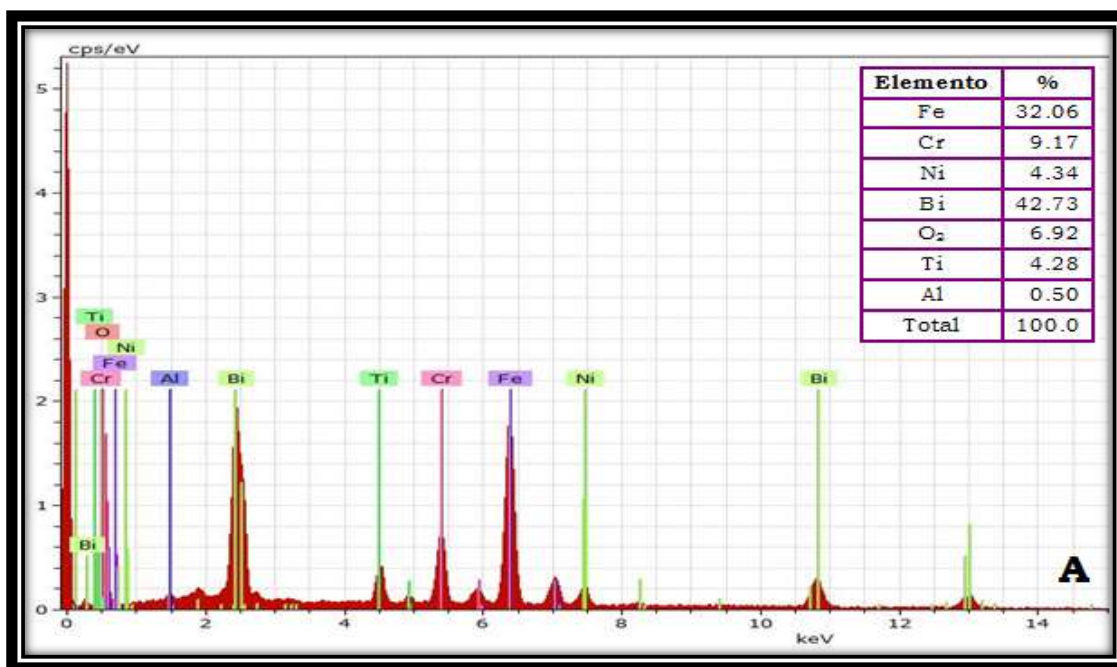
Figura 5.10: Composición química del sustrato Acero 316L.

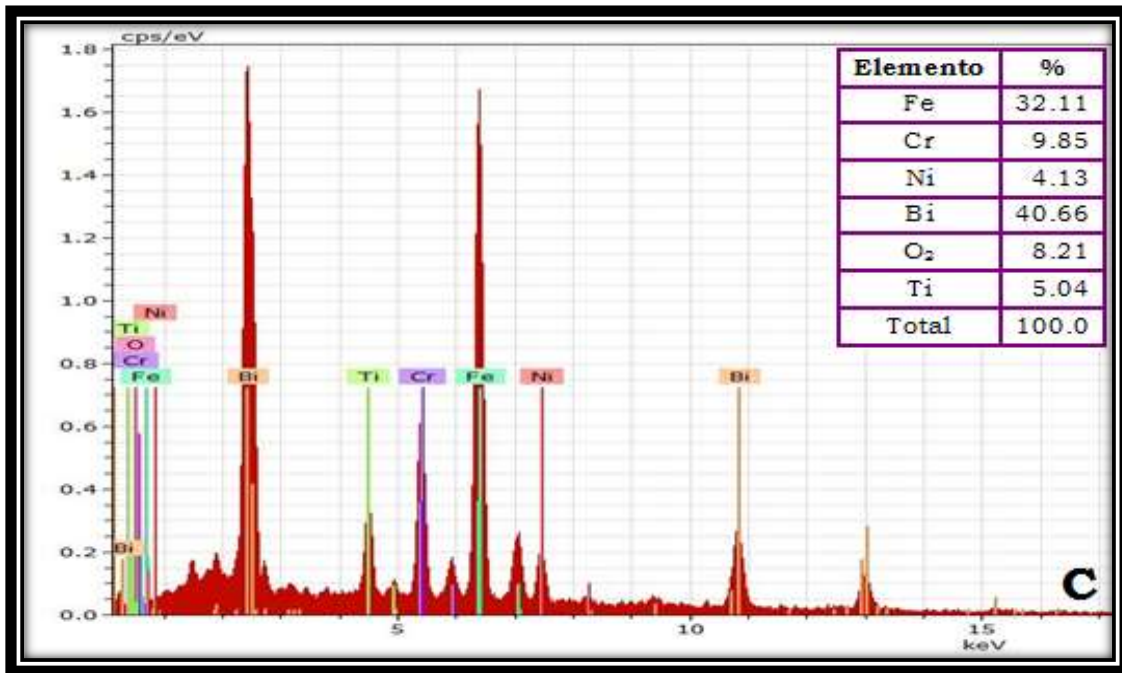


En la Figura 5.11A, se muestra el espectro para la evaluación de la composición química mediante la técnica de espectroscopia de dispersión de energía (EDX) para películas delgadas de titanato de bismuto crecidas a temperatura RT, en la parte superior de la imagen se puede observar las composiciones de los principales elementos que muestra el espectro, los de interés para la película son titanio el cual presenta un 4.28%, bismuto 42.73% y oxígeno 6.92%.

En la Figura 5.11B, se muestra el espectro para las películas crecidas a 473°K, donde se observa que titanio tiene una concentración de 4.15%, bismuto 36.18% y oxígeno 6.44%. De la misma manera en la Figura 5.11C, se encuentra el espectro para las películas crecidas a 673°K, estas tienen una concentración de titanio 5.04%, bismuto 40.66% y oxígeno 8.21%.

Figura 5.11: Composición química de las películas delgadas de titanato de bismuto A. RT B. 473°K C. 673°K.





Es de mencionar, que los elementos de interés en la composición química de la capa delgada son: Titanio, Bismuto y Oxígeno, teniendo en cuenta, que esta se obtiene mediante la técnica de pulverización catódica Sputering RF, utilizando como material de aporte un blanco de titanato de bismuto ($\text{Bi}_4\text{Ti}_3\text{O}_{12}$) en la fase Aurivillus con una pureza de 99.9%.

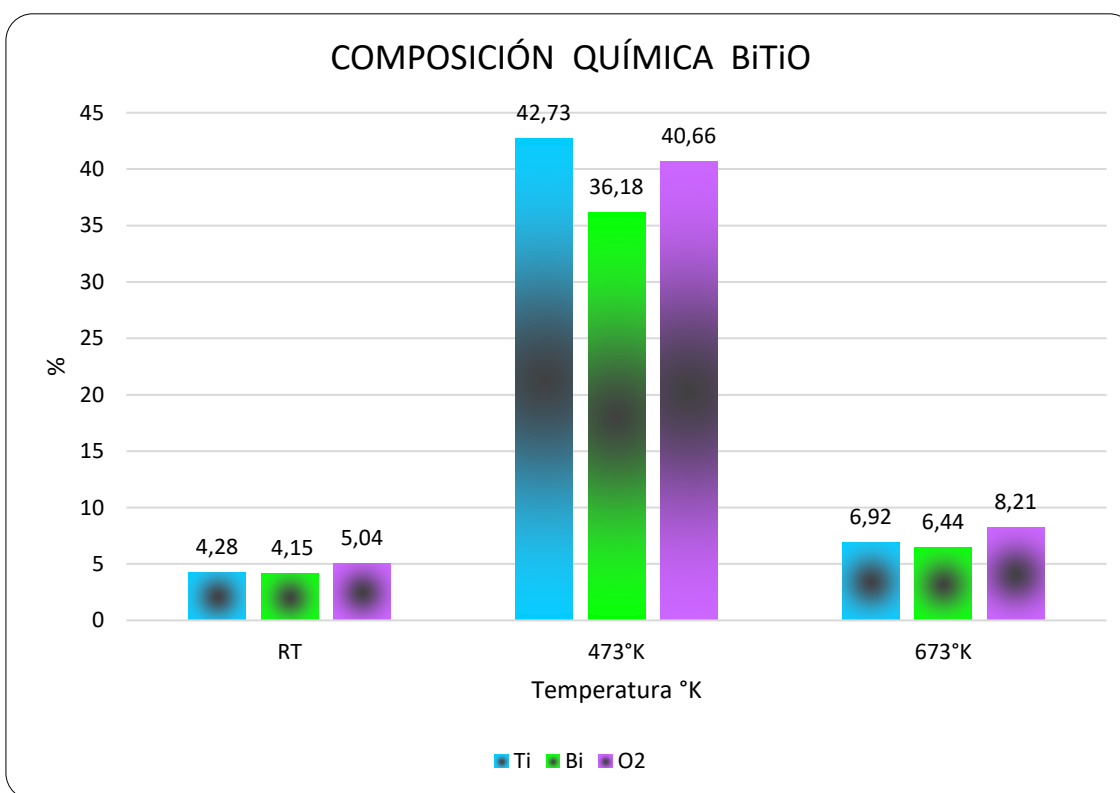
Mediante la evaluación de la composición química por la técnica de espectroscopia de dispersión de energía (EDX) de la capa delgada de titanato de bismuto, se observa claramente que los porcentajes de bismuto, titanio y oxígeno para las tres condiciones de temperaturas evaluadas, varían levemente, sin embargo, se observa que la película crecidas a una temperatura de 673°K presenta el mayor contenido de oxígeno y de titanio.

No obstante, el mayor porcentaje de bismuto lo presentan las películas crecidas a temperatura RT, el cual corresponde a 42,73%, seguido de las películas crecidas a 673°K . Las películas crecidas a 473°K tiene una composición química menor a las otros recubrimientos, sin embargo, las diferencias en porcentaje no son altas.

Para poder hacer una observación conjunta que permita hacer una comparación de los resultados de la composición química de cada una de las películas delgadas de titanato de bismuto obtenidas con las diferentes temperaturas usadas para el crecimiento, se muestra en la Tabla 5.3 la recopilación de datos, para los elementos de interés presentes en la película: Titanio, bismuto y oxígeno, con en el mismo propósito en la Gráfica 5.2, se muestra los mismos resultados en barras.

Tabla 5.3. Composición química de las películas delgadas de titanato de bismuto a: RT, 473°K y 673°K.

TEMPERATURA DE DEPOSITO (°K)	Ti %	Bi %	O ₂ %
RT	4.28	42.73	6.92
473	4.15	36.18	6.44
673	5.04	40.66	8.21

Gráfica 5.2. Composición química de las películas delgadas de titanato de bismuto A. RT B. 473°K C. 673°K.

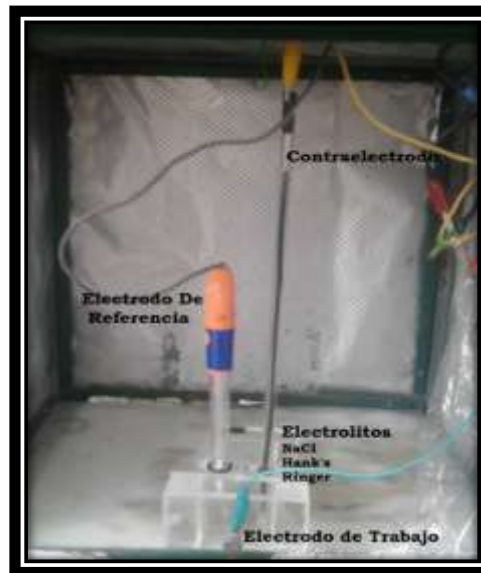
Así, se observa que la composición química obtenida por la técnica de espectroscopia de dispersión de energía (EDX) para las películas delgadas de titanato de bismuto obtenidas a diferentes temperaturas: RT, 473°K y 673°K, crecidas sobre el sustrato acero inoxidable 316L, es similar en los tres casos, la variación que muestra en cada uno de los elementos es mínima, esto, teniendo en cuenta el resumen presentado en la Tabla 5.4, donde se puede apreciar la composición de cada elemento con respecto a la temperatura y se corrobora con la Gráfica 5.2.

5.7 Evaluación de la resistencia a la corrosión

En la Figura 5.12 se observa el montaje para el desarrollo del ensayo de corrosión de las películas delgadas de titanato de bismuto, el cual consta de:

- Un electrodo de referencia que en esta caso es de calomel
- Un contraelectrodo
- Un electrodo de trabajo, que es el sustrato recubierto, es decir, acero inoxidable 316L recubierto con titanato de bismuto.
- Electrolito: NaCl 3.5%, Hank's y Ringer

Figura 5.12. Montaje para el ensayo de corrosión



5.7.1 Polarización Potenciodinámica

Con la aplicación del método de Extrapelación de Tafel, se determinaron los parámetros electroquímicos:

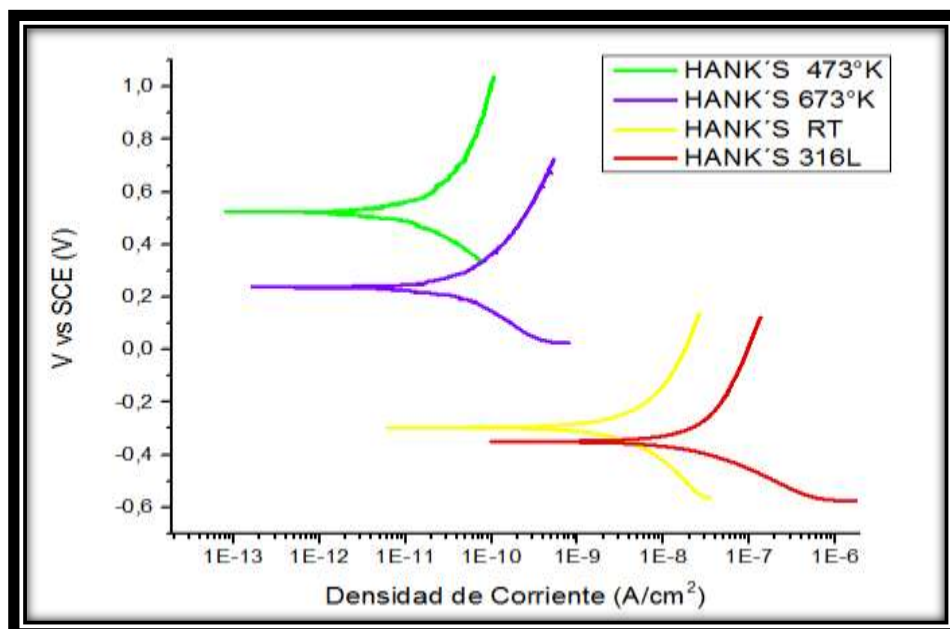
- Potencial de corrosión (E_{corr})
- Densidad de corriente de corrosión (I_{corr})
- Pendientes de Tafel anódica (β_a)
- Pendientes de Tafel catódica (β_c)
- Resistencia de polarización (R_p)
- Tasa de corrosión (T_C)

A continuación, se relacionan en la Tabla 5.4 cada uno de estos parámetros para los diferentes electrolitos que se utilizaron para el desarrollo de las pruebas de corrosión, los cuales fueron: Cloruro de Sodio (NaCl) 3.5%, solución Hank's y solución Ringer, para cada una de las temperaturas de crecimiento de las películas: RT, 473°K y 673°K.

Tabla 5.4. Parámetros electroquímicos obtenidos en las pruebas de Polarización Potenciodinámica (TAFEL), con cada uno de los electrolitos.

Elec	Ref.	Open Circuit	Ecorr (mV)	Icorr (A/cm ²)	Ba (V/dcd)	Bc (V/dcd)	Rp (Ω*cm ²)	Corr Rate (mupy)
HANK'S	316L	-0,33529	-227,8	2,23E-08	0,1805	0,1906	1,29E+06	0,3179
	RT	-0,29662	-236,6	2,25E-08	0,1819	0,15595	1,41E+06	0,4553
	473°K	0,52573	525,5	1,91E-10	0,1492	0,10515	1,48E+0,8	0,6052
	673°K	0,23865	238,6	1,29E-10	0,1352	0,1119	1,90E+08	0,5753
RINGER	316L	0,31721	-217,3	2,21E-08	0,1789	0,1895	1,28E+06	0,3067
	RT	-0,24834	-248,3	2,53E-08	0,1875	0,1603	1,47E+06	0,2937
	473°K	-0,17223	-172,2	4,89E-08	0,1215	0,1224	1,69E+06	0,4352
	673°K	-0,16015	-160,1	5,50E-08	0,1237	0,11211	1,72E+06	0,5370
NaCl	316L	-0,40282	-185,1	1,96E-08	0,1757	0,183745	1,27E+06	0,1679
	RT	-0,30538	-205,4	2,19E-08	0,1803	0,17895	1,31E+06	0,3455
	473°K	-0,24244	-242,4	2,69E-08	0,1997	0,15927	1,54E+06	0,2187
	673°K	-0,20854	-257,4	2,91E-08	0,1211	0,12907	1,65E+06	0,4255

Las curvas de Polarización Potenciodinámica de sustrato en blanco y de las películas delgadas de titanato de bismuto crecidas a diferentes temperaturas: RT, 473°K y 673°K; y evaluadas en NaCl 3.5%, en Solución Ringer y en Solución Hank's, se presentan a partir de la Figura 5.13 hasta la Figura 5.15.

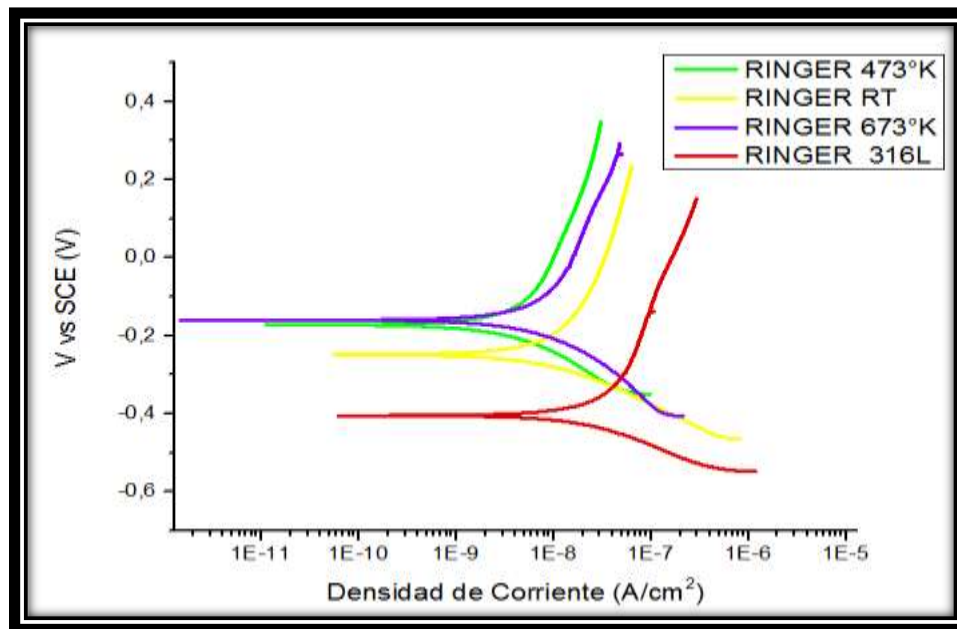
Figura 5.13. Curvas de polarización de películas de titanato de bismuto depositadas sobre acero 316L a temperatura: RT, 473°K y 673°K analizadas en Solucion Hank's.

De las películas evaluadas en la solución Hank's, la mejor resistencia a la corrosión, la presenta las películas de Titanato de Bismuto crecidas a una temperatura de 473°K, lo cual, se muestra en la Figura 5.13; se observa que este recubrimiento tiene buen comportamiento con respecto al sustrato, lo que, es coherente con los valores obtenidos de Resistencia a la Polarización.

De igual forma la mejor resistencia a la corrosión, de los recubrimientos de Titanato de Bismuto crecidos a una temperatura de 673°K, la presentaron los evaluados en la Solucion Hank's, lo cual, está directamente relacionados a los altos valores de Resistencia a la Polarización que presenta este recubrimiento y que se observa en la Tabla 5.4 y se corrobora con la Figura 5.13.

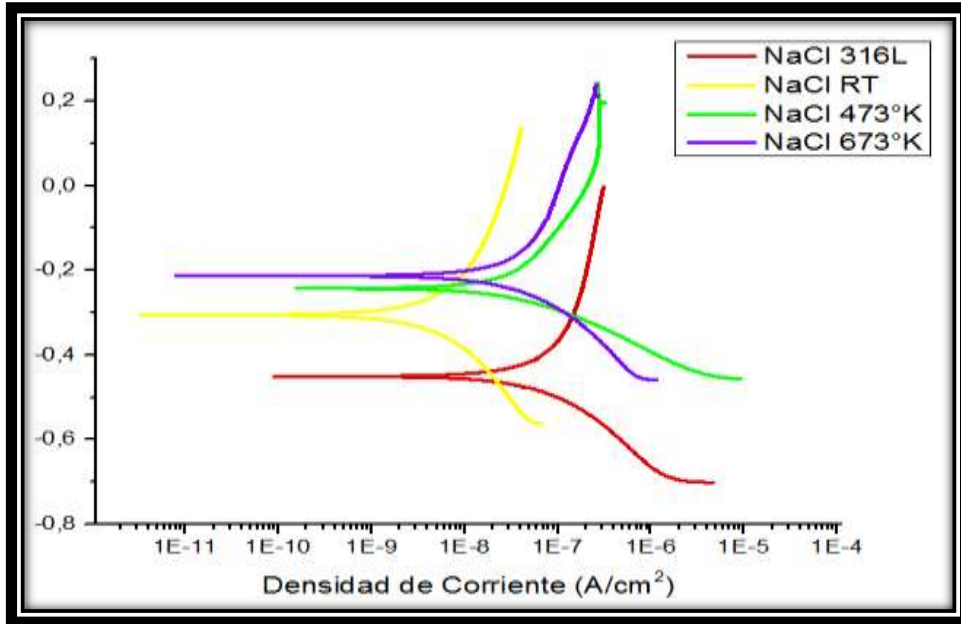
Las curvas potenciodinámicas de titanato de bismuto presentaron zona activa sin evidencia de pasivación. Dos de las películas evaluadas mostraron potenciales de corrosión positivos: la película crecida a 473°K y evaluada en el electrolito Hank's y la película crecida a 673°K evaluada en la misma solución, esto indica la menor actividad electroquímica, por tanto la menor tendencia termodinámica y mayor resistencia a la corrosión con respecto al sustrato de acero inoxidable 316L.

Figura 5.14. Curvas de polarización de películas de titanato de bismuto depositadas sobre acero 316L a una temperatura: RT, 473°K y 673°K analizadas en Solución Ringer.



Las películas de titanato de bismuto crecidas a diferentes temperatura y evaluadas en solución Ringer, presentaron buen comportamiento a la resistencia a la corrosión con respecto al sustrato acero 316L, evaluado en el mismo medio, lo que se puede observar en la Figura 5.14, y se corrobora con los valores de Resistencia a la Polarización que se observan en la Tabla 5.4., los cuales son mayores al del sustrato.

Figura 5.15. Curvas de polarización de películas de titanato de bismuto depositadas sobre acero 316L a una temperatura: RT, 473°K y 673°K analizadas en Cloruro de Sodio 3.5%.



Con respecto a las películas de titanato de bismuto evaluadas en Cloruro de Sodio 3.5%, es necesario aclarar que este electrolito simula un ambiente agresivo y no se considera un fluido corporal, por cuanto lo que simula es medio salino. No obstante, los resultados evidencian que el recubrimiento presenta mayor resistencia a la corrosión con respecto al sustrato acero 316L, lo que se puede observar en la Figura 5.15, y se relaciona con los altos valores de Resistencia a la Polarización que se observan en la Tabla 5.4.

El evaluar los recubrimientos de titanato de bismutos crecidos a diferentes temperaturas en un electrolito agresivo como el Cloruro de Sodio (NaCl) al 3.5%, donde el propósito principal es evaluar el comportamiento de estos al ser sometido en soluciones que simulen fluidos corporales, reviste de importancia para el estudio de corrosión, por cuanto, el resultado obtenido, evidencia si los recubrimientos presentan actividad electroquímica que favorezcan el intercambio de electrones.

La resistencia de polarización se calculó utilizando las curvas de Tafel. Todos los recubrimientos de Titanato de Bismuto depositados a una temperatura de 673°K presentaron una menor densidad de corriente de corrosión y una mayor resistencia a la polarización con relación a los recubrimientos de titanato de bismuto depositados a una temperatura RT.

En general los potenciales de corrosión de los sustratos recubiertos con titanato de bismuto a las diferentes temperaturas estuvieron más cercanos al potencial del electrodo de referencia al compararlo con el sustrato sin recubrir, esto, sugiere una respuesta positiva de resistencia evitando la corrosión.

Se observa que el comportamiento, de las películas delgadas de titanato de bismuto crecidas a diferentes temperaturas: RT, 473°K Y 673°K en los tres electrolitos diferentes: Cloruro de Sodio 3.5%, Solución Ringer y Solución Hank's, muestran un buen comportamiento de la resistencia a la corrosión con variaciones apreciables con respecto al comportamiento descrito por el sustrato acero 316L. Así, se evidencia que las películas muestran una significativa resistencia a la corrosión en los diferentes electrolitos utilizados.

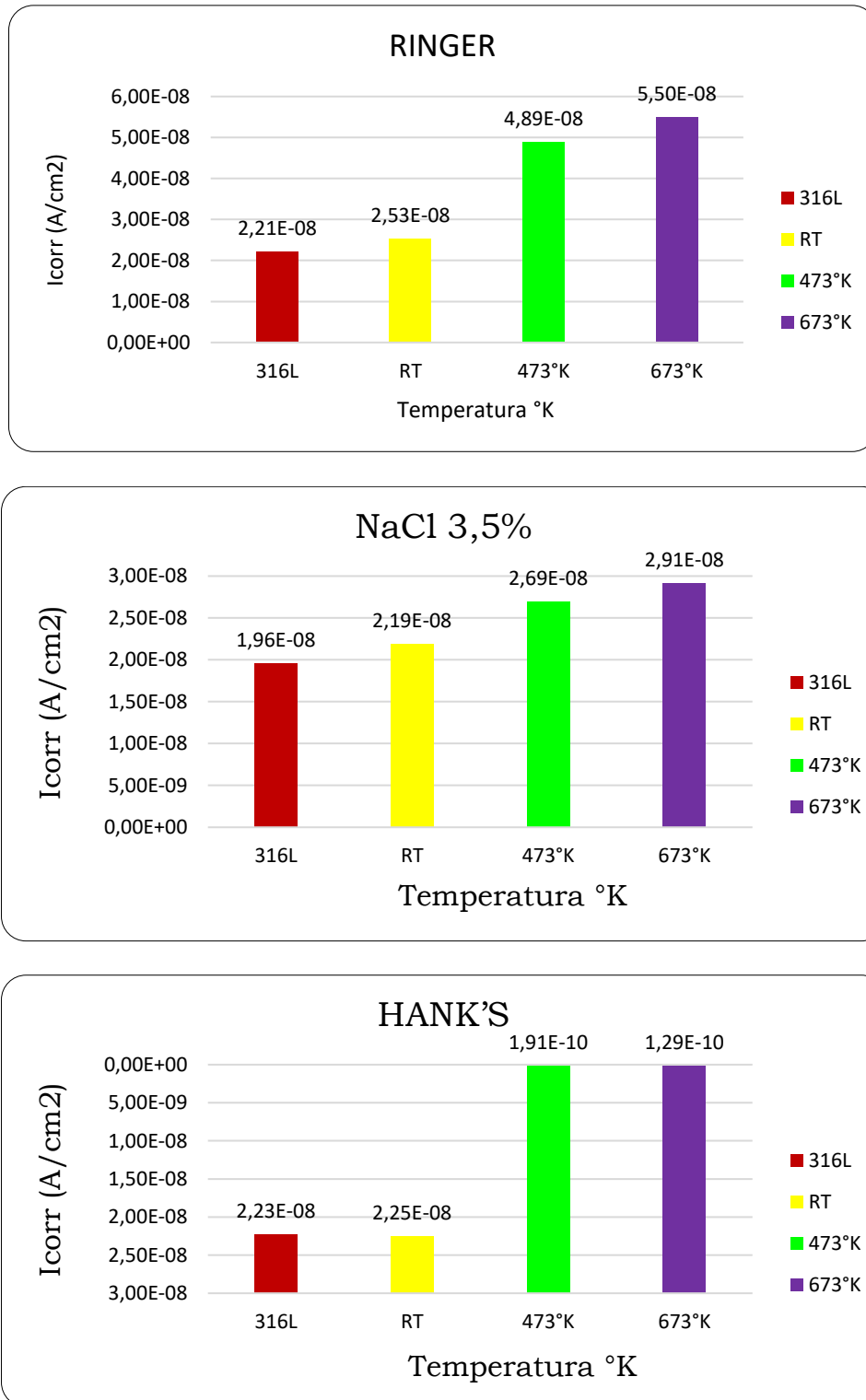
Con relación a la densidad de corriente de corrosión (I_{corr}) los recubrimientos se encuentran dentro el mismo orden de magnitud con respecto al sustrato Acero Inoxidable 316L a diferencia de las películas crecidas a 473°K y a 673°K, evaluado en solución Hank's, la cuales, varían en dos órdenes de magnitud y son las que presenta menor actividad electroquímica.

En la evaluación de las películas delgadas de titanato de bismuto en los tres electrolitos de evaluación, se observa que el mejor comportamiento de resistencia a la corrosión la presentan las películas crecidas a una temperatura de 473°K, para poder apreciar mejor este comportamiento, en la Tabla 5.5., se resume la información del I_{corr} con respecto a la temperatura para cada uno de los electrolitos, esto se puede verificar con la grafica de barras en la Gráfica 5.3.

Tabla 5.5. Densidad de corriente de corrosión (I_{corr}) obtenido en las pruebas de Polarización Potenciodinámica (TAFEL), con cada uno de los electrolitos.

Elect	Referencia	I_{corr} (A/cm ²)
HANK'S	316L	2,23E-08
	RT	2,25E-08
	473°K	1,91E-10
	673°K	1,29E-10
RINGER	316L	2,21E-08
	RT	2,53E-08
	473°K	4,89E-08
	673°K	5,50E-08
NaCl	316L	1,96E-08
	RT	2,19E-08
	473°K	2,69E-08
	673°K	2,91E-08

Grafica 5.3. Gráficas de barras de películas de titanato de bismuto depositadas sobre acero 316L a diferentes temperaturas y analizadas en A. Solución Ringer B. Cloruro de Sodio 3.5% C. Solucion Hank's.

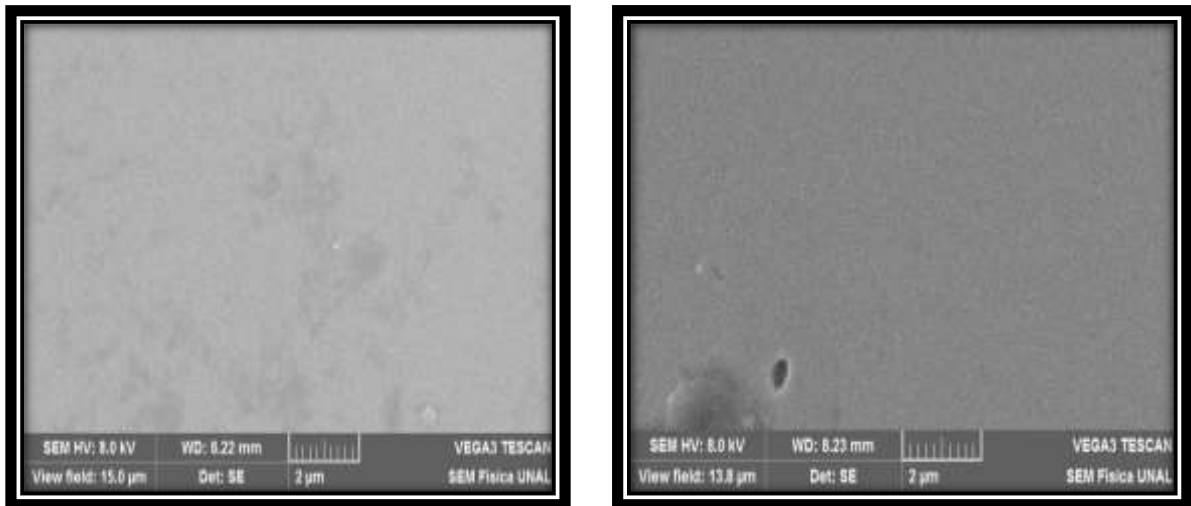


En la Grafica 5.3, al evaluar el Icorr para cada una de las temperaturas de crecimiento de las películas, se observa que en general presentan mejor comportamiento de resistencia a la corrosión con respecto al sustrato acero inoxidable 316L; dentro de las películas el mejor comportamiento es el de la película obtenida a una temperatura de 473°K y evaluada en solución Hank's y el menor se observa en la película crecida a RT evaluada en NaCl 3.5%.

5.7.2 Microscopia electrónica de barrido SEM

Las películas delgadas en general no presentan poros ni defectos superficiales apreciables, esto, de acuerdo a los resultados obtenidos por espectroscopia electrónica de barrido (SEM), para este fin se presenta en la Figura 5.16, a lado izquierdo la imagen de la película que mayor resistencia a la corrosión presento, es decir, la crecida a 473°K y evaluada en solución Hank's y en la parte derecha la imagen de la película crecida a temperatura RT evaluada en Cloruro de Sodio 3.5%, la cual, presento la menor resistencia con respecto a las demás películas evaluadas.

Figura 5.16. Microscopia electrónica de barrido, después de someter la películas al ensayo de corrosión.



Las películas en general no presentan defectos apreciables, razón por la cual, no tiene lugar la difusión de ninguno de los electrolitos evaluados por efecto de capilaridad. Con respecto a la cinética del proceso corrosivo se evidencia que los valores de la porosidad (P) tienen variaciones mínimas dentro del mismo orden de magnitud para las películas en general exceptuando las películas crecidas a 473°K y 673°K evaluadas en el electrolito Hank's, estos valores muestran un incremento de la resistencia a la corrosión.

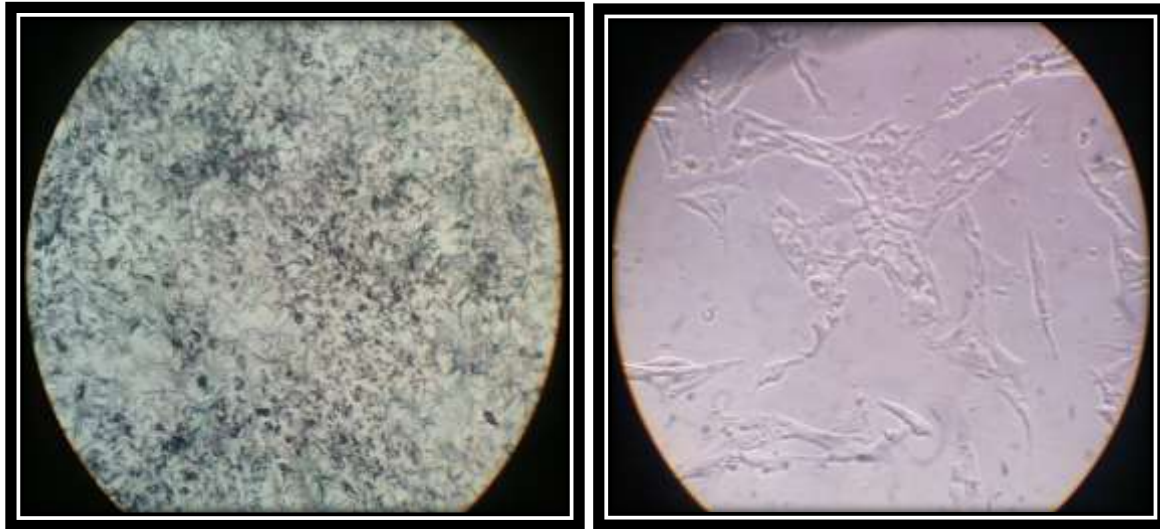
5.8 Pruebas de Biocompatibilidad

Para evaluar la biocompatibilidad de las películas delgadas de titanato de bismuto, crecidas a diferentes temperaturas, se realizaron dos ensayos: análisis de viabilidad celular MTT y formación de hidroxiapatita sobre la superficie por la técnica de Bone Like y la respectiva evaluación de composición química con la técnica de dispersión de energía, EDX.

5.8.1 Análisis de Viabilidad Celular MTT

Se hizo el análisis de viabilidad celular o actividad metabólica MTT, con el propósito de evaluar la biocompatibilidad de las películas delgadas de titanato de bismuto, en esta técnica que determina la viabilidad de células adheridas, el bromuro de tetrazolio es reducido a formazán, por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. De esta forma se determina la proliferación celular y la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular [120].

Figura 5.17. Vista microscópica de viabilidad MTT con reducción a formazán



En la Figura 5.17, se observa el bromuro de tetrazolio reducido a formazán, presentando coloración púrpura, este, es disuelto en isopropanol con el fin de tomar la medida de la absorbancia por espectrofotometría a 570 nm, longitud de onda, en la cual, se obtiene la máxima absorbancia del formazán; este valor permite determinar el porcentaje de células vivas que son capaces de interactuar con el biomaterial, donde, el número de células vivas es directamente proporcional a la cantidad de formazán producido.

Se utilizó como control la siembra de 120000 células osteoblásticas por pozo, para lo cual, se realizaron tres siembras en una caja de cultivo de 12 pozos,

como blanco la solución de siembra sin células, además se utilizó acero inoxidable 316L sin recubrir. La prueba se realizó por triplicado y en la Tabla 5.6 se describen los resultados de absorbancia para cada muestra evaluada.

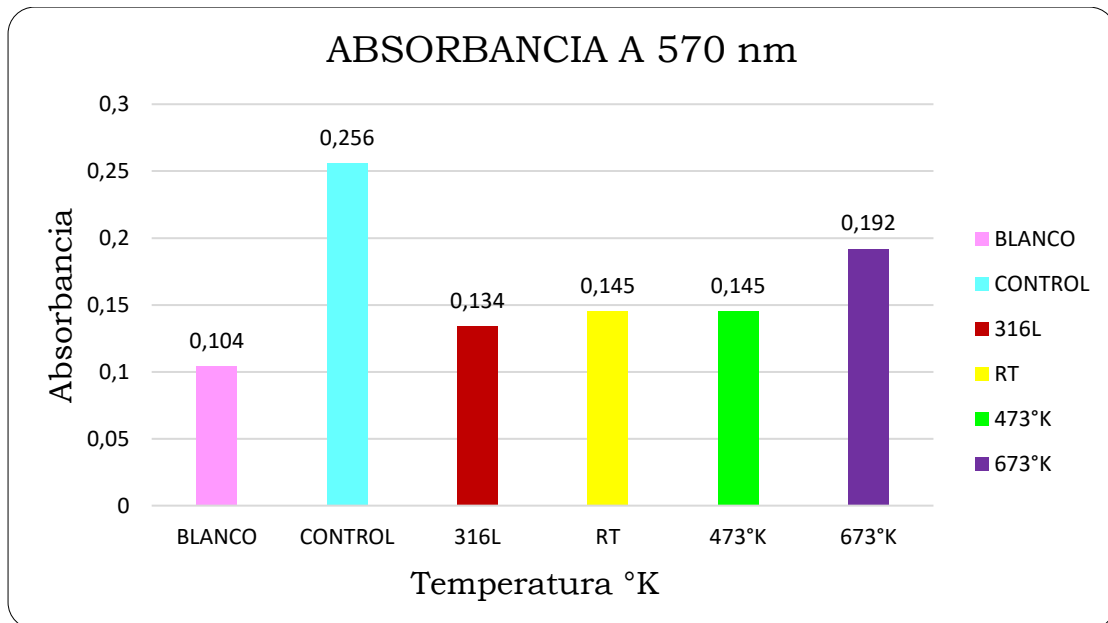
Características de las células

- Osteoblastos de ratón
- Línea celular C57BL6

Tabla 5.6. Valores de absorbancia a 570 nm.

ABSORBANCIA A 570 nm						
ENSAYO	BLANCO	CONTROL	SUSTRATO	RT	473°K	673°K
1	0,106	0,264	0,139	0,151	0,149	0,196
2	0,103	0,262	0,127	0,148	0,145	0,192
3	0,102	0,242	0,136	0,135	0,141	0,188
PROMEDIO	0,104	0,256	0,134	0,145	0,145	0,192

Grafica 5.4. Graficas de barras de la absorbancia a 570 nm.



La mayor absorbancia la presentan las películas de titanato de bismuto crecidas a una temperatura de 673°K con un valor promedio de 0,192 lo que indica que son las muestras que mayor número de células vivas de osteoblastos adhirieron a la superficie con respecto a las películas crecidas a 473°K, las cuales, presentan una absorbancia promedio de 0,145 al igual que las crecidas a Temperatura RT.

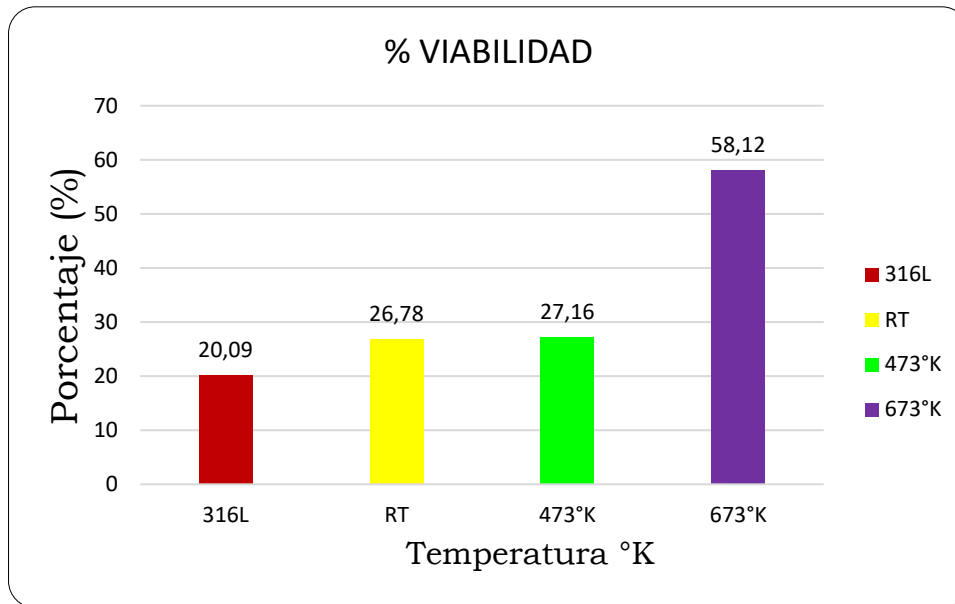
De igual forma las tres películas delgadas de titanato de bismuto crecidas a diferentes temperaturas tienen mayor viabilidad de crecimiento celular con

respecto al acero sin recubrir, el cual, muestra la menor absorbancia con un valor promedio de 0,134.

Tabla 5.7. Viabilidad de crecimientos celular en las películas crecidas a diferentes temperaturas

% VIABILIDAD				
ENSAYO	316L	RT	473°K	673°K
1	20,89	28,48	27,22	56,96
2	15,09	28,30	26,43	55,98
3	24,29	23,57	27,86	61,43
PROMEDIO	20,09	26,78	27,16	58,12

Grafica 5.5. Viabilidad de crecimientos celular en las películas crecidas a diferentes temperaturas.



El porcentaje de viabilidad de crecimientos celular en las películas crecidas a diferentes temperaturas se determinó mediante la fórmula 4.1 expuesta en el Capítulo 4 (Diseño experimental), estos resultados son expuestos en la Tabla 5.7 y se observa en la Grafica 5.5.

De esta forma se evidencia, que la mayor viabilidad la presenta las películas crecidas a una temperatura de 673°K con un porcentaje de 58.12%, lo que se corrobora con los resultados obtenidos en la evaluación de la corrosión, estas mismas películas presentaron buen comportamiento a la resistencia a la corrosión en los tres electrolitos evaluados: Solución Ringer B. Cloruro de Sodio 3.5% C. Solucion Hank's, con respecto al sustrato. Las películas crecidas a 473°K presentan una viabilidad celular de 27.16% y las de Temperatura RT de 26.78%, lo cuales, son mayores al del sustrato sin recubrir que es equivalente a

20.09%. Estos resultados son concordantes con los obtenidos en los ensayos de corrosión donde las películas en general son más resistentes a la corrosión con respecto al acero 316L

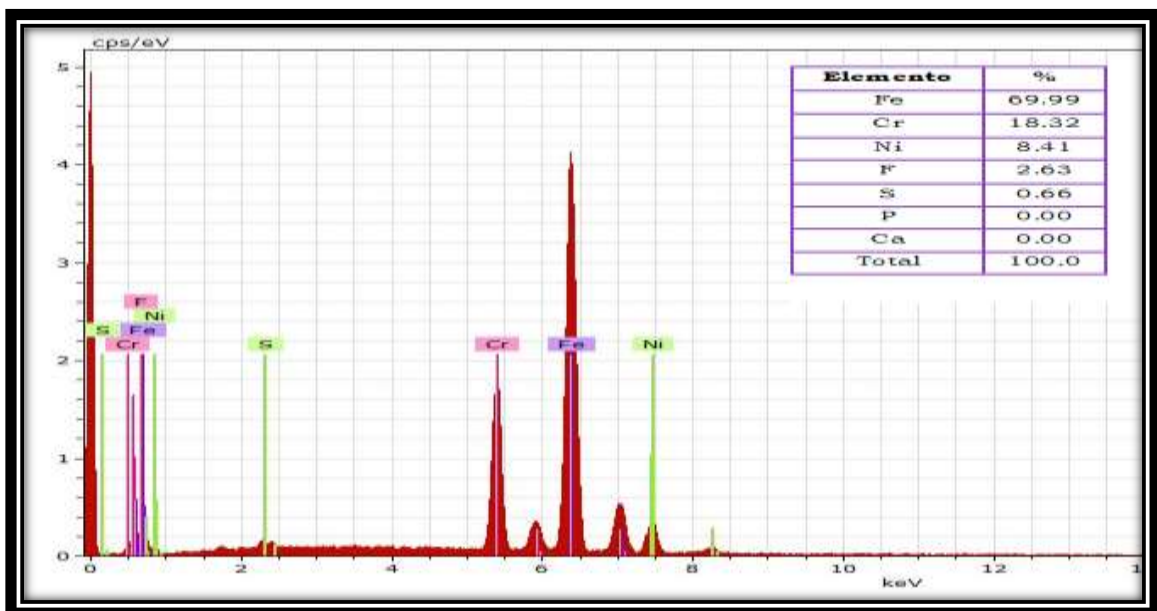
5.8.2 Formación de Hidroxiapatita Técnica Bone Like

Para la formación de apatita sobre las películas delgadas de titanato de bismuto depositadas a diferentes temperaturas, son sumergidas en SBF, donde se produce la formación de grupos Ti-OH en su superficie. Los grupos Ti-OH formados se combinan rápidamente con iones de calcio presentes en el fluido para formar titanato de calcio. Este titanato de calcio posteriormente se combina con iones fosfato, también presente en el SBF para formar fosfato de calcio amorfo, el fosfato de calcio se transforma en apatita, la cual se caracteriza principalmente por la relación molar Ca:P que se encuentra en un rango de 1,2 a 2, adicionalmente contiene bajas concentración de Mg y Na, similar a las que presenta el hueso [113].

Este fosfato de calcio se transforma espontáneamente en la apatita, debido a que la apatita es la fase estable en el cuerpo [113].

Para la formación de hidroxiapatita HAP, mediante la técnica Bone Like sobre la superficie de la película delgada de titanato de bismuto se sumergieron en la solución SBF (Fluido Corporal Simulado), una muestra de cada temperatura utilizada en el crecimiento: RT, 473°K y 673°K; para la respectiva comparación de resultados se utilizó como blanco el sustrato acero inoxidable 316L sin recubrir, los resultados de la composición se muestran en la Figura 5.18.

Figura 5.18. Composición Química del sustrato acero inoxidable 316L, por la técnica de dispersión de energía, EDX.



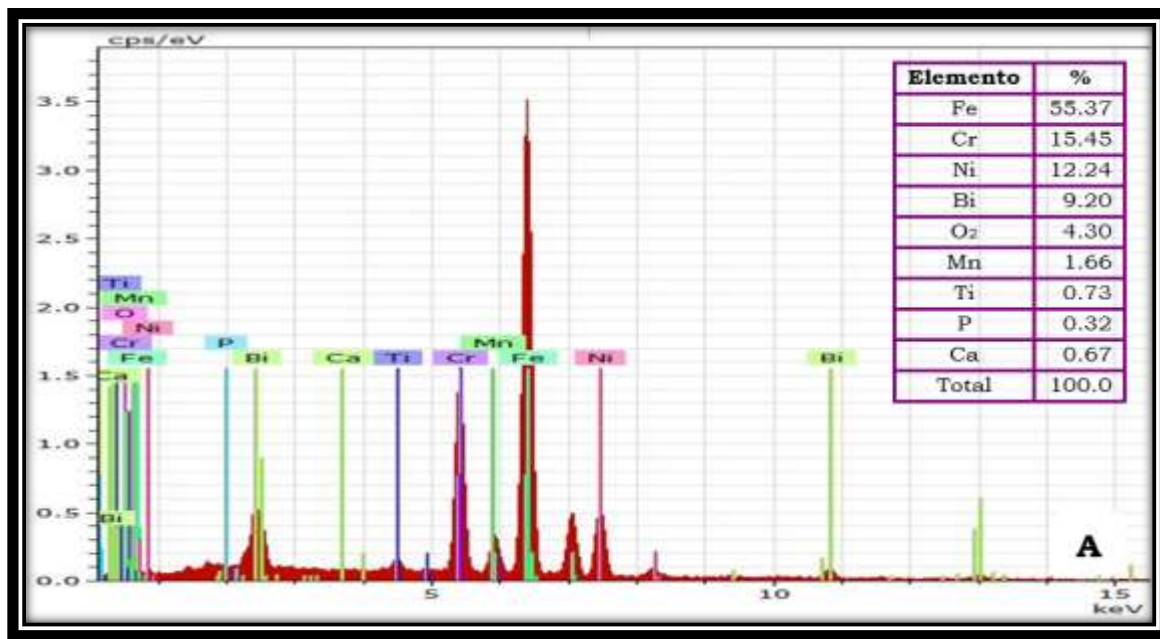
De acuerdo a la Figura 5.18, donde se presenta la composición química del sustrato acero inoxidable 316L, analizado por la técnica de dispersión de energía, EDX, el cual, fue sometido previamente en SBF con el propósito de evaluar la biocompatibilidad mediante la formación de hidroxiapatita por la técnica Bone Like, se observa la ausencia en porcentaje de calcio de igual forma de fosforo; por tanto no hubo formación de hidroxiapatita en la superficie del sustrato.

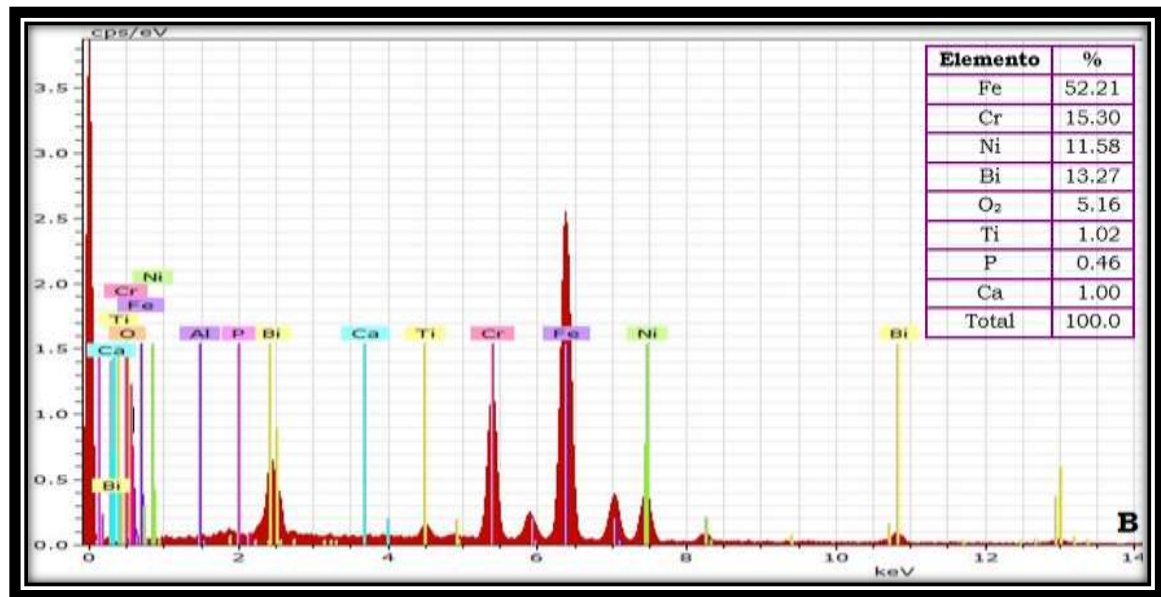
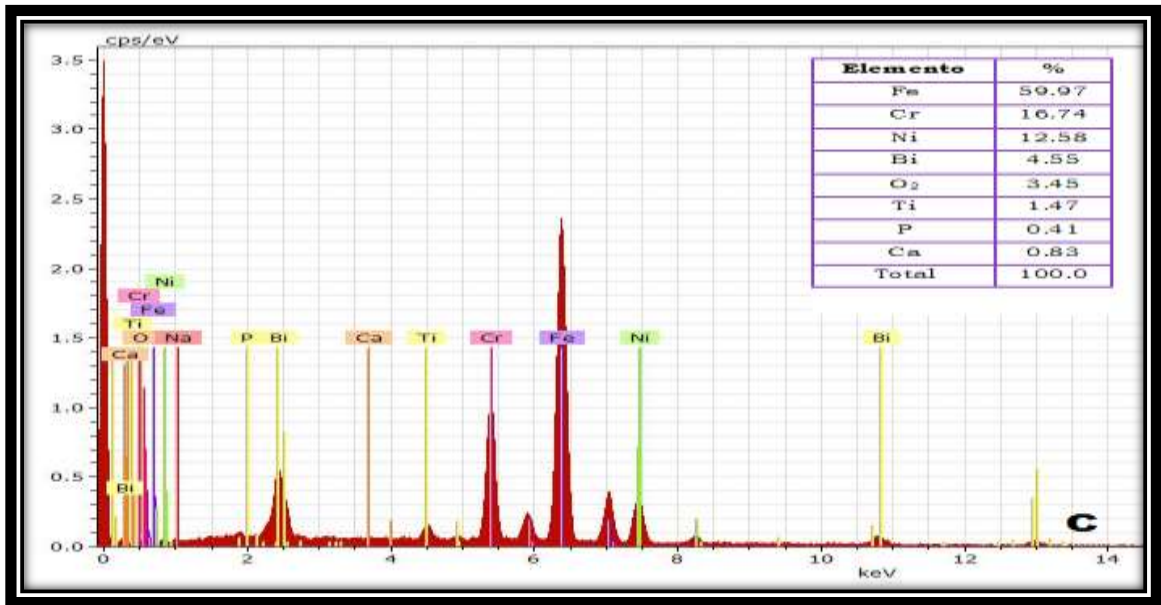
Las composiciones químicas de las películas delgadas de titanato de bismuto, que fueron sometidas a la prueba de biocompatibilidad por la técnica Bone Like fueron posteriormente evaluadas mediante espectroscopia de dispersión de energía (EDX), de acuerdo a la Figura 5.19.

En la Figura 5.19A, se muestra el espectro para la evaluación de la composición química para películas delgadas de titanato de bismuto crecidas a temperatura RT, y sometida a la prueba de biocompatibilidad; donde se puede observar las composiciones de los principales elementos que muestra el espectro, los de interés en esta ocasión es el calcio, el cual, es de 0.67% y fosforo 0.32%.

En la Figura 5.19B, se encuentra el espectro para las películas crecidas a 473°K, donde se observa que después de esta valoración el calcio es de 1.00% y el fosforo 0.46%. En la Figura 5.19C, se muestra el espectro para las películas crecidas a 673°K, donde la concentración de calcio es equivalente a 0.83% y el fosforo 0.41%.

Figura 5.19. Composiciones Químicas de películas delgadas de Titanato de Bismuto, por EDX depositados A. RT B.: 273°K C. 673°K





Los espectros de las tres películas depositadas a diferentes temperatura y sometidas a evaluación de composición química después de ser sumergidas en solución SBF con el propósito de determinar la biocompatibilidad, mediante la formación de hidroxiapatita por la técnica Bone Like, se observa que las películas de titanato de bismuto presentan contenido de calcio y fosforo a diferencia del sustrato acero 316L sin recubrir, donde es ausente.

Estos resultados guardan total coherencia con los obtenidos en la pruebas de análisis de viabilidad celular MTT, donde si bien es cierto el sustrato acero inoxidable 316L sin recubrir presenta viabilidad de crecimiento celular este

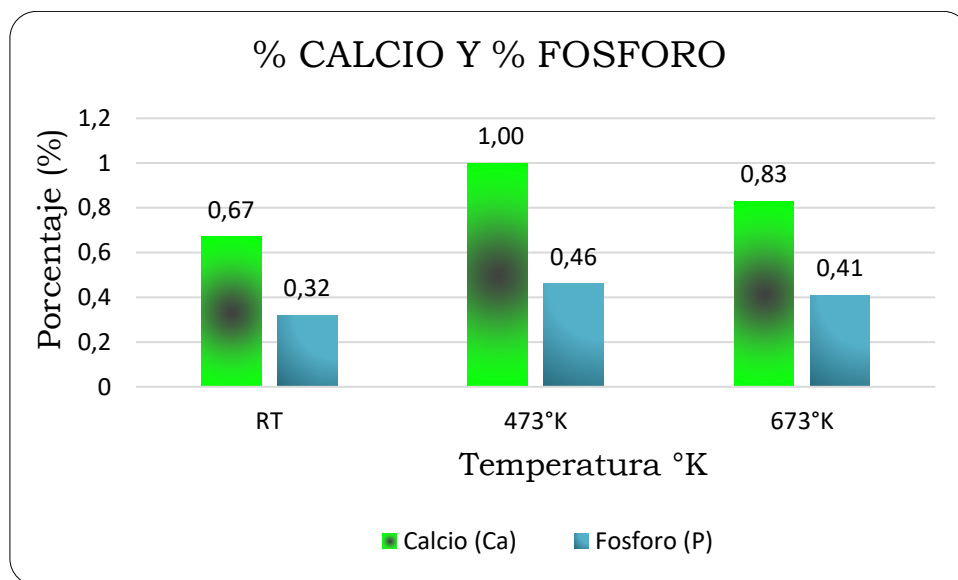
porcentaje es inferior respecto a la que presentan los tres sustratos recubiertos a diferente temperatura.

Con el fin de hacer una comparación de los resultados de la composición química del Calcio y fósforo específicamente, de cada una de las películas de titanato de bismuto y del sustrato sin recubrir sometidas a prueba de biocompatibilidad, se muestra en la Tabla 5.8 la recopilación de datos, con el mismo propósito en la Gráfica 5.6, se representan los mismos resultados en barras.

Tabla 5.8. Porcentaje de Ca y P obtenidos en cada una de las películas delgadas de titanato de bismuto crecidas a diferentes temperaturas.

TEMPERATURA DE DEPOSITO (°K)	Calcio (Ca) %	Fosforo (P) %
RT	0.67	0.32
473	1.00	0.46
673	0.83	0.41

Gráfica 5.6. Gráfica de producción de calcio y fósforo, de las películas delgadas obtenidas a diferentes temperaturas y ensayadas por la técnica Bone Like.



En la prueba de biocompatibilidad mediante la formación de hidroxiapatita por la técnica Bone Like con su respectiva evaluación de composición química, se evidencia que los recubrimientos a 473°K son los que presenta mayor concentración de calcio, lo cual, es concordante con los resultados obtenidos en el ensayo de corrosión, donde estas muestra presentaron la más alta resistencia a la corrosión al ser evaluados en la solución Hank's.

Para comprobar que el contenido de calcio y fósforo presentes en la superficie de las películas delgadas sometidas a ensayo de biocompatibilidad pertenecen a cristales de hidroxiapatita y no de fosfato de calcio, es pertinente calcular la relación molar del calcio con respecto al fósforo Ca/P. Los cálculos para las películas crecidas a 473°K se muestran a continuación.

Películas crecidas a 473°K

Moles de Ca

$$1.0\% = \frac{1.0 \text{ g}}{100 \text{ g totales}} \times \frac{(1 \text{ mol Ca})}{40,078 \text{ g}} = 0.025 \text{ mol Ca}$$

Moles de P

$$0.6\% = \frac{0.6 \text{ g}}{100 \text{ g totales}} \times \frac{(1 \text{ mol P})}{30,974 \text{ g}} = 0.019 \text{ mol P}$$

Relación Molar

$$\text{Ca} = \frac{0.025}{0.019} = 1.31$$

En la Tabla 5.9. se encuentran los resultados de los cálculos de la relación molar Ca:P para las cada una de las películas depositadas a diferentes temperaturas y sometidas a ensayo Bone Like, mediante la inmersión en SBF.

Tabla 5.9. Relación molar Ca:P para las películas depositadas a diferentes temperaturas y sometidas a ensayo Bone Like

TEMPERATURA DE DEPOSITO (°K)	Mol Ca	Mol P	Ca/P
RT	0.017	0.010	1.70
473	0.025	0.015	1.32
673	0.021	0.013	1.62

El rango de la relación molar de calcio con respecto al fósforo en hidroxiapatita se encuentra entre 1,2 a 2 en los huesos de los organismos vivos, variación que se debe a la presencia de trazas de otros elementos. Lo que sugiere que las tres películas delgadas de titanato de bismuto crece hidroxiapatita con una relación molar Ca/P dentro del rango establecido.

Esta prueba de biocompatibilidad, reviste de gran importancia, pues permite determinar, si las películas delgadas favorecen el crecimiento de cristales de HAP, lo que indica que el material depositado tiene buenas propiedades de osteointegración, osteoinducción y bioactividad. Lo que hace posible continuar con estudios que conlleven por último a la evaluación *in vivo*.

5.9 Perspectiva desde la bioética

En el desarrollo de la actividad científica, es necesario que el investigador centre sus esfuerzos no solo en la consecución de sus objetivos sino en la incidencia que estos, pueden tener en otras áreas que se relacionan con su investigación. Este trabajo, donde el objetivo general es la evaluación de la biocompatibilidad de películas delgadas de titanato de bismuto, obtenidas mediante la modificación superficial del acero inoxidable 316L, propone un abordaje desde la perspectiva bioética, teniendo en cuenta, que este tipo de investigación requiere observancia de normas técnicas y éticas.

Con relación a la estructura y composición química de la capa delgada de titanato de bismuto, al espesor, rugosidad y morfología superficial, a nivel bioético no se hace necesario el cumplimiento de ningún requisito específico, estas caracterizaciones, tienen requisitos a nivel técnico que de acuerdo a la aplicabilidad biológica, van a tener gran incidencia.

Así, en el desarrollo de materiales que sean aptos para implantes médicos, diferentes investigaciones han demostrado que tanto las modificaciones superficiales como los cambios en las propiedades físicas y químicas, son aspectos importantes en la respuesta biológica, por ello, esta investigación se centró en la modificación del acero inoxidable 316L, el cual, es utilizado como biomaterial [121].

En cuanto al espesor se ha encontrado que es importante evaluar el rango de espesores que se obtiene lo que depende por un lado de la técnica utilizada para el crecimiento de películas y por otro del tiempo de deposición. De acuerdo al valor obtenido se establece si es película delgada o gruesa, de esta forma como criterio más generalizado, se consideran que a valores de espesor inferiores a una (1) micra se encuentran la denominación de lámina delgada, aunque es de mencionar que hasta el momento el valor límite entre una película delgada y una gruesa no está establecido estrictamente [119]. Así, las películas obtenidas por la técnica de sputtering con un período de deposición de 45 minutos se logró obtener un espesor de capa entre 337,7 nm y 387,8 nm, encontrándose las películas entre la denominación de delgadas, sin presentar problemas de delaminación, picaduras, poros u otros defectos superficiales que suelen presentarse con regularidad, cuando la deposición no es óptima.

En cuanto a la composición química para caracterización de biocompatibilidad de películas de $\text{Bi}_x\text{Ti}_y\text{O}_z$, se hace la propuesta por primera vez en este trabajo para este compuesto, y de acuerdo a lo publicado se ha determinado, que ésta al igual que la topografía, son características fundamentales que influyen directamente en las reacciones biológicas que se llevan a cabo en la superficie del material. [119]. La estequiometría obtenida en la película de titanato de bismuto $\text{Bi}_x\text{Ti}_y\text{O}_z$, de acuerdo, a los resultados obtenidos en los ensayos de corrosión y biocompatibilidad, sugiere que es viable para el crecimiento celular, además, de mejorar la resistencia a la corrosión del sustrato, acero inoxidable 316L; otros estudios han demostrado que este compuesto obtenido mediante una técnica de reacción de estado sólido de alta temperatura, tiene propiedades

eléctricas, las cuales, se evaluaron por la técnica de espectroscopia de impedancia compleja, donde, los resultados muestran las contribuciones de grano y de contorno de grano hacia procesos eléctricos en forma de arcos de medio punto. Un análisis detallado de los arcos evidencia la presencia de una resistencia en paralelo y la capacitancia en serie con una resistencia en paralelo y el elemento de fase constante como un circuito eléctrico equivalente [122].

Haciendo referencia a la rugosidad, en la evaluación de la biocompatibilidad por la técnica de crecimiento celular se ha verificado que se ve favorecido en superficies rugosas más que en lisas, en consecuencia, en investigaciones donde se ha usado implantes de superficie lisa aunque han dado repuestas altamente favorables en cuanto a osteointegración, otros estudios han demostrado que existe un mejor comportamiento y mejor respuesta celular en materiales de implante con una superficies de rugosidad moderada [123,124,125].

Para poder establecer en que rango debe encontrarse la rugosidad para que sea apta y favorezca la osteointegración, ha sido clasificada macroscópica, microscópica y nanoscópicamente [126]. De esta manera, cuando se hace referencia a macrorugosidad, se refiere estrictamente a la geometría del material, y va a variar de acuerdo a la aplicación. En términos micro la rugosidad se encuentra en el rango de 1 a 10 μm , dentro del cual, existe un acoplamiento entre el hueso mineralizado y la superficie implantaria. El uso de superficies con topografías nanométricas, es de aparición reciente e involucra un rango dimensional entre 1 y 100 nm [124,126].

Con el propósito de caracterizar el proceso de osteointegración, es fundamental que la superficie aumente la energía superficial, con el fin, de estimular la adhesión celular, del tal modo que facilite el depósito de fibrina, la cual, estimula los factores de crecimiento y el de la matriz proteica, por ello, se considera la necesidad de evaluar la superficie a nivel topográfico en la escala nanométrica para caracterizar la osteointegración y determinar el grado de rugosidad. Esto implica, clasificar la superficie de los materiales de acuerdo al tratamiento que se les da y que influye directamente sobre la nanorugosidad [123,126,127]. Por esta razón, a menudo surgen investigaciones que centran su objetivo en la evaluación de las superficies rugosas, con el propósito de lograr la rugosidad que permita una osteointegración adecuada.

Lo que se corrobora con los resultados obtenidos en la caracterización de biocompatibilidad tanto por el análisis de viabilidad celular MTT como por la técnica Bone Like, teniendo en cuenta, que la rugosidad para las películas delgadas se encuentra entre el rango nanométrico y para las tres temperatura de depósito evaluadas, los resultados fueron favorables en esta caracterización con respecto al sustrato sin recubrir.

Así, el proceso de osteointegración, tiene una relación directa con la rugosidad, sin embargo, si esta es baja puede dificultar o limitar este proceso por el contrario si es muy alta influye de manera perjudicial en el fenómeno de desgaste y la corrosión [119]. Los valores obtenidos de rugosidad para las películas de titanato de bismuto se encuentran dentro de la escala nanométrica

lo que, favorece la osteointegración y se corrobora con los resultados obtenidos en el ensayo MTT.

Con respecto a la corrosión, la relación entre la superficie del biomaterial y su éxito clínico, ha sido demostrado que cuando contacta con fluidos del cuerpo, la superficie del implante y la región cercana a este, sufren cambios dinámicos causados por una rápida interacciones iónicas, moleculares y finalmente celulares [128]. Lo que hace necesario, la evaluación del material en fluidos que simulen el medio en el que van actuar, con el propósito de determinar el comportamiento. Los resultados obtenidos en la evaluación de la corrosión, dan muestra que la película delgada de titanato de bismuto al entrar en contacto con fluidos corporales simulados tiene una resistencia a la corrosión mayor al presentado por el sustrato acero inoxidable 316L sin recubrir.

Ahora bien, con respecto a la biocompatibilidad, sin lugar a duda la bioética tiene una tarea importante a desarrollar, teniendo en cuenta la responsabilidad y el deber de cuidado que en su labor debe tener el investigador, cuando para el cumplimiento de su objetivo debe hacer uso de animales. En este trabajo, la caracterización de biocompatibilidad se hizo por análisis de viabilidad celular MTT y por la técnica Bone Like. Con relación a la primera para el desarrollo del ensayo se utilizo osteoblastos de ratón de la línea celular C57BL6, éstas hacen parte, del repositorio de células del Grupo de Hormonas, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia.

Para la obtención de los osteoblastos de esta línea celular, los cuales, se derivan de la bóveda craneal, se toma la cepa de ratones con una edad de 5 a 7 días de nacidos, se sacrifican por decapitación dentro de los parámetros internacionalmente aceptados de eutanasia y sus cráneos se disecan retirando el tejido blando, luego se lavan con PBS que contiene calcio y magnesio por 10 minutos. Posteriormente se someten a digestión enzimática; las células liberadas se cultivan, y son mantenidas en DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, con presencia de antibióticos y de medio osteogénico. El medio se cambia con frecuencia y los cultivos se mantienen en un ambiente de 37°C 95% de aire y 5%de CO₂ [129].

En este proceso, debe tenerse en cuenta que la eutanasia debe caracterizarse entre otros aspectos por ser: humano y libre de dolor, temor o lucha; apropiado para la edad, especie, salud y número de animales; fiable y reproducible; libre de impactos ambientales negativos; libre de efectos químicos a nivel tisular; incapaz de inducir alteraciones histológicas en el animal de estudio [130]. Además debe tenerse en cuenta que para estos fines existe normatividad tanto a nivel nacional como internacional que debe cumplirse.

En Colombia la Ley 84 del 27 de diciembre de 1989, establece requisitos en el capítulo VI para el uso de animales vivos en experimentos e investigación, en el artículo 23, señala: *“Los experimentos que se lleven a cabo con animales vivos, se realizarán únicamente con autorización previa del Ministerio de Salud Pública y sólo cuando tales actos sean imprescindibles para el estudio y avance de la ciencia, siempre y cuando esté demostrado: A. Que los resultados experimentales*

no puedan obtenerse por otros procedimientos o alternativas; B. Que las experiencias son necesarias para el control, prevención, el diagnóstico o el tratamiento de enfermedades que afecten al hombre o al animal; C. Que los experimentos no puedan ser sustituidos por cultivo de tejidos, modos computarizados, dibujos, películas, fotografías, video u otros procedimientos análogos” [131].

Bajo la observancia de esta normatividad es claro, que no cualquier proyecto de investigación que tenga como objetivo el uso de animales, lo puede hacer deliberadamente, es necesario, que se avalado por las autoridades competentes en primera instancia le corresponde al Ministerio de Salud dar concepto si es pertinente, viable y justificable esta solicitud, no sin antes de que el Comité de Ética responsable emita su concepto, para ello la norma en mención en el artículo 26 establece: *“Para todo experimento con animales vivos deberá conformarse un comité de ética. El Ministerio de Salud Pública no autorizará la realización de experimentos con animales vivos sino cuando esté conformado el mismo, que estará integrado por no menos de tres (3) miembros, uno de los cuales deberá ser veterinario del Instituto Colombiano Agropecuario; el segundo deberá pertenecer a la autoridad administradora de los recursos naturales; el tercero deberá ser representante de las sociedades protectoras de animales” [131].*

En concordancia a lo anterior, El Ministerio de Salud mediante la Resolución número 8430 de 4 Octubre de 1993 “Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud”, en el Título V donde establece la investigación biomédica con animales, en el artículo 87, consagra: *“En toda investigación en la que los animales sean sujeto de estudio deberán tenerse en cuenta, además de las disposiciones determinadas en la Ley 84 de 1989, las siguientes: A. Siempre que sean apropiados, deben usarse métodos tales como modelos matemático, simulación en computador y sistemas biológicos in vitro. B. La experimentación en animales solamente se debe realizar después de estudiar su importancia para la salud humana o animal y para el avance del conocimiento biológico. C. Los animales seleccionados para la experimentación deben ser de una especie y calidad apropiada, y utilizar el mínimo número requerido para obtener resultados científicamente válidos. D. Solamente se emplearán animales adquiridos legalmente y se mantendrán en condiciones adecuadas y que cumplan con las reglamentaciones sanitarias vigentes. E. Los investigadores y demás personal nunca deben dejar de tratar a los animales como seres sensibles y deben considerar como un imperativo ético el cuidado y uso apropiado y evitar o minimizar el discomfort, la angustia y el dolor” [132].*

De esta forma queda claro que como última alternativa, los proyectos de investigación han de optar para su estudio el uso de animales, si así es posible. No obstante para aquellos que se desarrollan en líneas de investigación donde el uso de animales es indispensable, deben ajustarse y dar total observancia a la normatividad existente, de esta manera al solicitar el respectivo concepto ante el Comité de ética correspondiente, este tendrá argumentos de valor para evaluar el caso en concreto y darle viabilidad o restricción al uso de animales, teniendo en cuenta, que es este, el órgano encargado de dar el aval y corresponde a cada

entidad establecerlo. De acuerdo a ello, en la Universidad Nacional de Colombia mediante Resolución 14 De 2006, "Por la cual se reglamenta el Comité Nacional de Ética en Investigación de la Universidad Nacional de Colombia", en el artículo 2 define y expone características del Comité Nacional de Ética, así: *"El Comité Nacional de Ética en Investigación es un espacio para la deliberación sobre los aspectos éticos relacionados con las Investigación científica en todas las áreas del quehacer académico, que cuenta para su desempeño con el apoyo logístico de la Vicerrectoría de Investigación"* [133].

Así, el Comité de Ética como órgano conector entre la ciencia y la ética, en su misión de velar por el deber de cuidado de la actividad científica, la cual, debe tener como base fundamental principios y valores éticos que den cuenta del desarrollo responsable de su actividad, emitirá conceptos desde el punto de vista legal y ético, acerca de la conveniencia, pertinencia y viabilidad de los proyectos de investigación que se sometan a su consideración.

La evaluación de los proyectos de investigación por parte de Comité de Ética, que pretendan el uso de animales es estricta, tanto a nivel científico como bioético, teniendo en cuenta, que no siempre se obtienen resultados importantes para el desarrollo de la ciencia. Por ello, los comités previo a emitir su concepto requieren de soportes y consideraciones de expertos que avalen la necesidad del uso inminente de animales para la consecución de los fines investigativos.

Este proyecto de investigación no fue sometido al concepto del Comité de Ética teniendo en cuenta que no fue necesario el sacrificio de ratones para la obtención de los osteoblasto, puesto que la línea celular C57BL6, utilizada para el desarrollo del análisis de viabilidad celular MTT, están disponible, en el repositorio de células del Grupo de Hormonas, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia.

Es de mencionar, que se optó por el desarrollo de este ensayo para corroborar los resultados de biocompatibilidad obtenidos mediante la formación de hidroxiapatita por la técnica Bone Like y los de resistencia a la corrosión; por otro lado este análisis reviste de importancia, por cuanto, los osteoblastos son células óseas perteneciente al grupo de las llamadas células osteoprogenitoras de hueso, los cuales, son depósitos de calcio y otros iones inorgánicos útiles para el organismo. Además, mantienen los huesos en un estado de constante dinamismo a lo largo de la vida en lo que respecta al crecimiento, la remodelación y la reabsorción, mediante la cual los tejidos óseos son capaces de adaptarse a los diversos cambios que puedan sufrir [134]. El estudio de su comportamiento sobre el recubrimiento propuesto es de interés para determinar la viabilidad de la modificación superficial del acero inoxidable 316L, donde, finalmente, se tiene que la película delgada de titanato de bismuto obtenida mediante la técnica de sputtering es viable por cuanto favorece el crecimiento celular.

Sin embargo, el hecho de que no se requiera concepto por parte del Comité de Ética para el uso de células que sean parte de un repositorio, es importante destacar que este estudio de investigación cumplió con los aspectos importantes

que consagra la norma, para estos casos; así, se ha agotado la parte previa con el desarrollo de la parte experimental *in vitro*, con ensayos que complementan y corroboran los ya obtenidos, como lo son los ensayos de corrosión utilizando tres electrolitos diferentes y la dos técnicas de biocompatibilidad estudiadas, de esta manera este estudio es apto, para ser sometido a concepto del Comité de Ética, para continuar con ensayos *in vivo*, y complementar el estudio de las películas de titanato de bismuto.

Hacer un abordaje desde la perspectiva la bioética en cualquier estudio de investigación, es importante no porque así los requieran los comités de ética, sino que la ciencia deben ser observante siempre del deber de cuidado de la labor investigativa, no solo con fines médicos, sino cualquier otro estudio que pretenda dar respuesta a una necesidad, pues, la responsabilidad ética en la investigación debe estar dirigida hacia el mejor uso de la ciencia y la tecnología, teniendo en cuenta que la idoneidad del investigador juega un papel muy importante; es indispensable que además de tener conocimiento en el área que investiga, conozca los criterios éticos que involucren su estudio durante la investigación y posterior a esta, de la misma manera, debe conocer las normas legales tanto nacionales como internacionales, pero, sobre todo debe ser consciente de su labor y desarrollarla con respeto y responsabilidad [135].

Sin ser necesario, el cumplimiento estricto de normas, la labor del investigador debe ser responsable en todo sentido, ajena a toda limitación legal; donde, su interés por la ciencia lo lleve a ser cuidadoso y observante de las implicaciones en las que puede incurrir su estudio en el área de la ética, pues, esta es el puente de conexión entre la ciencia y las respuestas que se le dan a las necesidades humanas en el ámbito científico.

Son varios los estudios de investigación, que han hecho un acercamiento de la bioética a la ciencia, así, esta ciencia ha encontrado auge en la preocupación por el cuidado por la naturaleza, en la protección del medio ambiental, en el cuidado y preservación de la biodiversidad, en la aplicación de la bioseguridad, en el respeto por los valores y creencias de comunidades indígenas [136]. De manera más acentuada con el uso de animales como sujetos de estudio, razón que ha hecho que esta temática tenga interés en el ámbito internacional y sean expuestas estas inquietudes con el propósito de que sean analizados en detalle los riesgos y compararlos con los beneficios; de esta forma la bioética ha encontrado su lugar.

Esta inquietud se sustenta, porque se ha causado daño innecesarios a animales objeto de estudio, lo que hace necesario, que la investigación sea valorada desde la perspectiva ética a partir de la misma propuesta, dando paso a lo que se ha denominado ética anticipatoria que es un nuevo enfoque que integra la ética en el desarrollo tecnológico y pretende hacer acercamiento desde la etapas preliminares de la investigación ahondado en consecuencias que generalmente no se contemplan porque sencillamente no ha sido arraigada esta responsabilidad de manera voluntaria [137].

De esta manera, países como Estados Unidos mediante la Academia Nacional de Ciencias y los Institutos Nacionales de Salud ha emitido normas especiales para la investigación, con la que se ha logrado disminuir el uso de animales para experimentar a estrictamente lo necesario, exigiendo instalaciones adecuadas para el manejo y mantenimiento de estos, de igual forma, el tratamiento que se le da durante el proceso de investigación, es decir, todo lo relacionado con alimentación, habitación, tratamiento médico y psicológico, de esta manera, desde la bioética, los animales no son, considerados sujetos de derecho pero si objetos morales, teniendo en cuenta que la responsabilidad moral recae sobre el investigador [136].

En España, El Comité de Bioética fue creado por la Ley 14 de 3 de julio 2007, constituido como un órgano colegiado, independiente con funciones de consulta, relacionadas con las implicaciones éticas y sociales de la Biomedicina y Ciencias de la Salud. Para ello emite concepto, hace propuestas y recomendaciones para los poderes públicos de ámbito estatal, adicionalmente establece principios generales para la elaboración de códigos de buenas prácticas de investigación científica y la de representar a España en los foros y organismos supranacionales e internacionales implicados en la bioética [138].

En Latinoamérica países como Brasil, el 04 de Octubre del 2005, mediante la Ley Número 6032 se creó la Comisión de Bioética que con otras dos comisiones técnicas nacionales que trabajan en el campo de la bioética, la primera Comisión Técnica Nacional De Biotecnología, adscrita al Ministerio de Ciencia y Tecnología; y la segunda la Comisión Nacional De Ética En Investigación que hace parte del Consejo Nacional de Salud del Ministerio de Salud. Estas dos Comisiones, tienen funciones técnicas específicas, como son las investigaciones genéticas e investigaciones con seres humanos [139]. Argentina, es uno de los países que mejor estructurada tiene su legislación, pues, cuenta con normas referentes a Investigaciones científicas, con el propósito de resguardar la dignidad de la persona humana, también norman la utilización de células madre, teniendo en cuenta la capacidad terapéutica del uso de este tipo de células, también está normado el trasplante de órganos, la utilización de órganos y tejidos para su implantación, a la vez que la Creación y funcionamiento de Comités de Bioética, para el control y vigilancia de las actuaciones humanas y científicas que tengan que ver con la licitud de la intervención humana sobre el hombre [139].

De esta forma se evidencia que la inquietud porque la ciencia sea una actividad responsable y a la vez respetuosa de la dignidad humana, del buen trato a los animales destinados a estudio, y en general de la labor investigativa, es una preocupación a nivel internacional, que cada país, ha venido legislando de acuerdo a sus propias necesidades.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

Se logró encontrar los parámetros óptimos de depósito de los recubrimientos mediante el sistema de sputtering magnetrón de titanato de bismuto sobre el sustrato de acero inoxidable AISI 316L, donde se determinó que los depósitos reproducibles y estables se obtenían a una potencia de 150W, temperatura 673°K, flujo de Ar de 25 sccm, presión de trabajo 7.4E-3 mbar, durante un período de tiempo de 45 minutos.

Para el desarrollo de este trabajo de investigación se depositaron películas delgadas de Titanato de Bismuto usando como sustrato acero inoxidable 316L, las cuales, fueron caracterizadas estructural y químicamente, posteriormente se le realizaron pruebas electroquímicas de corrosión, con el fin, de evaluar su resistencia mediante la técnica Polarización Potenciodinámica (TAFEL), utilizando electrolitos de diferentes composiciones químicas, que simulan los fluidos corporales.

La caracterización estructural realizada mediante difracción de rayos X mostro la formación de una estructura cubica de Titanato de Bismuto en fase pirocloro ($\text{Bi}_2\text{Ti}_2\text{O}_7$), para las películas obtenidas a una temperatura de 673°K. Con este mismo ensayo fue factible la determinación del tamaño del cristalito.

Con las micrografías obtenidas mediante microscopia óptica, fue posible determinar que las películas delgadas depositadas sobre acero 316L a diferentes temperaturas, tienen una baja rugosidad y con microscopia electrónica de barrido se determinó que los recubrimientos de titanato de bismuto presentan una superficie homogénea en su generalidad.

Las pruebas electroquímicas mostraron el carácter protector de las películas, teniendo en cuenta que al estar en contacto con los diferentes electrolitos de Cloruro de Sodio (NaCl) al 3.5%, Solucion Ringer y Solución Hank's, se obtuvieron valores de resistencia a la polarización y tasa de corrosión que

limitan la actividad electroquímica con respecto al sustrato utilizado como blanco, sometidos a las mismas condiciones.

Se logró evidenciar mediante el ensayo de biocompatibilidad de análisis de viabilidad celular MTT y formación de hidroxiapatita por la técnica Bone Like con la posterior evaluación de la composición química mediante la técnica de espectroscopia de dispersión de energía (EDX), que las películas delgadas de titanato de bismuto crecidas a diferentes temperaturas, promueven el crecimiento celular ademas tienen capacidad para que se fije el Calcio, lo que indica que tienen bioactividad.

Al hacer un abordaje desde la perspectiva de la bioética, para investigaciones en las que se propone modificación superficial en biomateriales útiles para posibles implantes humanos, se logró determinar que las propuestas científicas que vayan encaminadas a dar respuesta a una necesidad médica o plantear un avance tecnológico, deben tener como pilar la observancia de los principios y lineamientos bioéticos, con el propósito de buscar un equilibrio entre las ciencias puras y las ciencias humanas, pues, estas deben ir en la misma dirección, teniendo en cuenta, que van a suplir una misma necesidad para beneficio humano, por tanto convergen en el mismo fin.

El investigador en el desarrollo de su labor científica además de enmarcarse dentro de unas exigencias técnicas debe contemplar las exigencias bioéticas que su labor le sugiere, esto, con el fin de direccionar desde el inicio el camino científico que se debe llevar a cabo cuando se hace una propuesta investigativa, que si bien es cierto en sus inicio no tienen el carácter de exigible en su totalidad en la media que se avanza en el camino se hace imprescindible. No tendría validez dar pasos significativos a nivel científico, si esta tarea no se ha llevado a cabo.

6.2 Recomendaciones

Para trabajos de investigación posteriores se recomienda:

Determinar la adherencia de las películas de Titanato de Bismuto, usando diferentes técnicas.

Se recomienda usar otros electrolitos para las pruebas de corrosión por las dos técnicas: Polarización Potenciodinámica (TAFEL) y Espectroscopia de Impedancias Electroquímica (EIS).

Bibliografía

- [1] P.N. Rojas Pelaez, Evaluación electroquímica de recubrimientos biocompatibles, Universidad Nacional Autónoma de México, 2015.
- [2] G. Duffo, Materiales y materias primas, Biomateriales, Capítulo 8, República Argentina. 2011.
- [3] R.G. Palacios, Comparación de la respuesta electrónica y adhesión bacteriana en películas delgadas amorfas y cristalinas de óxidos metálicos, Universidad Nacional Autónoma de México, 2015.
- [4] M. C. Piña Barba, La física en la medicina, Capitulo X, México D.F., http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/37/hm/sec_14.htm (accessed September 16, 2014).
- [5] F.J. Romero Gavilán, Obtención de recubrimientos bioactivos. Universidad Jaume I, España, 2014.
- [6] S. Barriuso Gómez, Modificación superficial de biomateriales metálicos (316 LVM, Ti₆Al₄V) mediante granallado, agua a alta presión y láser peening: efecto en la microestructura, las propiedades mecánicas y la liberación de iones, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España, 2014.
- [7] T. Albrektsson, C. Johansson, Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration Eur. Spine J. 2001.
- [8] H.A. Hansson, T. Albrektsson, P.I. Branemark, Structural aspects of the interface between tissue and titanium implants. J Prosthet Dent. 1983.
- [9] N. Niinomi, Recent research and development in titanium alloys for biomedical applications and healthcare goods. Science and Technology of Advanced Materials, 2003.
- [10] Ley Estatutaria 1751, por medio de la cual se regula el derecho fundamental a la salud y se dictan otras disposiciones, de 16 de febrero de 2015.
- [11] J.J. Olaya Florez, D. Marulanda, S. Rodil, Recubrimientos de nitruros metálicos depositados con ubm: tecnología eficiente y ambientalmente

- limpia, ISSN 0012-7353. Dyna rev.fac.nac.minas v.77 n.164 Medellín oct./dic. 2010.
- [12] F.L. Cuesta Fernandez, Análisis del fenómeno de la corrosión en materiales de uso técnico: metales procedimientos de protección, D.N.I.: 30.819.442-V noviembre 2009.
- [13] G.B. Kumar, S. Buddhudu, Optical, thermal and dielectric properties of $\text{Bi}_4(\text{TiO}_4)_3$ ceramic powders, *Ceram. Int.* 36 (2010) 1857–1861. doi:10.1016/j.ceramint.2010.03.023.
- [14] A. Hardy, D. Mondelaers, The formation of ferroelectric bismuth titanate ($\text{Bi}_4\text{Ti}_3\text{O}_{12}$) from an aqueous metal-chelate gel, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* (2003) 1103–1107. <http://link.springer.com/article> (accessed March 8, 2015).
- [15] K.R. Chakraborty, S.N. Achary, S.J. Patwe, P.S.R. Krishna, a. B. Shinde, a. K. Tyagi, Low temperature neutron diffraction studies on $\text{Bi}_4\text{Ti}_3\text{O}_{12}$, *Ceram. Int.* 33 (2007) 601–604. doi:10.1016/j.ceramint.2005.11.010.
- [16] A. Watcharapasorn, P. Siriprapa, S. Jiansirisomboon, Grain growth behavior in bismuth titanate-based ceramics, *J. Eur. Ceram. Soc.* 30 (2010) 87–93. doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2009.07.031.
- [17] M. Sedlar, M. Sayer, Structural and electrical properties of ferroelectric bismuth titanate thin films prepared by the sol gel method, *Ceram. Int.* 22 (1996) 241–247. doi:10.1016/0272-8842(95)00098-4.
- [18] J. Hou, S. Jiao, H. Zhu, R.V. Kumar, Bismuth titanate pyrochlore microspheres: Directed synthesis and their visible light photocatalytic activity, *J. Solid State Chem.* 184 (2011) 154–158. doi:10.1016/j.jssc.2010.11.017.
- [19] W. Yao, Photocatalytic property of bismuth titanate $\text{Bi}_2\text{Ti}_2\text{O}_7$, *Appl. Catal. A Gen.* 259 (2004) 29–33. doi:10.1016/j.apcata.2003.09.004.
- [20] B. Perez Rojo, Biomateriales: aplicación a cirugía ortopédica y traumatológica, Universidad Carlos III de Madrid.
- [21] P. J. Arango, D. S. Galeano, E. Restrepo, R. Ospina O, Recubrimientos hemocompatibles de nitruro de carbono, Universidad Nacional de Colombia, Sede Manizales.
- [22] R. Olivares Navarrete, J. J. Olaya Florez, C. Ramírez, S. E. Rodil, Biocompatibility of Niobium Coatings, *Coatings* 1(2011) 72-87; doi:10.3390/coatings1010072. Open Access no FI.
- [23] A. Pareja López, C. P. García García, P. J. Abad Mejía, M. E. Márquez Fernández, Estudio in vitro de la citotoxicidad y genotoxicidad de los

- productos liberados del acero inoxidable 316L con recubrimientos cerámicos bioactivos, *Iatreia* vol.20 no.1 Medellín Jan./Mar. 2007.
- [24] M.F. Ortiz Bastos, Recubrimientos de bismuto depositados por la técnica sputtering D.C. pulsado, Universidad Nacional de Colombia, 2012.
- [25] C.M. Bedoya-Hincapié, E. Restrepo-Parra, J.C. Riaño Rojas, J.J. Olaya Flores, J.E. Alfonso, Monte Carlo simulation of ferroelectric properties in bismuth titanate ($\text{Bi}_4\text{Ti}_3\text{O}_{12}$) thin films, *Comput. Mater. Sci.* 62 (2012) 131–135. doi:10.1016/j.commatsci.2012.05.023.
- [26] J. P. Parra Sua, Evaluación de la resistencia a la corrosión a altas temperaturas y su comportamiento como barrera termica de $\text{Bi}_x\text{Ti}_y\text{O}_z$, Universidad Nacional de Colombia, 2014.
- [27] G. Bordjih, J. Jouzeau, D. Mainard, E. Payan, J. P. Delagoutte and P. Netter, “Evaluation of the effect of three surface treatments on the biocompatibility of 316L stainless steel using human differentiated cells”, *Biomaterials*, vol. 17, pp. 491–500, 1996.
- [28] Z. Shai-hong W. Guo-hui, Z. Yan-zhong , L. Yi-ming, Z. Ke-chao, Biocompatibility of MIM 316L stainless steel, *Materials Science And Engineering, Journal of Central South University of Technology*, Volume 12, Issue 1, pp 9-11, October 2005.
- [29] E. Eisenbarth, M. Muller, R. Thull, D. Velten and J. Breme, Nanostructuredniobium oxide coatings influence osteoblast adhesión”, *Journal of Biomedical Materials Research*, vol 79, pp. 166-217, 2006.
- [30] M. Martinesi, S. Bruni, M. Stio, C. Treves, T. Bacci, F. Borgioli, Biocompatibility evaluation of surface-treated AISI 316L austenitic stainless steel in human cell cultures, US National Library of Medicine National Institutes of Health, 2007.
- [31] J. P. Jiménez de la Torre, *Bioceramicos*, Departamento de Posgrados en Manufactura Avanzada Universidad Panamericana, 2001.
- [32] M. C. Piña Barba, Los biomateriales y sus aplicaciones, http://www.difusioncultural.uam.mx/casadeltiempo/28_iv_feb_2010/casa_del_tiempo_eIV_num28_55_58.pdf (accessed October 16, 2014).
- [33] J. Buitrago Jaramillo, Materiales de sutura, <http://blog.utp.edu.co/cirugia/Materiales-de-Sutura2.pdf> (accessed October 19, 2014)
- [34] Conferencia de Desarrollo de Consenso de las Instituciones Nacionales de Salud.

- [35] J. Clavería Gracia, Biomédicos, Programa Oficial de Postgrado en Ingenierías Transversales, Ingeniería Biomédica.
- [36] S. E. Rodil, Modificación superficial de biomateriales metálicos, Instituto de Investigaciones en Materiales Universidad Autónoma de México, 2009.
- [37] Biomaterials editorial, "Trends in biomaterials research: An analysis of the scientific program of the world biomaterials congress 2008", Biomaterials, vol. 29, pp. 3047–3052, 2008.
- [38] D. F. Williams, "On the mechanics of biocompatibility", Biomaterials, vol. 29, pp. 2941–2953, 2008.
- [39] C. Mijangos, J.S. Moya, Nuevos materiales en la sociedad de siglo XXI, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, 2007.
- [40] Materiales para Investigación Científica y Fabricación, <http://www.goodfellow.com/S/Acero-Inoxidable-AISI-316.html>, (accessed October 19, 2014).
- [41] Compañía de aceros especiales IIRSACERO, Acero 316 y 316L, <http://iirsacero.com.mx/index.php>, (accessed October 19, 2014).
- [42] A.E. Nogueira, E. Longo, E.R. Leite, E.R. Camargo, Synthesis and photocatalytic properties of bismuth titanate with different structures via oxidant peroxo method (OPM)., *J. Colloid Interface Sci.* 415 (2014) 89–94. doi:10.1016/j.jcis.2013.10.010.
- [43] L. Zheng, G. Yan, Y. Huang, X. Wang, J. Long, L. Li, et al., Visible-light photocatalytic denitrogenation of nitrogen-containing compound in petroleum by metastable $\text{Bi}_{20}\text{TiO}_{32}$, *Int. J. Hydrogen Energy.* 39 (2014) 13401–13407. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.04.027.
- [44] K. Wasa, S. Hayakawa, Handbook of sputter deposition technology, Noyes Publications, New Jersey, 1992.
- [45] G. McGuire, Semiconductor Materials and Process Technology Handbook, Noyes Publications, New York, 1988.
- [46] D. Mattox, Handbook of physical vapor deposition (PVD) processing, Noyes Publications, New Jersey, 2010. <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/10426919908907566> (accessed May 07, 2014).
- [47] B. Erdem, R.A. Hunsicker, G.W. Simmons, E.D. Sudol, V.L. Dimonie, M.S. El-aasser, XPS and FTIR Surface Characterization of TiO_2 Particles Used in Polymer Encapsulation, *Langmuir.* 17 (2001) 2664–2669.

- [48] Č. Jovalekić, M. Zdujić, L. Atanasoska, Surface analysis of bismuth titanate by Auger and X-ray photoelectron spectroscopy, *J. Alloys Compd.* 469 (2009) 441–444. doi:10.1016/j.jallcom.2008.01.131. Jones DA: Principles and Prevention of Corrosion: Prentice Hall; 1996.
- [49] Bragg's Law. rayos X son dispersados por una red cristalina <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbasees/quantum/bragg.html>
- [50] J. M. Abella, Laminas delgadas y recubrimientos preparación propiedades y aplicaciones, CSIC, San Alfonso Madrid, 2003.
- [51] Q. Zhang, Y.X. Leng, F. Qi, T. Tao, N. Huang: Mechanical and corrosive behavior of Ti/TiN multilayer films with different modulation periods. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms 2007*, 257(1-2):411-415.
- [52] TEMA 8: Espectroscopía Foteoeléctrica de rayos X (XPS) <http://www.uco.es/~iq2sagrl/TranspTema8.pdf> (accessed October 19, 2014)
- [53] S. Feliu (Jr). Caracterización química de nanosuperficies. introducción a la espectroscopia fotoelectronica de rayos x (xps). Centro Nacional de investigaciones Metalúrgicas (CENIM), CSIC, Avda. Madrid, Spain
- [54] D. Leal, L. García, D. Moronta y J. Mantilla. Diseño y construcción de un sistema automatizado para la elaboración de películas delgadas, por el método de inmersión *Revista de la Facultad de Ingeniería Universidad Central de Venezuela versión impresa ISSN 0798-4065 Rev. Fac. Ing. UCV v.26 n.1 Caracas mar. 2011*
- [55] ECURED. Microscopio electrónico de barrido. https://www.ecured.cu/Microscopio_electr%C3%B3nico_de_barrido
- [56] H.D. Hagstrum, J.C. Tracy, "Electron spectroscopy of solid surfaces. Experimental methods in catalytic research," R.B Anderson y P.T. Dawson Editores. Academic Press 1976.
- [57] D.A. Jones, Principles and Prevention of Corrosion: Prentice Hall; 1996.
- [58] Mantenimiento Latino Americano, Corrosión y su Control <http://maintenancela.blogspot.com.co/2011/09/corrosion-y-su-control-parte-i.html>.
- [59] Perez N: Forms of Corrosion. In: *Electrochemistry and Corrosion Science*. Edited by Perez N: Springer US; 2004.
- [60] L. Velasco Estrada, Producción, Caracterización Microestructural y Estudio de la Resistencia a la Corrosión de Recubrimientos

- Nanoestructurados de Nb_xSiyN_z Depositados con el Sistema de UBM., Universidad Nacional de Colombia, 2011.
- [61] Gamry Instruments Software. Tutorials and Primes. Gamry Instrumens Inc. USA, September, 2005.
- [62] Modulo VIII- Corrosión, analisis técnicas de corrosión [<http://www.ing.unlp.edu.ar/quimica/QCACOR3.htm>] (accessed October 11, 2014)
- [63] J. ÁVILA, J. GENESCÁ. La física y la química de la corrosión. la corrosión metálica como ciencia aplicada. La ciencia para todos. <http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/menu.html>.
- [64] Materiales, biocompatibles, sus propiedades y características, materiales, [http:// biocompatibles-sus-propiedades-y-caracteristicas/materiales-](http://biocompatibles-sus-propiedades-y-caracteristicas/materiales-) (accessed May 07, 2014)
- [65] Berridge MV, Herst PM, y Tan AS. Colorantes de tetrazolio como herramientas de la biología celular: nuevas perspectivas sobre su reducción celular. *Biotecnología Annual Review*, 11: 127-152 (2005).
- [66] Berridge MV, Tan AS. Caracterización de la reducción celular de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT): Localización subcelular, la dependencia de sustrato, y la participación del transporte electrónico mitocondrial en la reducción de MTT. *Archivos Biochem Biophys* 303: 474-482 (1993).
- [67] H. P. Marambio. Evaluación de la citotoxicidad de nano partículas de oro conjugadas al péptido clpffd-nh2. Universidad de Chile Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica. Santiago, Chile 2007.
- [68] I. Fernández, G. Hernández, M. Alobera Gracia, M del Canto, L. Blanco. . Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11:E47-51. © Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - ISSN 1698-6946
- [69] D. Ribó. Microscopía óptica de campo claro Osteoblastos y osteocitos <http://www.wesapiens.org/es/file/1362315/Osteoblastos+y+osteocitos>
- [70] M. Fuentes, Optimización del sistema de cultivo y caracterización de células madre mesenquimales obtenidas a partir de medula ósea humana (Trabajo de grado), Pontificia Universidad Javeriana: Colombia (2008).
- [71] Thermo Fisher Scientific. DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011717_Hoec_hst_33342_UG.pdf (2015)

- [72] T. Riss, R. Moravec, A. Niles, H. Benink, T. Worzella, L. Minor. (2013) Cell viability assays, (1st Ed). Assay Guidance Manual. 2013.
- [73] S. Shojai, M. T Khorasani. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. Polymer Science & Engineering/Biomaterials. Acta biomaterialia 9 (8), 7591-7621.
- [74] Leger. Tratamientos Láser y Centro de Bioplastia <http://es.clinicaleger.com/hidroxiapatita-de-calcio.html>.
- [75] Quimimol Hidroxiapatita, propiedades químicas y usos médicos <https://quimimol.wikispaces.com/Hidroxiapatita,+propiedades+qu%C3%A9micas+y+usos+m%C3%A9dicos>.
- [76] S. Shojai. Estudio de caso; métodos de síntesis de hidroxiapatita nanométrica con diversas estructuras. http://datateca.unad.edu.co/contenidos/401540/exe/leccin_10_estudio_de_caso_metdos_de_sintesis_de_hidroxiapatita_nanomrica_con_diversas_es_estructuras.html. 2013.
- [77] S. Hosseini. Naderi-Manesh, H., Vali, H. & Faghihi, S. Improved surface bioactivity of stainless steel substrates using osteocalcin mimetic peptide, Materials Chemistry and Physics , 143(1) 1364-71. 2014.
- [78] R. Heimann. Structure, properties, and biomedical performance of osteoconductive bioceramic coatings, Surface and coatings Technology, 233 (1) 27-38. doi:10.1016/j.surfcoat.2012.11.013. 2013.
- [79] L. Pessini. En la cuna de la Bioética: el encuentro de un credo con un imperativo y un principio. Revista Colombiana de Bioética ISSN: 1900-6896 Universidad El Bosque Colombia. vol. 8, núm. 1, enero-junio, 2013, pp. 8-31
- [80] V.R. Potter. Bioethics: the science of survival, "Perspectives in Biology and Medicine" New York, 1970.
- [81] V.R. Potter Bridge to the Future, Prentice-Hall Pub, Englewood Cliffs, NJ, 1971.
- [82] Universidad de la sabana. acerca de la bioética una referencia a la bioética. <http://www.unisabana.edu.co/departamento-de-bioetica>.
- [83] Programa de Bioética Universidad El Bosque. Historia de la bioética en Colombia.
- [84] F. A. Wilches. La Propuesta Bioética de Van Rensselaer Potter, cuatro décadas después. Bogotá-Colombia.
- [85] W.T. Reich. "Encyclopedia of Bioethics", New York 1978

- [86] M. Sapag. Bioética; El encuentro de una conciencia. "Bioética para farmacéuticos, bioquímicos y médicos. Centro interdisciplinario de estudios en Bioética de estudios en Bioética. Chile. 2009
- [87] N. Blazquez, L. M. Pastor, Bioética Fundamental. Madrid: Biblioteca de Autores Cristiano. 1996.
- [88] J. S. Mill. Sobre la libertad. Original en inglés: On Liberty. 1859. Ed. Aguilar. Madrid. Pp. 20-21. 1967.
- [89] L. Fara, N. Cepero, C. Hernández. Bioethical features in the treatments of stem cells. Hospital Ortopédico "Frank País". La Habana, Cuba
- [90] Bioética y Tecnología Médica
<http://bioeticaytecnologiamedica.blogspot.com.co/>
- [91] J. Cepero, M. Ríos. Bioética en la introducción de los biomateriales implantables a la práctica médica.
- [92] U.S. Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/>
- [93] R. Pineda, G. K. González. Reflections about bioethics and biomedical engineering: intrinsic complementarity. Revista Latinoamericana de Bioética. Print version ISSN 1657-4702
- [94] P. I. Acevedo. Ethical issues in scientific research. Ciencia Y Enfermería 8 (1): 15-18, 2002 I.S.S.N. 0717 - 2079
- [95] El por qué de la ética en la investigación científica. Investigaciones Andina. No. 24 Vol. 14 - 130 p.
- [96] T.L. Beauchamp, Principles of Biomedical Ethics. New York: Oxford University Press, 1979.
- [97] T.L. Beauchamp, A History and Theory of Informed Consent. New York: Oxford University Press 1983.
- [98] M. D Espejo, A. Castilla. Bioética en las ciencias de la Salud, Historia y definición de la Bioética. Granada: Asociación Alcalá. 2001.
- [99] L. Ciccone, Bioética: Historia, principios, cuestiones.
<http://books.google.com.co/books?hl=es&lr=&id=wxrWiRsUI1MC&oi=fnd&pg=A14&dq=Vent%27anni+di+bioetica:+idee,+protagonisti,+istituzioni,Pa+dua+199.+Gracias+D.+Fundament. 2010.>
- [100] Bioética de intervención, interculturalidad y no-colonialidad Universidad de Brasilia. Programa de Postgrado en Bioética. Brasilia, DF, Brasil.

- [101] A. M. Abascal. Recomendaciones sobre los aspectos éticos de las colecciones de muestras y bancos de materiales.
- [102] Yes Stailens, barra redonda acero, <http://www.stainlesssteelsheetsb2b.com/es/round-bar.html> (accessed October 19, 2014)
- [103] J.E. Alfonso, J. Torres, J.F. Marco, Influence of the Substrate Bias Voltage on the Crystallographic Structure and Surface Composition of Ti6Al4V Thin Films Deposited by rf Magnetron Sputtering, *Brazilian J. Phys.* 36 (2006) 994–996.
- [104] Sputtering targets - CRM Material Co, <http://www.tradeusd.com/crm50/1848100.html> (accessed May 07, 2014)
- [105] Sionosis. Dynamics of ionic implatation & sputtering o surfaces <http://psilab.ep.wisc.edu/dionisos/>
- [106] Ciencia y tecnologia <http://cienciaytecnologiaen.blogspot.com.co/.html> (accessed October 07, 2015)
- [107] CTR, Scientific. Hoja de datos de seguridad solución salina de Hank`s <http://www.ctr.com.mx/pdfcert/Soluci%C3%B3n%20Salina%20de%20Hank%C2%B4s.pdf>.
- [108] Fresenius Kabi. Caring for life. Suero Ringer. Composición. http://www.fresenius-abi.cl/index.php?option=com_content&view.
- [109] Lector de microplacas modelo xMARK. Marca Bio-Rad. http://www.cociba.com/catalogo/index.php?route=product/product&product_id=223.
- [110] E. Saez, Ramos, M. Yates, Preparation, characterization and in vitro osteoblast growth of waste-derived biomaterials, *RCS Advances*, 4(1) 12630-39. Doi: 10.1039/C3RA47534D. 2014.
- [111] L. Yuanbin, D. A. Peterson, D. Schubert. Amyloid b peptide alters intracellular vesicle trafficking and cholesterol homeostasis * The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA 92037 Communicated by Roger Guillemin, The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA, September 14, 1998 (received for review June 23, 1998)
- [112] J.L. Gil J. Bosco; M. Domínguez; I. Domínguez . Chemosensitivity test on brain tumors. Ensayos de quimiosensibilidad en cultivos primarios de tumores cerebrales. Versión impresa ISSN 1130-1473. *Neurocirugía* vol.19 No.1 feb. 2008
- [113] T. Kokubo, H. Takadama, How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity. *Biomaterials* 27: 2907–2915. 2006.

- [114] H. Bender, W.D. Chen, J. Portillo, L. Van Den Hove, W. Vandervorst, AES and XPS analysis of the interaction of Ti with Si and SiO₂ during RTA, *Appl. Surf. Sci.* 38 (1989) 37–47.
- [115] L.Z. Zhao, J.B. Zhang, Bi and O valences in Ba-K-Bi-O, Ba-K-M-Bi-O (M = Rb, La, Eu, In, Tl and Pb) and the related compounds, *Solid State Commun.* 90 (1994) 709–712
- [116] J. Tan, K.J. Klabunde, P.M.A. Sherwood, X-ray Photoelectron Spectroscopy Studies of Solvated Metal Atom Dispersed Catalysts. Monometallic Iron and Bimetallic Iron-Cobalt Particles on Alumina, *Chem. Mater.* 2 (1990) 186–191
- [117] H. Perron, J. Vandenborre, C. Domain, R. Drot, J. Roques, E. Simoni, et al., Combined investigation of water sorption on TiO₂ rutile (110) single crystal face: XPS vs. periodic DFT, *Surf. Sci.* 601 (2007) 518–527. doi:10.1016/j.susc.2006.10.015
- [118] H.T. Fan, S.S. Pan, X.M. Teng, C. Ye, G.H. Li, L.D. Zhang, δ -Bi₂O₃ thin films prepared by reactive sputtering: Fabrication and characterization, *Thin Solid Films.* 513 (2006) 142–147. doi:10.1016/j.tsf.2006.01.07.
- [119] M. Hinojosa, M. Reyes. La rugosidad de superficies: Topometría. *Ingenierías*, vol. IV, 11. 2001; 27-33.
- [120] C. Castro. Determination of the cytotoxic effects of extracts, fractions, or substances, by means of the mtt test. *Fundación Universitaria San Martín*. Bogotá, Colombia.
- [121] M. Burgos, L. Rasmusson, L. Meirelles, L. Sennerby. Early bone tissue responses to turned and oxidized implants in the rabbit tibia. *Clin Implant Dent Relat Res* 10 vol 3. 2008; 181-90.
- [122] Y. K. Yadav. Electrical properties of Bi₂TiO₅ ceramic. M.P.K. Sahoo, R.N.P. Choudhary *Journal of Alloys and Compounds*. Volume 490, Issues 1–2, 4 February 2010, Pages 589–593.
- [123] J. Arismendi, L. Agudelo, A. Ospina. Implantes de superficie lisa o rugosa: Una decisión clínica. *Revista Internacional de Prótesis Estomatológica*. Ed. Hispanoamericana. 2004; 6 (1): 9-15.
- [124] A. Wennerberg, T. Albrektsson, J. Lausmaa. Torque and Histomorphometric Evaluation of c.p. Titanium Screws Blasted with 25- and 75-microns-sized Particles of Al₂O₃. *J Biomed Mater Res* 30. 1996; 251-60
- [125] C.J. Ivanoff, G. Widmark, C. Johansson, A. Wennerberg. Histologic Evaluation of Bone Response to Oxidized and Turned Titaniummicro-

- implants in Human Jawbone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 18. 2003; 341-8.
- [126] C. Pigatto, L.M. Antonini, E.L. Schneider, C.F. Malfatti. Superficies Nanoestructuradas de la Aleación Ti6Al4V. Influencia del Tiempo de Electropulido. *Información Tecnológica*. 2013; 23 (5): 13-22.
- [127] S. Anil S, P. S. Anand, H. Alghamdi, J.A. Jansen. Dental Implant Surface Enhancement and Osseointegration. En *Turkyilmaz I (Ed.). Implant Dentistry – A Rapidly Evolving Practice*. In Tech. DOI: 10.5772/16475. 2011. Disponible en <http://www.intechopen.com/books/implant-dentistry-a-rapidlyevolving-practice/dental-implant-surface-enhancement-andosseointegration>.
- [128] E. Nieto, F. Fernández, P. Duran, C. Moure. Películas delgadas: fabricación y aplicaciones. *Boletín De La Sociedad Española. Instituto de Cerámica y Vidrio. CSIC. Arganda del Rey. Madrid*.
- [129] C. A. Guerrero, C. Martínez, J. Sarmiento, C. A. Cardozo la proteína de estrés, heat shock cognate (hsc70) se sobreexpresa en osteoblastos sometidos a centrifugación overexpression heat shock cognate (HSC70) protein in osteoblasts submitted to centrifugal forces Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá Colombia.
- [130] La Eutanasia en los Animales de Laboratorio. Centro de Investigación. Hospital General Universitario de Valencia. *Research In Surgery*. Suplemento 5. Julio 1990.
- [131] Ley 84 del 27 de diciembre de 1989 Por la cual se adopta el Estatuto Nacional de Protección de los Animales y se crean unas contravenciones y se regula lo referente a su procedimiento y competencia. Republica De Colombia, Congreso Nacional.
- [132] Resolución número 8430 de 4 Octubre de 1993 “Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud Ministerio de Salud. Colombia.
- [133] Resolución 14 De 2006. Por la cual se reglamenta el Comité Nacional de Ética en Investigación de la Universidad Nacional de Colombia. Bogotá Colombia.
- [134] Bernard, B. Calcium metabolism and bone mineralization. En: “*Bone Metabolism and Mineralization. Vol 4*”. Hall B. CRC Press, Boca Ratón, 1992.
- [135] C. A. Cardozo. Consideraciones éticas de la investigación – generalidades. Especialista en Etica en Investigación Biomédica y Sicosocial Fogarty International Center OPS/OMS U de Chile.

- [136] E. Rodríguez. Ethics of research with animal models for human diseases. Centro Interdisciplinario de Estudios en Bioética, Universidad de Chile.
- [137] D. G. Johnson. The role of ethics in science and engineering. Trends in Biotechnology. Volume 28, Issue 12, December 2010, Pages 589–590.
- [138] Ley 14 de 3 de julio 2007, mediante la cual se crea El Comité de Bioética de España de Investigación Biomédica (BOE 4 de julio).
- [139] Centro de bioetica persona y familia. Leyes sobre bioética en Argentina <http://centrodebioetica.org/category/nt/pa/>. Argentina.