



**Caracterización de Recubrimientos a Base de Renio Y Carbono con Análisis Citotóxico en
Células Pk-15 para Posibles Aplicaciones Biomédicas**

Melany Lisbeth Lemus Rincón

**UNIVERSIDAD ECCI
FACULTAD DE INGENIERÍA
DIRECCIÓN DE INGENIERÍA BIOMÉDICA
PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA
BOGOTÁ, D.C.**

2024

**Caracterización de Recubrimientos a Base de Renio Y Carbono con Análisis Citotóxico en
Células Pk-15 para Posibles Aplicaciones Biomédicas.**

Melany Lisbeth Lemus Rincón

Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de:

Ingeniería Biomédica

Director (a):

Ph.D., Giovany Orozco

UNIVERSIDAD ECCI

FACULTAD DE INGENIERÍA

DIRECCIÓN DE INGENIERÍA BIOMÉDICA

PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA

BOGOTÁ, D.C.

2024

A mi faro en la tormenta:

Ph. Giovanni Orozco, gracias infinitas por ser mi punto de referencia y centro para dar continuidad al objetivo que tanto anhelaba, gracias por permitir que tu sabiduría fuese mi guía ante este desafío y por tu paciencia en cada mar de leva que en el proceso obstaculizaba llegar a puerto. Gracias por ser mi mentor, mi confidente y mi amigo en esta travesía.

A mis compañeros:

Profesores y compañeros, juntos exploramos mares de conocimiento y su apoyo en cada metro recorrido fue indispensable para obtener estos resultados, es un honor que ustedes me formaran como profesional. Quiero expresar mi profundo agradecimiento y admiración hacia el Profesor Luis Fajardo, MSc Ricardo Jaramillo, MSc. María Antonieta, porque bajo su exigencia y personalidades hicieron de mi recorrido estudiantil un reto y orgullo. A Cris, Sara, Kerlimber y Valeria que, con empatía, en turbulencia siempre estaban ahí para apoyarme. Gracias por ser compañeros de viaje excepcionales.

A mi constelación:

Dios, familia y amigos, ustedes: mi cielo estrellado, siempre presente, brindándome luz y guía. Agradezco a mis papás que son y han sido los cimientos irrompibles de toda la estructura que hoy soy, a mi abue, que, desde el cielo, será siempre la estrella guía y guardián, sé que estas feliz y orgullosa de lo que he logrado y que, como siempre quisiste desde ese hermoso universo eres testigo de mi logro. Por su amor incondicional, por sus abrazos que me reconfortaron con buñuelos en las noches de tormenta y por su aliento que me impulsó a seguir adelante.

A las olas que me impulsaron:

Agradezco a la Universidad ECCI que con su apoyo permitió realizar este proyecto, así como a la UPTC y la Universidad Militar por brindarme las herramientas necesarias para hacerlo posible de la mano de los docentes Willian Aperador y Yaneth Pineda. También expresar mi más sincero agradecimiento a la Ph. Adriana Corredor quien me apoyó y compartió su sabiduría y conocimiento, siendo una pieza clave para culminar el viaje de este reto.

Con profunda gratitud, dedico este viaje a cada uno de ustedes, cuyo apoyo y afecto me han guiado a través de los mares del conocimiento, permitiéndome arribar a este puerto llamado éxito.

Contenido

Resumen	11
Abstract	12
Introducción	13
Glosario	15
1. Planteamiento del Problema	17
1.1. Preliminares.....	17
1.2. Descripción del problema.....	17
2. Justificación	20
2. 1. Aspectos prácticos.....	20
2. 2. Aspectos Teóricos	20
2. 3. Aspectos Metodológicos	21
1. Objetivos	22
3. 1. Objetivo general	22
3. 2. Objetivos específicos	22
4 Estado del arte	23
4.1. Reacciones adversas en biocompatibilidad de metales.....	23
4. 2. Técnicas del recubrimiento	26
4. 3. Propiedades de los materiales.....	27
4. 4. Propiedades de biocompatibilidad.....	28
5 Marco Teórico	30
5.1. Marco histórico.....	30
5. 1. 1. Historia de los implantes metálicos.....	30
5.2. Marco conceptual	35

5. 2. 1. Renio	35
5. 2. 2. Carbono	35
5. 2. 3. Titanio	36
5. 2. 4. Molibdeno	36
5. 2. 5. Materiales metálicos biocompatibles	37
5. 2. 6. Microscopio Electrónico de Barrido (MEB/SEM)	38
5. 2. 7. Difracción de Rayos X	40
5. 2. 8. Sputtering	42
5. 2. 9. Minimum Essential Medium (MEM).....	44
5. 2. 10. Células PK-15	44
5. 2. 12. Ensayo de viabilidad celular con MTT	46
5. 2. 12. Lector de microplacas (Absorbancia)	47
5.3. Marco legal.....	49
5. 3. 1. ISO 10993-5 del 2009	49
6 Metodología	51
6. 1. Fase 1.....	51
6. 1. 1. Producción y preparación de las muestras	51
6. 1. 2. Caracterización de los recubrimientos	53
6. 2. Fase 2	54
6.2.1. Pruebas de biocompatibilidad MTT en células PK-15.....	54
6.2.2. Calculo de la viabilidad celular	57
7 Resultados.....	59
7.1. Caracterización de los recubrimientos	59

7.1.1. Análisis comparativo de la morfología de la superficie de las muestras por Microscopia electrónica de barrido (SEM)	59
7.1.2. Análisis comparativo con base en la composición de la superficie en las muestras por Espectroscopia de rayos X por energía dispersiva (EDS)	63
7. 1. 3. Análisis del espesor de los recubrimientos por SEM.....	68
7.2 Respuesta citotóxica de las células ante el recubrimiento.....	71
7.2.1. Análisis de absorbancia.....	71
7.2.2. Análisis del porcentaje de viabilidad celular	72
Conclusiones	76
ANEXO A	78
Ensayo MTT.....	78
Preparación reactivos	78
Preparación del medio.....	78
Preparación medio esencial mínimo (MEM).....	79
<i>Recuento celular</i>	80
Procedimiento ensayo MTT.....	81
ANEXO B.	82
Registro fotográfico de los procedimientos.	82
Producción recubrimientos INCITEMA UPTC.....	82
Caracterización de los recubrimientos	83
Ensayo MTT ejecutado en el Laboratorio de Investigación en Ciencias Biológicas en la universidad ECCI (LICiB)	83
Análisis de absorbancia.....	87

Análisis cualitativo de las células PK-15 en microscopio	88
Referencias.....	89

Índice de tabla

Figura 1. <i>Esquema funcional de la difracción de rayos X. Fuente: (Uwe König, 2012)</i>	41
Figura 2. <i>Esquema: Ion incidente atraído por el campo eléctrico y golpea la superficie del material transfiriendo su momento. Fuente: (Betancourt Coronado, 2023)</i>	43
Figura 3. <i>Fases metodológicas.</i>	51
Figura 4. <i>Esquema general metodologico para la producción y analisis del los recubrimientos.</i>	51
Figura 5. <i>Producción y preparación de las muestras</i>	51
Figura 6. <i>Características superficiales empleadas.</i>	52
Figura 7. <i>Esquema metodológico para el análisis de viabilidad celular mediante prueba MTT</i> 54	
Figura 8. <i>Esterilización de los recubrimientos con luz ultravioleta en cabina de cultivo</i>	55
Figura 9. <i>Distribución de las diferentes condiciones de los recubrimientos en las microplacas: C1) Brillo espejo, C2) Lija 200, C3) Lija 3000, C4) Sin recubrimiento (Moneda de Titanio), C5) Control celular (Medio celular)</i>	56
Figura 10. <i>Microplacas para evaluar la citotoxicidad del recubrimiento a las 24, 48 y 72 horas. Recubrimientos inmersos en el medio de cultivo durante el proceso de evaluación.</i>	56
Figura 11. <i>Flujo definido para el ensayo MTT, para mayor detalle dirigirse al Anexo 1.</i>	57
Figura 12. <i>SEM con magnificación de 500x de la superficie con notable desprendimiento: A) Recubrimiento 1, B) Recubrimiento 2, C) Recubrimiento 3, D) Recubrimiento 4.</i>	59
Figura 13. <i>SEM recubrimiento 5: A) resolución de 100µm a 50X, B) resolución de 20µm a 500X</i>	60
Figura 14. <i>SEM recubrimiento 6: A) resolución de 100µm a 50X, B) resolución de 20µm a 500X</i>	61

Figura 15. SEM recubrimiento 7: A) resolución de 100 μ m a 50X, B) resolución de 20 μ m a 500X.	62
Figura 16. Componentes de la superficie del recubrimiento 6 por EDS.	64
Figura 17. Recubrimiento 6. Micrografías SEM y espectros EDS obtenidas del recubrimiento para las muestras R6-2 hasta R6-5.....	65
Figura 18. Componentes de la superficie del recubrimiento 7 por EDS.	66
Figura 19. Recubrimiento 7. Micrografías SEM y espectros EDS obtenidas del recubrimiento para las muestras R7-A hasta R7-C.....	67
Figura 20. Espesor de las capas de recubrimiento del sustrato por SEM. A) Micrografía del espesor del recubrimiento. ER-T) Espesor del recubrimiento total. ER-Re) Espesor de la capa de Renio del recubrimiento, ER-Mo) Espesor de la capa de anclaje de Molibdeno.....	68
Figura 21. Difractograma del recubrimiento representativo con las condiciones de depósito y con la superficie del recubrimiento con pulida a lija 200 y tiempo de deposito de una (1) hora	69
Figura 22. Gráfico de absorbancia de las muestras bajo las diferentes condiciones. R-1. Brillo espejo, R-2. Lija 2000, R-3. Lija 3000, R-4. Sustrato de titanio sin recubrir, Ctrl. Células control	71
Figura 23. Gráfico de viabilidad celular de las muestras bajo las diferentes condiciones. R-1. Brillo espejo, R-2. Lija 2000, R-3. Lija 3000, R-4. Sustrato de titanio sin recubrir.	72
Figura 24. Micrografías que representan la respuesta de las células PK-15 observadas a las 24, 48 y 72 horas.	74

Índice de tablas

Tabla 1. Parámetros variados en los recubrimientos de Re y C sobre sustrato de Titanio.	53
---	-----------

Resumen

El presente estudio se origina a partir de las oportunidades que se presentan en el campo de los biomateriales implantables como alternativa al rechazo del Titanio (Rubén Comino-Garayoa 1. J.-B.-S.-G., 2020), por lo que el propósito central de este estudio radica en la evaluación de la biocompatibilidad de un recubrimiento dual compuesto por Renio (Re) y Carbono (C) sobre un sustrato de Titanio (Ti). Para lograr tal objetivo, se lleva a cabo el recubrimiento haciendo uso de la técnica de sputtering (pulverización catódica), adicional, una caracterización detallada del recubrimiento, haciendo uso de microscopia electrónica de barrido (SEM), difracción de rayos X (DRx) y espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS). Además, este análisis se complementó con la utilización de células PK-15 y la aplicación de la prueba de MTT. Este enfoque presenta un potencial innegable para generar información crucial acerca de la pertinencia de estos materiales en el contexto de aplicaciones biomédicas. En última instancia, este estudio también contribuye de manera significativa al avance constante en la creación de implantes que sean simultáneamente seguros y eficaces.

Palabras clave: Biocompatibilidad, Carbono, Caracterización, Recubrimiento, Renio, Titanio.

Abstract

The present study originates from the opportunities presented in the field of implantable biomaterials as an alternative to the rejection of titanium, so the main purpose of this study is the evaluation of the biocompatibility of a dual coating composed of rhenium (Re) and carbon (C) on a titanium (Ti) substrate. To achieve this objective, the coating is carried out using the sputtering technique (sputtering), in addition, a detailed characterization of the coating, using scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (DRx) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS). In addition, this analysis will be complemented by the use of PK-15 cells and the application of the MTT test. This approach presents an undeniable potential to generate crucial information about the relevance of these materials in the context of biomedical applications. Ultimately, this study will also contribute significantly to the continued advancement in the creation of implants that are simultaneously safe and effective.

Keywords: Biocompatibility, Carbon, Characterization, Coating, Rhenium, Titanium

Introducción

Los implantes de Titanio, pese a tener una buena aceptación suelen desencadenar procesos de metalosis o toxicidad, Kyeong Tae Kim realizó un estudio entre el periodo 2011-2015 exponiendo publicaciones en relación a la toxicidad de los implantes de titanio y reveló 734 resultados, incluyendo corrosión de titanio e hipersensibilidad de titanio, 1229 artículos para toxicidad de titanio, 149 toxicidades para aleación de titanio de los implantes realizados, además, una nota clínica de la Universidad de Zaragoza ejemplifica un caso clínico de pseudoartrosis diafisaria de húmero por proceso de corrosión por abrasión en los clavos centro-medulares implantados, con una gran presencia de micropartículas metálicas (D. Palanca Martin. T. Castiella Muruzabal, s.f.; Int. Evelyn May G, 2002; Kyeong Tae Kyeong Tae Kim, 2019)

Aun considerando que en la actualidad no se dispone de muchas referencias para el estudio del comportamiento del Carburo de Renio (ReC) como biomaterial, algunas indican que en el caso del Renio (Re) este cuenta con propiedades químico-mecánicas como una alta resistencia al desgaste, alta densidad de electrones de valencia en estados de enlace que, en consecuencia, determinan que poseen un módulo de Young significativo el cual define su poca capacidad a ser compresible. Su deformación no se presenta de forma plástica a causa de su enlace metálico omnidireccional y se hace uso de grafito para la mejora de la dureza del material, proporcionando covalencia de enlaces dentro de la red metálica (G. Soto, 2011).

El estudio del Renio en aplicaciones biomédicas se ha dado mediante implantes in-vitro en MG-63 (ratones) a través de un examen de tipo histológico y otros métodos de imagen, dichos implantes se insertaron en tejido blando, ubicando el implante en el tejido subcutáneo de la región

abdominal y para el estudio biocompatible en tejido duro se introdujo en la superficie lateral de la diáfisis del fémur, los resultados obtenidos en dicho trabajo investigativo mostraron inexistencia de disolución luego de 4 semana de haber realizado el implante, buen proceso de biocompatibilidad y osteogénesis, en síntesis, el estudio arrojó una buena resistencia a la corrosión en tejidos blandos y duros (Hironobu Matsuno, 2001) lo que permitió justificar su uso y análisis en mayor profundidad y es por tanto que nos planteamos si es posible generar un nuevo biomaterial a partir de un recubrimiento basado en Renio (Re) y Carbono (C) sobre sustratos de Titanio (Ti) para aplicaciones biomédicas. (D. Palanca Martin. T. Castiella Muruzabal, s.f.)

Glosario

Absorbancia: Medida de la cantidad de luz absorbida por una muestra en función de la longitud de onda.

Biomaterial: Un material diseñado y utilizado con fines biomédicos, que interactúa de manera segura con tejidos y sistemas biológicos.

Biocompatibilidad: La capacidad de un material para interactuar de manera favorable con los sistemas biológicos, como células y tejidos, sin causar respuestas adversas.

Carbono (C): Un elemento químico fundamental en la química de la vida y en la mayoría de los compuestos orgánicos.

Células PK-15: Una línea celular derivada de células renales de cerdo utilizada en investigaciones biomédicas.

Citotóxico: Sustancias o agentes que son tóxicos para las células.

Difracción de rayos X (DRx): Una técnica que permite determinar la estructura cristalina de un material al medir cómo los rayos X interactúan con la red cristalina.

Dimetilsulfóxido (DMSO): Solvente orgánico ampliamente utilizado en laboratorios debido a su capacidad para disolver una variedad de compuestos, incluyendo sustancias polares y no polares. También se emplea como agente para mejorar la penetración de ciertas sustancias a través de membranas celulares en estudios biomédicos.

Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS): Una técnica que analiza los rayos X emitidos por un material al ser bombardeado con electrones, proporcionando información sobre su composición química.

Implantes: Dispositivos médicos que se colocan en el cuerpo para cumplir una función específica, como los implantes biomédicos.

Microscopia electrónica de barrido (SEM): Una técnica de microscopía que utiliza electrones para producir imágenes detalladas de la superficie de muestras.

Recubrimiento dual: Una capa que consiste en la combinación de dos materiales diferentes, en este caso, Renio y Carbono, aplicados sobre otro material base.

Renio (Re): Un metal de transición utilizado en diversas aplicaciones debido a sus propiedades químicas y físicas únicas.

Sustrato: La base o material sobre la cual se aplica el recubrimiento o película.

Técnica de sputtering (pulverización catódica): Un método de deposición de capas delgadas en el que se bombardea un material con iones para generar partículas que se adhieren a un sustrato y forman un recubrimiento.

Titanio (Ti): Un metal ampliamente utilizado en aplicaciones biomédicas debido a su biocompatibilidad y resistencia.

1. Planteamiento del Problema

1.1. Preliminares

El avance constante en el campo de la medicina y la tecnología ha llevado a la creación y uso extendido de implantes biomédicos con el propósito de mejorar la calidad de vida de los pacientes. En este contexto, el titanio ha emergido como un material líder debido a su biocompatibilidad y resistencia. Sin embargo, pese a su aceptación generalizada, los implantes de titanio no están exentos de desafíos. Se han reportado casos de metalosis y toxicidad en relación con estos implantes (D. Palanca Martin. T. Castiella Muruzabal, s.f.), lo que ha suscitado preocupaciones en la comunidad médica y científica.

Estudios previos han documentado un número significativo de resultados relacionados con la toxicidad y corrosión de los implantes de titanio y biomateriales aleados al mismo, subrayando la necesidad de alternativas que eviten reacciones adversas en el organismo.

Esta preocupación por los efectos secundarios de los implantes de titanio ha llevado a una búsqueda constante de nuevos enfoques y materiales que ofrezcan una solución segura y efectiva para los pacientes.

1.2. Descripción del problema.

La problemática abordada en este contexto se centra en los desafíos asociados a los implantes de titanio, los cuales, aunque ampliamente aceptados en aplicaciones biomédicas, han demostrado ser propensos a desencadenar procesos de metalosis y toxicidad en el organismo (Alberto Sicilia, Titanium allergy in dental implant patients: a clinical study on 1500 consecutive patients, 2008). La revisión de literatura revela que estudios han documentado un número de resultados relacionados con la toxicidad de los implantes de titanio, incluyendo corrosión e hipersensibilidad.

Además, casos clínicos han resaltado situaciones de pseudoartrosis y corrosión en implantes de titanio que generan la liberación de micropartículas metálicas.

En este sentido, emerge la propuesta y búsqueda de soluciones se enfoca en explorar recubrimientos innovadores a base de Renio y Carbono sobre sustratos de Titanio (Ti) como alternativas viables para su uso como biomaterial.

No obstante, la investigación y el uso de la aleación de Carbono y Renio como biomaterial aún enfrenta una falta de investigaciones exhaustivas que respalden su idoneidad y efectividad en aplicaciones clínicas. Si bien se atribuyen al Renio (Re) propiedades químico-mecánicas favorables, como resistencia al desgaste y alta densidad de electrones de valencia (G. Soto, 2011), su potencial como biomaterial precisa una evaluación más detallada. Además, se ha constatado que la combinación con el Carbono (C) puede mejorar la dureza del material, formando enlaces covalentes en la red metálica. (UC, 2010)

Las investigaciones previas han demostrado que el estudio de la biocompatibilidad del Renio en implantes in-vitro arroja resultados prometedores. Estos implantes han demostrado resistencia a la corrosión y biocompatibilidad en tejidos blandos y duros (Hironobu Matsuno, 2001).

En esta línea, surge la cuestión esencial de si los recubrimientos de Renio aleados con Carbono sobre sustratos de Titanio podrían presentar una alternativa efectiva para pacientes que presentan rechazo al contacto directo con implantes de titanio. Por lo tanto, estos aspectos mediante la investigación proponen abordar este interrogante y evaluar la viabilidad de estos recubrimientos

como una opción beneficiosa en el ámbito de las aplicaciones biomédicas, entendiendo que indican una dirección potencialmente fructífera para la investigación y desarrollo de nuevos biomateriales que superen las limitaciones actuales de los implantes de titanio.

1. 2. 1. Formulación de la pregunta de investigación.

¿Es posible evaluar la citotoxicidad de recubrimientos producidos mediante técnicas PVD basados en Renio y Carbono sobre sustratos de Titanio en células PK-15?

2. Justificación

El fundamento de este proyecto de investigación, de enfoque teórico-experimental, se origina en las problemáticas de rechazo o toxicidad que ocasionalmente emergen en relación a implantes metálicos, entre ellos, el titanio. Por tanto, el propósito central es investigar en profundidad la viabilidad del Renio (Re) y Carbono (C) como posible solución para este desafío en el ámbito biomédico. Este enfoque se sustenta en los aspectos que siguen a continuación:

2. 1. Aspectos prácticos

En un ensayo clínico se analizó el comportamiento de 468 implantes de titanio durante un periodo de 10 años, los resultados de dicho estudio exponen que aunque se contaba con un éxito de supervivencia de 96,4%, aun existía un 3,6% de rechazo al implante metálico (J Thomas Lambrecht, 2003), anexo, un estudio clínico en 1500 pacientes señalan que 9 (0,06) de los pacientes mostraron alergias positivas al titanio (Ti). (Alberto Sicilia, Titanium allergy in dental implant patients: a clinical study on 1500 consecutive patients, 2008), otro proceso que preocupa a los especialistas como expone Comino G. (Rubén Comino-Garayoa 1. J.-B.-S.-G., 2020) en donde analiza 52 documentos asociados con la compatibilidad hacia los implantes de Titanio concluye que, aunque las alergias de titanio son poco comunes no deben pasarse desapercibidas, pues quienes requieren de un proceso de rehabilitación no tienen muchas alternativas, es por razones como las ya mencionadas que surge la necesidad de evaluar posibles materiales implantables que puedan aportar a mejoras en la calidad de vida de esos pacientes que requieren procesos de rehabilitación y tratamiento pero que, en la actualidad no cuentan con alternativas biocompatibles a los metales comerciales.

2. 2. Aspectos Teóricos

A partir del proceso de búsqueda bibliográfica se evidencia la carencia de información literaria

respecto al Renio y Carbono en aplicaciones biomédicas por lo que buscamos alimentar información relacional académica experimental y conceptual sobre el Renio y Grafito como posible biomaterial.

2. 3. Aspectos Metodológicos

Se hace uso de las técnicas de caracterización como la microscopia electrónica de barrido (SEM), espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS), difracción de rayos X (DRx) debido a la conveniencia experimental, sustentado en que permiten obtener información cualitativa y cuantitativamente del recubrimiento como la composición química, morfología de la superficie, estructura cristalográfica del material, además de la posibilidad de conservar el estado del recubrimiento realizado por Sputtering al ser técnicas no destructivas.

Se implementa el uso del Carburo de Renio por sus características mecánicas y químicas: posee un módulo de Young de 490 GPa (Hironobu Matsuno, 2001) significativo lo que define su poca capacidad a ser compresible y una alta resistencia al desgaste. El recubrimiento se realiza de forma conjunta con el uso de Grafito, esto con base en la posibilidad que otorga de mejorar la dureza del material (proporciona covalencia de enlaces dentro de la red metálica) (G. Soto, 2011), finalmente, un estudio realizado y analizado mediante un examen de tipo histológico y otros métodos de imagen en implantes in-vitro en los que se hizo uso de ratones de cepa tipo Wistar entre 11 y 12 semanas de vida, mostraron una buena biocompatibilidad y osteogénesis, sin disolución y con una buena resistencia a la corrosión luego de 4 semanas de implantar el Renio tanto en tejido blando, como en tejido duro (Hironobu Matsuno, 2001) lo que aporta el interés justificado a su uso y estudio.

1. Objetivos

3. 1. Objetivo general

Estudiar recubrimientos basados en Renio y Carbono, sobre sustratos de Titanio para su aplicación como biomaterial.

3. 2. Objetivos específicos

- i. Producir un recubrimiento de película delgada basados en Renio (Re) y Carbono (C), mediante la técnica de sputtering sobre sustrato de Titanio (Ti).
- ii. Caracterizar los recubrimientos obtenidos mediante técnicas de difracción de rayos X (DRX), espectroscopia de energía dispersa (EDS) y microscopía electrónica de barrido (SEM) para analizar la morfología del material y obtener información sobre su microestructura.
- iii. Evaluar las propiedades de biocompatibilidad de los recubrimientos obtenidos a través de la prueba de MTT en células PK-15.

4 Estado del arte

4.1. Reacciones adversas en biocompatibilidad de metales.

Allergies to titanium dental implants: what do we really know about them? A scoping review

Alergias a los implantes dentales de titanio: ¿Qué sabemos realmente sobre ellos? Una revisión de alcance

Rubén Comino-Garayoa, Jorge Cortés-Bretón Brinkmann, Jesús Peláez, Carlos López-Suárez,

Jose María Martínez-González and María Jesús Suárez.

2020, PubMed. Madrid, España.

Realiza una descripción del comportamiento de los implantes de Titanio mediante un análisis literario enfatizado en implantes dentales, dicho artículo profundizó luego de un proceso de selección en un total 52 documentos que cumplían con los requerimientos de selección definidos. Luego de la investigación los autores concluyen que existe una buena percepción de los implantes de titanio, sin embargo, también señalan el proceso de tribocorrosión que se presenta al implantar el titanio, en donde se liberan iones de titanio en los tejidos circundantes, lo que ramifica una secuencia de reacciones, las anteriores pueden presentarse de forma localizada o a distancia, se señala que incluso puede darse un proceso de reacción sistémica. (Rubén Comino-Garayoa J. C.-B.-S.-G., 2020)

Titanium allergy in dental implant patients: a clinical study on 1500 consecutive patients

Titanium allergy in dental implant patients: a clinical study on 1500 consecutive patients

Alberto Sicilia , Susana Cuesta, Gerardo Coma, Ignacio Arregui, Cristina Guisasola, Eduardo Ruiz, Antonio Maestro

2008, Clinica Oral Implants Research, Volumen 19, Issue 8. Oviedo, España.

En Ovideo, España, se realizó un estudio por medio de análisis de anamnesis y examen de los pacientes, a su vez se hizo uso selectivo de pruebas cutáneas y epicutáneas de titanio en los pacientes clasificados en: un grupo de respuesta compatible con alergias (ACGR), un grupo de factores predisponentes (PFG) y un grupo al azar en el Centro de Alergias (GC),

Los resultados de los estudios mostraron que nueve (9) de los mil quinientos (1500) pacientes presentaron reacciones positivas a las pruebas de alergia al titanio de los cuales uno fue en el grupo de factores predisponentes y ocho en el grupo de respuesta compatible con alergias, obteniendo así una prevalencia de 0,6% de reacción desfavorable en el comportamiento de los implantes en los 1500 pacientes evaluados. (Alberto Sicilia, Titanium allergy in dental implant patients: a clinical study on 1500 consecutive patients, 2008)

Potential neurotoxicity of titanium implants: Prospective, in-vivo and in-vitro study

Potencial neurotóxico de los implantes de titanio: Estudio prospectivo, in vivo e in vitro

Shahar Shelly, Sigal Liraz Zaltsman , Ofir Ben-Gal, Avraham Dayan, Ithamar Ganmore, Chen Shemesh, Dana Atrakchi, Sharif Garra, Orly Ravid, Daniel Rand, Hila Israelov
2021, *ELSEVIER. Biomaterials, volumen 276. Minnesora, USA.*

En la búsqueda de definir un alcance neurotóxico de los implantes de titanio, se realiza un estudio prospectivo in vivo e in vitro, en un inicio se plantean realizar análisis de estudios de los últimos 10 años, primero exponiendo un caso clínico en el que un hombre con 77 años sufre una disfunción aguda secundaria a un proceso de descomposición de un stent

carotídeo a base de titanio, proceso que repercute en un incremento de 1000 veces (3ppm) en sus niveles sanguíneos. Segundo, mediante un estudio de implantes desarrollado en ratas se exhiben deficiencias en la memoria de los animales. Tercero, una investigación en un modelo in vitro de barrera hematoencefálica humana expuesto a un implante de titanio mostro fugas paracelulares, lo anterior según los autores demuestra que las partículas de titanio se internalizaron de forma rápida en células endoteliales similares al cerebro por medio de endocitosis y macropinocitosis, lo que indujo a una reacción proinflamatoria. Los resultados sugieren que altos niveles de titanio se acumulan de forma adyacente a los implantes ortopédicos, corroborando mediante estudios in-vivo e in-vitro que pueden ser neurotóxicos. (Shahar Shelly 1, 2008)

Implant allergy

Alergia a los implantes

P. Thomas and B. Summer

2017, National Librarary of Medicine. Munich, Alemania

Inicialmente, la publicación enuncia que, causas comunes entre las quejas en pacientes de reemplazo articular artificial se encuentran principalmente en reacciones de intolerancia a los implantes, tales como: eccemas, retraso de la cicatrización de heridas y/o huesos, derrame recurrente, dolor, aflojamiento del implante como manifestación a alergia del mismo. Ejemplifica datos obtenidos en un estudio en donde de 239 pacientes con quejas debido a reemplazo con metales, el 29,7% tenía alergia a los metales, parametrizando que el 21,3% padecía alergia al níquel, el 10,9% al cobalto y el 5% al cromo.

Se describen los síntomas en piel en asociación a implantes metálicos o alergias, que como

anteriormente se relaciona de forma general suele darse en forma de eccemas locales, enrojecimiento livido e hinchazón lividos recurrentes y, por último, retraso de la cicatrización de heridas. Los eccemas se visualizaron con mayor frecuencia luego de la osteosíntesis en las extremidades en pacientes que presentaban alergia al níquel, cromo y cobalto, Ahora, en pacientes con esternotomía y alergia al níquel se notificaron eccemas aún después del cerclaje de alambre de acero. Adicionalmente, expone la existencia de informes de corrosión en que pacientes alérgicos al metal desarrollan eccemas dependientes a dicha corrosión. Se ejemplifican casos raros en los que se presentan eccemas sobre las caderas o rodillas artificiales y otros en los que se originan hemorragias cutáneas en forma de vasculitis o urticaria. (P. Thomas, 2008)

4. 2. Técnicas del recubrimiento

Síntesis de películas delgadas por la técnica de magnetron sputtering a partir de blancos de renio y boro

Luis Guillermo Angarita Gutiérrez

2017, Universidad EAFIT. Medellín, Colombia.

En la tesis presentada se realiza un análisis acentuado en el proceso de síntesis de recubrimientos haciendo uso del Renio y Boro mediante la técnica Sputtering. El proceso de caracterización del recubrimiento se analizó mediante técnicas como Microscopia de Fuerza Atómica y Microscopia Electrónica de Barrido para evaluar las propiedades morfológicas; la Espectroscopia de Energía Dispersiva fue empleada para evaluar la composición química de las películas. En última instancia se hace uso de microRaman,

Microscopia Electrónica de Transmisión y la Difracción de Rayos X para evaluar las propiedades estructurales del material. (Gutiérrez, 2017)

4. 3. Propiedades de los materiales.

Evaluation of rhenium carbide as a prospective material for hard coating

Evaluación del carburo de renio como material prospectivo para el revestimiento duro

G. Soto, H. Tiznado, J.A. Díaz, E.C. Samano, A. Reyes-Serrato

2011, Universidad Nacional Autónoma de México. Ensenada Baja California, México.

Se realiza una evaluación del carburo de renio como un material prospectivo para recubrimiento duro, este artículo justifica la aleación del grafito con el metal para incrementar la mejora en la resistencia al desgaste y prolongar la vida útil del dispositivo cubierto.

El método empleado para el recubrimiento es mediante deposición láser pulsada reactiva, los resultados muestran que la dureza máxima del Carburo de Renio mediante esta técnica de deposición de recubrimiento tiene una dureza máxima de 22,5 GPa, descartándolo como un material duro. (G. Soto, 2011)

TiAlN based wear resistant coatings modified by molybdenum addition

Recubrimientos resistentes al desgaste basados en TiAlN modificados por adición de molibdeno

Lukasz Tomaszewski, Wojciech Gulbiński, Arkadiusz Urbanowicz, Tomasz Suszko Ariel Lewandowski.

2015, ELSEVER, Vaccum, Vol 121. Łódź, Polonia.

Se ilustra en la metodología empleada para el estudio de los recubrimientos resistentes al desgaste que el método de co-deposición del Molibdeno (Mo) fue mediante el uso de una fuente de magnetrón plano, los resultados obtenidos por Tomaszewki y demás autores, señalan que la adición del molibdeno resultó en una mejora significativa de las propiedades, lo anterior manifestado en la reducción del coeficiente de fricción frente al acero, que pasa de ser de 0.8 a 0.5 y la tasa de desgaste se determinó por debajo de 10^{-15} m³/Nm. En cuanto al análisis de algunas de las propiedades mecánicas como la dureza y la adherencia no evidenciaron afección, en contraposición muestran una leve mejora, en síntesis, la adición del Mo al material no perjudica las propiedades mecánicas y sí contribuye a una mejora de la resistencia a la corrosión de los recubrimientos, en este caso del TiAlN o Nitruro de titanio aluminio, basado en los análisis bajo ensayos o el método potenciodinámico. El artículo atribuye que la adición del molibdeno puede generar una mejora en las propiedades de resistencia al desgaste de los recubrimientos. (Łukasz Tomaszewski, 2015)

4. 4. Propiedades de biocompatibilidad.

Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium

Biocompatibilidad y osteogénesis de implantes de metales refractarios, titanio, hafnio, niobio, tantalio y renio

Hironobu Matsuno, Atsuro Yokoyama, Fumio Watari, Motohiro Uo, Takao Kawasaki

2000, ELSEVIER. Sapporo, Japón.

La revista ELSEVIER publica un artículo en donde se evalúa y/o hace un estudio del Renio en aplicaciones biomédicas, estudio que se originó mediante implantes in-vitro en ratones de cepa Wistar a través de un examen de tipo histológico y otros métodos de imagen, dichos

implantes se insertaron en tejido blando, ubicando el implante en el tejido subcutáneo de la región abdominal y para el estudio biocompatible en tejido duro se introdujo en la superficie lateral de la diáfisis del fémur, los resultados obtenidos en dicho artículo mostraron inexistencia de disolución luego de 4 semana de haber realizado el implante, buen proceso de biocompatibilidad y osteogénesis, elo que refiere como resultado en el estudio que el Renio presenta una buena resistencia a la corrosión en tejidos blandos y duros. (Hironobu Matsuno, 2001)

In Vitro Degradation Behavior and Biocompatibility of Bioresorbable Molybdenum

Comportamiento de degradación in vitro y biocompatibilidad del molibdeno biorreabsorbible

Christian Redlich, Antje Schauer, Jakob Schebler, Georg Poehle, Peggy Barthel, Anita Maennel.

2021, MDP Journals, Metals, Vol 11. Dresden, Alemania.

Centralizados en la investigación del comportamiento biocompatible y de degradación del Molibdeno (Mo) puro, los autores evalúan su comportamiento por medio del análisis de concentración de iones haciendo uso del molibdeno en formato de polvo con un diámetro medio de 6µm de las partículas, específicamente, se hacen principalmente 4 ensayos y/o pruebas de nuestro interés, siendo la corrosión por inmersión electroquímica y estática la primera de las pruebas, en las cuales se hizo uso de una lámina caliente con un espesor de 0.096mm, segundo, los ensayos de apoptosis y necrosis bajo la técnica de fluorescencia/luminiscencia *RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay* sobre pruebas de colonización con líneas celulares de arteria coronaria humanas: endoteliales y de musculo liso en sustratos de Mo, tercero, ensayos de trombogenicidad aislando plaquetas de una muestra de sangre de un donante sano y, cuarto y último, un

ensayo con cebadores para marcadores de inflamación. Los resultados obtenidos mediante la primera prueba mostraron una degradación uniforme, la fluorescencia no evidenció efectos adversos sobre la viabilidad celular en ambas líneas celulares, en el ensayo de trombogenicidad no se observó activación de trombocitos, es decir, puede que no presente un trombogenicidad significativa y finalmente con los cebadores para marcadores de inflamación no se desencadenaron respuestas inflamatorias.

Asimismo, asocian la posibilidad de realizar un stent de molibdeno con una buena integración de los vasos y señalan que es un buen candidato a implantes biorreabsorbibles. (Christian Redlich, 2021)

5 Marco Teórico

Dentro de esta sección, se exploran las teorías, modelos y conceptos que están intrínsecamente vinculados con el objeto de investigación, proporcionando una estructura conceptual que guía la exploración y el análisis de los datos para entender el proceso ejecutado en el desarrollo de los recubrimientos y el análisis de biocompatibilidad.

5.1. Marco histórico

5.1.1. Historia de los implantes metálicos

5.1.1.1. Período prehistórico

El período prehistórico abarca desde antes de la existencia de documentos escritos y se divide en paleolítico y neolítico. Durante esta etapa, los humanos vivían en bosques, se alimentaban de frutas y raíces, desarrollaron el lenguaje, usaron el fuego y empezaron a cazar y agruparse. La aparición de herramientas como mazas, lanzas y arcos marcó un avance en la tecnología. Se domesticaron animales, se crearon artículos como vasijas y tejidos, y se transformó el entorno con herramientas metálicas en la Era del Cobre y el Hierro. Se construyeron barcos y surgieron

ciudades amuralladas, y finalmente, apareció la escritura. Además, se conoce la existencia de una antigua prótesis, realizada en el Neolítico, que implicaba la inserción de un fragmento de falange de dedo en un alvéolo dental. (Dra. C.E. Leticia María Lemus Cruz, 2009)

5. 1. 1. 2. Edad antigua

Durante la Edad Antigua, que abarca desde el año 4000 a.C., con la invención de la escritura, hasta el año 476 d.C, con la caída del Imperio Romano, la característica social predominante fue la esclavitud.

En esta época, se encuentran los restos antropológicos más antiguos de implantes dentales colocados en vivo, provenientes de la cultura maya. En 1931, el arqueólogo Popenoe descubrió en la Playa de los Muertos de Honduras una mandíbula datada en el año 400 d.n.e., en la cual se hallaban tres fragmentos de concha de Sagaamote introducidos en los alvéolos de los incisivos. Los estudios radiológicos revelaron la formación de hueso compacto alrededor de estos implantes, sugiriendo que fueron insertados en vida. Esta práctica de utilizar el alvéolo como soporte para dientes artificiales es antigua y se relaciona con otras técnicas médicas de la época.

En el antiguo Egipto también existen registros de procedimientos similares, como el trasplante de dientes humanos y de animales, así como la implantación de piedras y metales preciosos. A pesar de estas prácticas, la evolución de la Implantología no siguió un curso lineal, sino que tuvo avances escalonados y períodos de menor interés y entusiasmo. (Dra. C.E. Leticia María Lemus Cruz, 2009)

5. 1. 1. 3. Edad media

Durante la Edad Media, que se extiende desde la caída del Imperio Romano en el año 476 hasta la Revolución Inglesa en 1640, surgieron importantes avances en la Odontología y la

cirugía bucal. En el Siglo X, Abulcasis, un pensador islámico de Córdoba, mencionó la reposición de dientes perdidos usando hilos de oro, esbozando así una forma temprana de reimplante dental. A medida que la época progresaba, cirujanos barberos realizaban trasplantes dentales, pero esta práctica se desvaneció debido a fracasos y riesgos de enfermedades. Cirujanos notables como Ambroise Paré y Duval contribuyeron al campo en este período, y aunque el conocimiento quirúrgico se mantuvo constante, la cultura científica moderna comenzó a emerger hacia el final de la Edad Media.

La Edad Media, abarcando desde el año 476 con la caída del Imperio Romano hasta 1640 con la Revolución Inglesa, fue testigo de cambios cruciales en la Odontología y la cirugía bucal. Durante este tiempo, Abulcasis describió la posibilidad de reemplazar dientes con hilos de oro, anticipando el concepto de reimplante dental. Cirujanos barberos realizaron trasplantes dentales, pero esto se discontinuó por problemas de éxito y salud. Ambroise Paré y Duval dejaron su huella en la disciplina, y aunque no hubo grandes avances en conocimientos quirúrgicos, la cultura científica moderna comenzó a tomar forma al término de la Edad Media. (Dra. C.E. Leticia María Lemus Cruz, 2009)

5. 1. 1. 4. Edad moderna

La Edad Moderna abarca desde la Revolución Inglesa en 1640 hasta la Comuna de París en 1871. Durante este período, el conocimiento y la práctica en estomatología comenzaron a difundirse ampliamente gracias a la invención de la imprenta en el Siglo XV. En Francia, Pierre Fauchard (1690-1761) publicó "La Chirurgie Dentiste ou traité des dents" en 1728, una obra que demostraba su amplio dominio médico-quirúrgico y aportaba técnicas e instrumental valiosos para la cirugía bucal. John Hunter (1728-1793) también dejó su marca con publicaciones sobre odontología, clasificación dental y recomendaciones para empiezas del

seno maxilar.

El Siglo XIX y principios del XX experimentaron un declive en la popularidad de los trasplantes dentales debido a cuestiones morales y de higiene, así como a la decepción por los resultados de la auto-trasplantación. El campo de la implantología y los autotrasplantes se quedó sin rumbo y se buscaban alternativas a los dientes naturales. En esta época, varios autores exploraron la creación de raíces artificiales a partir de materiales como iridio, plomo y cerámica, que se insertaban en alvéolos de extracciones recientes. A principios del Siglo XIX, autores como Maggiolo introdujeron implantes metálicos intraalveolares, marcando avances significativos en el campo, con la cirugía emergiendo como una fuerza impulsora detrás de estos progresos. (Dra. C.E. Leticia María Lemus Cruz, 2009)

5. 1. 1. 5. Edad contemporánea

Durante la Edad Contemporánea (1871-1917), los cirujanos y dentistas experimentaron con técnicas de implantes usando diversos metales para tratar fracturas y reemplazar dientes. Harris implantó una raíz de platino revestida de plomo en un alvéolo artificial en 1887. En las primeras décadas del siglo XX, R. Payne y E.J. Greenfield presentaron técnicas en congresos dentales, utilizando metales como plata e iridio con oro. Greenfield documentó conceptos modernos en 1915, destacando la importancia de la higiene, la asociación hueso-implante y la inmovilidad del implante, además de recomendar un período de curación de tres meses. La elección del metal adecuado fue un desafío en la implantología y la cirugía en general.

5. 1. 1. 6. Actualidad

El texto aborda la evolución de los implantes dentales desde 1917 hasta la actualidad. Durante la Primera Guerra Mundial, se intentaron utilizar tornillos, clavos y placas en hospitales militares para tratar fracturas, aunque con resultados poco exitosos. En el ámbito dental, hubo

avances en la década de 1930 cuando Venable y Strock presentaron prótesis e implantes elaborados con una nueva aleación llamada Vitallium. La implantología se dividió en dos escuelas: la Subperióstica de Dahl y la Intraósea de Strock, influidas por el precursor italiano Formiggini.

En la década de 1950, en Italia, se exploró la implantología yuxtaósea con el uso de materiales como Tantalio. Hasta entonces, la implantología se basaba en la experimentación clínica, careciendo de un protocolo científico. En los años 60, el Dr. Brånemark y su equipo descubrieron accidentalmente la oseointegración, observando que el Titanio se adhería al hueso. Esto llevó al concepto de osteointegración, destacando la importancia de comprender la cicatrización y minimizar las lesiones en el proceso.

Este descubrimiento impulsó estudios en perros, resultando en la fijación en forma de tornillo. En 1982, Brånemark presentó su implante de Titanio en forma de tornillo en Toronto, marcando el inicio de la era científica de la implantología moderna. Sin embargo, antes de la oseointegración, algunos implantólogos ya cargaban implantes dentales con resultados variables.

En 1999, Brånemark y su equipo publicaron resultados sobre la función inmediata, donde la restauración protésica se completaba en pocas horas, alcanzando un alto índice de éxito en los primeros pacientes. Esto representó un avance conceptualmente significativo, siendo denominado "diente en el día". En conjunto, este proceso evolutivo ha transformado la implantología y estimulado el crecimiento del mercado implantológico. (Dra. C.E. Leticia María Lemus Cruz, 2009)

5.2. Marco conceptual

5.2.1. Renio

El renio, descubierto en 1925 en minerales como el platino y la columbita, se encuentra en toda la corteza terrestre. Su forma es blanco plateado con lustre metálico y puede ser manipulado en polvo. Tiene dos isótopos estables y diversos inestables. Su uso incluye filamentos para espectrógrafos, medidores iónicos y lámparas de destellos. Los catalizadores de renio son resistentes a sustancias químicas y se emplean en la hidrogenación de productos químicos finos. (Scientific, Rhenium, 2023) (Scientific, Titanium, 2023)

Propiedades físicas y químicas:

- Peso atómico: 186.2
- Punto de fusión: 3180°C
- Punto de ebullición: 5600°C
- Fase a temperatura y presión estándar: Solido
- Configuración electrónica: $[Xe]4f^{14}5d^56s^2$
- Estados de oxidación comunes: +7,4,6
- Número de electrones de valencia: 7

5.2.2. Carbono

Descubierto en la prehistoria, se distribuye en la naturaleza y está presente en estrellas, cometas y atmósferas planetarias. Existe en estado libre como grafito, diamante y fullereno, con una posible cuarta forma, el carbono blanco. Posee siete isótopos, incluyendo el carbono-12, utilizado como estándar para calcular masas atómicas, y el carbono-14, para datación arqueológica. En la Tierra, se encuentra como dióxido de carbono en la atmósfera y disuelto en aguas naturales. Forma parte de rocas como carbonatos de calcio, magnesio e hierro. El carbón, petróleo y gas natural son principalmente hidrocarburos. (Scientific, Carbon, 2023)

Propiedades físicas y químicas:

- Peso atómico: 12.01
- Punto de fusión: 3367°C
- Punto de ebullición: 4827°C
- Fase a temperatura y presión estándar: Solid
- Configuración electrónica: $[He]2s^22p^2$
- Estados de oxidación comunes: ± 4
- Número de electrones de valencia: 4

5. 2. 3. Titanio

El titanio fue descubierto en 1791 y nombrado en 1795, pero la producción de titanio puro no fue posible hasta 1910. Es un metal blanco brillante con baja densidad, gran resistencia y excelente resistencia a la corrosión. Es dúctil solo en ausencia de oxígeno, arde al entrar en contacto con el aire y es el único elemento que arde en nitrógeno.

El titanio es biocompatible y no provoca reacciones en el cuerpo. Tiene cinco isótopos estables y ocho inestables. Se encuentra en meteoritos, el Sol y rocas lunares. Es el noveno elemento más abundante en la corteza terrestre, presente en rocas ígneas, rutilo, ilmenita, titanita, titanato, menas de hierro y otros minerales. (Scientific, Titanium, 2023)

- Peso atómico: 47.87
- Punto de fusión: 1660°C
- Punto de ebullición: 3287°C
- Fase a temperatura y presión estándar: Solid
- Configuración electrónica: $[Ar]3d^24s^2$
- Estados de oxidación comunes: +4,3,2
- Número de electrones de valencia: 4

5. 2. 4. Molibdeno

El molibdeno fue identificado como un nuevo elemento en 1778 y se produjo su primera forma impura en 1782. Este metal, de color blanco plateado, es duro aunque menos que el tungsteno. Actúa como agente de aleación para fortalecer aceros templados y mejorar su

resistencia a altas temperaturas. Se oxida a temperaturas elevadas.

Se emplea en aleaciones con níquel resistentes al calor y corrosión. Se utiliza en hornos para vidrio, electrodos de antecrisoles, aplicaciones nucleares, piezas aeroespaciales y misiles. Además, es esencial como elemento traza para la fijación de nitrógeno y otros procesos metabólicos. (Scientific, Moibdenum, 2023)

- Peso atómico: 95.95
- Punto de fusión: 2617°C
- Punto de ebullición: 4612°C
- Fase a temperatura y presión estándar: Solid
- Configuración electrónica: [Kr]4d⁵5s¹
- Estados de oxidación comunes: +6,3,5
- Número de electrones de valencia: 6

5. 2. 5. Materiales metálicos biocompatibles

El éxito de los biomateriales empleados como implantes se basa en tres factores clave: la biocompatibilidad del implante, la salud del receptor y las habilidades del cirujano. La biocompatibilidad del implante es esencial para evitar rechazos. Además, la salud del paciente y la destreza del cirujano influyen. Las necesidades de un implante se comprenden al analizar las características necesarias para prevenir, por ejemplo, la fractura del fémur tras un accidente.

Los metales son materiales inorgánicos cuyos átomos están unidos por enlaces metálicos no direccionales, formando una estructura compacta de alta densidad, lo que los hace visibles en radiografías. La presencia de electrones libres en su estructura les confiere una alta conductividad eléctrica y térmica. Su naturaleza resistente y enlaces fuertes les otorgan propiedades como alta resistencia, módulo elástico y puntos de fusión elevados. Además, su ductilidad permite formas complejas mediante técnicas como mecanizado, forja, fundición y

conformado. Sin embargo, la susceptibilidad a la corrosión, especialmente en entornos con iones de cloruro, es una preocupación en su uso como biomateriales, requiriendo pasivación adecuada.

Se tiene referenciado que los biomateriales metálicos, altamente confiables en términos de rendimiento mecánico, han encontrado aplicación en dispositivos médicos para reemplazo de tejidos duros como articulaciones, placas óseas e implantes dentales. Varias aleaciones metálicas han sido desarrolladas para su uso en medicina, incluyendo aceros inoxidables, aleaciones de cobalto y aleaciones de titanio.

Los metales tienen una larga historia como implantes y dispositivos de fijación en odontología y ortopedia. También se emplean en aplicaciones como guías, stents vasculares, válvulas cardíacas y electrodos en diversos campos médicos. (María Dolores Ortuño García, 2022)

5. 2. 6. Microscopio Electrónico de Barrido (MEB/SEM)

El Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) emerge como una herramienta vital en el terreno de la indagación científica y la evaluación de materiales. A diferencia de los microscopios ópticos convencionales, que emplean luz visible, el MEB se vale de electrones para capturar imágenes de alta resolución de muestras a escala micro y nanométrica. El fundamento del funcionamiento del MEB radica en la interacción de los electrones con la muestra, permitiendo la generación de imágenes minuciosas de la topografía y composición química de la superficie. (Burgos, 2020)

Principio de funcionamiento:

Emplea un haz de electrones enfocado para explorar la superficie de la muestra. El haz de electrones interactúa con la muestra, desencadenando diversos tipos de señales que se emplean para confeccionar imágenes detalladas y obtener datos sobre la composición de la muestra.

Componentes Clave del MEB:

- *Fuente de Electrones:* El MEB se vale de un cañón de electrones que emite electrones mediante emisión termoiónica o emisión de campo. Estos electrones son acelerados y enfocados en un haz que impacta la muestra.
- *Lentes Magnéticas y Electroestáticas:* Estas lentes son empleadas para concentrar el haz de electrones en un punto sumamente pequeño en la superficie de la muestra. La resolución del MEB guarda una relación directa con la capacidad de enfocar el haz en un área diminuta.
- *Muestra:* La muestra ha de ser conductora o recubierta con una fina capa de metal conductor para evitar la acumulación de carga eléctrica y mejorar la conducción de electrones.
- *Detector de Electrones Secundarios (SE):* Cuando el haz de electrones incide en la muestra, provoca la emisión de electrones secundarios desde la superficie. Estos electrones secundarios son recogidos y utilizados para generar imágenes de la topografía de la muestra.
- *Detector de Electrones Retrodispersados (BSE):* Los electrones retrodispersados son aquellos que alteran su dirección debido a colisiones con los átomos de la muestra. Estos electrones son recogidos y empleados para obtener información acerca de la composición química y densidad de la muestra.
- *Detector de Rayos X de Energía Dispersiva (EDS):* Este detector mide la energía de los rayos X emitidos por la muestra debido a la interacción de los electrones del haz con los átomos de la muestra. Esto proporciona detalles sobre la composición química elemental de la muestra. (Marco Antonio González Cantellano, 2015)

Aplicaciones:

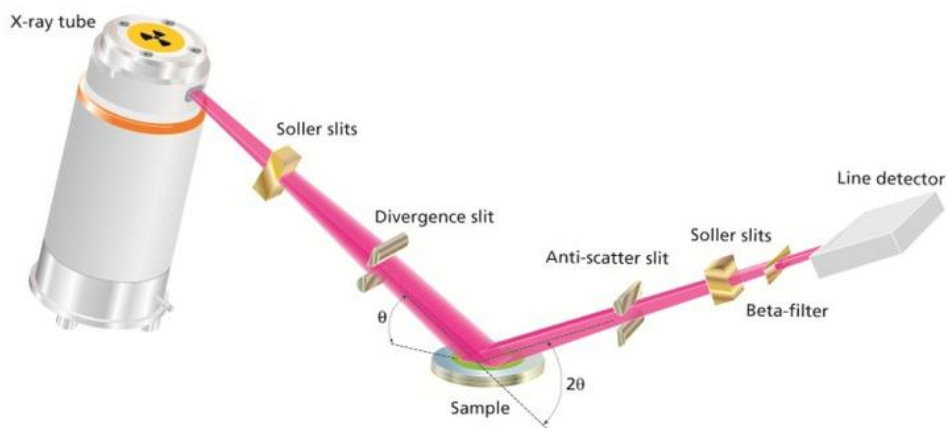
El MEB halla aplicaciones en una variada gama de campos, tales como:

- *Caracterización de Materiales:* Permite analizar la morfología de materiales como metales, polímeros, cerámicas y compuestos.
- *Ciencias de la Vida:* Se utiliza para estudiar tejidos biológicos, células, microorganismos y otros componentes biológicos a nivel micro y nanométrico.
- *Nanotecnología:* Facilita la visualización y manipulación de estructuras nanométricas y nanoestructuras, como nanotubos, nanopartículas y nanocompuestos.
- *Geología y Ciencias de la Tierra:* Se emplea para examinar minerales, rocas y muestras geológicas a escalas micro y submicroscópicas.
- *Caracterización de Fallas:* Posibilita el análisis de defectos, fracturas y problemas en la estructura de materiales.

5. 2. 7. Difracción de Rayos X

La difracción de rayos X es una técnica esencial para analizar la estructura cristalina de materiales. Implica la dispersión de rayos X por la disposición atómica en un cristal, generando patrones de difracción que revelan información sobre la estructura y distancia entre planos cristalinos. Los equipos de difracción constan de un generador de rayos X, una muestra cristalina, un goniómetro para rotar la muestra, detectores para medir rayos X dispersados, un monocromador para seleccionar una longitud de onda específica, sistemas de enfriamiento y software de análisis. (Martha Eloísa Aparicio Ceja, 2010)

Figura 1. Esquema funcional de la difracción de rayos X. Fuente: (Uwe König, 2012)



Con base en la descripción realizada por Eloísa Martha los rayos X se generan en un tubo de rayos X, que es una ampolla al vacío que contiene un cátodo y un ánodo. El cátodo incluye un filamento de tungsteno por donde fluyen los electrones. Estos electrones son acelerados por una diferencia de potencial de alta energía, alrededor de 45,000 voltios, y chocan con un blanco de cobre u otros materiales como molibdeno, hierro o cobalto. Estos impactos de electrones en el blanco generan rayos X. Los rayos X generados atraviesan una ventana de berilio, un material con bajo número atómico, que permite que los rayos X pasen a través de ella. Estos rayos X resultantes son los que se utilizan en la técnica de difracción para analizar la estructura cristalina de los materiales.

Notas importantes para el análisis de un difractograma:

- Ancho de los picos: El ancho de los picos de difracción es un indicador de la pureza cristalina y la dispersión atómica de un material. Los picos estrechos indican una alta pureza cristalina y una baja dispersión atómica, mientras que los picos anchos indican una baja pureza cristalina y una alta dispersión atómica. (UPTC, 2021)
- Pureza cristalina: La pureza cristalina de un material indica la cantidad de defectos

cristalinos que tiene el material. Los defectos cristalinos son imperfecciones en la estructura cristalina que pueden afectar las propiedades físicas y químicas del material. (UPTC, 2021)

Dispersión atómica: La dispersión atómica de un material indica la distribución de los átomos en el material. Una dispersión atómica uniforme indica que los átomos están distribuidos de manera uniforme en el material, mientras que una dispersión atómica no uniforme indica que los átomos están distribuidos de manera no uniforme en el material. (UPTC, 2021)

5. 2. 8. Sputtering

El sputtering, una técnica empleada para la deposición de películas delgadas sobre sustratos sólidos, involucra el impacto de partículas cargadas (iones) en un material objetivo, llamado "blanco" o "target", en un ambiente de vacío. Con el choque de los iones en la superficie del blanco, se liberan átomos o moléculas del material que luego son depositados sobre un sustrato, formando una película delgada (Betancourt Coronado, 2023).

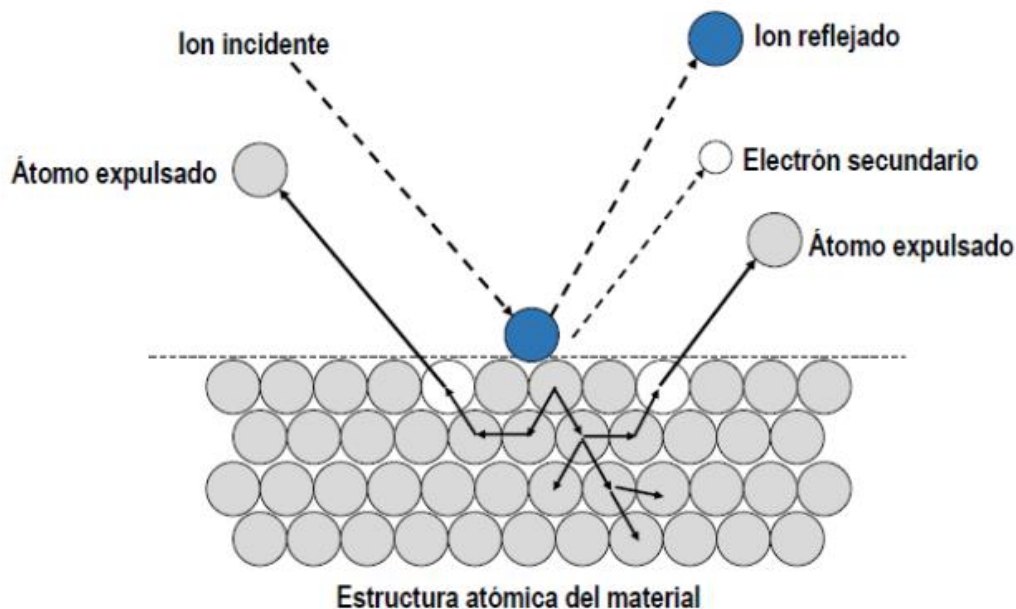
Principio del Sputtering:

El principio subyacente del sputtering radica en la transferencia de energía cinética desde los iones al blanco sólido. Al impactar la superficie del blanco, los iones transmiten parte de su energía a los átomos o moléculas del mismo, lo que puede provocar su desprendimiento, proceso conocido como "desprendimiento sputter". Estas partículas liberadas viajan en el vacío y se depositan en el sustrato, formando una película delgada con propiedades similares a las del material original.

En síntesis, la técnica de sputtering se fundamenta en la transferencia de momento y el desprendimiento de átomos mediante la vaporización física, generando la deposición de películas delgadas sobre superficies conocidas como "sustrato". Estas superficies son

bombardeadas con partículas altamente energizadas, típicamente iones de gases nobles acelerados en un campo eléctrico, como se puede visualizar en la imagen anexa a continuación:

Figura 2. Esquema: Ion incidente atraído por el campo eléctrico y golpea la superficie del material transfiriendo su momento. Fuente: (Betancourt Coronado, 2023)



Componentes del Equipo de Sputtering:

- ***Cámara de Vacío:*** En este entorno controlado se ejecuta el proceso de sputtering. El vacío evita interacciones de átomos y moléculas con gases en el aire, lo que preservaría la calidad de la película depositada.
- ***Fuente de Iones:*** Suministra iones cargados positivamente (generalmente argón) que se aceleran hacia el blanco. Estos iones bombardean la superficie del blanco, liberando átomos o moléculas.
- ***Blanco o Target:*** Es el material que se deposita en forma de película delgada en el sustrato. Puede ser metálico, cerámico u otro, según el propósito de la deposición.
- ***Sustrato:*** La superficie donde se deposita la película delgada. Puede ser semiconductor, vidrio u otros sólidos.

- *Sistema de Enfriamiento:* Para evitar la degradación de la película debido al calor generado, se emplea un sistema de enfriamiento que controla la temperatura del blanco.
- *Control de Proceso:* Factores como la energía de los iones, la presión en la cámara de vacío, el flujo de gas, el tiempo de deposición y otros son ajustados para obtener las características deseadas en la película resultante.

Aplicaciones:

El sputtering se usa en diversas áreas, incluyendo la manufactura de dispositivos electrónicos, recubrimientos protectores, capas conductoras, células solares, y en investigación de nuevos materiales y estructuras.

Consideraciones Clave:

La calidad de la película depositada está influenciada por la pureza del blanco, la energía de los iones, la uniformidad del bombardeo y la temperatura del proceso.

5. 2. 9. Minimum Essential Medium (MEM)

El Medio Esencial Mínimo (MEM) figura entre los medios de cultivo celular de mayor empleo. El MEM resulta apropiado para diversas aplicaciones de cultivo celular en células de mamífero, ya sean en suspensión o adherentes, abarcando ejemplos como HeLa, BHK-21, 293, HEP-2, HT-1080, MCF-7, fibroblastos y astrocitos primarios de rata. (Fisher, MEM, powder, 2023) (Fisher, Media Preparation from Powder and Concentrates, 2023)

5. 2. 10. Células PK-15

El Las células PK-15 son una línea celular derivada de células epiteliales porcinas. Su utilidad en la investigación biológica y biomédica es amplia, siendo comunes en estudios que abordan la toxicidad y citotoxicidad. A continuación, se presenta un marco teórico que explora la

utilización de las células PK-15 en pruebas citotóxicas:

Pruebas de Citotoxicidad:

Las pruebas de citotoxicidad son fundamentales para evaluar el impacto que diversos compuestos, como sustancias químicas o fármacos, tienen sobre la viabilidad y salud celular. Estos ensayos son esenciales para determinar si una sustancia puede generar daño celular, inflamación o incluso apoptosis. Las células PK-15 constituyen un modelo de gran utilidad en pruebas citotóxicas, al brindar información sobre cómo los compuestos afectan a las células de origen porcino. (Afshar) (P. Meerts, 2004)

Utilización y consideraciones generales de las Células PK-15 en Pruebas Citotóxicas:

- *Preparación Celular:* Las células PK-15 son cultivadas en condiciones óptimas, incluyendo el medio de cultivo adecuado y una temperatura controlada, antes de someterlas a pruebas citotóxicas. Es crucial que las células se encuentren en una fase activa de crecimiento y en una densidad apropiada para asegurar resultados confiables.
- *Exposición a Compuestos:* Las células PK-15 son expuestas a distintas concentraciones de la sustancia en estudio, la cual puede ser un compuesto químico, un fármaco o cualquier otro agente bajo evaluación de citotoxicidad.
- *Evaluación de la Viabilidad:* Posterior a la exposición, se evalúa la viabilidad celular empleando diversos métodos, como pruebas de absorbancia (MTT, MTS), tintes vitales (azul de tripano), ensayos de apoptosis y análisis de la integridad de la membrana celular.
- *Análisis de Resultados:* Los datos obtenidos son analizados para determinar la concentración del compuesto que ocasiona una disminución significativa en la viabilidad celular. Esta información es representada a través de curvas de dosis-respuesta, que visualizan la relación entre la concentración y el efecto citotóxico.

Aplicaciones:

- *Evaluación de Fármacos:* Para anticipar la toxicidad de potenciales fármacos previo a ensayos clínicos.
- *Estudio de Compuestos Químicos:* Para identificar sustancias con capacidad de dañar células o generar efectos adversos en la salud.
- *Investigación de Mecanismos:* Con el propósito de comprender cómo determinados compuestos interactúan con las células y provocan efectos citotóxicos.

5. 2. 12. Ensayo de viabilidad celular con MTT

Con base en lo expuesto por [Thermophisic Scientific](#) en 2002, este ensayo presenta un enfoque sencillo para calcular el recuento celular mediante lectores de absorbancia de microplacas convencionales. Esta técnica es ampliamente empleada para estimar las tasas de crecimiento celular en evaluaciones de eficacia de fármacos, sustancias citotóxicas y tamizaje de compuestos biológicamente activos. Si bien existen múltiples métodos, las estrategias indirectas que utilizan marcadores fluorescentes o cromogénicos ofrecen ensayos eficientes y escalables. Dentro de estos procedimientos, el ensayo MTT, concebido por Mossman (Mosmann, 1983), sigue siendo uno de los más versátiles y populares.

El ensayo MTT involucra la conversión del compuesto soluble en agua MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) en formazán insoluble²⁻⁴. Posteriormente, el formazán se disuelve y su concentración se determina midiendo la densidad óptica a 570 nm. Este enfoque brinda una forma confiable de evaluar la proliferación celular y ofrece una herramienta esencial para la caracterización de efectos biológicos en estudios a gran escala. (Fisher, Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit (V-13154), 2002)

5. 2. 11. 1. Antibiotic-Antimycotic (100X)

Se emplea con el fin de evitar la contaminación microbiana, ya sea de origen bacteriano o fúngico. Esta solución incorpora en su composición 10,000 unidades/mL de penicilina, 10,000 µg/mL de estreptomicina y 25 µg/mL de anfotericina B, suministrados por Gibco. Los antibióticos penicilina y estreptomicina desempeñan un papel fundamental en la prevención de la contaminación bacteriana en los cultivos celulares, gracias a su efectiva acción conjunta contra bacterias tanto grampositivas como gramnegativas. Por otro lado, la presencia de la anfotericina B actúa como salvaguarda contra la contaminación fúngica en los cultivos celulares, al inhibir el desarrollo de hongos pluricelulares y levaduras. (Fisher, Antibiotic-Antimycotic (100X), 2023)

5. 2. 12. Lector de microplacas (Absorbancia)

Un lector de microplacas representa un dispositivo empleado en laboratorios para la medición y análisis de múltiples muestras alojadas en una placa de microtitulación, también conocida como microplaca. El marco conceptual de un lector de microplacas abarca diversos componentes esenciales (JUAN CAMILO CASALLAS HERNÁNDEZ, 2010):

Principio de Funcionamiento:

El funcionamiento de un lector de microplacas se basa en la aplicación de diversas tecnologías de detección para evaluar propiedades de las muestras ubicadas en las cavidades individuales de la microplaca. Esto puede englobar medidas de absorción de luz, fluorescencia, luminescencia, actividad enzimática, entre otros parámetros, según el tipo de análisis que se esté efectuando.

Componentes del Lector de Microplacas:

- *Sistema Óptico:* El lector de microplacas incorpora un sistema óptico que genera y captura

la luz interactuando con las muestras en las cavidades de la microplaca. Esto puede implicar fuentes de luz, filtros, espejos y detectores ópticos para registrar las respuestas ópticas de las muestras.

- *Sistema de Movimiento:* Muchos lectores de microplacas pueden mover la microplaca en diferentes direcciones para asegurar que todas las cavidades se midan de manera uniforme. Esto evita posibles variaciones en las mediciones debido a diferencias en la ubicación de las muestras.
- *Sistema de Detección:* Comprende detectores sensibles que transforman las señales ópticas generadas por las muestras en señales eléctricas para su procesamiento y análisis subsiguiente.
- *Sistema de Dispensación:* Algunos lectores de microplacas posibilitan la adición automatizada de reactivos en las cavidades de la microplaca, lo que es crucial para la ejecución de experimentos controlados y repetibles.
- *Software de Control y Análisis:* El software dirige el funcionamiento del lector de microplacas, establece los parámetros del experimento, captura y almacena los datos y ejecuta análisis para extraer información pertinente de las mediciones.

Diversas Aplicaciones:

Los lectores de microplacas encuentran aplicación en una gama variada de campos como biología, química y otras disciplinas científicas. Estas aplicaciones abarcan ensayos de interacciones moleculares, análisis de actividad enzimática, evaluación de toxicidad celular, exploración de interacciones proteína-ligando, estudios de viabilidad celular y muchas otras investigaciones que demandan análisis de alto rendimiento y en paralelo.

Aspectos Relevantes:

- *Calibración y Validación:* La calibración precisa y la validación del lector de microplacas son cruciales para asegurar mediciones exactas y fiables. Se emplean estándares conocidos y controles positivos y negativos para validar el rendimiento del dispositivo.
- *Uniformidad:* Mantener uniformidad en las mediciones a lo largo de la microplaca es fundamental. Los lectores deben ser capaces de medir con alta precisión y reproducibilidad en todas las cavidades.
- *Compatibilidad de Placas:* Los lectores de microplacas deben ser compatibles con diversos formatos de microplacas, como 96, 384 e incluso 1536 pozos, para adaptarse a una variedad de experimentos y tamaños de muestra.
- *Análisis de Datos:* El software de análisis debe tener la capacidad de procesar los datos generados y proporcionar resultados cuantitativos y cualitativos de manera efectiva.

5.3. Marco legal

5.3.1. ISO 10993-5 del 2009

Consiste en la secuencia de las siguientes partes bajo un título generalizado *EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE DISPOSITIVOS MÉDICOS*

La *PARTE 5 - PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD INVITRO*, es la norma que establece tres categorías de estudios/pruebas:

- Extracto
- Contacto directo
- Contacto indirecto.

La elección de la(s) categoría(s) se determina en función del posible ámbito de aplicación, la

naturaleza de la muestra y el propósito del material. En consecuencia, el protocolo o procedimiento a seguir para la preparación de las muestras y las células con las que se realizarán los ensayos varía según el tipo de investigación que se pretenda llevar a cabo. Esto se realiza con el objetivo de evaluar la magnitud del efecto citotóxico del material en cuestión.

Las evaluaciones de citotoxicidad en materiales pueden agruparse en las siguientes categorías: primero, la evaluación del daño celular utilizando métodos morfológicos; segundo, las mediciones del daño celular en términos cuantitativos; tercero, las mediciones del crecimiento celular; y cuarto, las mediciones de aspectos físicos del metabolismo celular.

En los anexos de la norma se ofrecen ejemplos que indican qué tipo de muestras son adecuadas para cada una de estas categorías. Sin embargo, es importante destacar que esta identificación debe llevarse a cabo por parte del investigador, ya que se ajustará a la naturaleza específica de su estudio. (ISO 10993-5, 2009)

6 Metodología

El proceso metodológico se segmenta en 2 fases principales, que son:

Figura 3. *Fases metodológicas.*



6. 1. Fase 1. Esquema general producción y caracterización de los recubrimientos.

Figura 4. *Esquema general metodológico para la producción y análisis de los recubrimientos.*

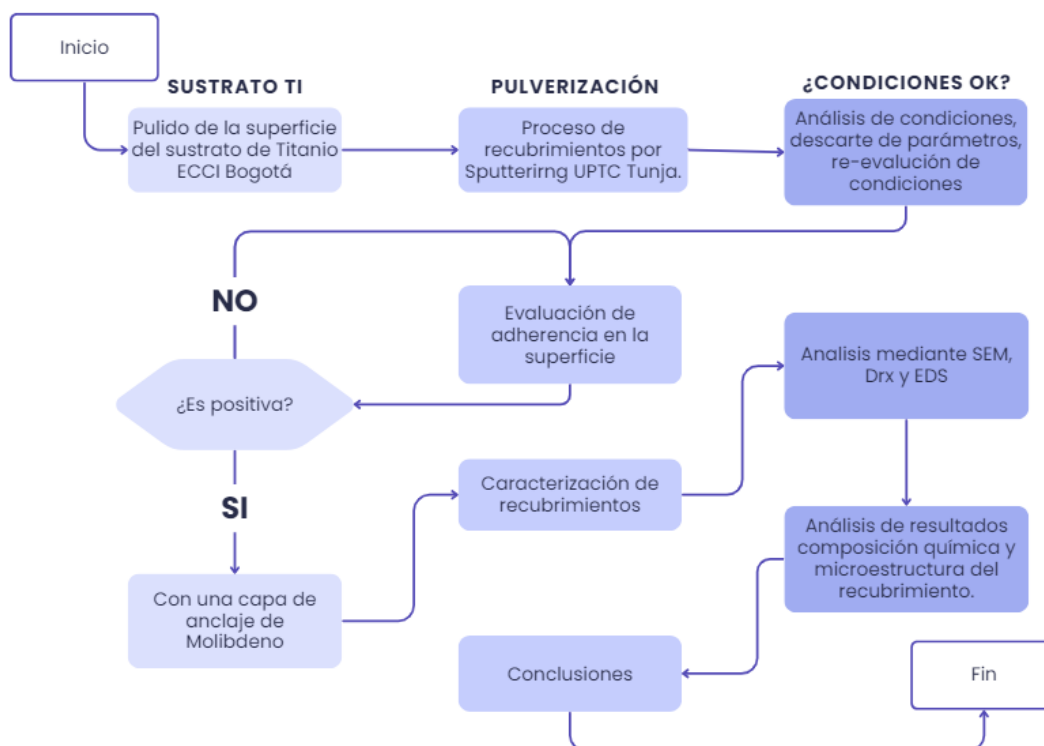
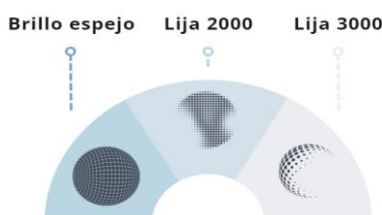


Figura 5. *Producción y preparación de las muestras*

Se desarrollaron recubrimientos basados en Re y C depositados sobre sustratos de Titanio mediante el proceso de pulverización catódica haciendo uso del equipo *YKY Three-target magnetron sputtering coater* en una atmósfera de argón (Ar). La presión base antes de la deposición era de 5×10^{-3} Pa y la presión de trabajo una vez iniciado el proceso de recubrimiento se estabiliza en $2,5 \times 10^{-2}$ Pa.

Se establecieron tres condiciones distintas para la superficie del sustrato de Titanio con el objetivo de evaluar la adherencia y el comportamiento en relación a las diferentes características superficiales, en cuanto a la rugosidad, las cuales se pueden ver en la Figura 4.

Figura 6. *Características superficiales empleadas.*



Para mejorar la adherencia de la película, se aplicó una capa de anclaje bombardeando iones de Molibdeno (Mo) a partir de un blanco de Mo de 2" con una potencia del cátodo de 50 y 70 W en un periodo de 3600 seg antes de la deposición. Con el flujo de Ar fijado en 4 sccm, la cámara mantuvo una presión del Ar de 2.5×10^{-2} Pa.

Después de la deposición de la capa intermedia de Mo sobre el sustrato de Ti, para la deposición de los recubrimientos de Re y C se usaron blancos de Renio (Re) y Grafito (C) de alta pureza (99,999%), los blancos tenían un diámetro de 2 pulgadas. Las muestras se ubicaron sobre un soporte de sustrato rotacional para la deposición con 10 rpm asegurando con esta rotación la homogeneidad del recubrimiento. Se hizo uso de un diseño experimental factorial 2^2 variando dos factores: la potencia de blanco de Renio y la potencia de blanco de Carbono. La especificidad de los parámetros empleados en los diferentes recubrimientos realizados se muestra en la *tabla 1*.

Tabla 1. *Parámetros variados en los recubrimientos de Re y C sobre sustrato de Titanio.*

RECUBRIMIENTO	POTENCIA DEL RENIO (W)	POTENCIA DEL CARBONO (W)	POTENCIA DE LA CAPA DE ACLAJE (Molibdeno) (W)	TEMPERATURA SUSTRATO (°C)
1	50	10	50	20
2	50	15	50	22
3	60	15	50	17
4	60	10	50	19
5	70	10	70	350
6	60	15	70	350
7	50	15	70	350

La temperatura de la muestra durante el proceso de deposición inicialmente se realizó a temperatura ambiente, sin embargo, se optó por utilizar 350°C como temperatura de los sustratos para realizar los recubrimientos con el fin de mejorar la adherencia de los recubrimientos.

6. 1. 1. Caracterización de los recubrimientos

La caracterización estructural para el análisis químico de la unión de las películas se llevó a cabo mediante la técnica de difracción de rayos X (DRX). Se utilizó un difractómetro de Rayos X Philips Xpert pro A Panalytical, equipado con una fuente de cobre, operando a una corriente de 40 mA y un voltaje de 45 KV.

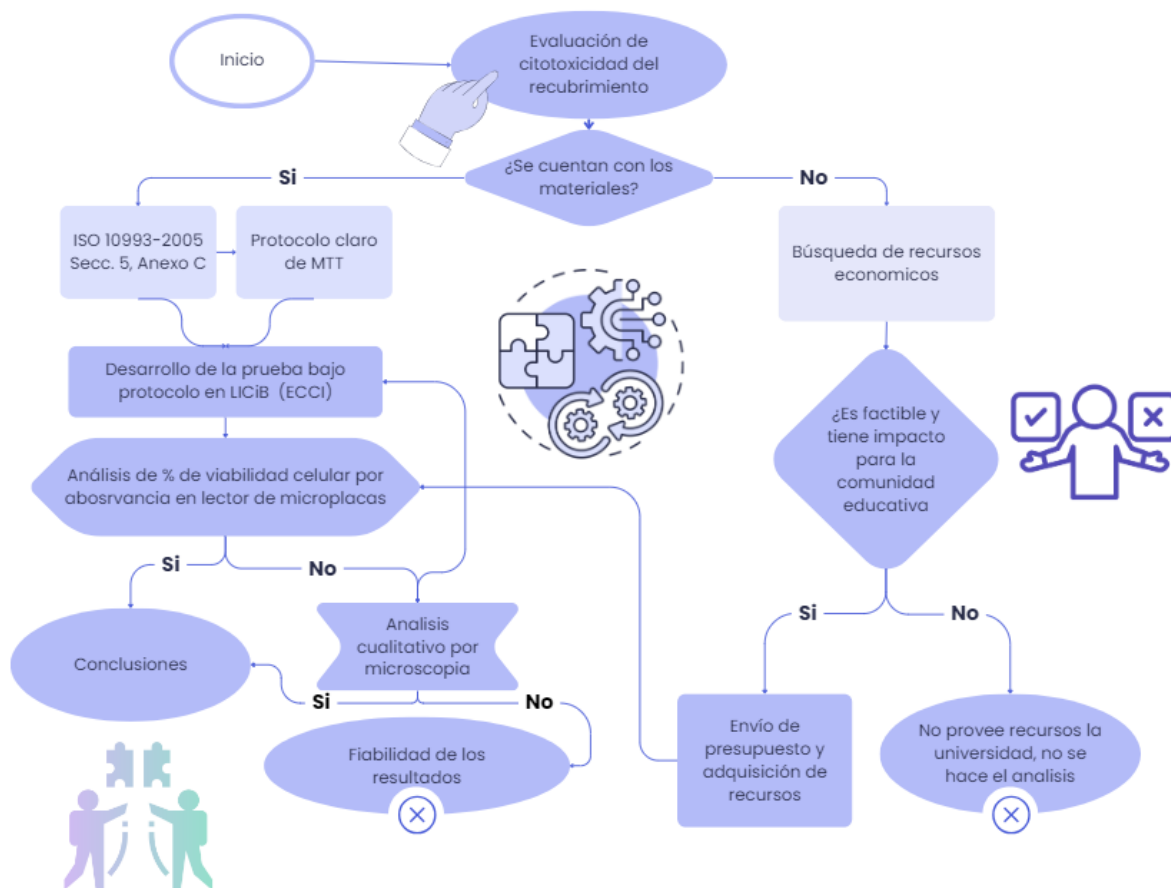
Para las piezas del sustrato, se aplicó un step size de 0.013 y un time per step de 40 segundos, lo que resultó en un tiempo total de 17 minutos. Para las muestras del recubrimiento, se emplearon los mismos parámetros, con la excepción del tiempo de radiación, que fue de 25 minutos.

El propósito de este procedimiento fue evaluar la estructura, las fases presentes y la cristalinidad de los recubrimientos. Para el análisis cualitativo de los recubrimientos se utilizó un microscopio electrónico de barrido ZEISS serie EVO MA10 operando a 20.00 kV y con una amplificación de 50X y 500X.

Además, se realizó un análisis semicuantitativo utilizando espectroscopía de energía dispersiva (EDS) mediante una sonda de OXFORD. Esta técnica posibilita obtener una perspectiva general de la composición química elemental de la muestra.

6. 2. Fase 2. Esquema general análisis de biocompatibilidad

Figura 7. Esquema metodológico para el análisis de viabilidad celular mediante prueba MTT



6.2.1. Pruebas de biocompatibilidad MTT en células PK-15

Las pruebas de biocompatibilidad se llevaron a cabo utilizando el ensayo MTT y se empleó el Lector de Microplacas de la marca Biotek, modelo ELX800, con una longitud de onda de 570 nm para la medición. El proceso de biocompatibilidad se realizó en el Laboratorio de Investigación en Ciencias Biológicas (LICiB), que cuenta con un nivel de bioseguridad BSL3, construido siguiendo los estándares del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos.

Las células fueron cultivadas en un medio de cultivo específico conocido como Minimum Essential Medium (MEM), proporcionado por Gibco (CAT 61100061). Para enriquecer este medio, se añadió un 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) también suministrado por Gibco (CAT 11573397), el cual provee nutrientes esenciales para el crecimiento celular. Además, se incorporó un 1% de Antibiotic-Antimycotic (100X) (CAT 15240062) de Gibco para prevenir la contaminación microbiológica. El cultivo se llevó a cabo en condiciones rigurosamente controladas, manteniendo una atmósfera de un 5% de CO₂ para optimizar las condiciones de crecimiento celular y una temperatura constante de 37°C, replicando así el ambiente óptimo para el desarrollo celular.

¹ Para validar el proceso de creación del MEM dirigirse al siguiente vínculo: [Media Preparation from Powder and Concentrates, Thermo Fisher](#) y Anexo 1.

El flujo de trabajo en este laboratorio involucró los siguientes pasos para evaluar la citotoxicidad de los recubrimientos:

1. Esterilización de los recubrimientos en cabina de cultivo con luz ultravioleta por un periodo de 15 minutos por cada lado.

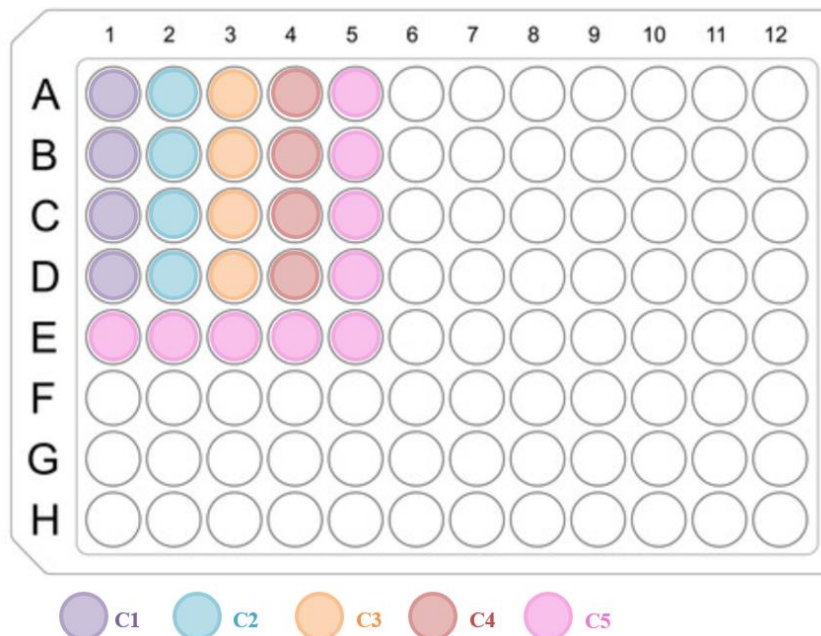
Figura 8. Esterilización de los recubrimientos con luz ultravioleta en cabina de cultivo.



2. Deposición de los recubrimientos en las 3 microplacas de 24 pozos (evaluadas a las 24,

48 y 72 horas.) con las células PK-15 en el medio, con la siguiente distribución:

Figura 9. Distribución de las diferentes condiciones de los recubrimientos en las microplacas: C1) Brillo espejo, C2) Lija 200, C3) Lija 3000, C4) Sin recubrimiento (Moneda de Titanio), C5) Control celular (Medio celular)



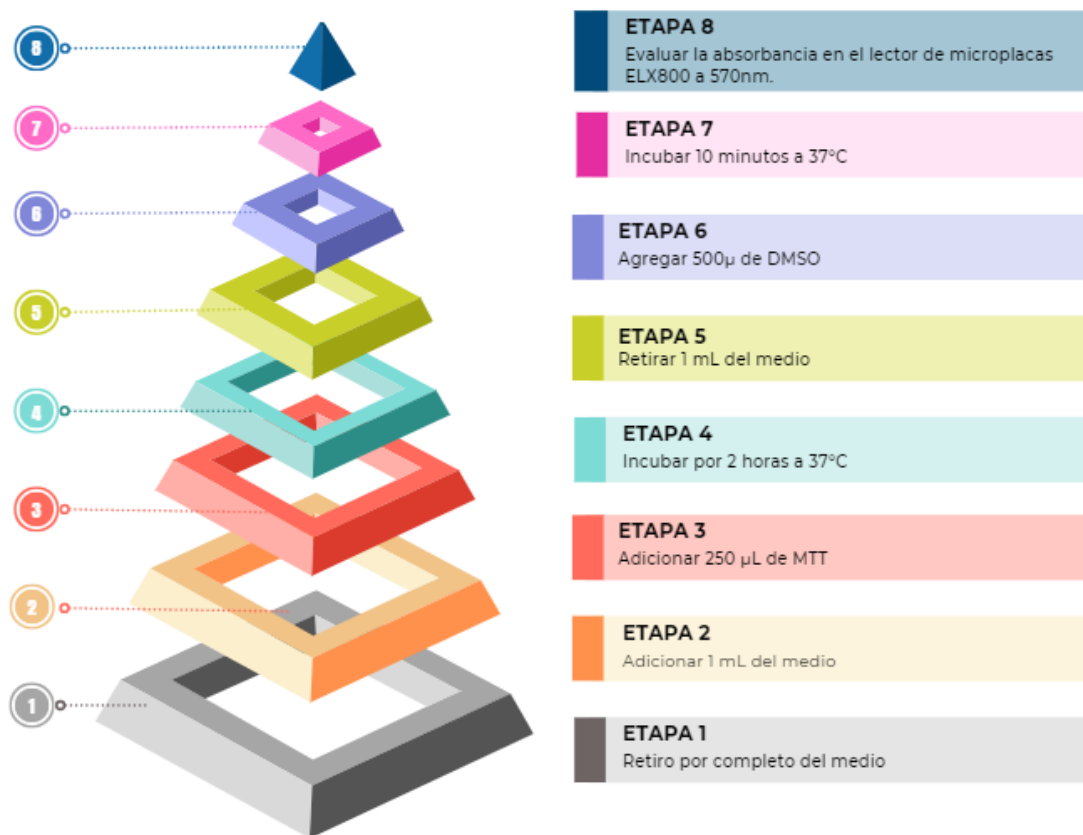
- Se llevó a cabo el ensayo MTT siguiendo el protocolo establecido por el fabricante (Fisher, Media Preparation from Powder and Concentrates, 2002). Este procedimiento se realizó en microplacas de 24 pozos, con mediciones realizadas a intervalos de 24, 48 y 72 horas.

Figura 10. Microplacas para evaluar la citotoxicidad del recubrimiento a las 24, 48 y 72 horas. Recubrimientos inmersos en el medio de cultivo durante el proceso de evaluación.



A continuación, se expone en un diagrama piramidal el proceso ejecutado para el desarrollo del ensayo MTT:

Figura 11. Flujo definido para el ensayo MTT, para mayor detalle dirigirse al Anexo 1.



6.2.2. Cálculo de la viabilidad celular

De acuerdo con la norma ISO 10993-5:2009, Anexo C. *MTT cytotoxicity test*, para evaluar la reducción de la viabilidad en comparación con el blanco de control celular, se emplea la ecuación 1, la cual proporciona un enfoque cuantitativo para medir el impacto de las diferentes condiciones de exposición en la viabilidad celular.

La ecuación se formula de la siguiente manera:

$$Viab. \% = \frac{100 - OD_{570e}}{OD_{570b}}$$

Donde:

- *Viab. %*, representa la reducción de la viabilidad en porcentaje.
- *OD570e*: es el valor medio de la densidad óptica medida de los extractos al 100 % de la muestra problema
- *OD570b*: es el valor medio de la densidad óptica medida de los blancos.

El valor de la viabilidad celular (Viab.%) es inversamente proporcional al potencial citotóxico del objeto de ensayo. En otras palabras, a medida que el valor de viabilidad disminuye, aumenta la posibilidad de que el objeto de ensayo tenga efectos citotóxicos.

Si la viabilidad celular se reduce a menos del 70% en comparación con el blanco de control, esto indica un potencial citotóxico del objeto de ensayo. Es decir, si el porcentaje de viabilidad es inferior al 70%, hay indicios de que el objeto podría tener un impacto negativo en la viabilidad celular.

7 Resultados

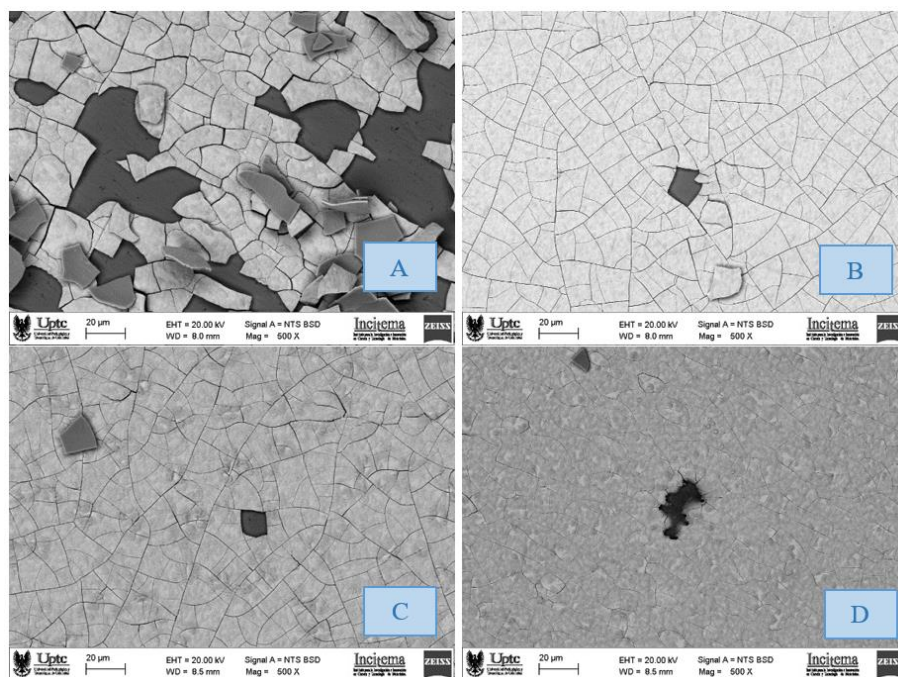
7.1. Caracterización de los recubrimientos

7.1.1. Análisis comparativo de la morfología de la superficie de las muestras por Microscopia electrónica de barrido (SEM)

En relación a los recubrimientos numerados como **1** (Re: 50W, C: 10W), **2** (Re: 50W, C: 15W), **3** (Re: 60W, C: 15W) y **4** (Re: 60W, C: 10W), se ha observado una falta de adherencia en relación al sustrato. Esta falta de unión adecuada persiste incluso cuando se mantiene la temperatura del sustrato en un rango de 19 a 22°C, y se ha implementado una capa de anclaje de molibdeno (Mo) con una potencia de 50W.

Se ha evidenciado un desprendimiento considerable y la formación de grietas notables en la superficie de la película o recubrimiento como se evidencia claramente en la *Figura 9*.

Figura 12. SEM con magnificación de 500x de la superficie con notable desprendimiento: A) Recubrimiento 1, B) Recubrimiento 2, C) Recubrimiento 3, D) Recubrimiento 4.



En cuanto al recubrimiento 5, se llevaron a cabo ajustes en las condiciones para mejorar su adherencia al sustrato. Se observó un desprendimiento significativo en los recubrimientos 1, 2, 3 y 4, lo que motivó la aplicación de las siguientes condiciones específicas de potencia en los blancos: 70W para el elemento Re (renio) y 10W para el elemento C (carbono). Este ajuste resultó en una mejor adherencia al sustrato.

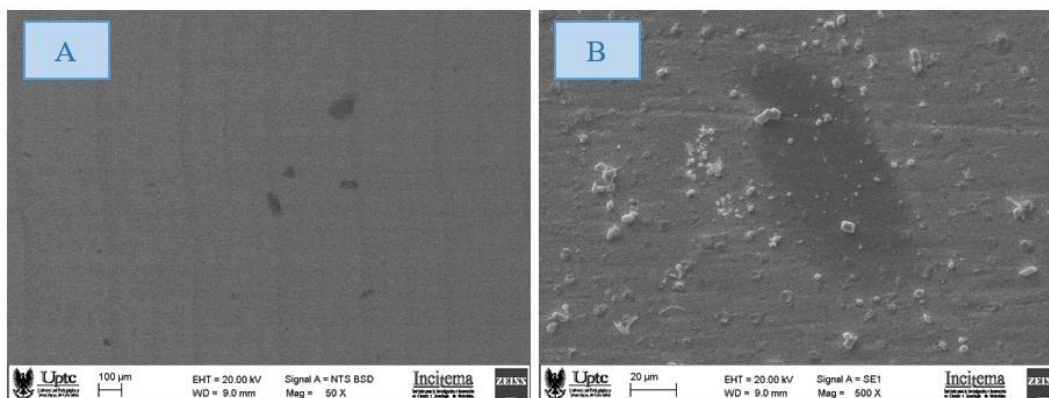
Además, al establecer una temperatura de 350°C y una potencia de 70W durante la etapa de deposición de la capa de anclaje de molibdeno, se evidenció una disminución en la irregularidad de la superficie y notables mejoras en las propiedades de adherencia.

Mediante la *figura 10*, la cual alcanza una ampliación de 500x, se pudo apreciar de forma visual una mejor adherencia del recubrimiento al sustrato, sin rastros de fracturas o separaciones.

El contraste visual de las tonalidades que se aprecia en la figura refleja variaciones en la composición. Destacan gránulos con una tonalidad más blanca, indicando una mayor concentración de electrones en esas regiones. Esta observación se encuentra detallada en las páginas 134, 135, 136 y 137. (Clavijo, 2013)

² Por limitantes de recurso el análisis por EDS se realizará solo para los recubrimientos 6 y 7 que no presentan desprendimiento de la película, razón por la cual se segmenta el análisis único de SEM en un apartado individual para el recubrimiento 5.

Figura 13. SEM recubrimiento 5: A) resolución de 100µm a 50X, B) resolución de 20µm a 500X

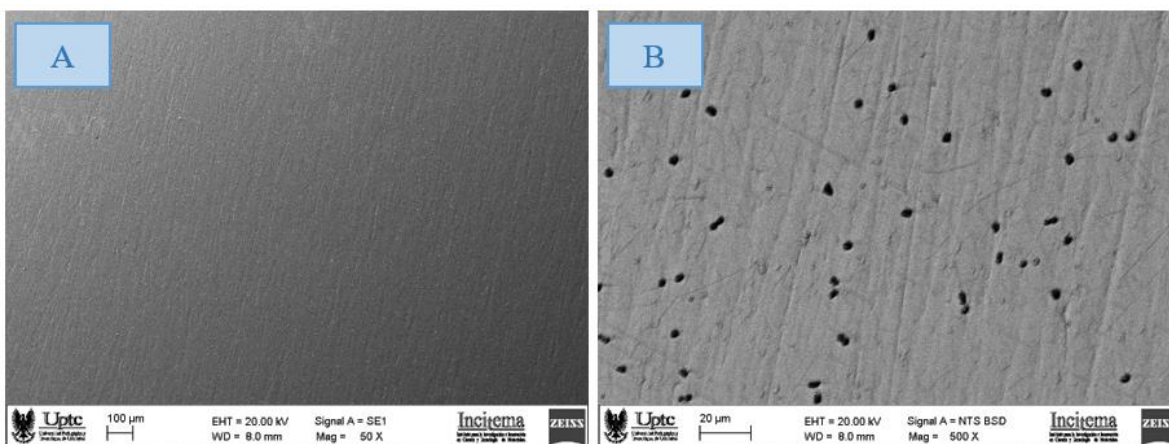


Por otra parte, la evaluación del recubrimiento 6, realizado bajo condiciones de 60W en el blanco de Renio y 15W en el blanco de carbono, que a la vista indica una adherencia positiva a la superficie. Esto es evidenciado claramente en la *figura 11A*. Esta observación se refuerza mediante el uso de microscopía a una magnificación de 50X, muestra que no se presenta desprendimiento ni cuarteamiento.

En la *figura 11B*, que emplea una ampliación de 500x, se observan cambios notables en la morfología superficial y la composición. La presencia de gránulos o nódulos de tonalidad negra llama la atención y será objeto de análisis mediante la técnica EDS (Espectroscopía de Dispersión de Energía) para evaluar su composición. Estos gránulos/nódulos, pese a su tonalidad oscura, evidencian una menor concentración de electrones.

En resumen, la muestra 6 ha demostrado desde una perspectiva visual una adherencia con mayor solidez a la superficie, respaldada por los resultados visuales en las *figuras 11A* y *11B*. La magnificación de 50X en la microscopía confirma la ausencia de problemas de desprendimiento, mientras que la magnificación de 500x en la ilustración 8 indica cambios en la morfología y composición de la superficie, particularmente en los gránulos/nódulos oscuros cuya composición será evaluada y descrita por EDS en la sección 7.1.2.

Figura 14. SEM recubrimiento 6: A) resolución de 100µm a 50X, B) resolución de 20µm a 500X

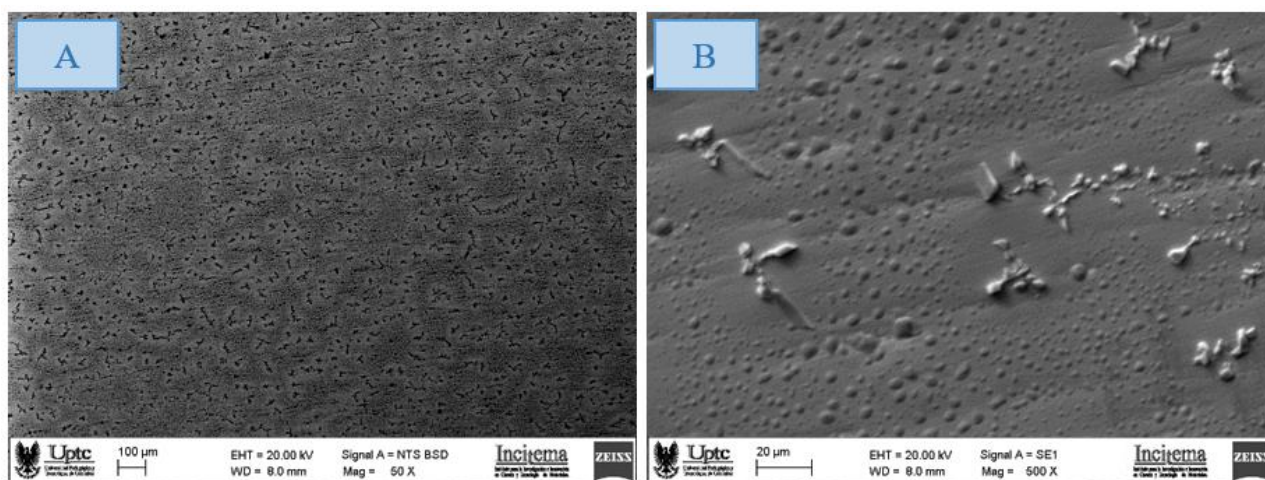


La microscopía de la superficie del recubrimiento número 7 revela un contraste distintivo que parece estar relacionado con las diferencias en el peso atómico. En este contexto, se sugiere realizar un análisis complementario mediante la técnica EDS (Espectroscopía de Dispersión de Energía) para obtener información detallada sobre las características químicas o de composición de la película. Esto podría ayudar a comprender mejor las formas en tipo de hojuelas que se aprecian en la morfología de la superficie.

El recubrimiento 7 fue llevado a cabo utilizando una potencia de 50W en el blanco de Renio y 10W en el de Carbono, con una capa de anclaje de Molibdeno de 70W. En la *figura 12A*, se realizó un análisis con una ampliación de 50X, mientras que en la toma de la *figura 12B* se utilizó una magnificación de 500X.

La observación detallada de estas ilustraciones permite una mejor comprensión de la estructura y composición de la superficie del recubrimiento 7, y la realización del análisis EDS ofrece una valiosa información adicional para interpretar las características de las formas tipo hojuelas y sus propiedades químicas.

Figura 15. SEM recubrimiento 7: A) resolución de 100 μ m a 50X, B) resolución de 20 μ m a 500X.



7.1.2. Análisis comparativo con base en la composición de la superficie en las muestras por Espectroscopia de rayos X por energía dispersiva (EDS)

A través del análisis morfológico realizado mediante Microscopia Electrónica de Barrido (SEM), se pudo observar que los recubrimientos de mayor interés, que presentaban notables propiedades de adherencia positiva con una película bien adherida al sustrato de Titanio, son los recubrimientos 5, 6 y 7. Estos recubrimientos a partir de una perspectiva visual destacaron por su capacidad para mantener una conexión sólida y estable entre la película y la superficie del sustrato de Titanio.

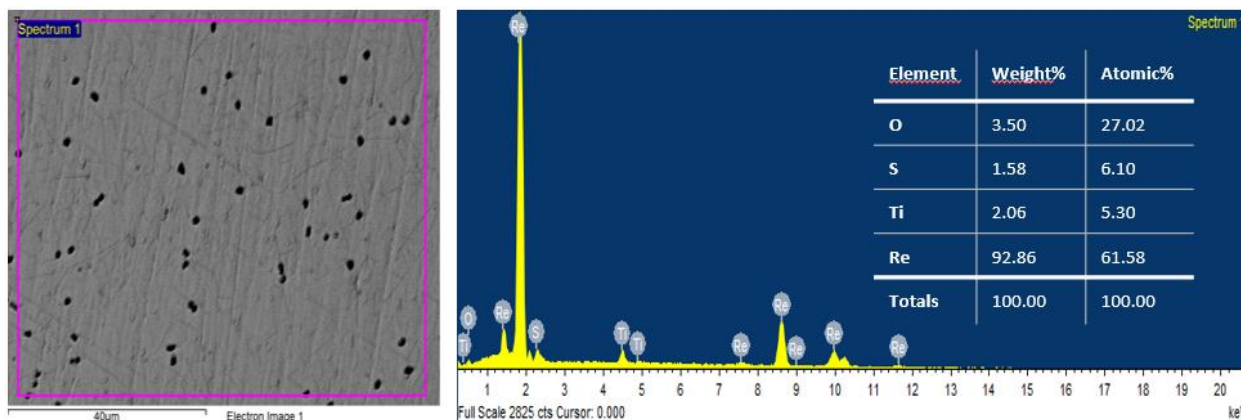
Dado que los recubrimientos (5, 6 y 7) mostraron una adherencia positiva a la vista, se ha decidido enfocar la caracterización detallada en ellos mediante la técnica EDS (Espectroscopía de Dispersión de Energía). El análisis EDS proporciona información específica sobre la composición química y elemental de cada uno de estos recubrimientos en particular. Esto permitirá obtener un conocimiento más profundo de las propiedades químicas y estructurales de la interfaz entre la película y el sustrato, así como de las posibles razones detrás de su mejor adherencia en comparación con otros recubrimientos.

7.1.2.1. Recubrimiento 6

Se llevo a cabo el análisis elemental de la película 6 mediante la técnica de Espectroscopia de Rayos X por Energía Dispersiva (EDS) para lograr la caracterización química precisa del material, en donde los resultados del análisis revelan una composición predominante en el recubrimiento, donde el Renio (Re) representa un 92,86% del peso total. A continuación, se observa la presencia de otros elementos: Oxígeno (O) con un peso de 3,50%, Titanio (Ti) con un 2,06%, y Azufre (S) con un 1,58% de presencia en peso. Es importante mencionar que la presencia de Azufre puede darse por razones como, condiciones del equipo Sputtering empleado en el proceso (suciedad en

la cámara de depósito de los recubrimientos) o bien sean, las condiciones atmosféricas.

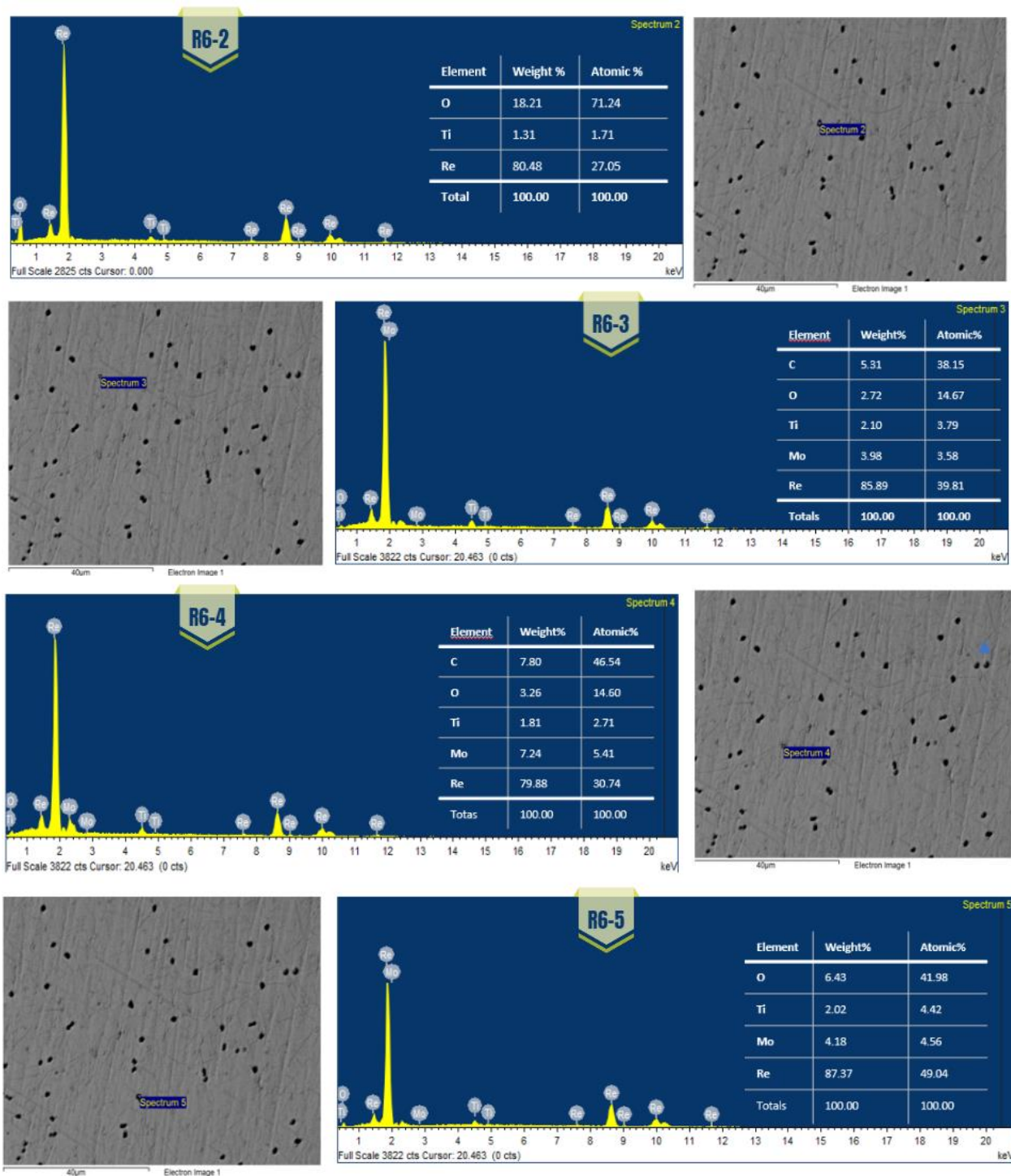
Figura 16. Componentes de la superficie del recubrimiento 6 por EDS.



La tabla en la *figura 13* se proporciona una visión específica de la composición obtenida del recubrimiento, destacando la alta concentración de Renio y las proporciones relativas de los otros elementos presentes. Cabe destacar y/o mencionar que la ausencia de Molibdeno en el análisis EDS contribuye a definir la homogeneidad del recubrimiento en términos de su composición química, confirmando la presencia y distribución de los elementos identificados en la muestra, aun así, debido a la profundidad de la deposición, el EDS no permite una evaluación completa.

...

Figura 17. Recubrimiento 6. Micrografías SEM y espectros EDS obtenidas del recubrimiento para las muestras R6-2 hasta R6-5.



En la figura 14 se pueden observar los distintos componentes presentes en la película, los cuales incluyen O, C, Ti, Re y Mo, con un porcentaje atómico de presencia mayor para el Renio, que

oscila entre el 79.88% y el 87.37%.

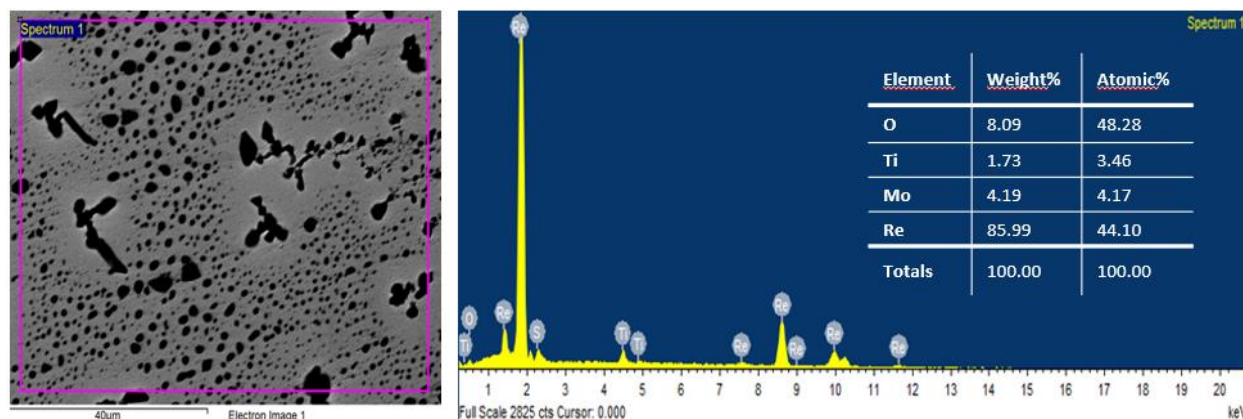
El predominio del Molibdeno sobre el Titanio en términos porcentuales se atribuye a su función como capa de anclaje en el recubrimiento. Esta capa tiene un contacto más directo con el Renio y el Carbono depositado en la capa superficial, lo que indica un cierto grado de homogeneidad en la película.

El bajo porcentaje de Titanio sugiere que, aunque la película de Renio y Carbono que recubre el sustrato presenta homogeneidad, existen segmentos que no fueron recubiertos en su totalidad.

7.1.2.2. *Recubrimiento 7 (9)*

Al analizar la muestra de la película 7, se observa una composición ordenada en función del peso ascendente de los elementos presentes. Específicamente, se identifica un 1.73% de Titanio (Ti), un 4.19% de Molibdeno (Mo), un 8.09% de Oxígeno (O) y el componente predominante con un 85.99% el Renio (Re). Estos porcentajes reflejan la distribución relativa de cada elemento en la muestra.

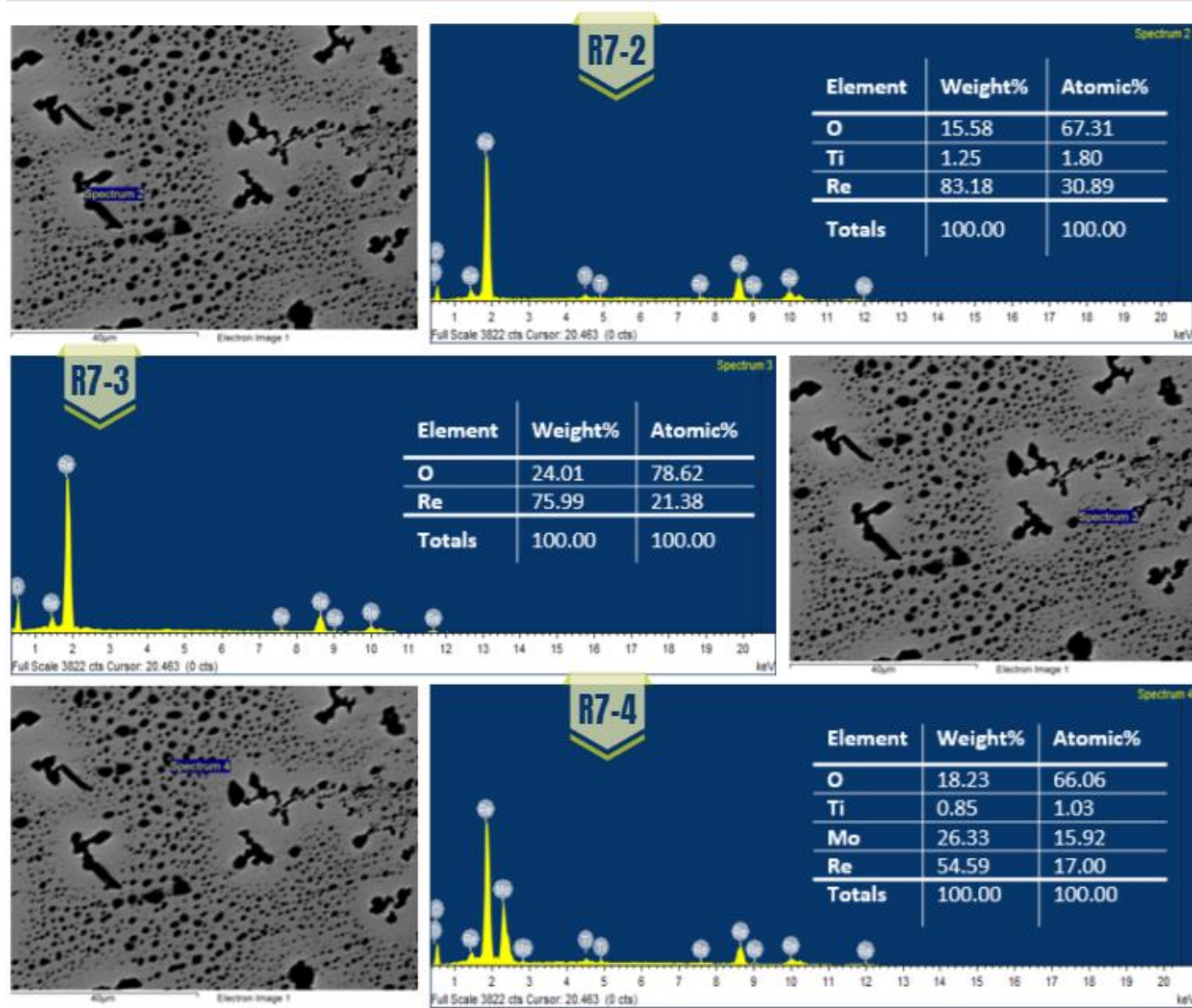
Figura 18. *Componentes de la superficie del recubrimiento 7 por EDS.*



La tabla expuesta en la anterior figura proporciona los resultados detallados obtenidos a través de la prueba de Espectroscopia de Rayos X por Energía Dispersiva (EDS), en la que se muestra la presencia y la proporción de cada elemento químico en la muestra analizada. Por otro lado, en la

figura 16, sección derecha, se presenta el espectro obtenido de la muestra, mientras que en la posición izquierda se observa la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Ambas ilustraciones contribuyen a visualizar y comprender los resultados de la caracterización química realizada mediante la técnica de EDS.

Figura 19. Recubrimiento 7. Micrografías SEM y espectros EDS obtenidas del recubrimiento para las muestras R7-A hasta R7-C.



En el caso del recubrimiento 7, se realizaron evaluaciones específicas en los espectros 2, 3 y 4, donde se observó una proporción notablemente superior de Renio en los espectros R7-2 y R7-4 en comparación con los demás elementos presentes en la muestra al puntualizar secciones de

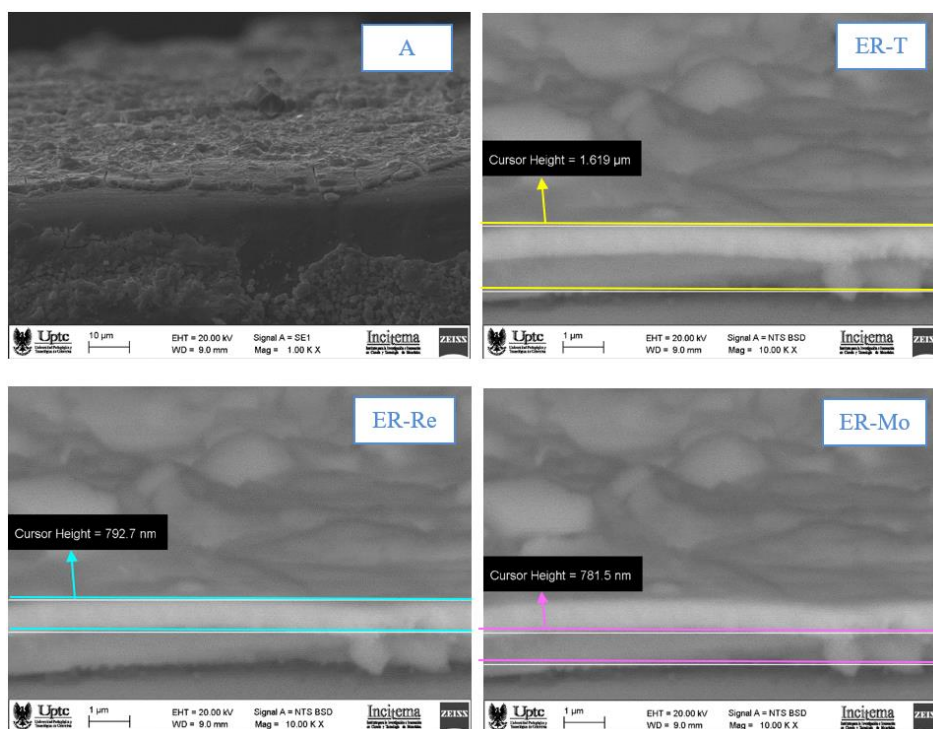
tonalidades oscuras, tal como se había observado previamente en el recubrimiento 6. Sin embargo, en el espectro R7-3, que por el contrario se evaluó en un segmento con tonalidad clara, se evidenció una composición única de Renio y Oxígeno, lo que sugiere una homogeneidad en esa área específica de la película.

En resumen, aunque la mayor parte de la superficie muestra una película de recubrimiento homogénea en los espectros evaluados, se observa una falta de homogeneidad en algunos puntos, donde elementos de las capas inferiores, como el Molibdeno y el Titanio, están presentes.

7. 1. 3. Análisis del espesor de los recubrimientos por SEM.

Para el análisis del espesor de la película de recubrimiento se hizo uso del microscopio electrónico de barrido (SEM) e imágenes de la sección transversal de los recubrimientos que como resultado derivó las imágenes de la Figura 17.

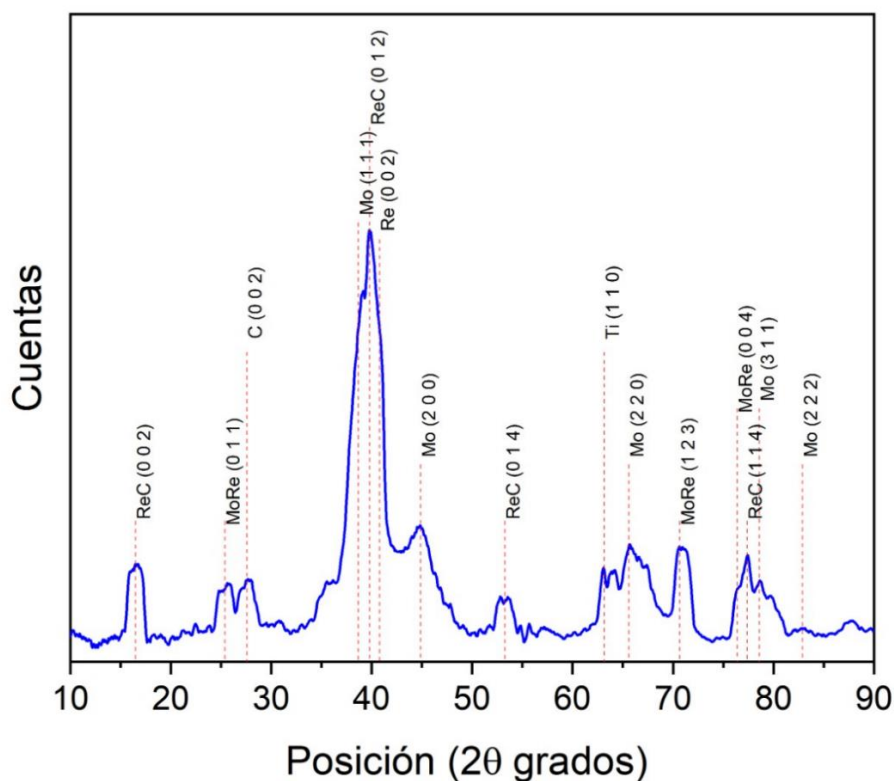
Figura 20. *Espesor de las capas de recubrimiento del sustrato por SEM. A) Micrografía del espesor del recubrimiento. ER-T) Espesor del recubrimiento total. ER-Re) Espesor de la capa de Renio del recubrimiento, ER-Mo) Espesor de la capa de anclaje de Molibdeno.*



Para determinar el espesor del recubrimiento total (ER-T), se realizó el cálculo por la suma del espesor de la deposición del Renio (Re) y carbono junto con la capa de anclaje de Molibdeno (Mo) se definió una magnificación de 10000X, lo que permitió evidenciar el espesor total del recubrimiento con un valor de 1.619 μm , ahora, en cuanto a los espesores de la capa de anclaje de Molibdeno se evidencia un grosor de 781.5 nm (véase en ER-Mo) y finalmente se evidencia un valor en el espesor de 792.7 nm para la capa de deposición del Renio y Carbono (ER-Re), esto se puede evidenciar en la *figura 17*.

7.2. Análisis de difracción de rayos X

Figura 21. Difractograma del recubrimiento representativo con las condiciones de depósito y con la superficie del recubrimiento con pulida a lija 200 y tiempo de deposito de una (1) hora



En el difractograma obtenido y expuesto en la *figura 18*, se logran evidenciar picos de difracción característicos de Molibdeno, Renio y Carbono.

- **Molibdeno (Mo):** Los picos de difracción del Molibdeno se encuentran en los ángulos de

$2\theta = 38,8^\circ, 44,9^\circ, 82,6^\circ, 78,0$. Estos picos corresponden a las reflexiones de las ondas de rayos X por los planos cristalinos del Molibdeno y están acordes al patrón con código 01-088-2331 de la ICDD (International Center for Diffraction Data).

- **Renio (Re):** Se encuentra un único pico de difracción del Renio en el ángulo de $2\theta = 40,9^\circ$. Estos picos corresponden a las reflexiones de las ondas de rayos X por los planos cristalinos del Renio . según patrón ICDD 03-065-8403.
- **Renio y Carbono (ReC):** Los picos de difracción de Carburo de Renio se encuentran en los ángulos de $2\theta = 12,1^\circ, 40^\circ, 53,9^\circ$ y $77,4^\circ$. Estos picos corresponden a las reflexiones de las ondas de rayos X por los planos cristalinos de la aleación de Renio y Carbono. Según el patrón ICSD 98-018-0376.
- **Molibdeno y Renio (Mo_{0.7}Re_{0.3}):** Los picos de difracción del compuesto basado en Molibdeno y Renio Mo_{0.7}Re_{0.3} se encuentran en los ángulos de $2\theta = 25,2^\circ, 70,9^\circ$ y $72,0^\circ$. Estos picos corresponden a las reflexiones de las ondas de rayos X por los planos cristalinos del Molibdeno y Renio según el patrón ICSD 98-010-5081.

Adicionalmente, se evidencia que la mayor cantidad de rayos X difractados y detectados se da en la posición aproximada a 40° .

- **Posición 40:** La posición 40 en el difractograma corresponde al pico de difracción del Renio y Carbono con un ángulo de $2\theta = 40^\circ$. Este pico es el más intenso porque el Renio y Carbono es el elemento más abundante en la aleación.

La baja pureza cristalina se evidencia por los anchos de los picos de difracción, en este caso son más anchos de lo esperado para una aleación de alta calidad. Esto indica que el material tiene una cantidad significativa de defectos cristalinos.

A su vez, se evidencia una alta dispersión atómica por la presencia de picos de difracción anchos

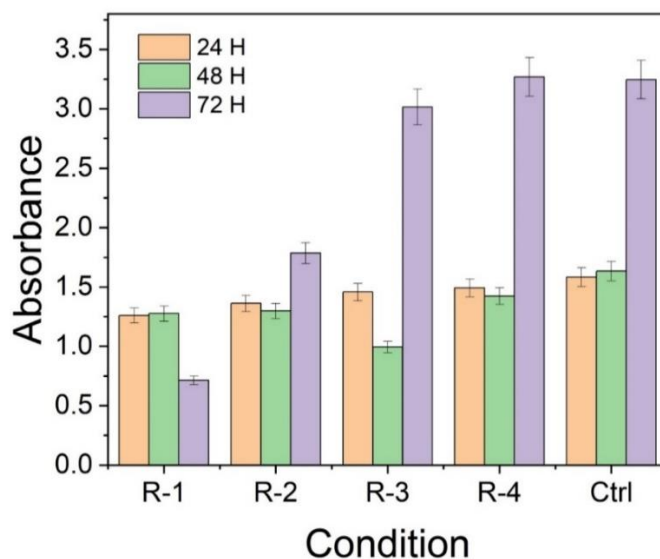
y débiles para los diferentes materiales de la muestra.

La baja calidad de la aleación tiene un impacto negativo en sus propiedades físicas y químicas. En síntesis, la baja pureza cristalina que se logra ver en la muestra indica una reducción de la resistencia y la ductilidad del material. En cuando a la alta dispersión atómica señala que hay una reducción de la densidad y la conductividad térmica del material. (UPTC, 2021)

7.2 Respuesta citotóxica de las células ante el recubrimiento.

7.2.1. Análisis de absorbancia

Figura 22. Gráfico de absorbancia de las muestras bajo las diferentes condiciones. R-1. Brillo espejo, R-2. Lija 2000, R-3. Lija 3000, R-4. Sustrato de titanio sin recubrir, Ctrl. Células control



Los resultados del análisis de absorbancia de las células sometidas a diferentes condiciones de recubrimiento mostraron que la absorbancia de las células sometidas a las condiciones de brillo espejo (BE), lija 2000 (2000) y lija 3000 (3000) disminuye en todos los intervalos de tiempo de exposición en comparación con las células no recubiertas y el grupo de control en el cultivo celular (Cce). Véase la *figura 19*.

En particular, la absorbancia de las células sometidas a las condiciones BE, 2000 y 3000 es inferior al 50% en todos los intervalos de tiempo de exposición. Este valor porcentual es significativamente

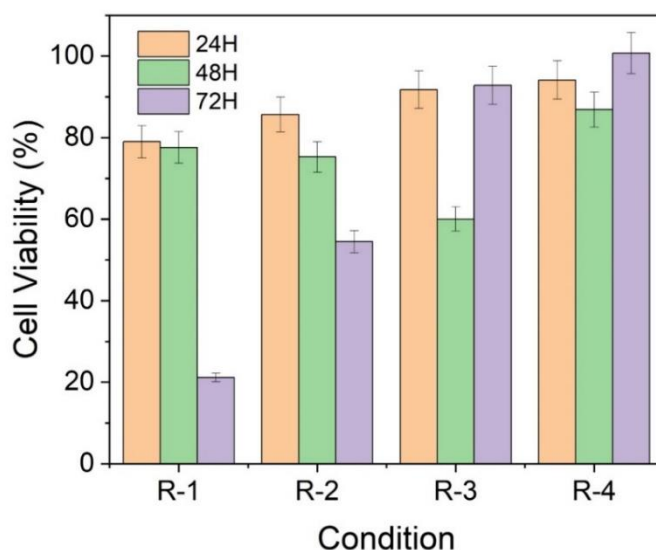
más bajo en comparación con los valores de SinR (sin recubrimiento), titanio puro y el cultivo celular de control.

Esta disminución en la absorbancia es un indicador desfavorable, ya que sugiere que las condiciones BE, 2000 y 3000 están asociadas con una viabilidad celular reducida en comparación con los controles establecidos.

Teniendo en cuenta que la normativa ISO 10993-5:2009 indica que si se reduce a menos del 70% en comparación con el blanco de control el porcentaje de viabilidad celular, esto indica un potencial citotóxico del objeto de ensayo, se puede concluir que las condiciones BE, 2000 y 3000 presentan un potencial citotóxico para las células en estudio.

7.2.2. Análisis del porcentaje de viabilidad celular

Figura 23. Gráfico de viabilidad celular de las muestras bajo las diferentes condiciones. R-1. Brillo espejo, R-2. Lija 2000, R-3. Lija 3000, R-4. Sustrato de titanio sin recubrir.



Haciendo uso de la fórmula expuesta en el anexo C de la ISO 10993-5:2009 para calcular la viabilidad celular, expresada por la fórmula:

$$Viab. \% = \frac{100 - OD_{570e}}{OD_{570b}}$$

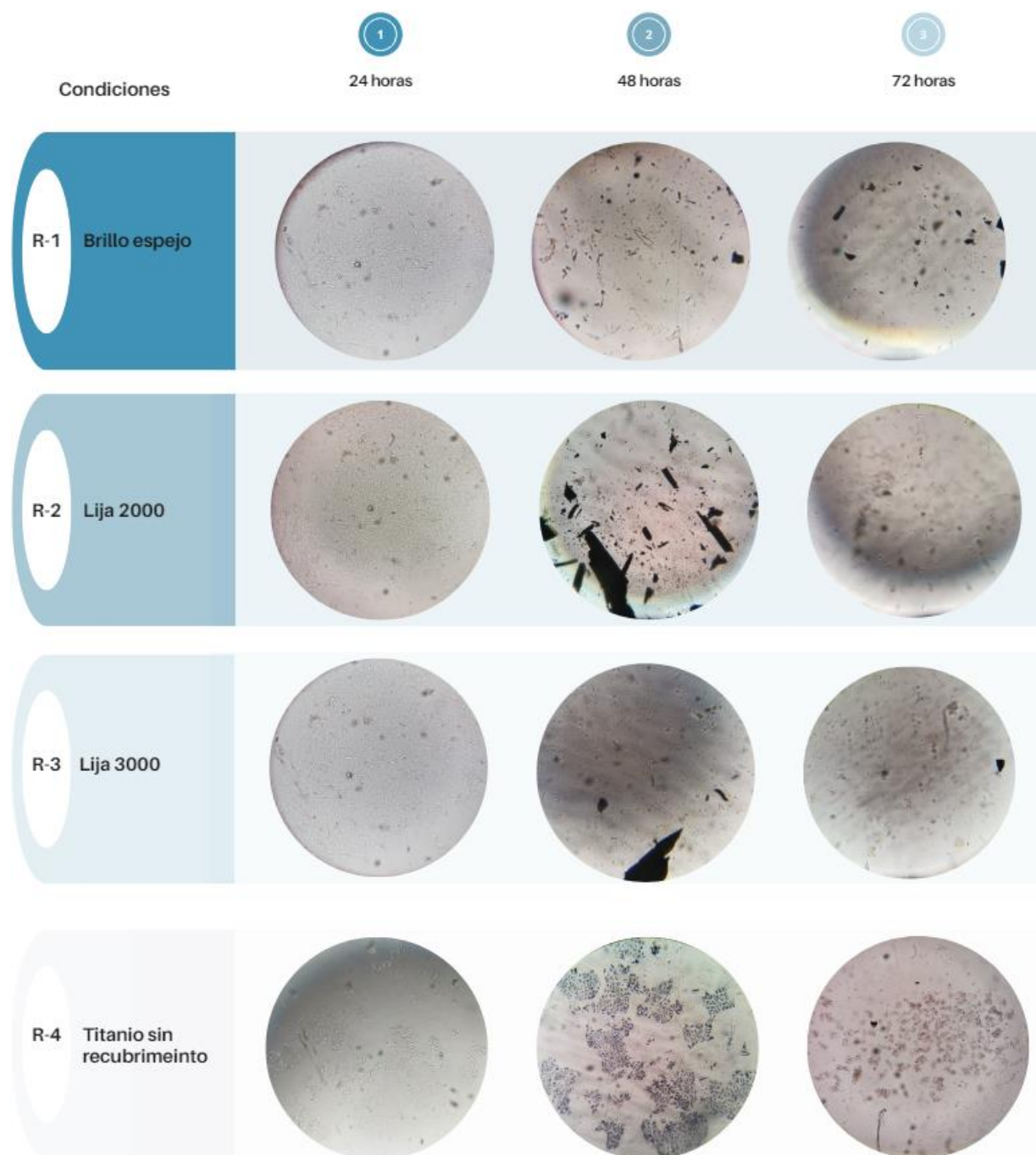
Se procederá a realizar el análisis de cada condición o recubrimiento:

- **R-1:** Variable asociada al recubrimiento con pulido brillo espejo, se observa que a las 24 horas presenta un porcentaje de viabilidad celular del 79%. Sin embargo, a las 48 horas se inicia el proceso de muerte celular con una reducción del 1%, y a las 72 horas, se evidencia un marcado proceso citotóxico, disminuyendo la viabilidad celular al 21%.
- **R-2:** Variable dada al recubrimiento con lija 2000, a las 24 horas muestra un 83% de viabilidad celular, disminuyendo a un 67% a las 48 horas y evidenciando una muerte celular más pronunciada a las 72 horas, con tan solo un 20% de viabilidad celular.
- **R-3:** La variable relacionada con el recubrimiento utilizando lija 3000 muestra un 86% de viabilidad celular después de 24 horas, disminuyendo al 60% después de 48 horas y luego recuperándose al 87% después de 72 horas. Esta fluctuación en la viabilidad celular no sigue una tendencia lineal, ya que las células experimentan estrés mitocondrial debido al proceso de adaptación metabólica. Durante el período de recuperación, se observan caídas en la viabilidad celular, pero a medida que las células se mantienen y se adaptan, se produce un aumento en la misma.
- **R-4:** Relacionado al sustrato de titanio sin recubrimiento, muestra un 88% de viabilidad celular a las 24 horas, disminuye a un 83% a las 48 horas y alcanza un 100% de viabilidad celular a las 72 horas, esta fluctuación al igual que en el análisis del recubrimiento 3, se presenta por el estrés al que se someten las células al entrar en contacto con un componente que afecta el ambiente en el que se encuentran.

Conforme a la norma ISO 10993-5:2009, si el porcentaje de viabilidad celular es inferior al 70%, se considera que las células presentan un proceso citotóxico en su interacción con el material. Esto sugiere que la aleación de Carbono y Renio muestra un comportamiento citotóxico al interactuar con las células PK-15, y que el titanio sin recubrimiento es el único en el que las células no

manifiestan reacciones adversas durante más de 72 horas, mostrando un porcentaje de viabilidad celular del 100%.

Figura 24. Micrografías que representan la respuesta de las células PK-15 observadas a las 24, 48 y 72 horas.



Los resultados del análisis de absorbancia de las células concuerdan con el análisis cualitativo realizado mediante microscopio. En dicho análisis particular, se observa que las células con mayor actividad metabólica presentan una mayor coloración por MTT en el sustrato R-4, que corresponde al titanio sin recubrimiento. Este hallazgo es claramente visible en la pigmentación celular en la fila 4, columna 3, de la *figura 21*, diferente a la pigmentación de las muestras celulares en donde se tiene contacto con el recubrimiento de Renio y Carbono. Estos hallazgos respaldan la evaluación integral de la biocompatibilidad de los recubrimientos bajo diferentes condiciones.

Conclusiones

- Se logro obtener recubrimientos de carburo de renio depositados sobre sustratos de titanio bajo las condiciones experimentales utilizadas, esto se confirmó mediante la técnica de difracción de rayos X.
- Las condiciones experimentales empleadas no proporcionaron una adherencia óptima para los recubrimientos según los análisis visuales en donde se evidenció fractura y desprendimiento de los recubrimientos.
- La adherencia del recubrimiento mejora significativamente en condiciones de alta temperatura. Visualmente, se observa una diferencia considerable con respecto a la aplicación de temperatura ambiente 19 a 22°C comparado con 350°C.
- El análisis de difracción de rayos X del recubrimiento, compuesto por Renio-Carbono con una capa de anclaje de Molibdeno sobre sustrato de Titanio, reveló una combinación de fases cristalinas y amorfas, con una pureza cristalina reducida y una alta dispersión atómica. Además, permitió la identificación de múltiples fases cristalográficas, en concordancia con las expectativas: Carburo de Renio (ReC), carbono, molibdeno, y una fase de MoRe, que se pudo dar debido a la difusión de iones en la interfaz entre la capa de anclaje y la de ReC
- El análisis de espesor de los recubrimientos proporcionó información valiosa sobre la estructura y la uniformidad de las capas. Los valores de espesor obtenidos para las capas de anclaje de Molibdeno (Mo) y la deposición de Renio y Carbono (Re-C) contribuyeron a una comprensión más completa de la arquitectura de los recubrimientos.
- El análisis morfológico y químico llevado a cabo mediante microscopía electrónica de barrido y espectroscopia de rayos X reveló una homogeneidad notable en los

recubrimientos, salvo por la presencia visual de defectos evidentes, como puntos negros en ciertos segmentos de la superficie. Estos hallazgos sugieren una mejora en la uniformidad de los recubrimientos y, por ende, en su adherencia, especialmente en aquellas áreas donde no se detectaron estas discontinuidades superficiales.

- La caracterización química reveló que los recubrimientos presentan una composición predominante de Renio (Re) en diferentes proporciones, junto con otros elementos como carbono (C), oxígeno (O) y titanio (Ti). Esta variabilidad en la composición contribuye a la formación de una película que interactúa de manera única con la superficie del sustrato.
- La evaluación de la viabilidad celular reveló que la presencia de los recubrimientos a base de Renio y carbono está asociada con una disminución en la viabilidad celular en comparación con el sustrato de titanio sin recubrimiento. Esto sugiere la posibilidad de efectos citotóxicos resultantes de la interacción entre las células y los recubrimientos, lo que es importante considerar en aplicaciones biomédicas.
- La evaluación global de los resultados demuestra la importancia de las condiciones experimentales, como la temperatura y la composición, en la calidad y el rendimiento de los recubrimientos de Renio y carbono. Estos hallazgos tienen implicaciones significativas en la aplicación de estos recubrimientos en contextos biomédicos y de ingeniería, ya que la adherencia y la biocompatibilidad son factores críticos a considerar en el diseño de biomateriales y superficies funcionales.

ANEXO A

Ensayo MTT

Investigador principal: Melany Lemus Rincón

Preparación reactivos

1. Preparación PBS 1x

$$V_1 = \frac{(1x)(500ml)}{10x} = 50ml \text{ PBS } 10x * 450ml \text{ H}_2\text{O}$$

2. Preparación NaHCO₃ 7.5%

$$1000 \text{ ml} \rightarrow 75g \text{ NaHCO}_3$$

$$500 \text{ ml} \rightarrow 34,5g \text{ NaHCO}_3$$

3. Preparación HCL 1N

$$\left(\frac{1eq}{1L}\right) (1L) \left(\frac{36,46g}{1n}\right) \left(\frac{1mL}{1,41g}\right) \left(\frac{100mL}{37mL}\right) = 70mL \text{ [HCL]}/1L$$

4. Preparación NaOH 1N

$$\left(\frac{1n}{1L}\right) (1L) \left(\frac{39,99g}{1n}\right) \left(\frac{100g}{98g}\right) = 40,8 \text{ [NaOH]}/1L$$

5. Antibiótico - Antimicótico 100x

☒ Descongelar (Dejar a temperatura ambiente).

☒ Alicuotar 1mL en 100 tubos eppendorf.

6. Tripsina 10x

☒ Descongelar (Dejar a temperatura ambiente).

☒ Alicuotar 500uL en 200 tubos eppendorf.

Preparación del medio

1. Suero fetal Bovino

- ✦ Inactivar complemento (56°C), manteniendo esa temperatura por 30 minutos.
- ✦ Alicuotar en tubos Falcon de 50ml.
- ✦ Almacenar alícuotas a -20°C

Preparación medio esencial mínimo (MEM)

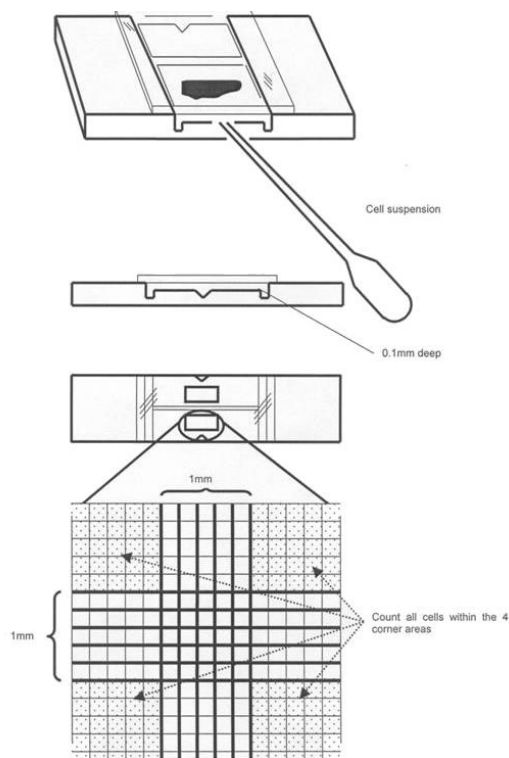
1. Disolver el medio en polvo en 950ml de H_2O destilada. (Agitar en agitador magnético). Enjuagar el sobre con agua.
2. Después de agitar durante unos minutos, medir pH con pHmetro (pH inicial: 5,72)
3. Con pipeta Pasteur agregar 9 gotas de HCL para acidificar el medio. (pH 4,36 Aprox)
4. Esterilizar el medio en autoclave (121 °C x 15 min) y dejar enfriar.
5. Agregar 10 ml de $NaHCO_3$
6. Medir pH y equilibrar con NaOH y/o HCL de ser necesario (PH 7,1 aprox).
Marcar y almacenar a 4°C.

Enriquecer Medio

1. En un frasco de Shott de 100ml:
 - ✦ 10mL de suero fetal bovino.
 - ✦ 1mL de antibiótico – Antimicótico.
 - ✦ 89mL de Medio (MEM).
 - ✦ Marcar y almacenar a 37°C

Recuento celular

Ilustración 1 Esquema del hemocitrometro. Tomado de: (Focosi, 2020)



Esquema del hemocitómetro y procedimiento a seguir:

- ✦ Cada porta tiene dos cámaras de recuento.
- ✦ La muestra (suspensión de células) se aplica en el borde del cubre y entrará por capilaridad al espacio entre el porta y el cubre, llenando una de las cámaras.
- ✦ La altura de dicho espacio en una cámara de Neubauer es habitualmente de 0,1 mm
- ✦ Hay retículas trazadas en cada cámara de recuento que la dividen en 9 zonas cuadradas, de 1 mm de lado cada una.

Las 4 zonas de las esquinas tienen una retícula interior más espaciada, la central una retícula más densa.

- ✦ Si se cuentan las células en los 4 cuadros de las esquinas, el volumen correspondiente es de $4 \times (1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm}) = 4 \times 0,1 \text{ mm}^3$.

$$\boxtimes 0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \times 10^{-9} \text{ m}^3 = 0,1 \times 10^{-9} \times 10^3 \text{ l} = 10^{-7} \text{ l} = 10^{-4} \text{ mL} .$$

\boxtimes Entonces se puede calcular la concentración de células como

$$N \text{ células} / (4 \times 10^{-4} \text{ mL}) = N / 4 \times 10^4 \text{ células/mL}$$

siendo $N = n^\circ$ total de células contadas en las 4 zonas

Por lo tanto:

$$(\# \text{cel contadas})(FD(3))(10.000)(1\text{mL}) = \text{cel/mL}$$

$$(99\text{cel})(3)(10000)(1\text{mL}) = 2.970.00 \text{ cel/mL}$$

1. 2. 2. % Viabilidad

$$99\text{cel} \rightarrow 75g \text{ 100\%}$$

$$96\text{cel} \rightarrow X = 96,96\%$$

Procedimiento ensayo MTT

1. Retirar todo el medio.
2. Poner 1mL de medio nuevo.
3. Adicionar 250uL de MTT.
4. Incubar 2Horas a 37°C.
5. Retirar 1mL de medio.
6. Agregar 500uL de DMSO.
7. Incubar 10 minutos a 37°C.
8. Leer a 570 nm.

- 3 El diagrama de flujo se puede evidenciar en la sección 6.2.1, apartado metodología.

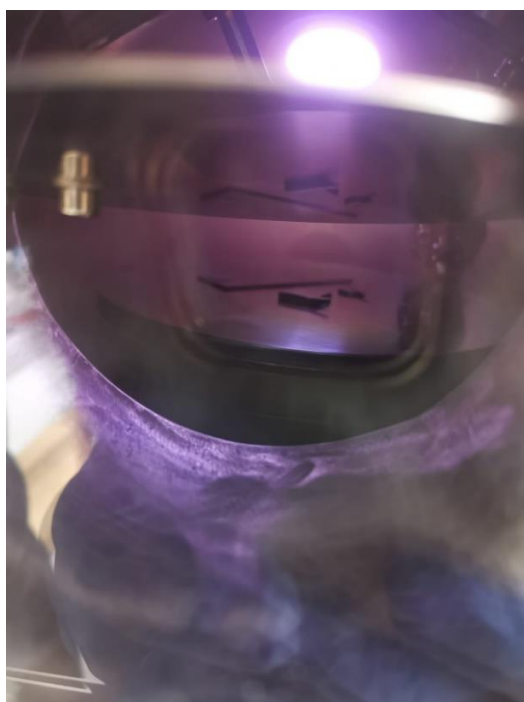
ANEXO B.

Registro fotográfico de los procedimientos.

Investigador principal: Melany Lemus Rincón

Producción recubrimientos INCITEMA UPTC

Registro fotográfico 1. Recubrimiento realizado mediante la técnica de sputtering.



Caracterización de los recubrimientos

Registro fotográfico 2. Microscopia electrónica de barrido y espectroscopia de energía dispersa en UPTC



Ensayo MTT ejecutado en el Laboratorio de Investigación en Ciencias Biológicas en la universidad ECCI (LICiB)

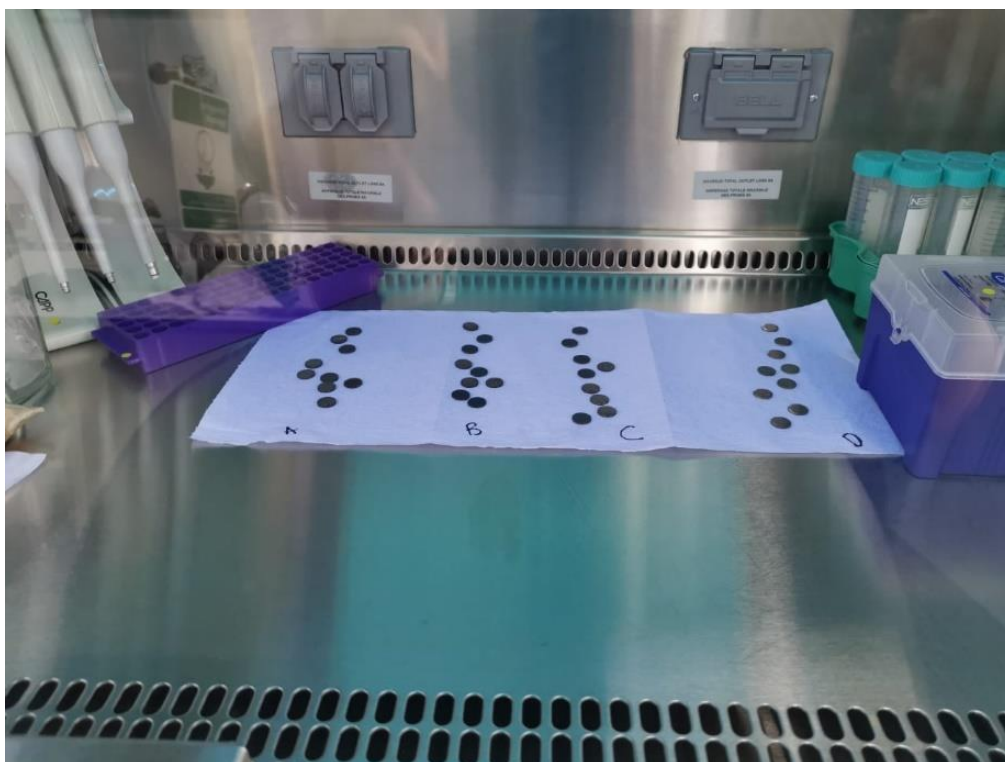
Registro fotográfico 3. Algunos elementos empleados en el proceso de la prueba y proceso de deposición del MTT a las 24 horas.



Registro fotográfico 4. Recuento celular



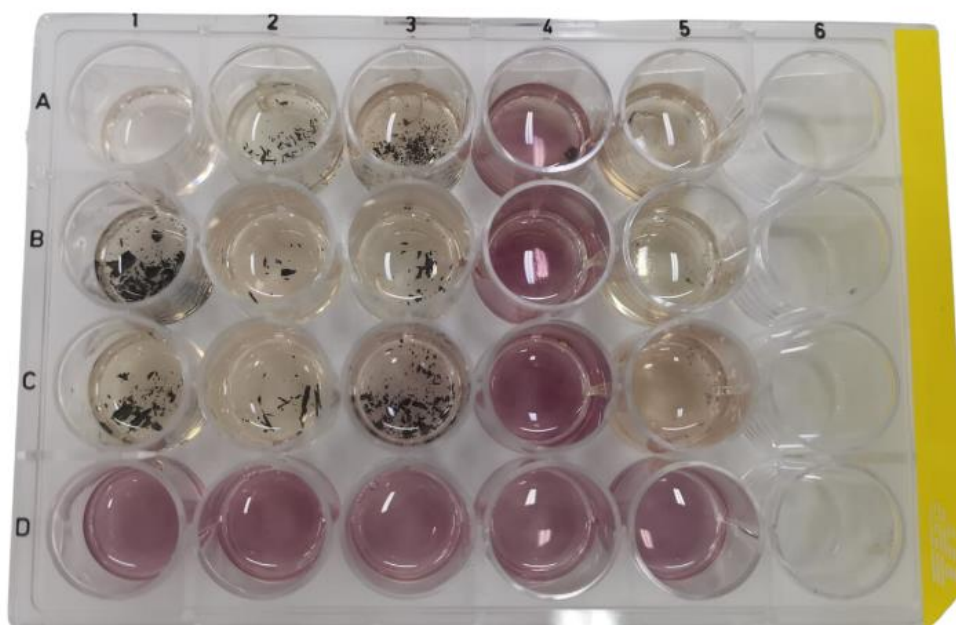
Registro fotográfico 5. Esterilización de recubrimientos



Registro fotográfico 6. Deposición de los recubrimientos en los pozos con células PK-15.



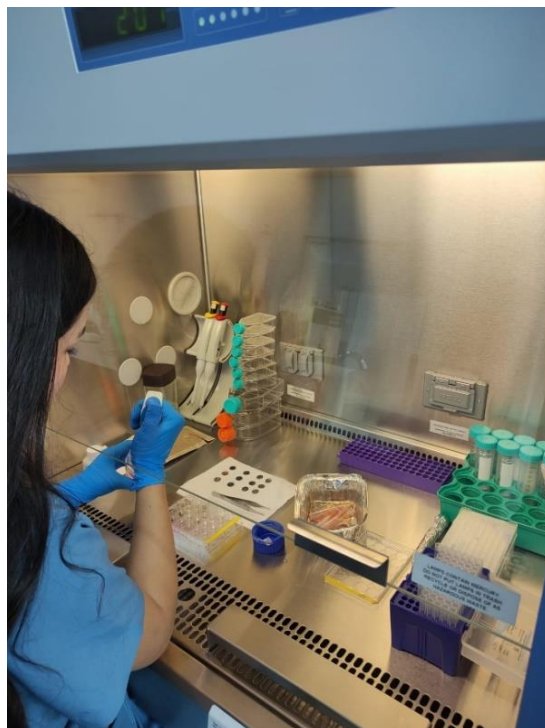
Registro fotográfico 7. Registro fotográfico de las placas de 24 pozos empleadas.



Registro fotográfico 8. Incubación del medio, MTT y placas.



Registro fotográfico 9. Retiro de las películas de las placas para ejecutar el análisis de absorbancia



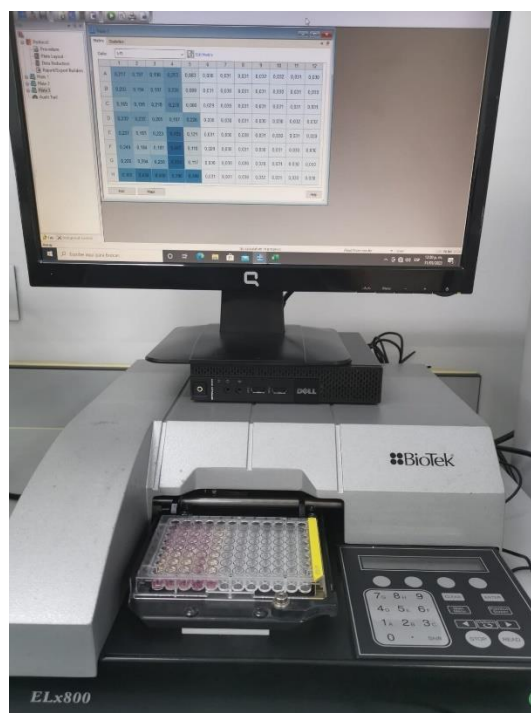
Registro fotográfico 10. Deposición del MTT en los pozos para realizar el análisis de la muestra a las 72 horas.



Análisis de absorbancia

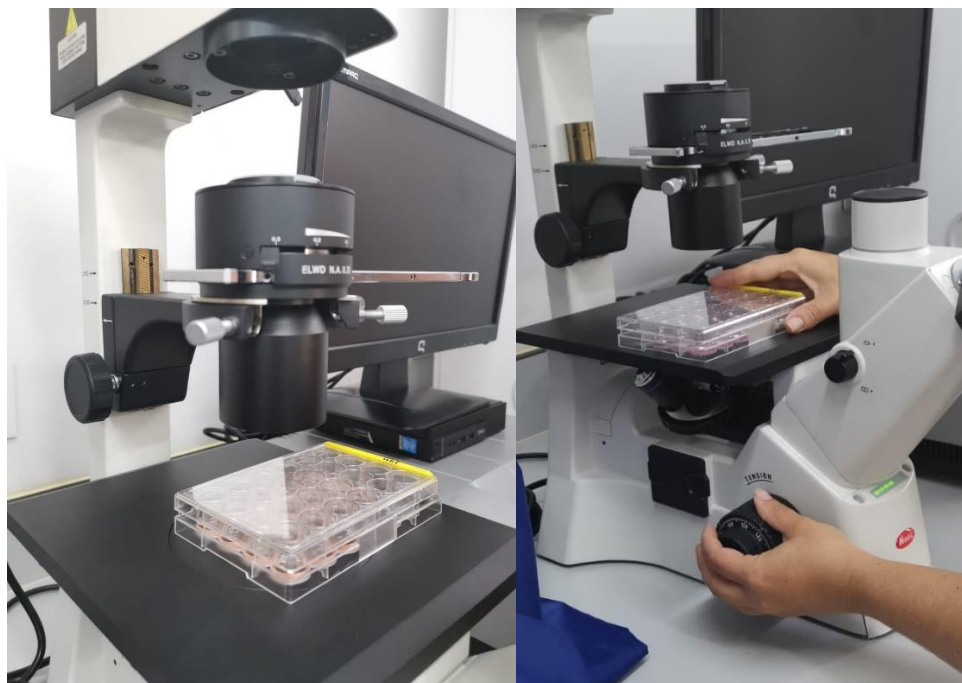
Lector de Microplacas Biotek ELX800.

Registro fotográfico 11. Proceso de muestreo, deposición de la placa.



Análisis cualitativo de las células PK-15 en microscopio

Registro fotográfico 12. Proceso de enfoque para visualización del estado celular.



Referencias

- Afshar, G. C. (s.f.). *Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC CCL-33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1255571/>
- Alberto Sicilia, S. C. (Agosto de 2008). *Titanium allergy in dental implant patients: a clinical study on 1500 consecutive patients*. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18705814/>
- Alberto Sicilia, S. C. (2008). *Titanium allergy in dental implant patients: a clinical study on 1500 consecutive patients*. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18705814/>
- Betancourt Coronado, Y. E. (2023). *Caracterización tribológica de recubrimientos de alta entropía de VCrNbMoTaW, producidos por el proceso co-Sputtering en acero AISI 4140*. Obtenido de UNAL: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/84075>
- Burgos, U. d. (2020). *Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)*. Obtenido de <https://www.ubu.es/parque-cientifico-tecnologico/servicios-cientifico-tecnicos/microscopia/microscopia-electronica-de-barrido-meb>
- Christian Redlich, A. S. (2021). *In Vitro Degradation Behavior and Biocompatibility of Bioresorbable Molybdenum*. Obtenido de <https://www.mdpi.com/2075-4701/11/5/761>
- Clavijo, J. (2013). *Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM) ()*. (N. 3. Vol. 3, Ed.) Obtenido de Dialnet: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5085347>
- D. Palanca Martin. T. Castiella Muruzabal. (s.f.). *Metalosis por titanio en pseudoartrosis de húmero*. (Revista Esp. Cir Osteoartrosis) Recuperado el 22 de Junio de 2022
- Dra. C.E. Leticia María Lemus Cruz, D. A. (2009). *Origen y evolución de los implantes dentales*. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1729-519X2009000400030&script=sci_arttext
- Fisher, T. (2002). *Media Preparation from Powder and Concentrates*. Obtenido de <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fmp13154.pdf>
- Fisher, T. (2002). *Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit (V-13154)*. Obtenido de <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fmp13154.pdf>
- Fisher, T. (2023). *Antibiotic-Antimycotic (100X)*. Obtenido de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15240096?SID=srch-srp-15240096>
- Fisher, T. (2023). *Media Preparation from Powder and Concentrates*. Obtenido de <https://www.thermofisher.com/co/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/media-preparation-from-powder-and-concentrates.html>
- Fisher, T. (2023). *MEM, powder*. Obtenido de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/61100061>
- Focosi, D. (2020). <https://biomodel.uah.es/tecnicas/cel/hemocitometro.htm>
- G. Soto, H. T.-S. (2011). *Evaluation of rhenium carbide as a prospective material for hard coating*. (ELSEVIER, Thin Solid Films) Recuperado el 2022 de junio de 13
- Gutiérrez, L. G. (2017). *Síntesis de películas delgadas por la técnica de magnetron sputtering a partir de blancos de renio y boro*. Obtenido de https://repository.eafit.edu.co/bitstream/handle/10784/11822/AngaritaGutierrez_LuisGuillermo_2017.pdf?sequence=2

- Hironobu Matsuno, A. Y. (2001). *Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium*. (ELSIEVER)
Recuperado el 2022 de junio de 12
- Int. Evelyn May G, D. A. (2002). *METALOSIS POR TITANIO. DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DE MASA DE COMPARTIMIENTO ILIOPSOAS. CASO CLINICO*. (SCIELO) Obtenido de
https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-93082002000400008
- ISO 10993-5. (2009). Obtenido de Biological evaluation of medical devices. Part 5: Test for in vitro cytotoxicity:
https://drive.google.com/file/d/1bGDqFHL_w_uyxBuveyIOv4T3rDzHP7m6/view
- J Thomas Lambrecht, A. F. (Noviembre de 2003). *Long-term evaluation of submerged and nonsubmerged ITI solid-screw titanium implants: a 10-year life table analysis of 468 implants*. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14696658/>
- JUAN CAMILO CASALLAS HERNÁNDEZ, A. M. (2010). *DISEÑO Y DESARROLLO DE UN SOFTWARE PARA LA ADQUISICIÓN Y PROCESAMIENTO DE VALORES DE ABSORBANCIA GENERADOS POR EL LECTOR DE PLACAS BIOTEK ELx800*. Obtenido de UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA:
<https://repositoriousco.co/bitstream/123456789/871/1/TH IE 0088.pdf>
<https://repositoriousco.co/bitstream/123456789/871/1/TH IE 0088.pdf>
- Kyeong Tae Kyeong Tae Kim, M. Y. (Marzo de 2019). *General review of titanium toxicity*. (National Library of Medicine) Recuperado el 22 de Junio de 2022, de
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6409289/>
- Łukasz Tomaszewski, W. G. (2015). *TiAlN based wear resistant coatings modified by molybdenum addition*. Obtenido de
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0042207X15300531>
- Marco Antonio González Cantellano, L. M. (2015). *La espectroscopia y su tecnología: Un repaso histórico y su importancia para el siglo XXI*. Obtenido de
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5514757>
- María Dolores Ortuño García, U. P. (2022). *Materiales para aplicaciones*. Obtenido de
<https://repositorio.upct.es/bitstream/handle/10317/11962/tfg-ort-mat.pdf?sequence=1>
- Martha Eloísa Aparicio Ceja, G. G. (2010). *Utilidad de la difracción de rayos x en las nanociencias*. Obtenido de
https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2448-56912010000200062
- Mosmann, T. (1983). *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. Obtenido de
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6606682/>
- P. Meerts, G. M. (2004). *Replication kinetics of different porcine circovirus 2 strains in PK-15 cells, fetal cardiomyocytes and macrophages*. Obtenido de
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00705-004-0444-2>
- P. Thomas, B. S. (Agosto de 2008). *Implant allergy*. Obtenido de
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6039992/>
- Rubén Comino-Garayoa, I. J.-B.-S.-G. (2020). *Allergies to Titanium Dental Implants: What Do We Really Know about Them? A Scoping Review*. Obtenido de
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7698636/#B11-biology-09-00404>
- Rubén Comino-Garayoa, J. C.-B.-S.-G. (Noviembre de 2020). *Allergies to Titanium Dental Implants: What Do We Really Know about Them? A Scoping Review*. Obtenido de
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33217944/>
- Scientific, F. (2023). *Carbon*. Obtenido de <https://www.fishersci.es/es/es/periodic-table.html#re75>

- Scientific, F. (2023). *Moibdenum*. Obtenido de <https://www.fishersci.es/es/es/periodic-table.html#re75>
- Scientific, F. (2023). *Rhenium*. Obtenido de <https://www.fishersci.es/es/es/periodic-table.html#re75>
- Scientific, F. (2023). *Titanium*. Obtenido de <https://www.fishersci.es/es/es/periodic-table.html#re75>
- Shahar Shelly 1, S. L.-G. (Agosto de 2008). *Potential neurotoxicity of titanium implants: Prospective, in-vivo and in-vitro study*. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34352627/>
- UC. (2010). *Unidad 3 | química orgánica*. Obtenido de https://www7.uc.cl/sw_educ/educacion/grecia/plano/html/pdfs/cra/quimica/NM2/RQ2O102.pdf
- UPTC. (2021). *Difracción de Rayos X*. Obtenido de https://www.upct.es/~minaees/difraccion_rayosx.pdf
- Uwe König, R. S. (2012). *Rapid X-ray diffraction (XRD) for grade control of bauxites*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/269109318_Rapid_X-ray_diffraction_XRD_for_grade_control_of_bauxites