

Trabajo Fin de Grado

Grado en Química

Recubrimientos antibacterianos para implantes de Ti-6Al-4V

Autora:

IRATXE POBLACIÓN CONCEJO

Directoras:

LEYRE PÉREZ ÁLVAREZ

LEIRE RUIZ RUBIO

© 2019, Iratxe Población Concejo

Leioa, 21 de Febrero de 2019

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN QUÍMICA

RECUBRIMIENTOS ANTIBACTERIANOS PARA IMPLANTES DE TI-6AL-4V

MEMORIA PRESENTADA POR IRATXE POBLACIÓN CONCEJO

FECHA DE MATRICULACIÓN Y DEFENSA: FEBRERO Y MARZO 2019

DIRECTORA: LEYRE PÉREZ ÁLVAREZ

DIRECTORA: LEIRE RUIZ RUBIO

DEPARTAMENTO: QUÍMICA-FÍSICA

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1. ESTRATEGIAS ANTIBACTERIANAS	3
1.2. ADHESIÓN MEDIANTE GRUPO CATECOL.....	8
1.3. OBJETIVOS.....	10
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
2.1. MATERIALES.....	10
2.2. SÍNTESIS EXPERIMENTALES	11
2.2.1. Síntesis de ácido hialurónico – catecol	11
2.2.2. Síntesis de quitosano – catecol	12
2.2.3. Síntesis de poli(<i>N</i> -vinilpirrolidona)- catecol	12
2.3. RECUBRIMIENTOS.....	13
3. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	14
3.1. MEDICIÓN DE ÁNGULOS DE CONTACTO	14
3.2. XPS	15
3.3. RMN	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	16
4.1. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE H ¹ (RMN-H ¹).....	16
4.2. ESPECTROSCOPÍA FOTOELECTRÓNICA DE RAYOS X (XPS).....	22
4.3. MEDICIÓN DE ÁNGULOS DE CONTACTO	24
5. CONCLUSIONES.	25
6. AGRADECIMIENTOS.	26
7. BIBLIOGRAFÍA.....	27

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los biomateriales pueden ser definidos de forma genérica como materiales diseñados para dirigir mediante el control de las interacciones con componentes de sistemas vivos, el curso de cualquier procedimiento terapéutico o de diagnóstico en seres vivos.¹ Estos materiales, han sufrido una gran evolución a lo largo de la historia, la evidencia más antigua hallada se remonta al año 2000 a.C y corresponde a madera tallada para realizar tratamientos externos de fracturas, amputaciones e injertos.² Posteriormente, en 1829 Levert realizó los primeros estudios empleando metales como el oro, la plata y el aluminio, pero debido a la nocividad de los productos liberados en el organismo, fueron reemplazados por el acero inoxidable a finales del siglo XIX.³ Tras finalizar la segunda guerra mundial y con el imparable auge de nuevos biomateriales, así como con el aumento de su grado de sofisticación, aparecieron materiales como el titanio y sus aleaciones.⁴

Sin embargo, aunque existen muchas aleaciones metálicas, muy pocas son candidatas adecuadas para la estructura de un implante. Esto se debe a la corrosión que ejercen los fluidos corporales sobre los metales, así como a la liberación de iones metálicos.⁵ Sin embargo, este no es el caso del titanio y sus aleaciones, ya que presentan una resistencia a la corrosión satisfactoria,⁶ lo que se puede comprobar especialmente con las aleaciones de Ti-6Al-4V, las que han demostrado una resistencia a la corrosión es muy superior a las que presentan alternativas como las aleaciones de acero inoxidable y aún mucho mejor que las aleaciones basadas en cobalto-cromo.⁷ Estas aleaciones de titanio han sido en las últimas décadas cada vez más usadas en implantes permanentes en el campo de las prótesis y de los implantes dentales (Figura 1).⁸



Figura 1.- Aplicaciones del Ti-6Al-4V como a) prótesis craneal b) prótesis para dedos
c) prótesis de rodilla d) implantes dentales

El gran interés en el titanio y sus aleaciones se debe a que además de su alta resistencia a la corrosión, presentan las características idóneas para aplicaciones biomédicas, tales como gran compatibilidad, elevada fuerza específica, capacidad de ser inerte en el medio fisiológico, y módulo de elasticidad similar al del hueso. Igualmente, presentan la habilidad de integrarse al hueso y, además, muy poca probabilidad de rechazo debido a sus propiedades antialérgicas, es decir, que se adhieren al hueso sin efectos secundarios ya que no interfiere ni se degrada en medio fisiológico.⁹ Es por todo esto que el titanio y sus aleaciones han adquirido la cualidad de ser un material biocompatible de uso extendido.¹⁰

Sin embargo, y a pesar de lo descrito en líneas anteriores, los implantes quirúrgicos todavía suponen un gran problema al ser susceptibles de generar infecciones bacterianas.¹¹ La contaminación bacteriana en la superficie de los implantes es una de las principales preocupaciones en las operaciones quirúrgicas, ya que puede llegar a producir una infección e incluso la pérdida del implante, comprometiendo así la salud del paciente. De hecho, el proceso de adhesión bacteriana y, la consiguiente formación del *biofilm*, es la principal limitación asociada a los implantes de titanio y sus aleaciones.¹²

Por definición, el *biofilm* es una comunidad de diferentes microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos secretados por las bacterias, y

que se une irreversiblemente a la superficie sobre la que crece.¹³ Estas biopelículas se componen principalmente de bacterias Gram negativas y Gram positivas. Generalmente, el proceso de unión de una bacteria a cualquier superficie, descrito por Ábalos,¹⁴ se divide en dos fases: en la primera etapa se establece una adherencia temporal mediante fuerzas de Van der Waals y en la segunda etapa, en cambio, se trata de una adhesión irreversible en la que entran en juego enlaces primarios, bien iónicos o covalentes.¹⁵

Es por ello, que resulta necesario desarrollar nuevas estrategias en la lucha contra la formación del *biofilm*. Una táctica generalizada para lograr este fin, es el desarrollo de recubrimientos antibacterianos sobre el propio implante con el fin de evitar la formación del *biofilm* y, por consiguiente, el posible rechazo del implante, manteniendo las propiedades ventajosas del biomaterial conocido.¹²

Afortunadamente, sólo las primeras 24 horas después de la implantación son críticas para la creación de la biopelícula, ya que después de ese tiempo los tejidos celulares se integran en la prótesis. Por lo tanto, la adhesión bacteriana debe ser evitada especialmente durante esas primeras 24 horas antes de que la adhesión bacteriana suceda.¹⁶

1.1. ESTRATEGIAS ANTIBACTERIANAS EN RECUBRIMIENTOS

Los recubrimientos antibacterianos han surgido como un componente primario de mitigación de patógenos bacterianos. Gracias a los recientes avances en la ciencia de materiales y biotecnología y de una comprensión cada vez mayor de la microbiología ambiental, existen diversas posibilidades.¹⁷ Pero lo más sencillo y por lo que se apuesta, es hacer recubrimientos duraderos con propiedades antibacterianas sobre biomateriales conocidos. Estas propiedades antibacterianas se pueden lograr mediante la transformación de la superficie de los materiales.¹⁸

Teniendo todo esto en cuenta, la formación del *biofilm* puede evitarse mediante distintas estrategias (Figura 2), que puede ser tanto para prevenir como para causar la muerte de las bacterias adheridas. Se puede decir de forma general que todas estas estrategias están basadas en la: exclusión por repulsión estérica, repulsión

electrostática, baja energía superficial, liberación de un biocida y contacto con biocida activo.¹⁹

Debido al aumento de las bacterias resistentes a los antibióticos y teniendo en cuenta el complejo mecanismo de la adhesión y proliferación antibacteriana, parece resultar necesario la combinación de dichas estrategias para conseguir una mayor eficiencia antibacteriana.²⁰

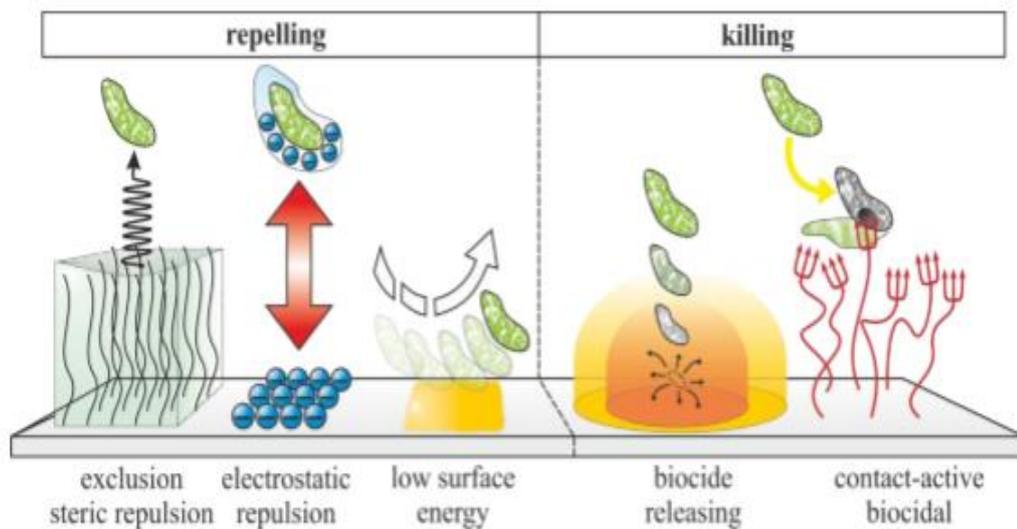


Figura 2.- Distintas estrategias de acción y desarrollo de superficies antimicrobianas (CC BY 3.0).²¹

Las estrategias utilizadas para disminuir la adhesión bacteriana en superficies se basan por una parte en generar repulsiones electrostáticas que imposibilitan el acoplamiento entre el recubrimiento y las bacterias, ya que las células microbianas generalmente poseen una carga negativa neta, es por eso, que se unen polímeros aniónicos como agentes repelentes.²² Por otra parte, la adhesión también puede ser debilitada mediante la creación de superficies altamente hidrofílicas, ya que como demostraron Zhu *et al.*,²³ las bacterias encuentran mayor dificultad de adherencia en dichas superficies.

De acuerdo con esto, Joo *et al.*²⁴ sugirieron que uno de los polímeros que mejor se ajusta a todas las condiciones es el ácido hialurónico (HA, Figura 3). Este polisacárido

constituye una importante matriz bioactiva que se ha utilizado para la regeneración de cartílago, ingeniería de células madre y en aplicaciones vasculares, al haber demostrado inhibir la adhesión de plaquetas debido a su actividad antitrombótica.

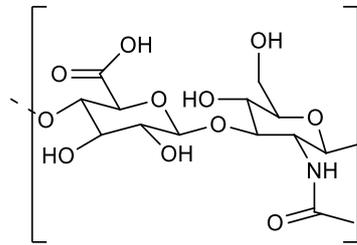


Figura 3.- Representación esquemática de la estructura química del ácido hialurónico.

Este glucosaminoglucano lineal consta de unidades repetitivas de disacáridos poliméricos de ácido β-(1,4)-glucurónico y β-(1,3)-*N*-acetil-d-glucosamina. De hecho, es uno de los compuestos más hidrofílicos en la naturaleza, así como biocompatible y biodegradable, lo que lo convierte en un biomaterial muy adecuado.²⁵

La razón por la que el ácido hialurónico es uno de los polisacáridos más estudiados como repelente de biopelículas se debe a que presenta una elevada capacidad de hidratación que conduce a recubrimientos con alta hidrofilia¹⁷. Esta capacidad de hidratación se produce cuando el ácido hialurónico entra en contacto con el agua, formándose un enlace de hidrógeno entre las moléculas de agua y los grupos carboxilo y *N*-acetilo adyacentes. Como consecuencia, se produce una rigidez conformacional al polímero que limita su flexibilidad. Dicha formación de enlaces de hidrógeno da como resultado la capacidad de retención de agua y retención de polímero, originando una superficie muy hidrofílica.²⁶

Del mismo modo, la estructura química del ácido hialurónico presenta ácidos carboxílicos, cuyo valor de pKa está entre 3-4 y, como consecuencia de su ionización, se encuentra cargado negativamente en un pH>3-4, por lo que ejercerá repulsión electrostática en las condiciones de pH fisiológico.²⁷

Otro polímero con gran capacidad de generar superficies altamente hidrofílicas es la poli(*N*-vinilpirrolidona) (PVP, figura 4) que es un polímero sintético no tóxico y

bioinerte. Igualmente, la presencia en su estructura de un grupo amina explica sus propiedades hidrófilas.²⁸

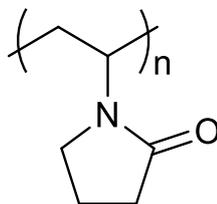


Figura 4.- Representación esquemática de la estructura química del PVP.

Asimismo, la PVP ha demostrado tener una amplia gama de aplicaciones en el campo farmacéutico debido a sus buenas características de formación de películas y como adhesivo.²⁹

A pesar de la evidencia de la eficacia de las superficies modificadas para prevenir o limitar la adhesión bacteriana, el problema principal que presentan, es la incapacidad de dichos recubrimientos para eliminar las bacterias una vez adheridas.³⁰ Es por esto, que entra en juego otro tipo de estrategia, que consiste en eliminar los microorganismos que se han adherido al soporte. Existen determinados compuestos poliméricos capaces de inducir la muerte celular de las bacterias por contacto, ya que presentan la denominada capacidad “contact killing”, como es el caso del quitosano.³¹

El quitosano (CHI, figura 5) es un polisacárido lineal compuesto de cadenas repetitivas de β -(1-4) D-glucosamina (unidades desacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada). Se trata de un polímero biocompatible, debido a su no toxicidad y biodegradable. Se ha demostrado, además, que es útil en áreas diferentes, como compuesto antimicrobiano en la agricultura, como potencial inductor de respuestas de defensa de las plantas, como agente hidratante en cosmética, y recientemente, como agente farmacéutico en biomedicina debido a sus propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas y antioxidantes.³²

En este contexto, la actividad antimicrobiana del quitosano y sus derivados contra diferentes grupos de microorganismos, como bacterias y hongos, ha recibido una atención considerable en los últimos años.³³

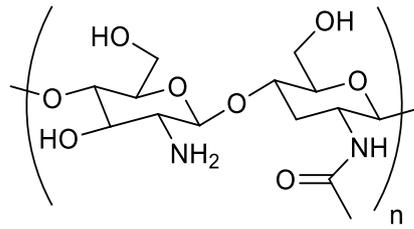


Figura 5.- Representación esquemática de la estructura química del quitosano.

Este polímero actúa principalmente en la superficie externa de las bacterias, ya que, presenta una gran densidad de cargas positivas provenientes del grupo amonio, que interactúan con la pared celular microbiana cargada negativamente, destruyendo la membrana citoplasmática, dando como resultado la fuga de componentes intramoleculares y por consiguiente la muerte celular (figura 6).³⁴

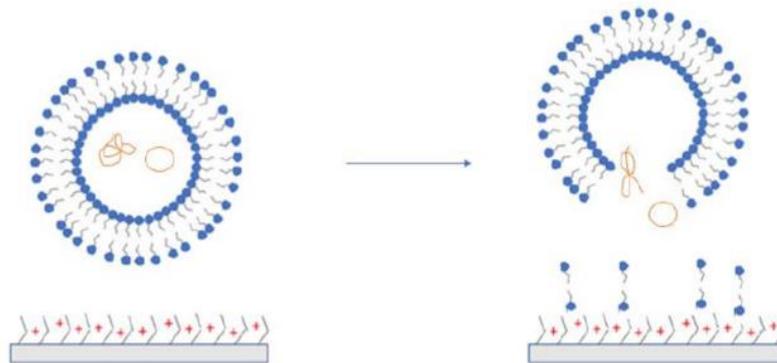


Figura 6.- Representación esquemática de la ruptura de las membranas celulares microbianas por "contact killing".

Por último, con el fin de lograr una eliminación más efectiva de las bacterias, existe una última estrategia antibacteriana, que consiste en la liberación de un biocida desde el propio implante. En este caso, el propio polímero va a actuar como red para almacenar, soportar y liberar el biocida ya sea como resultado de la degradación de la superficie o por la misma difusión del biocida.

Este sistema de liberación de biocidas controlado por polímeros implica numerosas ventajas, ya que mantienen en el tiempo una concentración alta de biocida cerca de los microorganismos, facilitando así su rápida actuación. Es por eso, que esta estrategia ha demostrado un gran potencial de uso en la industria médica.³⁵

Se pueden liberar muchos biocidas, pero merece especial mención el yodo, ya que se ha utilizado durante más de 150 años como antiséptico debido a sus propiedades bactericidas, fungicidas, virucidas y esporicidas. Sin embargo, el yodo presenta la desventaja de que puede llegar a provocar irritación en la piel. Es por ello, que ha sido muy estudiada su acción ligada al polímero poli(*N*-vinilpirrolidona) (PVP), ya que reacciona fácilmente con aceptores de electrones como el yodo formando un complejo estable en disolución.³⁶ Este hecho potencia el papel de la PVP en el desarrollo de recubrimientos antibacterianos debido a su doble papel como repelente bacteriano en base a su hidrofilia y biocida tras su complejación con yodo.

1.2. ADHESIÓN MEDIANTE GRUPO CATECOL

En el desarrollo de nuevos mecanismos de adhesión que puedan ser utilizados para todo tipo de superficies y en presencia de altos grados de humedad, se ha buscado como fuente de inspiración seres vivos que utilizan propiedades de adherencia permanente. Un ejemplo de bioadhesión permanente nos lo proporcionan los mejillones, que se adhieren a las rocas gracias a la segregación de unas proteínas capaces de formar uniones irreversibles en pocos segundos. La clave para sus propiedades adhesivas fue identificada por Waite y Tanzer y se trata de la presencia del aminoácido L-3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) cuya característica estructural diferenciadora es la presencia del grupo 1,2- dihidroxifenil, también conocido como catecol.²⁸

En los últimos años, se han dedicado grandes esfuerzos en afrontar el reto de mimetizar y comprender las propiedades adhesivas de este molusco, que van desde la expresión en microorganismos recombinantes de alguna de las proteínas responsables de la adherencia, hasta la preparación de polímeros sintéticos que

utilizan como unidades repetitivas derivados de catecol, que simulan la estructura de la DOPA.³⁷

Es por eso, que para mejorar las interacciones entre la superficie de Ti-6Al-4V y los recubrimientos antibacterianos en los últimos tiempos se ha extendido el empleo de la dopamina (Figura 7) que contiene el grupo catecol como molécula de anclaje, y establece fuertes interacciones entre la superficie y el grupo catecol como resultado de la formación un enlace de coordinación bidentado.³⁸

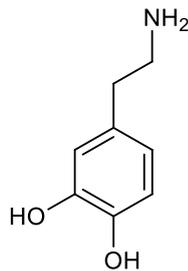


Figura 7.- Representación esquemática de la estructura química de la dopamina.

La funcionalización con grupos catecol es uno de los métodos de modificación más importantes e interesantes gracias a su alta eficiencia de modificación y universalidad, por lo que ha sido muy estudiado en los últimos años.²²

A este respecto, uno de los problemas que presenta, es la oxidación del grupo catecol a quinona (figura 8). Lou *et al.*³⁹ evidenciaron que, en condiciones alcalinas, se producía la oxidación del catecol a quinona y esto, atenuaba significativamente la fuerza de adhesión de esta, es decir, que no contribuía en su forma oxidada a la unión interfacial.⁴⁰

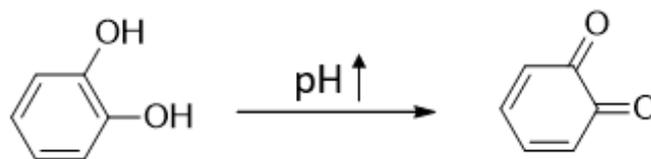


Figura 8.- Representación esquemática de la oxidación del grupo catecol.

Debido a la facilidad de oxidación a quinona se están haciendo esfuerzos en encontrar las condiciones óptimas de reacción que llevan al éxito de dicha funcionalización.

Debido a todas estas razones han proliferado los trabajos en los que se funcionalizan polímeros con este grupo. En la literatura actual hay ejemplos significativos aunque no abundantes de diferentes polímeros derivatizados con catecol, tanto sintéticos: PVP y PEG, como naturales, HA y CHI.⁴¹

1.3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es desarrollar recubrimientos poliméricos antibacterianos sobre láminas de Ti-6Al-4V.

Más concretamente, se funcionalizarán con el grupo catecol tres polímeros susceptibles de crear recubrimientos con potenciales propiedades antibacterianas por diferentes estrategias: repulsión electrostática, hidrofilia y “contact killing”. Los polímeros empleados son el ácido hialurónico, poli(*N*-vinilpirrolidona) y quitosano respectivamente. Posteriormente, se desarrollarán los recubrimientos sobre Ti-6Al-4V y se realizará su caracterización. También se realizarán recubrimientos con los polímeros originales sin la funcionalidad catecol con el objetivo de analizar comparativamente las propiedades de las superficies obtenidas y servir de base para futuros estudios de interacción con bacterias y estabilidad de recubrimientos vía catecol preparados.

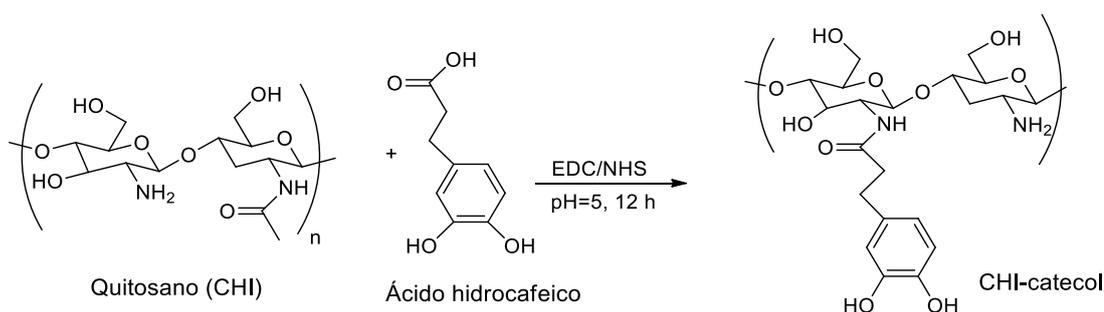
2. MATERIALES Y MÉTODO

2.1. MATERIALES

Los disolventes utilizados para las síntesis fueron etanol absoluto (99,8%), metanol (99,5%), ácido clorhídrico (37,0%) e hidróxido sódico, que fueron suministrados por Panreac. El ácido acético (99,0%) y las placas de Ti-6Al-4V empleadas fueron suministrados por Sigma Aldrich. Para el lavado de éstas, se emplearon etanol absoluto (99,8%), acetona (99,5%) suministrados por Panreac y agua destilada.

2.2.2. Síntesis de quitosano – catecol

La síntesis del compuesto conjugado quitosano-catecol se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Kim *et al.*³⁰ Inicialmente, se disolvió el quitosano (591 mg, 1,6 mmol) en una disolución ácida formada por HCl (2,5 mL, 1 M) y agua destilada 22,5 mL y se incrementó el pH de la disolución hasta llevarla a 5,0 con 5 M de NaOH. Después, se añadió a la disolución ácido hidrocafeico (600 mg, 3,25 mmol), previamente disuelto en 1,5 mL de agua desionizada. Seguidamente, se añadió lentamente EDC (930 mg, 4,75 mmol) disuelto en 50 mL de una mezcla etanol/agua (1:1, v/v). Dicha disolución se agitó vigorosamente a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante 12 horas controlando el pH de la disolución cada 30 min para que se mantuviera en un valor de 5.0 (Esquema 2). Tras 12 horas, la disolución se dializó con una membrana de 3500 Da en agua desionizada acidificada a pH 5 durante 3 días. Por último, el producto final fue liofilizado y almacenado en una desecador libre de hidratación.

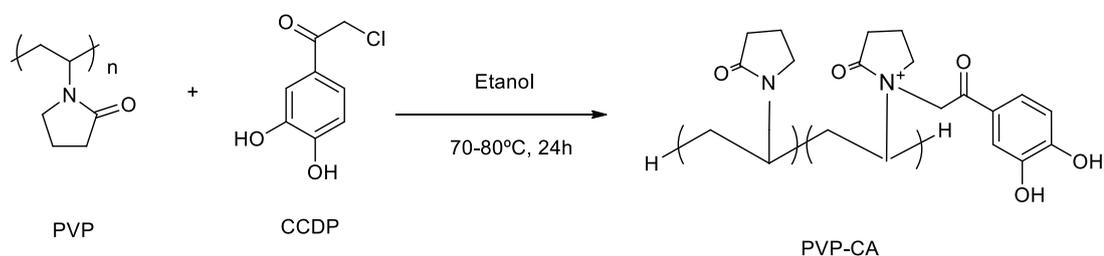


Esquema 2.- Síntesis de conjugación entre el quitosano y el ácido hidrocafeico.

2.2.3. Síntesis de poli(*N*-vinilpirrolidona)- catecol

La síntesis de poli(*N*-vinilpirrolidona)-catecol (PVP-CA) se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Tamim *et al.*³⁶ Primero, se disolvió poli(*N*-vinilpirrolidona) (PVP) (2 g, 18 mmol) y 2-cloro-3',4'-dihydroxiacetofenona (CCDP) (1,12 g, 6 mmol) en 50 mL de etanol dentro de un matraz de 150 mL y se purgó la disolución con gas nitrógeno. Posteriormente, se agitó la disolución a 70-80 °C durante 24 horas (Esquema 3). Una vez finalizado el tiempo de reacción, el disolvente se evaporó a vacío y el polímero se

precipitó utilizando dietiléter. Por último, el producto se secó en una bomba de vacío y se molió obteniendo un polvo marrón.



Esquema 3.- Síntesis de conjugación entre la poli(N-vinilpirrolidona) y 2-cloro-3,4-dihidroxiacetofenona.

2.3. RECUBRIMIENTOS

Primeramente, se acondicionaron las muestras de Ti-6Al-4V, para ello se lavó cada muestra con acetona, etanol y agua destilada durante 15 minutos y se secaron en una bomba de vacío a 50 °C durante 24 horas. Después se procedió a realizar los distintos recubrimientos.

Para demostrar la eficacia del grupo catecol, se realizaron dos tipos de recubrimientos, unos conteniendo únicamente el polímero de interés y otros con el compuesto formado polímero-catecol.

En el caso del ácido hialurónico, las muestras de Ti-6Al-4V se sumergieron en 50 ml de agua destilada con 50 mg de HA o HA-CA.²⁴ Para los recubrimientos de quitosano, las muestras se introdujeron en una disolución de 806 mg de CHI o CHI-CA en 5 mL de ácido clorhídrico (1M) y 45 mL de agua destilada.³⁰ Por último, para los recubrimientos de poli(N-vinilpirrolidona) se siguió el procedimiento descrito por Tamim *et al.*³⁶ Se sumergieron las muestras en una disolución de 50 mg PVP o PVP-CA en 5 mL de etanol y 3,75 mL de agua destilada. En todos los casos, se dejó reaccionando durante 12 horas, después se lavaron las muestras de Ti-6Al-4V con abundante agua y se secaron en la bomba de vacío.

3. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

En esta sección se recogen las condiciones experimentales, así como la instrumentación empleada para caracterizar los recubrimientos antibacterianos.

Los experimentos de RMN- H^1 y la espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) fueron realizados en los servicios generales de Investigación (SGIker) de la universidad del País Vasco, UPV/EHU.

3.1. MEDICIÓN DE ÁNGULOS DE CONTACTO

El ángulo de contacto se define como el ángulo que toma un líquido al entrar en contacto con un sólido, la medida y el valor de dicho ángulo nos proporcionará el grado de mojabilidad, y por tanto, el grado de adhesión del líquido al sólido (Figura 9).³²

En el caso de que las fuerzas de adhesión sean muy bajas, la superficie tenderá a “repeler” el líquido y el ángulo de contacto será mayor de 90° , más conocido como superficies hidrófobas. Mientras que, si las fuerzas de adherencia son muy altas, el ángulo de contacto es menor de 90° , ya que el líquido se ve “atraído” por el sólido y se extiende, en este caso se denomina superficies hidrófilas.

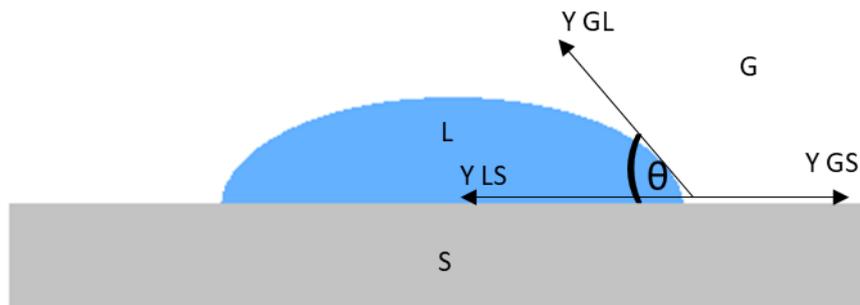


Figura 9.- Representación de la medida de ángulo de contacto.

La medida del ángulo de contacto de las placas de Ti-6Al-4V con y sin los recubrimientos se realizó, empleando el sistema óptico Neurtek Dataphysics OCA 15EC Instruments. Sobre cada muestra se depositaron 10 gotas ($3 \mu\text{L/gota}$) de agua

Mili-Q y se midieron los ángulos de contacto en la superficie. Los datos presentados constituyeron la media de 10 medidas.

3.2. XPS

La espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) es una técnica ampliamente utilizada debido a su gran precisión a la hora de conocer de manera cuantitativa el porcentaje atómico en la superficie de los materiales sólidos homogéneos.

Esta técnica consiste en la excitación mediante un haz de rayos X, de los niveles más internos de los átomos, provocando la emisión de fotoelectrones. Dicha emisión, proporciona información sobre la energía de cada nivel, y por tanto, sobre la naturaleza de cada átomo emisor.

Según la Ecuación 1, puesto que la energía del haz de rayos X es $h\nu$, la energía cinética de emisión del fotoelectrón es EK , y la función trabajo es ϕ , la diferencia de ellas nos da la energía de ligadura (EL), que es característica de cada elemento.

$$EL = h\nu - EK - \phi \quad (1)$$

Se analizó la composición química de las muestras mediante el equipo Phoibos 150 1D-DLD empleando una fuente de radiación monocromática Focus 500, con ánodo dual Al/Ag en una espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS).

3.3. RMN

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN- ^1H) se realizaron a temperatura ambiente en un espectrómetro Bruker AV-300 (300 MHz para ^1H), utilizando agua y dimetilsulfóxido deuterados como disolventes. Los desplazamientos químicos (δ) están expresados por partes por millón (ppm) relativos al TMS empleando la señal residual del disolvente [δ 4,79 ppm (^1H) para D_2O y δ 2,50 ppm (^1H) para $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$] como referencia interna.

4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los polímeros HA, CHI y PVP fueron modificados tal y como se ha descrito en el apartado experimental para introducir en ellos la funcionalidad catecol, que ha demostrado servir de anclaje, al establecer fuertes interacciones con la superficie de Ti-6Al-4V.

4.1. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE H¹ (RMN-H¹)

La espectrometría RMN-H¹ permitió comprobar que las síntesis habían transcurrido con éxito y se determinó cuantitativamente el grado de modificación de los polímeros.

En la figura 10, se muestran los espectros del quitosano, del ácido hidrocafeico y del quitosano-catecol.

A continuación, se comentan las señales obtenidas:

Primeramente, el quitosano (Figura 10.A) presenta una señal a 1,98 ppm correspondiente a los protones metílicos del grupo acetamida, por otro lado, las señales que aparecen entre 3,00-3,90 ppm corresponden a los protones de los enlaces glucosídicos del anillo. A 4,68 ppm aparece la señal correspondiente al protón anomérico. Por último, la señal que aparece en torno a 4,79 ppm corresponde al agua deuterada utilizada como disolvente.

Al analizar el espectro del ácido hidrocafeico (Figura 10.B), entre 2,77-3,12 ppm se encuentran dos tripletes correspondientes a los metilenos y entre 6,64-6,74 ppm aparecen las señales de los protones aromáticos del grupo catecol

Finalmente, en el producto obtenido tras haber realizado la síntesis (Figura 10.C), se observa una señal a 6,50 ppm correspondiente a los protones aromáticos del catecol incorporado al polímero. El cálculo del grado de modificación CHI-catecol, se llevó a cabo calculando la variación del área relativa de la señal, correspondiente a los protones metílicos, del grupo acetamida (1,98 ppm) respecto a la intensidad de las integrales de los protones aromáticos del catecol (6,50 ppm), obteniendo un grado de modificación del 41%.

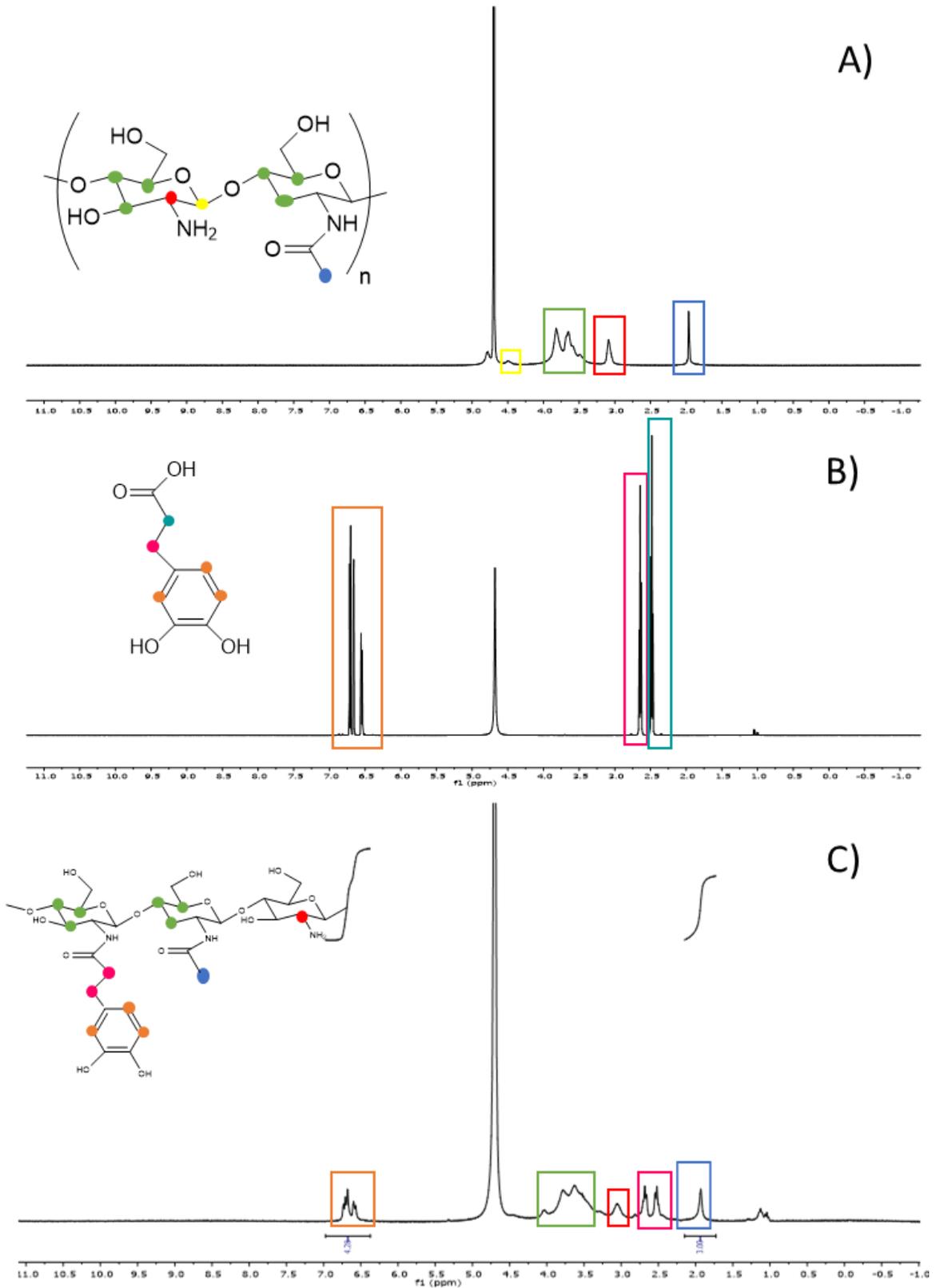


Figura 10.- Espectros RMN- H^1 de A) Quitosano B) Ácido hidrocafeico C) Quitosano – Catecol en $D_2O/2\%$ DCl.

RMN-H¹ Quitosano (D₂O/ 2% DCI, 500 MHz, 20°C): δ (ppm) = 1,98 (s, 3H, N-COCH₃), 3,00-3,15 (m, 2H, CH de GlcN), 3,40-3,90 (m, 6H, CH de GlcN), 4,68 (s, 1H, CH anomérico).

RMN-H¹ Ácido hidrocafeico (D₂O/ 2% DCI, 500 MHz, 20°C): δ (ppm) = 2,77 (t, 2H, $J=7,2$ Hz, CH₂ azul), 3,12 (t, 2H, $J=7,2$ Hz, CH₂ rosa), 6,64 (dd, 1H, $J=8,1$ Hz, $J=2,1$ Hz, CH aromático), 6,74 (d, 1H, $J=2,1$ Hz, CH aromático), 6,80 (d, 1H, $J=8,1$, CH aromático).

RMN-H¹ Quitosano-catecol (D₂O/ 2% DCI, 500 MHz, 20°C): δ (ppm) = 1,98 (s, 3H, CH₃ acetamida), 2,45(t, 2H, CH₂, metileno), 2,75 (t, 2H, CH₂, metileno), 3,05 (s, 1H, CH de GlcN), 3,30-4,10 (m, 6H, CH de GlcN), 6,50-6,85 (m, 3H, CH del anillo aromático).

La modificación de la PVP también fue corroborada y cuantificada mediante RMN-H¹, registrándose los espectros de la poli(*N*-vinilpirrolidona) (PVP), del 2-cloro-3,4-dihidroxiacetofenona (CCDP) y del PVP-catecol (Figura 11).

En la Figura 11.A correspondiente a la PVP se observa que a 1,77 ppm aparece un doblete correspondiente a dos de los protones de la cadena principal polimérica, entre 1,80-3,15 aparecen los protones correspondientes a la lactama, mientras que a 3,47 aparece un singlete correspondiente al protón de la cadena principal unido a la lactama. Asimismo, 2,50 ppm aparece la señal correspondiente al disolvente DMSO. Seguidamente, en la Figura 11.B se registra el espectro del 2-cloro-3,4-dihidroxiacetofenona, donde aparece a 5,00 ppm el singlete propio del protón de la cadena principal, y por último entre 6,83-7,39 aparecen las señales de los protones aromáticos. Finalmente, en el espectro del PVP-catecol (Figura 11.C) entre 6,83-7,39 ppm se aprecia la señal de los protones del grupo catecol.

El cálculo del grado de sustitución del catecol en el PVP se cuantificó calculando cómo varía el área relativa de la señal correspondiente a los protones de la unidad -CH₂ de la lactama (3,15 ppm) y los protones del catecol (7,00 ppm) obteniendo un grado de modificación del 21%.

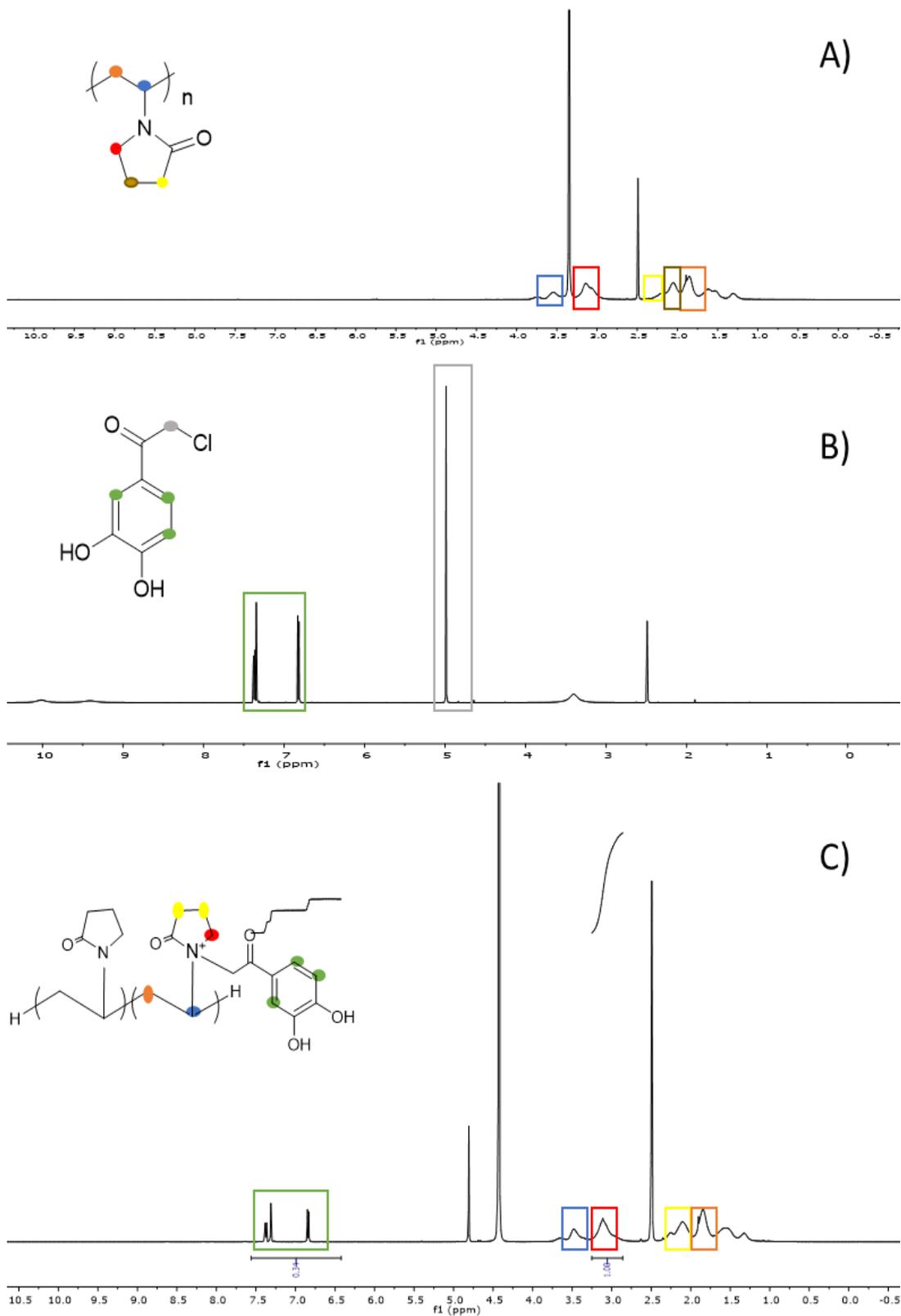


Figura 11.- Espectros RMN- H^1 de A) PVP B) CCDP C) PVP – Catecol en DMSO.

RMN-H¹ PVP (DMSO, 500 MHz, 20°C): δ (ppm) = 1,75 (d, 2H, CH₂, de la cadena principal), 1,80-2,25 (m, 4H, CH₂, de la lactama), 3,15 (d, 2H, CH₂ de la lactama), 3,47 (s, 1H, CH de la cadena principal).

RMN-H¹ 2-cloro-3,4-dihidroxiacetofenona (DMSO, 500 MHz, 20°C): δ (ppm) = 5,00 (s, 2H, -CH₂-, -COCH₂Cl), 6,82 (d, 1H, J = 8,3 Hz, CH aromático), 7,34 (d, 1H, J = 2,1 Hz, CH aromático), 7,37 (dd, 1H, J = 8,3 Hz, CH aromático).

RMN-H¹ PVP-catecol (DMSO, 500 MHz, 20°C): δ (ppm) = 1,77 (d, 2H, CH₂, de la cadena principal de la lactama), 2,24 (m, 4H, CH₂, de la lactama), 3,15 (m, 2H, CH₂ de la lactama), 3,47 (s, CH cadena principal), 6,83-7,39 (m, 3H, CH del catecol).

En lo que respecta a la modificación del ácido hialurónico (Figura 12) se muestra comparativamente los espectros RMN-H¹ del ácido hialurónico, dopamina y HA-catecol.

En el espectro del HA (Figura 12.A) se observó un singlete a 1,85 ppm correspondiente al grupo aceto, entre 3,25-3,85 ppm las señales correspondientes a los protones de los enlaces glucosídicos y por último entre 4,45-4,60 ppm aparece la señal del protón anomérico.

En cuanto al espectro de la dopamina (Figura 12.B) entre 2,76-3,12 ppm aparecen los protones alquílicos y entre 6,64-6,80 ppm aparecen las señales correspondientes a los protones del anillo aromático.

Para determinar si la reacción transcurrió con éxito, se realizó el espectro RMN del producto obtenido (Figura 12.C), y se observó que se había realizado adecuadamente ya que entre 6,60-7,25 ppm aparecen las señales correspondientes a los protones aromáticos en posición orto y meta del grupo catecol. Además, a 1,85 ppm se observan los multipletes del ácido hialurónico y a 2,75 ppm aparecen las señales de la cadena alifática de la dopamina.⁴²

Asimismo, el grado de modificación se estimó a partir de las integraciones entre los protones del aceto del ácido hialurónico (1,85 ppm) y los protones aromáticos (7,00 ppm) obteniendo un grado de sustitución del 33%.

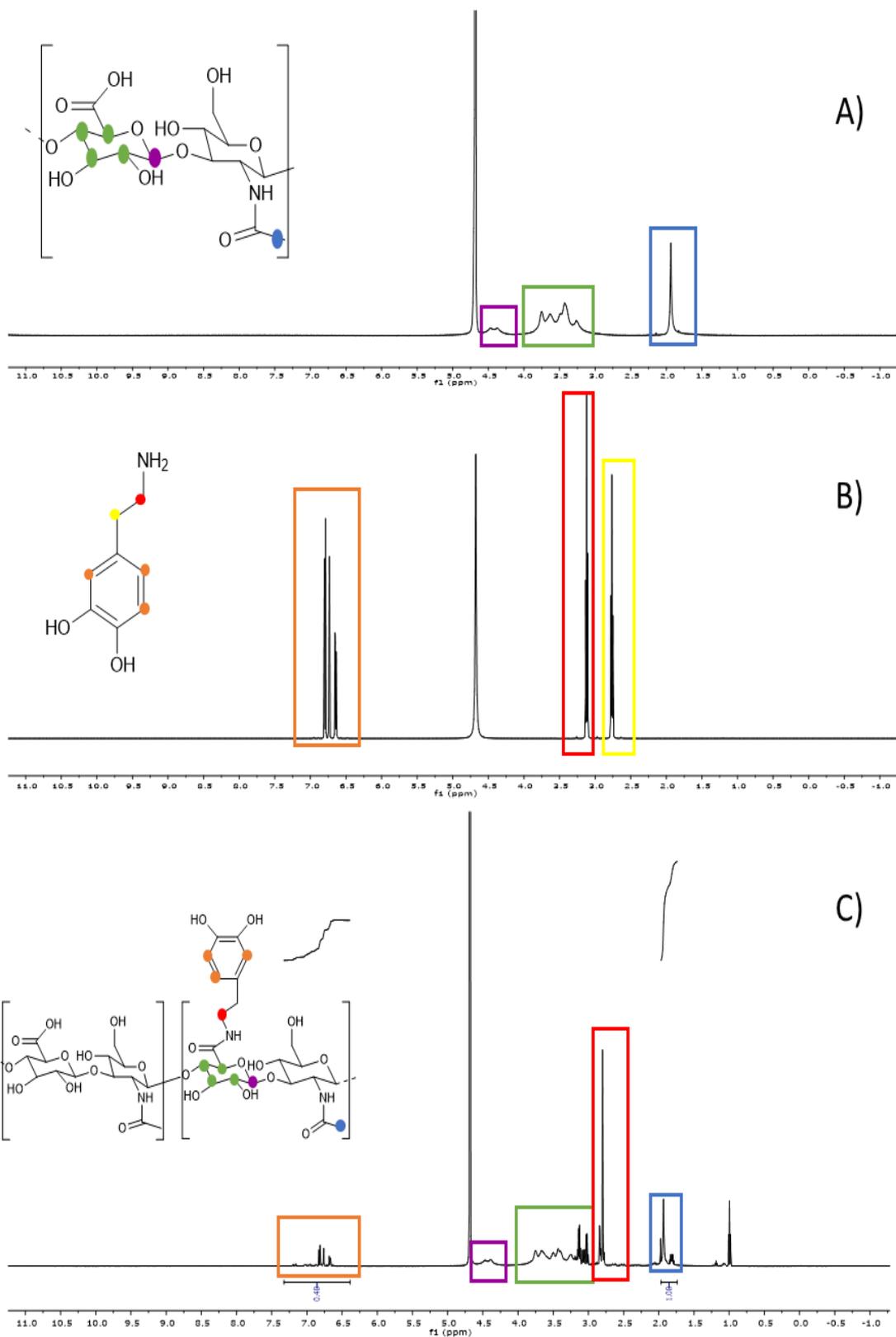


Figura 12.- Espectros RMN- H^1 de A) Ácido hialurónico B) Dopamina C) HA- Catecol en D_2O .

RMN-H¹ Ácido hialurónico (D₂O, 500 MHz, 20°C): δ (ppm) = 1,85 (s, 3H, CH₃, acetamida), 3,25-3,85 (m, 8H, CH de los anillos de HA), 4,45-4,60 (m, 1H, CH anomérico).

RMN-H¹ Dopamina (D₂O, 500 MHz, 20°C): δ (ppm) = 2,76 (t, $J=7,2$ Hz, 2H, CH₂ metileno), 3,12 (t, $J=7,2$ Hz, 2H, CH₂ metileno), 6,64 (dd, $J=8,1$ Hz, $J=2,1$ Hz, 1H, CH anillo aromático), 6,74 (d, $J=2,1$ Hz, 1H, CH anillo aromático), 6,80 (d, $J=8,1$ Hz, 1H, CH anillo aromático).

RMN-H¹ Ácido hialurónico-catecol (D₂O, 500 MHz, 20°C): δ (ppm) = 1,85 (m, 3H, CH₃, acetamida), 2,75 (m, 2H, CH₂, metileno), 3,25-3,75 (m, 6H, CH, anillos del HA), 4,45-4,55 (m, 1H, CH anomérico), 6,60-7,25 (m, 3H, CH anillo aromático).

4.2. ESPECTROSCOPÍA FOTOELECTRÓNICA DE RAYOS X (XPS)

Después de la realización de las síntesis y de la caracterización de los derivados poliméricos HA-catecol, CHI-catecol y PVP-catecol se procedió a su deposición sobre las muestras de Ti-6Al-4V. Para ello, las muestras de Ti-6Al-4V se sumergieron en disoluciones de HA-catecol, CHI-catecol y PVP-catecol tal y como se ha descrito en el apartado experimental. Y la composición de su superficie fue analizada mediante XPS.

Los resultados obtenidos por XPS se muestran en la Figura 13, donde se analiza la composición química de la superficie de las placas de Ti-6Al-4V antes y después de las deposiciones de los polímeros modificados con catecol en un intervalo de energía de 0-600 eV.

Estas curvas permitieron realizar la determinación cuantitativa de la composición superficial del Ti-6Al-4V (Tabla 1). Asimismo, en la figura 13 se distingue un todas las muestras con recubrimiento un incremento del pico a 400 eV correspondiente al N_{1s}, también se observa un incremento en el pico del C_{1s} a 288,3 eV en las tres curvas, que corresponde al enlace C=O, grupo funcional característico de los tres polímeros y por último, también se aprecia un incremento a 531,3 eV que corresponde al pico del O_{1s} mientras que los picos correspondientes al Ti_{2p}, V_{2p} y Al_{2p} se volvieron

inapreciables en todas las muestras recubiertas, lo que indica la formación del recubrimiento sobre la aleación metálica.

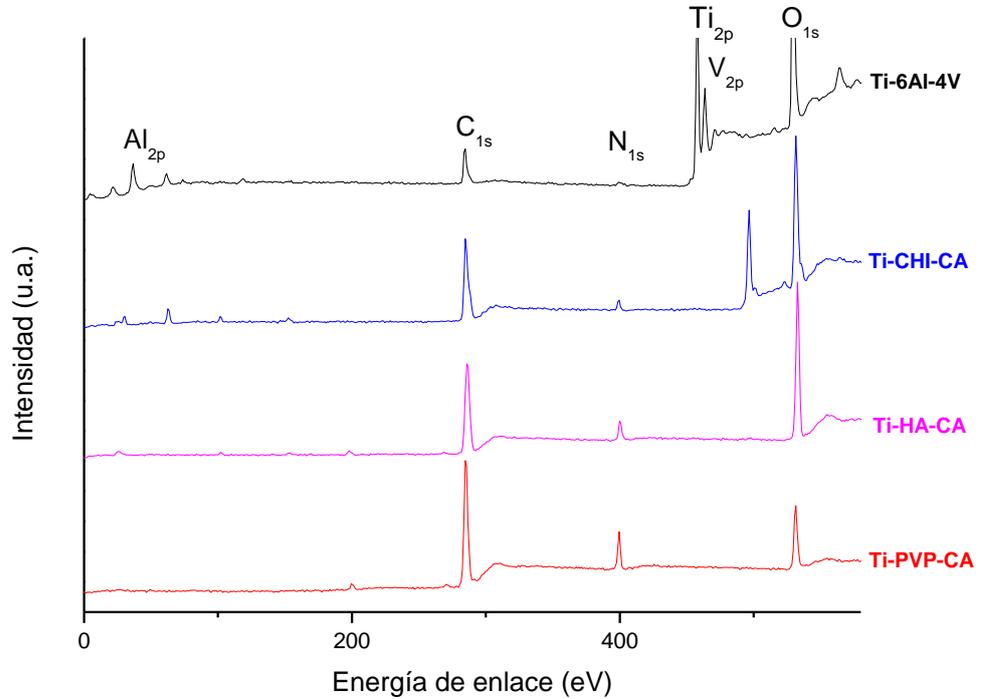


Figura 13.- Curvas de XPS de los recubrimientos superficiales de Ti-6Al-4V.

Por otra parte, en la curva del quitosano-catecol (Figura 13) aparece un pico a 498 eV, que corresponde a un pico Auger por contaminación de sodio. Estos picos se explican como el efecto cascada en el que un electrón de un nivel de energía superior ocupa una vacante que se había creado por el bombardeo de rayos X.

La Tabla 1, recoge los valores numéricos correspondientes a las composiciones superficiales determinadas para cada una de las muestras, donde se percibió que el porcentaje atómico del aluminio, vanadio y titanio pasó a ser despreciable en las placas modificadas respecto a la placa sin modificar. Este hecho, corroboró la correcta formación de los recubrimientos demostrando así la gran capacidad de adhesión del grupo catecol que es el responsable del anclaje a la aleación.

Tabla 1. Composición atómica (%) de la superficie de Ti-6Al-4V y de las muestras de Ti-6Al-4V modificadas.

Muestra	Composición atómica (%)					
	C _{1s}	O _{1s}	Ti _{2p}	V _{2p 3/2}	N _{1s}	Al _{2p}
Ti-6Al-4V	24,0	51,4	19,4	0,7	1,2	3,3
Ti-6Al-4V con quitosano-catecol	57,0	39,4	0	0	3,6	0
Ti-6Al-4V con ácido hialurónico-catecol	60,0	33,6	0	0	6,4	0
Ti-6Al-4V con poli(N-vinilpirrolidona)-catecol	75,7	14,3	0	0	10,0	0

4.3. MEDICIÓN DE ÁNGULOS DE CONTACTO

Asimismo, la variación de las propiedades hidrófilas del Ti-6Al-4V tras su modificación superficial se analizó midiendo el ángulo de contacto de las superficies. En la Figura 14, se comparan los ángulos de contacto obtenidos tanto en las muestras en las que se había realizado la deposición con catecol como con los polímeros originales sin catecol. En ellas, pudo observarse un claro aumento de la hidrofilia en las muestras modificadas con el polímero respecto a la muestra sin modificar, obteniéndose un ángulo de contacto de $83,0 \pm 1,8^\circ$ en la muestra de Ti-6Al-4V sin modificar mientras que las modificadas con polímeros sin modificar, como quitosano, ácido hialurónico y poli(N-vinilpirrolidona) obtuvieron $71,21 \pm 5,5^\circ$, $68,64 \pm 4,5^\circ$ y $47,22 \pm 3,0^\circ$ respectivamente. Esta variación en el ángulo fue observada por diferentes autores como Joo *et al.*, y es atribuida a la introducción de grupos hidrofílicos, como grupos carboxílicos, hidroxilos y amino en la superficie del sustrato, que hace que la superficie hidrófoba del Ti-6Al-4V se transforme en una superficie altamente hidrófila.⁴²

Por otra parte, al analizar las muestras con recubrimientos de polímeros funcionalizado con catecol, se obtienen para CHI-CA, HA-CA y PVP-CA los siguientes ángulos de contacto: $46,3 \pm 5,3^\circ$, $32,1 \pm 5,4^\circ$ y $27,6 \pm 2,3^\circ$ respectivamente, es decir, un descenso aún mayor del ángulo de contacto, debido a la introducción de dos grupos hidroxilo nuevos, lo cual dota a la superficie de una mayor hidrofilia.²⁴

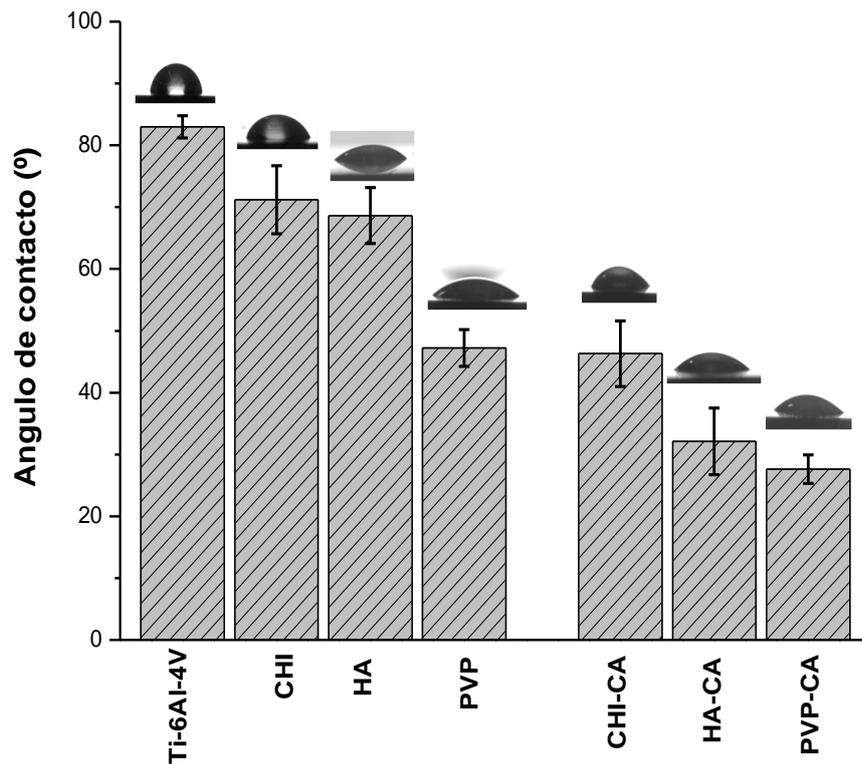


Figura 14.- Gráfica de los ángulos de contacto de las superficies modificadas.

5.CONCLUSIONES.

Se han llevado a cabo de manera exitosa las síntesis de HA-catecol, CHI-catecol y PVP-catecol, así como la modificación de la superficie de Ti-6Al-4V por recubrimiento con los polímeros funcionalizados preparados.

A través de las distintas técnicas de caracterización empleadas se ha podido comprobar la correcta formación de los recubrimientos con potenciales propiedades

antibacterianas. Asimismo, han quedado demostradas las ventajosas propiedades del catecol en el aumento de la hidrofilia de las superficies metálicas estudiadas.

Además, respecto a las técnicas cuantitativas, cabe destacar que XPS ha aportado resultados de análisis elementales de las superficies de los materiales, obteniendo gran información sobre la composición del recubrimiento, corroborando así la correcta adhesión de los recubrimientos.

Los recubrimientos poliméricos permiten obtener de manera sencilla mediante deposición, materiales con propiedades mejoradas para aplicaciones determinadas en el campo de los biomateriales.

Finalmente, este trabajo ha permitido también desarrollar competencias del grado de química como son las habilidades para conocer y analizar nuevos problemas, plantear estrategias para solucionarlos y desarrollar habilidades de iniciación a la investigación y al trabajo en entornos nuevos.

6.AGRADECIMIENTOS

Primeramente, me gustaría agradecer al Grupo de Investigación Labquimac de la UPV/EHU, y más en particular, a mis directoras Leyre Pérez y Leire Ruíz por permitirme llevar a cabo este trabajo y por su entera disposición y paciencia. Además, agradecer también al apoyo técnico y humano de los Servicios Generales de Investigación de la UPV/EHU (SGIker) en la realización de algunas de las medidas mostradas. También agradecer a las investigadoras Sheila Maiz y Julia Sánchez por todo el apoyo mostrado.

Y por encima de todo, a mi padre, por todo y por tanto, cada día y siempre, por darme lo más valioso en esta vida, raíces para crecer fuerte y alas para poder volar.

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Williams, D. F. *Biomaterials* **2009**, *30*, 5897–5909.
- (2) Huebsch, N.; Mooney, D. J. *Nature* **2009**, *462*, 426–432.
- (3) Hermawan, H.; Ramdan, D.; Djuansjah, J. R. P. In *Biomedical engineering- From theory to Applications*; 2011; pp 411–430.
- (4) Chouirfa, H.; Bouloussa, H.; Migonney, V.; Falentin-daudré, C. *Acta Biomater.* **2019**, *83*, 37–54.
- (5) Heintl, P.; Müller, L.; Körner, C.; Singer, R. F.; Müller, F. A. *Acta Biomater.* **2008**, *4*, 1536–1544.
- (6) Matsuno, A.; Tanaka, H.; Iwamuro, H.; Takanashi, S.; Miyawaki, S.; Nakashima, M.; Nakaguchi, H.; Nagashima, T. *Acta Neurochir* **2006**, *148*, 535–540.
- (7) Ding, R.; Guo, Z. X.; Wilson, A. *Mater. Sci. Eng. A* **2002**, *327*, 233–245.
- (8) Murr, L. E.; Esquivel, E. V.; Quinones, S. A.; Gaytan, S. M.; Lopez, M. I.; Martinez, E. Y.; Medina, F.; Hernandez, D. H.; Martinez, E. *Mater. Charact.* **2009**, *60*, 96–105.
- (9) Eisenbarth, E.; Meyle, J.; Nachtigall, W.; Breme, J. *Biomaterials* **1996**, *17*, 1399–1403.
- (10) Cherenda, N. N.; Basalai, A. V.; Shymanski, V. I.; Uglov, V. V.; Astashynski, V. M.; Kuzmitski, A. M.; Laskovnev, A. P.; Remnev, G. E. *Surf. Coatings Technol.* **2018**, *355*, 148–154.
- (11) Knetsch, M. L. W.; Koole, L. H. *Polymers (Basel)*. **2011**, *3*, 340–366.
- (12) Trampuz, A.; Widmer, A. F. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2006**, *19*, 349–356.
- (13) Zhang, Z. X.; Qu, S. J.; Feng, A. H.; Hu, X.; Shen, J. *J. Alloys Compd.* **2019**, *773*, 277–287.
- (14) Benincasa, M.; Abalos, A.; Oliveira, I.; Manresa, A. *Kluwer Acad. Publ.* **2004**, *85*, 1–8.

- (15) Silva, E. R.; Ferreira, O.; Ramalho, P. A.; Azevedo, N. F.; Bayón, R.; Igartua, A.; Bordado, J. C.; Calhorda, M. J. *Sci. Total Environ.* **2019**, *650*, 2499–2511.
- (16) Huang, K. S.; Yang, C. H.; Huang, S. L.; Chen, C. Y.; Lu, Y. Y.; Lin, Y. S. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1578.
- (17) Gour, N.; Ngo, K. X.; Vebert-Nardin, C. *Macromol. Mater. Eng.* **2014**, *299*, 648–668.
- (18) Cloutier, M.; Mantovani, D.; Rosei, F. *Trends Biotechnol.* **2015**, *33*, 637–652.
- (19) Nurioglu, A. G.; Esteves, A. C. C.; With, G. De. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 6547–6570.
- (20) Wu, P.; Grainger, D. W. *Biomaterials* **2006**, *27*, 2450–2467.
- (21) Siedenbiedel, F.; Tiller, J. C. *Polym. Rev.* **2012**, *4*, 46–71.
- (22) Vila, J.; Soriano, A.; Mensa, J. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2008**, *26*, 48–55.
- (23) Zhang, C.; Zhang, R.; Zhu, Y.; Wei, W.; Gu, Y.; Liu, X. *Mater. Lett.* **2016**, *164*, 15–18.
- (24) Joo, H.; Byun, E.; Lee, M.; Hong, Y.; Lee, H.; Kim, P. *J. Ind. Eng. Chem.* **2016**, *34*, 14–20.
- (25) Saranraj, P.; Naidu, M. A. *Int. J. Pharm. Biol. Arch.* **2013**, *4*, 853–859.
- (26) Lee, H.; Hwang, C.; Kim, H.; Jeong, S. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *186*, 290–298.
- (27) Nascimento, V.; França, C.; Hernández-montelongo, J.; Machado, D.; Lancellotti, M.; Cotta, M.; Landers, R.; Beppu, M. *Eur. Polym. J.* **2018**, *109*, 198–205.
- (28) Zhang, X.; Huang, Q.; Deng, F.; Huang, H.; Wan, Q.; Liu, M.; Wei, Y. *Appl. Mater. Today* **2017**, *7*, 222–238.
- (29) Papadopoulou, E. L.; Valentini, P.; Mussino, F.; Pompa, P. P.; Athanassiou, A.; Bayer, I. S. *Chem. Eng. J.* **2018**, *347*, 19–26.
- (30) Kim, K.; Kim, K.; Ryu, J. H.; Lee, H. *Biomaterials* **2015**, *52*, 161–170.

- (31) Junter, G. A.; Thébault, P.; Lebrun, L. *Acta Biomater.* **2016**, *30*, 13–25.
- (32) Valverde, A.; Pérez-Álvarez, L.; Ruiz-Rubio, L.; Pacha Olivenza, M. A.; García Blanco, M. B.; Díaz-Fuentes, M.; Vilas-Vilela, J. L. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *207*, 824–833.
- (33) Kalantari, K.; Amalina, M. A.; Jahangirian, H.; Webster, T. J. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *207*, 588–600.
- (34) Kaur, R.; Liu, S. *Prog. Surf. Sci.* **2016**, *91*, 136–153.
- (35) Thouvenin, M.; Peron, J.; Charreteur, C.; Guerin, P.; Langlois, J.; Vallee-rehel, K. *Prog. Org. Coatings* **2002**, *44*, 75–83.
- (36) Lee, C. *Colloid Polym. Sci.* **2018**, *296*, 1173–1182.
- (37) Lih, E.; Choi, S. G.; Ahn, D. J.; Joung, Y. K.; Han, D. K. *J. Tissue Eng.* **2016**, *7*, 1–11.
- (38) Ryu, J. H.; Hong, S.; Lee, H. *Acta Biomater.* **2015**, *27*, 101–115.
- (39) Palanisamy, S.; Sakthinathan, S.; Chen, S.; Thirumalraj, B.; Wu, T.; Lou, B.; Liu, X. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *135*, 267–273.
- (40) Yang, J.; Cohen Stuart, M. A.; Kamperman, M. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 8271–8298.
- (41) Faure, E.; Falentin-daudré, C.; Jérôme, C.; Lyskawa, J.; Fournier, D.; Woisel, P.; Detrembleur, C. *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38*, 236–270.
- (42) Kim, S.; Jang, Y.; Jang, M.; Lim, A.; Hardy, J. G.; Park, H. S.; Young, J. *Acta Biomater.* **2018**, *80*, 258–268.