



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**OBTENCIÓN DE RECUBRIMIENTOS
DE GRAFENO-CaO-P₂O₅-SiO₂-TiO₂,
SOBRE Ti6Al4V POR PLASMA
ELECTROLÍTICO PARA
REPARACIÓN Y REGENERACIÓN
ÓSEA.**

Yuliana Andrea Franco Márquez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Minas, Departamento de Materiales y Minerales
Medellín, Colombia
2022

OBTENCIÓN DE RECUBRIMIENTOS DE GRAFENO-CaO-P₂O₅-SiO₂-TiO₂, SOBRE TI6AL4V POR PLASMA ELECTROLÍTICO PARA REPARACIÓN Y REGENERACIÓN ÓSEA.

Yuliana Andrea Franco Márquez

Tesis como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ingeniería - Materiales y Procesos

Director (a):

Ph.D, Hugo Armando Estupiñán Durán

Línea de Investigación:

Biomateriales para aplicación ósea

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Biosuperficies

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Minas, Departamento de Materiales y Minerales

Medellín, Colombia

2022

Gratitud con Dios, por siempre estar a mi lado, por apoyarme y creer en mí, a mis padres, Duván y Doris, hermanos, Fabián y Jenny, por ser siempre una de mis más grandes motivaciones, y a mí, por la fortaleza, la paciencia y la fe.

Declaración de obra original

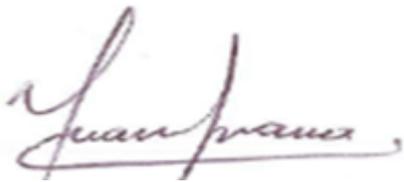
Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Yuliana Andrea Franco Márquez.

Fecha 02/12/2022

Agradecimientos

Siempre gracias a Dios por tanto, por el proceso formativo, académico e investigativo que me permitió llevar a cabo en la Universidad Nacional de Colombia, Institución que llevo en el corazón, especialmente a la Facultad de Minas y a todos mis compañeros del bloque M17 de Ingeominas, a quienes doy un sincero y cariñoso gracias, reconociendo especialmente, con mucho amor y gratitud, el apoyo dado por Efra, Mericita, Naren, el profe Alejo Toro, Julito, Cami (Bedoya), Luchito, Oscar, Daniela, Jhonatan, la torre Marín, al profe Fabio Suarez, quienes me apoyaron desde lo técnico y emocional, compartiendo conmigo sus conocimientos, experiencias, consejos y tiempo, algo que respeto y valoro mucho; cada uno de ustedes, no sólo me enseñó algo en el ámbito académico, sino también, a nivel personal, con sus palabras de apoyo, de motivación, con sus consejos, su escucha, y con los preciados momentos en el cafetín, y a la hora del almuerzo, cada momento fue muy enriquecedor para mí. Agradezco también el acompañamiento y la dirección dada por el Dr. Hugo Armando Estupiñán Durán, por la confianza que depositó en mí, por las oportunidades de aprendizaje y crecimiento profesional y científico que me otorgó, por las enseñanzas, por el apoyo, la paciencia, el respeto, por creer en mí, y por mucho más, muchas gracias profesor. Gracias a los frailejones del ITM, quienes lograron ayudar a dispersarme un poco del estrés y las angustias que en varias ocasiones sentí en este camino, por escuchar mis quejas, molestias y demás sentimientos y expresiones generadas por el agotamiento del trote de cada día, de estudiar, trabajar y dar un feliz avance y término a una tesis de investigación. Gracias familia, gracias mejor amigo Pepi, gracias a la vida.

Obtención de recubrimientos de grafeno-CaO-P₂O₅-SiO₂-TiO₂, sobre Ti6Al4V por plasma electrolítico para reparación y regeneración ósea

En este proyecto se sintetizó por medio del método de oxidación por plasma electrolítico (PEO) un recubrimiento biocerámico, compuesto por grafeno-CaO-P₂O₅-SiO₂-TiO₂. Esta técnica permitió la migración, difusión y deposición de los iones constituyentes del electrolito elaborado, sobre la superficie de Ti6Al4V, previamente tratada con un proceso de anodizado. Posterior a esto, se realizaron tratamientos térmicos, a 400°C y 600°C, los cuales, en conjunto con los diferentes porcentajes de grafeno utilizados, promovieron unos efectos a nivel estructural, morfológico y químico en el recubrimiento. Para el análisis y caracterización de los recubrimientos sintetizados, se utilizaron técnicas de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Espectroscopía de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS), Mapeo Elemental EDS, Difracción de Rayos X (DRX), Espectroscopía Confocal Raman, Mapeo Raman y medición de ángulo de contacto de gota sésil. Posterior a la caracterización de las propiedades de mojabilidad del recubrimiento, se realizó un tratamiento por plasma de descarga intensa de gas ionizante, con el objetivo de promover modificaciones en las propiedades de mojabilidad, factor que influye en la adsorción de proteínas y adhesión celular. Finalmente se realizó un estudio mediante espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE), para evaluar la capacidad bioactiva del recubrimiento, la cual se relaciona con la disposición del recubrimiento para promover la formación de complejos de apatita. Comportamiento que finalmente favoreció la adhesión de células de osteosarcoma humano sobre los recubrimientos evaluados. De esta manera, se obtuvieron recubrimientos compuestos de fosfatos cálcicos, complejos de SiO₂, silicato de calcio y grafeno funcionalizado, con características morfológicas porosas, transformaciones de fase anatasa, y la formación de componentes biocerámicos de fosfatos cálcicos amorfos.

Palabras clave: recubrimientos, grafeno, oxidación por plasma electrolítico, bioactividad, Ti6Al4V, biocerámicos.

Obtaining of graphene-CaO-P₂O₅-SiO₂-TiO₂ coatings on Ti6Al4V by electrolytic plasma for bone repair and regeneration

In this project, a bioceramic coating composed of graphene-CaO-P₂O₅-SiO₂-TiO₂ was synthesized by means of the plasma electrolytic oxidation (PEO) method. This technique allowed the migration, diffusion and deposition of the constituent ions of the elaborated electrolyte on the Ti6Al4V surface, previously treated with an anodizing process. After this, thermal treatments were performed at 400°C and 600°C, which, together with the different percentages of graphene used, promoted some effects at the structural, morphologic, and chemical level of the bioceramic coating. For the analysis and characterization of the synthesized coatings, Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS), EDS elemental mapping, X-ray diffraction (XRD), Raman confocal spectroscopy, mapping Raman and sessile droplet contact angle measurement were used. After the characterization of the wettability properties of the coating, a treatment was carried out by intense ionizing gas discharge plasma, with the aim of promoting changes in wettability properties, a factor that influences protein adsorption and cell adhesion. Finally, a study was implemented using electrochemical impedance spectroscopy (EIS), to evaluate the bioactive capacity of the coating, which is related to the disposition of the coating to promote the formation of apatite complexes. Behavior that finally favored the adhesion of human osteosarcoma cells on the evaluated coatings. In this way, coatings composed of calcium phosphates, SiO₂ complexes, calcium silicate and functionalized graphene were obtained, with porous topographic characteristics, anatase phase transformations, and the formation of amorphous calcium phosphate bioceramics.

Keywords: coatings, graphene, electrolytic plasma oxidation, bioactivity, Ti6Al4V, bioceramics.

Productos asociados a la tesis de maestría

Participación en proyectos asociados al grupo de investigación en biomateriales y biosuperficies:

- Proyecto "un innova": convocatoria nacional de proyectos para el fortalecimiento de la innovación, en la Universidad Nacional de Colombia a partir de desarrollo de prototipos y experiencias piloto 2016-2018 segunda cohorte" (H: 42976). Contrato: OSE No. 420, para prestación de servicios profesionales (01/07/2021- 22/09/2021)
- "Aprovechamiento industrial del reciclado de la viruta de Ti6Al4V". Código 54020. Semillero de biomateriales y biotecnología.

Eventos de divulgación científica:

- 1er Seminario de Investigación en Recursos Minerales, Materiales y Nanotecnología (1SIRMMN). Universidad Nacional de Colombia, sede Minas. Modalidad: posters (09-10 de diciembre de 2021).

Trabajos presentados:

- Aprovechamiento industrial del reciclado de virutas de Ti6Al4V.
- Recubrimiento de superficies de Ti6Al4V con nanopartículas de grafeno por oxidación por plasma electrolítico para su potencial uso en reparación ósea.
- IX Coloquio de Investigación en Ingeniería Biomédica. Instituto Tecnológico Metropolitano. Presentación oral del trabajo titulado: "Síntesis de recubrimientos biocerámicos con nanopartículas de grafeno, para su uso en reparación y regeneración ósea" (agosto 25 y 26 de 2022).
- XI Congreso Internacional de Materiales 2022. Hotel Irotama Resort, Santa Marta-Colombia, octubre 26, 27 y 28 de 2022. Presentación oral de los trabajos titulados:
 - Obtención de recubrimientos biocerámicos con nanopartículas de grafeno, para su uso potencial en reparación y regeneración ósea.

- Caracterización elemental y electroquímica de recubrimientos biocerámicos con nanopartículas de grafeno, para su uso potencial en reparación y regeneración ósea.
- II Seminario de Investigación de Materiales y Minerales. Universidad Nacional de Colombia, sede Minas, diciembre 5 y 6 de 2022. Presentación oral del trabajo titulado:
 - Efectos del uso de nanopartículas de grafeno, tratamiento térmico y por plasma de descarga intensa de gas ionizante, en recubrimientos biocerámicos.

Publicaciones:

- Publicación del trabajo titulado, "Síntesis de recubrimientos biocerámicos con nanopartículas de grafeno, para su uso en reparación y regeneración ósea", presentado en el IX Coloquio de Investigación en Ingeniería Biomédica, en la revista Avances en Ciencias Aplicadas (ISSN 2805-9409 (En línea)).

Distinciones y contraprestaciones:

- Monitoría de posgrado, convocatoria # 8: Apoyo administrativo a los laboratorios y grupos de investigación del Departamento de Materiales y Minerales.
- Beca de facultad, BEDAS- Becas de exención de derechos académicos.
- Contraprestación BEDAS: "Puesta a punto de la información de los laboratorios de Materiales". Monitor Asignatura/Actividades del Área: Caracterización de materiales, Docente Acompañante de las contraprestaciones: Hugo Armando Estupiñán.
- Apoyo de movilidad 11905, para la asistencia al XI Congreso Internacional de Materiales 2022. Hotel Irotama Resort, Santa Marta- Colombia.

Contenido

Introducción	1
1. Capítulo 1: Síntesis de recubrimientos de grafeno-CaO-P₂O₅-SiO₂-TiO₂ sobre Ti6Al4V, mediante oxidación por plasma electrolítico, con tratamiento térmico y plasma por descarga intensa de gas ionizante.....	4
1.1 Introducción.....	4
1.2 Estado del arte.....	12
1.3 Metodología.....	15
1.3.1 Materiales y equipos.....	15
1.3.2 Preparación de las superficies de las muestras.....	15
1.3.3 Anodizado de los discos de Ti6Al4V.....	16
1.3.4 Síntesis del recubrimiento G-CaO-P ₂ O ₅ -SiO ₂ -TiO ₂ sobre Ti6Al4V y postratamiento térmico.....	17
1.3.5 Equipos de caracterización utilizados, para el análisis topográfico, elemental y de propiedades de mojabilidad.....	18
1.4 Resultados y conclusiones.....	19
1.4.1 DRX (de las muestras sólo con el recubrimiento sin el tratamiento térmico)....	19
1.4.2 Ángulo de contacto.....	23
1.4.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM-EDS)-medida de espesores.....	27
1.4.4 Discusión y Conclusiones.....	34
2. Capítulo 2: análisis del efecto del tratamiento térmico en el desempeño bioactivo y estructural de los recubrimientos de grafeno-CaO-P₂O₅-SiO₂-TiO₂.....	36
2.1 Introducción.....	36
2.2 Metodología.....	37
2.2.1 Materiales y equipos.....	37
2.2.2 Análisis por difracción de rayos X, haz rasante.....	38
2.3 Resultados y conclusiones.....	39
2.3.1 Resultados DRX.....	39

2.3.2 Resultados de Espectroscopía Raman.....	40
2.3.3 Resultados SEM, EDS, y mapeo elemental EDS.....	43
2.4.4 Discusión y Conclusiones.....	66
3. Capítulo 3: evaluación del efecto del tratamiento térmico y del plasma por descarga intensa de gas ionizante sobre la adsorción de iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} en el recubrimiento de grafeno-$\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-TiO}_2$, mediante impedancia electroquímica y mapeo Raman.....	69
3.1 Introducción.....	69
3.2 Metodología.....	71
3.3 Resultados y conclusiones.....	72
3.3.1 Ángulos de contacto para el análisis del efecto del tratamiento por plasma. .	72
3.3.2 Caracterización por mapeo Raman.	75
3.3.3 Análisis por espectroscopía de impedancia electroquímica (<i>EIE</i>) de los recubrimientos biocerámicos y la capacidad de adsorción de Ca^{2+} y PO_4^{3-}	83
3.4 Viabilidad celular.....	92
3.4.1 Preparación de las muestras.....	93
3.4.2 Evaluación y resultados de adhesión celular.	93
3.5 Discusión y Conclusiones.	96
4. Conclusiones generales y recomendaciones	98
4.1 Conclusiones	98
4.2 Recomendaciones	100
5. Bibliografía	102

Lista de figuras

Figura 1-1: Microscopía electrónica de barrido del extremo distal de la tibia [15].	5
Figura 1-2: Microscopía electrónica de barrido de hueso compacto y esponjoso [15].....	6
Figura 1-3: Microscopía electrónica de barrido de hueso compacto con tinción de Schmorl [15].	6
Figura 1-4: Microscopía electrónica de barrido del osteocito (izquierda) y del osteon (derecha) [15].	8
Figura 1-5: Esquema de tratamiento con oxidación por plasma electrolítico en una superficie de Ti6Al4V [20].	11
Figura 1-6: Imágenes del proceso de crecimiento de óxidos preferenciales de titanio, con la técnica de anodización.	16
Figura 1-7: Concentraciones de las soluciones electrolíticas preparadas para el proceso de oxidación por plasma electrolítico.	17
Figura 1-8: Difracción de rayos X (DRX) del sustrato Ti6Al4V.	20
Figura 1-9: DRX los recubrimientos 1_SIN_TT (recubrimiento sin grafeno y sin tratamiento térmico), 1_400_TT (recubrimiento sin grafeno y con tratamiento térmico a 400°C), y 1_600_TT (recubrimiento sin grafeno y con tratamiento térmico a 600°C).	21
Figura 1-10: Software de tratamiento y análisis de imagen, para el estudio de las micrografías SEM.	27
Figura 1-11: Micrografías SEM, corte transversal, de la muestra 1_SIN_TT, a) imagen por electrones secundarios con 2500 aumentos, b) imagen por electrones retrodispersados, con 2500 aumentos, c) imagen por electrones secundarios con 4000 aumentos.	28
Figura 1-12: Micrografías SEM, corte transversal, de la muestra 2_SIN_TT, a) imagen por electrones secundarios con 2500 aumentos, b) imagen por electrones retrodispersados, con 2500 aumentos, c) imagen por electrones secundarios con 4000 aumentos.	29
Figura 1-13: Micrografías SEM, corte transversal, de la muestra 3_SIN_TT, a) imagen por electrones secundarios con 2500 aumentos, b) imagen por electrones retrodispersados, con 2500 aumentos, c) imagen por electrones secundarios con 4000 aumentos.	30

Figura 1-14: Micrografías SEM, corte transversal, de la muestra 3_600_TT, a) imagen por electrones secundarios con 2500 aumentos, b) imagen por electrones retrodispersados, con 2500 aumentos, c) imagen por electrones secundarios con 4000 aumentos.....	31
Figura 2-1: Resultados DRX de las muestras 5_600_TT (nueva concentración evaluada), 2_400_TT, 2_600_TT, 3_600_TT, 4_600_TT, y 5_SIN_TT.....	39
Figura 2-2: Resultados de espectroscopía raman, de las muestras 1_600_TT, 2_400_TT, 2_600_TT, 3_600_TT, 4_600_TT, 5_600_TT y 5_SIN_TT, a) zoom de la zona del espectro raman de 100-300 cm ⁻¹ , b) zoom de la zona del espectro raman de 600-1800 cm ⁻¹	41
Figura 2-3: Micrografías SEM de la muestra 2_400_TT, con aumentos de 1.000X, 2.000X, 2.500X, 5.000X y 10.000X.	43
Figura 2-4: Análisis por ImageJ de la micrografía SEM (obtenida con electrones retrodispersados a 1.000X) de la muestra 2_400_TT.....	44
Figura 2-5: Resultado EDS de la muestra 2_400_TT.....	45
Figura 2-6: Resultado del mapeo elemental realizado por SEM.....	45
Figura 2-7: Micrografías SEM de la muestra 2_600_TT, con aumentos de 1.000X, 2.000X, 2.500X, 5.000X y 10.000X.	47
Figura 2-8: Análisis por ImageJ de la micrografía SEM (obtenida con electrones retrodispersados a 1.000X) de la muestra 2_600_TT.....	48
Figura 2-9: Resultados EDS de la muestra 2_600_TT.	48
Figura 2-10: Resultados del mapeo elemental realizado por SEM.	49
Figura 2-11: Micrografías SEM de la muestra 3_400_TT, con aumentos de 1.000X, 2.000X, 2.500X, 5.000X y 10.000X.	50
Figura 2-12: Análisis por ImageJ de la micrografía SEM (obtenida con electrones retrodispersados a 1.000X) de la muestra 3_400_TT.....	51
Figura 2-13: Resultados EDS de la muestra 3_400_TT.	51
Figura 2-14: Resultados del mapeo elemental realizado por SEM.	52
Figura 2-15: Micrografías SEM de la muestra 3_600_TT, con aumentos de 1.000X, 2.000X, 2.500X, 5.000X y 10.000X.	53
Figura 2-16: Análisis por ImageJ de la micrografía SEM (obtenida con electrones retrodispersados a 1.000X) de la muestra 3_600_TT.....	54
Figura 2-17: Resultados EDS de la muestra 3_600_TT.	54
Figura 2-18: Resultados del mapeo elemental realizado por SEM.	55

Figura 2-19: Micrografías SEM de la muestra 4_400_TT, con aumentos de 1.000X, 2.000X, 2.500X, 5.000X y 10.000X.....	56
Figura 2-20: Análisis por ImageJ de la micrografía SEM (obtenida con electrones retrodispersados a 1.000X) de la muestra 4_400_TT.....	57
Figura 2-21: Resultados EDS de la muestra 4_400_TT.....	57
Figura 2-22: Resultados del mapeo elemental realizado por SEM.....	58
Figura 2-23: Micrografías SEM de la muestra 4_600_TT, con aumentos de 1.000X, 2.000X, 2.500X, 5.000X y 10.000X.....	60
Figura 2-24: Análisis por ImageJ de la micrografía SEM (obtenida con electrones retrodispersados a 1.000X) de la muestra 4_600_TT.....	61
Figura 2-25: Resultados EDS de la muestra 4_600_TT.....	61
Figura 2-26: Resultados del mapeo elemental realizado por SEM.....	62
Figura 2-27: Micrografías SEM de la muestra 5_600_TT, con aumentos de 1.000X, 2.000X, 2.500X, 5.000X y 10.000X.....	63
Figura 2-28: Análisis por ImageJ de la micrografía SEM (obtenida con electrones retrodispersados a 1.000X) de la muestra 5_600_TT.....	64
Figura 2-29: Resultados EDS de la muestra 5_600_TT.....	64
Figura 2-30: Resultados del mapeo elemental realizado por SEM.....	65
Figura 3-1: Resultados del mapeo espectral de 3 zonas de la muestra 2_QT_600_TT, y mapeo general de la muestra 2_QT_SIN_TT.....	75
Figura 3-2: Resultados del mapeo espectral de 3 zonas de la muestra 3_QT_600_TT, y mapeo general de la muestra 3_QT_SIN_TT.....	78
Figura 3-3: Resultados del mapeo espectral de 3 zonas de la muestra 5_QT_600_TT, y mapeo general de la muestra 5_SINQT_SINTT.....	80
Figura 3-4: Esquema del circuito equivalente utilizado para el análisis y simulación en Zview, de los resultados obtenidos con EIE.....	84
Figura 3-5: Espectro de Nyquist de los resultados de EIE, de las muestras 2_QT_600, 2_QT_SIN_TT, 3_QT_600, 3_QT_SIN_TT, 5_QT_600 y 5_QT_600 (muestras tratadas con plasma), a-b) corresponde a imágenes aumentadas del diagrama de Nyquist.....	85
Figura 3-6: Diagrama del comportamiento de la resistencia del SBF al entrar en contacto con la superficie de los recubrimientos de las muestras 2_QT_600_TT, 2_QT_SINTT, 3_QT_600_TT, 3_QT_SINTT, 5_QT_600_TT y 5_SINQT_SIN600.....	88
Figura 3-7: Diagrama de la resistencia de polarización total de las muestras 2_QT_600, 2_QT_SIN_TT, 3_QT_600, 3_QT_SIN_TT, 5_QT_600 y 5_SINQT_SIN600.....	90

Figura 3-8: Diagrama de la sumatoria de las capacitancias del sistema de las muestras 2_QT_600, 2_QT_SIN_TT, 3_QT_600, 3_QT_SIN_TT, 5_QT_600 y 5_QT_600.	91
Figura 3-9: Micrografías, con objetivo de 10X, de células HOS adheridas a los recubrimientos. Control (A), 2_QT_600_TT (B), 5_QT_600_TT (C).	94
Figura 3-10: Micrografías, con objetivo de 40X, de células HOS adheridas a los recubrimientos. Control (A), 2_QT_600_TT (B), 5_QT_600_TT (C).	94

Lista de tablas

Tabla 1-1: Denominaciones de las muestras, de acuerdo a la solución electrolítica utilizada.	18
Tabla 1-2: Datos composicionales del análisis de difracción del sustrato Ti6Al4V.....	20
Tabla 1-3: Ángulos de contacto y energía superficial de los recubrimientos obtenidos con y sin grafeno, y de los tratamientos realizados a 400 y 600°C.....	24
Tabla 1-4: Resultados de las medidas de los espesores promedios para las muestras 1_SIN_TT, 2_SIN_TT, 3_600_TT y 3_SIN_TT, analizadas con el software ImageJ, y espectros EDS, obtenidos con el SEM.	32
Tabla 3-1: Resultados de las mediciones de ángulo de contacto de las muestras tratadas por plasma de descarga intensa de gas ionizante.	73
Tabla 3-2: Valores de resistencia de la solución electrolítica R1, resistencia de polarización Rp (equivalente a R12+R3), y elementos de fase constante CPE (que representan las capacitancias y el coeficiente de idealidad n).	87

Introducción

Una de las preocupaciones más subyacentes en el desarrollo y uso de biomateriales para sustitución y/o reparación ósea, es la degradación de los materiales y la baja bioactividad al estar en contacto con los tejidos nativos, dado los procesos de corrosión, abrasión y desgaste que pueden sufrir. Afectando la biomecánica del implante y la integridad de la estructura ósea, exponiendo con ello limitaciones en la osteoconducción, proliferación, regeneración y reparación ósea. La formación de tejido fibroso y/o cantidad inadecuada de tejido, la irregularidad en el crecimiento óseo, la morbilidad en el sitio de contacto, la necesidad de extracción del material implantado, la pérdida de propiedades biológicas y mecánicas, y la inmunogenicidad, son algunas de las dificultades que se presentan con el uso de implantes óseos [1][3].

El uso de implantes metálicos para el tratamiento de fracturas, daños óseos y/o sustitución de estructuras óseas, busca propiciar la reparación del hueso afectado, permitiendo restaurar la anatomía y funcionalidad del mismo [2]. Por lo tanto, los materiales utilizados para fijación ósea deben cumplir con una serie de requisitos que faciliten la recuperación del paciente, entre los cuales está, una alta biocompatibilidad, baja citotoxicidad, excelentes propiedades mecánicas, eléctricas y químicas. Además de una adecuada integración con el tejido óseo circundante, aspecto que continúa evaluándose en el desarrollo nuevos materiales y que busca obtener sustitutos óseos competentes y óptimos que mejoren la calidad de vida de los pacientes [2][3].

El cuerpo humano expone un entorno hostil para los implantes metálicos dado lo componentes electrolíticos que lo componen: como el agua, el sodio, el cloro, los aminoácidos, las proteínas y la sangre. Factores que generan ataques electroquímicos y con ello la degradación del material implantado, reduciendo la vida útil del mismo. Las proteínas por ejemplo, son unas de las biomoléculas que generan daños en las prótesis óseas, ya que al depositarse sobre la superficie de los implantes reduce la difusión de

oxígeno causando corrosión. El desarrollo de materiales para implantes óseos, cuya finalidad sea la sustitución y/o reemplazo de articulaciones, debe tener una mayor duración, alta capacidad biomecánica, tribológica y de biocompatibilidad [1][3].

La osteólisis, mecanismo patogénico, que genera la destrucción del hueso alrededor del implante, terminando en muchos casos, en el des-anclaje y/o aflojamiento del implante, es uno de los problemas que ocasiona la lixiviación de los materiales metálicos, dada la liberación de iones y elementos metálicos. Investigadores de la Charité-Universitätsmedizin de Berlín (Alemania), evaluaron la liberación de residuos de diferentes metales, utilizados en implantes articulares, exponiendo que las partículas y los metales disueltos liberados por prótesis de artroplastia, estaban presentes en el hueso y en la médula ósea, lo que representa un alto riesgo en la salud, aspecto que llama a evaluar y a mejorar la relación riesgo-beneficio que tiene el uso de implantes metálicos en los procesos de reparación y/o sustitución ósea [4].

La evolución de la nanotecnología y los nanocompuestos han permitido desarrollar una serie de materiales con características biomiméticas que favorecen la recuperación del tejido óseo. Estos pueden interactuar de manera más efectiva con las células y biomoléculas que conforman los tejidos y fluidos circundantes, reduciendo así la formación de trombos, inflamación de tejidos sanos, rechazo y/o migración del implante y muerte celular [2]. Consecuencias que aún se siguen presentando, especialmente en zonas donde se utilizan implantes por períodos de mediano y largo plazo. Los avances en la formulación de nanomateriales y recubrimientos han facilitado el uso de nuevas técnicas de intervención quirúrgica y de tratamientos posoperatorios que exponen una recuperación rápida y poco traumante para el paciente, mejorando la calidad en la salud y la restauración en las funciones biomecánicas.

Como ya se había mencionado, son varias las consecuencias adversas que pueden generarse con el uso de implantes para fijación ósea, especialmente en la población adulta, ya que en ésta se puede presentar hasta un 45% de necrosis avascular y una serie de complicaciones que pueden empeorar el efecto del trauma inicial, pudiéndose presentar un re-desplazamiento de la fractura o deformación de la misma, migración del implante, infección del tejido circundante, entre otros, aspectos que buscan eliminarse, no sólo con el mejoramiento de las técnicas de intervención quirúrgica y tratamientos posoperatorios,

sino también con el desarrollo de nuevos implantes que expongan mejores propiedades bioeléctricas y de biocompatibilidad [2] [11].

El propósito de este proyecto se basó en el cumplimiento de los siguientes objetivos:

- **Objetivo general:**

- ✓ Obtener recubrimientos de grafeno-CaO-P₂O₅-SiO₂-TiO₂ en Ti6Al4V por plasma electrolítico para reparación y regeneración ósea.

- **Objetivos específicos:**

- ✓ Obtener recubrimientos de grafeno-CaO-P₂O₅-SiO₂-TiO₂ sobre Ti6Al4V, mediante oxidación por plasma electrolítico, con tratamiento térmico y plasma por descarga intensa de gas ionizante.
- ✓ Analizar el efecto del tratamiento térmico en el desempeño bioactivo y estructural de los recubrimientos de grafeno-CaO-P₂O₅-SiO₂-TiO₂.
- ✓ Evaluar el efecto del tratamiento térmico y del plasma por descarga intensa de gas ionizante sobre la adsorción de iones Ca²⁺ y PO₄³⁻ en el recubrimiento de grafeno-CaO-P₂O₅-SiO₂-TiO₂, mediante impedancia electroquímica y mapeo Raman.

1. Capítulo 1: Síntesis de recubrimientos de grafeno-CaO-P₂O₅-SiO₂-TiO₂ sobre Ti6Al4V, mediante oxidación por plasma electrolítico, con tratamiento térmico y plasma por descarga intensa de gas ionizante.

1.1 Introducción

Entender la histología y fisiología del tejido óseo es importante para poder evaluar las mejoras a desarrollar para los procesos de reparación y regeneración asistidos por implantes, por lo tanto, se expone a continuación un poco de la histología y fisiología del hueso:

- El hueso es un tejido conjuntivo muy vascularizado e innervado, conformado por unas laminillas de matriz osteoide calcificada, cuya orientación y disposición determinará la morfología del tejido.
- Morfológicamente el tejido óseo se compone por hueso esponjoso o trabecular, constituido por laminillas óseas en forma de red que demarca las cavidades areolares donde se encuentra la médula ósea, y el hueso compacto conformado por las laminillas y el canal de Havers donde se encuentra los osteocitos (ambos contienen osteonas).
- Los dos tipos de formación ósea son: formación de hueso intramembranoso, el cual se forma dentro de centros organizativos del mesénquima y la formación de hueso

endocondral, éste se forma a partir de un modelo cartilaginoso en el que se desarrollará posteriormente hueso.

- Los tipos de cartílago son: cartílago hialino, cartílago elástico y fibrocartílago.
- Las fibras de tejido conectivo que predominan en cada tipo de cartílago son: en el cartílago hialino se tienen las fibras colágeno tipo 2, en el cartílago elástico las fibras colágeno tipo 2 y las fibras elásticas y en el fibrocartílago se tienen las fibras colágeno tipo 1 y 2 [14-15].

Figura 1-1: Microscopía electrónica de barrido del extremo distal de la tibia [15].

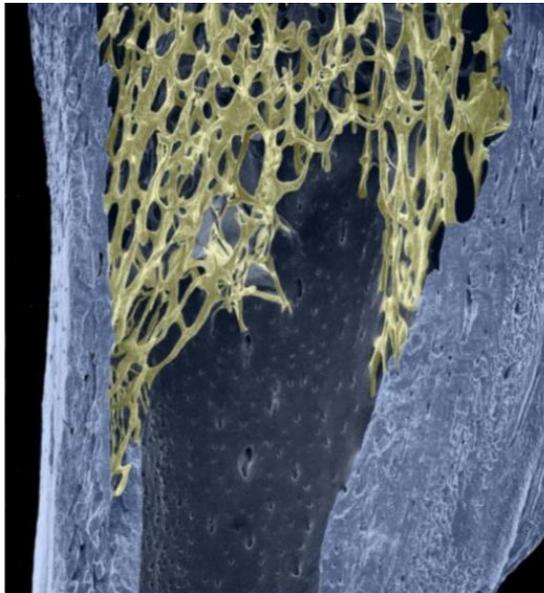


Figura 1-2: Microscopía electrónica de barrido de hueso compacto y esponjoso [15].

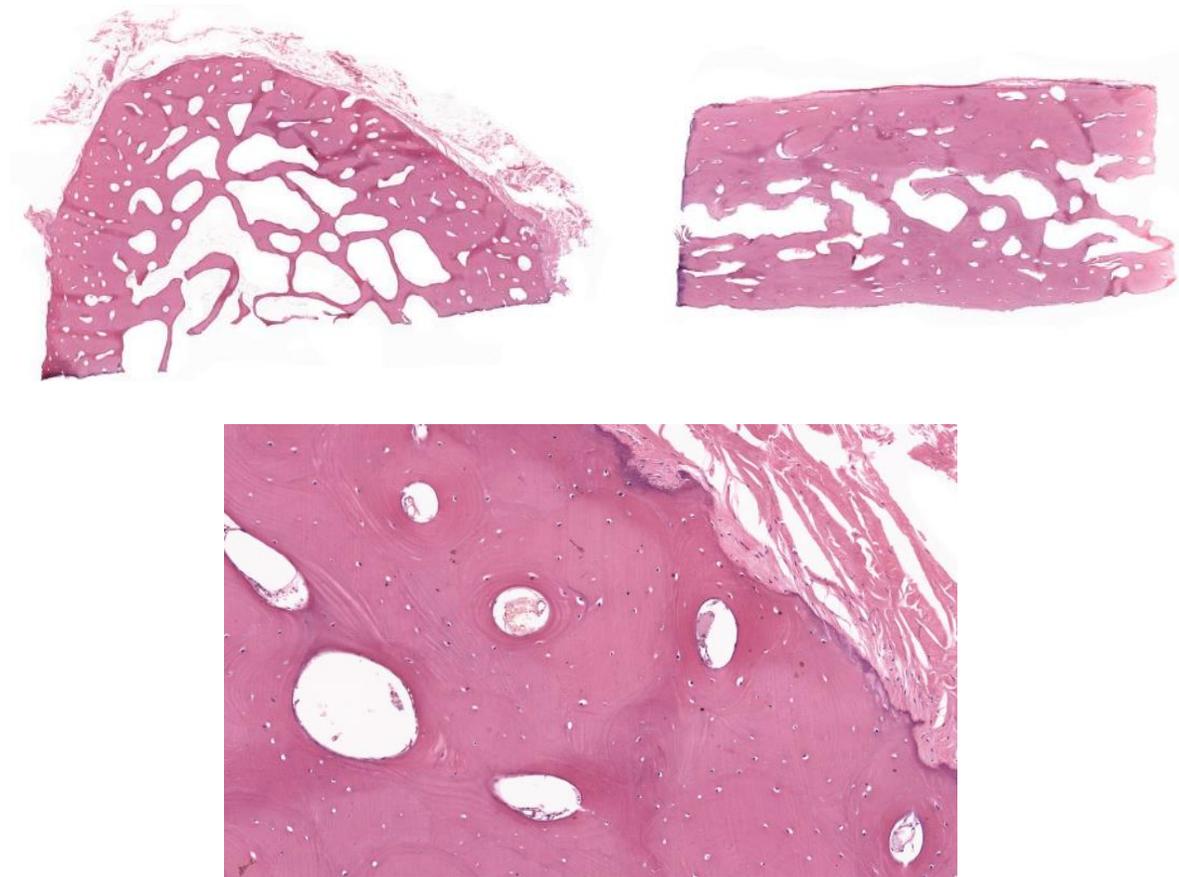
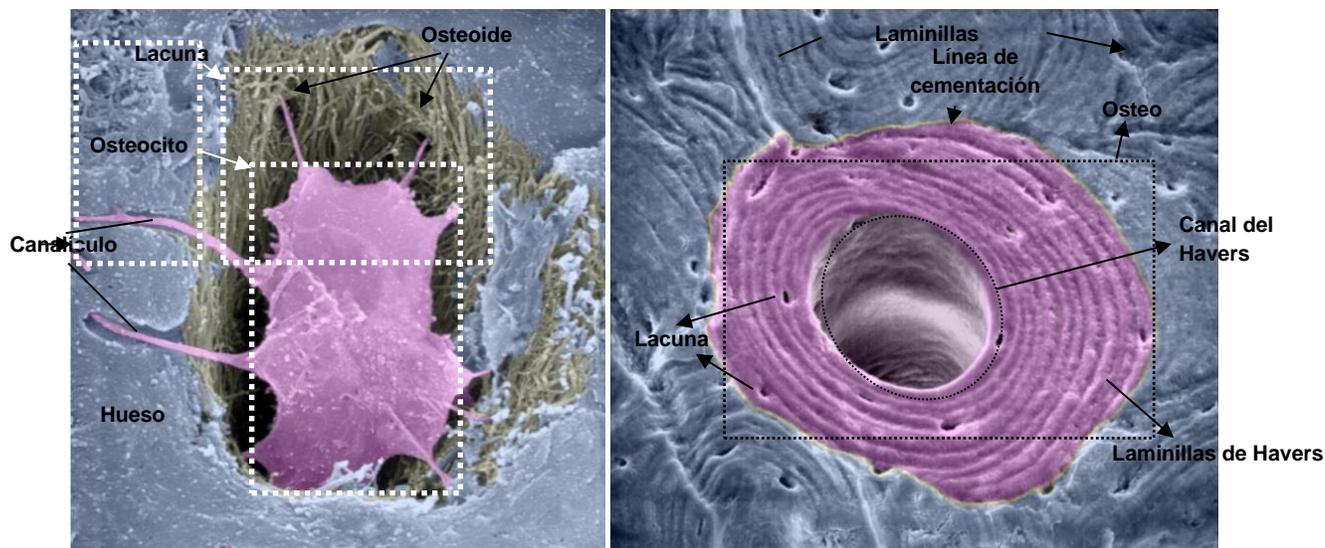


Figura 1-3: Microscopía electrónica de barrido de hueso compacto con tinción de Schmorl [15].



Las micrografías de la Figura 1-1, Figura 1-2 y Figura 1-3, exponen la estructura e histología del hueso compacto y del hueso esponjoso; en la primera imagen se puede observar caracterizado de forma colorimétrica, la zona azul correspondiente al hueso compacto, constituido por los osteones y la zona amarilla que hace referencia al hueso esponjoso, compuesto por una red esponjosa de trabéculas. La segunda micrografía se compone de 2 ejemplares, a la izquierda se encuentra un corte transversal del extremo de un hueso largo ubicado en las extremidades y a la derecha se encuentra un corte transversal de un hueso plano de la parte superior del cráneo, denominada la Calvaria; debajo de las imágenes descritas está un zoom de la micrografía de la derecha, en la cual se puede apreciar, en la zona de hueso compacto, los osteones, los canales y las laminillas de Havers, zonas que se ven con más detalle en la tercera micrografía, la cual gracias al proceso de tinción Schmorl, permite identificar con más contraste las estructuras que conforman el hueso compacto, observando así los osteones, unidad estructural del hueso compacto de forma cilíndrica, dispuestas en paralelo a las líneas de tensión en el hueso, y los canales de Havers, correspondientes a la apertura circular del centro del osteon; se observan también las laminillas de Havers, dispuestas concéntricamente como capas constituidas por matriz extracelular que forman la mayor parte del osteon; la lacunae (o laguna), son esas especies de óvalos pequeños de color café oscuro, que realmente son unos espacios abiertos en la matriz mineralizada que contiene un osteocito, se observa también unos pequeños canales llamados canalículos, con manchas oscuras que conectan las lagunas entre sí, éstos permiten que los osteocitos compartan nutrientes y expandan los procesos celulares, y las laminillas intersticiales que a través de las lagunas presentes en éstas, se conectan con los osteones, ubicándose así entre los osteones y los restos de la remodelación ósea. A modo de ilustración se expone a continuación unas micrografías del osteon y el osteocito, Figura 1-4 [14-15].

Figura 1-4: Microscopía electrónica de barrido del osteocito (izquierda) y del osteon (derecha) [15].



En el proceso de recuperación de una fractura y/o daño de tejido óseo, se pueden dar dos fenómenos, el de reparación y/o regeneración; al utilizar un implante que propicie la formación de hueso nuevo idéntico al preexistente, se está hablando de regeneración, cuando lo que se obtiene es un tejido con características diferentes al tejido óseo original, se está haciendo referencia a un tejido cicatricial y con ello a un proceso de reparación. En ambos casos se tiene todo un proceso bioquímico y fisiológico de recuperación del hueso, en el que interactúan las células y las proteínas óseas, generando además señales que promueven la diferenciación celular y con ello las fases de regeneración y/o reparación [15].

Existe una gran variedad de materiales con muy buenas propiedades físicas y químicas, que han sido de gran apoyo en campos como la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa, sin embargo aspectos como la biocompatibilidad, proliferación celular, regeneración, reparación ósea y especialmente la cicatrización ósea, siguen presentando algunos inconvenientes, generados por el rechazo de implantes y materiales que al entrar en contacto con los tejidos y sustancias biológicas del organismo, no generan las señales necesarias, ni los mecanismos requeridos para los procesos de regeneración y reparación, factores que ralentizan la reparación ósea, generando en algunos casos un daño mayor al

primario por la extracción del material protésico, aspecto que podría estar relacionado con la degradación del material expuesto.

El Ti6Al4V es una de las aleaciones metálicas más utilizadas en el desarrollo de implantes óseos dada la biocompatibilidad y baja citotoxicidad e integridad mecánica que ofrece, mejora además mediante la estimulación eléctrica factores de crecimiento óseo [5][6]. Característica que continúa siendo foco de estudio y que busca mejorarse con la integración de nanomateriales como el grafeno sobre las superficies de los implantes y/o sobre los cementos óseos que se utilizan para promover la fijación ósea e interacción celular. Permitiendo con ello explorar el potencial que tiene la estimulación eléctrica en la regeneración de tejido óseo y la capacidad e influencia que exponen los biopotenciales en la orientación, diferenciación y proliferación de células y tejidos [6][9].

La medicina regenerativa, la ingeniería de tejidos y como tal la nanotecnología, forman un equipo, en el que se aprovecha los factores naturales del cuerpo, de cada órgano, célula y tejido, para inspirar la creación de nuevos materiales que contengan nanopartículas con características antibacterianas y que proporcionen además excelentes propiedades mecánicas, eléctricas, térmicas, químicas y biomiméticas, favoreciendo con todo esto, la recuperación de tejidos y órganos, permitiendo tener cada vez más implantes y biomateriales con mayor capacidad bioactiva, de regeneración y reparación [7][8]. Cuando se busca desarrollar un implante que tenga mejores características de biocompatibilidad, diferenciación celular y baja toxicidad, entre otros, es importante tener presente los componentes y/o partículas estimulantes que harán posibles los factores antes mencionados. Evitando la muerte celular y/o el rechazo de materiales e implantes por el sistema inmune. Las señales bioquímicas y biofísicas son resultado de esos factores estimulantes que tienen una influencia directa sobre el comportamiento celular, lo que hace que un recubrimiento, tratamiento y/o modificación superficial, que posteriormente estará en contacto con un tejido óseo, genere las señales necesarias para propiciar la fijación y reparación ósea. Reduciendo uno de los problemas presentes con el uso de implantes metálicos, la liberación de iones metálicos, que pueden generar alergias y carcinogénesis [9][10], permitiendo también con todo esto un proceso menos complicado y más exitoso en el retiro de aquellos implantes que no son definitivos ni reabsorbibles.

El grafeno es un nanomaterial 2D que presenta muy buenas propiedades eléctricas, electrónicas, químicas, térmicas y mecánicas, que hacen de éste un material de amplio

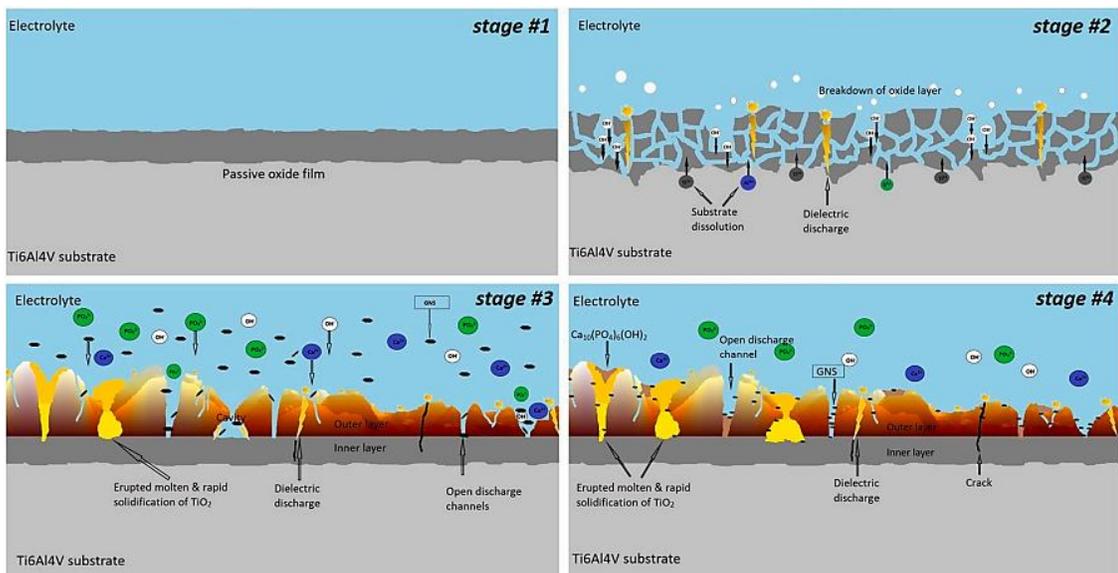
estudio en todas las industrias. En biomedicina por ejemplo, se continúa estudiando la efectividad de este material en el tratamiento de patologías como el cáncer, con en el desarrollo de biosensores que permitan monitorear el estado de las células y el tratamiento selectivo de las mismas. También se ha convertido en un candidato potencial para el desarrollo de implantes neuronales y materiales para aplicaciones biomédicas, gracias a las propiedades antimicrobianas, de biocompatibilidad, y baja toxicidad que presenta [6]. Adicionalmente, el grafeno es un material 2D que presenta resistencia a la corrosión y es de fácil biofuncionalización. Está siendo evaluado como material de recubrimiento y modificación superficial. Algunos estudios demuestran que la combinación de grafeno con partículas de plata, las cuales destaca por sus propiedades antimicrobianas, de biocompatibilidad y baja toxicidad, reducen la citotoxicidad de implantes en tejidos óseos y blandos. Permitiendo en recubrimientos de aleaciones de titanio obtener mayor biocompatibilidad tisular y funcionalidad del material, promoviendo así, efectos positivos sobre la diferenciación y potencial osteogénico [10][12].

Otro material de interés es el dióxido de silicio o sílice (como se le conoce comúnmente), éste es un material ampliamente utilizado en la industria farmacéutica como agente aglomerante, adsorbente y deslizante en el desarrollo de tabletas. Generalmente es biológicamente inerte, está aprobado por la *FDA* (U.S. Food and Drug Administration), y expone propiedades de regeneración y factores antioxidantes. De acuerdo a la estructura y composición química, proporciona a los materiales comportamientos bioactivos, que permiten una adecuada incorporación en los tejidos vivos. Es además, un material que se sigue estudiando e investigando para aplicaciones biomédicas, en diversas estructuras y aplicaciones, como esferas de sílice amorfo, en nanoesferas, como biovidrio, sílice mesoporo, agente bioactivo, entre otros [13].

Los tratamientos superficiales y la síntesis de recubrimientos tendrán un determinado efecto, de acuerdo a la técnica utilizada y a la naturaleza de los electrolitos y/o elementos, partículas o iones que se empleen para tal fin. La oxidación por plasma electroquímico (PEO) u oxidación por micro-arco (MAO), es un método de síntesis de recubrimiento que utiliza altos voltajes y presiones. Este proceso se desarrolla en CC a pulso continuo, pasando luego a corriente alterna (CA), etapa que genera la característica chispa o micro arco que se produce sobre la superficie del material tratado. De esta manera se deposita, por la reacción electrolítica ocasionada con el soluto empleado, las diferentes partículas y/o iones de interés sobre el sustrato. Partiendo de la película de óxido aislante que se

genera en el material, se promueve un proceso de ruptura, ocasionado en las zonas más débiles cuando se alcanza el valor crítico de la intensidad del campo eléctrico, formándose el micro arco por la ruptura dieléctrica, tal como puede observarse en la Figura 1-5. De esta manera se logran fenómenos como fusiones localizadas del material, difusiones térmicas, reacciones químicas, termoquímicas de plasma, deposiciones y migraciones de partículas coloidales, entre otros; factores que hacen de esta técnica, un tratamiento superficial de creciente uso, por las diferentes estructuras y composiciones que se logran obtener. PEO se diferencia del proceso de anodizado convencional, ya que en este último se utiliza electrólisis de corriente continua (CC) con valores de voltaje de 20 a 80 V aproximadamente, densidades de corriente de 1 a 10 A/dm² y procesos controlados que utilizan voltajes de celda constante [19-20].

Figura 1-5: Esquema de tratamiento con oxidación por plasma electrolítico en una superficie de Ti6Al4V [20].



1.2 Estado del arte.

Algunos estudios demuestran que el uso de recubrimientos de grafeno, sobre aleaciones de Ti6Al4V y acero inoxidable 316L, materiales ampliamente utilizados en reparación de fracturas, como las de fémur, mejora comparablemente el rendimiento mecánico. Obteniendo de esta manera materiales implantables más duraderos y estables, con factores de tensión y desplazamiento mejorados [16].

Algunas investigaciones han utilizado SiO₂ para recubrir sustratos metálicos, teniendo como resultado, espesores, rugosidades y porosidades mayores, favoreciendo con ello la bioactividad de la superficie. En algunos casos, estos factores estructurales favorecen la síntesis de recubrimientos más estables, promoviendo y mejorando la proliferación y diferenciación celular, exponiendo así un comportamiento más biocompatible. Ensayos clínicos demuestran que este material fomenta una buena unión celular de células similares a osteoblastos, en los que se evidencia, que la microestructura tiene una influencia directa en la cantidad de células que se adhieren, validando también, que la presencia de SiO₂, influye en la diferenciación celular [17].

Por su parte, las aplicaciones de TiO₂ son bastantes amplias, especialmente en el campo biomédico. A nivel de interacción celular, el TiO₂ favorece la osteointegración de implantes, y como tal la interacción de los osteoblastos con biomateriales como el titanio y sus aleaciones. Al generar capas de TiO₂ sobre implantes óseos, por ejemplo de tipo amorfo, se promueve la osteointegración, factor que desencadena una serie de reacciones entre la superficie y el entorno fisiológico, produciendo capas de hidroxiapatita amorfa, que termina propiciando, la formación de tejido óseo, elementos que pueden mejorar la interacción del recubrimiento biocerámico y la capacidad bioactiva del mismo [29].

Estudios recientes abordan las propiedades superficiales obtenidas con la funcionalización de grafeno y la obtención de recubrimientos híbridos de TiO₂/nHA sobre aleaciones de Ti6Al7Nb, por métodos como la oxidación por plasma electrolítico (PEO), exponiendo que este tipo de recubrimientos proporcionan a los materiales metálicos como las aleaciones de titanio, propiedades de resistencia a la corrosión in vitro mejoradas. Obteniendo además, por la naturaleza de la técnica de recubrimiento empleada, factores microestructurales convenientes para la interacción celular, mayores durezas, tamaño de poro variado y espesores que mejoran la bioactividad del material [18]. De igual manera, y

continuando con la línea de investigación anterior, investigadores de las universidades Firat y Ataturk (Turkia) evaluaron el recubrimiento de nanohidroxiapatita reforzado con grafeno sobre Ti6Al4V, elaborado por el método PEO con corriente AC, empleando diferentes frecuencias de deposición, con lo que se logró obtener mejores propiedades morfológicas y cristalográficas de la superficie tratada. Asimismo, en esta investigación validaron la sensibilidad a la corrosión por medio técnicas electroquímicas, realizando pruebas de barrido potenciodinámico (PDS) en condiciones in vitro - en fluido corporal simulado (SBF). Complementando el análisis con métodos de caracterización química, espectroscópica y de imagen, que permitieron confirmar la obtención de recubrimientos de diferentes espesores, de acuerdo con la cantidad de grafeno utilizado (a medida que se aumentaba la concentración de grafeno utilizado, aumentaba el espesor y dureza del recubrimiento), los cuales presentaron comportamientos bioactivos y aumentada resistencia a la corrosión [19].

Partiendo de la importancia de las superficies de los implantes y las ventajas que representan el desarrollo de recubrimientos inteligentes con capacidad de actividad biológica, biocompatibilidad y promoción de la osteogénesis, los recubrimientos con contenido de fosfatos y silicatos se han convertido en referentes. Estos para el diseño de soluciones electrolíticas que posteriormente se emplearán como iones de recubrimiento, dado que se tiene como base e inspiración biomimética los componentes inorgánicos del tejido óseo y el papel que juegan en la reparación y regeneración del hueso. Algunas investigaciones demuestran que los recubrimientos a base de fosfatos de calcio y silicato de calcio promueven una buena actividad biológica, biocompatibilidad e interacción celular [17]. Recubrimientos que promueven la generación de hidroxiapatita mejoran la adhesión y proliferación de células madre mesenquimales y la osteo y angiogénesis in vitro e in vivo. Tal como se evidenció en trabajos realizados por Li et al, en recubrimientos realizados con ácido alcalino y tratamiento térmico superficial. En trabajos previos también se evidenciaron que los revestimientos de silicato dicálcico sobre superficies de Ti6Al4V promueve la deposición de apatitas y con ello el crecimiento celular. Wang et al. a través de sus investigaciones se dio cuenta que los recubrimientos de silicato de calcio sintetizados por medio de pulverización de plasma atmosférico y métodos hidrotermales, aumentaron la capacidad de mineralización de apatita, mejorando así la biocompatibilidad y bioactividad del implante metálico, validando con ello la actividad de la fosfatasa alcalina y la expresión de genes osteogénicos y angiogénicos [22]. Investigaciones en las que

utilizaron el método MAO y soluciones electrolíticas enriquecidas con fosfato, silicato de calcio y estroncio para sintetizar recubrimientos sobre titanio, expusieron resultados muy prometedores, en los que se evidenció propiedades topográficas y químicas que mejoran la adhesión, proliferación y diferenciación celular. Validando que la combinación de silicato de calcio y estroncio prometen ser una excelente alternativa para implantes utilizados en ortopedia y aplicaciones dentales, dada la capacidad de osteogénesis que obtuvieron [22].

La osteointegración de las células al recubrimiento está directamente influenciada por la naturaleza del recubrimiento utilizado, por lo tanto, cerámicos de características bioabsorbibles, como los fosfatos cálcicos, promueven el crecimiento de tejido óseo, permitiendo tener un proceso de osteointegración más rápido. Además, un factor muy relevante en biomateriales, la biocompatibilidad, mejora con este tipo de recubrimientos, dada la afinidad o analogía que encuentran las células en éstos, por la similitud que puede generarse con la estructura y/o composición del mineral del hueso [30].

Los recubrimientos ricos en fosfatos cálcicos representan un material, que, como uno de los principales componentes inorgánicos del tejido óseo, promueve la osteointegración y la osteoinducción, mejorando con ello el crecimiento de células osteoblásticas formadoras de hueso [31]. En este proyecto también se incorporó silicato de calcio, de manera que, en conjunto con los elementos ricos en fosfatos cálcicos, se pudiese obtener una solución madre que propiciase la síntesis de un recubrimiento biocerámico, con características bioactivas. El silicato de calcio tiene una participación similar al del fósforo, respecto a la formación de hueso, exponiendo propiedades de regulación de genes que controlan la osteogénesis. Algunos estudios de recubrimientos elaborados con silicato de calcio muestran la capacidad de estos materiales para impulsar la mineralización de apatita, mejorando con ello la biocompatibilidad, bioactividad y resistencia a la corrosión de los biomateriales implantables [31].

1.3 Metodología.

1.3.1 Materiales y equipos

Se describe a continuación los diferentes reactivos, materiales y equipos utilizados en los procesos de tratamiento superficial y síntesis de recubrimiento con en el método *PEO* (oxidación por plasma electrolítico): ácido ortofosfórico (H_3PO_4) al 85% de Panreac Applichem, acetato de calcio x-hidrato puro ($\text{Ca}(\text{H}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, M:158.17 g/mol de Panreac Applichem, EDTA sal disódica dihidratada ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), M: 372.24 g/mol de Panreac Applichem, calcio bis(di-hidrogeno fosfato) monohidratado ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, M: 252.07 g/mol de Sharlau, silicato de calcio puro (CaSiO_3), M: 116.16 g/mol de Riedel-de-Hâen, agregado de nanoplaquetas de grafeno (submicronanopartículas) de Alfa Aesar (concentración de referencia, 0.2 mg/ml). Para el proceso de oxidación por plasma electrolítico se empleó una fuente KIKUSUI PAS500-1.8, para los tratamientos térmicos se utilizó una mufla multipropósito Terrígeno, y para la etapa de tratamiento de plasma por descarga intensa de gas ionizante, se utilizó un recubridor Quorum, por el método *Glow Discharge -Ve* (catódico).

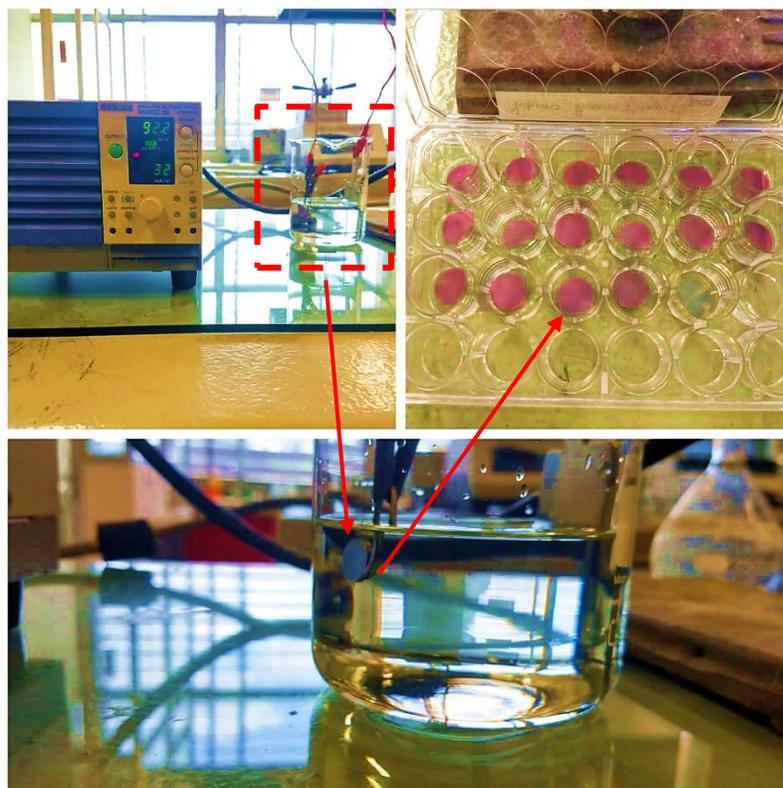
1.3.2 Preparación de las superficies de las muestras.

Se utilizaron 51 discos de Ti6Al4V de 6 mm de diámetro y 2 mm de espesor. Antes de la síntesis del recubrimiento, se preparó la superficie, mediante un proceso de pulido y decapado de óxidos inestables, empleando lijas de # 400 hasta 2000, validando la calidad de la superficie pulida por medio de un estereomicroscopio. Finalizado el proceso de pulido, los discos se colocaron por 5 minutos en un baño ultrasónico con alcohol isopropílico, posterior a esto se dio paso el proceso de decapado, en el que se empleó una solución de ácido fluorhídrico a 20 g/L con ácido nítrico a 160 g/L, dejando los discos por 30 segundos, luego se lavaron con agua destilada y se dejaron nuevamente en el baño ultrasónico por 5 minutos, finalizando con el secado de las muestras en una estufa a 40°C por 30 minutos, para dar paso a la etapa de anodizado.

1.3.3 Anodizado de los discos de Ti6Al4V.

El proceso de anodizado permite generar capas de óxido de forma controlada, que protege la superficie del sustrato. En este proyecto con el objetivo de propiciar el crecimiento de óxidos preferenciales de titanio sobre la superficie de los discos, se realizó un proceso de anodizado electrolítico por medio del método de corriente continua, utilizando una fuente marca KIKUSUI PAS500-1.8, programada con una corriente de 32 mA, alcanzando un voltaje patrón de 145 V, en un tiempo de 2 minutos, en una solución de ácido ortofosfórico de concentración 0.5 M [61]. En la Figura 1-6 se observa el montaje electrolítico empleado y el estado de las muestras al final del proceso.

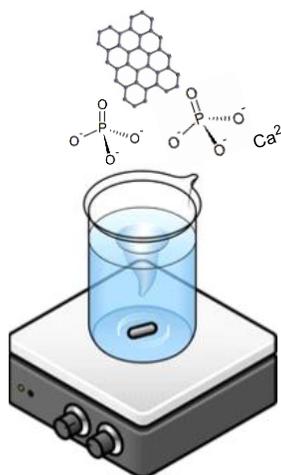
Figura 1-6: Imágenes del proceso de anodizado.



1.3.4 Síntesis del recubrimiento G-CaO-P₂O₅-SiO₂-TiO₂ sobre Ti6Al4V y postratamiento térmico.

Para este proceso se elaboró en principio 4 soluciones electrolíticas, con las cuales se evaluaron diferentes concentraciones de grafeno, teniendo las siguientes formulaciones de acuerdo a la Figura 1-7 a continuación:

Figura 1-7: Concentraciones de las soluciones electrolíticas preparadas para el proceso de oxidación por plasma electrolítico.



Soluciones electrolíticas

Solución 1 (solución madre):

- * 6.3 g/L Ca(H₂PO₄)₂*H₂O
- * 12.7 g/L Ca(H₃COO)₂*H₂O
- * 44,67 g/L C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈*2H₂O
- * 5 g/L CaSiO₃

Solución 2 (0.3% de grafeno (G)):

- * Solución madre + 3 g/L G

Solución 3 (con 0.6% de grafeno (G)):

- * Solución madre + 6 g/L G

Solución 4 (con 0.9% de grafeno (G)):

- * Solución madre + 9 g/L G

Para la definición de los parámetros de síntesis del recubrimiento, se realizó en principio un control galvanostático con el que se definieron los ítems de programación del equipo. De esta manera, para la síntesis del recubrimiento biocerámico, se utilizó una fuente KIKUSUI PAS500-1.8, programada con una corriente fija de 210 mA y un voltaje de hasta 500V, por un tiempo de 3 minutos. Para el montaje del sistema electrolítico se utilizó como cátodo una placa de acero inoxidable 316L, como ánodo los discos de Ti6Al4V sujetos

por un gancho del mismo material. Para este proceso se empleó también, una plancha de agitación con calentamiento, con agitación constante de las soluciones electrolíticas, y a una temperatura entre 37 y 38 °C. Como ya se había mencionado, se prepararon inicialmente 4 soluciones electrolíticas, con una variación específica en la concentración de nanopartículas de grafeno. A continuación, en la Tabla 1-1, se relaciona la nomenclatura asignada para cada una de las muestras:

Tabla 1-1: Denominaciones de las muestras, de acuerdo a la solución electrolítica utilizada.

<i>Muestra</i>	<i>Solución 1</i>	<i>Solución 2</i>	<i>Solución 3</i>	<i>Solución 4</i>
<i>Nomenclatura</i>	1	2	3	4

Para la etapa de tratamiento térmico se utilizó una mufla multipropósito Terrígeno, con conexión trifilar a 220V, temperatura máxima de 1200 °C, y un sistema de resistencias tipo espiral, que permite tener una radiación adecuada y homogénea en la cámara interna. Se evaluaron 2 temperaturas, 400°C y 600°C, con el objetivo de evaluar la capacidad de estructuración biocerámica, el aumento de cristalinidad y la capacidad de anclaje microestructural entre la capa de TiO₂ y el sustrato. Paralelamente, se evaluó el efecto de la temperatura sobre las nanopartículas de grafeno, la relación Ca/P, y el comportamiento electroquímico.

1.3.5 Equipos de caracterización utilizados, para el análisis topográfico, elemental y de propiedades de mojabilidad.

La caracterización realizada por difracción de rayos X (DRX), se llevó a cabo con el difractómetro Empyrean, PANalytical, con radiación K α de cobre, a un voltaje de 40 Kv, con un rango de medición de 10° a 80° 2 θ , utilizando un muestreo a pasos de 0,026° en

un tiempo de 53 s, y para el análisis de los difractogramas obtenidos, se empleó el software X'Pert HighScore– PANalytical.

Con el objetivo de evaluar la mojabilidad y con ello la energía superficial de los recubrimientos obtenidos, se empleó el equipo Model 200, Ramé-hart, utilizando agua como sustancia líquida polar, cuyo software operó adquiriendo automáticamente 40 mediciones por muestra, en un tiempo de 0.25 s por adquisición. Posteriormente se realizó el análisis y obtención de datos, mediante el software DROPimage Standard.

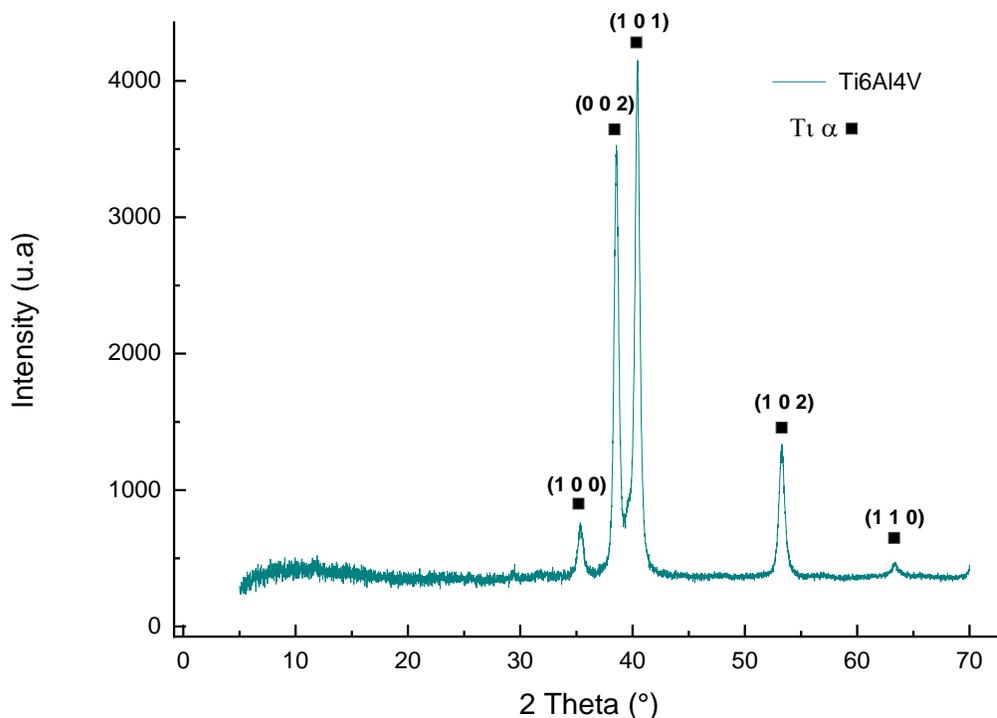
El equipo con el que se obtuvieron las diferentes micrografías de este proyecto, los análisis por EDS y el mapeo elemental (resultados analizados en el capítulo 2), fue un microscopio electrónico de barrido JEOL-JSM 5910LV, con un voltaje de 15Kv y una distancia de trabajo de 10 mm (en algunas muestras 9mm).

1.4 Resultados y conclusiones

1.4.1 Difracción de rayos X (DRX)

La difracción de rayos X permitió validar la estructura del sustrato Ti6Al4V, como se muestra en la Figura 1-8, y la composición del recubrimiento y la identificación de especies cristalinas expuestas por los recubrimientos sintetizados con la solución madre, con y sin tratamientos térmicos; teniendo como resultados preliminares los difractogramas de la Figura 1-9, en los que se observa los espectros obtenidos para las muestras 1_SIN_TT, 1_400_TT y 1_600_TT.

Figura 1-8: Difracción de rayos X (DRX) del sustrato Ti6Al4V.

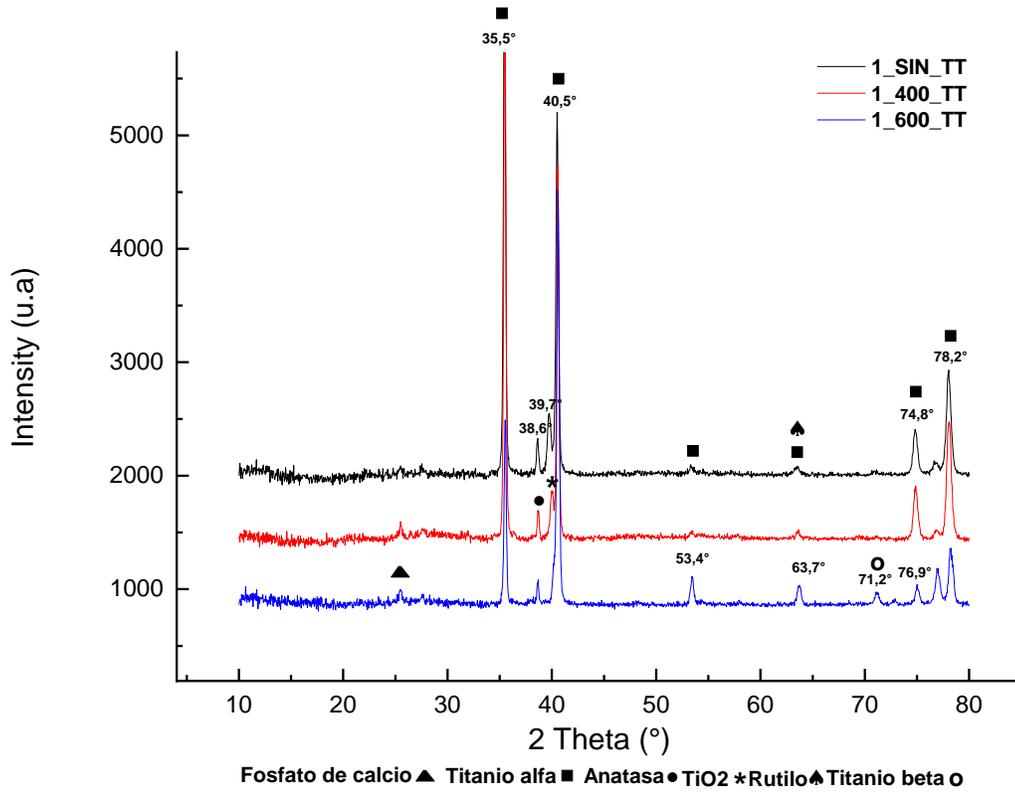


La caracterización por difracción de rayos X permitió inicialmente, validar de forma semicuantitativa el % de cada uno de los compuestos que conforman la aleación de titanio. Los picos de difracción se asocian principalmente a una aleación de titanio alfa con estructura hexagonal compacta [23-24], teniendo así un 47% de aluminio titanio, 20% de vanadio aluminio y 33% de titanio alfa, como puede observarse en la Tabla 1-1 a continuación:

Tabla 1-2: Datos composicionales del análisis de difracción del sustrato Ti6Al4V.

Componente	Fórmula química	% Semicuantitativo
Aluminio Titanio (0.3/1.7)	$Al_{0.3} Ti_{1.7}$	47
Vanadio Aluminio (1/3)	$Al_3 V_1$	20
Titanio Alfa	Ti_1	33

Figura 1-9: DRX los recubrimientos 1_SIN_TT (recubrimiento sin grafeno y sin tratamiento térmico), 1_400_TT (recubrimiento sin grafeno y con tratamiento térmico a 400°C), y 1_600_TT (recubrimiento sin grafeno y con tratamiento térmico a 600°C).



De acuerdo con la identificación y el análisis de los picos obtenidos, el software X'Pert HighScore– PANalytical del equipo de difracción de rayos X, determinó que la muestra 1_600_TT se compone de óxido de titanio (Ti_2O_1), titanio en fase anatasa (Ti_1O_2), óxido de silicio amorfo (Si_1O_2) y óxido de titanio en fase rutilo (Ti_1O_2). En la muestra 1_400_TT, el pico que mejor se identificó fue el aluminio titanio ($Al_{0.3}Ti_{1.7}$). Finalmente, en 1_SIN_TT, el listado de picos confirma la presencia de titanio alfa (Ti_1), fosfato de aluminio ($Al_1O_4P_1$), óxido de titanio en fase rutilo (Ti_1O_2), y aluminato de calcio ($Al_2Ca_2O_5$).

Métodos de síntesis de recubrimientos como la oxidación por plasma electrolítico, dado los fenómenos de difusión térmica y termoquímica de plasma, en conjunto con los componentes del electrolito utilizado, viabiliza la cristalización de los compuestos de TiO_2 en anatasa y rutilo, dada la interacción que se obtiene con los iones calcio, fósforo y silicio

de la solución madre y las altas temperaturas que se promueven en esta reacción. Algunos estudios exponen patrones de difracción de recubrimientos con una composición elemental de Ti, Si y O, en los que se observa una matriz de Ti, rutilo, y una pequeña cantidad de anatasa, siendo mayor la energía de enlace del rutilo. Cuando se realizan tratamientos térmicos a más de 700°C, la fase anatasa va transformándose en rutilo, factor que provee al recubrimiento mayor resistencia al desgaste [25].

Los resultados obtenidos con el software validan la formación de titanio (TiO_2) en fase rutilo y anatasa principalmente. Como puede observarse en la Figura 1-9, los picos que se observan solapan un poco la formación de rutilo, transformación de fase que se da mejor a temperaturas mayores de las utilizadas. La baja resolución de este pico puede confundirse con la identificación de titanio, sin embargo, se expone una mayor resolución en la muestra 1_600_TT. Es importante recordar que uno de los primeros pasos para la síntesis del recubrimiento fue la preparación de la superficie, que incluye la generación de óxidos de titanio, por medio del proceso de anodizado. Otro factor influyente fue el tratamiento térmico realizado a 400°C y a 600°C, posterior a la obtención del recubrimiento biocerámico, tratamiento que favorece la transformación de los óxidos de titanio en fase anatasa especialmente. En todas las muestras se expone la presencia de titanio α y algunos picos varían su altura para cada uno de los elementos, especialmente en la muestra 1_600_TT. En ésta, varía la altura para algunos de los picos de titanio α (36,6°, 53,4°, 63,7°), exhibiendo más claramente el pico de titanio β , solapando un poco el pico de TiO_2 . Dado los tratamientos térmicos, la fase de rutilo no aparece muy claramente, ya que éste aumenta su intensidad con tratamientos térmicos de 650 a 850°C, siendo mayor la transformación de fase a 850°C, logrando estructuras completas de rutilo en la superficie del material [23].

Los espectros de la Figura 1-9, exponen más información del sustrato y de la formación de los óxidos preferenciales de titanio, dada la naturaleza del electrolito ortofosfato utilizado en el proceso de anodizado, el cual tiene como componente cristalino principal la anatasa [26]. Por su parte, mediante el software X'Pert HighScore se evidenciaron algunos compuestos del recubrimiento biocerámico, como Si_1O_2 , $\text{Al}_1\text{P}_1\text{O}_4$, $\text{Al}_2\text{Ca}_2\text{O}_5$, exponiendo así, la adecuada integración del recubrimiento a la superficie del sustrato pretratado. Esta integración se presenta más claramente en las muestras tratadas a 600°C, logrando estructurar mejor la formación de un recubrimiento biocerámico rico en fosfatos cálcicos,

con el cual se pretendió obtener un recubrimiento con mayores características de biocompatibilidad y bioactividad.

En los capítulos siguientes se podrá corroborar la composición del recubrimiento con la información obtenida por espectroscopia de rayos X de dispersión de energía (EDS), en conjunto con el espesor promedio y la topografía obtenida, resultados que continuarán interpretándose en los siguientes capítulos.

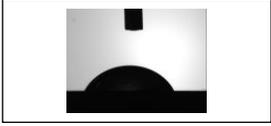
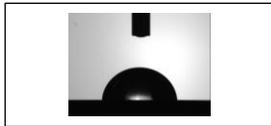
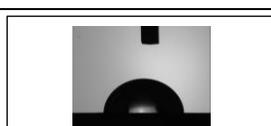
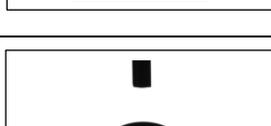
Dado los resultados preliminares, y como se podrá observar en los siguientes resultados, se decidió trabajar y/o dar prioridad a la temperatura de 600°C, y evaluar una nueva concentración de grafeno, 0.1% G, denominando esta muestra, muestra 5. Evaluando de esta manera, la misma solución madre, a diferentes concentraciones de grafeno y especialmente al rango de temperatura enfatizado.

1.4.2 Ángulo de contacto.

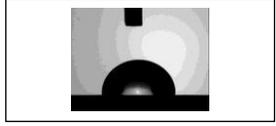
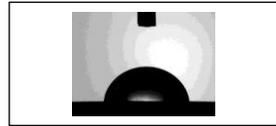
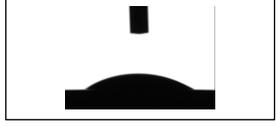
La técnica de caracterización de ángulo de contacto por gota sésil permitió evaluar los parámetros de mojabilidad y energía superficial, aspectos que dan razón de cómo se da esa relación y/o interacción entre la superficie del recubrimiento y el líquido evaluado. De esta manera se observa la forma que se genera al dejar caer la gota sobre la superficie, cuya forma dependerá de la tensión superficial del líquido, en este caso agua destilada, y de la naturaleza de la superficie. Ángulos que estén entre 0 y 90°, indican que la superficie es hidrófila, pero si está entre 90 y 150°, indica que la superficie es hidrófoba, y resultados mayores a 150°, son considerados super-hidrófobos, característica conocida generalmente como efecto loto o efecto repelente del agua que poseen algunas superficies [48].

En la Tabla 1-3, se puede observar las imágenes y resultados obtenidos de las mediciones de ángulo de contacto y energía superficial promedio de las muestras analizadas.

Tabla 1-3: Ángulos de contacto y energía superficial de los recubrimientos obtenidos con y sin grafeno, y de los tratamientos realizados a 400 y 600°C.

Muestra	Ángulo de contacto (°)	Energía superficial (mJ/m²)	Imágenes representativas
1_SIN_TT	65.08 ± 0.74	44.73 ± 0.45	
1_400_TT	93.93 ± 0.54	26.78 ± 0.34	
1_600_TT	93.08 ± 0.56	27.93 ± 0.34	
2_SIN_TT	54.20 ± 0.50	51.22 ± 0.30	
2_400_TT	75.24 ± 0.46	38.40 ± 0.28	
2_600_TT	62.93 ± 0.60	46.06 ± 0.36	
3_SIN_TT	62.77 ± 0.58	46.14 ± 0.51	
3_400_TT	71.4 ± 0.85	40.83 ± 0.61	
3_600_TT	63.50 ± 0.71	45.69 ± 0.55	
4_SIN_TT	56.03 ± 0.79	50.21 ± 0.63	

Continuación: Tabla 1-3

4_400_TT	94.79 ± 0.12	26.25 ± 0.08	
4_600_TT	$87,73 \pm 0.75$	30.65 ± 0.46	
5_SIN_TT	35.85 ± 0.18	61.57 ± 0.09	
5_600_TT	60.25 ± 0.30	47.49 ± 0.18	

Medir la mojabilidad de los recubrimientos permitió validar la energía de superficie obtenida, en conjunto con las propiedades de humectabilidad, factores muy importantes en los procesos de adsorción de proteínas y adhesión celular [27].

Teniendo presente que no se habla de un rango único de trabajo o de un dato específico de energía superficial, en el que en un contexto de osteointegración, las células sembradas sobre estas superficies pueden o no proliferar y generar matriz extracelular, los factores a evaluar son muy variables, y dependerán también de las características elementales y topográficas. Así, se parte del objetivo de evaluar superficies que manifiesten un comportamiento equilibrado de propiedades de humectabilidad, especialmente de energía superficial, en el que se promueva un entorno apropiado para las células. De esta manera, se comprende que es más que definir si una superficie es o no hidrófoba. Energías de superficie, por ejemplo, de 21 mJ/m^2 , asociadas a un comportamiento hidrófobo, genera muerte celular por la poca promoción en la adhesión celular y adsorción de proteínas. Sin embargo, una superficie completamente hidrofílica, en los que se obtienen energías superficiales críticas de aproximadamente 75 mJ/m^2 , tienden a suprimir el crecimiento y la proliferación celular. Por esto, se busca obtener energías superficiales moderadas de 65 a 70 mJ/m^2 , rango que da lugar a condiciones favorables para una adecuada interacción célula-recubrimiento [28].

Como puede observarse en la Tabla 1-3, los tratamientos térmicos tienden a aumentar el ángulo de contacto, por ende, a reducir la energía superficial (E_s), siendo mayor este comportamiento a 400°C. Permitiendo pensar en el efecto que genera el tratamiento térmico a 600°C, el cual expone una relación de aumento de hidrofobicidad superficial menor que a 400°C, especialmente en las muestras con grafeno. Esto puede relacionarse con la interacción y el efecto de esta temperatura sobre los recubrimientos biocerámicos, las transformaciones de fase que se promueven, y el influjo sobre las nanopartículas de grafeno. Teniendo presente además, el proceso mismo de oxidación por plasma que se utilizó para la síntesis del recubrimiento, el cual proporciona factores químicos y estructurales en la funcionalización del grafeno [49].

La muestra 1, recubrimiento biocerámico sin grafeno, sólo con la solución madre, expone un aumento de la hidrofobicidad con los tratamientos térmicos, comportamiento muy equivalente entre 400 y 600°C. Para las demás muestras, la disminución de la energía superficial (E_s) fue menor en la muestra tratada a 600°C, característica asociada a la estructuración biocerámica promovida con esta temperatura, lo que le confiere un mayor carácter iónico, aumento de la energía de enlace, y disminución del desorden estructural. Los tratamientos térmicos afectan significativamente la cristalinidad, el tamaño de cristal y la morfología del material biocerámico, promoviendo cambios en sus propiedades, los cuales pueden optimizar el comportamiento biológico en aplicaciones biomédicas y la capacidad de unión a tejidos óseos [50]. Para la muestra 2, se tiene un comportamiento similar, de aumento del ángulo de contacto ocasionado por los tratamientos térmicos, siendo un poco mayor esta reacción a 400°C, lo mismo pasa con las muestras 3 y 4. Este fenómeno puede estar relacionado con el efecto estructurador del tratamiento térmico y por la presencia del grafeno y el efecto de funcionalización promovido en éste por el método de síntesis de oxidación por plasma electrolítico, el cual incrementa la capacidad de anclaje e interacción de las nanopartículas con los componentes biocerámicos del recubrimiento [49]. La muestra 5 con 0.1% de grafeno y con tratamiento térmico a 600°C, presentó un incremento en el ángulo de contacto y disminución de la E_s , observando en ésta, que la energía superficial obtenida sin TT (sin tratamiento térmico), expone valores muy cercanos a los rangos de E_s que se mencionaron anteriormente [28].

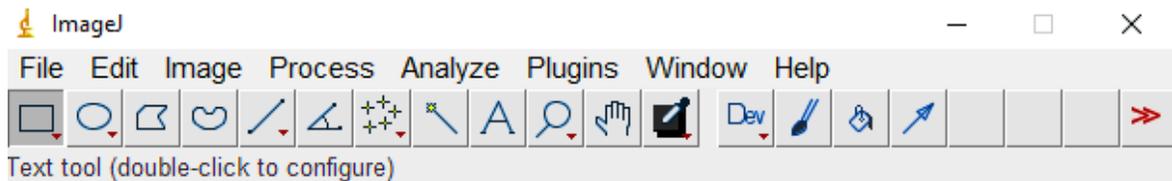
En el capítulo 3 se presenta el efecto del tratamiento por plasma de descarga intensa de gas ionizante, el cual permitió generar de manera controlada, cambios sobre las propiedades de humectabilidad de la superficie del recubrimiento, producto de la

modificación en la orientación electrónica dipolar del material, encontrando que, la técnica que mejores resultados generó sobre la reducción del ángulo de contacto fue el método Glow Discharge -Ve (catódico), como contraparte, el método Glow Discharge +Ve (anódico), generó un incremento considerable del ángulo de contacto, con una disminución de la energía superficial. Finalmente, para los propósitos de esta investigación, se empleó el método catódico -Ve (Glow Discharge -Ve).

1.4.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM-EDS)-medida de espesores.

Se validó el espesor promedio de los recubrimientos a través del análisis de las micrografías SEM de 4 muestras: 1_SIN_TT (sin grafeno ni tratamiento térmico), 2_SIN_TT (con 0.3% de grafeno y sin tratamiento térmico), 3_SIN_TT (con 0.6% de grafeno y sin tratamiento térmico) y 3_600_TT (con 0.6% de grafeno y tratamiento térmico a 600°C), Figura 1-11, Figura 1-12, Figura 1-14, Figura 1-13. Estas muestras fueron seleccionadas estratégicamente por la variación en el % de grafeno y el tratamiento térmico seleccionado y optimizado para el análisis de las demás muestras. El análisis se realizó con el software libre ImageJ, Figura 1-10, tomando en cada micrografía 6 puntos diferentes para obtener posteriormente el promedio del espesor.

Figura 1-10: Software de tratamiento y análisis de imagen, para el estudio de las micrografías SEM.

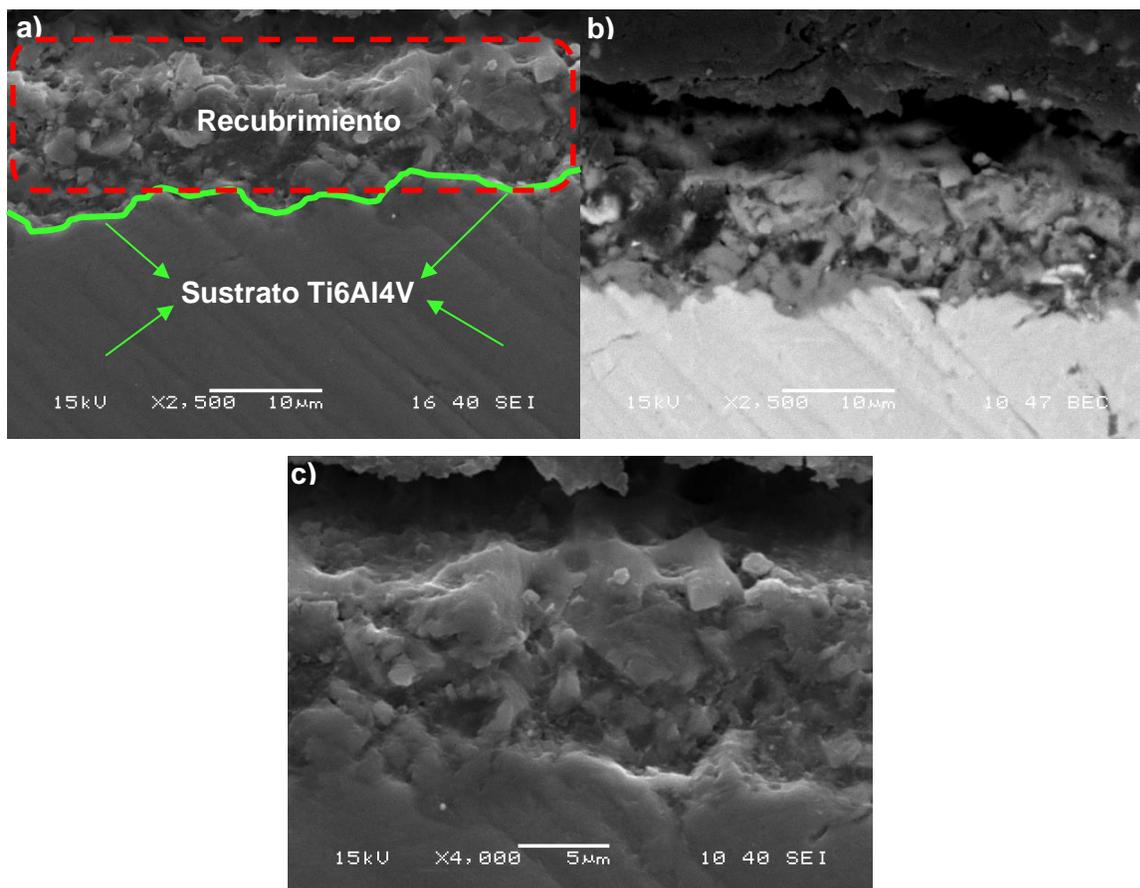


El análisis se realizó con las imágenes obtenidas por electrones retrodispersados, las cuales permitieron observar con mayor claridad el cambio de fases, distinguiendo así, la transición entre el sustrato y el recubrimiento. Para obtener medidas más precisas con el software ImageJ, luego del proceso de calibración de la imagen con la escala propia de la

micrografía obtenida (10 μ m), se generó un ajuste de límites de colores GB (verde y azul), para diferenciar mejor el espesor del recubrimiento, exponiendo un color verde en la zona del sustrato Ti6Al4V, y un tono azul que separa principalmente el recubrimiento de la resina de la baquelita o del espacio generado en el proceso de embaquelamiento.

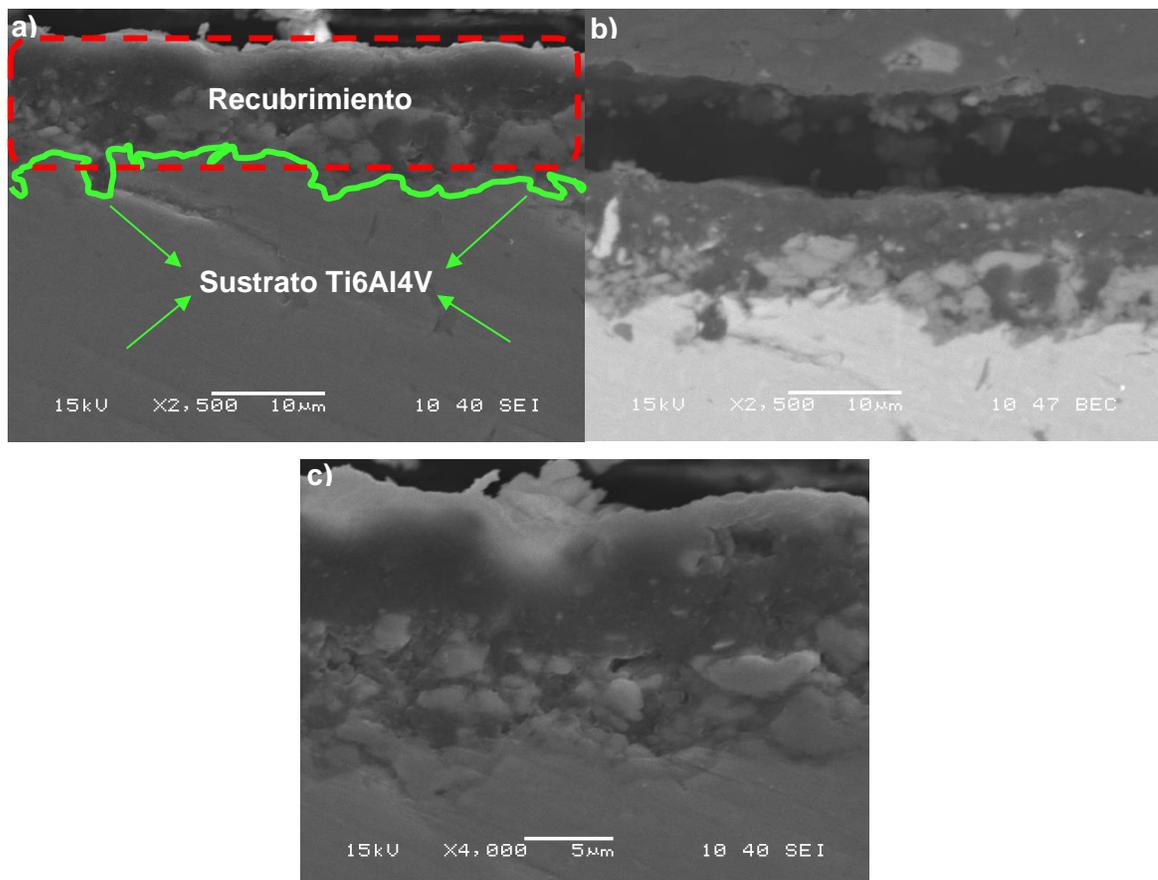
A continuación, se expone la Figura 1-11 correspondiente a las micrografías tomadas del corte transversal de la muestra 1, que hace referencia al recubrimiento obtenido con la solución madre, sin grafeno, y en este caso sin tratamiento térmico.

Figura 1-11: Micrografías SEM, corte transversal, de la muestra 1_SIN_TT, a) imagen por electrones secundarios con 2500 aumentos, b) imagen por electrones retrodispersados, con 2500 aumentos, c) imagen por electrones secundarios con 4000 aumentos.



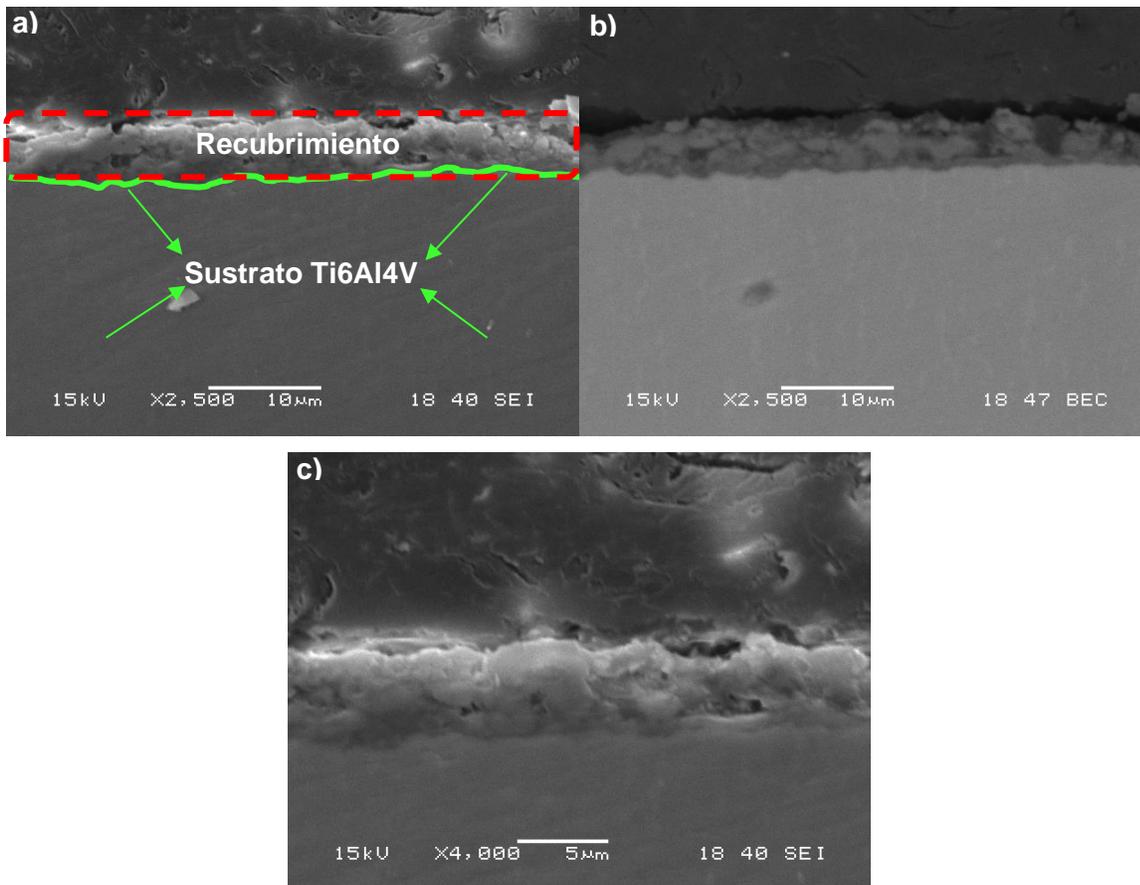
A continuación, se expone la Figura 1-12 correspondiente a las micrografías tomadas del corte transversal de la muestra 2, que hace referencia al recubrimiento obtenido con la solución madre, más 0.3% de grafeno, y en este caso sin tratamiento térmico.

Figura 1-12: Micrografías SEM, corte transversal, de la muestra 2_SIN_TT, a) imagen por electrones secundarios con 2500 aumentos, b) imagen por electrones retrodispersados, con 2500 aumentos, c) imagen por electrones secundarios con 4000 aumentos.



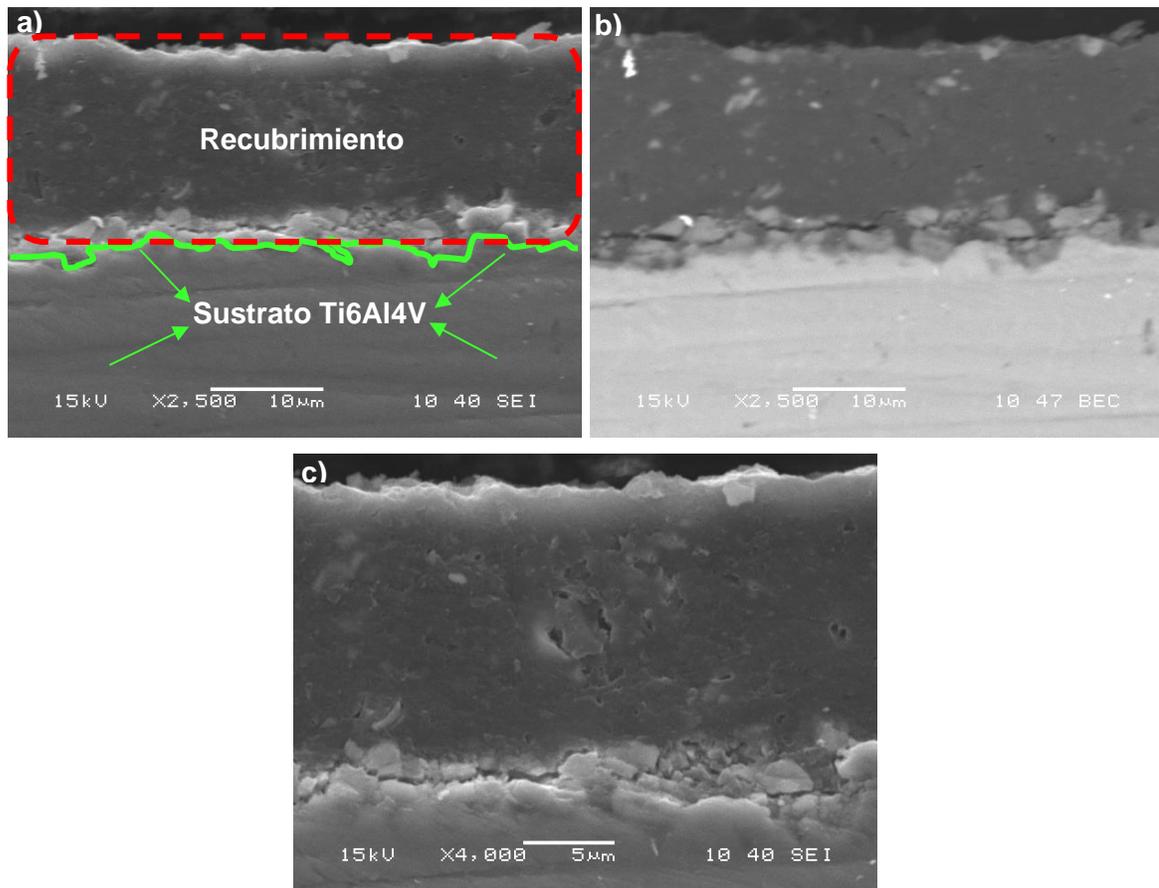
A continuación, se expone la Figura 1-133 correspondiente a las micrografías tomadas del corte transversal de la muestra 3, que hace referencia al recubrimiento obtenido con la solución madre, más 0.6% de grafeno, y en este caso sin tratamiento térmico.

Figura 1-133: Micrográficas SEM, corte transversal, de la muestra 3_SIN_TT, a) imagen por electrones secundarios con 2500 aumentos, b) imagen por electrones retrodispersados, con 2500 aumentos, c) imagen por electrones secundarios con 4000 aumentos.



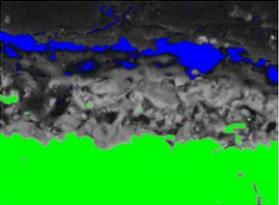
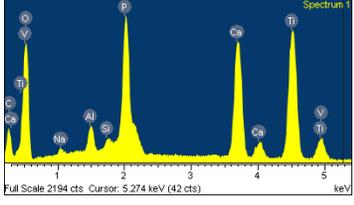
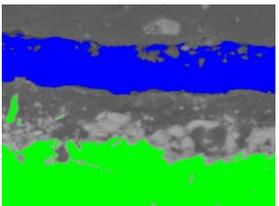
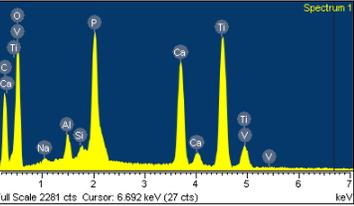
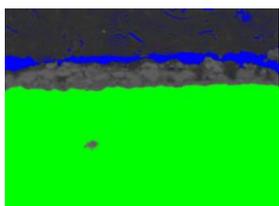
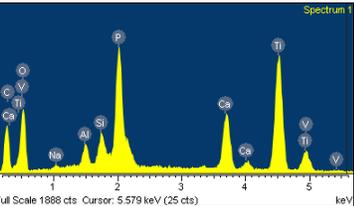
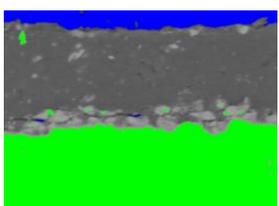
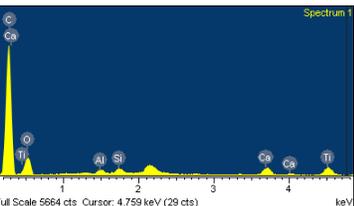
A continuación, se expone la Figura 1-144 correspondiente a las micrográficas tomadas del corte transversal de la muestra 3, que hace referencia al recubrimiento obtenido con la solución madre, más 0.6% de grafeno, y en este caso, con tratamiento térmico a 600°C.

Figura 1-144: Micrografías SEM, corte transversal, de la muestra 3_600_TT, a) imagen por electrones secundarios con 2500 aumentos, b) imagen por electrones retrodispersados, con 2500 aumentos, c) imagen por electrones secundarios con 4000 aumentos.



A continuación, se expone la Tabla 1-4 con los resultados de las medidas de los espesores promedio, obtenidos y analizados con el software libre ImageJ, de las muestras observadas en las micrografías SEM.

Tabla 1-4: Resultados de las medidas de los espesores promedios para las muestras 1_SIN_TT, 2_SIN_TT, 3_600_TT y 3_SIN_TT, analizadas con el software ImageJ, y espectros EDS, obtenidos con el SEM.

Imagen analizada por ImageJ	Espectro EDS	Espesor promedio (μm) y relaciones Ca/P- C/Ca
 <p data-bbox="266 667 363 695">1_SIN_TT</p>		<p data-bbox="1127 432 1211 459">15,405</p> <p data-bbox="1102 478 1235 506">Ca/P: 1.14</p> <p data-bbox="980 522 1357 600">(Fosfato dicálcico dihidratado [43] [51])</p> <p data-bbox="1102 617 1235 644">C/Ca: 1.79</p>
 <p data-bbox="266 1018 363 1045">2_SIN_TT</p>		<p data-bbox="1127 783 1211 810">10,181</p> <p data-bbox="1102 829 1235 856">Ca/P: 1.06</p> <p data-bbox="980 873 1357 951">(Fosfato dicálcico dihidratado [43] [51])</p> <p data-bbox="1102 968 1235 995">C/Ca: 4.87</p>
 <p data-bbox="250 1369 347 1396">3_SIN_TT</p>		<p data-bbox="1127 1134 1211 1161">4,874</p> <p data-bbox="1102 1180 1235 1207">Ca/P: 0.62</p> <p data-bbox="1013 1224 1325 1302">(Fosfato monocálcico monohidratado [43] [51])</p> <p data-bbox="1102 1318 1235 1346">C/Ca: 6.83</p>
 <p data-bbox="250 1740 347 1768">3_600_TT</p>		<p data-bbox="1127 1484 1211 1512">18,631</p> <p data-bbox="1102 1530 1235 1558">Ca/P: 1.12</p> <p data-bbox="980 1575 1357 1652">(Fosfato dicálcico dihidratado [43] [51])</p> <p data-bbox="1102 1669 1235 1696">C/Ca: 8.02</p>

Al observar la muestra sin grafeno y sin tratamiento térmico (sólo con la solución madre), Figura 1-11, se puede validar que en comparación con las micrografías de las demás muestras, Figura 1-12, Figura 1-14, Figura 1-13, ésta presenta una morfología granular, más irregular y con un aspecto menos compacto. Las muestras con contenido de grafeno exponen espesores con una morfología más compacta, con presencia de algunos poros y grietas, características que se observan mejor en las micrografías de la superficie, expuestas en el capítulo 2. Se valida para todas las muestras la incorporación del recubrimiento al sustrato, percibiendo la típica formación de espacios en éste, dados por la ruptura dieléctrica que genera la inherente chispa o microarco de PEO en las zonas más débiles. Es importante recordar que en la reacción PEO se promueve el movimiento iónico de los componentes del titanio, el electrolito, y las partículas utilizadas, generando el crecimiento del recubrimiento por la deposición de los iones P, Si, Ca, Na, grafeno, sobre la capa de TiO₂ obtenida previamente por el pretratamiento realizado. Durante este proceso el grafeno pasa por una etapa de funcionalización, en el que los iones cargados de plasma reaccionan con los átomos de carbono del grafeno, incorporando en éste grupos funcionales. Esto promueve unos efectos sobre el espesor del recubrimiento, dadas las interacciones iónicas con los elementos del electrolito, y los fenómenos eléctricos y térmicos propiciados. Estos factores tienen la capacidad de promover una reorganización atómica importante en el recubrimiento [52][53][54].

los EDS de la Tabla 1-4 muestran la composición elemental de los espesores del recubrimiento, observando la presencia de C, O, Na, Al, Si, P, Ca, Ti y V. Esto confirma la efectiva formación del recubrimiento biocerámico rico en fosfatos cálcicos y con contenido de grafeno, que para las muestras 2, 3 y 5, expone un pico de C más pronunciado, dando razón de la adecuada integración de las nanopartículas de grafeno al recubrimiento. Se relaciona también en la tabla las relaciones Ca/P y C/Ca, de esta manera, respecto a la relación Ca/P obtenida de los espesores, se obtuvo fosfato dicálcico dihidratado y fosfato monocálcico monohidratado [43] [51]. El aumento en las relaciones C/Ca permitieron confirmar la mayor integración de grafeno generado por el aumento en el % utilizado. Al observar la 3_600 _TT, se valida que el pico EDS de C, se solapa un poco con el pico de Ca, sin embargo, se ve un poco más elevado que para la muestra 3 sin tratamiento térmico, aspecto que confirma la relación C/Ca. Esto permite vislumbrar el efecto del tratamiento térmico sobre el grafeno, aspecto que se podrá evaluar de forma más amplia en los siguientes capítulos.

La muestra 1, recubrimiento sin grafeno, dio como resultado un espesor de 15,405 μm , mientras que la muestra 2_SIN_TT dio un espesor menor, de 10,181 μm , este resultado puede asociarse a la presencia de grafeno. Estas nanopartículas promueven una compactación mayor del recubrimiento dada la interacción térmica y química generada en el proceso de síntesis con los iones de la solución rica en fosfatos cálcicos. Este efecto se debe al aumento de la corriente y de la energía en el proceso de PEO. Con el movimiento de iones en direcciones opuestas desde el electrolito y el sustrato, y los grupos OH, se favorece la participación del oxígeno y la deposición de los iones y partículas de interés, y con esto una mayor estructuración y ordenamiento atómico del recubrimiento. Lo anterior conlleva a la obtención de espesores más compactos, finos y con un mayor carácter iónico alcanzado [42][45]. La muestra 3_SIN_TT, cuyo espesor dio 4,874 μm , confirma el fenómeno descrito en la muestra anterior, validando el nivel de interacción del grafeno en el proceso de oxidación por plasma, y la facultad de promover la formación de espesores más compactos. La muestra 3 cuenta con una cantidad mayor de grafeno que la muestra 2, lo que explica el cambio en el tamaño del espesor, pero también el fenómeno de reducción de protagonismo de los demás elementos de la solución electrolítica, dado que se disminuye la expresión de calcio y fósforo (relaciones analizadas en el capítulo 2), factores fundamentales para la bioactividad del material. Finalmente se tiene la muestra 3_600_TT, que supera considerablemente el tamaño del espesor de la muestra 3 sin tratamiento térmico, condición generada por el aumento en la compacidad del material y la distribución de éste en el recubrimiento. En conjunto con el método de síntesis se infiere que la temperatura promovió la redistribución de los planos hexagonales del grafeno en la estructura del recubrimiento, aumentando las tensiones internas, teniendo como consecuencia el aumento en el espesor [52-54].

1.4.4 Discusión y Conclusiones.

El capítulo 1 expone los procesos efectuados para el desarrollo del recubrimiento biocerámico con nanopartículas de grafeno, también los pretratamientos superficiales realizados, como el desarrollo de óxidos de titanio sobre la superficie del sustrato, previo a la síntesis del recubrimiento, el cual se realizó con el objetivo de potenciar las

propiedades bioactivas del recubrimiento y de reducir las probabilidades de corrosión de este.

Los procesos de caracterización confirmaron la formación e integración del recubrimiento rico en fosfatos cálcicos, silicio y grafeno al sustrato pretratado con la formación de óxidos de titanio. El análisis de los espectros de difracción confirmó la formación de TiO_2 en fase anatasa (principalmente) y rutilo; también se valida la formación de óxido de silicio con una estructura amorfa. Cabe mencionar que la expresión de estas fases y estructuras cristalinas manifiestan un comportamiento más notorio y organizado en las muestras tratadas a 600°C , factor que representa una mejor estructuración del recubrimiento biocerámico, formación de fases e interacción de las nanopartículas de grafeno, como se pudo corroborar en el análisis de los espesores promedio y composición elemental por EDS. En los capítulos siguientes se pudo describir aún más el efecto del tratamiento térmico, especialmente a 600°C , temperatura priorizada, y los fenómenos que se generaron con los diferentes % de grafeno utilizados y su influencia a nivel morfológico, químico y estructural.

Se observó también, las propiedades iniciales de humectabilidad de la superficie de los recubrimientos, notando que los tratamientos térmicos a 400°C y 600°C aumentaron los ángulos de contacto, disminuyendo la energía superficial, consecuencia que se evidencia mejor en las muestras con grafeno y tratamiento térmico a 400°C , relación que permitió confirmar las reacciones obtenidas con el tratamiento térmico a 600°C , corroborando la influencia de ésta sobre las nanopartículas de grafeno, efectos que se analizaron más ampliamente en los siguientes capítulos.

2. Capítulo 2: análisis del efecto del tratamiento térmico en el desempeño bioactivo y estructural de los recubrimientos de grafeno-CaO-P₂O₅-SiO₂-TiO₂.

2.1 Introducción.

En el capítulo 1 se evaluó el efecto inicial del tratamiento térmico sobre el recubrimiento biocerámico sintetizado, con y sin nanopartículas de grafeno, en dos temperaturas, 400°C y 600°C, seleccionando como temperatura de énfasis 600°C, ya que los recubrimientos evaluados en este rango expusieron importantes transformaciones y/o efectos a nivel superficial, estructural y elemental. Aspectos que se validaron con el análisis de los cambios morfológicos, estimados inicialmente desde la medida promedio de los espesores, con las micrografías SEM y los espectros de EDS. El análisis realizado previamente, permitió confirmar la adecuada integración de los fosfatos cálcicos, el silicio y el grafeno al recubrimiento. Por su parte, los resultados de difracción de rayos x del sustrato pretratado, paso necesario para las mediciones de haz rasante que se utilizaron en el presente capítulo, validó la estructura de la aleación de titanio con la que se trabajó en este proyecto, teniendo así una aleación de titanio alfa principalmente, con una estructura hexagonal compacta. Los resultados previos de DRX de los recubrimientos sintetizados sólo con la solución madre (sin nanopartículas de grafeno), permitieron validar el efecto del tratamiento térmico sobre el recubrimiento, confirmando así la formación de

titanio en fase anatasa y algunos picos asociados a la formación de rutilo y óxido de silicio amorfo. Finalmente, se observó el impacto sobre las propiedades de mojabilidad, en los recubrimientos con y sin nanopartículas de grafeno. De esta manera, con los resultados preliminares, se seleccionó como temperatura principal de tratamiento, 600°C, teniendo como punto de comparación, para algunas muestras, el tratamiento realizado a 400°C. En este capítulo se evaluó, además, la influencia del grafeno en la estructura biocerámica, y se propuso una nueva concentración de grafeno, 0.1%, denominando esta muestra: 5.

Los resultados de DRX reafirmaron los datos obtenidos previamente, al tener una mejor expresión de los picos de difracción, asociados a la formación de fases ricas en fosfatos cálcicos, como el fosfato tricálcico alfa; se detectó también, más definido, la expresión de Si y SiO₂, en estado amorfo, y algunos picos asociados a TiO₂. Estos resultados fueron apoyados con el análisis realizado por espectroscopía Raman, en el que se validó mejor la presencia del grafeno. En este capítulo, las micrografías adquiridas por microscopía electrónica de barrido (SEM), facilitaron el análisis morfológico y elemental de los recubrimientos sintetizados, los cuales presentaron cambios importantes al variar el % de grafeno utilizado y el tratamiento térmico. Se analizó también, el influjo del grafeno tanto en la estructura, como en la composición elemental, y se mostró los resultados de las relaciones Ca/P, además de los datos de espectroscopía de rayos x de energía dispersiva (EDS) y la distribución elemental por medio del mapeo elemental EDS.

2.2 Metodología

2.2.1 Materiales y equipos.

Posterior al tratamiento térmico realizado en las dos temperaturas propuestas, 400°C y 600°C, llevados a cabo en una mufla multipropósito Terrígeno, se pasó a realizar el proceso de caracterización y análisis elemental, mediante las técnicas de difracción de rayos X, SEM, EDS, mapeo por SEM, espectroscopía Raman confocal, y estudio morfológico con el software ImageJ.

2.2.2 Análisis por difracción de rayos X, haz rasante.

La caracterización por DRX se realizó en el equipo relacionado en el capítulo 1, el difractómetro Empyrean, PANalytical, con radiación $K\alpha$ de cobre, a un voltaje de 40 Kv, haz rasante, step size 2θ , mínimo de 0.001, y muestreo a pasos de $0,026^\circ$ en un tiempo de 53 s. Cabe mencionar, que en principio se tuvo que parametrizar el ensayo, realizando unas medidas preliminares del sustrato solo y luego con el proceso de anodizado, para finalmente dar con los parámetros óptimos para el ensayo.

2.2.3 Microscopía electrónica de barrido SEM, espectroscopía de rayos x de energía dispersiva EDS, y mapeo elemental EDS.

Las micrográficas SEM, los EDS y los mapas elementales, se obtuvieron con el microscopio electrónico mencionado en el capítulo 1, el SEM JEOL-JSM 5910LV, y las mismas condiciones de operación para la obtención de las imágenes con electrones secundarios y retrodispersados; se continuó con un voltaje de 15 KV, ya que éste permitió obtener buenas imágenes del recubrimiento, reduciendo el efecto de carga sobre el mismo. El mapeo elemental se realizó con una resolución de 512×384 , y un tiempo de procesamiento de 5 min. Para el análisis del % de porosidad y el tamaño de poro promedio se empleó nuevamente el software ImageJ.

2.2.4 Espectroscopía Raman confocal.

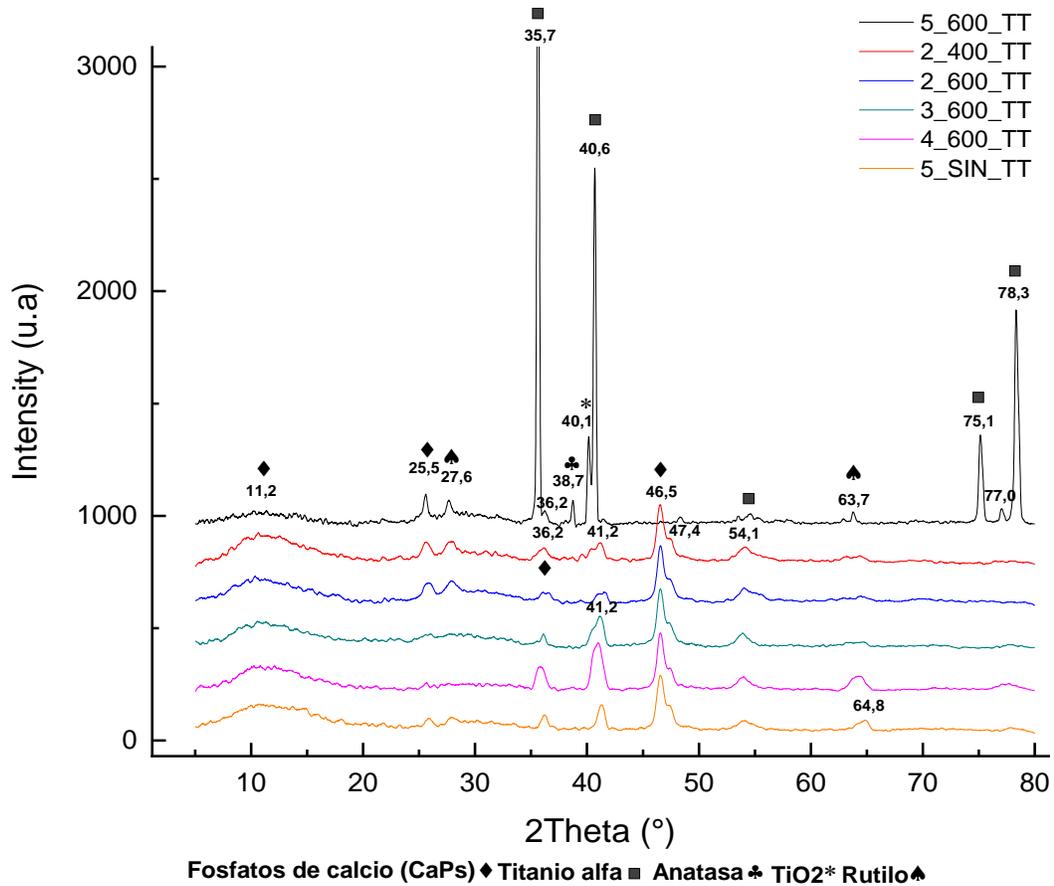
Para la caracterización química de los recubrimientos se utilizó el espectrómetro confocal Raman Horiba LabRAM HR Evolution, en conjunto con el Software de análisis LabSpec6. Se utilizó el láser de 532 nm, un grating de 600 gr/mm, un rango y tiempo de adquisición de 100-2000, 30-25 acumulaciones, un hole de 400, objetivo de 50x LWD, y una potencia del 100%.

2.3 Resultados y conclusiones.

2.3.1 Resultados DRX.

La Figura 2-1 expone los resultados de difracción de rayos X de la muestra 2 tratada a 600°C y a 400°C para efectos de comparación, también expone los picos de difracción de las muestras 3, 4 y 5, tratadas a 600°C, junto con la muestra 5 sin tratamiento térmico, esto con el objetivo de validar el efecto del rango de temperatura optimizado sobre la nueva muestra (con el menor % de grafeno).

Figura 2-1: Resultados DRX de las muestras 5_600_TT (nueva concentración evaluada), 2_400_TT, 2_600_TT, 3_600_TT, 4_600_TT, y 5_SIN_TT.



El software X'Pert HighScore, con base a las fases cristalinas y estructuras que conforman la estructura del material, permitió tomar los patrones de difracción detectados y realizar un análisis de los picos de DRX, permitiendo validar de forma cualitativa y semicuantitativa la composición cristalográfica/elemental del recubrimiento. Esto, ayudó a entender las transformaciones de fases generadas en el recubrimiento biocerámico tratados térmicamente, apoyando así, los resultados obtenidos con EDS y espectroscopía Raman.

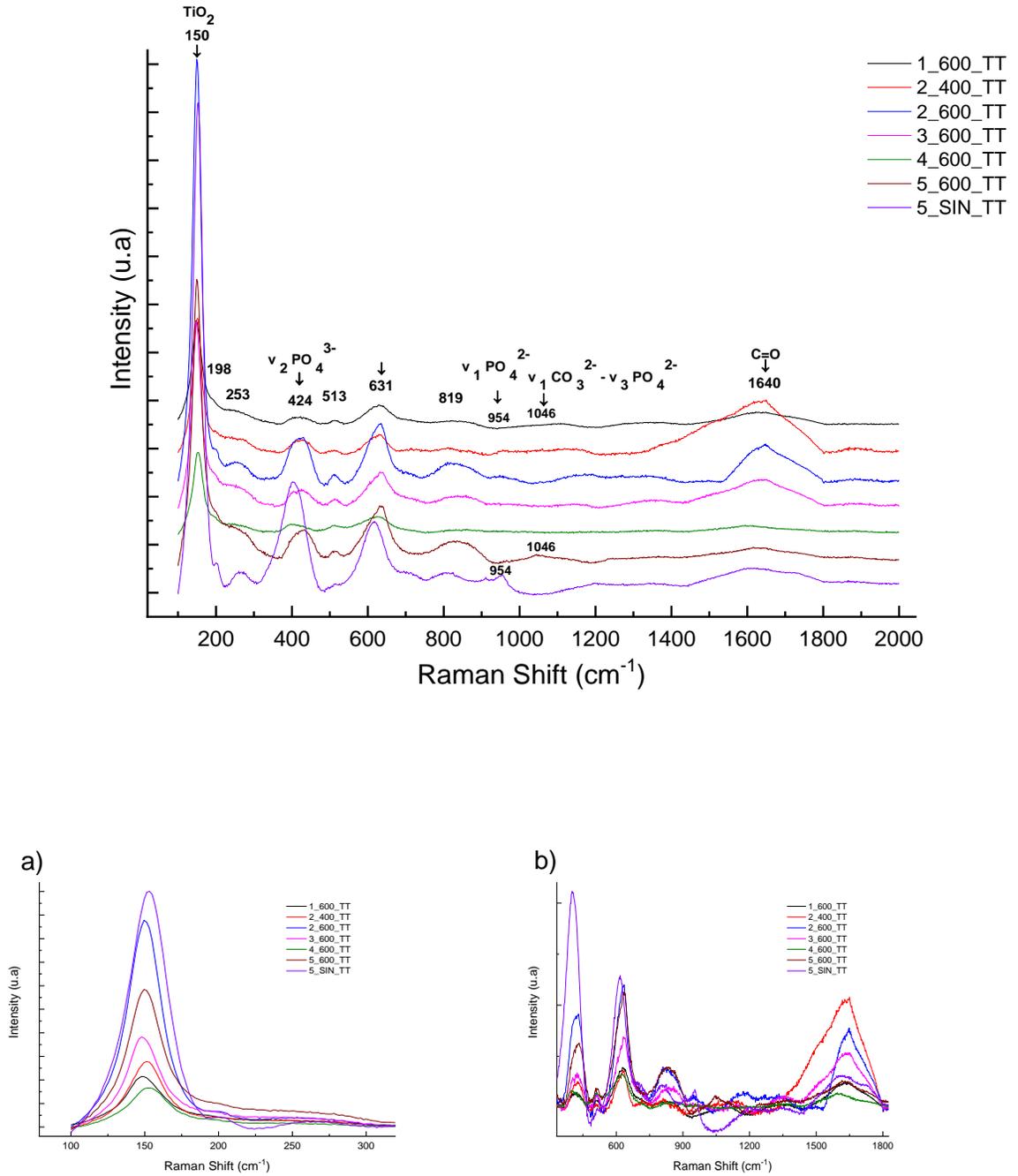
De acuerdo con los resultados obtenidos por difracción de rayos X, se evidenció en principio la formación exitosa del recubrimiento sobre el sustrato, integrando adecuadamente los iones de la solución electrolítica, rica en fosfatos cálcicos y grafeno, a la estructura del recubrimiento biocerámico.

Los resultados obtenidos por DRX denotan en las fases detectadas en el recubrimiento, la presencia de zonas con características amorfas y cristalinas, desarrollo de fases anatasa y rutilo, y la formación de fosfatos cálcicos, como el fosfato dicálcico amorfo, de comportamiento bioabsorbible. Se comprobó además, la efectiva integración del silicio, razón por la cual se tienen picos asociados a Si y SiO₂, los cuales, dada la amorficidad que presentan dificultan su determinación en el espectro.

2.3.2 Resultados de Espectroscopía Raman

En Figura 2-2 se muestran los espectros Raman de las muestras 1, 2, 3, 4 y 5, tratadas a 600°C, y de la muestra 2 con tratamiento térmico a 400°C, y la muestra 5 sin tratamiento térmico, esto, con el objetivo de observar las diferencias generadas, y confirmar el efecto estructurador producido por el rango de temperatura optimizado.

Figura 2-2: Resultados de espectroscopía raman, de las muestras 1_600_TT, 2_400_TT, 2_600_TT, 3_600_TT, 4_600_TT, 5_600_TT y 5_SIN_TT, a) zoom de la zona del espectro raman de 100-300 cm⁻¹, b) zoom de la zona del espectro raman de 600-1800 cm⁻¹.



Los espectros Raman corroboraron la formación de estructuras biocerámicas en el recubrimiento formado sobre el sustrato de Ti6Al4V, en el cual, es notable las bandas asociadas a la formación de una capa de óxido de titanio, producto del proceso de tratamiento de anodizado previo; el pico Raman característico se observa a 150 cm^{-1} . Alrededor de $500\text{-}526\text{ cm}^{-1}$ (puntualmente en 513 cm^{-1}), se observa un pico Raman correspondiente al SiO_2 , siendo este más agudo en las muestras tratadas a 600°C , lo cual se relaciona con una mayor cristalinidad para esta estructura. También, se confirmó la presencia de grupos carbonatos y fosfatos, asociados a la formación de fases Ca/P integrados con grafeno sobre la superficie del sustrato, exponiendo principalmente las vibraciones moleculares de los componentes cerámicos, vinculados a los grupos PO_4^{3-} y PO_4^{2-} . En 424 cm^{-1} se tiene el pico de PO_4^{3-} relacionado con la flexión simétrica y/o modo vibracional V2, el pico a 631 cm^{-1} se relaciona con PO_4^{3-} en su modo vibracional V4. En 954 cm^{-1} se puede observar una formación leve de complejos de fosfatos cálcicos.

Con el componente de silicio que contiene la solución electrolítica utilizada y su incorporación al recubrimiento, en conjunto con el tratamiento térmico propuesto, se buscó obtener un recubrimiento capaz de promover la formación de silanoles superficiales. Estos al interactuar con fluidos fisiológicos contribuye a la estructuración de apatitas amorfas, que posteriormente tienen la posibilidad de transformarse en apatitas cristalinas similares al del tejido óseo. En 1046 cm^{-1} se encuentra un pico de baja resolución y poco resuelto asociado a CO_3 y PO_4 ; adicionalmente el pico detectado en 1640 cm^{-1} se vinculó a la presencia de componentes orgánicos, para este caso el grafeno [30-33].

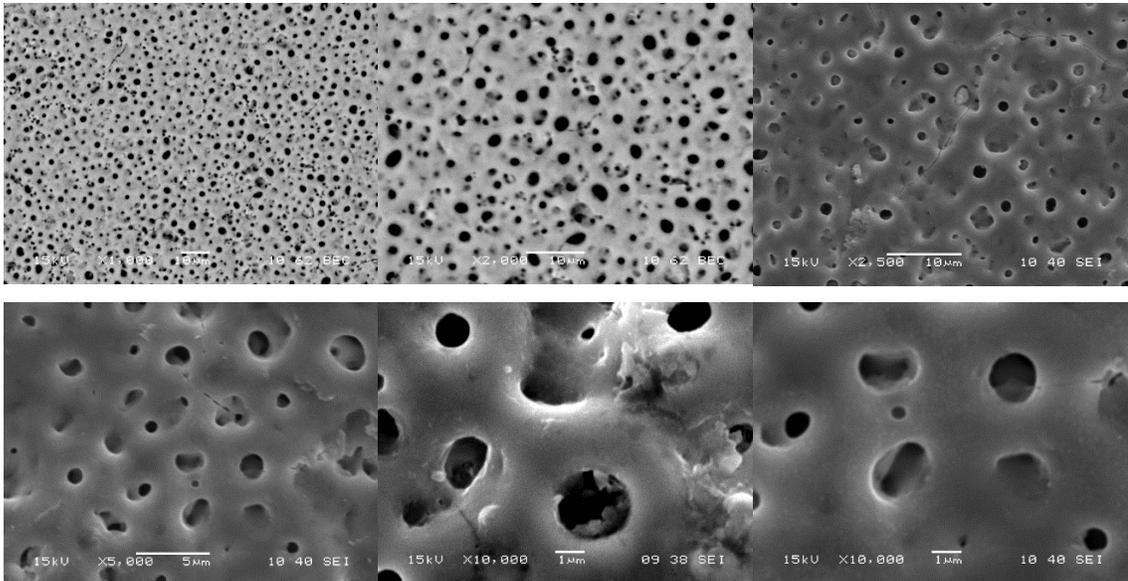
Los espectros obtenidos por la técnica de Raman confirmaron no sólo la positiva formación del recubrimiento, sino también la saturación que pudo darse en el recubrimiento 4 al utilizar una cantidad mayor de grafeno, de 0,9%, factor que afectó la estructura, morfología y relación Ca/P. Los resultados de la caracterización por espectroscopía Raman además de complementar los datos obtenidos con DRX, expuso también, de forma más clara, la tendencia del recubrimiento a tener una estructura con un balance amorfo-cristalino, característico de un vitrocerámico, conveniente para los propósitos buscados en esta investigación. Se observó de igual manera, que los recubrimientos con mejor estructuración de fosfatos cálcicos y relación Ca/P, son las muestras 2 y 5 (razón que se confirmó con los resultados de EDS), obteniendo picos más definidos con las muestras tratadas a 600°C . Finalmente, respecto a las nanopartículas de grafeno, la espectroscopía Raman, no detectó de forma tan clara los picos D y G característicos de este tipo de

nanopartículas, dada la interacción que se generó con los demás componentes del recubrimiento y el proceso de funcionalización que se propició, lo cual dificulta la detección de las señales generadas por las vibraciones moleculares del grafeno, sin embargo se da cuenta de la presencia de éste y de la adecuada integración al recubrimiento en 1640 cm^{-1} , conclusión que se validó con los resultados de EDS y los mapas SEM de este capítulo, en conjunto con los mapas Raman del capítulo 3, en los que se demuestra con mayor claridad la inclusión de las nanopartículas de grafeno.

2.3.3 Resultados SEM, EDS, y mapeo elemental EDS.

En la Figura 2-3 se muestran las micrografías tomadas por microscopía electrónica de barrido de la muestra 2 tratada térmicamente a 400°C , con electrones retrodispersados, con aumentos de 1.000X y 2.000X, y electrones secundarios, con aumentos de 2.500X, 5.000X y 10.000X.

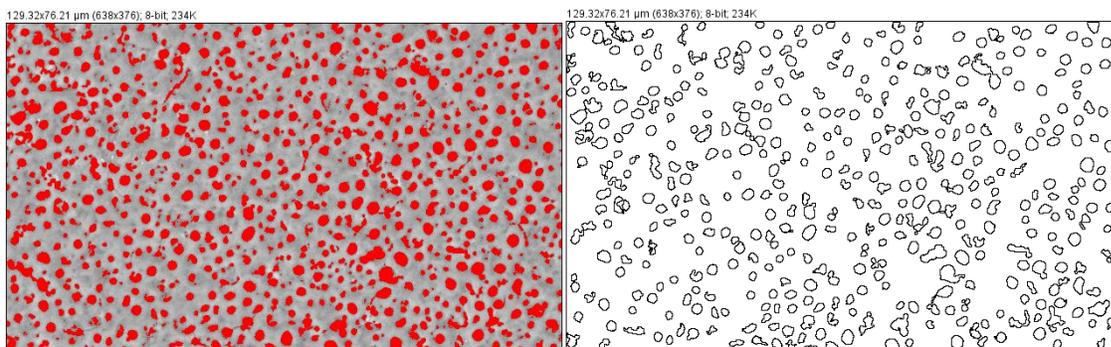
Figura 2-3: Micrografías SEM de la muestra 2_400_TT, con aumentos de 1.000X, 2.000X, 2.500X, 5.000X y 10.000X.



La superficie de la muestra 2_400_TT presentó una elevada cantidad de poros, de tamaños variables, un poco irregulares (no todos tienen formas circulares), también algunas grietas y/o microfisuras. Los poros, como se ha reportado para este tipo de recubrimientos, se han formado por la combinación de los procesos de cavitación y reacción galvánica de alta energía, propia de la anodización por plasma electrolítico. Las microfisuras corresponden a patrones característicos en este proceso, relacionados con el rompimiento dieléctrico asociado al voltaje límite alcanzado en la formación del recubrimiento [44].

La Figura 2-4 representa el análisis realizado con el software ImageJ, con el cual se obtuvo un promedio del porcentaje de porosidad de la muestra y del tamaño de poro, características que permitieron evaluar, en conjunto con las micrografías, los cambios morfológicos generados en las muestras, de acuerdo con el % de grafeno utilizado y los tratamientos térmicos efectuados.

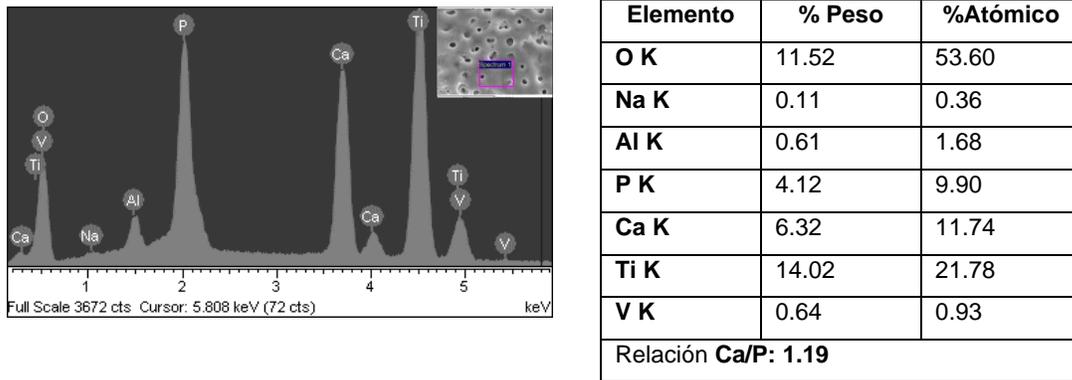
Figura 2-4: Análisis por ImageJ de la micrografía SEM (obtenida con electrones retrodispersados a 1.000X) de la muestra 2_400_TT.



Los resultados obtenidos con el software de análisis de imagen, para la figura 2-4 fueron:
POROS: 407- TAMAÑO PROMEDIO DE PORO: 3.924 μm - % POROSIDAD 16.203.

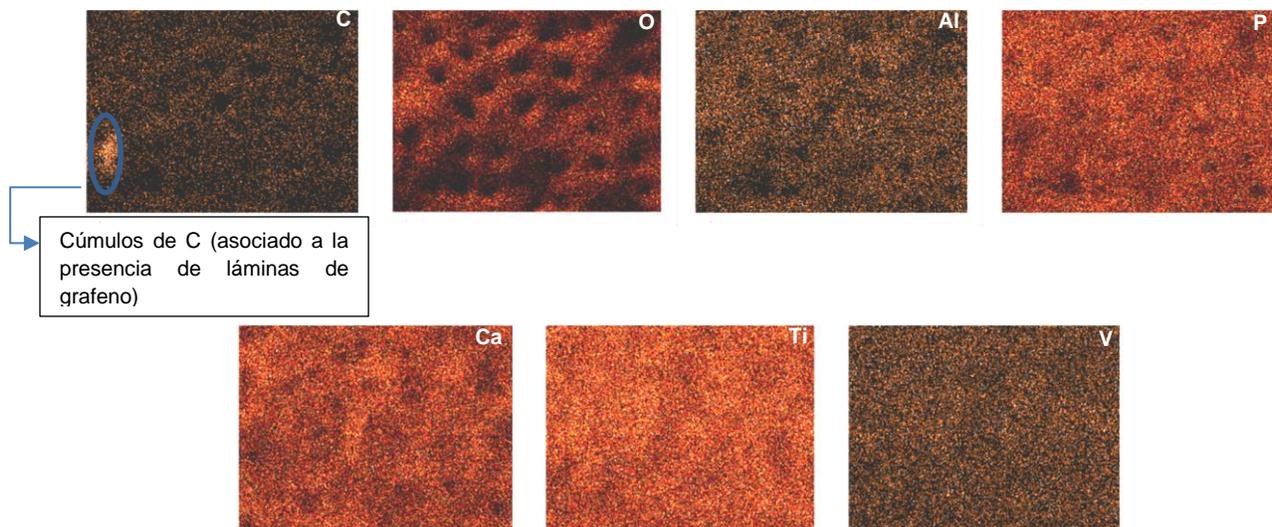
La Figura 2-5 muestra los resultados obtenidos por EDS, los cuales permitieron evaluar los % atómicos adquiridos para cada uno de los elementos detectados en la muestra. De esta manera se calculó la relación Ca/P.

Figura 2-5: Resultado EDS de la muestra 2_400_TT.



La Figura 2-6 muestra los mapas *EDS* obtenidos de la muestra 2 tratada a 400°C, lo que permitió evaluar en principio, la distribución de los componentes detectados en el recubrimiento y la generación de cúmulos de grafeno.

Figura 2-6: Resultado del mapeo elemental realizado por SEM.

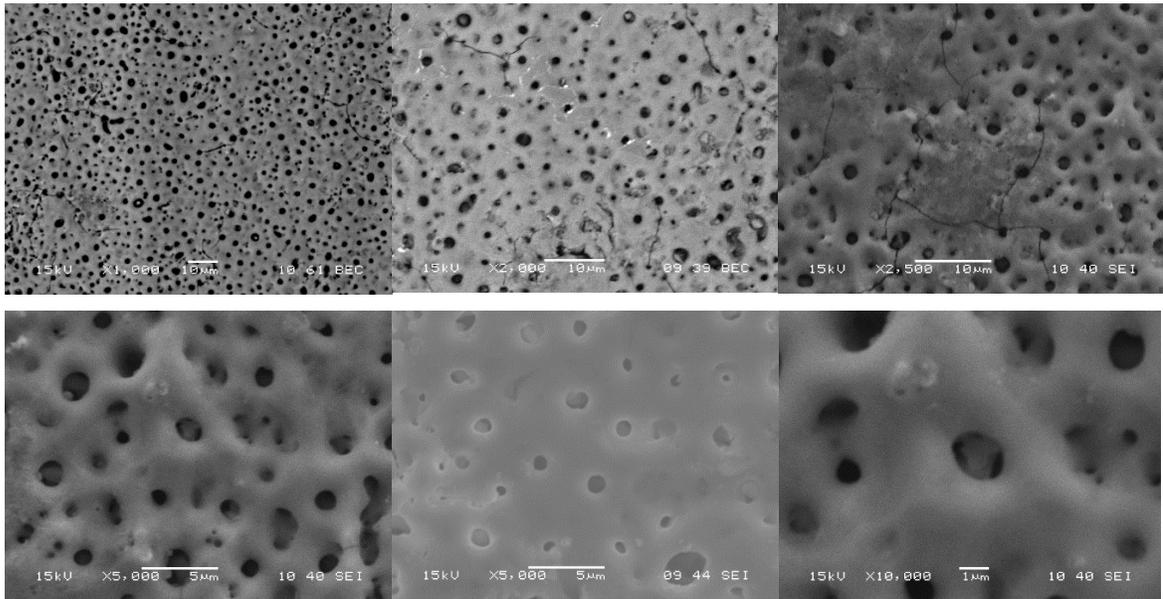


Como se pudo validar con el *EDS*, la composición elemental del recubrimiento expone la presencia de los elementos esperados, dada la composición del electrolito utilizado para el proceso de oxidación por plasma electrolítico, encontrando así O, Na, Al, P, Ca, Ti, V, con una relación Ca/P de 1.19, relación equivalente para un fosfato de calcio amorfo, los

cuales presentan relaciones Ca/P de 1.2 -1.5 (1.18- 1.53) [33] [43] [51]. Para el alótopo de carbono utilizado se encontró una variación en el % atómico medido, teniendo porcentajes de 22, 21 a 34,29 de presencia en el recubrimiento, de acuerdo con la medida de EDS tomada en varios puntos. Esto indica la efectiva integración del grafeno al recubrimiento (siendo esta medida más de carácter cualitativo). Los mapas obtenidos con el microscopio electrónico permitieron validar la disposición de los elementos detectados con el EDS, de esta manera, se pudo observar que, para los diferentes elementos, se tiene en general, una distribución heterogénea, tanto en el sustrato como en el recubrimiento. La disposición de C presenta algunos cúmulos, asociados a la detección de láminas de grafeno, reacción que se promueve desde el proceso de oxidación por plasma y la fase de agitación al que debe mantenerse la solución electrolítica mientras sucede la reacción. La presencia de oxígeno se detectó principalmente sobre el recubrimiento, dada las reacciones de oxidación por plasma que se generaron sobre la superficie con los iones del electrolito. Los demás elementos, especialmente los asociados al recubrimiento, Ca, P, se disponen uniformemente, validando cualitativamente, una mayor presencia de Ca, tal como lo confirma el EDS, de forma equivalente pasa con el sustrato, en el cual, el mapa de Ti, expone más presencia en el material que el Al y el V, dada la intensidad colorimétrica de los puntos (mayoritariamente rojos y amarillos) que conforman la totalidad del mapa.

A continuación, la Figura 2-7 expone las micrografías tomadas por microscopía electrónica de barrido de la muestra 2 tratada térmicamente a 600°C, con electrones retrodispersados, con aumentos de 1.000X y 2.000X, y electrones secundarios, con aumentos de 2.500X, 5.000X y 10.000X.

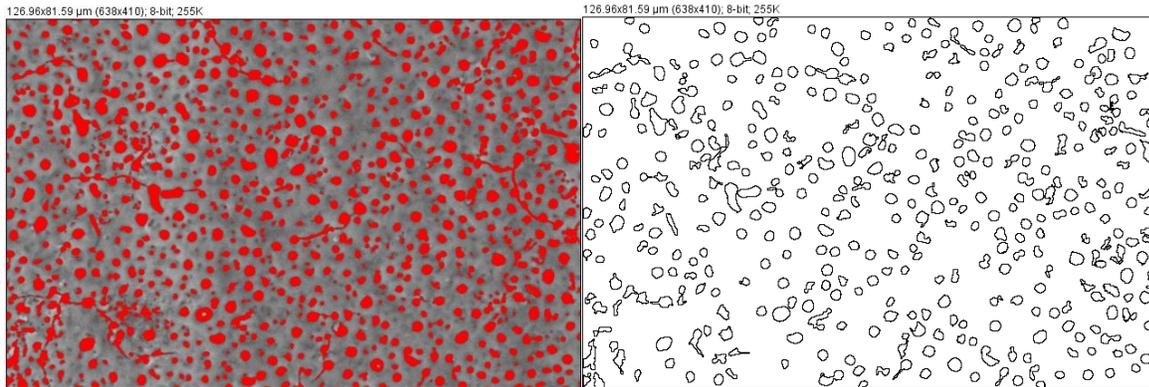
Figura 2-7: Micrografías SEM de la muestra 2_600_TT, con aumentos de 1.000X, 2.000X, 2.500X, 5.000X y 10.000X.



Para la muestra 2_600_TT las microfisuras son más notorias y se evidenció un mayor tamaño de éstas. Presentó también una alta cantidad de poros e irregularidad en sus formas y tamaños, y algunos poros y microfisuras interconectados.

La Figura 2-8 representa el análisis realizado con el software ImageJ, con el cual se obtuvo un promedio del porcentaje de porosidad de la muestra y del tamaño de poro, características que permitieron evaluar, en conjunto con las micrografías, los cambios morfológicos generados en las muestras, de acuerdo con el % de grafeno utilizado y los tratamientos térmicos efectuados.

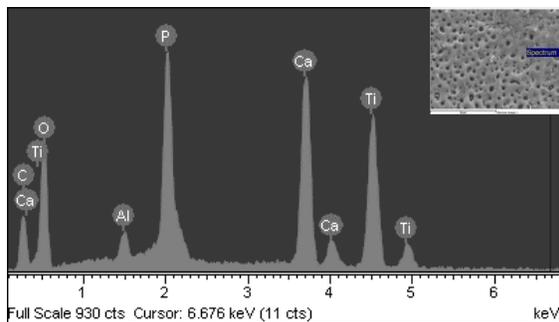
Figura 2-8: Análisis por ImageJ de la micrografía SEM (obtenida con electrones retrodispersados a 1.000X) de la muestra 2_600_TT.



Los resultados obtenidos con el software de análisis de imagen, para la figura 2-8 fueron:
 # POROS: 390 - TAMAÑO PROMEDIO DE PORO: 3.801 μm - % POROSIDAD 14.310.

En la Figura 2-9 se muestra los resultados obtenidos por EDS, los cuales permitieron evaluar los % atómicos adquiridos para cada uno de los elementos detectados en la muestra. De esta manera calculó la relación Ca/P.

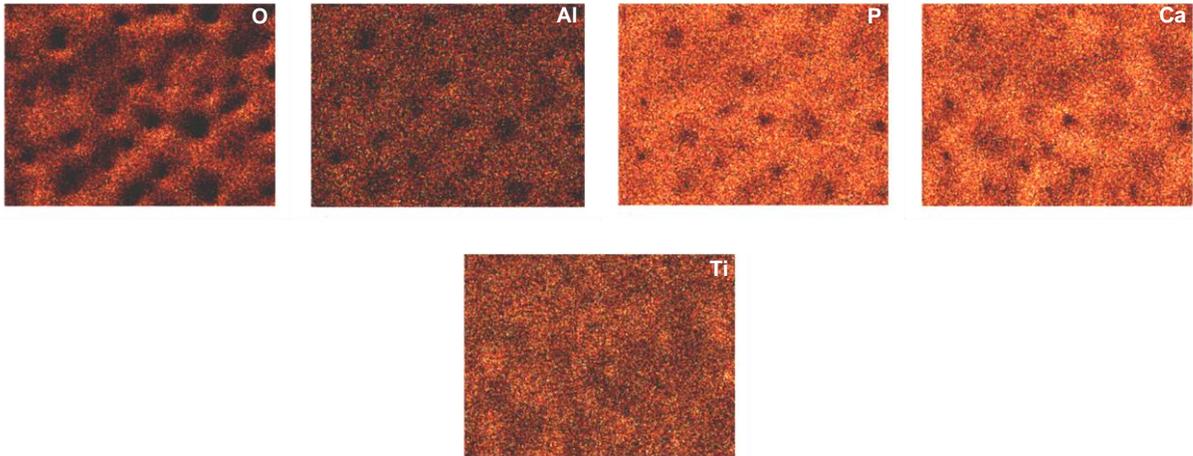
Figura 2-9: Resultados EDS de la muestra 2_600_TT.



Elemento	% Peso	%Atómico
C K	11.70	21.89
O K	34.07	47.85
Al K	1.24	1.03
P K	10.44	7.57
Ca K	18.49	10.36
Ti K	24.06	11.29
Relación Ca/P: 1.37		

La Figura 2-10 muestra los mapas EDS obtenidos de la muestra 2 tratada a 600°C, lo que permitió evaluar en principio, la distribución de los componentes detectados en el recubrimiento.

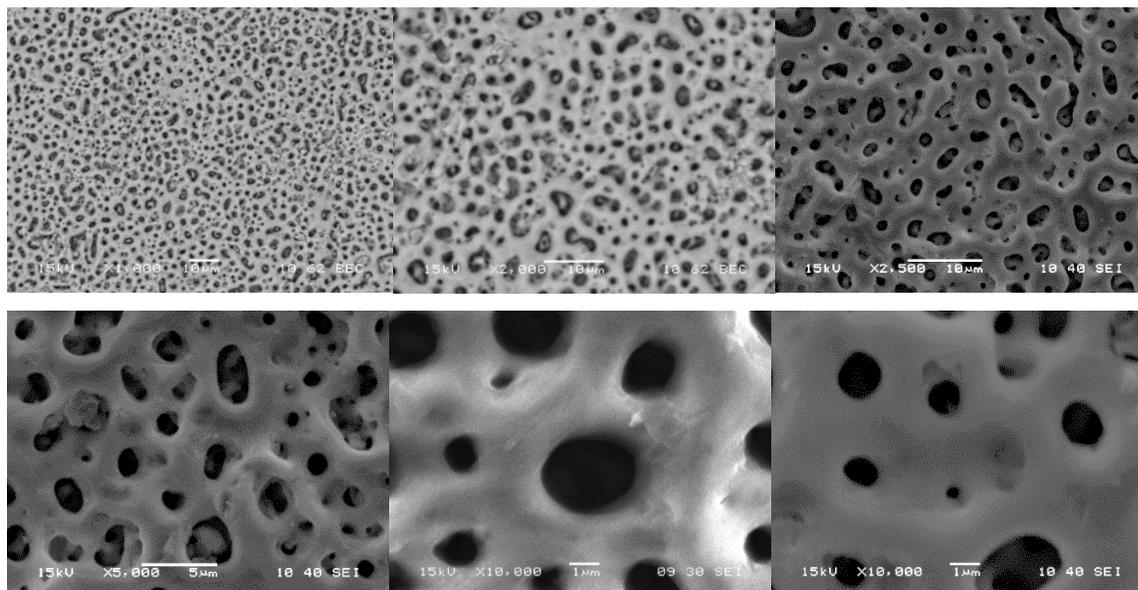
Figura 2-10: Resultados del mapeo elemental realizado por SEM.



Respecto a la composición elemental, de acuerdo con el EDS, el único elemento en relación con la muestra 2_400_TT que no se logró detectar fue el Na. Se encontró una relación promedio de % atómico de C, de 16,48 a 23,33, de acuerdo con las medidas tomadas en varios puntos del recubrimiento, siendo así una medida muy cualitativa que permitió validar la presencia de grafeno en la estructura. Se obtuvo una relación Ca/P de 1,37, relación que aumentó en comparación con el tratamiento a 400°C. Los mapas obtenidos para esta muestra confirmaron la composición elemental detectada por EDS, para los elementos Ca, P, Ti, Al, O principalmente. Validando nuevamente la disposición heterogénea de los elementos Ca, P, O, que constituyen esencialmente al recubrimiento. El oxígeno, por ejemplo, deja visualizar de forma más diferenciada, al igual que el Ca y el P, las zonas más oscuras, con las formas de los poros, razón de su presencia en el recubrimiento, especialmente en las zonas compactas (sin poros). Con el software *ImageJ* se pudo validar que el tamaño de poro promedio y el % de porosidad para la muestra 2, en ambos tratamientos térmicos, son un poco equivalentes, dado que no se tienen diferencias cuantitativas significativas.

La Figura 2-11 muestra las micrografías tomadas por microscopía electrónica de barrido de la muestra 3 tratada térmicamente a 400°C, con electrones retrodispersados, con aumentos de 1.000X y 2.000X, y electrones secundarios, con aumentos de 2.500X, 5.000X y 10.000X.

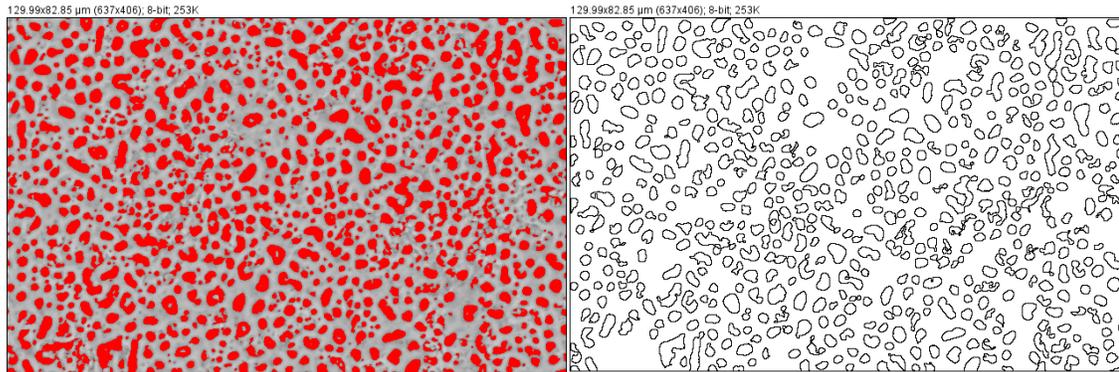
Figura 2-11: Micrografías SEM de la muestra 3_400_TT, con aumentos de 1.000X, 2.000X, 2.500X, 5.000X y 10.000X.



La muestra 3_400_TT no tuvo presencia notoria de microfisuras, pero si se presentó una mayor conectividad de poros, lo que condujo a tamaños y % de poros mayores y con más irregularidad en su forma.

La Figura 2-12 representa el análisis realizado con el software ImageJ, con el cual se obtuvo un promedio del porcentaje de porosidad de la muestra y del tamaño de poro, características que permitieron evaluar, en conjunto con las micrografías, los cambios morfológicos generados en las muestras, de acuerdo con el % de grafeno utilizado y los tratamientos térmicos efectuados.

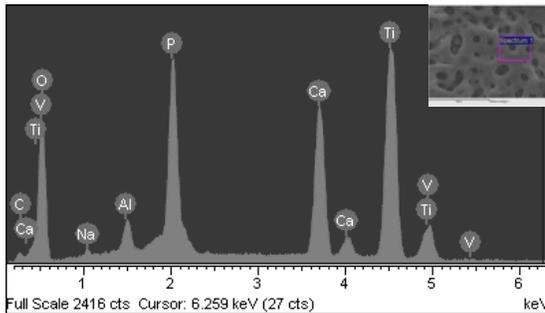
Figura 2-12: Análisis por ImageJ de la micrografía SEM (obtenida con electrones retrodispersados a 1.000X) de la muestra 3_400_TT.



Los resultados obtenidos con el software de análisis de imagen, de la figura 2-12 fueron:
 # POROS: 555 - TAMAÑO PROMEDIO DE PORO: 5.174 μm - % POROSIDAD: 26.661

A continuación, la Figura 2-13 expone los resultados obtenidos por EDS, los cuales permitieron evaluar los % atómicos adquiridos para cada uno de los elementos detectados en la muestra. De esta manera se calculó la relación Ca/P.

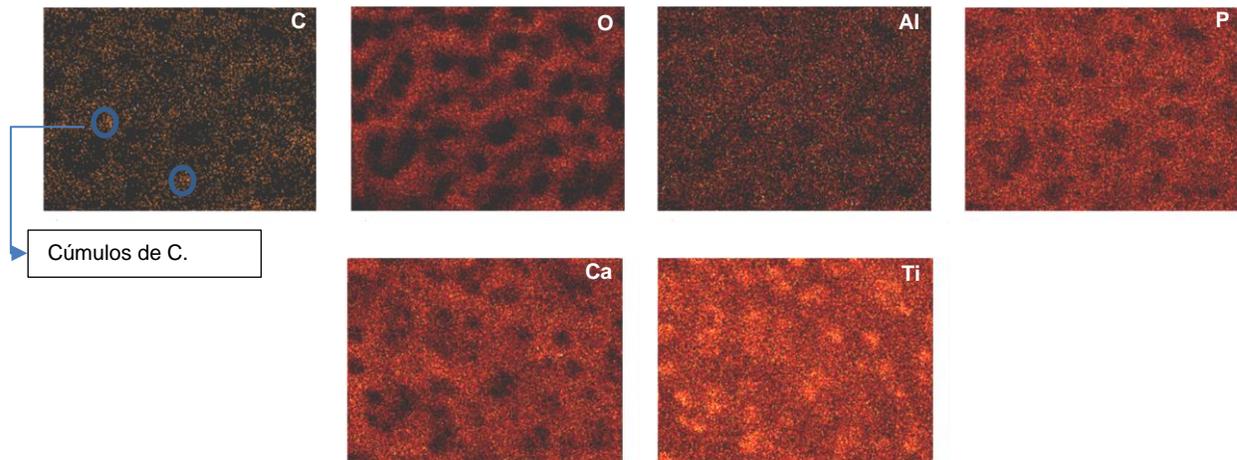
Figura 2-13: Resultados EDS de la muestra 3_400_TT.



Elemento	% Peso	%Atómico
C K	1.55	3.29
O K	36.81	58.59
Na K	0.38	0.42
Al K	1.43	1.35
P K	10.76	8.84
Ca K	14.07	8.94
Ti K	33.86	18.00
V K	1.15	0.58
Relación Ca/P: 1.01		

La Figura 2-14 muestra los mapas EDS obtenidos de la muestra 3 tratada a 400°C, lo que permitió evaluar en principio, la distribución de los componentes detectados en el recubrimiento y la generación de cúmulos de grafeno.

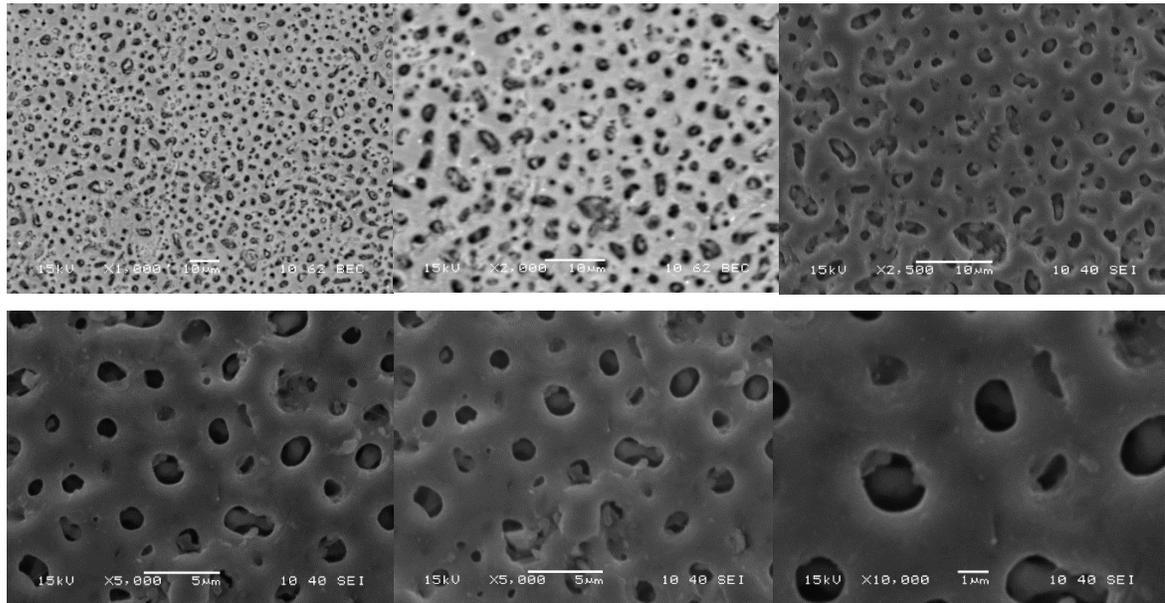
Figura 2-14: Resultados del mapeo elemental realizado por SEM.



En este caso la relación Ca/P: 1,01 disminuyó respecto a la muestra 2 tratada a 400° y 600°C, mostrando así, un recubrimiento equivalente a un fosfato dicálcico [33] [43] [51]. El EDS detectó los mismos elementos de la muestra dos con cada uno de los tratamientos térmicos, obteniendo así: C, O, Na, Al, P, Ca, Ti, V, confirmando la participación y distribución de estos con el mapeo EDS. La presencia de Ca, P y O se observó nuevamente con características muy uniformes en el recubrimiento; para el caso del C algunas zonas presentaron una coloración más intensa, dada la presencia de láminas apiladas de grafeno en la zona mapeada. Particularmente en el mapa de Ti parece exponerse cúmulos de Ti, sin embargo, las zonas que presentan una coloración más amarilla y más intensa se ubicaron justo en las regiones de los poros, lo que permitió inferir que el poro está más interconectado, detectando así el titanio del sustrato o del óxido de titanio sintetizado con el proceso de anodizado.

A continuación, la Figura 2-15 expone las micrografías tomadas por microscopía electrónica de barrido de la muestra 3 tratada térmicamente a 600°C, con electrones retrodispersados, con aumentos de 1.000X y 2.000X, y electrones secundarios, con aumentos de 2.500X, 5.000X y 10.000X.

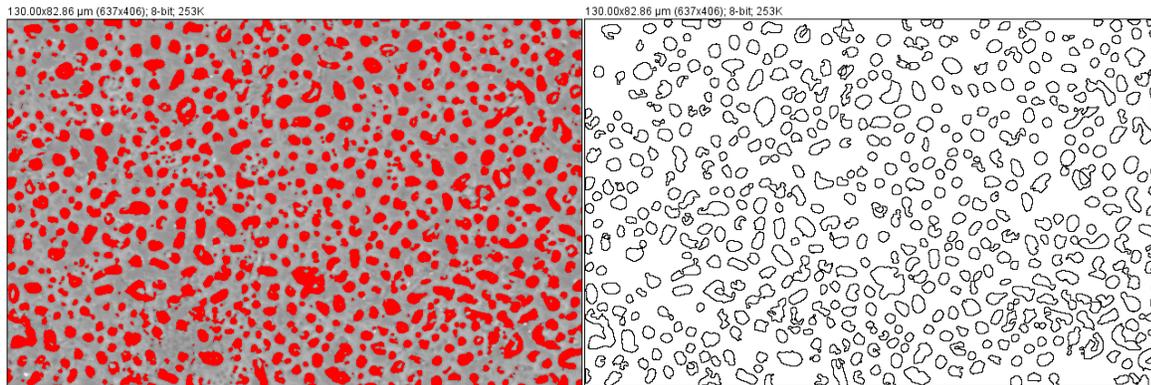
Figura 2-15: Micrografías SEM de la muestra 3_600_TT, con aumentos de 1.000X, 2.000X, 2.500X, 5.000X y 10.000X.



En la muestra 3_600_TT tampoco se evidenció una cantidad muy notoria o significativa de grietas. En comparación con la muestra tratada a 400° C, la estructura morfológica se expuso muy similar al igual que el número y tamaño de poros, en conjunto con el % de porosidad.

La Figura 2-16 representa el análisis realizado con el software ImageJ, con el cual se obtuvo un promedio del porcentaje de porosidad de la muestra y del tamaño de poro, características que permitieron evaluar, en conjunto con las micrografías, los cambios morfológicos generados en las muestras, de acuerdo con el % de grafeno utilizado y los tratamientos térmicos efectuados.

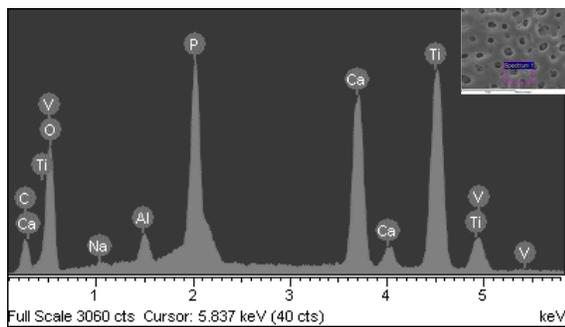
Figura 2-16: Análisis por ImageJ de la micrografía SEM (obtenida con electrones retrodispersados a 1.000X) de la muestra 3_600_TT.



Los resultados obtenidos con el software de análisis de imagen, de la figura 2-16 fueron:
 # POROS: 492 - TAMAÑO PROMEDIO DE PORO: 5.518 μm - % POROSIDAD: 25.205.

A continuación, la Figura 2-17 expone los resultados obtenidos por EDS, los cuales permitieron evaluar los % atómicos adquiridos para cada uno de los elementos detectados en la muestra. De esta manera se calculó la relación Ca/P.

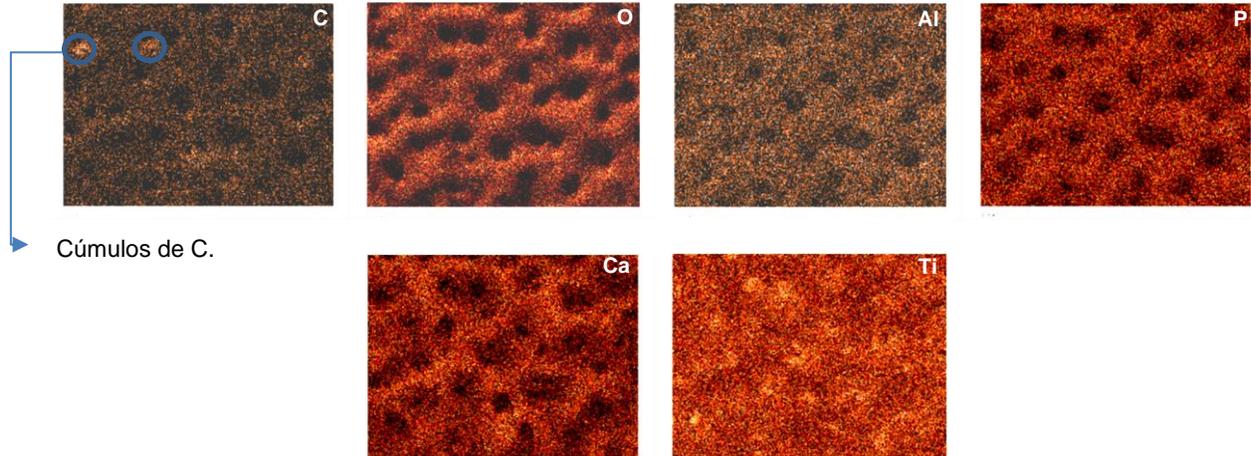
Figura 2-17: Resultados EDS de la muestra 3_600_TT.



Elemento	% Peso	%Atómico
C K	1.58	12.34
O K	8.94	52.48
Na K	0.06	0.25
Al K	0.33	1.16
P K	2.67	8.09
Ca K	3.98	9.33
Ti K	8.03	15.75
V K	0.33	0.61
Relación Ca/P: 1.15		

La Figura 2-18 muestra los mapas EDS obtenidos de la muestra 3 tratada a 600°C, lo que permitió evaluar en principio, la distribución de los componentes detectados en el recubrimiento y la generación de cúmulos de grafeno.

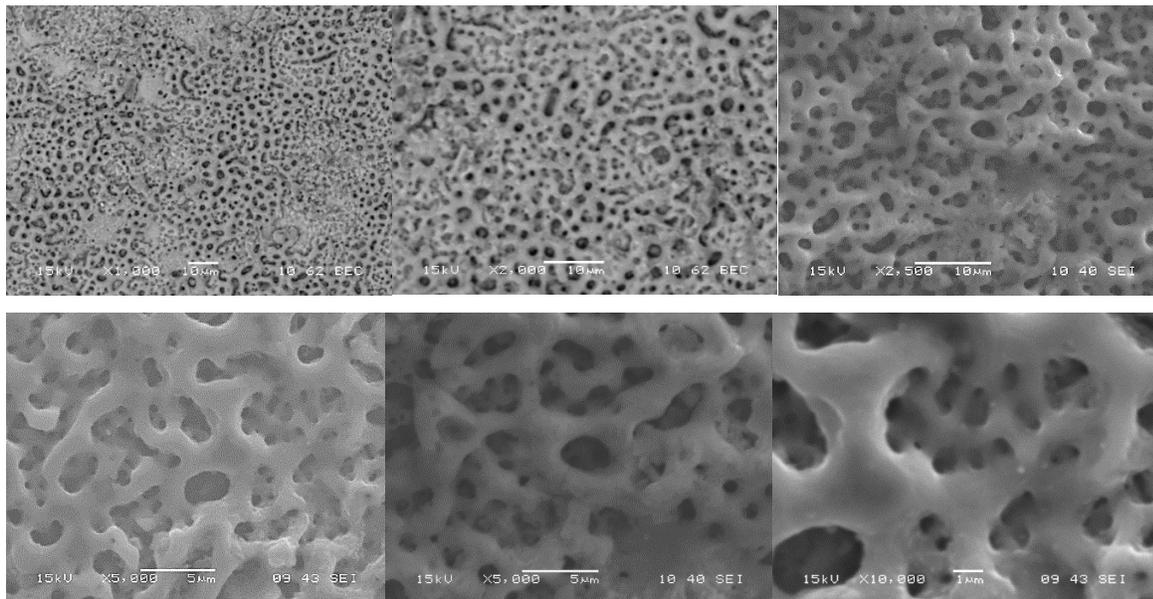
Figura 2-18: Resultados del mapeo elemental realizado por SEM.



Los resultados de EDS presentaron la misma composición elemental que 3_400_TT, pero con una relación Ca/P mayor, de 1,15, equivalente para un fosfato dicálcico [33] [43] [51]. Los mapas por su parte, confirmaron la integración del grafeno y la presencia de estas nanopartículas de forma heterogénea en el recubrimiento. También se valida la incorporación de Ca y P, cuyos mapas exponen una coloración más intensa que la muestra tratada a 400°C, lo que puede relacionarse con el aumento de la relación Ca/P. Sin embargo, para los demás elementos la muestra expone mapas similares, resultados esperados, dado que sólo se varió la temperatura, la cual influyó directamente sobre la relación Calcio-fósforo.

Seguidamente, la Figura 2-19 expone las micrografías tomadas por microscopía electrónica de barrido de la muestra 4 tratada térmicamente a 400°C, con electrones retrodispersados, con aumentos de 1.000X y 2.000X, y electrones secundarios, con aumentos de 2.500X, 5.000X y 10.000X.

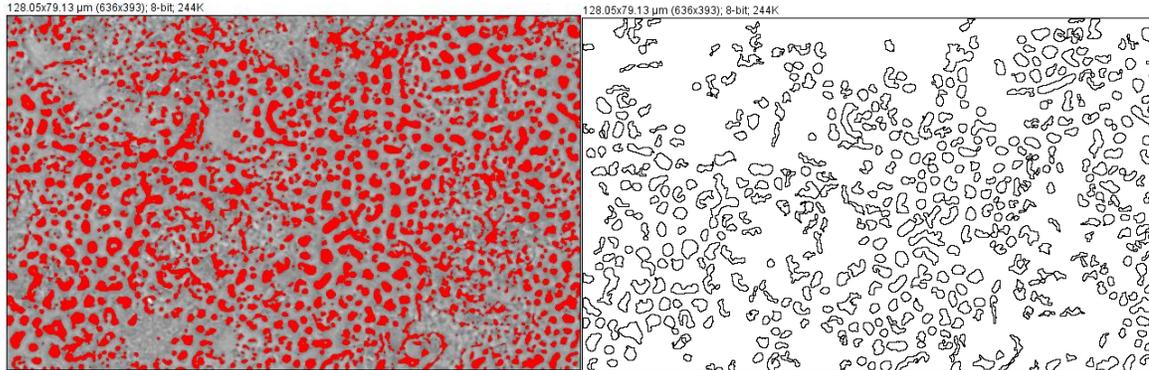
Figura 2-19: Micrografías SEM de la muestra 4_400_TT, con aumentos de 1.000X, 2.000X, 2.500X, 5.000X y 10.000X.



La muestra 4_400_TT morfológicamente expuso poros tipo cráter, evidenciándose una mayor cantidad de poros interconectados y también la formación de poros más pequeños y aglomerados, mostrando un recubrimiento con mayor irregularidad en su estructura. Se presentó también daños en la estructura del recubrimiento, ya que se alcanzó el límite dieléctrico en el proceso de oxidación por plasma electrolítico, situación que generó ruptura en algunas de las zonas del biocerámico sintetizado. Dada la estructura que se generó en este recubrimiento, la variación en profundidad, cantidad y forma de los poros, se puede inferir que ésta exhibe una mayor rugosidad.

La Figura 2-20 representa el análisis realizado con el software ImageJ, con el cual se obtuvo un promedio del porcentaje de porosidad de la muestra y del tamaño de poro, características que permitieron evaluar, en conjunto con las micrografías, los cambios morfológicos generados en las muestras, de acuerdo con el % de grafeno utilizado y los tratamientos térmicos efectuados.

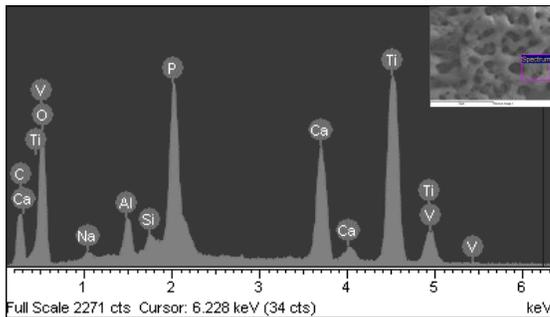
Figura 2-20: Análisis por ImageJ de la micrografía SEM (obtenida con electrones retrodispersados a 1.000X) de la muestra 4_400_TT.



Los resultados obtenidos con el software de análisis de imagen, para la figura 2-20 fueron:
 # POROS: 447 - TAMAÑO PROMEDIO DE PORO: 4.475 μm - % POROSIDAD: 19.742.

A continuación, la Figura 2-21 expone los resultados obtenidos por EDS, los cuales permitieron evaluar los % atómicos adquiridos para cada uno de los elementos detectados en la muestra. De esta manera se calculó la relación Ca/P.

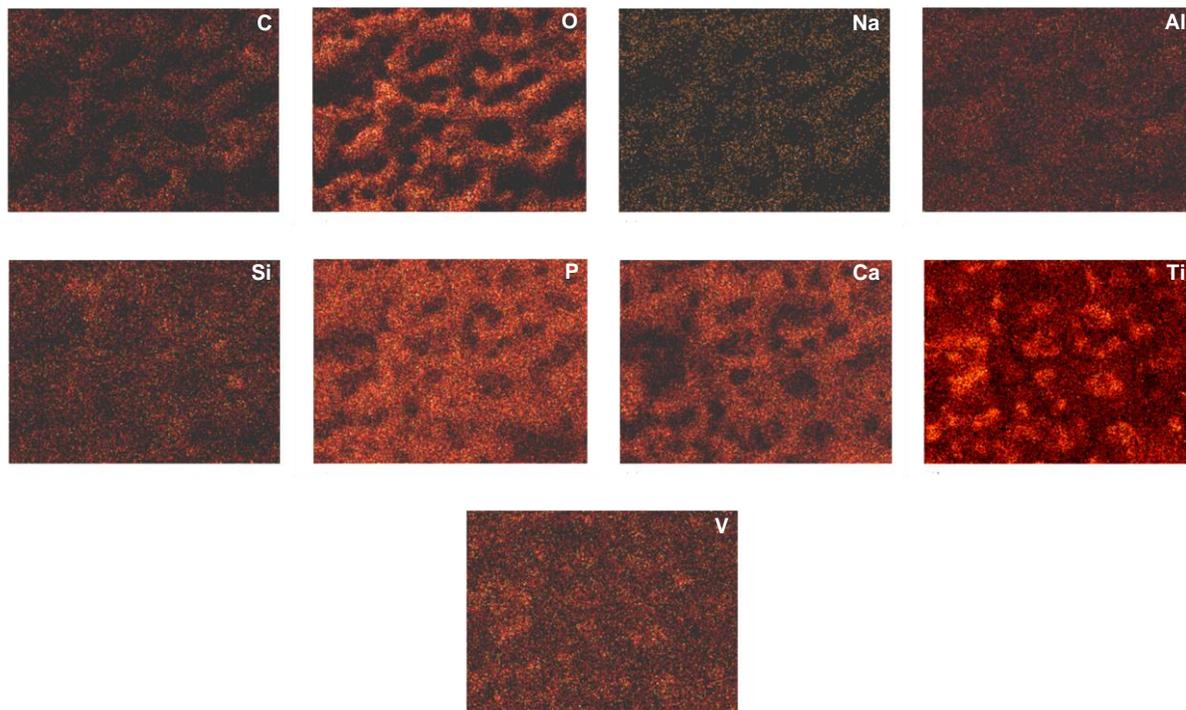
Figura 2-21: Resultados EDS de la muestra 4_400_TT.



Elemento	% Peso	%Atómico
C K	11.13	20.98
O K	34.49	48.84
Na K	0.48	0.47
Al K	1.79	1.50
Si K	0.54	0.44
P K	9.47	6.93
Ca K	10.57	5.98
Ti K	30.19	14.28
V K	1.34	0.59
Relación Ca/P: 0.86		

La Figura 2-22 muestra los mapas EDS obtenidos de la muestra 4 tratada a 400°C, lo que permitió evaluar en principio, la distribución de los componentes detectados en el recubrimiento y la generación de cúmulos de grafeno.

Figura 2-22: Resultados del mapeo elemental realizado por SEM.

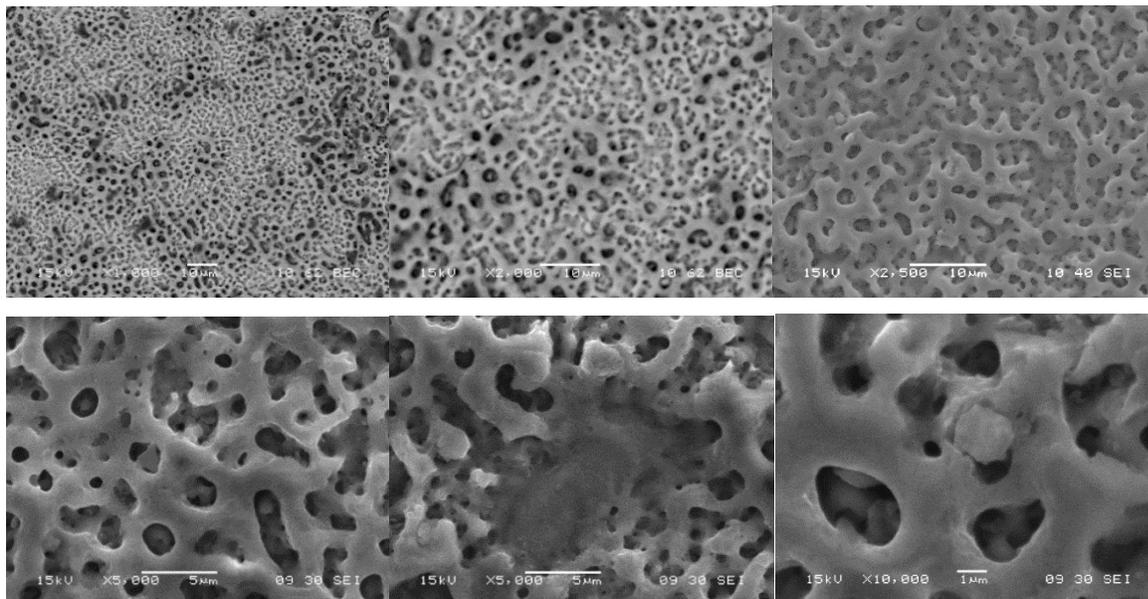


La muestra 4_400_TT presentó una relación Ca/P de 0.86 la cual disminuyó considerablemente respecto a las demás muestras, exponiendo una composición y/o relación equivalente a un fosfato monocalcico principalmente [33] [43] [51]. La composición elemental detectada por EDS fue similar respecto a las otras muestras, aunque en este recubrimiento se logró detectar también silicio, componente constituyente de la solución electrolítica utilizada en el proceso de oxidación por plasma electrolítico. Se obtuvo mapas de cada uno de los elementos detectados por EDS: C, O, Na, Al, Si, P, Ca, Ti, V, confirmando además, la integración del grafeno a la estructura del recubrimiento y la disposición heterogénea de los componentes constituyentes del recubrimiento. Para esta muestra el análisis por ImageJ fue un poco más complejo, dado la alta cantidad de poros aglomerados y aún más pequeños de 3-5 μm , lo que hizo que algunas zonas no fueran fáciles de detectar y de analizar. Sin embargo, el número y tamaño promedio de poro y el % de porosidad fue mayor, respecto a la muestra dos, pero no respecto a la muestra tres. Este efecto desde la visualización de la estructura morfológica que expuso la superficie del recubrimiento 4, resulta ser poco acertado en la comparación, debido a que los resultados obtenidos con ImageJ hacen más referencia al promedio de los poros más grandes, de aproximadamente 4 μm , descartando en parte los poros más pequeños para el cálculo de

los datos de referencia. Este fenómeno estructural y químico está directamente relacionado con la cantidad de grafeno utilizado, que para esta muestra fue del 0.9%, teniendo como base la misma solución electrolítica descrita en el capítulo 1. De esta manera, al evocar los fenómenos térmicos, químicos y eléctricos generados en el proceso de oxidación por plasma electrolítico y la generación de la característica microchispa sobre la superficie del material pretratado, se puede realizar un análisis del efecto que promovió la presencia del grafeno, la cantidad utilizada. Partiendo de las propiedades intrínsecas de este alótropo de carbono, especialmente de las propiedades de conducción eléctrica, se comprende que en el proceso de síntesis del recubrimiento se promovió una mayor generación de microchispas. De esta manera se favoreció un aumento de la ruptura dieléctrica y con esto la generación de más cantidad de poros y protuberancias tipo cráter en el recubrimiento. Se dio también, una especie de solapamiento en la participación y deposición de los iones fosfatos cálcicos, razón por la cual se disminuyó tanto la relación Ca/P. Un efecto particular que se generó fue la formación de zonas tipo colonias, de microporos altamente concentrados y de zonas con poros muy irregulares que expusieron daños en el recubrimiento, situación que puede evidenciarse mejor en la muestra tratada a 600°C [44].

La Figura 2-23 expone las micrografías tomadas por microscopía electrónica de barrido de la muestra 4 tratada térmicamente a 600°C, con electrones retrodispersados, con aumentos de 1.000X y 2.000X, y electrones secundarios, con aumentos de 2.500X, 5.000X y 10.000X.

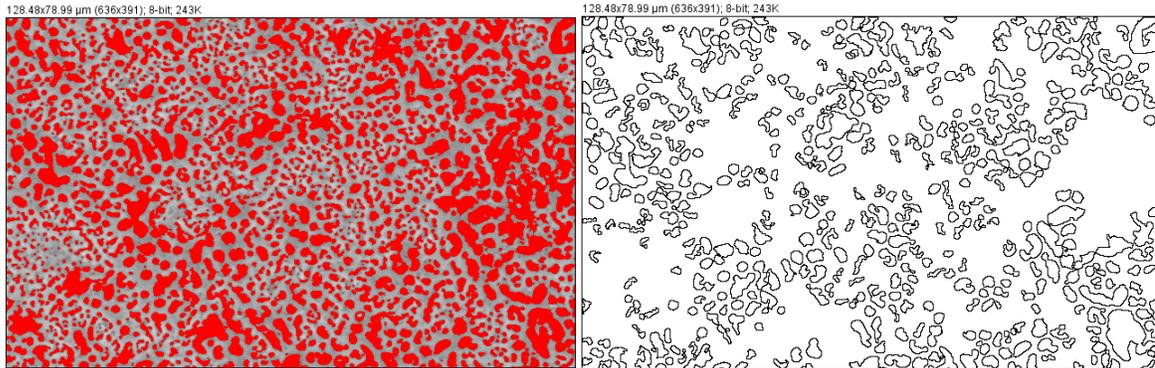
Figura 2-23: Micrografías SEM de la muestra 4_600_TT, con aumentos de 1.000X, 2.000X, 2.500X, 5.000X y 10.000X.



La muestra 4 tratada a 600°C expuso aún más la formación de protuberancias tipo cráter, unión de poros, irregularidad en la estructura, y generación de zonas tipo “colonias”, con alto contenido y aglomeración de microporos y sectores con espacios y/o daños generados en el recubrimiento.

La Figura 2-24 representa el análisis realizado con el software ImageJ, con el cual se obtuvo un promedio del porcentaje de porosidad de la muestra y del tamaño de poro, características que permitieron evaluar, en conjunto con las micrografías, los cambios morfológicos generados en las muestras, de acuerdo con el % de grafeno utilizado y los tratamientos térmicos efectuados.

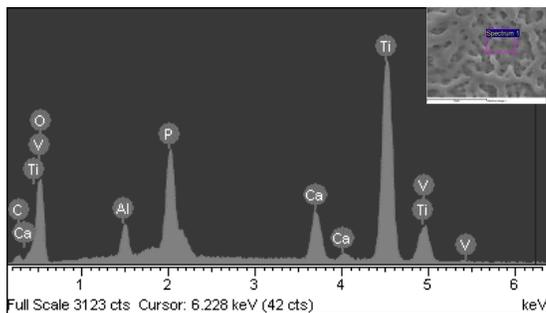
Figura 2-24: Análisis por ImageJ de la micrografía SEM (obtenida con electrones retrodispersados a 1.000X) de la muestra 4_600_TT.



Los resultados obtenidos con el software de análisis de imagen, de la figura 2-24 fueron:
 # POROS: 421 - TAMAÑO PROMEDIO DE PORO: 5.991 μm - % POROSIDAD: 24.850.

A continuación, la Figura 2-25 expone los resultados obtenidos por EDS, los cuales permitieron evaluar los % atómicos adquiridos para cada uno de los elementos detectados en la muestra. De esta manera se calculó la relación Ca/P.

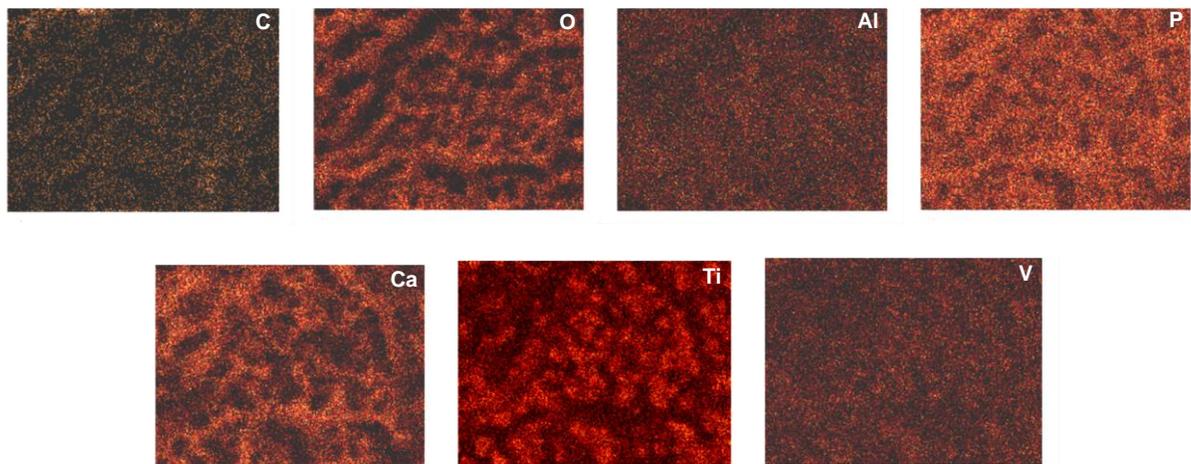
Figura 2-25: Resultados EDS de la muestra 4_600_TT.



Elemento	% Peso	%Atómico
C K	1.91	4.17
O K	34.66	56.94
Al K	2.10	2.04
P K	8.69	7.38
Ca K	6.21	4.07
Ti K	43.84	24.05
V K	2.59	1.34
Relación Ca/P: 0.55		

La Figura 2-26 muestra los mapas EDS obtenidos de la muestra 4 tratada a 600°C, lo que permitió evaluar en principio, la distribución de los componentes detectados en el recubrimiento.

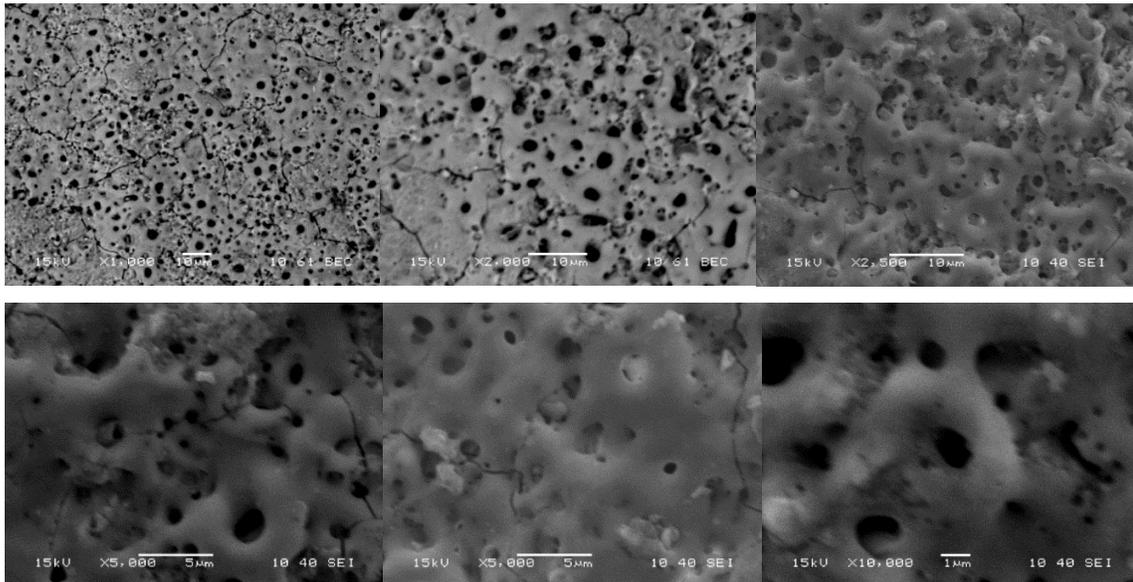
Figura 2-26: Resultados del mapeo elemental realizado por SEM.



El EDS logró detectar 7 de los 9 elementos que se habían detectado en la muestra 4_400_TT, teniendo así, una relación elemental confirmada por los mapas de: C, O, Al, P, Ca, Ti, V, exponiendo características cualitativas similares a la muestra tratada a 400°C. Esta muestra, en comparación con el comportamiento de las muestras 2 y 3, en el que la temperatura aumenta la relación Ca/P, para este caso la redujo, bajando de una relación Ca/P de 0,86 a 0,55, relación equivalente para un fosfato monocálcico (o Fosfato dicálcico dihidratado) [33] [43] [51]. De esta manera, partiendo de los fenómenos generados en el proceso de PEO y la interacción y reacciones que promueven las nanopartículas de grafeno, además de la influencia generada por la cantidad de este, se pudo validar el efecto que ocasiona sobre la estructura biocerámica. Lo que indicó la importancia de utilizar cantidades más bajas que permitan integrar efectivamente las propiedades del grafeno al recubrimiento biocerámico. Promoviendo así, una adecuada interacción entre los iones y componentes utilizados para la síntesis, evitando solapamientos en la participación y formación de los fosfatos cálcicos sobre el material tratado; factores que permiten tener un equilibrio y ayudan a obtener un recubrimiento biocerámico biocompatible y bioactivo.

A continuación, la Figura 2-27 expone las micrografías tomadas por microscopía electrónica de barrido de la muestra 5 tratada térmicamente a 600°C, con electrones retrodispersados, con aumentos de 1.000X y 2.000X, y electrones secundarios, con aumentos de 2.500X, 5.000X y 10.000X.

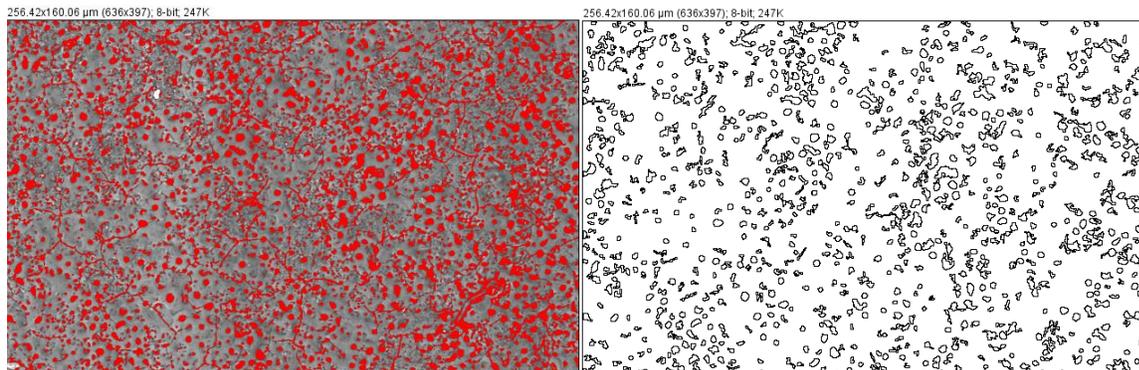
Figura 2-27: Micrografías SEM de la muestra 5_600_TT, con aumentos de 1.000X, 2.000X, 2.500X, 5.000X y 10.000X.



La muestra 5_600_TT morfológica y estructuralmente expone una alta cantidad de microfisuras (algunas interconectadas), alto contenido de poros, de diferentes tamaños, algunos irregulares, otros con formas muy definidas. Dado el desarrollo de poros tipo cráter y la cantidad de fisuras, fue complejo el análisis por ImageJ, sin embargo, en comparación con la muestra 2 ésta expone una mayor cantidad de poros.

La Figura 2-28 representa el análisis realizado con el software ImageJ, con el cual se obtuvo un promedio del porcentaje de porosidad de la muestra y del tamaño de poro. Estas características permitieron evaluar, en conjunto con las micrografías, los cambios morfológicos generados en las muestras de acuerdo con el % de grafeno utilizado y los tratamientos térmicos efectuados.

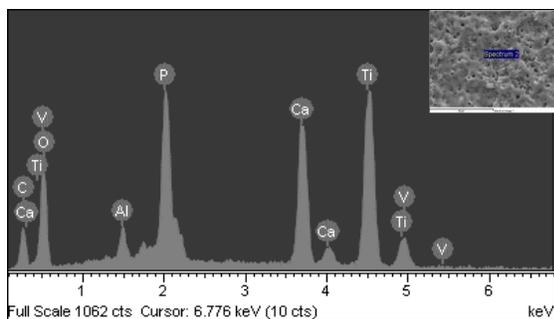
Figura 2-28: Análisis por ImageJ de la micrografía SEM (obtenida con electrones retrodispersados a 1.000X) de la muestra 5_600_TT.



Los resultados obtenidos con el software de análisis de imagen, para la figura 2-28 fueron:
 # POROS: 872 - TAMAÑO PROMEDIO DE PORO: 5.851 μm - % POROSIDAD: 12.432.

A continuación, la Figura 2-29 expone los resultados obtenidos por EDS, los cuales permitieron evaluar los % atómicos adquiridos para cada uno de los elementos detectados en la muestra. De esta manera se calculó la relación Ca/P.

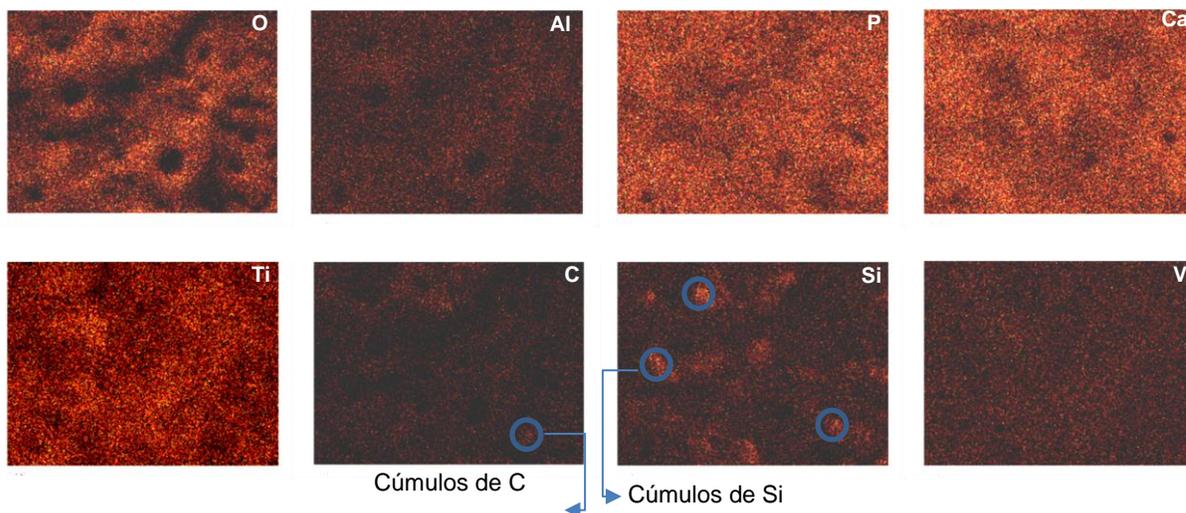
Figura 2-29: Resultados EDS de la muestra 5_600_TT.



Elemento	% Peso	%Atómico
C K	8.73	17.55
O K	31.58	47.65
Al K	1.63	1.45
P K	9.59	7.47
Ca K	15.19	9.15
Ti K	31.79	16.02
V K	1.49	0.70
Relación Ca/P: 1.22		

La Figura 2-30 muestra los mapas EDS obtenidos de la muestra 5 tratada a 600°C, lo que permitió evaluar en principio, la distribución de los componentes detectados en el recubrimiento.

Figura 2-30: Resultados del mapeo elemental realizado por SEM.



Con base a los resultados obtenidos previamente de las muestras 2, 3, y 4 con tratamientos térmicos, se evaluó una concentración más de grafeno en el recubrimiento, siendo éste el % más bajo: 0,1%, tratado a 600°C, dado que es el tratamiento térmico que expuso mejores resultados respecto al aumento de la relación Ca/P, teniendo así, la muestra 5_600_TT. Este recubrimiento obtuvo una relación Ca/P de 1.22 de acuerdo con los resultados de EDS, los cuales permitieron validar que se tuvo una relación mayor que 2_400_TT, aunque menor que 2_600_TT: Ca/P:1,37. Este resultado indica que la presencia de grafeno al igual que la temperatura, influyó directamente en el % Ca/P que se obtuvo y en la estructura del recubrimiento, infiriendo además, el efecto suscitado en las propiedades elásticas, característica relacionada con la alta generación de grietas, lo que indica una mayor fragilidad del recubrimiento.

A medida que aumentó la participación del grafeno se redujo el % Ca/P del biocerámico obtenido, por lo que se esperaba obtener una relación mayor para la muestra 5. Efecto que se logró pero respecto a la muestra 2 tratada a 400°C (Ca/P: 1.19), siendo ésta un poco más baja que la muestra 2 tratada a 600°C. A nivel morfológico se generaron diferencias importantes, especialmente por la alta cantidad de grietas que expuso 5_600_TT, fenómeno que podría afectar la adecuada interacción de las células con el recubrimiento. Esta característica pudo darse precisamente por la cantidad de grafeno utilizado, razón

que se puede validar y comparar con la estructura poco agrietada que presentaron las otras muestras a medida que aumenta la participación del grafeno, especialmente en % porcentajes de equilibrio como las muestras 2 y 3. Este comportamiento puede asociarse a las propiedades elásticas que aporta el grafeno a la estructura, confirmando con esto la resistencia y capacidad elástica que le suma al recubrimiento biocerámico, reduciendo su fragilidad y exposición a la formación de grietas. La participación del grafeno en la síntesis de recubrimientos cerámicos proporciona a la estructura resistencia mecánica y capacidad elástica, dada la facultad de absorción de energía que posee [55][56][57].

Respecto a la composición elemental el EDS y los mapas confirmaron lo que en la mayoría de las muestras se pudo corroborar, y es la integración de los elementos, Si, Ca, P, C, Si, O al recubrimiento, además, de la detección de los componentes propios del sustrato, Ti, Al, V. En general se obtuvo una disposición muy homogénea de los elementos biocerámicos, teniendo en algunas zonas un comportamiento más heterogéneo, especialmente para los elementos C y Si.

2.4.4 Discusión y Conclusiones.

El capítulo 2 expuso el análisis completo de los resultados obtenidos a nivel morfológico, estructural y elemental de cada una de las muestras y/o recubrimientos sintetizados, observando las variaciones generadas por la influencia de los tratamientos térmicos y el % de grafeno formulado para cada una de las soluciones implementadas en el proceso de oxidación por plasma electrolítico. Confirmando que es importante evaluar la cantidad de nanopartículas de grafeno, para que éste no solape la integración exitosa de los iones fosfato, calcio y silicio, y se evite así reducir las relaciones Ca/P obtenidas, efecto que se generó a medida que aumentaba la participación del grafeno. Si bien este alótropo de carbono aporta propiedades de biocompatibilidad al material, por los factores bactericidas, anticorrosivos y eléctricos que expone, respecto a las propiedades mecánicas, se evidenció con las micrografías SEM el influjo que tiene a nivel elástico, fenómeno que se expresó en la cantidad de grietas formadas en el recubrimiento, las cuales disminuyeron a medida que se aumentaba la cantidad de grafeno. Las propiedades eléctricas de este material generaron un aumento de conducción eléctrica en la reacción PEO, lo cual trajo como consecuencia la generación de más microarcos, reacción que incrementó las

aglomeraciones de poros y unión de estos a medida que aumentaba también la relación de grafeno [44]. En este punto, se evaluó los fenómenos generados a nivel morfológico y estructural, teniendo en cuenta las fases biocerámicas generadas y las relaciones Ca/P obtenidas, que fueron muy prometedores para las muestras 2 y 5 tratadas a 600°C. Todos estos componentes son muy relevantes en el desarrollo de un material bioactivo, en conjunto con factores como las propiedades de humectabilidad y energía superficial, ítems que se evaluaron en el desarrollo de este proyecto, y se exponen más ampliamente en el capítulo 3. Como se observa, es un conjunto de elementos y propiedades los que entran a jugar un papel importante en la síntesis de biomateriales, especialmente aquellos que tienen una relación e influencia directa respecto al contacto con tejidos, biomoléculas y líquidos fisiológicos, como la sangre; por esto, en este proyecto se buscó tener un equilibrio de este conjunto de propiedades.

Los resultados obtenidos por DRX ratificaron la formación de una estructura con fases cristalinas de anatasa principalmente y algunas transformaciones de rutilo, obteniendo una estructura biocerámica rica en fosfatos cálcicos, con tendencia a la formación de fosfatos tricíclicos alfa. Se confirmó también, la integración heterogénea de iones silicio, formando especialmente complejos de silicato de calcio y óxido de silicio. La caracterización por espectroscopía Raman permitió corroborar no sólo la formación e integración del recubrimiento biocerámico al sustrato metálico pretratado con la formación de la capa de TiO_2 , sino también describir puntualmente las vibraciones moleculares asociadas a los grupos funcionales PO_4^{3-} y PO_4^{2-} , elementos que se expresaron mejor en las muestras tratadas a 600°C. Logrando además, detectar una leve formación de apatita sobre la superficie, que de acuerdo con la naturaleza del electrolito utilizado y algunos de los resultados obtenidos por DRX, puede tratarse de apatita fosfocálcica (apatita carbonatada). Los elementos constituyentes del recubrimiento se validaron también con los resultados obtenidos por EDS.

Con el objeto de implementar este tipo de recubrimientos en áreas específicas, es interesante ver cómo en el área de odontología, los biocerámicos vienen exponiendo excelentes aplicaciones en procedimientos periodontales, en el que éstos presentan la capacidad de proliferación de fibroblastos y diferenciación celular de la pulpa dental, factores que determinan las capacidades bioactivas del material. De esta manera, biocerámicos ricos en fosfatos cálcicos y silicato de calcio presentan la facultad de promover la precipitación de hidroxiapatita, al interactuar con el agua de los fluidos

fisiológicos, generando así una interfase entre la dentina, el biocerámico y el agua. Puntualmente, los biocerámicos a base de silicato de calcio promueven diferenciación celular en la pulpa dental, además de osteoblastos, cementoblastos, células madre mesenquimales, entre otros. Un dato de interés para este proyecto, es la capacidad de precipitación de apatitas sobre superficies de materiales biocerámicos, cuando éstos se encuentran en contacto con tejido óseo y fluido del tejido, lo que conlleva a una mayor adhesión química. El silicato de calcio otorga la capacidad de liberación de iones Ca^{2+} , y con ello la precipitación de cristales tipo apatita cuando está en contacto con el *SBF*; al entrar en contacto los iones Ca^{2+} con los fluidos fisiológicos, se genera CO_2 , el cual reacciona con el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (hidróxido de calcio), formando carbonato de calcio, que sirve como núcleo de calcificación, llegando posteriormente a la mineralización ósea [40].

3. Capítulo 3: evaluación del efecto del tratamiento térmico y del plasma por descarga intensa de gas ionizante sobre la adsorción de iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} en el recubrimiento de grafeno- $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-TiO}_2$, mediante impedancia electroquímica y mapeo Raman.

3.1 Introducción.

En el capítulo anterior se evaluó la adecuada integración de los elementos constituyentes de las soluciones electrolíticas al recubrimiento, observando una distribución heterogénea de los mismos, con algunos cúmulos de silicio y grafeno en algunas de las muestras. Las relaciones Ca/P se vieron afectadas no sólo por el tratamiento térmico efectuado, posterior a la síntesis del recubrimiento por medio del proceso de oxidación por plasma electrolítico, sino también por los diferentes porcentajes de grafeno utilizados, validando la importancia de manejar rangos de equilibrio, en el que este alótropo de carbono pueda expresar un adecuado comportamiento, desde lo estructural, a lo morfológico y químico del recubrimiento evaluado. De esta manera, se tiene que la muestra 2 y 5, tratadas a 600°C , por las relaciones Ca/P obtenidas principalmente, prometen propiciar un entorno no sólo

biocompatible, sino también con las señales necesarias para que las células puedan generar una relación bioactiva con la superficie del recubrimiento. Sin embargo, es importante tener muy presente la estructura topográfica, la generación de grietas y el % de poros generados en las diferentes muestras. En este punto del proyecto, se ha podido evaluar varios factores, desde la influencia que tienen los tratamientos térmicos en la estructura de los recubrimientos biocerámicos, como la participación y afectaciones que generan los diferentes % de grafeno formulados. Este capítulo propone un nuevo tratamiento, el plasma por descarga intensa de gas ionizante o plasma de descarga luminiscente, el cual promueve cambios superficiales, respecto a las propiedades de humectabilidad del recubrimiento, sin sacrificar las propiedades evaluadas previamente, especialmente la formación de estructuras ricas en fosfatos cálcicos y las relaciones Ca/P obtenidas. Por lo tanto, la influencia del tratamiento por plasma de descarga intensa de gas ionizante se evaluó con la modificación generada en los ángulos de contacto y con ello en las energías superficiales, ítem que denota un factor importante para la capacidad bioactiva del recubrimiento, como se podrá observar más adelante. Se continuó en este capítulo con la evaluación elemental de las muestras, a través de una técnica muy novedosa de la espectroscopía Raman, el mapeo Raman confocal, tomando varios puntos del recubrimiento, confirmando con ello, no sólo la integración de los elementos esperados y confirmados con los procesos de caracterización previos, sino también, su concentración (distribución de elementos). Con una mejor resolución, se pudo evaluar, en comparación con el mapeo elemental del SEM, la incorporación de iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} , que parte de la composición elemental detectada de calcio, fósforo, silicio, SiO_2 , TiO_2 , dada la naturaleza de las soluciones electrolíticas desarrolladas. Finalmente, se dio paso al método de Espectroscopía de Impedancia Electroquímica, EIE, para evaluar a nivel "invitro", el comportamiento bioactivo del recubrimiento, al entrar en contacto una solución fisiológica simulada (SBF). Esta técnica emplea una celda electroquímica, por lo general de tres electrodos, bajo la acción de un potencial eléctrico en un barrido de frecuencias, evaluando los efectos de interacción entre el electrolítico y el recubrimiento, por medio de la corriente e impedancia de transferencia del sistema; análisis que se realiza por medio de circuitos eléctricos equivalentes, bajo un modelo propuesto que representa el sistema estudiado y con el cual, se ajustan mediante simulación, los datos obtenidos en los espectros de Bode y Nyquist mediante el software Zview, obteniendo los parámetros de impedancia, capacitancia, inductancia del sistema, asociados a cada uno de los componentes del circuito (tabla 3-6). Estos resultados suministran la información necesaria para realizar los

gráficos finales, como los que se exponen en este capítulo (figura 3-48), calculando la resistencia de polarización del sistema, la constante de tiempo de relajación τ_{thao} , y el total de las capacitancias. Los resultados obtenidos hacen énfasis en el potencial comportamiento de las muestras 2 y 5, tratadas a 600°C.

3.2 Metodología

3.2.1 Materiales y equipos.

El tratamiento por plasma de descarga intensa de gas ionizante se realizó con el Sputtering Quorum Q150R ES, principalmente por el método Glow Discharge -Ve, con una polaridad negativa, corriente de 20 mA y un voltaje de 292 V. Para medir las propiedades de humectabilidad del recubrimiento se utilizó el medidor de ángulo de contacto Ramé-hart, utilizando agua destilada y 45 iteraciones cada 0.25 segundos. Los datos de los ángulos de contacto y las energías superficiales se obtuvieron con el software del equipo, DROPimage Standart, empleado también en los capítulos anteriores.

La solución electrolítica utilizada para el análisis por espectroscopía de impedancia electroquímica fue una solución fisiológica simulada (SBF), rica en sales que simulan la concentración y pH del plasma humano. Teniendo de esta manera una solución que contiene: agua ultrapura, cloruro de sodio (NaCl), bicarbonato de sodio (NaHCO₃), cloruro de potasio (KCl), fosfato dipotásico trihidratado (K₂HPO₄ · 3H₂O), cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl₂ · 6H₂O), cloruro de calcio (CaCl₂), sulfato de sodio (Na₂SO₄), Tris(hidroximetil)aminometano (Tris), y ácido clorhídrico (HCl) 1M [41].

3.2.2 Mapeo composicional raman confocal.

Para validar el componente composicional y confirmar la adecuada adsorción de Ca²⁺ y PO₄³⁻ sobre el recubrimiento biocerámico, se utilizó la técnica de mapeo composicional Raman, con un láser de 532 nm, grating de 600 gr/mm, rango espectral de 100 nm -2000 nm, tiempo de adquisición de 2, 15 acumulaciones, hole de 400, objetivo de 50x LWD,

potencia del 100%, montaje (μm) de 100-100, tipo de mapa rectangular, y 36 puntos a evaluar con un tiempo estimado de 20 min por mapa. Software de análisis, LabSpec6.

3.2.3 Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE).

A modo de evaluación invitro se empleó la técnica de espectroscopia de impedancia electroquímica, con el equipo Potenciostato/galvanostato marca Gamry, modelo interfase 1000E, por el método EIS (Electrochemical Impedance Spectroscopy) o EIE (por su traducción en español). Teniendo como electrodo de trabajo la muestra de interés (recubrimientos), electrodo de referencia de Ag/AgCl y un contraelectrodo de grafito de alta pureza. Los parámetros de trabajo fueron: frecuencia inicial 100.000 Hz, frecuencia final 0.1 Hz, puntos/década 7, tiempo de acondicionamiento 50 S (delay).

3.3 Resultados y conclusiones.

3.3.1 Ángulos de contacto para el análisis del efecto del tratamiento por plasma.

El tratamiento por plasma de descarga intensa de gas ionizante o plasma de descarga luminiscente ha sido una técnica ampliamente utilizada para tratamientos superficiales. Dependiendo del gas utilizado se puede generar una descarga de iones y electrones sobre la superficie tratada, permitiendo limpiar y esterilizar la muestra y eliminar capas de óxidos no deseadas e impurezas. Favoreciendo además la generación de procesos de reoxidación con O_2 , para reducir por ejemplo la contaminación por carbono de aleaciones de titanio anodizadas. También, empleando gases nobles como el argón es posible aumentar la energía superficial y la humectabilidad de la superficie, siendo un método muy versátil que dependiendo de los parámetros programados, el gas utilizado, la presión, el tiempo y la densidad de corriente, puede incluso generar revestimientos superficiales,

permitiendo así, la participación de reacciones químicas en el proceso que mejoran propiedades, como la resistencia a la corrosión [34].

Como se mencionó anteriormente, el tratamiento por plasma se utilizó con el recubridor Quorum, por el método Glow Discharge -Ve (GD -Ve) principalmente, aunque en principio se evaluó el efecto de Glow Discharge +Ve (GD +Ve), y como gas ionizante argón (para ambos casos). En la Tabla 3-1 se relacionan los datos obtenidos de las mediciones de ángulo de contacto y energía superficial de las muestras tratadas.

Tabla 3-1: Resultados de las mediciones de ángulo de contacto de las muestras tratadas por plasma de descarga intensa de gas ionizante.

Muestra	Ángulo de contacto sin tratamiento por plasma (°)	Energía superficial sin tratamiento por plasma (mJ/m ²)	Ángulo de contacto con tratamiento por plasma, +Ve (°)	Energía superficial con tratamiento por plasma, +Ve (mJ/m ²)	Ángulo de contacto con tratamiento por plasma, -Ve (°)	Energía superficial con tratamiento por plasma, -Ve (mJ/m ²)
1_600_TT	93.08 ± 0.5	27.93 ± 0.3	108.03 ± 0.2	18.23 ± 0.1	21.76 ± 0.0	68.08 ± 0.0
2_SIN_TT	54.20 ± 0.5	51.22 ± 0.3	92.74 ± 0.0	27.52 ± 0.0	19.40 ± 0.0	68.98 ± 0.0
2_600_TT	62.93 ± 0.6	46.06 ± 0.3	85.10 ± 0.1	32.29 ± 0.1	57.10 ± 0.1	49.58 ± 0.1
3_SIN_TT	62.77 ± 0.6	46.14 ± 0.5	93.58 ± 0.0	27.00 ± 0.0	35.05 ± 0.1	61.98 ± 0.0
3_600_TT	63.50 ± 0.7	45.69 ± 0.5	94.00 ± 0.1	26.74 ± 0.1	77.92 ± 0.7	36.78 ± 0.4
5_600_TT	60.25 ± 0.3	47.49 ± 0.2	97.98 ± 0.1	24.28 ± 0.0	79.07 ± 0.2	36.06 ± 0.1

Los resultados de ángulo de contacto exponen el efecto que generó el tratamiento por plasma realizado inicialmente por GD +Ve, el cual aumentó el ángulo de contacto teniendo como efecto directo la reducción de la energía superficial, generado un cambio importante en la humectabilidad de la superficie del recubrimiento. Tal como se mencionó en el capítulo 1, las propiedades de mojabilidad y de energía superficial del recubrimiento juegan un papel muy importante en la capacidad de interacción que tendrá las células con el recubrimiento biocerámico sintetizado, ya que esa primera interacción del tejido biológico,

biomoléculas y células se relacionan con la acción del componente hídrico del cuerpo, es decir, con los fluidos corporales circundantes al material reparador y regenerador. De esta manera, la acción de las proteínas y del H₂O del cuerpo generan toda una reacción bioquímica que, al encontrarse por ejemplo con una superficie hidrofóbica, disminuye la adherencia del implante al tejido objeto de regeneración [27-28]. Teniendo presente estos factores, las muestras tratadas con GD +Ve se sometieron nuevamente a tratamiento por plasma con GD -Ve, teniendo como resultado un comportamiento muy interesante de recuperación de las propiedades humectables de la superficie, reduciendo el ángulo de contacto, aumentando la energía superficial y la hidrofiliidad. Para efecto del presente proyecto, el tratamiento por plasma se utilizó principalmente para evaluar la influencia sobre el recubrimiento, validando la capacidad de este tipo de técnicas de tratamientos superficiales para modificar el comportamiento hidrofílico e hidrofóbico de biocerámicos como los sintetizados, y a su vez el control que se puede obtener de la energía superficial, aspecto muy importante y de reiterada evaluación en biomateriales.

A continuación, se podrá observar los mapas Raman y los espectros asociados a estos, los cuales, en conjunto con los espectros Raman previamente analizados en el capítulo 2, confirman la adecuada integración y formación de compuestos a partir de los elementos iónicos incorporados en el recubrimiento, como fosfatos cálcicos, silicio y grafeno, exponiendo una presencia heterogénea principalmente, especialmente para los elementos silicio y grafeno. Los mapas Raman permiten representar espacialmente la composición y estructura del material estudiado, para las zonas que se tomen como referencia. Es de destacar que este tipo de técnicas han permitido caracterizar propiedades del tejido óseo, dada la resolución espacial y las ventajas experimentales que expone, permitiendo analizar diversos componentes de la matriz orgánica y mineral del hueso, siendo utilizado además, para el análisis de tejidos patológicos, envejecidos y de diferentes características del tejido óseo, validando los cambios que se generan en éste, pudiendo obtener también imágenes y mapas Raman de tejidos hidratados y de muestras in vivo [35].

En el presente capítulo se hace énfasis a las muestras tratadas a 600°C, especialmente aquellas que contienen nanopartículas de grafeno y que presentaron resultados relevantes previamente, realizando así, un análisis de las muestras 2, 3 y 5 para el proceso de caracterización por mapeo Raman.

Las

Figura 3-1 (muestra 2 con 0.3% de grafeno), Figura 3-2 (muestra 3 con 0.6% de grafeno), y Figura 3-3 (muestra 5 con 0.1% de grafeno), muestran las Imágenes de mapas Raman confocales recopilados en las superficies, junto con algunos espectros Raman representativos de las muestras, tanto el de referencia, es decir el espectro general del recubrimiento, como el de la posición seleccionada y/o zona, donde las regiones coloreadas resaltan los picos seleccionados para el mapeo (tomados del espectro de referencia). Cabe mencionar que los mapas exponen una distribución de intensidad espectral de la zona seleccionada, en el que cada color indica la distribución composicional de los elementos constituyentes del recubrimiento, asociados al espectro de referencia, pero también a la zona seleccionada, teniendo presente, tal como se mencionó en el capítulo 2, la distribución heterogénea de los compuestos y partículas del sustrato, capa de óxidos preferenciales y principalmente del recubrimiento.

3.3.2 Caracterización por mapeo Raman.

La

Figura 3-1 expone los resultados del mapeo composicional obtenidos por espectroscopía Raman confocal de 3 zonas distintas de la superficie del recubrimiento de la muestra 2 con tratamiento térmico a 600°C y tratamiento por plasma, 2_QT_600_TT. También se muestra un espectro y mapeo general de la muestra 2 con tratamiento por plasma y sin tratamiento térmico, 2_QT_SIN_TT.

Figura 3-1: Resultados del mapeo espectral de 3 zonas de la muestra 2_QT_600_TT, y mapeo general de la muestra 2_QT_SIN_TT.

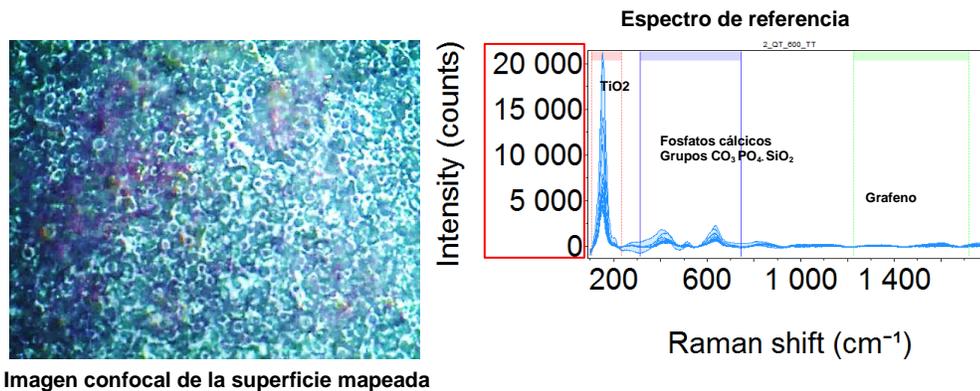


Figura 3-1: (Continuación).

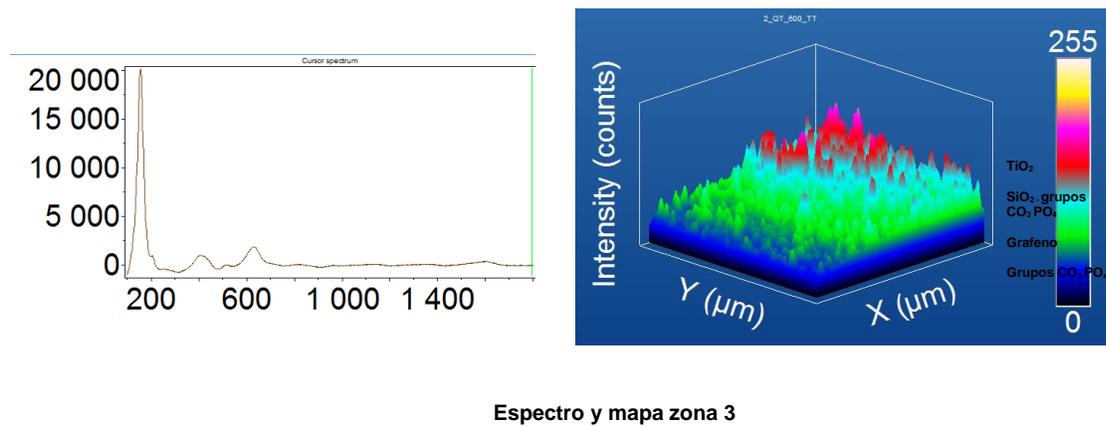
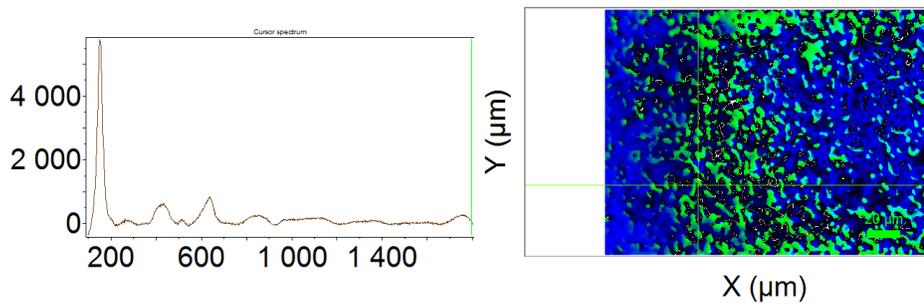
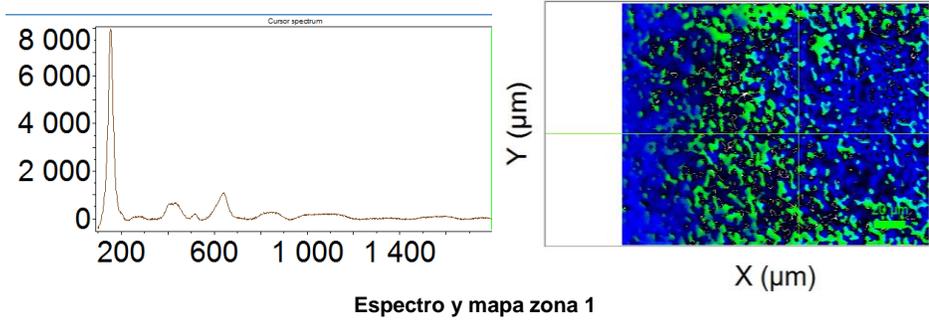
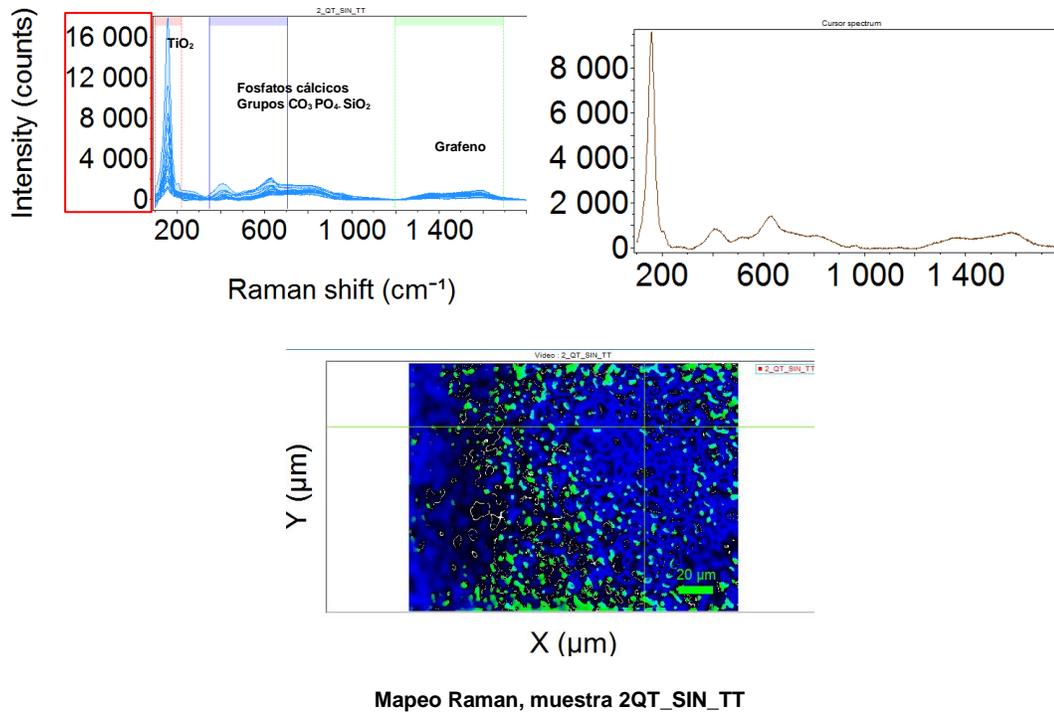


Figura 3-1: (Continuación).



Partiendo de los espectros de referencia de la muestra 2 con y sin tratamiento térmico (ambas con tratamiento por plasma), se pudo observar diferencias en las intensidades de los picos, especialmente el asociado al TiO₂ ubicado alrededor de 150 cm^{-1} , siendo mayor para la muestra tratada a 600°C. Esto confirmó la influencia del tratamiento térmico sobre la organización estructural del recubrimiento, siendo congruente con los resultados de DRX, Figura 2-1, cuyo análisis dio como resultado la formación de anatasa, fase predominante sobre la cristalización de rutilo, como lo expuso también los espectros Raman, Figura 2-2. El mapeo Raman permitió ratificar también, la naturaleza heterogénea de la composición del recubrimiento biocerámico con nanopartículas de grafeno, ya que este expuso, de acuerdo con la zona mapeada, diferencias en las intensidades relacionadas con los grupos fosfatos cálcicos, SiO₂ y grafeno integrados a la estructura.

La Figura 3-2 expone los resultados del mapeo composicional obtenidos por espectroscopía Raman confocal de 3 zonas distintas de la superficie del recubrimiento de la muestra 3 con tratamiento térmico a 600°C y tratamiento por plasma, 3_QT_600_TT. También se muestra un espectro y mapeo general de la muestra 3 con tratamiento por plasma y sin tratamiento térmico, 3_QT_SIN_TT.

Figura 3-2: Resultados del mapeo espectral de 3 zonas de la muestra 3_QT_600_TT, y mapeo general de la muestra 3_QT_SIN_TT.

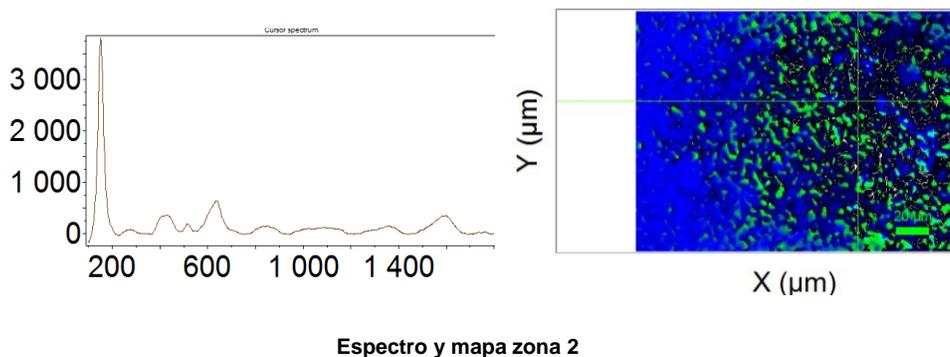
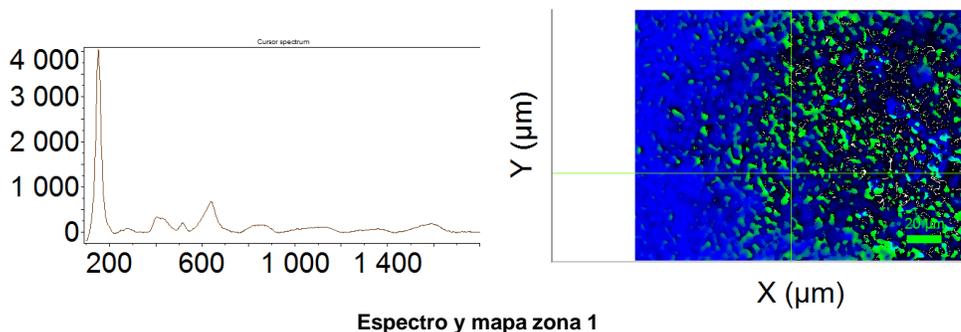
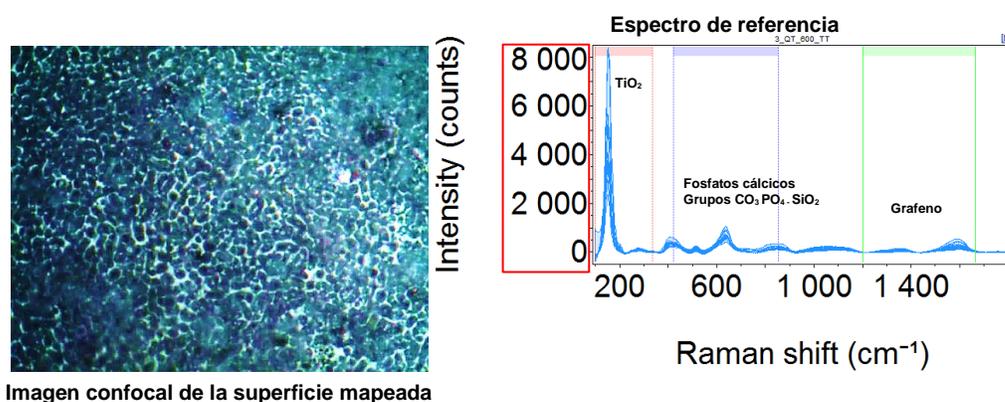
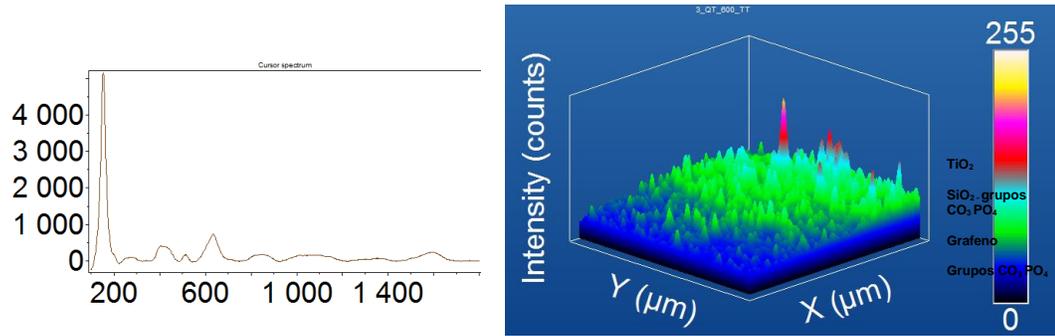
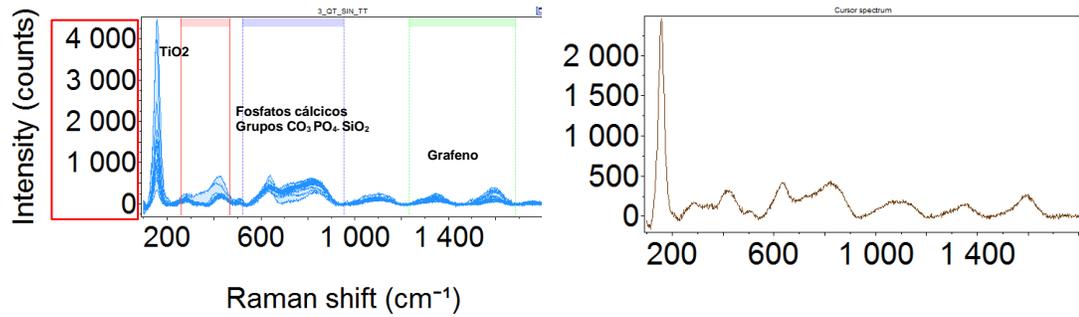


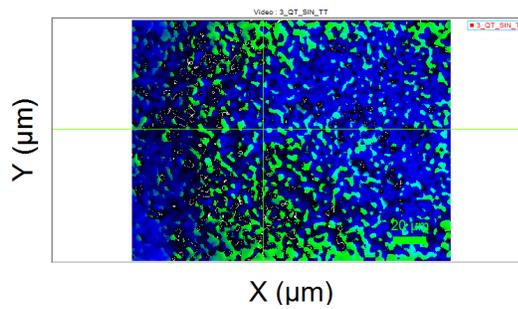
Figura 3-2: (Continuación).



Espectro y mapa zona 3



Raman shift (cm⁻¹)

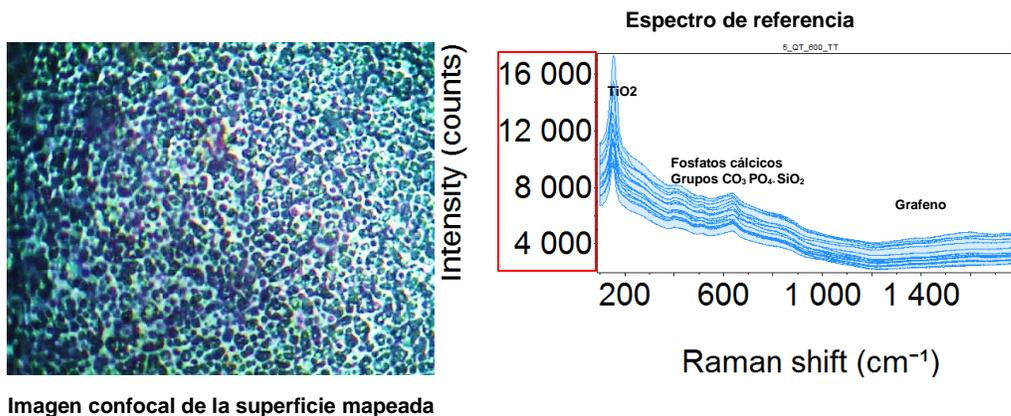


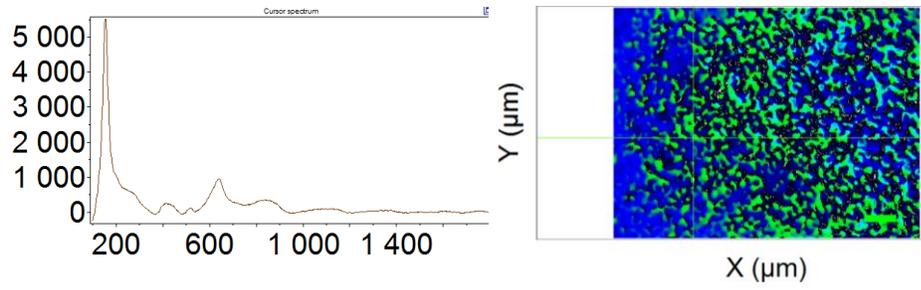
Mapeo Raman, 3QT_SIN_TT

La muestra 3 presentó el mismo fenómeno de aumento del orden cristalino para la fase de TiO_2 con el tratamiento térmico realizado a 600°C , relación que pudo observarse en la intensidad del pico asociado, validando además, con el espectro de referencia y las zonas evaluadas, una variación de éste y los demás elementos integrados al recubrimiento, dada la disposición heterogénea de los mismos que continúa exhibiendo una estructura más amorfa (que cristalina, respecto a la estructura del TiO_2) para los elementos ubicados en las bandas de $200\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$.

La Figura 3-3 expone los resultados del mapeo composicional obtenidos por espectroscopía Raman confocal de 3 zonas distintas de la superficie del recubrimiento de la muestra 5 con tratamiento térmico a 600°C y tratamiento por plasma, 5_QT_600_TT. También se muestra un espectro y mapeo general de la muestra 5 sin tratamiento por plasma y sin tratamiento térmico, 5_SINQT_SINTT.

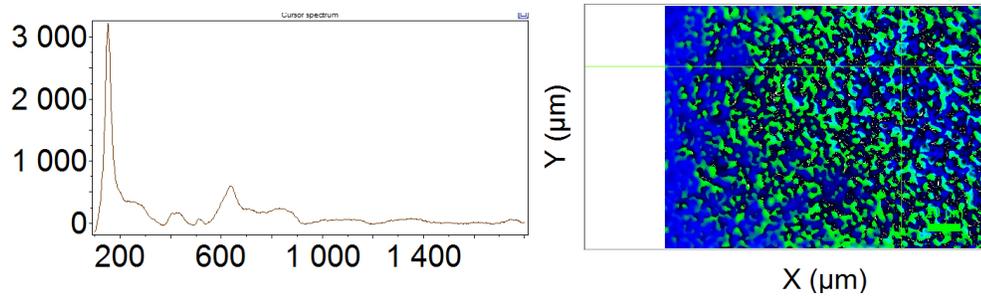
Figura 3-3: Resultados del mapeo espectral de 3 zonas de la muestra 5_QT_600_TT, y mapeo general de la muestra 5_SINQT_SINTT.



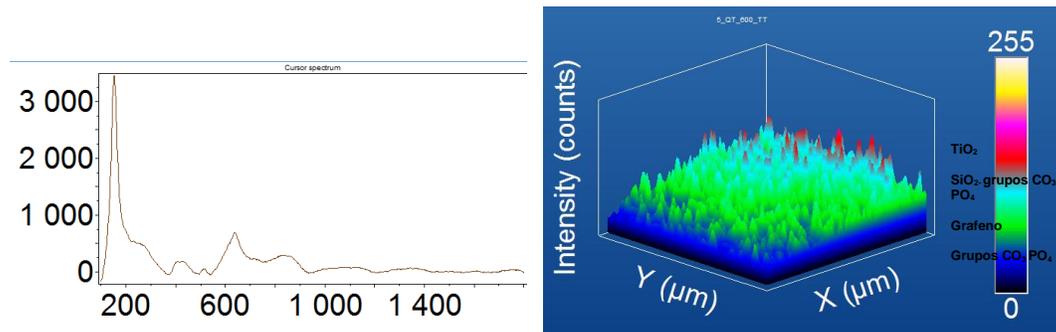


Espectro y mapa zona 1

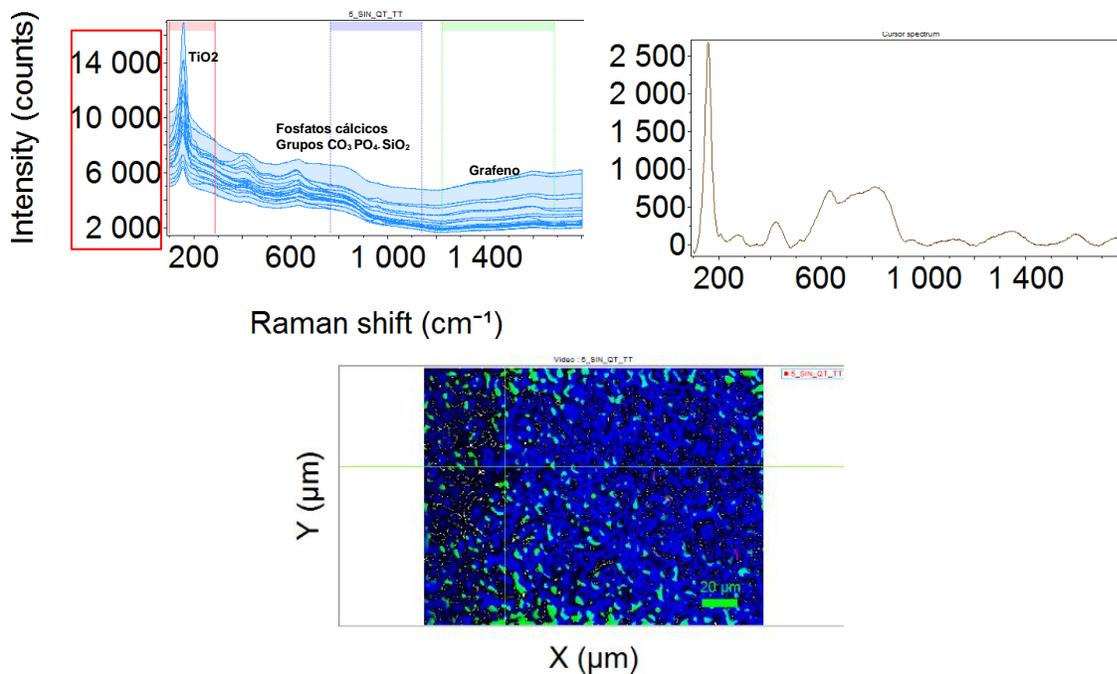
Figura 3-3: (Continuación).



Espectro y mapa zona 2



Espectro y mapa zona 3



Mapeo Raman, muestra 5_SINQT_SINTT

Los espectros de referencia de la muestra 5 con y sin tratamiento térmico y por plasma exhiben un comportamiento semejante al de las muestras 2 y 3, con una tendencia al aumento de la cristalinidad con el tratamiento térmico a 600°C, resultado congruente con los espectros de difracción de rayos X analizados previamente, Figura 2-1. En éstos se evidenció la formación de TiO₂ en fase anatasa principalmente (dado que se formó también algunas fases de rutilo), con un pico muy definido para la muestra 5_600_TT, resultado consecuente con la baja resistencia de polarización presentada en la

Figura 3-7. El mapeo Raman al realizar el análisis composicional desde el modo espectral, realizó un barrido superficial con el láser, permitiendo detectar de forma general y focalizada la distribución elemental de los componentes del recubrimiento; de esta manera, los espectros y mapas Raman lograron confirmar que la muestra 5 con tratamiento térmico y de plasma por descarga intensa de gas ionizante, exhibe mayor cristalinidad que la muestra 3, teniendo un comportamiento electroquímico (Figura 3-5) similar a la muestra 2QT_600_TT (muestra 2 con tratamiento térmico y por plasma).

Finalmente, el análisis de los mapas espectrales permitieron concluir en conjunto con las otras técnicas de caracterización expuestas en los capítulos 1 y 2, la integración heterogénea de los elementos constituyentes del recubrimiento, el cual permitió por el método de oxidación por plasma electrolítico obtener un recubrimiento biocerámico rico en fosfatos cálcicos, con una estructura amorfa predominante; de igual manera, se validó la incorporación exitosa del grafeno y el silicio a la estructura cerámica. Los mapas de apariencia 3D, a diferencia de los mapas 2D que exponen la distribución elemental principalmente de los fosfatos cálcicos, el silicio y el grafeno, permite observar también, dado el factor de profundidad, la presencia de TiO_2 captada por el espectrofotómetro Raman. De esta manera se tiene un mapa con unas intensidades que representan espacialmente la distribución elemental de las muestras y zonas evaluadas, en las que las diferencias espectrales mostraron variación en la intensidad de los picos asociados al TiO_2 , componente cristalino del recubrimiento, y también en los compuestos de estructura principalmente amorfa integrados al recubrimiento, observando además, que en algunas zonas del espectro se define mejor la presencia de grafeno, resultado acorde con los resultados del mapeo EDS, capítulo 2, en los que se encontró algunos cúmulos de grafeno en la estructura.

3.3.3 Análisis por espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE) de los recubrimientos biocerámicos y la capacidad de adsorción de Ca^{2+} y PO_4^{3-} .

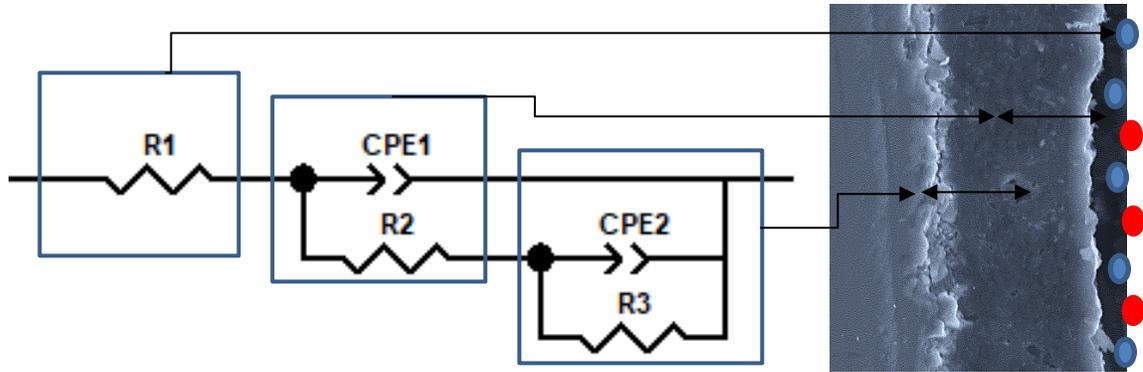
La espectroscopía de impedancia electroquímica es una técnica ampliamente utilizada en el estudio y caracterización de biomateriales y sistemas electroquímicos dada la

versatilidad y sensibilidad que presenta. Permite evaluar la corriente e impedancia de transferencia de un sistema de interés, aplicando un potencial eléctrico y una frecuencia variable, que continúa con el análisis de la respuesta en corriente de la celda electroquímica. Teniendo como resultado la impedancia de transferencia electroquímica del material evaluado en forma de números complejos, los cuales se evalúan y analizan mediante diferentes modelos matemáticos y/o esquemas eléctricos [38-39]. Para el análisis de la información obtenida es importante comprender la interacción del sistema material-medio, por medio de la analogía que se hace con el modelo de circuito eléctrico seleccionado, Figura 3-4.

Partiendo del análisis puntual que se quiso realizar en el presente estudio, se resalta que técnicas como EIE ha sido utilizada como método de caracterización de recubrimientos, dada la información que es capaz de proporcionar, respecto a la capacidad de interacción biomaterial-electrolito, propiedad que expone la cinética de transferencia tanto del biomaterial con el medio, como de la influencia de la estructura y las propiedades de la interfase del material y la celda electroquímica. Factores que promueven el uso de esta técnica como un modelo de evaluación *in vitro* para el estudio del comportamiento electroquímico de diversos materiales en contacto con fluidos fisiológicos [38].

Anteriormente se había mencionado que para el análisis de los resultados se hace necesario la interpretación de los espectros de impedancia a través de circuitos electrónicos equivalentes, los cuales permiten simular los sistemas reales partiendo de los datos obtenidos por EIE, de esta manera, para el presente estudio se seleccionó el circuito electrónico equivalente graficado en la Figura 3-4.

Figura 3-4: Esquema del circuito equivalente utilizado para el análisis y simulación en Zview, de los resultados obtenidos con EIE.



La nomenclatura correspondiente al circuito seleccionado es: $R_s-(Q_1/(R_1-(Q_2/R_2)))$, donde R_s hace referencia a la resistencia de la solución y Q_x a las capacitancias representadas en el circuito de la Figura 3-4, como elementos de fase constante que representan las heterogeneidades de las interfases correspondientes a nivel físico. Cuando se tiene un circuito equivalente con grupos RC en paralelo, es porque se tiene la presencia de una subcapa externa porosa y una subcapa interna compacta, las cuales se relacionan por su naturaleza del catión común, titanio, tal como sucede con el recubrimiento evaluado. Este es uno de los circuitos más utilizados y de los que mejor se ajusta a los datos experimentales de EIE. En el circuito utilizado para el proceso de simulación en Zview, Figura 3-4, R_1 representa la resistencia del electrolito y el comportamiento óhmico generado por la migración de iones, que se genera no sólo en el electrolito sino también en el recubrimiento; CPE_1 expone el efecto capacitivo del recubrimiento, actuando como un dieléctrico que separa algunas de las cargas del electrolito (SBF) del recubrimiento; R_2 es la resistencia del recubrimiento y como tal del circuito RC, que evalúa el comportamiento estructural y poroso de la superficie estudiada; el siguiente circuito RC representa la interface generada por el SBF al entrar en contacto con al material del recubrimiento y los poros que lo constituyen, en el que R_3 , representa la resistencia de polarización [37] [39].

A continuación, la Figura 3-5 relaciona los espectros de Nyquist obtenidos del proceso de simulación en Zview de las muestras 2, 3 y 5 con tratamiento térmico a 600°C y tratamiento por plasma, también se exponen los resultados de las muestras 2 y 3 sin tratamiento térmico y con tratamiento por plasma, esto, con el objetivo de observar la influencia del tratamiento térmico en conjunto con el tratamiento por plasma, el cual generó un cambio a nivel superficial sobre las propiedades de humectabilidad.

Figura 3-5: Espectro de Nyquist de los resultados de EIE, de las muestras 2_QT_600, 2_QT_SIN_TT, 3_QT_600, 3_QT_SIN_TT, 5_QT_600 y 5_QT_600 (muestras tratadas con plasma), a-b) corresponde a imágenes aumentadas del diagrama de Nyquist.

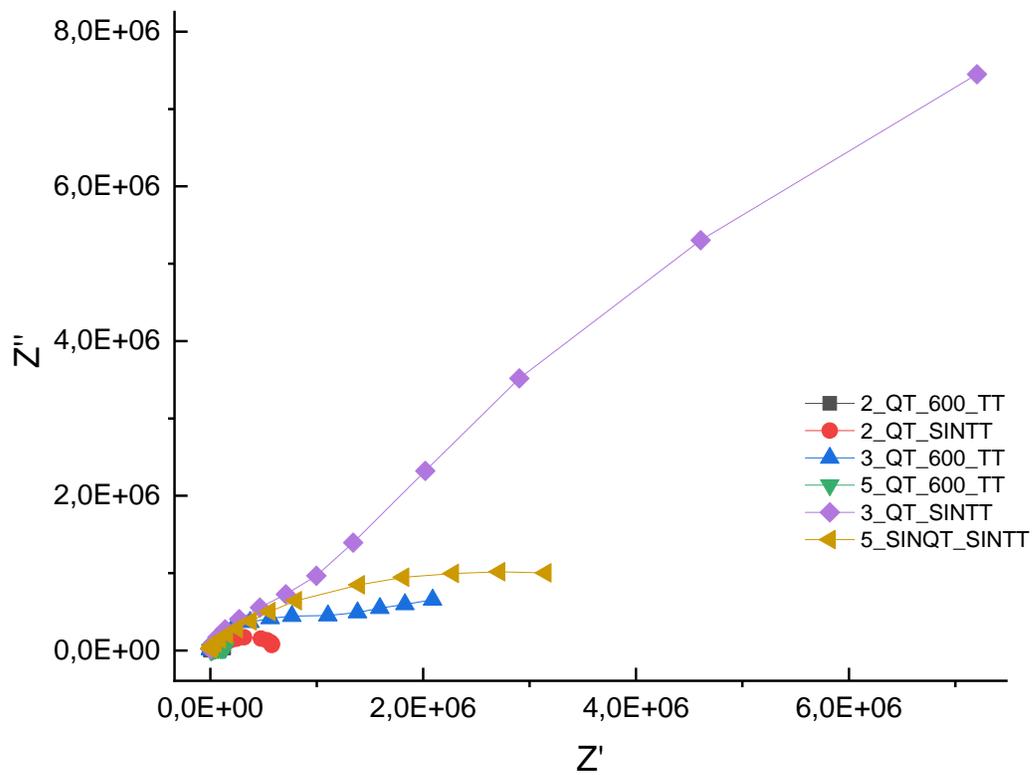
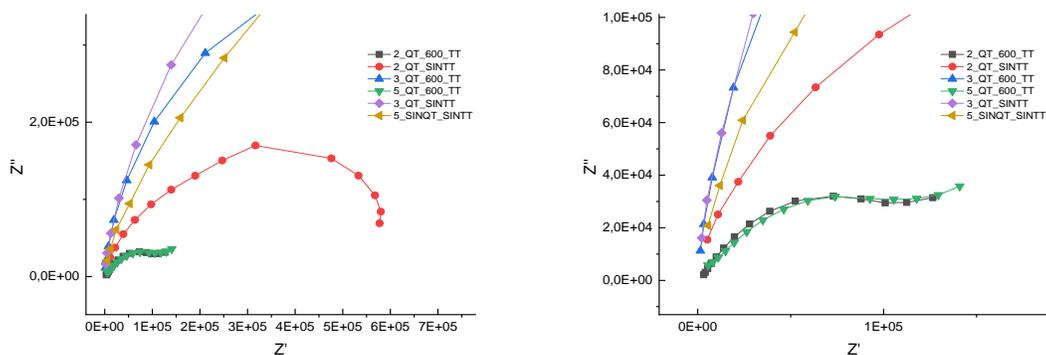


Figura 3-5: (Continuación).

a)

b)



Los diagramas de Nyquist representan el comportamiento y funciones de transferencia generados por los recubrimientos biocerámicos al interactuar con el SBF, reacciones que se evaluaron a través del sistema de la celda electroquímica y el análisis efectuado con el modelo de circuito equivalente. En principio, los diagramas exponen la formación de unos semicírculos, los cuales tienen una mayor o menor depresión de acuerdo con la resistencia de polarización (R_p) generada en el sistema (a menor R_p , más pequeño el semicírculo). Este parámetro está relacionado con la compactidad y capacidad de estructuración cristalina del recubrimiento, los cuales, de acuerdo con los resultados obtenidos por medio del mapeo espectral Raman, mostraron que las muestras 2 y 5 con tratamiento térmico y por plasma de descarga intensa de gas ionizante, presentaron una mayor formación de cristalitas de TiO_2 anatasa, logrando conformar un recubrimiento biocerámico con mayor cristalinidad. Estos resultados permitieron comprender aún más el efecto no sólo del tratamiento térmico, sino también del grafeno sobre la estructura, el cual, al sufrir un proceso de funcionalización, por la interacción que tiene con el oxígeno y los iones fosfato, calcio y silicio en la reacción PEO, promueve una mayor compactidad, a medida que se alcanza un equilibrio en la participación de este. Es importante tener presente que, a mayor cantidad de grafeno menor es la estructuración del componente biocerámico, se genera mayor porosidad, y se tiene también un efecto de reducción de la energía superficial. De este modo, al analizar los diagramas de Nyquist, se confirmó que las muestras 2_QT_600_TT y 5_QT_600_TT, mostraron una menor resistencia a la polarización, lo que indica una mayor interacción de los iones del SBF con los compuestos del recubrimiento, reacción que promueve la formación de apatitas.

La Tabla 3-2 muestra los valores cuantitativos de cada uno de los elementos asociados al circuito electrónico equivalente simulado en el *software Zview*.

Tabla 3-2: Valores de resistencia de la solución electrolítica R1, resistencia de polarización Rp (equivalente a R12+R3), y elementos de fase constante CPE (que representan las capacitancias y el coeficiente de idealidad n).

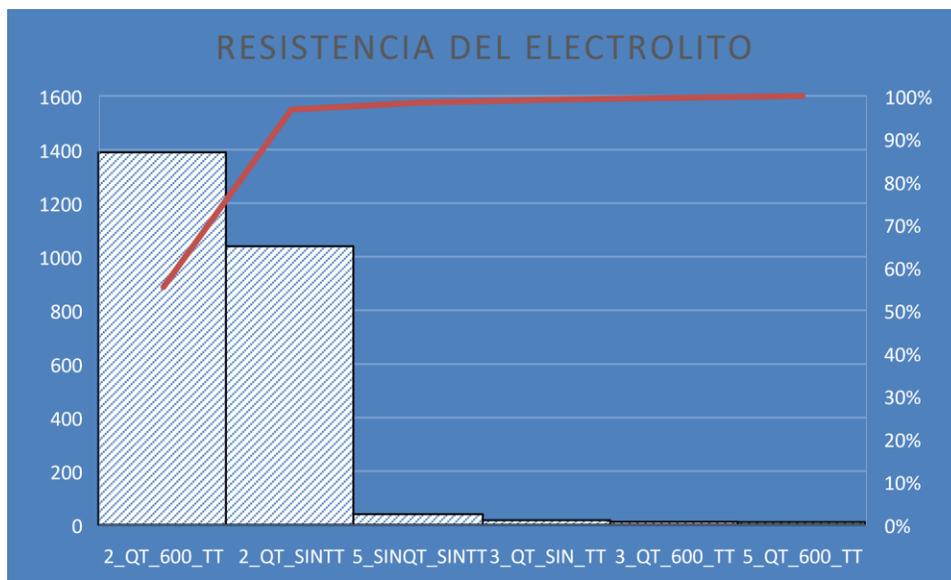
Elementos	Muestras					
	2_QT_600_TT	2_QT_SINTT	3_QT_600_TT	5_QT_600_TT	5_SINQT_SINTT	3_QT_SINTT
R1 (Ωcm^2)	1390	1039	11,54	10	40	17,31
CPE1-T (F/cm^2)	2,74E-07	2,69E-10	4,68E-10	3,20E-07	4,00E-10	5,98E-10
CPE1-P (F/cm^2)	0,55534	0,956	0,94049	0,46382	0,89796	0,89382
R2 (Ωcm^2)	135840	51062	1000	158260	80000	965030
CPE2-T (F/cm^2)	1,87E-06	5,75E-08	2,17E-07	3,00E-06	3,92E-08	1,08E-08
CPE2-P (F/cm^2)	0,98	0,51301	0,21951	0,7774	0,44448	0,67243
R3 (Ωcm^2)	38291	631950	1,26E+07	150000	5,32E+06	3,75E+07
Chi-cuadrado	3,37E-04	1,46E-03	4,81E-05	7,70E-04	2,32E-04	7,85E-04
r1 (s)	3,72E-02	1,37E-05	4,68E-07	5,07E-02	3,20E-05	5,77E-04
r2 (s)	7,16E-02	3,63E-02	2,74E+00	4,50E-01	2,09E-01	4,06E-01

Al observar los resultados cuantitativos de la Tabla 3-2 obtenidos del proceso de simulación de los datos experimentales con el circuito equivalente seleccionado y utilizado en el *software Zview*, teniendo presente que los materiales inertes exponen comportamientos netamente capacitivos, se valida en principio, que las capacitancias obtenidas con los elementos de fase constante son realmente muy pequeñas, del orden de los micro y nano faradios, razón que indica que los recubrimientos tienden a tener un comportamiento más de carácter activo, razonamiento que se confirma con el análisis de los demás elementos constituyentes del circuito. Por su parte, los resultados de chi cuadrado del orden de 10×10^{-3} a 10×10^{-5} , denotan un ajuste estable de los datos simulados con el modelo de circuito equivalente evaluado. Cabe señalar, que el análisis del circuito equivalente se puede interpretar de varias formas, entre las cuales se tiene, dividir el circuito en 3 zonas y validar los datos obtenidos a qué reacciones se configuran, o analizar

el circuito como un todo, teniendo muy presente los elementos que lo constituyen. Para el presente estudio se analizó como un todo el circuito equivalente en sus componentes RC.

La Figura 3-6 expone los resultados cuantitativos relacionados con la resistencia R1 del electrolito de las muestras 2, 3, y 5 con tratamiento térmico a 600°C y con tratamiento por plasma; se relaciona también los resultados asociados a las muestras 2 y 3 con tratamiento por plasma y sin tratamiento térmico; finalmente, se muestra los resultados obtenidos para la muestra 5 sin tratamiento térmico ni tratamiento por plasma.

Figura 3-6: Diagrama del comportamiento de la resistencia del SBF al entrar en contacto con la superficie de los recubrimientos de las muestras 2_QT_600_TT, 2_QT_SINTT, 3_QT_600_TT, 3_QT_SINTT, 5_QT_600_TT y 5_SINQT_SIN600.



Tal como puede observarse en la Figura 3-6, la resistencia del electrolito R1 varía considerablemente, aun cuando se tiene la misma composición electrolítica del SBF, comportamiento que se asocia a la caída óhmica generada por el mecanismo de transferencia de iones y cargas del electrolito en contacto con el recubrimiento, interacción que genera la entrada y salida de electrones, en principio por parte del electrolito (lo que hace que no tenga siempre la misma resistencia), ya que se está generando una “captura” de iones del electrolito, el cual entra en contacto e interacciona con un recubrimiento de

naturaleza porosa. En este punto comienza a generarse una absorción de especies sobre la superficie, generando complejos entre los iones y elementos constituyentes del recubrimiento y el SBF, reacción que se confirma con los resultados aportados por los otros elementos del circuito equivalente.

La caída óhmica o de voltaje, $I \cdot R$, generada entre el electrodo de referencia y el de trabajo, es influenciada también por las propiedades conductoras del electrolito utilizado y La distancia entre estos electrodos, que para el presente estudio fueron las mismas condiciones de ensayo y de montaje de la celda electroquímica para las muestras evaluadas. Es importante tener presente que la distribución de corriente, el potencial del electrolito, la geometría de la celda, la posición de los electrodos y la conductividad de la solución electrolítica, son factores que se deben considerar al momento de evaluar los resultados obtenidos con los ensayos de EIE [36].

La

Figura 3-7 representa los diagramas asociados a los valores cuantitativos relacionados con la resistencia de polarización del sistema, equivalente a la sumatoria de las resistencias de los circuitos RC. De esta manera se muestra los resultados obtenidos para las muestras 2, 3, y 5, con tratamiento térmico a 600°C y con tratamiento por plasma, de igual manera, para las muestras 2 y 3, con tratamiento por plasma y sin tratamiento térmico, y la muestra 5, sin tratamiento térmico, ni tratamiento por plasma.

Figura 3-7: Diagrama de la resistencia de polarización total de las muestras 2_QT_600, 2_QT_SIN_TT, 3_QT_600, 3_QT_SIN_TT, 5_QT_600 y 5_SINQT_SIN600.

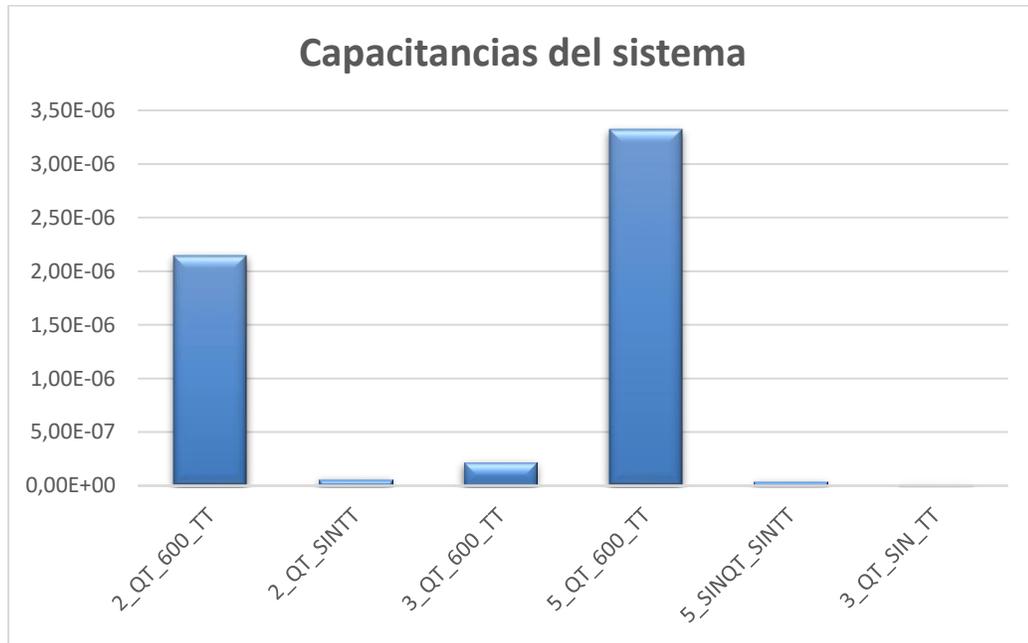


La resistencia de polarización y/o de transferencia de carga, tabla 3-6,

Figura 3-7, es en general un valor que se asocia también con la velocidad de reacción y con el proceso de corrosión. En los diagramas de Nyquist, Figura 3-5, se puede validar la relación que tienen los resultados obtenidos de la resistencia de transferencia de carga, con la depresión de los semicírculos de los diagramas, característica que se ve favorecida por los tratamientos térmicos realizados a 600°C, dada la disminución de la resistencia de polarización, es decir, la resistencia a la corrosión, siendo mayor este comportamiento en las muestras 2_QT_600 y 5_QT_600. En este punto es importante hacer énfasis en el comportamiento del recubrimiento y en las propiedades estructurales y cristalinas evaluadas previamente, ya que las propiedades de resistencia a la corrosión se promueven con la generación de los óxidos preferenciales de titanio, proceso que se produjo con el tratamiento de anodizado, realizado previamente al proceso de oxidación por plasma electrolítico. La disminución de los valores de R_p , en este caso hace alusión a la formación de complejos de los iones fosfato de la solución SBF con los iones silicio del recubrimiento, los fosfatos cálcicos y las nanopartículas de grafeno, promoviendo así una superficie más activa, capaz de promover la deposición de silanoles, dada la interacción del silicio con los grupos OH de la solución electrolítica, en conjunto con el intercambio de iones Ca, P y Na, reacciones que van generando la formación de apatita de naturaleza amorfa y/o cristalina, la cual promueve también la formación de apatita biológica. Este resultado es coherente con los tiempos de reacción τ y/o constantes de tiempo (C^*R), Tabla 3-2, que dan idea del tiempo que toma la variación de la densidad de corriente o de transferencia de carga, aspecto que se relaciona con la velocidad de corrosión, validando también, el comportamiento gráfico y del parámetro n (CPE-P) de las capacitancias [37-38].

A continuación, la Figura 3-8 representa los diagramas asociados a los valores cuantitativos de las capacitancias del sistema del circuito equivalente de las muestras 2, 3, y 5 con tratamiento térmico a 600°C y con tratamiento por plasma, de igual manera, para las muestras 2 y 3 con tratamiento por plasma y sin tratamiento térmico, y la muestra 5 sin tratamiento térmico ni tratamiento por plasma.

Figura 3-8: Diagrama de la sumatoria de las capacitancias del sistema de las muestras 2_QT_600, 2_QT_SIN_TT, 3_QT_600, 3_QT_SIN_TT, 5_QT_600 y 5_QT_600.



Como puede observarse en el gráfico de capacitancias del sistema, Figura 3-8, los resultados se mantienen, en forma general, en el orden de 10×10^{-7} y 10×10^{-8} , siendo éstas muy pequeñas, pero no como para afirmar que se tiene un sistema completamente resistivo, tal como pudo validarse con los resultados de las resistencias de polarización, que son inversamente proporcional a los resultados de las capacitancias.

Un dato que permite comprender también el comportamiento gráfico de los diagramas de Nyquist, es el valor de CPE1-P, para altas frecuencias, y CPE2-P para bajas frecuencias, llamándolos parámetro n de la impedancia, los cuales permiten observar la variación que se genera con los elementos de fase constante utilizados para el análisis de las capacitancias, estos obtienen valores de 0-1, como puede constatarse con los datos de la Tabla 3-2, factor que aplanar o aumenta el radio del semicírculo de los diagramas de Nyquist, lo que relaciona el comportamiento general de las muestras analizadas por medio del circuito electrónico equivalente y que data del aumento o disminución de la parte imaginaria de la impedancia, teniendo que, valores de $n=0$ expone un comportamiento de resistencia pura y $n=1$ una capacitancia pura. De esta manera, se relaciona este parámetro con los resultados obtenidos de las capacitancias del sistema, resistencias de polarización y tiempos de reacción τ . Los elementos CPE, de fase constante, permiten obtener muy

buenos ajustes, especialmente para materiales que exponen rugosidades, porosidad y procesos de difusión [37-39] [45].

3.4 Adhesión celular.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los procesos de caracterización y conforme al análisis realizado por EIE, se dio paso a la realización de cultivos celulares, con el objetivo de constatar el comportamiento bioactivo de las muestras que mejores resultados expusieron y su capacidad de promover la adhesión celular. De esta manera, se realizó un cultivo de células de osteosarcoma humano (HOS, ATCC CRL-1543) sobre las muestras 2_QT_600_TT y 5_QT_600_TT, las cuales mostraron por medio del análisis realizado por espectroscopía de impedancia electroquímica, capacidad bioactiva para la formación de apatita sobre su estructura.

3.4.1 Preparación de las muestras.

Las células de osteosarcoma humano fueron mantenidas en cajas de cultivo con medio RPMI-1640, suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado y 1% de penicilina/estreptomicina, en una atmosfera de 5% de CO₂, 95% de humedad, y a una temperatura de 37°C. Una vez se alcanzó el 90% de confluencia celular (3 días de cultivo), las células fueron sub-cultivadas mediante el desprendimiento celular con tripsina-EDTA.

Las muestras fueron esterilizadas en autoclave a 121°C y 6.8 Kg, en un ciclo de duración de 30 minutos, posterior a esto se realizó el sub-cultivo. Se continuó con la evaluación de la adherencia cualitativa de las células sobre las superficies de los recubrimientos evaluados, observando las características generadas mediante microscopía de epifluorescencia; para esto, las células en fase de crecimiento exponencial (1,5x10⁴ células/ml) se colocaron sobre la superficie de los recubrimientos y se incubaron durante 48 horas. Luego del proceso de incubación las células fueron marcadas con tinción para fluorescencia, DILC18 (1,1'-dioctadecil-3,3,3', 3'-tetrametilindocarbocianina perclorato) para las membranas y Hoesch 33342 para los núcleos celulares. Finalmente, las células

fueron fijadas con paraformaldehído 2%. Las muestras se lavaron con PBS pH =7,2 antes y después de cada proceso, con el fin de retirar restos de reactivos. El análisis del comportamiento celular generado sobre los recubrimientos se examinaron en el microscopio de epifluorescencia (OLYMPUS BX43F), utilizando filtros UV2A (Ex=330-380, DM=400, BA=420).

3.4.2 Evaluación y resultados de adhesión celular.

A continuación, la Figura 3-9 y la Figura 3-10 muestran las micrografías tomadas con el microscopio de epifluorescencia OLYMPUS BX43F con los objetivos de 10X y 40X, de las células de osteosarcoma humano adheridas sobre las superficies de los recubrimientos 2 y 5 con tratamiento térmico a 600°C y tratamiento por plasma de descarga intensa de gas ionizante. Con estas micrografías fue posible evaluar la confluencia generada, nivel cualitativo de adhesión y la capacidad bioactiva para promover la organización y extensión del citoesqueleto celular.

Figura 3-9: Micrografías con objetivo de 10X, de células HOS adheridas a los recubrimientos. Control (A), 2_QT_600_TT (B), 5_QT_600_TT (C).

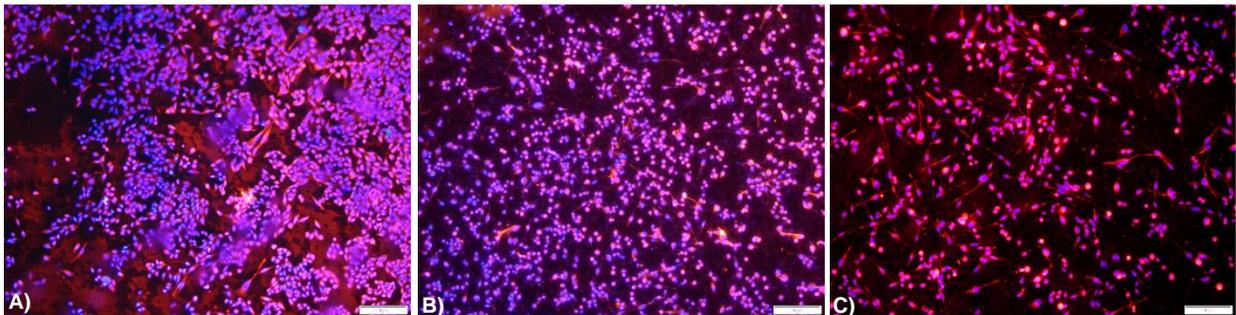
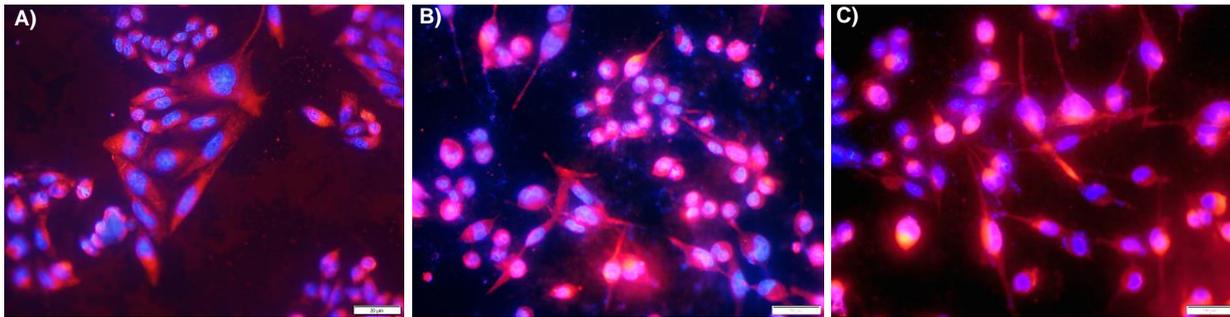


Figura 3-10: Micrografías con objetivo de 40X, de células HOS adheridas a los recubrimientos. Control (A), 2_QT_600_TT (B), 5_QT_600_TT (C).



En condiciones óptimas las células HOS mostraron una morfología celular de extenso citoplasma (tinción roja/naranja) y núcleo grande (tinción azul) sin condensación o fragmentación del material genético [46-47]. Luego de 48 horas de incubación sobre los recubrimientos biocerámicos evaluados y la muestra control (lámina circular de vidrio), se observó que las células cultivadas sobre la muestra control alcanzaron una morfología normal, con una confluencia celular del 90% aproximadamente, ver Figura 3-9 y Figura 3-10. Las células cultivadas sobre las superficies de los recubrimientos 2_QT_600_TT y 5_QT_600_TT (micrografías B y C respectivamente), mostraron una morfología similar al caso de la muestra control, con una ligera disminución en la confluencia celular, principalmente para la muestra 5_QT_600_TT, reacción que se asoció, no sólo a las diferencias morfológicas presentadas por el recubrimiento, sino también, a la relación calcio fósforo obtenida (Ca/P 1.22), respecto a la muestra 2_QT_600_TT (Ca/ P 1.37), teniendo presente también, el efecto del tratamiento por plasma de descarga intensa de gas ionizante, que para el caso de la muestra 5 promovió una energía superficial menor que la muestra 2.

Algunos estudios reportan la capacidad de adhesión, proliferación celular y de expresión de marcadores de osteogénesis que proporciona el grafeno a recubrimientos biocerámicos como la hidroxiapatita. Al tener un grafeno funcionalizado en la estructura del componente

biocerámico del recubrimiento, se está proporcionando más factores que permiten a las células interactuar con el recubrimiento. Esto promueve la capacidad de adhesión, proliferación y diferenciación celular, y de osteogénesis. Recubrimientos de grafeno oxidado con partículas de sílice mejoran la mineralización ósea, dada la promoción en la actividad biológica de proteínas. Andamios cerámicos reabsorbibles de fosfatos cálcicos funcionalizado con grafeno promueven la osteogénesis in vitro; de acuerdo con algunas investigaciones, este puede incluso promover la formación de hueso al estar en presencia de células como las de estroma de médula ósea. Son varias las ventajas que se encuentran con el uso de grafeno para la síntesis de recubrimientos biocerámicos, sin embargo, es de vital importancia comprender que de acuerdo con los % que se utilicen, el grafeno podría promover procesos inflamatorios adecuados o no para el tejido, ya que en algunos casos puede provocar apoptosis y defectos morfológicos. El tipo y la concentración de grafeno presenta una relación directa con el nivel de biocompatibilidad y de bioactividad que se quiere promover en el material, especialmente cuando este se utilice in vivo [58-60].

3.5 Discusión y Conclusiones.

Este último capítulo además de gráfico es muy cuantitativo, dado los datos y diagramas obtenidos, que permitieron contemplar con mayor claridad la información adquirida con las técnicas de caracterización y evaluación utilizadas, y así correlacionar mejor esta información con las interacciones y fenómenos generados en el material, como es el caso del análisis realizado por espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE), que en este proyecto, hizo la veces de ensayo invitro, para la evaluación del comportamiento de los recubrimientos biocerámicos, frente a la solución fisiológica simulada; reacción con la que se quiso valorar la capacidad del recubrimiento para generar intercambio iónico entre el recubrimiento y el electrolito, y con ello vislumbrar la capacidad de formación de estructuras bioactivas. Partiendo de los procesos de caracterización realizados previamente, se denotan comportamientos realmente prometedores, en especial para los recubrimientos sintetizados con 0.3% y 0.1% de grafeno, y los tratamientos térmicos realizados a 600°C (muestra 2 y 5). Tal como se mencionó en el capítulo 2, cuando se quiere desarrollar un biomaterial, son varios los factores esenciales que se deben evaluar, a nivel químico- composicional, estructural, topográfico, mecánico, entre otros, en este

proyecto se buscó tener un equilibrio entre varias de las propiedades evaluadas, a nivel morfológico, estructural, superficial y elemental, por esta razón se optó por implementar varias técnicas de caracterización y por realizar un tratamiento adicional al térmico, el tratamiento por plasma de descarga intensa de gas ionizante, el cual tuvo un efecto directo sobre las propiedades de humectabilidad y de energía superficial del recubrimiento, constatando que el método que mejores resultados expone, es el Glow Discharge -Ve, ya que permitió aumentar los valores de energía superficial, reduciendo con ello los valores de ángulo de contacto; estos efectos, exponen una herramienta muy útil para el control y/o manipulación de las propiedades de mojabilidad, de acuerdo a las necesidades y/o valores requeridos.

El análisis zonal realizado por mapeo confocal Raman, de las muestras 2, 3 y 5, tratadas a 600°C y con modificación de propiedades de humectabilidad superficial (aspecto que no influye en la composición y análisis elemental), valida en conjunto con los espectros Raman de referencia para cada una de las muestras, la composición elemental de los recubrimientos, apoyando los resultados obtenidos con el mapeo elemental EDS y como tal los espectros de EDS. Esta técnica a diferencia de las otras permitió observar con mayor claridad y resolución la disposición heterogénea de los elementos constituyentes del recubrimiento biocerámico, TiO_2 , SiO_2 , grupos CO_3 PO_4^- CO_3 PO_4 y grafeno, validando la distribución espacial (no cuantitativa) de los mismos, factor que no se lograba evidenciar con tanta precisión en los mapas *EDS*. Esta técnica de mapeo aún es poco explorada, dada las pocas referencias encontradas al respecto, sin embargo, fue una técnica pertinente, como método de caracterización, dada la aplicabilidad que puede tener en el estudio de biomateriales.

Por su parte, el ensayo realizado con EIE y el análisis elaborado de la información obtenida por medio del circuito equivalente simulado en el software Zview, favoreció la comprensión de la interacción generada entre el material y el medio, es decir, el recubrimiento y la solución fisiológica simulada. Con los resultados cuantitativos generados por los elementos del circuito equivalente, se pudo evaluar la resistencia del electrolito frente al recubrimiento de cada una de las muestras evaluadas, la resistencia de polarización y las capacitancias del sistema, además de la constante de tiempo, $\tau = RC$. Esta información en conjunto con los diagramas de Nyquist, destacó el interesante comportamiento de las muestras, especialmente de las muestras 2 y 5, tratadas a 600°C y con tratamiento por plasma de descarga intensa de gas ionizante, las cuales mostraron una depresión importante de los

semicírculos, aspecto que da razón de una estructura más activa, ya que este comportamiento está asociado a la formación de complejos entre los iones constituyentes del electrolito fisiológico y los elementos del recubrimiento, favoreciendo la formación de grupos fosfatos y calcio, que proveen de señales más activas al recubrimiento. El análisis anterior se logró confirmar con los cultivos de células de osteosarcoma humano (*HOS*), realizado sobre los recubrimientos 2_QT_600_TT y 5_QT_600_TT, los cuales, respecto a la muestra control, presentaron una adherencia y morfología celular similar, con una disminución de la confluencia celular, principalmente para la muestra 5_QT_600_TT, dadas las diferencias morfológicas, estructurales y químicas que tienen ambos recubrimientos, validando de igual manera, las competencias que demuestran tener como recubrimientos biocerámicos activos sintetizados sobre Ti6Al4V.

4. Conclusiones generales y recomendaciones

4.1 Conclusiones generales

La obtención de los recubrimientos por el método de oxidación por plasma electrolítico-PEO, permitió sintetizar recubrimientos de naturaleza porosa con la integración de los iones y partículas utilizados en las soluciones electrolíticas (Figura 1-7), promoviendo así la formación de complejos de óxido de silicio, silicato de calcio, fases cristalinas de anatasa, algunas de rutilo, y fases de apatita carbonatada, desarrollando de esta manera un recubrimiento biocerámico con la estructura equivalente a un fosfato tricálcico alfa, con nanopartículas de grafeno en su composición. En este proceso de investigación fue interesante validar el influjo no sólo de los tratamientos térmicos evaluados, sino también de los porcentajes de grafeno utilizados, dando paso a métodos como el tratamiento por plasma de descarga intensa de gas ionizante, para la modificación de propiedades de humectabilidad de la superficie, característica afectada en gran parte por los % de grafeno evaluados.

En principio se evaluó la adecuada formación de un recubrimiento rico en fosfatos cálcicos, con la generación de complejos de óxido de silicio, silicato de calcio, y la integración de nanopartículas de grafeno, el cual tuvo una influencia directa, en conjunto con el tratamiento térmico, sobre la relación calcio fósforo obtenida para cada una de las muestras y sobre algunos efectos morfológicos. De esta manera se generó efectos sobre la estructura del recubrimiento, como la disminución en la cantidad de grietas formadas, a medida que aumentaba el porcentaje del alótropo de carbono. Cabe mencionar que el tratamiento térmico a 600°, respecto al de 400°, permitió una mejor estructuración del componente biocerámico, dadas las relaciones Ca/P obtenidas, logrando resultados prometedores, principalmente en las muestras 2 (Ca/P: 1.37) y 5 (Ca/P: 1.22).

A medida que aumentaba la cantidad de grafeno, éste ciertamente generaba una especie de solapamiento sobre el recubrimiento biocerámico, ya que, aún con el tratamiento térmico a 600°C, disminuía la relación Ca/P, comportamiento que se evidenció aún más en la muestra 4, recubrimiento con mayor contenido de grafeno, 0.9%; esta muestra particularmente, a diferencia de las demás, en las que la relación Ca/P aumentó con el tratamiento térmico a 600°, la relación Ca/P para la muestra 4 disminuyó, lo que da razón del proceso de oxidación y exfoliación del grafeno en el proceso *PEO*, de la promoción de un mayor rompimiento dieléctrico en la reacción, y del influjo del tratamiento térmico sobre el mismo, reacción que promueve un mayor anclaje del grafeno sobre la estructura, situación que puede validarse también a nivel morfológico, con la alta cantidad de poros pequeños y de tipo cráter, la poca presencia de grietas y el daño generado en algunas zonas del recubrimiento, Figura 2-23. El anterior comportamiento permite inferir el efecto generado sobre la muestra 5, con 0.1% de grafeno, tratada a 600°C, dado que presentó un recubrimiento con % de poros promedio menor, de mayor tamaño y más cantidad de grietas, efectos asociados a la baja capacidad elástica que aportó el % las nanopartículas de grafeno, siendo esta la relación más baja, sin embargo, al utilizar menos cantidad, se disminuyó el efecto de solapamiento sobre los demás compuestos, obteniendo una relación Ca/P de 1.22, mejor que la muestra 2 tratada a 400°C, Figura 2-5.

Otra característica que se evaluó en este proceso fueron las propiedades de humectabilidad de la superficie; partiendo de las muestras sin contenido de grafeno, se encontró que la temperatura aumentaba el ángulo de contacto en ambos tratamientos, especialmente en el tratamiento térmico a 400°C, aunque para la muestra 1, con 0% de grafeno, respecto a 600°C, se tuvo resultados muy equivalentes, lo que indica que el anterior comportamiento se genera principalmente en los recubrimientos con contenido de grafeno. Así, las muestras, con 0.1%, 0.3%, 0.6%, y 0.9% de grafeno, aumentaron el ángulo de contacto, a medida que aumentaba la participación del grafeno en la estructura biocerámica. Para el anterior fenómeno, se utilizó el tratamiento por plasma de descarga intensa de gas ionizante, de manera que se pudiese tener control sobre la modificación de las propiedades de humectabilidad del recubrimiento, sin sacrificar las relaciones calcio fósforo obtenidas. Inicialmente, el tratamiento por plasma se validó con el método Glow Discharge $Ve+$, teniendo como resultado que éste aumentaba considerablemente el ángulo de contacto de la superficie, llevándola a un comportamiento altamente hidrofóbico (con ángulos mayores a 90°), situación poco favorable para las células, ya que evita la

adsorción de proteínas y la adhesión celular, generando muerte celular; al observar este efecto, se cambió el parámetro de tratamiento por Glow Discharge Ve-, con el cual se logró recuperar propiedades de humectabilidad, mejorando las energías de superficie de las mismas, de esta manera, se comprobó que para obtener energías superficiales, por ejemplo de 60 a 70 mJ/m² aproximadamente, el tratamiento con el que se puede lograr, es con GD Ve-. Finalmente, el estudio y análisis realizado por espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE), confirmó, en conjunto con los resultados obtenidos en los procesos de caracterización previos, el comportamiento bioactivo del recubrimiento. Lo anterior, gracias al análisis realizado con la simulación de los resultados EIE, con el circuito equivalente en el software Zview. La EIE, a modo de ensayo invitro, permitió evaluar por medio del montaje de una celda electroquímica con SBF, y el uso un potencial eléctrico y frecuencias variables, la capacidad de interacción de los iones del recubrimiento con los de la solución fisiológica simulada, razón que da idea de las propiedades de bioactividad del material analizado, obteniendo resultados muy prometedores para las muestras 2 y 5 tratadas térmicamente a 600°C y con plasma por descarga intensa de gas ionizante. Este análisis, se confirmó con los resultados obtenidos de los cultivos de células de osteosarcoma humano (HOS), los cuales permitieron confirmar la capacidad de estos recubrimientos biocerámicos, Figura 3-9 y Figura 3-10, de promover la adhesión celular y disposición del citoesqueleto celular, al tener un extenso citoplasma y núcleo grande sin condensación o fragmentación del material genético [46-47].

4.2 Recomendaciones

Sería importante, además de interesante, evaluar la misma formulación del recubrimiento biocerámico, con 0.1% de grafeno y 0.3%, pero variado el % de silicio; realizando tratamientos térmicos en un rango de temperatura de 600 a 850°C, dado que a mayores temperaturas se obtienen más transformaciones de fases rutilo. Resulta significativo concentrarse en un par de técnicas de caracterización, utilizando más ampliamente las herramientas e información que se pueden obtener con espectroscopía de impedancia electroquímica. Se recomienda también, para futuros estudios, evaluar la formación de cristales de apatita en diferentes tiempos, luego de tener los recubrimientos biocerámicos

embebidos en solución SBF, y aumentar la cantidad de cultivos celulares invitro, realizando también pruebas de citotoxicidad, y en lo posible ensayos in-vivo. Otro aspecto enriquecedor, sería enfocar la aplicación a un área del tejido óseo en específico o como tal un campo de intervención, como el odontológico u ortopédico, para realizar también, y de manera más específica, estudios de propiedades mecánicas y eléctricas.

5. Bibliografía

- [1] M. Plaza Torres and W. Aperador, "Nuevos materiales para mejorar los niveles de corrosión," *Rev. Cuba. Investig. Biomédicas*, vol. 34, no. 3, pp. 0–0, 2015, Accessed: Jan. 23, 2022. [Online]. Available: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002015000300007&lng=es&nrm=iso&tlng=es.
- [2] R. Oriňaková, R. Gorejová, Z. O. Králová, and A. Oriňak, "Surface modifications of biodegradable metallic foams for medical applications," *Coatings*, vol. 10, no. 9. MDPI AG, Sep. 01, 2020, doi: 10.3390/coatings10090819.
- [3] R. Gorejová, L. Haverová, R. Oriňaková, A. Oriňak, and M. Oriňak, "Recent advancements in Fe-based biodegradable materials for bone repair," doi: 10.1007/s10853-018-3011-z.
- [4] infosalus. "¿Existe riesgo de que los metales de los implantes se acumulen en el tejido óseo?" infosalus.com. <https://www.infosalus.com/asistencia/noticia-existe-riesgo-metales-implantes-acumulen-tejido-oseo-20200812133145.html> (accedido el 23 de enero de 2022).
- [5] M. Z. Ibrahim, A. A. D. Sarhan, F. Yusuf, and M. Hamdi, "Biomedical materials and techniques to improve the tribological, mechanical and biomedical properties of orthopedic implants – A review article," *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 714. Elsevier Ltd, pp. 636–667, Aug. 15, 2017, doi: 10.1016/j.jallcom.2017.04.231.
- [6] Balint R, Cassidy NJ, Cartmell SH. Electrical stimulation: a novel tool for tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* 2013 Feb;19(1):48-57. doi: 10.1089/ten.TEB.2012.0183. Epub 2012 Oct 9. PMID: 22873689.

- [7] I. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, M. Alobera Gracia, M. Canto Pingarrón and L. Blanco Jerez, "Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo", Scielo.isciii.es, 2021. [Online]. Available: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1698-69462006000100011. [Accessed: 01- Jun- 2021].
- [8] Q. Shi, Z. Qian, D. Liu, and H. Liu, "Surface Modification of Dental Titanium Implant by Layer-by-Layer Electrostatic Self-Assembly," *Front. Physiol.*, vol. 8, p. 574, 2017, doi: 10.3389/fphys.2017.00574.
- [9] C. Hernández Gervacio and D. Quiroz Ceballos, "'GRAFENO: ESTADO DEL ARTE'", CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN MATERIALES AVANZADOS, S. C., 2015. [Online]. Available: <https://cimav.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1004/607/1/-Tesis%20Claudia%20Hern%C3%A1ndez%20Gervacio%2C%20Dalia%20Quiroz%20Ceballos.pdf>. [Accessed: 16- May- 2021].
- [10] M. E. Moncada Acevedo, J. A. de la Cruz Saavedra, and C. R. Pinedo Jaramillo, "Los Campos Bioeléctricos Y Algunas Aplicaciones Médicas - Revisión," *Rev. ing. bioméd*, vol. 5, no. 9, pp. 50–59, 2011.
- [11] C. Chen, X. Bai, Y. Ding, and I.-S. Lee, "Electrical stimulation as a novel tool for regulating cell behavior in tissue engineering," *Biomater. Res.*, vol. 23, no. 1, p. 25, 2019, doi: 10.1186/s40824-019-0176-8.
- [12] N. Raura, A. Garg, A. Arora, and M. Roma, "Nanoparticle technology and its implications in endodontics: a review," *Biomater. Res.*, vol. 24, no. 1, p. 21, 2020, doi: 10.1186/s40824-020-00198-z.
- [13] Website Drug Topic. "Silicon Dioxide". Drugs. know more. Be sure. <https://www.drugs.com/inactive/silicon-dioxide-170.html#:~:text=In%20the%20pharmaceutical%20industry,%20silicon,appear%20to%20be%20biologically%20inert>. (accedido el 22 de enero de 2022).
- [14] M. S. Kang et al., "Reduced graphene oxide coating enhances osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on Ti surfaces," *Biomater. Res.*, vol. 25, no. 1, p. 4, 2021, doi: 10.1186/s40824-021-00205-x.

- [15] T. Brelje and R. Sorenson, "Histology Guide- Bone", Histology Guide, virtual microscopy laboratory, 2021. [Online]. Available: <http://histologyguide.com/index/index-B.html>. [Accessed: 22- May- 2021].
- [16] D. Tümer, M. Güngörürler, H. Havıçıođlu y Y. Arman. "Investigation of effective coating of the Ti–6Al–4V alloy and 316L stainless steel with graphene or carbon nanotubes with finite element methods". ScienceDirect.com | Science, health and medical journals, full text articles and books. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2238785420320196> (accedido el 23 de enero de 2022).
- [17] R. Gorejová, L. Haverová, R. Oriň Aková, A. Oriň Ak, and M. Oriň Ak, "Recent advancements in Fe-based biodegradable materials for bone repair," doi: 10.1007/s10853-018-3011-z.
- [18] O. Yigit, N. Ozdemir, Burak Dikici y M. Kaseem. "Surface Properties of Graphene Functionalized TiO₂/nHA Hybrid Coatings Made on Ti6Al7Nb Alloys via Plasma Electrolytic Oxidation (PEO)". MDPI. <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/13/3903/htm> (accedido el 23 de enero de 2022).
- [19] B. Rakhadilov y D. Baizhan. "Creation of Bioceramic Coatings on the Surface of Ti–6Al–4V Alloy by Plasma Electrolytic Oxidation Followed by Gas Detonation Spraying". MDPI. <https://www.mdpi.com/2079-6412/11/12/1433> (accedido el 1 de septiembre de 2022).
- [20] O. Yigit, B. Dikici, N. Ozdemir y E. Arslan, "Plasma electrolytic oxidation of Ti-6Al-4V alloys in nHA/GNS containing electrolytes for biomedical applications: The combined effect of the deposition frequency and GNS weight percentage", Surface & Coatings Technology, vol. 415, n.º 127139, 2021, art. n.º 0257-8972.
- [21] Q. Li, J. Liang y Q. Wang. "Plasma Electrolytic Oxidation Coatings on Lightweight Metals". IntechOpen - Open Science Open Minds | IntechOpen. <https://www.intechopen.com/chapters/44294> (accedido el 25 de enero de 2022).
- [22] R. Li, B. Ying, Y. Wei, H. Xing, Y. Qin, and D. Li, "Comparative evaluation of Sr-incorporated calcium phosphate and calcium silicate as bioactive osteogenesis coating

orthopedics applications,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 600, p. 124834, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.124834>.

[23] Shugurov, A. (2020). Recovery of Scratch Grooves in Ti-6Al-4V Alloy Caused by Reversible Phase Transformations. *Metals*, 10. <https://doi.org/10.3390/met10101332>

[24] Wysocki, B., Maj, P., Sitek, R., Buhagiar, J., Kurzydłowski, K. J., & Świążkowski, W. (2017). Laser and Electron Beam Additive Manufacturing Methods of Fabricating Titanium Bone Implants. *Applied Sciences*, 7, 657. <https://doi.org/10.3390/app7070657>

[25] O. Pinilla-Navarro, A. Siado-Guillen, M. M. Cely-Bautista, I. Romero-Mejia y J. Jaramillo-Colpas. "Microstructural characterization of titanium alloy Ti6Al4V thermally oxidized". OJS - Universidad Autónoma del Caribe. <http://ojs.uac.edu.co/index.php/prospectiva/article/view/1617/1151> (accedido el 9 de septiembre de 2022).

[26] E. Matykina, F. Monfort, A. Berkani, P. Skeldon, G. E. Thompson y J. Gough. "Characterization of Spark-Anodized Titanium for Biomedical Applications". <https://iopscience.iop.org/>. <https://iopscience.iop.org/article/10.1149/1.2717383/pdf> (accedido el 9 de septiembre de 2022).

[27] Wang, J., Zhang, M., Wang, Y., Jia, L., Yang, J., & Zhang, Q. (2022). The effects of using Nd:YAG laser on the surface modification and cell adhesion/spreading on zirconia discs: An in vitro study. *Materials Letters*, 324, 132602. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matlet.2022.132602>

[28] Majhy, B., Priyadarshini, P., & Sen, A. (2021). Effect of surface energy and roughness on cell adhesion and growth -facile surface modification for enhanced cell culture †. *RSC Advances*, 11, 15467–15476. <https://doi.org/10.1039/d1ra02402g>

[29] B. Moreno, M. Carballo, J. Jurado y E. Chinarro. "Una revisión del uso del TiO₂ en terapias e ingeniería tisular". Researchgate. <https://www.researchgate.net/publication/41168339> (accedido el 30 de julio de 2022).

[30] E. A. Taylor y E. Donnelly. "Raman and Fourier transform infrared imaging for characterization of bone material properties". ScienceDirect. <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S8756328220302702> (accedido el 28 de septiembre de 2022).

[31] Li, R., Ying, B., Wei, Y., Xing, H., Qin, Y., & Li, D. (2020). Comparative evaluation of Sr-incorporated calcium phosphate and calcium silicate as bioactive osteogenesis coating orthopedics applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 600, 124834. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.124834>

[32] UPM. MOOC Biomateriales: 9.1.2 Biomateriales cerámicos. (2 de marzo de 2018). Accedido el 10 de mayo de 2022. [Video en línea]. Disponible: <https://www.youtube.com/watch?v=829WzTSyV3E>

[33] UPM. MOOC Biomateriales: 9.1.3 Biomateriales cerámicos. (2 de marzo de 2018). Accedido el 10 de mayo de 2022. [Video en línea]. Disponible: <https://www.youtube.com/watch?v=RlrV9no03MU>

[34] L.-C. Zhang, L.-Y. Chen y L. Wang, "Surface Modification of Titanium and Titanium Alloys: Technologies, Developments, and Future Interests", *Advanced Engineering Materials*, vol. 22, n.º 5, p. 1901258, enero de 2020. Accedido el 3 de octubre de 2022. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.1002/adem.201901258>

[35] E. A. Taylor y E. Donnelly. "Raman and Fourier transform infrared imaging for characterization of bone material properties". ScienceDirect. <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S8756328220302702> (accedido el 28 de septiembre de 2022).

[36] M. Autolab. "Caída óhmica parte 1: principios básicos". Germany | Metrohm. https://www.metrohm.com/es_es/applications/application-notes/autolab-applikationen-anautolab/an-ec-003.html (accedido el 4 de octubre de 2022).

[37] U. PIRATOBA MORALES, Á. MARIÑO CAMARGO y J. J. OLAYA FLÓREZ. "IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA INTERPRETACIÓN DE DIAGRAMAS TÍPICOS CON CIRCUITOS EQUIVALENTES". SciELO Colombia- Scientific Electronic Library

Online. <http://www.scielo.org.co/pdf/dyna/v77n164/a08v77n164.pdf> (accedido el 7 de agosto de 2022).

[38] J. L. Vázquez Gutiérrez, "EMPLEO DE LA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIAS ELECTROQUÍMICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE BIOMATERIALES. APLICACIÓN A UNA ALEACIÓN BIOMÉDICA DE Co-Cr-Mo", Tesis de Máster, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, 2007. Accedido el 28 de julio de 2022. [En línea]. Disponible: <http://hdl.handle.net/10251/12346>

[39] N. P. Cosman, K. Fatih y S. G. Roscoe. "Electrochemical impedance spectroscopy study of the adsorption behaviour of α -lactalbumin and β -casein at stainless steel". ScienceDirect. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2004.08.007> (accedido el 16 de junio de 2022).

[40] F. Espinoza, A. Lizana y P. Muñoz. "Bioceramics in odontology, a literature review". Revista Canal Abierto. <https://www.canalabierto.cl/storage/articles/April2020/5oUEjxeli3GDRfSLFnJ.pdf> (accedido el 31 de octubre de 2022).

[41] J. A. Pérez González. "Síntesis de biovidrios por la técnica sol-gel con incorporación de metales y estudio de sus propiedades antibacteriales". Repositorio Académico - Universidad de Chile. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/111122> (accedido el 18 de julio de 2022).

[42] W. Liu et al. "Effects of graphene nanosheets on the ceramic coatings formed on Ti6Al4V alloy drill pipe by plasma electrolytic oxidation". ScienceDirect. <https://www.sciencedirect-com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S0925838819308679> (accedido el 9 de septiembre de 2022).

[43] M. Canillas, P. Pena, A. H. de Aza y M. A. Rodríguez. "Calcium phosphates for biomedical applications | Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio". Elsevier | Una empresa de análisis de la información | Empowering Knowledge. <https://www.elsevier.es/en-revista-boletin-sociedad-espanola-ceramica-vidrio-26-articulo-calcium-phosphates-for-biomedical-applications-S0366317517300444> (accedido el 18 de noviembre de 2022).

[44] A. Fattah-alhosseini, M. Molaei, M. Nouri y K. Babaei, "Review of the role of graphene and its derivatives in enhancing the performance of plasma electrolytic oxidation coatings on titanium and its alloys", *Applied Surface Science Advances*, vol. 6, p. 100140, diciembre de 2021. Accedido el 28 de noviembre de 2022. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2021.100140>

[45] V. Zahedi Asl, S. F. Chini, J. Zhao, Y. Palizdar, M. Shaker y A. Sadeghi, "Corrosion properties and surface free energy of the Zn Al LDH/rGO coating on MAO pretreated AZ31 magnesium alloy", *Surface and Coatings Technology*, vol. 426, p. 127764, noviembre de 2021. Accedido el 28 de noviembre de 2022. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2021.127764>

[46] J. E. Gómez R, L. E. Forero Gómez, P. Escobar Rivero y W. Valdivieso. "Estudio de citotoxicidad y adhesión de células humanas de osteosarcoma en ti6al4v superficialmente modificado".

Researchgate. https://www.researchgate.net/publication/26544398_Estudio_de_citotoxicidad_y_adhesion_de_celulas_humanas_de_osteosarcoma_en_ti6al4v_superficialmente_modificado (accedido el 18 de noviembre de 2022).

[47] A. Cerqueira et al., "Complex effects of Mg-biomaterials on the osteoblast cell machinery: A proteomic study", *Biomaterials Advances*, p. 212826, abril de 2022. Accedido el 25 de noviembre de 2022. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.212826>

[48] N. Ceballos Ramírez. "Mojado sobre superficies con geometría esférica: Efectos sobre el ángulo de contacto y la presión interna". Repositorio Institucional UASLP. <https://repositorioinstitucional.uaslp.mx/xmlui/handle/i/5897> (accedido el 20 de marzo de 2023).

[49] Rana, A., et al. "Protein-graphene interactions: opportunities and challenges". *Nanoecale* 8.2 (2016):1237-1262.

[50] Saiz, E., et al. "In vitro behavior of a bioactive glass coated on a glass-ceramic under different thermal treatments." *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials* 61.4 (2002): 622-632.

- [51] S. Dorozhkin, "Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine", *Materials*, vol. 2, n.º 2, pp. 399–498, abril de 2009. Accedido el 23 de marzo de 2023. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.3390/ma2020399>
- [52] Zhang, L., et al. "Effect of coating thickness on the incorporation and distribution of graphene in a plasma electrolytic oxidation coating." *Surface and Coatings Technology* 354 (2018): 45-51.
- [53] Han, J., et al. "Effect of coating thickness on the microstructure and mechanical properties of graphene-reinforced micro-arc oxidation coatings on magnesium alloy." *Materials Science and Engineering: A* 760 (2019): 227-235.
- [54] Chen, C., et al. "Exfoliation and redeposition of graphite in plasma electrolytic oxidation coating of titanium." *Surface and Coatings Technology* 422 (2021): 127885.
- [55] Park, S. Y., & Bae, T. S. "Mechanical properties of graphene-coated bioceramics for orthopaedic applications: A review". *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 67, 307-320. (2017).
- [56] Lee, S., Kim, H. J., & Park, J. H. "Enhanced mechanical properties of zirconia ceramics by graphene coating". *Journal of Ceramic Processing Research*, 20(3), 332-337. (2019).
- [57] Zhou, H., Zhu, W., & Yang, Y. "Graphene coatings on bioceramic scaffolds enhance mechanical properties and promote osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells". *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 106(2), 430-439. (2018).
- [58] K. Ghosal, P. Mondal, S. Bera y S. Ghosh, "Graphene family nanomaterials-opportunities and challenges in tissue engineering applications", *FlatChem*, vol. 30, p. 100315, noviembre de 2021. Accedido el 24 de marzo de 2023. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.1016/j.flatc.2021.100315>.
- [59] A. Ricci, A. Cataldi, S. Zara y M. Gallorini, "Graphene-Oxide-Enriched Biomaterials: A Focus on Osteo and Chondroinductive Properties and Immunomodulation", *Materials*, vol. 15, n.º 6, p. 2229, marzo de 2022. Accedido el 24 de marzo de 2023. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.3390/ma15062229>

[60] J. Su et al., "Graphene oxide coated Titanium Surfaces with Osteoimmunomodulatory Role to Enhance Osteogenesis", *Mater. Sci. Engineering: C*, vol. 113, p. 110983, agosto de 2020. Accedido el 24 de marzo de 2023. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110983>

[61] S. M. Leal Marín y H. A. Estupiñán Durán. "EIS, Mott Schottky and EFM analysis of the electrochemical stability and dielectric properties of Ca-P-Ag and Ca-P-Si-Ag coatings obtained by plasma electrolytic oxidation in Ti6Al4V". *Redalyc.org*. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43051470002> (accedido el 16 de febrero de 2023).