

E.T.S. de Ingeniería Industrial,
Informática y de Telecomunicación

Recubrimiento biopolimérico para dispositivos de estimulación cardiaca



Máster Universitario en
Ingeniería Biomédica

Trabajo Fin de Máster

Nagore Martinez de Cestafe Rodriguez

Tutor upna: Armando Malanda/Abian Socorro

Tutor empresa: Raúl Pérez

Pamplona, 21 de Julio de 2018



AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a i+Med haberme dado la oportunidad de desarrollar mi proyecto fin de master en su empresa. También, por la confianza y el apoyo que me han dado durante este tiempo.

Gracias a los meses transcurridos siendo parte de su oficina y laboratorio he aprendido lo que es trabajar en equipo, y lo importante que esto es para sacar los proyectos adelante. Ya que, gracias a la ayuda de los y las compañeras de i+Med he podido llevar a cabo esta investigación. En especial quiero dar las gracias a Jone Renteria, por dejarme seguir con el trabajo que ella empezó, y a Txema Alonso por todo lo que me ha enseñado. No me olvido de los consejos de Manu Muñoz ni de la ayuda que me ha prestado Jesica Ruiz para poder caracterizar todas las muestras que he preparado, y en especial, agradezco a Alex Bittner del CIC nanoGUNE de Donosti su tiempo, ayuda e interés mostrado para el análisis de estas.

Por último, no me olvido del resto del equipo Oihane mi fotógrafa, Carmen, Lorena, Garazi, Raúl, Maialen, Cristina, Sergio, Mónica, Iñaki, Karmele, Virginia y todas las nuevas incorporaciones porque ir a trabajar con ganas y una sonrisa es lo más importante.

Mila esker guztioi!

RESUMEN

En este proyecto fin de master se recoge el trabajo realizado en la empresa i+Med. El objetivo ha sido crear un recubrimiento polimérico biocompatible para los dispositivos de estimulación cardíaca, en concreto para el generador de un marcapasos. En primer lugar se ha realizado una investigación de la situación actual en cuanto a los diferentes dispositivos de estimulación cardíaca, material, técnicas de recubrimiento y caracterización. Esta búsqueda bibliográfica ha permitido establecer las condiciones para la realización de diversas pruebas, con diferentes precursores, para conseguir la mejor monocapa de anclaje posible. A continuación se ha investigado la inmovilización de un hidrogel de ácido hialurónico sobre el sustrato mediante diferentes técnicas de unión.

En los ensayos se han estudiado varios procedimientos de activación química de la superficie del sustrato de titanio grado 5. Así mismo se ha investigado el anclaje del ácido hialurónico a la superficie de titanio mediante el empleo de monocapas basadas en silanos. Los mejores resultados se han obtenido con el precursor de monocapas N-[3-(trimetoxisilil)propil]-etilendiamina y con los agentes de acoplamiento 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida hidrócloruro (EDC·HCl) y el N-hidroxisuccinimida (Sulfo-NHS).

Los procedimientos definitivos se han establecido analizando los resultados obtenidos en la caracterización de las muestras realizadas mediante microscopía electrónica, ángulo de contacto y por FT-IR.

Todo este proceso de investigación, ha hecho posible conseguir un óptimo resultado, planteando diferentes soluciones y mejoras a los problemas detectados.

LABURPENA

Master amaierako proiektu honetan, i+Med enpresan egindako lana jasotzen da. Honen helburu nagusia, estimulazio kardiako gailuentzat estaldura polimeriko biobateragarri bat garatzea izan da, taupada-markagailuaren sorgailurako estalkia hain zuzen ere. Lehenik eta behin, gaur egungo merkatua ikertu da, bai gailu mota, material, estaldura metodo zein karakterizazio metodo ezberdinei dagokionez. Bilaketa bibliografiko honek, saiakuntza ezberdinak bideratzeko aukera eman du, aitzindari ezberdinak erabiliz guztien artean ainguraketa monokaparik hobereana lortu ahal izateko. Ondoren, elkarketa teknika desberdinak ikertu dira, substratu gainean azido hialuronikoko hidrogel baten immobilizazioa lortzeko.

Egindako saioetan, gradu 5eko titanio substratu gainazalaren aktibazio kimikoaren prozedura desberdinak aztertu dira. Aldi berean, silanotan oinarritutako monokapak erabiliz azido hialuronikoaren eta titanio gainazalaren ainguraketa ikertu da. Emaitzarik hoberenak N-[3-(trimetoxisilil)propil]-etilendiamina aitzindariak eman ditu, honekin batera 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida hidrocloruro (EDC-HCl) eta N-hidroxisuccinimida (Sulfo-NHS) akoplamendu eragileak erabili direlarik.

Behin betiko prozedurak, mikroskopia elektronikoaren, ukipen angeluaren eta FT-IRaren bitartez egindako laginen karakterizazioan lortutako emaitzak aztertuz ezarri dira.

Ikerketa prozedura honek, emaitza hoberenak lortzea posible egin du, topatutako arazoan aurrean irtenbide eta hobekuntza desberdinak proposatuz.

ABSTRACT

This master's thesis summarizes the work done at the company i+Med. The goal of the project was to create a biocompatible polymeric coating for cardiac stimulation devices, specifically for the generator of a pacemaker. First, a research of the state of the art has been carried out concerning cardiac stimulation devices, materials, coating and characterization techniques. This literature research allowed us to establish the experimental conditions with different precursors in order to achieve the best anchor monolayer. Next, the immobilization of a hydrogel of hyaluronic acid on the substrate was investigated through different binding techniques.

Several methods for the chemical activation of the titanium grade 5 substrate surfaces were researched. In addition, the anchoring of hyaluronic acid to the titanium surface using silane-based self-assembled monolayers was studied as well.

The best results were obtained with the monolayer precursor N- [3-(trimethoxysilyl) propyl] -ethylenediamine and with the coupling agents 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC-HCl) and N -hydroxysuccinimide (Sulfo-NHS). The definitive protocols were established after analyzing the results of the electron microscopy, contact angle and by FT-IR characterization of the samples.

The whole research process enabled to achieve optimal results by proposing different solutions and improvements to the detected problems.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	I
RESUMEN	II
LABURPENA.....	III
ABSTRACT.....	IV
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1 Problemática actual y propuesta de innovación.....	2
1.2 i+Med S.Coop	2
1.3 Objetivos	3
1.4 Fases del proyecto.....	3
1.5 Cronograma.....	4
1.5.1 Fase I. Revisión	4
1.5.2 Fase II. Necesidades	4
1.5.3 Fase III: Definición del diseño.....	4
1.5.4 Fase IV: Desarrollo.....	4
1.5.5 Fase V: Prototipo	5
1.6 Pliego de condiciones.....	7
2. MARCO CONCEPTUAL	8
2.1 INTRODUCCIÓN.....	8
2.2 DISPOSITIVOS DE ESTIMULACIÓN CARDÍACA	8
2.2.1 Materiales utilizados en los dispositivos de estimulación cardíaca.....	9
Los metales en la industria biomédica	9
Los polímeros en la industria biomédica.....	10
2.2.2 Métodos de fabricación	11
Control de calidad	12
2.3 HIDROGELES PARA EL RECUBRIMIENTO DEL DISPOSITIVO.....	12
2.3.1 Técnica de fabricación de los hidrogeles.....	13
2.4 TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL RECUBRIMIENTO DE DISPOSITIVOS IMPLANTABLES	15
2.4.1 Razones y métodos para la modificación superficial	15
Métodos mecánicos	16
Métodos químicos.....	16
Métodos físicos	16
2.4.2 Tratamiento químico ácido	17

2.4.3	Técnica de deposición sobre metal	17
2.5	SELF ASSEMBLED MONOLAYER (SAMs)	20
2.5.1	Monocapas con Silano	20
	Formación de monocapas de silano por disolución.....	21
	Formación de monocapas de silano por vapor	21
	Proceso de formación de la monocapa de silano	22
2.6	METODOS DE CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL.....	22
2.6.1	Caracterización térmica.....	23
	Análisis termogravimétrico (TGA)	23
	Calorimetría de barrido diferencial (DSC)	24
2.6.2	Caracterización estructural y morfológica	24
	Difracción de Rayos X (DRX)	24
	Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	25
	Ensayo de adherencia	26
2.6.3	Caracterización química	27
	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).....	27
	Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS).....	27
2.6.4	Caracterización físico-química.....	28
	Ángulo de contacto	28
2.7	INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA	29
2.7.1	Complicaciones relacionadas con el implante	31
3.	NORMATIVA APLICADA	34
3.1	INTRODUCCIÓN	34
3.2	PROYECTO BAJO NORMA UNE-EN ISO 13485:2016.....	34
3.3	NORMATIVA A APLICAR COMO PRODUCTO SANITARIO.....	34
3.3.1	La normativa legal de obligado cumplimiento	34
3.3.2	Clasificación de los implantes biosanitarios.....	35
3.3.3	Requisitos legales	35
3.3.4	Certificación como producto sanitario; marcado CE de los recubrimientos biosanitarios para su uso en implantología	36
4.	PROCESO EXPERIMENTAL	37
4.1	ÁREA DE TRABAJO	38
4.2	ACOPIO DE MATERIAL	39
4.3	ENSAYOS REALIZADOS.....	40

4.3.1	Ensayos realizados en la fase 1	43
	Precursor MTEOS	44
4.3.2	Ensayos realizados en la fase 2	45
	Precursor GOPTS	45
4.3.3	Ensayos realizados en la fase 3	48
4.3.4	Ensayos realizados en la fase 4	49
4.3.5	Ensayos realizados en la fase 5	50
	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).....	51
	Ángulo de contacto	52
4.3.6	Ensayos realizados en la fase 6	53
	Precursor Tris(2-aminoethyl)amine	54
	Funcionalización.....	54
4.3.7	Ensayos realizados en la fase 7	55
	Precursor EDS.....	55
	Ácido hialurónico.....	56
4.3.8	Ensayos realizados en la fase 8	57
	Gel de ácido hialurónico.....	57
	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC·HCl)	58
	Sulfo-NHS	58
4.4	CARACTERIZACIÓN	60
4.4.1	Ángulo de contacto	60
4.4.2	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).....	62
4.4.3	SEM.....	64
5.	FABRICACIÓN PROTOTIPO.....	66
5.1	INTRODUCCIÓN.....	66
5.1	DISEÑO DEL PROTOTIPO	66
5.1.1	Activación de la superficie del sustrato.....	67
5.1.2	SAM de enlace entre el sustrato y el hidrogel	67
5.1.3	Recubrimiento de Titanio Gr.5 con hidrogel.....	67
5.2	ESQUEMA DE FABRICACIÓN.....	68
6.	MEMORIA ECONOMICA	69
6.1	COSTE DEL RECUBRIMIENTO UTILIZANDO LOS POLIMEROS GOPTS Y TAEA	70
6.2	COSTE DEL RECUBRIMIENTO UTILIZANDO EL POLIMERO EDS.....	71
6.3	RESUMEN Y COMPARACIÓN PRESUPUESTOS.....	73

7. CONCLUSIONES	74
8. LÍNEAS FUTURAS	75
9. BIBLIOGRAFÍA.....	76
ANEXO I	79
A.1 FABRICACIÓN DEL PROTOTIPO	79
A.1.1 Limpieza del sustrato	79
A.1.2 Activación de la superficie del sustrato	80
A.1.3 SAM de enlace entre el sustrato y el hidrogel.....	81
A.1.4 Recubrimiento de Titanio Gr.5 con hidrogel.....	81
A.1.5 Neutralización de la disolución piraña.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema interno de un marcapasos	9
Figura 2: Implante dental	10
Figura 3: Formula química del poliuretano	11
Figura 4: Síntesis de hidrogeles por la polimerización de radicales libres y entrecruzamiento .	13
Figura 5: a) Síntesis de un hidrogel mediante polímeros entrecruzados con reticulación multifuncional. b) Síntesis de un hidrogel mediante la reticulación de polímeros multifuncionales con moléculas bifuncionales pequeñas	14
Figura 6: Dos métodos para formar un hidrogel de red interpenetrante (IPN)	15
Figura 7: Formación de hidrogeles iónicos	15
Figura 8: a) Formación de un hidrogel por afinidad entre polibiotina y estreptavidina. b) El hidrogel sensible a la glucosa se hincha cuando la glucosa libre compite con los grupos de glucosa poliméricos en un hidrogel GEMA (glucosyloxyethyl methacrylate).....	15
Figura 9: Técnica de deposición dip-coating	18
Figura 10: Técnica de deposición flow-coating.....	18
Figura 11: Técnica de deposición drop-coating	19
Figura 12: Técnica de deposición spin-coating	19
Figura 13: Esquema de una monocapa	20
Figura 14: Diagrama del proceso de silanización	20
Figura 15: Mecanismo de tres pasos para formar la monocapa de silano en superficies con –OH	22
Figura 16: Ejemplo del resultado de un análisis termogravimétrico	23

Figura 17: a) esquema de un calorímetro y b) Ejemplo de resultados de una caracterización por DSC	24
Figura 18: Diagrama esquemático de la ley de Bragg	25
Figura 19: Imagen de SEM de un implante dental de titanio granallado superficialmente	25
Figura 20: Clasificación del ensayo de corte-enrejado según la norma ISO 2409	26
Figura 21: Ejemplo del resultado de una caracterización por FTIR	27
Figura 22: Superficie irradiada con una fuente de fotones de alta energía que provoca la emisión de electrones.....	28
Figura 23: Angulo de contacto de una superficie hidrofóbica y otra hidrofílica	29
Figura 24: Acceso venoso mediante la punción de la vena subclavia.....	30
Figura 25: Acceso mediante la punción de la vena cefálica.....	30
Figura 26: a) Causas de explante del generador y b) causas de explante de electrodos.....	32
Figura 27: Panorámica del laboratorio de i+Med	38
Figura 28: Dispositivos de estimulación cardíaca de la marca Medtronic.....	39
Figura 29: Arandelas de titanio grado 5 empleadas	40
Figura 30: Activación de la superficie mediante la disolución piraña	43
Figura 31: Estructura química de la molécula MTEOS	44
Figura 32: Recubrimiento que se crea al utilizar el precursor MTEOS.....	45
Figura 33: Estructura química de la molécula de GOPTS	45
Figura 34: Comparación de la arandela sin tratar (izquierda) y la arandela tratada (derecha)..	47
Figura 35: a) Silanización de la superficie con los grupos epoxy. b) Monocapa de silano estable sobre la superficie de titanio grado 5	47
Figura 36: Disolución piraña a. 5 minutos después de meter la arandela, b. 10 minutos después y c. un rato después de haber sacado la arandela.	49
Figura 37: Aspecto de la arandela al sacarla de la disolución piraña, a. mojada y b. seca. c. Gota de agua sobre la superficie de la arandela seca.....	49
Figura 38: Gota de agua sobre la superficie de Ti6Al4V a. antes de activarla y b. después.	50
Figura 39: Espectro de las cinco arandelas obtenido con la espectroscopia infrarroja.....	52
Figura 40: Imágenes de una gota de agua sobre la superficie de Ti6Al4V en la técnica de ángulo de contacto	53
Figura 41: Estructura química de la Tris(2-aminoetil)amina.....	54
Figura 42: Estructura química de las SAM creada sobre el sustrato.....	54
Figura 43: Estructura química de la molécula de EDS.....	55
Figura 44: Monocapa del silano aminofuncional sobre la superficie de titanio grado 5	56
Figura 45: Estructura química de la molécula del ácido hialurónico	57

Figura 46: Estructura química del EDC·HCl	58
Figura 47: Estructura química del Sulfo-NHS	58
Figura 48: Esquema de la reacción que se produce	59
Figura 49: Recubrimiento creado sobre el sustrato de Titanio	60
Figura 50: Imágenes de los resultados de la caracterización por ángulo de contacto en las diferentes muestras	62
Figura 51: Espectro de infrarrojo de la muestra 2	63
Figura 52: Espectro de infrarrojo de la muestra 3 y 5.....	63
Figura 53: Espectros de infrarrojo de la muestras 4	64
Figura 54: Imágenes de las superficies obtenidas con el SEM	65
Figura 55: Flujograma de fabricación del prototipo.....	66
Figura 56: Esquema del proceso químico que sucede	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cronograma previsto para el desarrollo del trabajo	6
Tabla 2: Propiedades mecánicas del titanio para implantes quirúrgicos [12]	10
Tabla 3: Resumen de los métodos de modificación de la superficie de los implantes de titanio y sus aleaciones.....	17
Tabla 4: Equipos utilizados a lo largo del proyecto.....	38
Tabla 5: Características del material utilizado	40
Tabla 6: Resumen de las pruebas llevadas a cabo en la parte experimental	41
Tabla 7: Sustratos analizados por FT-IR	51
Tabla 8: Sustratos caracterizados con Ángulo de Contacto	52
Tabla 9: Resultados de la caracterización del ángulo de contacto	53
Tabla 10: Características de las muestras analizadas.....	60
Tabla 11: Resultados de la caracterización por ángulo de contacto.....	61
Tabla 12: Resultados de la caracterización por IR.....	62
Tabla 13: Características de las muestras llevadas a analizar	64
Tabla 14: Gasto de material en el proceso de recubrimiento mediante GOPTS y TAEA	70
Tabla 15: Gastos generados en el proceso de recubrimiento.....	71
Tabla 16: Gastos de material en el proceso de recubrimiento con EDS	71
Tabla 17: Gastos generados en el proceso de recubrimiento.....	72

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En 1954 se realizaron los primeros implantes de marcapasos permanentes y en 1980, los primeros desfibriladores automáticos implantables. El uso de estos dispositivos de estimulación cardíaca se ha incrementado de manera exponencial en los últimos años, debido a la incorporación en las guías de prácticas clínica de los resultados obtenidos en los ensayos clínicos, a la mejora continua de sus funciones, la mayor facilidad de implantación y especialmente, al envejecimiento de la población. Por otra parte, la mayor complejidad de los dispositivos y la implantación de los mismos en pacientes cada vez con más edad y con mayor número de comorbilidades producen un aumento del riesgo y número de complicaciones, con el consiguiente aumento de la morbilidad-mortalidad y los costes [1, 2].

El tratamiento de estas complicaciones no es fácil y aunque existen guías al respecto, aspectos relacionados con el diagnóstico y el tratamiento son objeto de debate [1]. Las infecciones relacionadas con los dispositivos de estimulación cardíaca se reconocen desde los primeros años de la década de los 70, cuando la endocarditis en relación con los marcapasos fue considerada como una importante y grave complicación, sin embargo, después de más de 40 años no hay una definición de infección que sea universalmente aceptada [2]. En la actualidad se incluyen como tal, las infecciones de cualquier componente del sistema implantado, desde infecciones de la herida, tejido celular subcutáneo y de la bolsa, hasta las que afectan al material endocárdico o endovascular, lo que implica diferentes entidades clínicas que requieren distintas estrategias de tratamiento.

En la actualidad existen numerosas patologías infecciosas causadas por la implantación de aparatos ajenos al organismo. La gran mayoría de las infecciones sobre los dispositivos provienen de la colonización de la bolsa del generador durante el momento del implante, bien procedente del equipo quirúrgico (aire del quirófano o cirujanos) o de la piel del propio paciente [2]. Y aunque diversos estudios han mostrado que la influencia de los primeros es escasa y que, la desinfección previa de la zona quirúrgica reduce de manera apreciable el número de colonias en la zona (de 50.000 a 200 UFC/cm²) [3], en presencia de material extraño los mecanismos defensivos del organismo tienen una mayor dificultad para eliminar microorganismos adheridos a la superficie inerte.

Por lo tanto, las infecciones se desarrollan por la adherencia de los microorganismos a los tejidos dañados y a los biomateriales. Estos microorganismos son especialmente prevalentes en *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, entre muchas otras [2]. Estas familias de proteínas interactúan con las “fibronectinas”, proteínas reparadoras del organismo que, junto al colágeno y el fibrinógeno, se depositan en los tejidos dañados (y también sobre los biomateriales) y que sirven de nexo de anclaje para los microorganismos que tienen receptores para ellas [4]. A raíz de este proceso se genera una biocapa o “biofilm”, que permite la supervivencia de la colonia bacteriana y que las protege de las defensas naturales del cuerpo, de los antibióticos y de los desinfectantes.

No hay que olvidar, el coste que se genera a consecuencia de estas infecciones. Los principios generales del tratamiento de estas infecciones incluyen la hospitalización (significativamente

prolongada), el tratamiento antibiótico, la extracción completa del sistema (generador y cables) y la reimplantación del nuevo sistema, si se considera necesario [2]. En el *Libro de Precios Públicos* [5], se pueden ver las tarifas que deben aplicar las organizaciones de servicios del Ente Público Osakidetza para el año 2018.

1.1 Problemática actual y propuesta de innovación

Como se ha mencionado, en los últimos años, por una mayor expectativa de vida de la población, ha aumentado la prevalencia de las enfermedades cardiovasculares. Con ello, se ha dado un aumento de implantaciones de dispositivos cardíacos en pacientes, lo que, a pesar de las mejoras en la implantación y una mayor experiencia quirúrgica, ha supuesto un mayor número de infecciones.

La adhesión bacteriana sobre el dispositivo médico es de relevancia crítica, ya que provoca una gran parte de las recaídas de infecciones hospitalarias. En este proyecto se plantea desarrollar una nueva tecnología para prevenir estas infecciones, utilizando un recubrimiento antibacteriano que proteja el marcapasos y así, repeler las bacterias y evitar la formación de “biofilms”. Este recubrimiento ha de mantener la funcionalidad de los dispositivos implantados y ayudar a reducir los índices de mortalidad y los costes médicos asociados a estas infecciones.

La función de este recubrimiento es reducir los efectos no deseados, como la contaminación bacteriana, la formación de trombos o la mala integración del implante, dando para ello a la superficie del implante actividad biológica mediante un hidrogel. La investigación realizada en el área de los hidrogeles ha demostrado que pueden ser materiales muy útiles y atractivos para el campo médico por su alta biocompatibilidad, su carácter hidrófilo, y su capacidad de hinchamiento y estado de equilibrio. Es por eso que se busca desarrollar un hidrogel antibacteriano para su aplicación en la implantación de dispositivos de estimulación cardíaca.

La función final del hidrogel será la administración controlada de sustancias activas, ya que en ocasiones, la administración oral o intravenosa de los medicamentos puede conllevar a efectos secundarios graves como daño en el hígado, además de a un coste sanitario elevado. Por ello, el recubrimiento debe permanecer activo al menos durante el tiempo en el que existe un mayor riesgo de complicaciones derivadas del implante.

Este proyecto se ha podido realizar gracias a que la empresa innovadora i+Med ha analizado el problema, y quiere buscar una solución basándose en su experiencia y en su capacidad de fabricación de recubrimientos biocompatibles. Además de la colaboración surgida entre esta empresa y la Universidad Pública de Navarra.

1.2 i+Med S.Coop

i+Med S.Coop. es una empresa de biotecnología de muy reciente creación. Fundada en 2014 en el Centro Laskaray de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU), actualmente está ubicada en el Parque Tecnológico de Álava, en Miñano. Dispone de un espacio propio, un laboratorio con una sala blanca y sede administrativa diferenciadas, en el vivero de empresas CEIA (Centro de Empresas e Innovación de Álava). Sus instalaciones están equipadas con tecnología de última generación que posibilitan el diseño, producción y certificación de sus productos.

La actividad principal de i+Med es la fabricación de productos y dispositivos médicos en el área de la biomedicina. Esta empresa desarrolla y posee una amplia experiencia en el mundo de los hidrogeles y nano-hidrogeles, siempre enfocados al campo de la biomedicina. La puesta en el mercado de sus productos actualmente se centra en los sectores como traumatología, odontología, oftalmología y estética. i+Med cuenta con una página web, en la que se describen los productos y áreas en las cuales trabajan, así como el equipo e instalaciones que lo componen.

Además del producto propio i+Med desarrolla hidrogeles y nanopartículas a terceros, cada una de ellas específicas para cada sector biomédico, generando día a día nuevo conocimiento dentro del equipo.

1.3 Objetivos

El objetivo principal de este proyecto es desarrollar un recubrimiento con hidrogel antimicrobiano, para su aplicación en marcapasos y, de esta forma, reducir la probabilidad de sufrir una infección o un rechazo del dispositivo.

Para ello, se analizarán los diferentes materiales que forman los dispositivos de estimulación cardíaca, y las diferentes técnicas existentes para la inmovilización del hidrogel sobre ellos. Teniendo en cuenta que este recubrimiento no debe afectar a la labor del dispositivo, los objetivos marcados para ello son los siguientes:

- Conocer la labor realizada hasta ahora en la empresa en relación al proyecto.
- Conocer las distintas características de los dispositivos de estimulación cardíaca, así como su material y su funcionalidad.
- Conocer y aplicar la normativa de obligado cumplimiento aplicable a los productos sanitarios a la hora de fabricar y diseñar nuevas soluciones ingenieriles.
- Desarrollar ensayos para conseguir un recubrimiento que no modifique las propiedades del material del marcapasos y no afecte su correcto funcionamiento.
- Ensayar con los posibles biomateriales para la composición del recubrimiento, compatibles con el implante.

1.4 Fases del proyecto

Para poder trabajar de una forma más efectiva y ordenada, y llevar un seguimiento de las tareas realizadas, el proyecto se ha dividido en diferentes fases, detalladas a continuación:

- Revisión bibliográfica del trabajo realizado previamente por la empresa, de las características del dispositivo implantable y de las características de recubrimiento.
- Planificación del prototipo y del diagrama de procesos de ensayo y fabricación.
- Selección de proveedores y compra del material.
- Desarrollo del prototipo.
- Realización de ensayos de compatibilidad y funcionalidad.

En el siguiente apartado se describe con detalle las tareas realizadas en cada fase y el tiempo dedicado a cada una de ellas a lo largo del proyecto.

1.5 Cronograma

Para realizar el proyecto de forma ordenada y clara, en el primer momento se rellenó un cronograma (tabla 1). En el que se han fijado las diferentes fases, tareas y tiempo en el que se realiza cada una. Este cronograma se ha rellenado para cumplir con los objetivos y fases del proyecto descritos en los apartados anteriores.

A continuación se detalla la relación existente entre las fases establecidas en la planificación y el desarrollo del proyecto.

1.5.1 Fase I. Revisión

La primera fase se centra en conocer el proyecto en el que se va a trabajar. No se trata de un proyecto de comienzo desde cero, si no que existe una labor previa realizada por i+Med gracias a la Ingeniera Biomédica Jone Rentería Aguirregabiria. En su trabajo fin de grado comenzó con la investigación sobre de los posibles polímeros y técnicas aptas para recubrir los diferentes implantes de titanio [6].

1.5.2 Fase II. Necesidades

En esta segunda fase se recaba información sobre el ámbito sanitario y los posibles clientes, ya que para desarrollar un buen producto es importante saber qué es lo que los usuarios piden. Se realiza una revisión de la intervención quirúrgica, se identifican las necesidades de los clientes, los requisitos de mercado y la normativa exigida.

1.5.3 Fase III: Definición del diseño

El objetivo de esta tercera fase es recabar información necesaria para conocer las diferentes opciones, en cuanto a materiales y técnicas existentes, y poder llevar a cabo los objetivos de la mejor forma posible, teniendo en cuenta lo revisado en los puntos anteriores. Para ello, se hace una evaluación de las propiedades de los diferentes dispositivos implantables que hay en el mercado, al igual que de los posibles biopolímeros, para la composición y enlace del recubrimiento.

Se tomará una decisión teniendo en cuenta que tiene que existir compatibilidad entre la superficie del dispositivo implantable y el recubrimiento, además de la biocompatibilidad de los materiales. Toda esta información servirá para realizar un diseño adecuado de un primer prototipo.

1.5.4 Fase IV: Desarrollo

Tras analizar la información obtenida, se realiza un diagrama de planificación (o flujograma) de los procesos de ensayo y fabricación. Es decir, en esta fase se desarrolla lo planificado en la fase anterior. Se realiza una selección de proveedores y compra de material, y se forma al personal. Aunque, hay que mencionar, que la tarea de formación se ha llevado a cabo a lo largo de todo el proceso.

1.5.5 Fase V: Prototipo

Esta fase está enfocada a la fabricación del producto, donde se realizan los ensayos pensados para conseguir lo planificado en las fases anteriores, es decir, todas las pruebas realizadas en el proyecto. Los ensayos se llevan a cabo en el laboratorio, sobre sustratos del material adecuado, siguiendo las instrucciones técnicas de i+Med. Se realiza para cada ensayo una hoja de pruebas. Después, si las muestras realizadas se llevan a caracterizar, se terminarán de completar las hojas de pruebas con los resultados.

CRONOGRAMA PREVISTO PARA EL DESARROLLO DEL PROYECTO

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
		Febrero				Marzo				Abril				Mayo				Junio				
Fases	Tareas	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
Fase I: Revisión	1.1 Analisis del proyecto previo realizado "Desarrollo de un recubrimiento compatible con diferentes métodos de fabricación y materiales"																					
	1.2 Analisis de proyecto prodrita																					
Fase II: Necesidades	2.1 Revisión de la intervencion quirurgica																					
	2.2 Identificación de las necesidades de los clientes, requisitos de mercado y su previsión. Finalidad e indicaciones previstas																					
	2.3 Normativa exigida																					
Fase III: Definición del diseño	3.1 Evaluación de las propiedades del dispositivo implantado (marcapasos)																					
	3.2 Evaluacion de los posibles biopolimeros para la composición del hidrogel																					
	3.3 Compatibilidad del dispositivo implantable y el hidrogel																					
	3.4 Conocimiento del proceso de integración y estabilidad del dispositivo, el hidrogel y la bolsa																					
	3.5 Realización del diseño de prototipo																					
Fase IV: Desarrollo	4.1 Realización de diagramas de procesos de ensayo/fabricación																					
	4.2 Diseño de medios de producción y equipos de medida																					
	4.3 Formación y entrenamiento del personal																					
	4.4 Selección de proveedores y compra de material además de las fichas de especificaciones																					
	4.5 Establecer requisitos de limpieza y esterilidad																					
	4.6 Definición del material de acondicionamiento																					
Fase V: Prototipo	5.1 Desarrollo del prototipo																					
	5.2 Verificación del prototipo																					
	5.2 Ensayo compatibilidad dispositivo/hidrogel																					

Tabla 1: Cronograma previsto para el desarrollo del trabajo

1.6 Pliego de condiciones

Respetar el pliego de condiciones establecido respecto a los recursos y requisitos para llevar a cabo los objetivos citados previamente. Respecto a los recursos materiales, se dispone de diferente materia prima, la cual se utiliza para realizar los ensayos previos al prototipo final. Otro ámbito dentro de los recursos está relacionado con la tecnología empleada, ya que tanto para recubrir el material como para caracterizar la superficie, es necesario disponer de cierto conocimiento y acceso a las tecnologías dentro de la empresa i+Med o fuera de esta.

Los requisitos para llevar a cabo el desarrollo interfieren en diferentes ámbitos, por ejemplo: tener que cumplir con la normativa vigente respecto a la fabricación de dispositivos médicos, así como cumplir el Sistema de Gestión de Calidad que funciona bajo la norma UNE-EN ISO 13485:2016. Además, es necesario disponer de un laboratorio equipado para llevar a cabo las reacciones y disoluciones para su aplicación sobre las piezas seleccionadas.

2. MARCO CONCEPTUAL

2.1 INTRODUCCIÓN

En este apartado se realiza una revisión de los trabajos que han servido como base de discusión para desarrollar un conocimiento y una solución del problema a resolver. Para ello, se ha realizado una primera introducción a los dispositivos de estimulación cardíaca y, en particular, al material que compone la superficie y el material con que se quiere recubrir.

Posteriormente, se detallan las diferentes técnicas que se utilizan para realizar el proceso y se profundiza en las que se llevan a cabo en la fase experimental, tanto enfocadas a la deposición del recubrimiento como a la caracterización. Por último, se hace un análisis sobre la intervención quirúrgica del implante de los dispositivos de estimulación cardíaca.

De esta forma, se recogen los diferentes enfoques que hay que tener en cuenta para diseñar un prototipo de recubrimiento biocompatible.

2.2 DISPOSITIVOS DE ESTIMULACIÓN CARDÍACA

Un marcapasos es un sistema que monitorea la actividad intrínseca del corazón y a la vez genera un impulso eléctrico cuando el ritmo intrínseco del corazón no lo hace. Está compuesto por un generador, capaz de producir estímulos, y unos electrodos conductores, capaces de transmitir estos estímulos al corazón [7], se puede observar el esquema interno de un marcapasos en la figura 1.

Su funcionamiento es similar a un circuito eléctrico en el cual la batería provee de electricidad que viaja por un cable hasta el miocardio, donde lo estimula, y produce un latido cardíaco [8]. La corriente regresa a la batería por el mismo cable o por los tejidos del paciente para completar el circuito. Un sistema de marcapasos consta de dos elementos:

- Fuente o generador de pulsos: Aparato metálico de titanio en cuyo interior se guarda una batería de yoduro de litio, su duración es un promedio de 10 a 15 años. Además contiene el circuito electrónico que controla el tiempo y duración de los impulsos eléctricos así como las diversas operaciones de sensado y funcionamiento del marcapasos.
- Electrodo: Es el que conduce la electricidad desde la fuente hasta el corazón. En el caso de que el electrodo sea bipolar, llevan la corriente de regreso a la batería para cerrar el circuito. Además llevan información hacia la fuente sobre la actividad cardíaca. El electrodo está aislado del cuerpo con silicona, solo la punta metálica está expuesta.

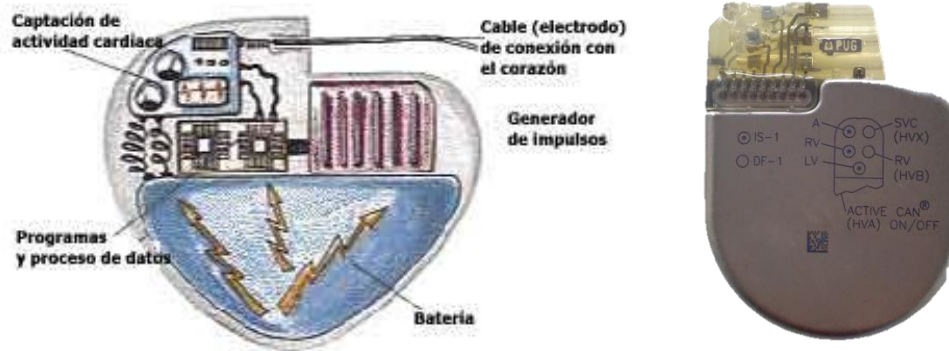


Figura 1: Esquema interno de un marcapasos [9]

2.2.1 Materiales utilizados en los dispositivos de estimulación cardíaca

En los últimos años los biomateriales han ido evolucionando rápidamente. Al principio simplemente se buscaba construir los implantes de un material que no fuera rechazado por el organismo, pero hoy en día se ha introducido la necesidad de una reacción positiva entre el implante y los tejidos adyacentes. Con los años se han ido consiguiendo materiales específicos para cada aplicación, que en la actualidad se utilizan comúnmente. En este caso, al tratarse de un dispositivo de estimulación cardíaca, colocado en una zona sensible a cualquier alteración, la tolerancia por parte del organismo debe ser muy estricta y óptima.

Los dispositivos de estimulación cardíaca son componentes híbridos, ya que están compuestos tanto de materiales metálicos como de materiales poliméricos. La carcasa donde se alberga el circuito eléctrico es de material metálico y los conectores que llegan hasta las válvulas del corazón están fabricados mediante polímeros, así como el conector que está hecho de poliuretano.

Los metales en la industria biomédica

Los materiales metálicos son utilizados gracias a las propiedades mecánicas que ofrecen pero su uso en la industria sanitaria puede traer complicaciones ya que pueden mostrar desgaste del material, corrosión, liberación de iones metálicos... Para evitar estos problemas, se tratan las superficies que posteriormente van a estar en contacto con el medio biológico, para obtener unos resultados lo más óptimos posibles. Para conseguir las características necesarias en cada aplicación, normalmente se emplean aleaciones entre diferentes metales, de este modo se modifica su estructura cristalina y, por lo tanto, sus propiedades físicas como la resistencia, elasticidad, ductilidad, pureza, etc.

La carcasa del marcapasos, la parte que entra en contacto con el hidrogel desarrollado, normalmente está hecha de titanio o alguna aleación del mismo [10], ya que este metal ayuda a proteger los componentes internos y reduce la interferencia electromagnética externa.

El titanio en la biomedicina

El titanio ha sustituido a la cerámica y a la resina epoxi en la fabricación del generador de los dispositivos cardíacos implantables. Este material forma una capa de óxido no conductor en la superficie, lo que ayuda a evitar el intercambio de carga. Además presenta un alto módulo de

elasticidad, alta resistencia a la corrosión y alta durabilidad [10]. Hoy en día en el sector biosanitario el uso de aleaciones de titanio es cada vez más común, debido a su alta biocompatibilidad y resistencia a la corrosión, ofreciendo características mecánicas y de moldeo que lo convierten en un material idóneo en la mayoría de las aplicaciones [11].

Sus aplicaciones en el mundo de la medicina son muy diversas, se utiliza en la traumatología, en la odontología (figura 2) y en la cardiología, en válvulas cardiacas o en marcapasos, entre otras cosas [12].



Figura 2: Implante dental [13]

El llamado titanio puro comercial (de símbolo químico “Ti”) es un elemento químico único que contiene trazas de hierro, oxígeno, nitrógeno, carbono e hidrógeno. La cantidad de trazas de estos elementos influye en las propiedades mecánicas del titanio [14]. El estándar internacional para el titanio como material de implante quirúrgico, existe desde 1978 (ISO 5832/2) y describe cuatro graduaciones según la composición química y las propiedades mecánicas, las diferencias entre cada una de estas graduaciones se basan en las cantidades máximas de oxígeno, hierro o nitrógeno que tienen. La aleación más usada en la fabricación de marcapasos es el titanio grado 1, el más puro [10]. Pero dependerá de la aplicación para la que se quiera usar, en la tabla 2 se muestran las propiedades mecánicas de las diferentes graduaciones para implantes quirúrgicos.

Propiedades	Grado I	Grado II	Grado III	Grado IV
Carga de rotura (MPa)	240	345	450	550
Límite elástico (0.2%)(MPa)	170	275	380	485
Elongación (%)	24	20	18	15
Estricción (%)	30	30	30	25

Tabla 2: Propiedades mecánicas del titanio para implantes quirúrgicos [12]

Los polímeros en la industria biomédica

En la actualidad, se han perfeccionado los polímeros ya existentes y se han desarrollado nuevos para aplicaciones específicas dentro del campo de la medicina. Existe una gran variedad de polímeros biocompatibles, por un lado están los polímeros naturales como por ejemplo la celulosa o la glucosamina, y por otro los polímeros sintéticos como pueden ser el polietileno de ultra alto peso molecular (UHMWPE), el PVC, el nylon o la silicona.

El polímero empleado en la medicina tiene que cumplir ciertas características, debe ser un buen aislante, no debe ocasionar ningún tipo de reacción y debe tener una resistencia a la rotura alta, así como gran posibilidad de maleabilidad.

En los dispositivos de estimulación cardíaca el polímero más utilizado es el poliuretano.

Poliuretano

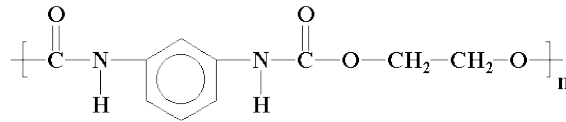


Figura 3: Fórmula química del poliuretano

Los poliuretanos son los materiales más utilizados comúnmente en la producción de dispositivos que entran en contacto con la sangre, como catéteres, aislamiento de cables de marcapasos, prótesis vasculares, válvulas cardíacas, o dispositivos de asistencia cardíaca [15, 16] por su excelente biocompatibilidad, duración y compatibilidad con la sangre.

Los implantes de poliuretano fueron usados por primera vez en 1950. Fueron desarrollados para fines industriales, pero demostraron muy buenas propiedades mecánicas a largo plazo al exponerse a cargas estáticas o dinámicas, y por lo tanto, se empezó a emplear en diferentes aplicaciones médicas [15]. Además, posteriormente se ha encontrado que tiene propiedades hemostáticas y que no produce adherencias post-operatorias.

Se encuentra entre los materiales de construcción más versátiles que se pueden formular para dispositivos médicos, su composición química se muestra en la figura 3. Pueden ser elastómeros fuertes o plásticos rígidos, y pueden procesarse mediante extrusión, moldeo por inyección, soplado de película, inmersión en solución y por moldeo de líquido en dos partes. La química única de los poliuretanos les da esta versatilidad. Son polímeros segmentados, lo que significa que tienen un segmento blando que proporciona flexibilidad y un segmento duro que proporciona resistencia [17].

Pero hay que tener en cuenta que los poliuretanos cubren una amplia gama de composiciones y estructuras dentro de la familia de los polímeros, y que no todos tienen la misma interacción con la sangre. Difieren en su tendencia a calcificarse y en su propensión a la biodegradación [16]. Por ello, muchos grupos de investigación han desarrollado nuevas composiciones y nuevos métodos de producción de poliuretanos y así, modificar los disponibles para mejorar sus propiedades y obtener materiales con las propiedades deseadas para aplicaciones médicas y biocompatibles. Los poliuretanos basados en poliéter son los polímeros de elección en aplicaciones médicas porque son prácticamente insensibles a la hidrólisis y, por lo tanto, son muy estables en el entorno fisiológico.

2.2.2 Métodos de fabricación

Los marcapasos son dispositivos electrónicos sofisticados. Por lo tanto, algunos fabricantes dependen de proveedores externos para proporcionar muchos de los componentes. Las piezas componentes como la batería, los cables y los circuitos se construyen individualmente y luego se unen para formar el producto final.

Fabricación de la batería: El tipo de batería que se suele usar en los marcapasos es una célula de litio/yodo. Un método para fabricar estas baterías consiste en mezclar primero el yodo y un polímero como el poli(vinilpiridina). Se calientan juntos, formando un complejo fundido de transferencia de carga. Este líquido se vierte en una celda preformada en forma de media luna que contiene los otros componentes de la batería, como son el ánodo de litio (carga positiva) y una pantalla de colector del cátodo. La mezcla de yodo/polímero se solidifica a medida que se enfría para formar el cátodo. Después, la batería se sella herméticamente para evitar que entre humedad.

Fabricación de los cables: Los cables suelen estar compuestos de una aleación de metal. El cable se fabrica mediante un proceso de extrusión en el que el metal se calienta hasta que se funde y luego se empuja a través de una abertura de tamaño adecuado. Después, se corta y se empaqueta con muchos otros alambres para tratarlo con un aislante polimérico, como el poliuretano. Un extremo de los cables tiene forma de punta y el otro está equipado con un conector del marcapasos.

Fabricación de la placa base: La placa base contiene todos los circuitos eléctricos del marcapasos, incluidos los chips semiconductores, las resistencias, los condensadores, diodos y otros dispositivos. Mediante la hibridación, se combinan los diferentes componentes para formar un único circuito complejo.

Ensamblaje: Cuando todas las piezas del componente están disponibles se realiza el montaje final. El circuito se conecta a la batería y ambas se insertan en una carcasa de metal. La carcasa utilizada para el marcapasos normalmente se forma con titanio o alguna aleación de este. Se construye en varias piezas que se sellan después de introducir todos los componentes. También se coloca un conector en la carcasa, para proporcionar un punto de conexión con los cables.

Control de calidad

La calidad del marcapasos se garantiza mediante inspecciones visuales y eléctricas a lo largo de todo el proceso de producción. La funcionalidad de cada marcapasos terminado también se prueba antes de enviarla a los distribuidores. Muchas de estas pruebas se realizan en diferentes condiciones ambientales, como la humedad excesiva y el estrés, ya que los dispositivos deben ser absolutamente confiables.

Los fabricantes son los que establecen normalmente sus propios estándares de calidad para los dispositivos que producen. Sin embargo, hay organizaciones médicas y agencias gubernamentales que requieren estándares y recomendaciones de rendimiento. Como la clasificación MEDDEV, a la que se hace referencia en el apartado de normativa, o la Directiva 90/385/CEE que regula los productos sanitarios implantables activos.

2.3 HIDROGELES PARA EL RECUBRIMIENTO DEL DISPOSITIVO

Los hidrogeles han recibido mucha atención por su potencial uso en diferentes aplicaciones biomédicas. Un hidrogel es una red tridimensional formada por cadenas poliméricas entrecruzadas que se hinchan en un líquido. Cuando las cadenas que se forman son hidrofílicas

y el líquido es agua, se denomina hidrogel. La estructura de los hidrogeles puede darse por enlaces cruzados covalentes primarios, fuerzas iónicas, enlaces de hidrógeno, interacciones de afinidad o "bioreconocimiento", interacciones hidrofóbicas, cristalitos de polímero, enredos físicos de cadenas poliméricas individuales, o una combinación de dos o más de las interacciones anteriores [18].

Estos materiales se caracterizan por ser hidrófilos, insolubles en agua, blandos, elásticos y por hincharse en presencia de agua, manteniendo su forma, hasta alcanzar un equilibrio físico-químico [19]. En estado deshidratado (xerogel) son cristalinos.

La capacidad de adaptación de los hidrogeles sobre sustratos de diferentes materiales es una de sus principales propiedades. Además presentan compatibilidad con diferentes materiales, tienen propiedades mecánicas adecuadas enfocadas a diferentes aplicaciones como pueden ser la ortopedia, la cardiología y la oftalmología entre otras y, muestran una inalterabilidad frente a procesos propios, lo que los hace adecuados como materiales de recubrimiento en la industria biomédica.

Para la fabricación de hidrogeles se pueden utilizar diferentes polímeros naturales como colágeno, gelatina, fibrina, ácido hialurónico, heparina, alginatos, pectinas y quitosano, los cuales han sido utilizados en aplicaciones biomédicas.

2.3.1 Técnica de fabricación de los hidrogeles

Los hidrogeles reticulados covalentemente se preparan juntando pequeñas moléculas multifuncionales como monómeros u oligómeros, que reaccionan formando una estructura de red. A veces, moléculas de polímeros grandes pueden estar entrecruzadas con estas mismas moléculas pequeñas. Esta reticulación puede llevarse a cabo con la reacción de dos grupos químicos, que puede iniciarse mediante catalizadores, fotopolimerización o mediante radiación [18].

Muchos de los métodos para formar hidrogeles se basan en la reacción de radicales libres, moléculas inestables con enlaces débiles. Un primer ejemplo implicaría una reacción de copolimerización-entrecruzada entre uno o más monómeros y un monómero multifuncional presente en pequeñas cantidades. En otro método relacionado, dos polímeros solubles en agua pueden entrecruzarse (figura 4), mediante la formación de radicales libres que se combinan.

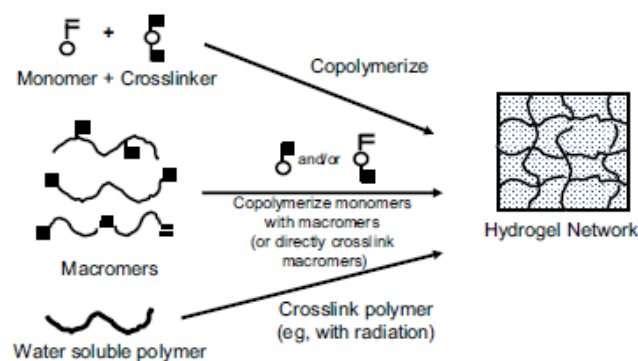


Figura 4: Síntesis de hidrogeles por la polimerización de radicales libres y entrecruzamiento [18]

A estas reacciones se les llama polimerización por radicales libres o reacción de reticulación (o entrecruzamiento), y pueden llevarse a cabo por descomposición de peróxidos o compuestos azoicos, usando radiación ionizante, o luz UV.

Los métodos de radiación ionizante utilizan haces de electrones, rayos gamma o rayos X para excitar un polímero y generar una estructura reticulada mediante la unión de radicales libres. Estas reacciones de radicales libres pueden formar una red tridimensional de forma rápida, generalmente hay que llevarlas a cabo en ausencia de oxígeno o aire, ya que algunos polímeros se pueden degradar con la radiación en presencia de aire.

En un segundo ejemplo, la reticulación química requiere de una reacción directa entre un polímero lineal o ramificado y un agente bifuncional o multifuncional, de peso molecular pequeño. Este agente normalmente une dos cadenas de mayor peso molecular mediante sus grupos bi- o multifuncionales (figura 5a).

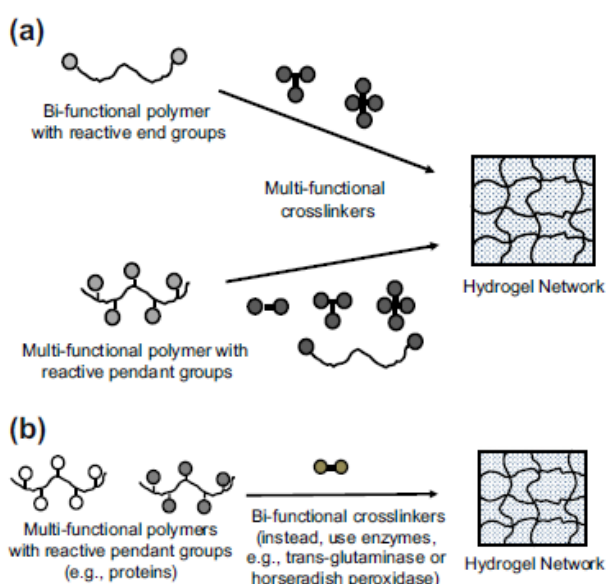


Figura 5: a) Síntesis de un hidrogel mediante polímeros entrecruzados con reticulación multifuncional. b) Síntesis de un hidrogel mediante la reticulación de polímeros multifuncionales con moléculas bifuncionales pequeñas [18]

Existen una serie de reacciones que se pueden usar para unir polímeros hidrofílicos entre sí o con reticulantes y formar hidrogel, incluidos algunos métodos recientes con creciente popularidad, tales como la adición de Michael de compuestos de ditioles con compuestos de divinilo [20] y la reacción de alquinos con azidas para formar triazoles. Estos métodos se detallan en el libro *Bioconjugate Techniques* [21].

Se llevan a cabo reacciones similares entre moléculas bifuncionales pequeñas y cadenas poliméricas lineales con grupos reactivos o terminales colgantes, -OH, -NH₂, NCO o -COOH, que se entrecruzan con la molécula bifuncional (figura 5b). Los polímeros naturales, como las proteínas, también se pueden unir de forma similar mediante el uso de enzimas.

La formación de redes de hidrogel también puede darse por interacciones fisicoquímicas [18]. La figura 6 muestra la formación de un hidrogel con red interpenetrante (IPN). La figura 7 muestra cómo se forman hidrogel mediante una interacción iónica y en la figura 8 se puede

ver cómo los hidrogeles pueden formarse mediante reacciones de reconocimiento por afinidad.

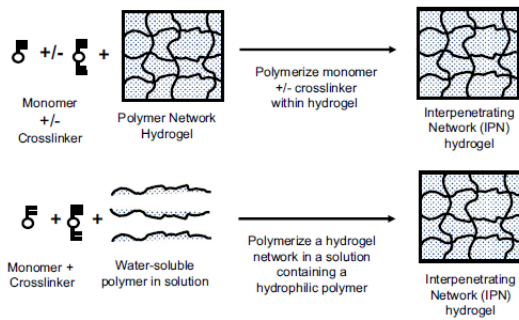


Figura 6: Dos métodos para formar un hidrogel de red interpenetrante (IPN) [18]

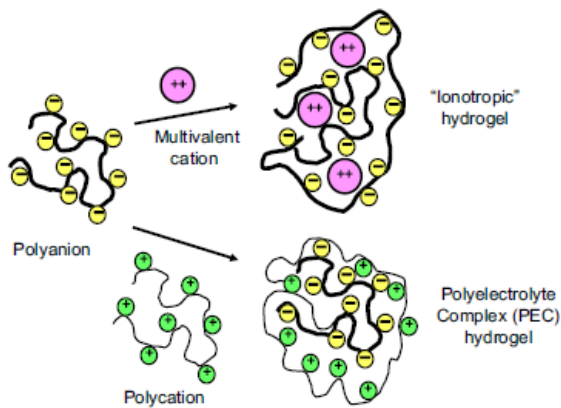


Figura 7: Formación de hidrogeles iónicos [18]

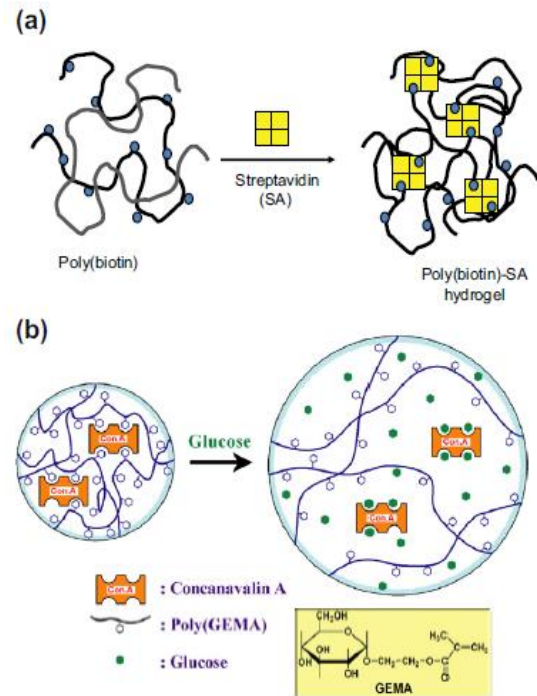


Figura 8: a) Formación de un hidrogel por afinidad entre polibiotina y estreptavidina. b) El hidrogel sensible a la glucosa se hincha cuando la glucosa libre compite con los grupos de glucosa poliméricos en un hidrogel GEMA (glucosyloxethyl methacrylate) [18]

2.4 TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL RECUBRIMIENTO DE DISPOSITIVOS IMPLANTABLES

2.4.1 Razones y métodos para la modificación superficial

Las propiedades de los materiales medibles, así como su inocuidad, su resistencia a la corrosión o la degradabilidad controlada, su módulo de elasticidad y la resistencia a la fatiga, son ampliamente reconocidas y muy relevantes a la hora de seleccionar un material para cada aplicación biomédica específica. Tras la implantación, existirá una interacción entre el entorno biológico y la superficie del material artificial.

La superficie del material tendrá un papel importante en esta respuesta. Los implantes de titanio, tras su fabricación, generalmente tienen una superficie contaminada con una capa de óxido que a menudo está deformada, no es uniforme y está bastante poco definida. Estas superficies no son apropiadas para las aplicaciones biomédicas y es obligatorio llevar a cabo tratamientos de modificación [22]. Otra de las razones importantes para llevar a cabo la modificación de la superficie de los dispositivos médicos de titanio es, que en muchos casos, se requieren propiedades específicas diferentes para cada aplicación. Por ejemplo para los

aparatos que entren en contacto con la sangre, como son las válvulas artificiales del corazón, la compatibilidad con la sangre es crucial. De acuerdo con las diferentes necesidades médicas, a continuación se muestran diferentes métodos para la modificación de superficies, resumidos en la tabla 3.

Métodos mecánicos

Los métodos mecánicos más comunes para la modificación de superficies suponen tratamientos físicos, de moldeo, o extracción de material. El objetivo de esta modificación suele ser obtener una topografía o una rugosidad específica de la superficie, extraer la contaminación de la superficie, y/o mejorar la adherencia para los siguientes pasos.

Métodos químicos

Existen diferentes métodos para modificar químicamente las superficies. Entre ellos destacan los tratamientos ácidos, básicos u oxidativos, los tratamientos electroquímicos, procesos sol-gel, la deposición química en fase vapor (CVD) así como la modificación bioquímica de superficies. Durante los tratamientos químicos, el tratamiento electroquímico y la modificación bioquímica se dan reacciones en la interfase entre el titanio y la disolución. La deposición química por vapor es un proceso donde los productos químicos en fase gaseosa reaccionan químicamente con la superficie de la muestra, dando como resultado la formación de un compuesto no volátil sobre el sustrato. Por el contrario, en el proceso sol-gel, las reacciones químicas no ocurren en la interfase entre la superficie de la muestra y la disolución o el gel, sino en la disolución.

Métodos físicos

En algunos procesos de modificación, como en la pulverización térmica y en la deposición física de vapor, no suceden reacciones químicas. En estos casos, la modificación de la capa superficial, o la formación de un recubrimiento en el titanio o sus aleaciones sucede como consecuencia de la energía térmica, cinética y eléctrica.

En los siguientes puntos se describe el estado del arte de la metodología empleada en este proyecto, la formación de monocapas. La información se centra en el tratamiento ácido y la técnica mencionada realizada sobre la aleación de titanio grado 5, ya que los dispositivos de estimulación cardíaca, en su mayoría, están fabricados con este material.

Métodos de modificación de la superficie	Capa modificada	Objetivo
Métodos mecánicos		
Machining	Con un proceso de sustracción, se consiguen superficies ásperas o lisas	Producir topografías superficiales específicas; limpiar y raspar la superficie; mejorar la adhesión en unión
Grinding		
Polishing		
Blasting		
Métodos químicos		
Tratamientos químicos		
Tratamiento ácido	< 10nm de capa de óxido en la superficie	Quita el óxido y la contaminación
Tratamiento alcalino	~ 1µm gel de titanato de sodio	Mejora la biocompatibilidad, bioactividad o la conductividad del hueso

Tratamiento de peróxido de hidrogeno	~5nm de óxido interno denso y capa externa porosa	Mejora la biocompatibilidad, bioactividad o la conductividad del hueso
Sol Gel	Film de ~10 µm, como fosfato de calcio, TiO ₂ y silica	Mejora la biocompatibilidad, bioactividad o la conductividad del hueso
Oxidación anódica	De ~10nm a 40 µm de capa de TiO ₂ , absorción e incorporación de aniones electrolíticos	Produce topografías superficiales específicas; mejora la resistencia a la corrosión; mejora la biocompatibilidad, bioactividad o la conductividad del hueso
CVD (deposición química de vapor)	~ 1µm, una película delgada de TiN, TiC, TiCN, diamante y carbono tipo diamante	Mejora la resistencia al desgaste, la resistencia a la corrosión y la compatibilidad con la sangre
Métodos bioquímicos	Modificación a través de titania silanizada, fotoquímica, monocapas autoensambladas, resistencia a proteínas, etc.	Inducir respuesta celular y tisular específica por medio de péptidos, proteínas o factores de crecimiento inmovilizados en la superficie
Métodos físicos		
Pulverizador (spray) térmico	Capas de ~30 a 200 µm, de titanio, HA, silicato de calcio, Al ₂ O ₃ , ZrO ₂ , TiO ₂	Mejora la resistencia al desgaste, la resistencia a la corrosión y las propiedades biológicas
Flame spray		
Plasma spray		
HVOF		
DGUN		
PVD (deposición física de vapor)	~ 1µm, una película delgada de TiN, TiC, TiCN, diamante y carbono tipo diamante	Mejora la resistencia al desgaste, la resistencia a la corrosión y la compatibilidad con la sangre
Evaporation		
Ion plating		
Sputtering		
Deposición e implantación iónica	Capa de superficie modificada de ~10nm y/o una película delgada de ~1µm	Modifica la composición de la superficie; mejora el desgaste, la resistencia a la corrosión y la biocompatibilidad
Por haz de iones		
Por inmersión en plasma (PIII)		
Tratamiento de plasma con descarga luminiscente	Capa de superficie modificada de ~1nm a ~100nm	Limpiar, esterilizar, oxidar, superficie de nitruro; eliminar la capa de óxido nativo

Tabla 3: Resumen de los métodos de modificación de la superficie de los implantes de titanio y sus aleaciones

2.4.2 Tratamiento químico ácido

El tratamiento ácido se suele usar para eliminar la contaminación de la superficie y conseguir limpiarla y uniformizarla. El uso de diferentes ácido es frecuente en el pre-tratamiento del titanio. Este proceso suele crear una delgada capa superficial de óxido (<10nm), proceso conocido como etching. El óxido que se crea es predominantemente TiO₂, pero pueden quedarse unidos residuos de la solución ácida, los que pueden permanecer incluso después de un tratamiento térmico. Algunos tratamientos conducen a la incorporación de hidrógeno en la superficie, junto al óxido, lo que mejora las propiedades bioactivas del titanio y sus aleaciones [22].

2.4.3 Técnica de deposición sobre metal

En este trabajo la técnica de deposición va destinada a la elaboración de recubrimientos en un sustrato metálico, el titanio. De este modo se va a lograr por un lado, la protección del metal y,

por otro lado, modificar las propiedades de los implantes para la aplicación a la que van destinados.

En cuanto a las técnicas de fabricación, hay varias opciones de deposición tales como el dip-coating (recubrimiento por inmersión), el flow-coating (recubrimiento por flujo), el drop-coating (recubrimiento por goteo) o el spin-coating (recubrimiento por giro a alta velocidad), que se explican a continuación [19][23].

Técnica dip-coating: Es un proceso con una precisión controlada de inmersión y extracción de cualquier sustrato en la disolución a aplicar durante un tiempo determinado, con el fin de depositar una capa de material. Tanto las velocidades de bajada del sustrato como las de subida están determinadas por el usuario y con ello se consigue el grosor final de la capa depositada (figura 9).

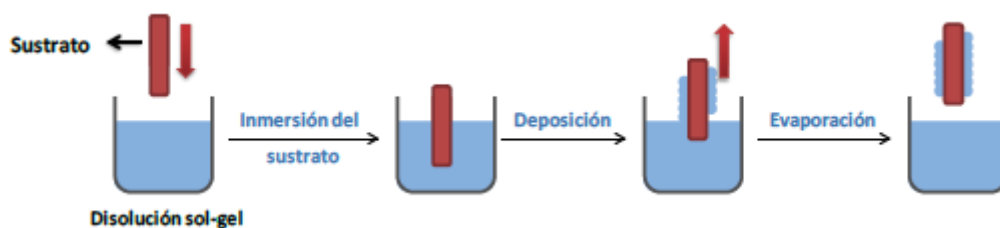


Figura 9: Técnica de deposición dip-coating [23]

Técnica flow-coating: Esta técnica se basa en verter la disolución a aplicar sobre el sustrato que se quiere recubrir mediante una pipeta Pasteur de forma continua. Este proceso se repite tres veces para asegurar que todo el sustrato ha sido recubierto (figura 10).

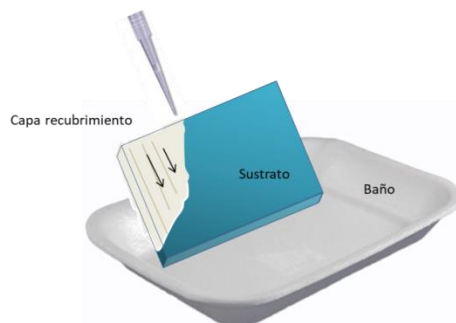


Figura 10: Técnica de deposición flow-coating

Técnica drop-coating: Consiste en depositar una cantidad de sol, previamente medida por el usuario, sobre el sustrato. Es importante tratar de expandir homogéneamente el sol por toda la superficie y evitar que se pierda material (figura 11).

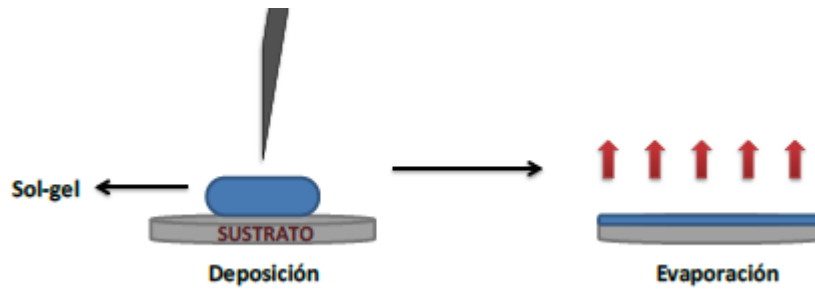


Figura 11: Técnica de deposición drop-coating [23]

Técnica Spin-coating: Esta técnica consiste en depositar un exceso del material de interés sobre el centro del sustrato; posteriormente, este se hace girar a alta velocidad para lograr una distribución uniforme del material. Dos fuerzas entran en juego en este procedimiento, la fuerza centrífuga, que permite al líquido fluir hacia fuera y la fuerza de resistencia por la viscosidad, la cual actúa hacia dentro, dejando una película delgada de sol-gel sobre la superficie (figura 12).

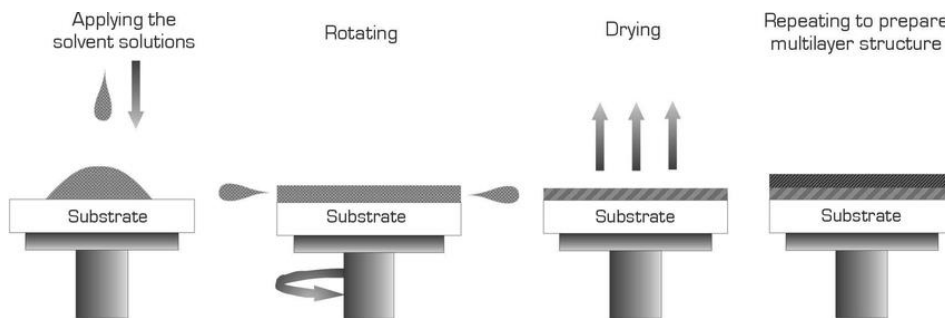


Figura 12: Técnica de deposición spin-coating [24]

El estado final y el espesor de los recubrimientos dependerán de los siguientes factores:

- La superficie del sustrato inicial
- El tiempo que se establece para cada proceso
- La velocidad con la que se lleva a cabo cada proceso
- El número de ciclos
- Composición de la solución
- Concentración de material sólido en gel
- Composición química de los precursores utilizados en la preparación del gel
- La temperatura de densificación del gel
- El número de soluciones en cada secuencia
- La humedad ambiente

Con las técnicas descritas es posible la aplicación de recubrimientos multicapas, repitiendo el proceso realizado para la aplicación de una monocapa en el sustrato. Se han obtenido recubrimientos de diferentes composiciones con espesores entre 0,02 y 1 μm [25].

2.5 SELF ASSEMBLED MONOLAYER (SAMs)

Las monocapas autoensambladas son finos recubrimientos creados sobre la superficie de un sustrato de forma ordenada (figura 13). Las moléculas que forman la monocapa, en el caso que nos ocupa, tienen una funcionalidad química en un extremo (llamado grupo de cabeza) con una afinidad química específica hacia un determinado sustrato. La molécula del otro extremo de la cadena (denominada grupo de cola) tendrá otra funcionalidad química, y determinará las características de la superficie del sistema y la posibilidad de cualquier modificación adicional de la superficie.

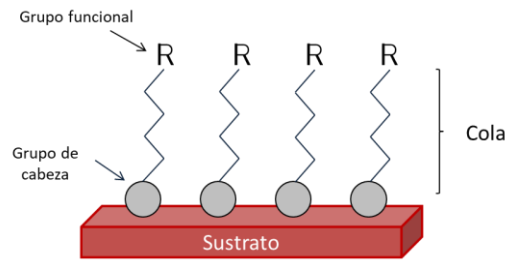


Figura 13: Esquema de una monocapa

Mediante la técnica empleada, dip-coating y drop-coating en este caso, la solución que contiene las moléculas de tensioactivo requeridas y el sustrato se ponen en contacto. Después de un periodo de tiempo específico se observará una monocapa ordenada, con buena simetría bidimensional sobre el sustrato. El autoensamblaje de las monocapas se realiza por adsorción espontánea. Tanto el grupo de cabeza como el grupo de cola se pueden adaptar para aplicaciones específicas [26].

Los SAM en sustratos de óxido metálico son habituales, ya que se genera una fuerte unión entre la formación de capas estables. Los elementos más utilizados para crear las capas son los silanos y los fosfonatos, ya que se unen bien a los sustratos de óxido metálico. En este caso, las moléculas tensioactivas que se han utilizado para formar la SAM de silano han sido los epoxisilanos.

2.5.1 Monocapas con Silano

La modificación de superficies con silanos es uno de los métodos más comunes para realizar monocapas en superficies oxidadas [27]. La reacción de silanos con superficies portadoras de iones hidroxilo ($-OH$) (figura 14), han encontrado uso en áreas muy diversas.

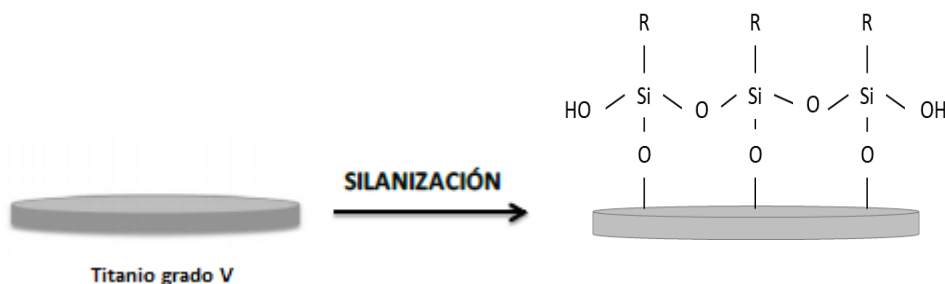


Figura 14: Diagrama del proceso de silanización [16]

La principal ventaja de usar silanos en la formación de monocapas, sobre superficies oxidadas, es la rápida formación de un enlace covalente entre el sustrato y el grupo de anclaje. Este enlace covalente estabiliza la monocapa y permite una modificación química más sencilla, sin comprometer la integridad de la monocapa. Las propiedades de esta capa dependen de su composición química, el grosor, la orientación y el orden lateral de las cadenas R (Figura 13).

La modificación química de superficies con silanos puede producirse en disolución o en fase gaseosa. Los factores críticos de las reacciones en disolución, son la temperatura (generalmente temperatura ambiente), la viscosidad, la polaridad del solvente, y la cantidad de agua utilizada en el medio líquido para hidrolizar las moléculas de silano. Para las modificaciones en fase de vapor, la superficie se expone al silano durante horas o días a una temperatura elevada (50-120°C) [27]. Aunque para reducir el tiempo de reacción, se pueden utilizar clorosilanos y metoxisilanos, como agentes formadores de monocapas altamente reactivos y moderadamente reactivos, respectivamente.

Bajo las condiciones de vapor se forman monocapas más homogéneas que bajo las condiciones de disolución. En el mecanismo de reacción, el número de grupos reactivos del silano es clave, siendo muy atractivos, en términos de reproducibilidad, los organosilanos monofuncionales (con un solo grupo hidrolizante) [28].

Formación de monocapas de silano por disolución

La forma más reproducible y rápida (segundos a minutos) para obtener SAMs de silano es la inmersión de un sustrato polar, limpio, recién preparado en una solución milimolar, formada por un precursor triclorosilano de cola larga disuelto en biciclohexano purificado ($C_6H_{11}-C_6H_{11}$) [29].

En la solución, los silanos se hidrolizan con agua generando silanoles (reacción de hidrolisis), antes de unirse a la superficie hidroxilada con un enlace covalente. Normalmente es necesario utilizar solventes anhídridos con el triclorosilano, aunque la presencia de agua absorbida en la superficie es importante para conseguir una monocapa uniforme y libre de agregados. Hay que tener en cuenta que cuando el contenido de agua es muy bajo se forman monocapas incompletas, aunque demasiada agua en la superficie tampoco es adecuada (figura 15), ya que se difundirá en la disolución al entrar en contacto provocando la polimerización del silano [30]. La concentración óptima de agua estimada es 0.15 mg de agua por cada 100 ml de solvente [27].

La longitud de la cadena del resto alquilo es otro de los factores que influye en la calidad de la monocapa, y tanto el calentamiento posterior a la formación como el preanclaje del óxido de silicio (SiO_2) generan mejoras en la capa, además de un menor número de sitios sin reaccionar.

Formación de monocapas de silano por vapor

En muchos casos las capas generadas en fase de disolución muestran irregularidades morfológicas, lo que limita sus aplicaciones tecnológicas. La deposición química en fase de vapor (CVD) es una alternativa. Esta técnica consiste en la reacción de una mezcla de gases en el interior de una cámara de vacío (reactor) para dar lugar a la formación de un material en

forma de capa delgada. En este caso, se da una menor formación de oligómeros de siloxano, además de una menor contaminación de la superficie por partículas [27]. Es un método altamente eficaz y reproducible para producir monocapas de alta calidad.

Proceso de formación de la monocapa de silano

Partiendo de un silano tipo RSiX_3 la formación de monocapas se puede dividir en tres pasos.

1. Los organosilanos son hidrolizados por moléculas de agua que ya están adsorbidas en la superficie de óxido, para crear el hidroxilano correspondiente (normalmente R-Si(OH)_3).
Este paso es el más crítico y controla la calidad final y la morfología de la SAM, ya que la hidrólisis incompleta o la hidrólisis excesiva dan como resultado monocapas incompletas o formación de polisiloxanos en la superficie.
2. Los hidroxilanos están unidos a la superficie, pero mantienen una movilidad lateral por esta, por lo que se crea un orden lateral. Esto produce agregaciones por fuerzas de Van der Waals entre las cadenas alquílicas, interacciones dipolo-dipolo y los enlaces de hidrógeno. Una vez agregadas, se vuelven significativamente menos móviles.
3. Finalmente, ocurre una condensación entre los grupos Si-OH para formar enlaces Si-O-Si , no sólo con los grupos $-\text{OH}$ de la superficie, también entre los grupos silano, mediante enlaces covalentes.

Si la densidad de grupos $-\text{OH}$ en la superficie es pequeña, se puede activar con plasma.

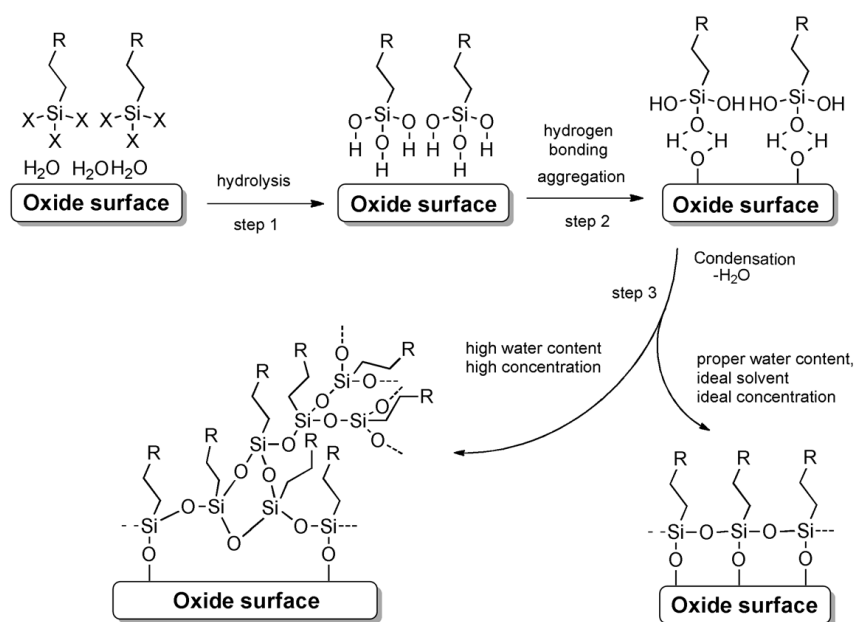


Figura 15: Mecanismo de tres pasos para formar la monocapa de silano en superficies con $-\text{OH}$ [27]

2.6 METODOS DE CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL

La caracterización tiene como finalidad conocer tanto cualitativa como cuantitativamente la constitución de la superficie y las transformaciones que sufre como consecuencia de diferentes

tratamientos [31]. En este apartado se describen las técnicas más habituales, pero no todas han sido usadas en la experimentación de este trabajo.

Existe una amplia variedad de técnicas para realizar una caracterización superficial, y diferentes formas de clasificación. La clasificación realizada en este trabajo es la siguiente: caracterización térmica, caracterización morfológica y caracterización química.

2.6.1 Caracterización térmica

Los métodos de análisis térmico engloban una serie de técnicas en las que se mide una propiedad física en función de la temperatura. Los efectos del calor sobre los materiales pueden ser variados (fusión, cristalización, transición vítrea, ...) y pueden producir cambios en muchas de sus propiedades.

En la caracterización térmica se distinguen principalmente dos tipos de análisis: aquellos que estudian cambios de peso, indicando si una muestra pierde o gana peso, y los que estudian cambios energéticos, que muestran si una reacción o cambio físico son exotérmicos o endotérmicos (e incluso la variación de calor). A continuación se describen dos técnicas de análisis, una de cada tipo [32].

Análisis termogravimétrico (TGA)

Esta técnica consiste en registrar de manera continua la variación de la masa de una muestra alojada en una atmósfera controlada (normalmente de N_2), ya sea en función de la temperatura, o en función del tiempo [32], en la figura 16 se muestran las curvas de pérdida de peso (TG) y la derivada de pérdida de peso (dTG) de tres muestras MTMOS:GOPTS con diferentes concentraciones. Aporta información acerca de la estabilidad térmica y de la composición de los materiales a estudiar [33].

Si la temperatura de la muestra va aumentando de manera controlada, normalmente de forma lineal con el tiempo, se habla de experimento dinámico. Si la temperatura se mantiene constante durante todo el experimento se trata de un experimento isoterma. Los datos obtenidos de la variación de la masa se representan en función del tiempo o de la temperatura y se denomina termograma o curva de descomposición térmica [32].

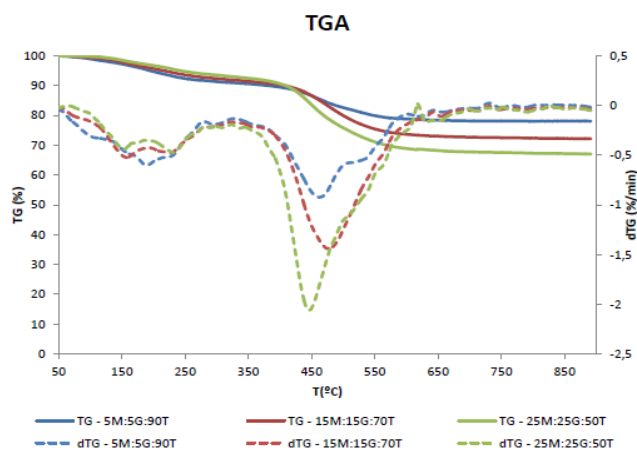


Figura 16: Ejemplo del resultado de un análisis termogravimétrico [19]

Calorimetría de barrido diferencial (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica que nos permite analizar qué le ocurre al material cuando es calentado, y permite estudiar sus transiciones térmicas. Mediante esta técnica se puede determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia, cuando es mantenida a temperatura constante, durante un tiempo determinado o cuando es calentada o enfriada a velocidad constante, en un determinado intervalo de temperaturas.

El equipo dispone de dos cápsulas, como se ve en la figura 17: una de ellas contiene la muestra a analizar y la otra está generalmente vacía, y se la conoce como cápsula de referencia. Se usan calefactores individuales para cada cápsula y un sistema de control comprueba si se producen diferencias de temperatura entre ambas. El objetivo es que la temperatura de la muestra y de la referencia sea la misma. Por lo que, si el material a estudiar experimenta un proceso exotérmico o endotérmico, el calefactor individual se corregirá para que la temperatura en ambas capsulas se mantenga igual [34].

Determinando la diferencia de flujo calorífico que se da en cada transformación fisiológica el DSC es capaz de medir la cantidad de calor que la muestra absorbe o elimina, así como identificar a qué temperatura se producen [32]. Se puede decir que todas las transformaciones o reacciones donde se produce un cambio de energía pueden ser medidas por el DSC [34].

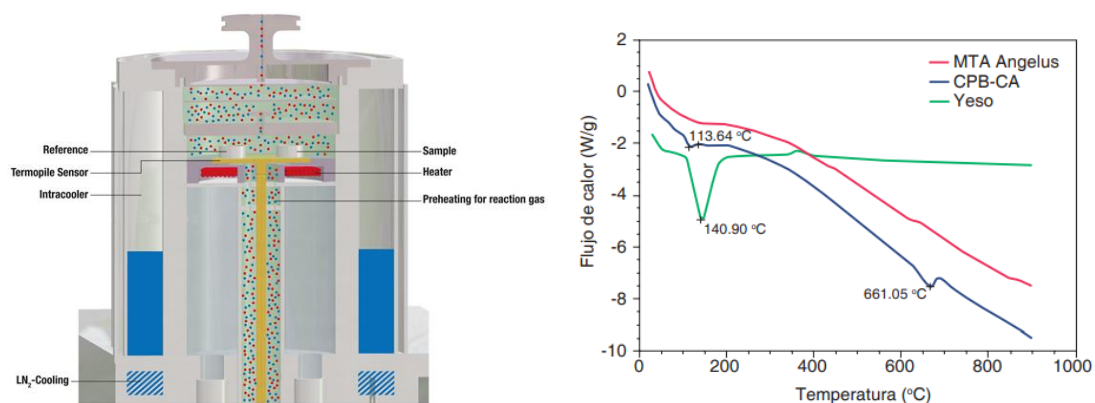


Figura 17: a) esquema de un calorímetro y b) Ejemplo de resultados de una caracterización por DSC [35]

En el resultado obtenido, se observan unos picos, estos picos se identifican como exotérmicos o endotérmicos y por lo tanto se pueden identificar las diferentes transiciones del material. La forma y tamaño de los picos nos da indicaciones sobre las propiedades del material, así como la homogeneidad o el grado de entrecruzamiento.

2.6.2 Caracterización estructural y morfológica

Difracción de Rayos X (DRX)

La difracción de rayos X proporciona información cualitativa y cuantitativa sobre los compuestos cristalinos presentes en un sólido, basándose en el hecho de que cada sustancia cristalina presenta un diagrama de difracción único. Siendo así, se comparan un diagrama de una muestra desconocida y el de una muestra patrón, y se determina su identidad y composición química.

La técnica consiste en hacer incidir un haz de rayos X sobre la muestra que se quiere estudiar. La incidencia entre el vector eléctrico de la radiación X y los electrones de la materia que atraviesa dan lugar a una dispersión. Al producirse la dispersión tienen lugar interferencias (constructivas y destructivas) entre los rayos dispersados, ya que las distancias entre los centros de dispersión son del mismo orden de magnitud que la longitud de onda de la radiación. El resultado es la difracción, que da lugar a un patrón de intensidades que puede interpretarse según la ubicación de los átomos en el cristal, por medio de la ley de Bragg.

Esta ley dice que cuando un haz de rayos X incide sobre la superficie de un cristal formando un ángulo θ una parte del haz es dispersada por la capa de átomos de la superficie y la otra parte penetra a la segunda capa de átomos donde, nuevamente una fracción es dispersada y así sucesivamente.

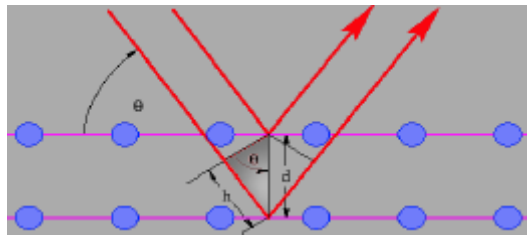


Figura 18: Diagrama esquemático de la ley de Bragg [34]

Para que se dé una buena difracción de rayos X, el espaciado entre las capas de átomos tiene que ser aproximadamente el mismo que la longitud de onda de la radiación y, los centros de dispersión tienen que estar regularmente distribuidos en el espacio [31].

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Esta técnica se emplea para estudiar la morfología de la superficie de las muestras. Se basa en un haz de electrones que incide sobre la superficie a analizar, originando un haz de electrones secundarios que tratados adecuadamente dan lugar a la imagen que se obtiene de la superficie [24], se puede ver un ejemplo en la figura 19, las imágenes obtenidas con un tornillo.

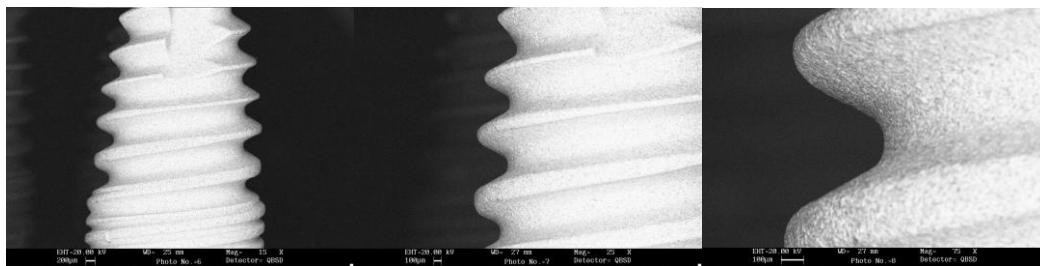


Figura 19: Imagen de SEM de un implante dental de titanio granallado superficialmente [19]

El haz realiza un barrido coordinado, punto por punto, generando diferentes tipos de señales que permiten obtener información morfológica de la muestra estudiada. Lo que permite realizar imágenes de gran resolución y examinar detenidamente las muestras. Existen diferentes métodos para realizar esta técnica, pero el más común es el emisor, en el cual, una corriente de electrones monocromáticos se produce en una pistola de electrones (normalmente compuesta por un filamento de tungsteno) y se concentra mediante una lente

magnética. Después, el haz de electrones pasa a través de unas bobinas de escaneo que deflecan el haz horizontalmente de modo que el rayo escanea toda la superficie de la muestra. Toda la columna y el compartimento donde se sitúa el material deben estar en el vacío siempre que esté en uso, para producir un haz de electrones estable y evitar la presencia de otras moléculas.

Cuando el haz de electrones bombardea la superficie de la muestra, se producen amplias categorías de dispersión de electrones que se definen como elásticos e inelásticos [36]. La dispersión elástica ocurre cuando la trayectoria del electrón se altera, pero la energía cinética no varía. Este fenómeno da como resultado una retrodispersión de los electrones incidentes proporcionando información química de la muestra analizada, ya que cuanto mayor es la retrodispersión mayor es el número atómico. Por lo tanto, se pueden detectar diferentes composiciones químicas observando los electrones retrodispersados, pero no se puede identificar el elemento químico (las zonas más brillantes indican más electrones retrodispersados y, por lo tanto, un número atómico mayor).

Cuando la dispersión que se produce es no-elástica, parte de la energía del electrón se transfiere al átomo de la superficie generando electrones secundarios por el efecto fotoeléctrico. Estos electrones secundarios son recogidos por el detector proporcionando información topográfica de la superficie. Este proceso de detección se repite punto por punto a lo largo del escaneo.

Las muestras analizadas deben ser conductoras eléctricas. En caso de no serlo, deberían ser recubiertas con una fina capa de carbono o de algún metal como platino u oro para convertirlas en conductoras [23] [33].

Ensayo de adherencia

La adherencia de los recubrimientos al sustrato metálico se mide mediante el ensayo de corte por enrejado. Este método consiste en someter las muestras que se quieren analizar a cortes cruzados y perpendiculares con una cuchilla, con una separación entre cortes de 2mm. A continuación, se cubre con una cinta adhesiva la zona de los cortes y se tira de ella con un movimiento rápido.

Dependiendo del posible desprendimiento de los cortes, se establece una clasificación entre 0 y 5 (figura 20). El 0 se asigna al área cuadrículada que no presenta alteración y el 5 a desprendimientos de película superiores al 65%. Se requiere de un microscopio para observar el resultado de forma adecuada.

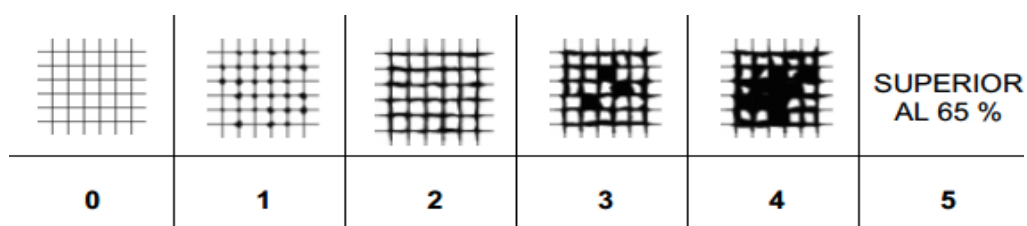


Figura 20: Clasificación del ensayo de corte-enrejado según la norma ISO 2409 [23]

2.6.3 Caracterización química

Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarroja es una de las técnicas más utilizadas en el análisis de materiales, puesto que su resultado está directamente relacionado con la estructura molecular y la composición del material a estudiar. Esta técnica se basa en el intercambio de energía entre la materia y las diferentes regiones del espectro electromagnético.

Al ser irradiados con un haz de luz infrarroja, la cual hace un barrido desde los números de onda comprendidos entre 4000 cm^{-1} y 600 cm^{-1} , los enlaces entre los átomos se excitan generando modos de vibración. Cada molécula, según las características de sus enlaces, absorberá radiación de una o varias longitudes de onda específicas [31]. Así la absorción de radiación que realiza el sustrato indica los tipos de enlaces y grupos funcionales que se encuentran presentes en él, por lo tanto la información que proporciona un espectro de infrarrojo es característica de cada uno [37]. A continuación, en la figura 21, se observa el espectro obtenido con un análisis de vapor de agua.

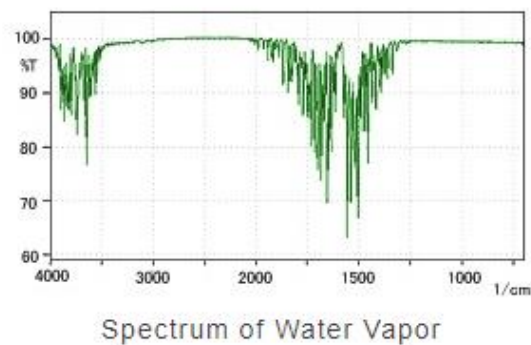


Figura 21: Ejemplo del resultado de una caracterización por FTIR [38]

Los espectrofotómetros infrarrojos son del tipo de transformada de Fourier (FTIR), basados en el principio de interferómetro de Michelson. Un espectrómetro FTIR simultáneamente recoge los datos espectrales en un amplio rango espectral, mientras que los espectrómetros dispersivos miden la intensidad en un intervalo estrecho de longitudes de onda a la vez. En FTIR la salida analógica del detector es amplificada y transformada en una señal digital. Este interferograma digital se trata numéricamente, mediante una transformada de Fourier, para dar lugar al espectro [25].

Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS)

La espectroscopia de electrones para el análisis químico proporciona información tanto cuantitativa como cualitativa de los elementos presentes en la muestra. Ya que informa sobre la composición atómica y también sobre la estructura y el grado de oxidación de los elementos que forman la superficie que se está analizando [31].

Esta técnica se basa en el efecto fotoeléctrico. Cuando los átomos de la superficie son excitados por el haz de fotones, y la frecuencia de excitación de éste es adecuada, un fotón

interacciona con un electrón de un orbital atómico dándose una transferencia total de la energía del fotón hacia el electrón, causando la excitación de este electrón del átomo. La técnica XPS es superficial, informa sobre tres o cuatro capas de átomos de la superficie de la muestra.

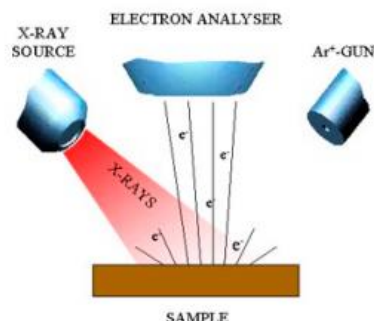


Figura 22: Superficie irradiada con una fuente de fotones de alta energía que provoca la emisión de electrones

Todos los elementos excepto el hidrógeno y el helio emiten electrones internos que tienen energías de enlace características. Normalmente un espectro general abarca un intervalo de energías cinéticas desde 250 a 1500 eV, que corresponde a una energía de enlace de entre 0 y 1250 eV. Cada elemento de la tabla periódica tiene uno o más niveles de energía que dan lugar a la aparición de picos en esta región.

2.6.4 Caracterización físico-química

Ángulo de contacto

Mediante el ángulo de contacto se determina el grado de hidrofilia/hidrofobia de la superficie. Esta propiedad es importante conocerla, puesto que tiene gran influencia en la adherencia celular [33]. Está directamente relacionada con la capacidad de adhesión de las células a la superficie del sustrato y a su proliferación. Además, teniendo en cuenta que los recubrimientos desarrollados estarán en contacto con el medio fisiológico, cuya mayor parte es agua, esta medida dará una idea de la capacidad de absorción de la superficie, que influirá en su posible degradación hidrolítica [23].

Es una medida cuantitativa de la mojabilidad de una superficie sólida por un líquido. El ángulo de contacto se puede definir como el ángulo formado entre la superficie del líquido y la superficie sólida cuando ambos entran en contacto [39].

Este estudio se realiza mediante el uso de un goniómetro. Se considera una superficie hidrófoba a aquella en la que el ángulo de contacto entre la gota y la superficie es mayor que 90°, y se considera una superficie hidrófila si el ángulo de contacto es menor de 90° (figura 23). Se da una humectación completa cuando el ángulo es igual a 0°.

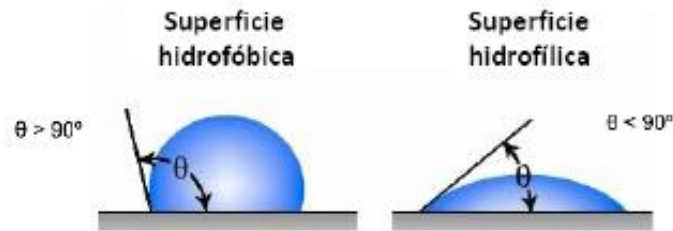


Figura 23: Ángulo de contacto de una superficie hidrofóbica y otra hidrofílica [23]

Los ensayos pueden ser realizados a temperatura ambiente, teniendo en cuenta que el volumen de cada muestra tiene que ser constante y que por cada gota se obtienen dos medidas, ya que se mide tanto el ángulo del lado derecho como el del izquierdo. Para obtener un resultado final se realiza una media con todas las medidas obtenidas.

2.7 INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA

Para poder desarrollar un producto final adecuado para el usuario, en este caso el equipo médico, es importante conocer su proceso de trabajo y su forma de tratar con el producto. Para ello, a continuación se describe la cirugía de implantación de un dispositivo médico cardíaco.

La implantación de un dispositivo de estimulación cardíaca, en la actualidad, se realiza por vía endocavitaria en la mayoría de los pacientes [40]. De este modo se disminuye la mortalidad y no se precisa de anestesia general.

El electrofisiólogo que realiza la operación iniciará la misma infiltrando la región infraclavicular, hombro, hemitórax y zona axilar homolateral con anestésico local y, tras unos minutos de espera, procede a iniciar el acceso venoso mediante la punción de la vena subclavia o la disección de vena cefálica [41].

La elección del acceso realizado en cada cirugía la tomará el cirujano en función de las características del paciente. Para un acceso por la vena subclavia, se realiza una incisión de 5 a 8 cm, paralela a 2 cm de la clavícula hasta llegar a la fascia pectoral, donde se realiza el bolsillo para el generador (figura 24). Una vez que se localiza la vena subclavia, el cirujano, con la ayuda de una jeringa introduce una guía metálica y posteriormente el introductor, comprobando mediante fluoroscopia que la parte distal está en vena cava descendente. Después, tras retirar la guía, introduce el electrodo mediante técnica de Seldinger hasta la aurícula derecha.

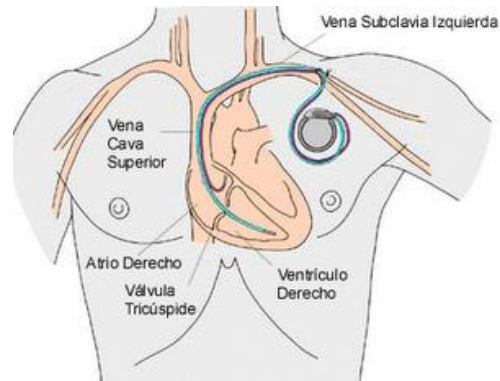


Figura 24: Acceso venoso mediante la punción de la vena subclavia

Si se realiza una disección por vena cefálica, situada en el surco delto-pectoral, la incisión se hace a nivel de la coroides de 2 a 5cm (figura 25). Con ayuda del separador Withlander y del bisturí, se llega a la superficie de la fascia pectoral, donde se identifican los bordes de los músculos pectorales y deltoides y, se localiza la vena cefálica. En la vena se realiza una incisión horizontal con unas tijeras finas, tipo iris, por la cual se introduce la guía del introductor y, posteriormente, el electrocatéter con la ayuda del fluoroscopio.

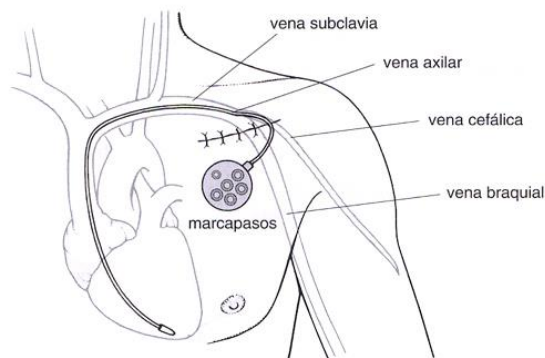


Figura 25: Acceso mediante la punción de la vena cefálica

La elección del tipo de electrodo y su posición estará determinada en el informe médico. La técnica de emplazamiento definitivo dependerá del electrofisiólogo que realice la operación, y de la anatomía o patología del paciente. La integridad del electrodo se verificará mediante un analizador de umbrales (voltaje, miliamperaje, amplitud de la onda P o R, resistencias, etc.) [42]. Durante el acto de implantación se miden los umbrales con un analizador de similares características a las del generador que se va a implantar [40]. Si todos los valores tomados se consideran correctos, se procederá a la fijación del electrodo.

La bolsa para alojar el generador se realiza en el plano de separación del tejido celular subcutáneo y la fascia del pectoral mayor. Es algo que se consigue con facilidad realizando una disección roma, con los dedos o con la ayuda de gasas [42]. El tamaño de la bolsa debe ser el adecuado para el generador y, para evitar su migración, se fija al músculo y a la fascia. Una vez realizado se conectan los electrodos al generador del marcapasos y se verifica que funcionan correctamente. Para finalizar se realiza el cierre de la herida por planos, mediante sutura absorbible, y la piel se cerrará con grapas o con sutura de seda.

Queda mencionar que el protocolo de actuación en cuanto a la implantación del marcapasos, las pruebas de funcionalidad, etc. estarán definidas por el fabricante del dispositivo implantado.

Tras la intervención quirúrgica todas las guías internacionales sobre estimulación cardíaca insisten en la necesidad de practicar un seguimiento clínico de los pacientes con la siguiente periodicidad [43]:

1. Antes de dar de alta a un paciente tras la implantación: entre las 6 semanas y 3 meses desde la implantación.
2. Posteriormente y hasta la proximidad prevista del fin de vida útil de la batería: de forma anual los marcapasos unicamerales, semestralmente los bicamerales o tricamerales.
3. A partir de la proximidad prevista del fin de garantía de vida de la batería: cada 3-6 meses.

En general deben llevarse a cabo los siguientes pasos en el protocolo de seguimiento [44]:

- Valoración de la sintomatización del paciente
- Exploración de la zona de implantación del generador
- Visualización del ritmo cardíaco en el ECG basal
- Frecuencia magnética, y valoración del autoumbrales si lo realiza el modelo del marcapasos
- Inhibición del generador para conocer la frecuencia intrínseca cardíaca (fundamentalmente en fechas próximas al agotamiento)
- Determinación del umbral de estimulación en cada una de las cámaras
- Determinación del umbral de detección en cada una de las cámaras
- Investigación de miopotenciales con electrodos monopoles, o en bipolares programados en detección monopolar.
- Investigación de conducción retrograda (fundamentalmente en la enfermedad de seno)
- Análisis de datos de telemetría (batería, electrodo, histogramas, contadores de eventos, episodios de cambio de modo, histogramas de arritmias acontecidas y de los ECG almacenados, gráficos de umbral de autocaptura o de autodetección, gráficos de medición de onda endocavitaria, etc.)
- Ajuste de salida y de detección de polaridad, intervalos AV, periodos refractarios tras realizar los análisis anteriormente descritos.

Es importante mencionar que se detalla el protocolo de seguimiento de la implantación del dispositivo ya que, el hidrogel con el que se recubrirá el marcapasos no debe afectar en ningún caso a los parámetros que se toman en este seguimiento.

2.7.1 Complicaciones relacionadas con el implante

El implante de marcapasos es un procedimiento invasivo y por lo tanto susceptible de presentar complicaciones. Estas complicaciones estarán relacionadas con diversos motivos

como pueden ser el acto quirúrgico, el tipo de acceso vascular utilizado, la profilaxis antibiótica, la duración del procedimiento o, las enfermedades subyacentes y comorbilidades.

La Sociedad Española de Cardiología recoge en el Registro Español de Marcapasos el número de dispositivos de estimulación cardíaca que anualmente se implantan en España y que para el año 2016 ascendió a 39.217 [45]. De estos el 74.9% corresponden a implantes que se realizan por primera vez (primoinplantados) y el 25.1% a recambios de generador.

La causa más frecuente de explante de generador es el fin de vida de la batería (87,8%), seguida del reemplazo electivo (4,1%), la reintervención atribuida a síndrome de marcapasos (1,8%), el agotamiento prematuro de la batería (1,2%), la disfunción/recall (1,1%) y otras causas no especificadas (< 1%). La tasa de retirada del generador por erosión/ infección/ protrusión del dispositivo es más alta que el año previo (el 3,4 frente al 1,4%).

En este periodo se explantaron 216 electrodos y el motivo más frecuente fue la infección/ulceración (65.6%), seguida de un fallo del aislante (7.7%), desplazamiento (7.7%) y con menor frecuencia el defecto de conexión (3.8%), la estimulación extracardiaca (3.8%), el bloqueo de salida (3.8%) o el recambio electivo (3.8%). El 3.8% restante corresponde a causas no específicas [45].

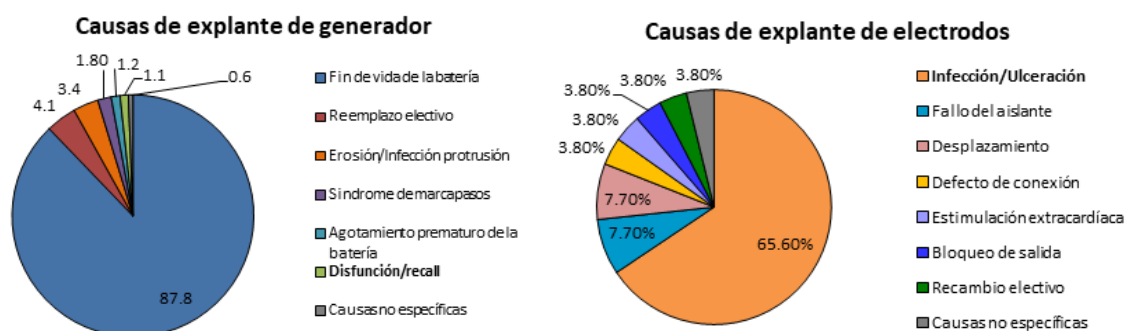


Figura 26: a) Causas de explante del generador y b) causas de explante de electrodos

Las complicaciones más frecuentes que se pueden detectar en el paciente son las siguientes [40]:

Hematoma de la bolsa: Se debe a una hemostasia incompleta o bien a grandes aumentos de la presión intratorácica y sangrado en el punto de penetración del cable. Su aparición es más frecuente en pacientes con problemas hematológicos y en pacientes anticoagulados.

Infección del marcapasos: La infección puede afectar a todo el sistema de estimulación, desde la piel al endocardio, produciendo infecciones de la piel y partes blandas, infección de la bolsa (lugar donde más frecuentemente se da el problema) e infección de la sonda con sepsis y endocarditis. Los gérmenes más frecuentemente implicados son *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, enterobacterias, *Pseudomonas* y hongos como *Candida albicans*.

El tratamiento de la infección buscando la conservación del dispositivo no suele dar buenos resultados, y en la mayoría de los casos es preciso extraer el generador y

cables y colocarlos en otro lado. En los casos en los que la infección es más grave, es obligatorio mantener tratamiento antibiótico parenteral prolongado, de acuerdo con los resultados del hemocultivo. Siempre es de obligada realización un ecocardiograma transtorácico y transesofágico para comprobar o descartar la existencia de verrugas o endocarditis.

Desplazamiento del catéter y/o perforación: Se manifiesta con disfunción del sistema, siendo obligatoria la recolocación del electrodo. Los desplazamientos suelen ocurrir sobre todo en los primeros días tras la implantación. Se sospechará en pacientes con umbrales de captura elevados, pérdida de la captura, contracciones diafragmáticas y de los músculos intercostales sincrónicas con el impulso, entre otros signos.

Alteraciones del cable-electrodo: Suelen deberse a deterioros del mismo durante la implantación o como consecuencia de la degradación de sus componentes. Cuando sólo se afecta el aislante puede producirse pérdida de la captura por derivación de la corriente y alteraciones de la impedancia del electrodo. Cuando lo afectado es el conductor, su fractura produce pérdida de la captura. Si la fractura es incompleta, se observan alteraciones en el ciclado por inhibición inadecuada del generador.

Alteraciones de la detección: La infradetección es la falta de reconocimiento de la actividad eléctrica de la cámara donde se aloja el cable, y puede ser corregida por reprogramación de la sensibilidad o, en algunos casos, hay que proceder a la recolocación del mismo.

La sobredetección es el reconocimiento de señales eléctricas cardíacas inapropiadas (onda T) o extracardíacas (miopotenciales o interferencias electromagnéticas ambientales). En el primer caso, la solución se basa en la reprogramación del período refractario o de la sensibilidad. En la inhibición por miopotenciales se puede optar por reprogramar el dispositivo.

Alteraciones de la captura: La pérdida de la captura puede obedecer a desplazamientos del cable o a establecimiento de fibrosis en la interfaz endocardio-electrodo (lo que se denomina bloqueo de salida).

En cuanto a una información más detallada sobre infecciones en el sistema de marcapasos y técnica de extracciones, Silvestre Garcia J. et al. del Servicio de Cirugía Cardíaca del Hospital la Paz de Madrid, recoge un amplio análisis en el artículo *“Infecciones en el sistema de marcapasos. Extracción de electrodos. Estimulación permanente por vía femoral”* [46].

3. NORMATIVA APLICADA

3.1 INTRODUCCIÓN

En este apartado se muestra la normativa vigente que se aplica a este proyecto para poder llevarlo a cabo de una forma correcta. Por un lado se ha trabajado bajo las indicaciones de la norma UNE-EN ISO 13485:2016 durante todo el transcurso del proyecto, y por otro lado se ha tenido en cuenta la normativa específica a aplicar para el producto sanitario concreto que se ha producido.

3.2 PROYECTO BAJO NORMA UNE-EN ISO 13485:2016

La norma UNE-EN ISO 13485:2016 rige los productos sanitarios, por lo que se ha tenido en cuenta en todo el proceso del proyecto. Esta norma describe los requisitos mínimos de un Sistema de Gestión de la Calidad adecuado, idóneo y eficaz para producir de forma consistente dispositivos médicos seguros.

3.3 NORMATIVA A APLICAR COMO PRODUCTO SANITARIO

El producto que se desarrolla en este proyecto es innovador, y no está en el mercado como producto propio de i+Med, por lo que requiere de la certificación como producto sanitario mediante un organismo notificador. A continuación se describe la normativa vigente que el recubrimiento biocompatible debe cumplir para estar en el mercado.

3.3.1 La normativa legal de obligado cumplimiento

El dispositivo médico cardíaco con el que se trabaja en este proyecto es considerado como producto sanitario, por lo que al dispositivo junto con el recubrimiento se le considera también un producto sanitario, cuya definición según la directiva europea 93/42/EEC es la siguiente:

Cualquier instrumento, dispositivo, equipo, material u otro artículo, utilizado solo o en combinación, incluidos los programas informáticos que intervengan en su buen funcionamiento, destinado por el fabricante a ser utilizado en seres humanos con fines de:

- Diagnóstico, prevención, control, tratamiento o alivio de una enfermedad,
- Diagnóstico, control, tratamiento, alivio o compensación de una lesión o de una deficiencia,
- Investigación, sustitución o modificación de la anatomía o de un proceso fisiológico,
- Regulación de la concepción,

y que no ejerza la acción principal que se desee obtener en el interior o en la superficie del cuerpo humano por medios farmacológicos, inmunológicos ni metabólicos, pero a cuya función puedan contribuir tales medios.

3.3.2 Clasificación de los implantes biosanitarios

Los dispositivos con los que se ha trabajado están pensados para mantenerse dentro del cuerpo humano durante largo periodo de tiempo, además de alojarse cerca del corazón. Es por ello por lo que en la legislación de productos sanitarios se clasifican como productos de clase III.

A continuación se detalla la definición dada en la mencionada directiva 93/42/CEE, que se traspone a nivel estatal en el Real Decreto 1591/2009 para los productos sanitarios de clase III:

Producto sanitario clase III: Se incluyen en esta clase algunos productos implantes, los productos destinados a entrar en contacto con el sistema nervioso central o con el sistema circulatorio central con fines de terapia o diagnóstico, los productos que contienen sustancias medicinales, los productos que se absorben totalmente y los productos que contienen derivados animales.

3.3.3 Requisitos legales

Para cada clase de producto legislado, existen ciertos requisitos legales que se deben tener en cuenta para poder obtener el marcado CE.

El fabricante deberá tener implantado un sistema de calidad que garantice la conformidad de los productos con las disposiciones aplicables de la Directiva en las fases de diseño, fabricación y control final. El procedimiento requiere la declaración por parte del fabricante de dicho cumplimiento y la intervención de una Entidad de Certificación, que evaluará si el sistema de calidad implantado por el fabricante asegura el cumplimiento de los requisitos esenciales aplicables al producto, para lo cual evaluará también los expedientes de diseño de los productos.

Para llevar a cabo la certificación del producto por un organismo notificado, el fabricante debe realizar una solicitud de certificación al organismo notificado, y éste, tras verificar que el fabricante tiene certificación UNE-EN ISO 13485:2016, procede a la evaluación de la conformidad de cada producto.

El producto a certificar debe cumplir los requisitos esenciales que le sean de aplicación recogidos en la Directiva 93/42/CEE, para asegurar su calidad, seguridad y prestaciones. La solicitud deberá acompañarse de los documentos justificativos del cumplimiento de dichos requisitos esenciales.

Las tablas de requisitos esenciales a presentar acorde con el procedimiento de evaluación elegido por el fabricante para productos sanitario será la guía para la evaluación de la documentación técnica que debe aportar la empresa como evidencia del cumplimiento de los requisitos esenciales.

Para justificar el cumplimiento de los requisitos esenciales es aconsejable utilizar normas armonizadas europeas o equivalentes, cuando existan.

Para los productos sanitarios la demostración de las prestaciones y la ausencia de riesgos deberán basarse en datos clínicos, siguiendo lo establecido en el Anexo X "Evaluación Clínica" de la Directiva 93/42/CEE para productos sanitarios. En cualquier caso, si se presentan datos bibliográficos, será necesaria una evaluación crítica de la bibliografía que se presente como soporte. La empresa deberá aportar, también para cada producto el plan de seguimiento post comercialización o la justificación de la no necesidad del mismo, si fuera el caso.

El documento MEDDEV 2.7.1 rev4 de junio de 2016 "Evaluation of clinical data: a guide for manufacturers and notified bodies", disponible en la página Web de la Comisión Europea (<https://ec.europa.eu/docsroom/documents/17522>) [47], serán la referencia para la evaluación de los datos clínicos por el Organismo Notificado y puede ser un herramienta muy útil para el fabricante.

Además de los impresos y documentos citados anteriormente, toda solicitud de marcado CE debe llegar acompañada del justificante de abono de tasas aplicables.

3.3.4 Certificación como producto sanitario; marcado CE de los recubrimientos biosanitarios para su uso en implantología

I+Med está certificado en la norma UNE-EN ISO 13485:2016 y por lo tanto está autorizado para la investigación, la fabricación y la certificación de un recubrimiento aplicable a diferentes sustratos metálicos para su uso de implantología biosanitaria.

Pasos que i+Med debe realizar para el cumplimiento como producto de clase III

1. Elaboración del dossier técnico
2. Declaración de conformidad
3. La vigilancia y la posterior vigilancia del mercado (colocar el marcado CE y comercializar los productos).

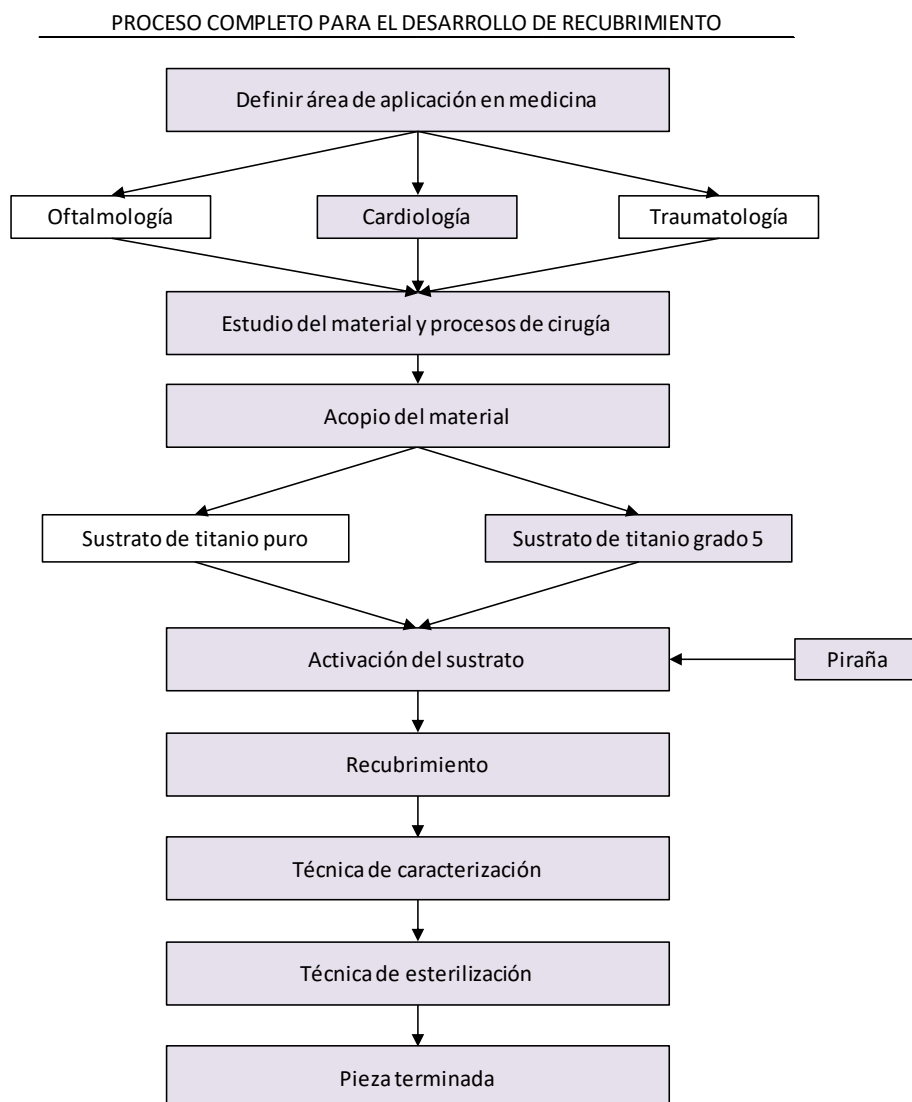
Queda reflejado que para poder comercializar el producto diseñado a lo largo del proyecto, i+Med debería cumplir con la normativa explicada previamente.

4. PROCESO EXPERIMENTAL

En el capítulo anterior se ha establecido el marco teórico de este proyecto, enfocado a los procesos realizados, así como la situación actual de los materiales utilizados en biomedicina, y las técnicas de fabricación y procesos tanto de recubrimientos como de caracterización. En este capítulo, se detalla la parte experimental, es decir, el proceso que se ha seguido para llevar a cabo este proyecto.

Para conseguir un prototipo óptimo, se han realizado diferentes pruebas, siguiendo las diferentes opciones que se han encontrado en la literatura. Es importante entender cuál es el camino que se ha seguido, ya que ha ayudado a conseguir el resultado final.

El desarrollo de un recubrimiento para un dispositivo de estimulación cardíaca está formado por diferentes pasos. En el siguiente flujograma se muestran las fases llevadas a cabo, para dar solución al desarrollo de esta nueva tecnología implantada en la empresa i+Med.



Flujograma 1: Fases del proceso de recubrimiento

4.1 ÁREA DE TRABAJO

El desarrollo del proyecto se ha realizado en las instalaciones de la empresa i+Med. Estas, están dotadas con un laboratorio con tecnología de vanguardia, que posibilitan la investigación en nanotecnología, impulsando nuevos desarrollos y creaciones en nanohidrogeles e ingeniería biomédica. En la figura 27 se puede observar una imagen panorámica del laboratorio.



Figura 27: Panorámica del laboratorio de i+Med

La fabricación de un recubrimiento que sea compatible con los diferentes métodos de fabricación y materiales, ha requerido del uso de diferentes equipos, tanto para la correcta fabricación como para cumplir la normativa vigente respecto a la seguridad laboral dentro del laboratorio. En la siguiente tabla están recogidos algunos de los equipos utilizados durante el desarrollo de este proyecto.

Equipo	Marca	Modelo	Proveedor	Propiedad
Campana gases	ASEM ICO 120	Vitrina extracción gases	LinLabRioja	I+Med
Baño termostático	Grant/GD 110	Baño termostático	Galileo	I+Med
Agitador magnético	STIH-001-001	Agitador magnético	Labbox	I+Med
Estufa	Memmert	UF 110 Plus	LinLabRioja	I+Med
Compresor aire	CleanAir	Compresor CLR20/30ST	Puska	I+Med
Multiagitador	Ovan/MMH90E	Multiagitador magnético	LetsLab	I+Med
Balanza	Ohaus PA214C	Balanza analítica	Ohaus corp.	I+Med
Ultrasonidos	Selecta/Ultrasonidos 6L	Baño por ultrasonidos	LinLabRioja	I+Med
Agitador mecánico	Comecta Reax 2000	Vortex Heidolph	Galileo	I+Med
Agitador térmico magnético	IKA	C-MAG HS7	IKA	I+Med

Tabla 4: Equipos utilizados a lo largo del proyecto

En los siguientes apartados, se podrá observar de forma más específica el uso que se le da a cada uno de estos equipos.

4.2 ACOPIO DE MATERIAL

En este apartado se describe la materia prima que se ha utilizado para las pruebas realizadas a lo largo del proyecto. Antes de decidir cuál es el material adecuado para estas pruebas, se ha realizado una revisión bibliográfica con objeto de escoger un sustrato que dispusiera de las mismas características que un dispositivo de estimulación cardíaca.

Analizar los resultados de cada prueba es un proceso fundamental para poder aceptar, o rechazar la metodología empleada, y conseguir el mejor resultado posible. A continuación se hace un resumen de todas las pruebas realizadas, puesto que aunque no hayan sido satisfactorias, han sido útiles para encontrar el camino adecuado.

Como ya se ha comentado en apartados anteriores, los dispositivos de estimulación cardíaca están compuestos de titanio grado cinco (Ti6Al4V), en su mayoría, y de poliuretano. Gracias a una colaboración con la unidad de cardiología de Osakidetza OSI Araba, se han podido analizar dispositivos médicos reales, los que se visualizan en la figura 28, aunque no se han utilizado en el desarrollo de ninguna prueba. Son de la marca Medtronic, fabricante mundialmente conocido de este tipo de dispositivos.



Figura 28: Dispositivos de estimulación cardíaca de la marca Medtronic

Para el desarrollo de las primeras pruebas realizadas en el laboratorio de i+Med se han utilizado unas arandelas de titanio, las cuales se pueden observar en la figura 29. Son unas arandelas de titanio grado 5 (Ti6Al4V), con un diámetro exterior de 20mm y un grosor de 2mm (DIN 125 M10), fabricadas por la empresa LOWDE Titanium.

Posteriormente se realizó la compra de arandelas DIN 433 M10 y DIN 433 M3.5, fabricadas del mismo material que las anteriores y del mismo proveedor.



Figura 29: Arandelas de titanio grado 5 empleadas

A continuación se muestra una tabla donde se observan las características de los materiales mencionados.

Tipo de material	Material	Fabricante	Dimensiones	Coste (€/ud.)	Unidades
Arandela	Titanio grado 5 (Ti6Al4V)	LOWDE Titanium	DIN 125 M10	2,50*	40
Arandela	Titanio grado 5 (Ti6Al4V)	LOWDE Titanium	DIN 433 M10	2.80*	20
Arandela	Titanio grado 5 (Ti6Al4V)	LOWDE Titanium	DIN 433 M3.5	1.44*	20
Dispositivo de estimulación cardíaca	Titanio grado 5 y poliuretano	Medtronic	Pequeño: 55x44x6 mm Mediano: 58x51x7 mm Grande: 49x67x14mm	3500	-

* I.V.A no incluido

Tabla 5: Características del material utilizado

4.3 ENSAYOS REALIZADOS

Para conseguir un prototipo óptimo con el que trabajar, ha sido necesaria la realización de diferentes pruebas. En estos primeros ensayos se aprendió la forma de trabajar en el laboratorio de i+Med y a utilizar las diferentes sustancias. Además, los resultados obtenidos han servido para lograr un recubrimiento adecuado.

En la siguiente tabla se puede ver un resumen de todas las pruebas realizadas. Aunque se explican de una forma más extensa a continuación, este resumen recoge la información más relevante de cada una de las pruebas y ayuda a ver los cambios realizados entre unas y otras.

Ti	ACTIVACIÓN				FUNCIONALIZACIÓN						TRAT. CALOR	RECUBRIMIENTO	
	Disolución	Relación	t(min)	T(°C)	Disolución	Relación	t(h)	Disolución	Relación	t(h)	120°C/1h	Disolución	t(h)
1	H ₂ SO ₄ + H ₂ O ₂	3:1	10'	-	MTEOS	1:1	1h	-	-	-	No	-	-
2	NH ₄ OH + H ₂ O ₂	3:1	10'	-	Et + GOPTS	2% p/v	3h	-	-	-	Sí	-	-
	NH ₄ OH + H ₂ O ₂	3:1	5'	-	Et + GOPTS	2% p/v	3h	-	-	-	Sí	-	-
3	H ₂ SO ₄ + H ₂ O ₂	3:1	10'	-				-	-	-	No	-	-
4	H ₂ SO ₄ + H ₂ O ₂	3:1	10'	45°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H ₂ SO ₄ + H ₂ O ₂	1:1	10'	45°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H ₂ SO ₄ + H ₂ O ₂	2:1	10'	25°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H ₂ SO ₄ + H ₂ O ₂	2:1	10'	45°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H ₂ SO ₄ + H ₂ O ₂	1:1	10'	45°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	H ₂ SO ₄ + H ₂ O ₂	1:1	30'	45°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H ₂ SO ₄ + H ₂ O ₂	1:1	10'	45°C	Et + GOPTS	2% p/v	3h	-	-	-	Sí	-	-
	H ₂ SO ₄ + H ₂ O ₂	1:1	10'	45°C	Et + GOPTS	2% p/v	6h	-	-	-	Sí	-	-
	H ₂ SO ₄ + H ₂ O ₂	1:1	10'	45°C	Et + GOPTS	2% p/v	24h	-	-	-	Sí	-	-
6	H ₂ SO ₄ + H ₂ O ₂	1:1	10'	45°C	Et + GOPTS	2% p/v	3h	-	-	-	Sí	-	-
	H ₂ SO ₄ + H ₂ O ₂	1:1	10'	45°C	Et + GOPTS	2% p/v	24h	Tolueno + TAEA	5% v/v	22h	Sí	-	-
7	H ₂ SO ₄ + H ₂ O ₂	1:1	10'	45°C	EDS+H ₂ O+Me	1:5:94	2h	-	-	-	-	-	-
	H ₂ SO ₄ + H ₂ O ₂	1:1	10'	45°C	EDS+H ₂ O+Me	1:5:94	4h	-	-	-	-	-	-
	H ₂ SO ₄ + H ₂ O ₂	1:1	10'	45°C	EDS+H ₂ O+Me	1:5:94	5'	-	-	-	-	-	-
	H ₂ SO ₄ + H ₂ O ₂	1:1	10'	45°C	Et + EDS	2% p/v	3h	-	-	-	-	-	-
	H ₂ SO ₄ + H ₂ O ₂	1:1	10'	45°C	Et + EDS	2% p/v	24h	-	-	-	-	-	-
8	H ₂ SO ₄ + H ₂ O ₂	1:1	10'	45°C	Et + GOPTS	2% p/v	24h	Tolueno + TAEA	5% v/v	22h	Sí	HA + EDC + NHS	24h
	H ₂ SO ₄ + H ₂ O ₂	1:1	10'	45°C	Et + EDS	2% p/v	24h	-	-	-	Sí	HA + EDC + NHS	24h

*A.C: Ángulo de Contacto, Et: Etanol, Me: Metanol

Tabla 6: Resumen de las pruebas llevadas a cabo en la parte experimental

Hay que decir que se han realizado más pruebas que las aquí mencionadas. Únicamente se detallan las pruebas donde se ha realizado algún cambio o donde se ha tomado alguna decisión.

Cada prueba realizada está formada por diferentes procesos, como podemos observar en la tabla. Hay que mencionar que en este apartado, se explican los procesos del ensayo realizados una vez el sustrato está limpio (El proceso de limpieza se describe en el Anexo I).

Para entender bien en qué ha consistido cada una de las pruebas, estas se han dividido en cinco procesos diferentes. El primero, que no aparece en la tabla, es la **limpieza**. Que la superficie esté limpia es algo imprescindible si se quiere modificar y depositar una monocapa sobre ella. Al segundo proceso se le ha llamado **activación** de la superficie, en resumen, este proceso consiste en crear una capa de grupos hidroxilos (-OH) sobre ella. El tercero es la **funcionalización**, con el que se crea una monocapa que une el sustrato de titanio y el hidrogel. Después, se realiza el **recubrimiento** de hidrogel. Por último se procede a la **caracterización**, diferentes pruebas empleadas para analizar la superficie y obtener datos sobre el resultado conseguido.

En todas las pruebas no se ha realizado una caracterización. Lo que no quiere decir que no se haya observado la superficie. En todas las pruebas, tras cada proceso, la superficie se ha analizado de forma visual, utilizando el ángulo de contacto que forma sobre ella una gota de agua.

Esta gota de agua se ha vertido con una pipeta de 0.5-10 μ L, buscando obtener el mismo volumen de agua en cada ensayo. Las conclusiones sacadas dependen de lo siguiente:

- Tras la limpieza, la superficie de la aleación de titanio es hidrófoba, lo que significa que la gota de agua no se esparce mucho en ella, por lo que el ángulo de contacto tiene que ser grande.
- La activación se realiza con el objetivo de crear grupos OH (hidroxilo) que permitan el anclaje del silano a la superficie. En este caso, la gota de agua se tiene que esparcir y el ángulo de contacto que se visualice tiene que ser pequeño.
- En la funcionalización, se coloca una monocapa sobre la superficie. Como resultado se obtendrá una superficie más hidrófoba, por lo que la gota de agua tiene que volver a tener un ángulo de contacto mayor. Dependiendo de la sustancia que se encuentre en la superficie el grado de hidrofilia variará.
En este trabajo la monocapa estará formada por epóxidos o aminas. El primero es más hidrófobo que el segundo, y se observará una diferencia en el comportamiento de la gota de agua sobre la superficie entre una capa y otra.
- En el último paso, la unión del hidrogel, el ángulo de contacto volverá a cambiar. El hidrogel es una sustancia muy hidrófila, por lo que el agua vertida se expandirá tanto como en el paso de activación o incluso más.

A continuación se van explicando los diferentes pasos empleados, cómo se ha llegado a ellos y en que han consistido.

4.3.1 Ensayos realizados en la fase 1

En la primera fase se ha realizado una única prueba, ya que ha sido una copia del prototipo conseguido por la Ingeniera Biomédica Jone Rentería en su trabajo fin de grado. Esta prueba se ha podido realizar gracias a su ayuda, y ha servido para aprender a trabajar en el laboratorio.

Activación de la superficie

En esta fase, como en la mayoría de las siguientes, la superficie se ha activado con una disolución conocida como *La Disolución Piraña*. Es una mezcla de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Sirve para limpiar los residuos orgánicos de los sustratos y además, hidroxilar la superficie generando grupos $-OH$ (figura 30), lo que hace que la superficie sea altamente hidrofílica.

Se pueden usar diferentes proporciones de H_2SO_4 y de H_2O_2 para crear esta disolución, aunque en todos los casos es conocida por el mismo nombre. En la tabla se observa que a lo largo del proceso se han utilizado diferentes relaciones entre el soluto y el disolvente. A la hora de trabajar con ella se debe tener mucho cuidado, ya que es una disolución fuertemente ácida y oxidante. Puede provocar explosiones y quemaduras graves en la piel de la persona que lo manipula, por lo que es importante cumplir con las medidas de seguridad recomendadas (trabajar en la campana de gases, y usar gafas y guantes de seguridad).

En las diferentes pruebas, para activar la superficie del sustrato, se ha seguido el proceso que se detalla a continuación.

1. Con una probeta se mide la cantidad requerida de H_2SO_4 y se vierte a un vaso de precipitados. Este vaso se coloca sobre el agitador magnético y se empieza a remover.
2. Con una pipeta, se coge la cantidad de H_2O_2 necesaria y se gotea en el vaso donde se encuentra el ácido.
3. Si se quiere poner la disolución piraña a una temperatura concreta se mete en el baño de agua sin dejar pasar mucho tiempo.
4. Cuando la disolución haya alcanzado la temperatura adecuada, se introduce el sustrato, con la ayuda de unas pinzas y con cuidado de no tocarla.
5. Trascurrido el tiempo necesario, normalmente 10 minutos, se saca el sustrato con las pinzas.
6. Se limpian los restos de disolución piraña, metiendo el sustrato primero en un vaso con agua y después a otro.
7. Se seca la pieza mediante el compresor de aire.

El esquema del resultado conseguido en la superficie es el siguiente:

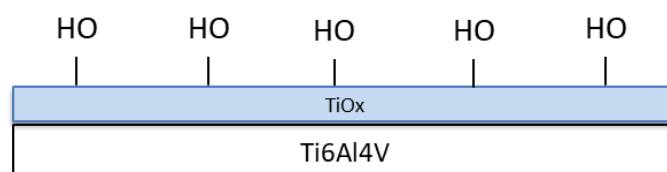
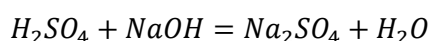


Figura 30: Activación de la superficie mediante la disolución piraña

Como ya se ha comentado, la disolución Piraña es altamente peligrosa y, tras su uso, hay que neutralizarla para poder verterla al contenedor de residuos de laboratorio. Para ello, se utiliza una disolución de hidróxido de sodio.



Los pasos que se requieren para neutralizar la disolución piraña se enumeran a continuación.

1. Se prepara la disolución de hidróxido de sodio.
 - a. Se calcula la cantidad necesaria de NaOH que se necesita para neutralizar la cantidad de H₂SO₄ que se tiene.
 - b. Se pesa la cantidad necesaria de hidróxido de sodio.
 - c. Se disuelve en 0,5L de agua desionizada. La sosa se echa poco a poco al vaso con agua, que estará sobre el agitador magnético removiéndose.
2. En un vaso de 2L, se vierten 0,5L de agua desionizada y se vierte sobre ella, con cuidado, la disolución piraña una vez fría.
3. Se coloca este segundo vaso sobre el agitador magnético.
4. Con la ayuda de una pipeta pequeña de cristal se vierte, poco a poco, la disolución de NaOH sobre la piraña.
5. Es importante medir el pH de la disolución, sobre todo al final, porque puede pasar de una disolución ácida a básica con muy poca cantidad.
6. Cuando se haya conseguido un pH neutro y la disolución esté fría, se vierte al contenedor de reactivos.

Funcionalización

El precursor que se ha utilizado para la funcionalización en esta fase, fue el utilizado por la Ingeniera Biomédica Jone Rentería Aguirregabiria, aunque en los siguientes ensayos del proyecto no se ha vuelto a utilizar.

La disolución de recubrimiento se ha creado añadiendo el precursor MTEOS a isopropanol, con una relación 1:1, y añadiendo agua acidificada como catalizador.

Precursor MTEOS

El precursor metiltrietoxisilano es uno de los precursores de silicio, conocido en inglés como Methyltriethoxysilane o Triethoxymethylsilane (de aquí en adelante MTEOS). Existe otro precursor con gran similitud con el MTEOS: el MTMOS. Sin embargo, son moléculas diferentes: la molécula MTMOS, posee en su estructura un grupo metilo, pero, dado que el grupo metilo es tóxico, convierte al MTEOS en una molécula más adecuada para medicina, ya que éste tiene un grupo etilo [48]. A continuación (figura 31), se muestra la estructura química de la molécula MTEOS.

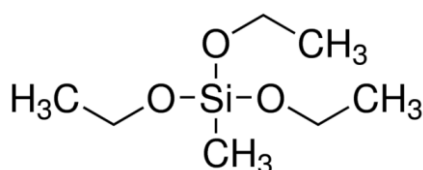


Figura 31: Estructura química de la molécula MTEOS

Todas las sustancias mencionadas estaban disponibles en el laboratorio que i+Med dispone, por lo que no ha sido necesario realizar ningún proceso de selección de proveedores ni de compra. Para las primeras pruebas, sólo se ha necesitado la compra de las Arandelas de Titanio grado 5. Para ello se realizó una previa búsqueda en internet de los diferentes proveedores de Ti6Al4V y se terminó optando por unas arandelas distribuidas por la empresa LOWDE Titanium.

4.3.2 Ensayos realizados en la fase 2

En la segunda fase, se ha ajustado el proceso siguiendo las indicaciones del Investigador José María Alonso. Su propuesta fue comparar la activación por medio ácido con la activación por medio básico, mediante una disolución llamada *Piraña básica*. El objetivo ha sido facilitar el proceso, ya que la acidez de la Disolución Piraña lo complica.

También se ha cambiado el precursor del recubrimiento, en vez de utilizar el precursor MTEOS se ha utilizado un epoxisilano, el 3-Glycidyloxypropyl (trimethoxy-silane) o (GOPTS) en concreto. Se ha tomado esta decisión porque la monocapa que crea el MTEOS tiene metilos enlazados a los átomos de silicio (figura 32), lo que limita la posterior unión al hidrogel.

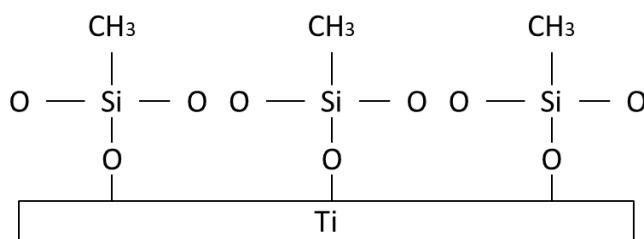


Figura 32: Recubrimiento que se crea al utilizar el precursor MTEOS

Precursor GOPTS

EL 3-Glicidiloxipropil (trimetoxi-silano) es un organosilano bifuncional que posee un epóxido orgánico reactivo y grupos de metoxisililo hidrolizables (figura 33). Esta naturaleza dual le permite unirse químicamente tanto a materiales inorgánicos (vidrio o metales) como a polímeros orgánicos (termoplásticos o elastómeros), funcionando como un reactivo precursor de adhesión.

Es un líquido incoloro, de baja viscosidad, con un ligero olor a aguarrás. Es soluble en alcoholes, cetonas e hidrocarburos alifáticos o aromáticos. Su estructura molecular se muestra en la siguiente imagen.

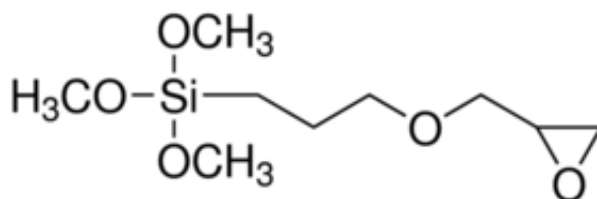
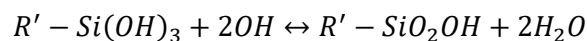


Figura 33: Estructura química de la molécula de GOPTS

El ensamblaje de la capa de epoxisilano sobre la superficie de titanio consiste en una primera hidrólisis, descrita a continuación



seguida por una condensación [49].



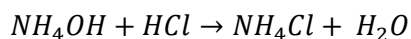
Activación de la superficie

El objetivo de la disolución piraña básica es el mismo que el de la piraña ácida. Ayuda a limpiar la superficie y además crea enlaces hidroxilos en ella. Al calentarse ambas son igual de peligrosas, pero mientras que la piraña ácida reacciona por sí sola, la utilizada en esta fase tiene que calentarse por encima de los 60°C para que se active.

El proceso seguido en la activación de esta fase es muy parecido al anterior.

1. Con una probeta se mide la cantidad requerida de NH_4OH y se vierte a un vaso de precipitados.
2. Se pone a remover sobre el agitador magnético.
3. Con una pipeta, se coge la cantidad de H_2O_2 necesaria y se echa al vaso donde se encuentra la disolución de amonio.
4. Una vez mezclado se deja de remover, y con la ayuda de unas pinzas se mete el sustrato en la disolución.
5. Trascurrido el tiempo pensado, normalmente 10 minutos, se saca el sustrato con las pinzas.
6. Se limpian los restos de disolución piraña básica, metiendo el sustrato primero en un vaso con agua y después a otro.
7. Se seca la pieza mediante el compresor de aire.

Después de utilizar esta disolución piraña, también hay que neutralizarla y clasificarla como residuo de laboratorio peligroso. En este caso, al ser una disolución básica, se neutraliza con una disolución de ácido clorhídrico (HCl) siguiendo los mismos pasos indicados en el punto anterior.



El resultado observado al activar la superficie con esta disolución básica no ha sido muy satisfactorio. Al sacar el sustrato de la disolución había perdido el brillo del principio y se había oscurecido. Según Nazarov D.V. et al. [50] al utilizar la piraña básica se crea una rugosidad en la superficie. Ésta se modifica creando una especie de esponja o coral en la capa superior, lo que hace que su aspecto y características cambien. En la figura 34 se observa la pérdida de brillo y el oscurecimiento que ha sufrido la arandela tratada por la formación de la microestructura mencionada.

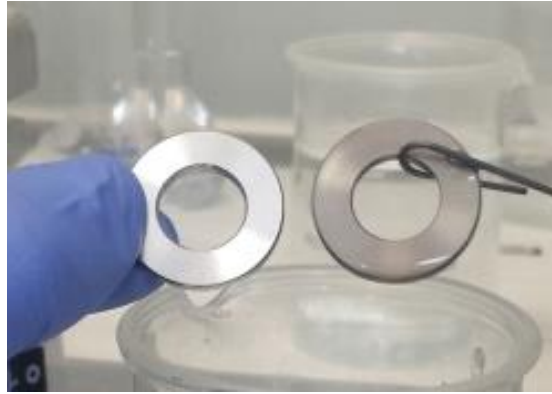


Figura 34: Comparación de la arandela sin tratar (izquierda) y la arandela tratada (derecha).

Hay que tener en cuenta que el objetivo de estas pruebas es recubrir un marcapasos, por lo que no se puede utilizar un proceso que modifique la superficie del dispositivo. En consecuencia, se ha decidido volver a utilizar la disolución piraña ácida, ya que sus resultados fueron más adecuados.

Funcionalización

De esta segunda fase en adelante, la funcionalización se ha realizado con una disolución de etanol + 3-Glicidiloxipropil trimetoxisilano (de ahora en adelante epoxisilano o GOPTS). En esta etapa, el sustrato se recubre creando una monocapa de silano sobre la superficie (figura 35a). Esta capa, por un lado se unirá a los hidroxilos, creados sobre la superficie en el proceso de activación, y por otro lado al hidrogel.

Para eliminar las moléculas de silano mal adheridas a la superficie, el sustrato se sumerge durante unos segundos en el disolvente utilizado, en este caso etanol. De esta forma solo se mantienen las partículas unidas covalentemente al titanio.

Para terminar el proceso y mejorar esta unión, se calienta el sustrato en una estufa. De este modo, las moléculas adheridas a la superficie se entrecruzan entre sí (figura 35b) y se consigue una mayor estabilidad.

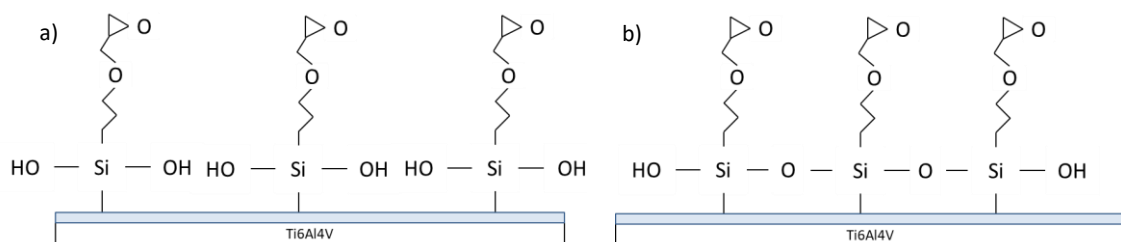


Figura 35: a) Silanización de la superficie con los grupos epoxy. b) Monocapa de silano estable sobre la superficie de titanio grado 5

El proceso que se ha seguido para crear la monocapa, y así funcionalizar la superficie del sustrato es el siguiente:

1. Se toma la cantidad necesaria de etanol y se vierte en un vaso de precipitados.

2. El vaso de precipitados, que contiene el disolvente, se coloca sobre el agitador magnético y se empieza a remover.
3. Se coge la cantidad calculada de epoxisilano y se vierte sobre el etanol. Para ello hay que tener en cuenta que:
 - a. El 3-Glicidiloxipropil trimetoxisilano es una sustancia que se hidroliza muy fácil al entrar en contacto con el agua del ambiente, formando agregados microscópicos como consecuencia de la hidrólisis de los grupos trimetoxisilano (Si-OMe) y la posterior policondensación de los silanoles (Si-OH)
 - b. Para evitar estropear la sustancia, el epoxisilano necesario se extrae del bote con una jeringuilla.
 - c. Mientras tanto, con otra jeringuilla, se mete nitrógeno seco. Al terminar se tapa la botella.
4. Se deposita el sustrato en la disolución.
5. Se tapa el vaso de precipitados con parafilm y se deja removiendo durante el tiempo establecido.
6. Una vez transcurrido este tiempo, se saca el sustrato con cuidado y se limpia en el disolvente utilizado, durante unos segundos.
7. La pieza se seca con la ayuda del compresor de aire.
8. El sustrato se coloca en un vaso y se mete en la estufa, durante 1h a 120°C.
9. Se deja enfriar.

4.3.3 Ensayos realizados en la fase 3

La tercera fase se ha planificado como una mezcla entre las dos anteriores. Se va a utilizar la disolución piraña ácida para hidroxilar la superficie, ya que, como se ha dicho en el punto anterior, el resultado de la disolución piraña básica no fue adecuado. Y para la funcionalización se va a crear una monocapa de epoxisilanos.

Activación de la superficie

El primer paso, la activación, no se ha producido de la forma esperada, como se observa en las figuras 36 y 37. Aunque se han repetido los mismos pasos que en la primera fase, el resultado ha sido diferente. Hay que tener en cuenta los factores que han podido alterar la reacción, ya que aunque se ha intentado realizar el proceso de la misma forma, la mano de obra y el ambiente no siempre son los mismos. Según Rodríguez-Cano A. et al. [51] el resultado que se ha obtenido ha sido a causa de la alta temperatura que ha cogido la disolución piraña al reaccionar.

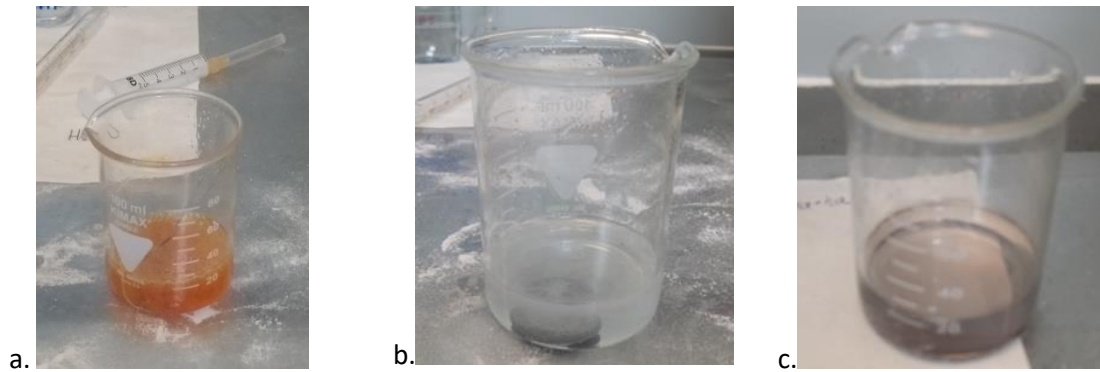


Figura 36: Disolución piraña a. 5 minutos después de meter la arandela, b. 10 minutos después y c. un rato después de haber sacado la arandela.

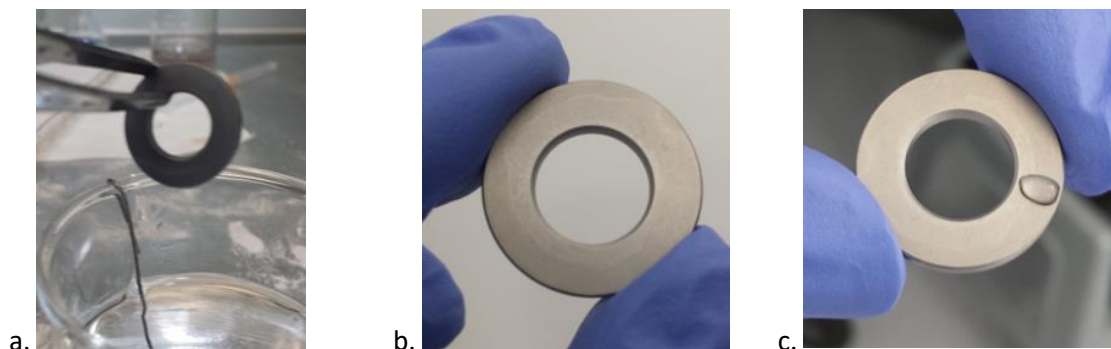


Figura 37: Aspecto de la arandela al sacarla de la disolución piraña, a. mojada y b. seca. c. Gota de agua sobre la superficie de la arandela seca.

Después de obtener este resultado, se ha decidido que el objetivo de los siguientes ensayos sea conseguir una activación óptima del sustrato. Y una vez activada la superficie, se procedería al siguiente paso.

4.3.4 Ensayos realizados en la fase 4

Esta cuarta fase está compuesta por diferentes pruebas, cada una de ellas ha sido diseñada siguiendo las indicaciones encontradas en la literatura. Con el objetivo de obtener el mejor resultado en la activación de la superficie.

Activación de la superficie

El primer objetivo ha sido comprobar si la causa de los resultados fue la alta temperatura de la disolución [51]. Para ello, se ha repetido la concentración de la disolución piraña utilizada en las fases anteriores (3:1), pero en este caso controlando la temperatura a 45°C.

Las predicciones realizadas fueron correctas, en este caso la disolución no ha cambiado de color ni se ha quemado la superficie del sustrato. Después, se han realizado diversas pruebas intentando replicar los resultados descritos por Rodríguez-Cano A. et. al. [51] y por Variola F. et. al. [52], en las que se cambian: la relación de ácido sulfúrico y peróxido de hidrogeno utilizada, y la temperatura.

Visualmente, el mejor resultado se ha dado con una relación 1:1 en la disolución de activación, manteniendo el sustrato sumergido durante diez minutos a 45°C, se observa el cambio de hidrofiliidad de la superficie en la figura 38.

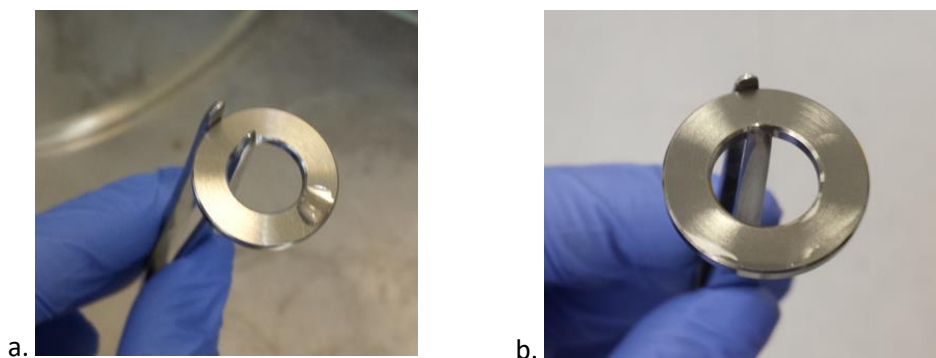


Figura 38: Gota de agua sobre la superficie de Ti6Al4V a. antes de activarla y b. después.

Para terminar con esta fase, se realizó una última prueba. En gran parte de la literatura se indica que el sustrato pasa sumergido en la disolución piraña más de 30 minutos, para conseguir que la superficie se active. En el planteamiento de este proceso, se pensó que 10 minutos serían suficientes, ya que la disolución piraña es muy agresiva, y puede terminar modificando la superficie del sustrato. Pero se quiso probar cual era el resultado si se mantenía la muestra de Ti6Al4V sumergida durante media hora.

El único cambio que se hizo en esta prueba fue el tiempo, la relación de la disolución y la temperatura se mantuvieron constantes. El resultado fue similar a las pruebas anteriores, por lo que no se vio la necesidad de dejar tanto tiempo la pieza sumergida.

4.3.5 Ensayos realizados en la fase 5

En esta quinta fase, no se han realizado cambios en los procesos empleados. Pero los ensayos realizados sí que han sido caracterizados. Esta caracterización se ha llevado a cabo con la ayuda del equipo de i+Med que se encuentra en las instalaciones disponibles en el Centro Laskaray Ikergeunea.

Activación del sustrato

Siguiendo los resultados de la fase anterior, se ha optado por activar la superficie con la disolución piraña, relación 1:1 manteniendo el sustrato sumergido durante 10 minutos a 45°C.

Es importante mencionar, que no hay que dejar mucho tiempo entre la mezcla del peróxido con el ácido sulfúrico y la inmersión del sustrato en esta disolución. Ya que las propiedades del H_2O_2 se pierden en poco tiempo.

Las pruebas realizadas en esta fase están centradas en la funcionalización del sustrato. En este punto ya se ha decidido cómo se va a activar la superficie, y falta decidir cómo se va a crear la monocapa de enlace sobre ella.

Funcionalización

Para funcionalizar la superficie se han seguido los mismos pasos de la segunda fase. Se ha utilizado un epoxisilano diluido en etanol, con una relación 2% w/v. Mediante la técnica dip-coating se inserta el sustrato en la disolución y se mantiene en ella el tiempo establecido.

La concentración de la disolución empleada se ha mantenido constante en todos los ensayos, el objetivo era analizar el resultado con diferentes tiempos de inmersión. Para comprobar si el grosor de la monocapa creada varía en función del tiempo.

Caracterización

Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Se ha utilizado un espectrofotómetro FT-IR modelo 6300 Jasco (Tokio, Japon) con analizador ATR (attenuated total reflection) de Pike (Cottonwood Drive, Madison) para analizar la superficie de las arandelas mediante una espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier. Esta técnica permite la identificación de los grupos funcionales de un compuesto. Ya que cuando una molécula absorbe radiación infrarroja, la vibración intramolecular con frecuencia igual a la de la radiación aumenta en intensidad, lo que genera señales con frecuencias que corresponden a la vibración de un enlace específico. Permitiendo evaluar el área integrada y así seguir las modificaciones que se dan en la superficie tras cada paso.

Para poder analizar la superficie al final de cada uno de los procesos, se han caracterizado cinco sustratos diferentes. Se pueden ver definidos en la tabla 7.

1.	Arandela limpia
2.	Arandela limpia + Activada (Piraña)
3.	Arandela limpia + Activada + Recubierta (monocapa epoxisilano) durante 3 horas
4.	Arandela limpia + Activada + Recubierta (monocapa epoxisilano) durante 6 horas
5.	Arandela limpia + Activada + Recubierta (monocapa epoxisilano) durante 23 horas

Tabla 7: Sustratos analizados por FT-IR

Resultado FT-IR

El resultado obtenido con el análisis por espectroscopia infrarroja no ha sido el esperado. En las señales obtenidas solo se observa vapor de agua y carbono adherido a la superficie [38], las señales tienen mucho ruido para poder ver las sustancias y enlaces deseados.

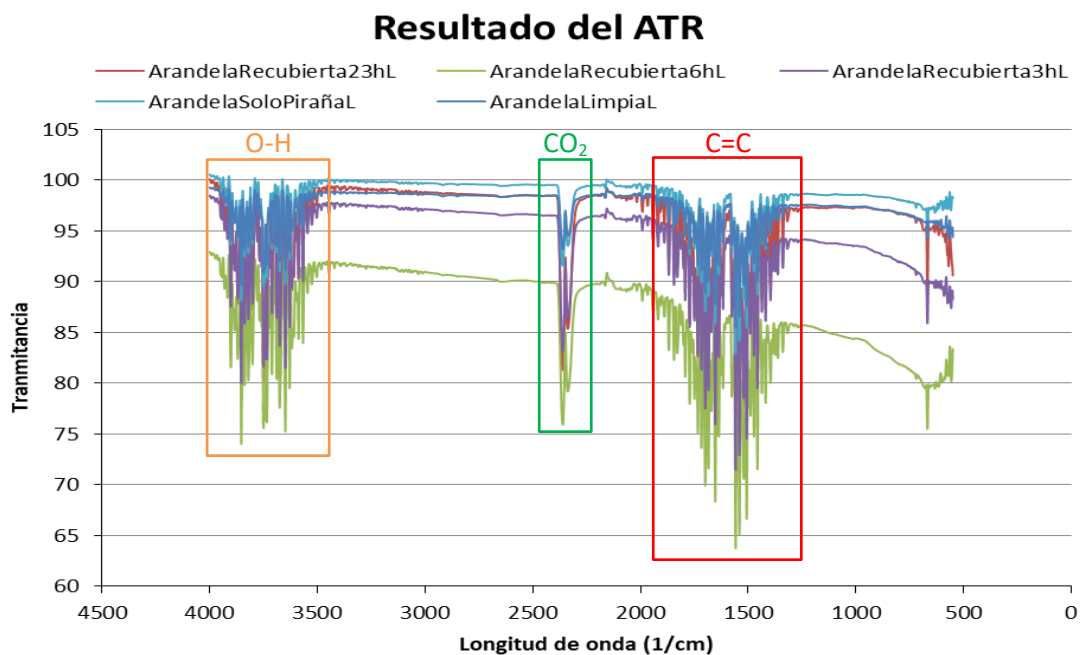


Figura 39: Espectro de las cinco arandelas obtenido con la espectroscopia infrarroja

Como se observa en la figura 39, no se puede sacar ninguna información sobre el proceso realizado de los espectros. Esto puede ser debido a que la superficie metálica ha reflejado el haz infrarrojo enmascarando lo que queremos ver, entre otras cosas.

Con el objetivo de visualizar algo, se les han hecho varias modificaciones a las señales. Como alinearlas a la misma altura o restarles el espectro de la arandela con la superficie activada a los espectros de las superficies recubiertas, pero tampoco se ha podido sacar ninguna conclusión.

Ángulo de contacto

Al no conseguir una buena caracterización de las superficies con el FTIR, se ha intentado con una nueva técnica. Gracias a la colaboración entre la empresa i+Med y la UPV/EHU, la Doctora en Química Jéscica Ruiz ha podido caracterizar la superficies por Ángulo de Contacto en el laboratorio Labquimac ubicado en el campus de Leioa.

Con este análisis se quiere comprobar si se están modificando las superficies del titanio como se cree. Las características de los sustratos que se han llevado a analizar son los siguientes.

1.	Arandela limpia
2.	Arandela limpia + Activada (Piraña)
3.	Arandela limpia + Activada + Recubierta (monocapa epoxisilano) durante 3 horas

Tabla 8: Sustratos caracterizados con Ángulo de Contacto

Resultados ángulo de contacto

El equipo empleado para realizar estas medidas es de la marca DataPhysics OCA-Series, el cual dispone del software SCA20 Versión 4.5.14 build 1064. Como se puede observar en la tabla 9, a cada una de las muestras se le han realizado diversos ensayos, para tener un resultado global de la superficie.

	Arandela Limpia	Superficie activada*	Arandela monocapa*
Medida 1	30.17	24.67	63.60
Medida 2	32.94	27.66	55.44
Medida 3	29.86	24.39	59.16
Medida 4			52.88
Media	30.99	25.57	57.77

*Superficie activada: Se ha creado una capa de hidróxidos (-OH) enlazada a la superficie.

Superficie monocapa: Se ha adherido una capa de epóxidos a la superficie

Tabla 9: Resultados de la caracterización del ángulo de contacto

De los datos obtenidos se puede decir que existe una diferencia entre las tres superficies analizadas.

- Entre la superficie de la arandela limpia y la superficie activada, existe una diferencia de pocos grados. Aunque tras pasar por la disolución piraña la superficie se ha vuelto más hidrófila, en los artículos revisados, el valor de los ángulos de contacto de metales con una superficie hidroxilada suele ser menor de 10° . En este caso no ha sido ese el resultado. La falta de hidrofiliidad puede deberse al tiempo transcurrido entre la activación de la superficie y el momento de la caracterización, ya que se han podido adherir partículas sobre ella.
- Entre la arandela con la superficie activada y la arandela con la monocapa epoxi se observa una mayor diferencia, lo que indica que sí se ha dado una modificación en la superficie, y por tanto, que se ha creado la monocapa.

Se pueden ver algunas de las imágenes obtenidas al realizar la prueba en la figura 40.

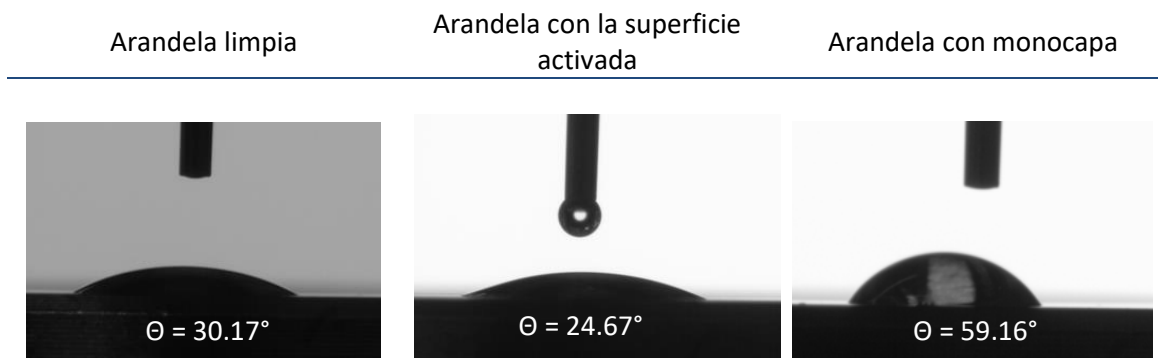


Figura 40: Imágenes de una gota de agua sobre la superficie de Ti6Al4V en la técnica de ángulo de contacto

4.3.6 Ensayos realizados en la fase 6

Una vez adherida la monocapa de silanos a la superficie de titanio grado cinco, es necesario crear una segunda capa de aminos, con la que se unirá finalmente el hidrogel. Se vuelve a utilizar la técnica dip-coating para conseguir esta capa, sumergiendo el sustrato en una disolución donde se habrá disuelto la tris(2-aminoetil)amina o (TAEA) como precursor.

En este punto se ha establecido que la monocapa de silano que une el sustrato y la capa de aminos se realizará como se describe en la fase anterior. El Ti6Al4V se mantendrá sumergido durante un día en una disolución de etanol + GOPTS (2% w/v) a temperatura ambiente.

Precursor Tris(2-aminoethyl)amine

La tris(2-aminoetil)amina conocida también como Tren o TAEA, es una poliamina. Su estructura consta de una amina terciaria central de la que penden tres grupos amino primarios (concretamente grupos aminoetil) (figura 41).

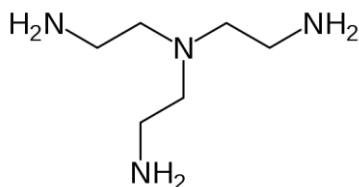


Figura 41: Estructura química de la Tris(2-aminoetil)amina

Es un líquido incoloro o amarillo con el característico olor de las aminas. Tiene su punto de ebullición a 102 °C y a -16 °C solidifica. En fase líquida posee una densidad prácticamente igual a la del agua ($\rho = 0,978 \text{ g/cm}^3$), mientras que su vapor es cinco veces más pesado que el aire. Es soluble en agua, lo que indica que su solubilidad es mayor en disolventes hidrófilos que en disolventes hidrófobos. Es un compuesto estable e higroscópico. Absorbe dióxido de carbono del aire y, al ser un compuesto básico, es incompatible con ácidos fuertes así como con agentes oxidantes enérgicos.

La TAEA es una sustancia combustible que tiene su punto de inflamabilidad a 110 °C. Es tóxica si se inhala o si se absorbe por la piel; su contacto puede irritar o causar quemaduras tanto en la piel como en los ojos.

Funcionalización

Con la primera capa sobre el sustrato, se procede a realizar el segundo paso para funcionalizarlo. Mediante dip-coating se unirá una segunda capa, esta se enlazará al epóxido situado como grupo de cola en el paso anterior y dejará una amina en su lugar, formando la estructura química de la figura 42.

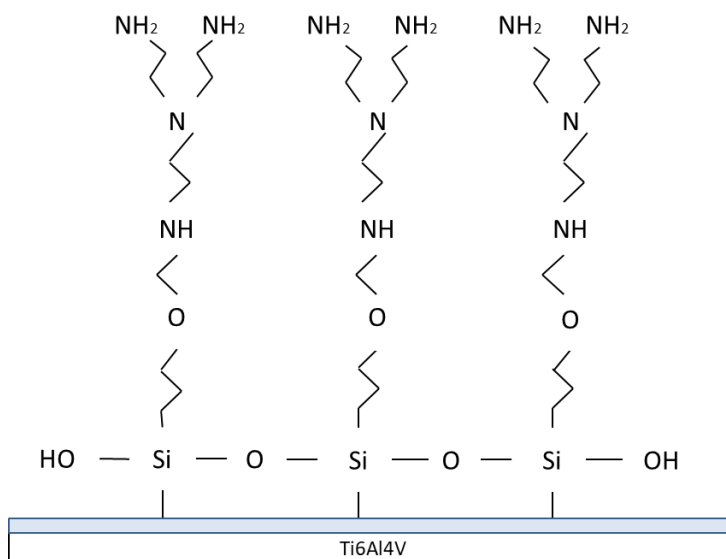


Figura 42: Estructura química de las SAM creada sobre el sustrato

Como se observa en la imagen, la cadena de unión se ha alargado. Esto facilitará el enlace entre el sustrato y el hidrogel, ya que las partículas que forman el hidrogel son muy grandes y tienen tendencia a hincharse. Las partículas del gel tendrán más margen de movimiento sin arrastrar, con ellas, la SAM creada.

Siguiendo las indicaciones del Doctor en Química José María Alonso, el soluto de aminas se ha diluido en tolueno, con una relación 5% v/v. El sustrato se ha mantenido sumergido durante 24h a una temperatura constante de 40°C.

El proceso que se ha seguido es el siguiente:

1. El sustrato se deposita en un matraz, con dos bocas, de fondo redondo.
2. Con una pipeta se toma la cantidad necesaria de etanol y se vierte sobre el sustrato.
3. Del mismo modo se coge el precursor TAEA y se une al disolvente en el matraz.
 - a. Es importante que ambas sustancias se utilicen con cuidado, con la campana encendida y la mampara bajada. También es conveniente tapar los botes lo antes posible, contra menos contacto tengan con el aire mejor
4. Cuando las dos sustancias están bien mezcladas, se sumerge el matraz en el baño de agua, precalentado a 40°C. Se dejan en el baño durante toda la noche.
5. Trascurrido este tiempo, se saca el sustrato con cuidado de la disolución, y se limpia primero con tolueno y después con etanol.
6. La pieza se seca con la ayuda del compresor de aire.

4.3.7 Ensayos realizados en la fase 7

En esta fase, siguiendo lo descrito por Stile R.A et al [53] se ha querido ir un paso más adelante. Es decir, para conseguir unir la superficie de titanio grado 5 y el hidrogel, son necesarias tres uniones: titanio-silano, silano-amina y amina-ácido hialurónico. En esta fase, se ha ensayado la forma de crear esos enlaces con una sola monocapa.

Del mismo modo, se ha investigado para acortar el tiempo de proceso y disminuir la cantidad de sustancias utilizadas. El precursor que se utiliza para conseguir este objetivo es el N-[3-(Trimetoxisilil)propil]etilendiamina (EDS). Este es un silano amino-funcional, lo que significa que la monocapa creada por este precursor basta para unir el Ti6Al4V y el hidrogel.

Precursor EDS

El N-[3-(Trimetoxisilil)propil]etilendiamina (EDS) es un agente de acoplamiento que promueve la adhesión. Al entrar en contacto con agua, los grupos trimetoxisilil se convierten por hidrólisis en trisilanol, los cuales se unen molecularmente a sustratos inorgánicos. Durante el proceso de hidrólisis, el grupo metoxi se libera como metanol y la superficie de los sustratos inorgánicos se modifica con el silano. De esta forma, se genera un acoplamiento perfecto entre las dos sustancias [53].

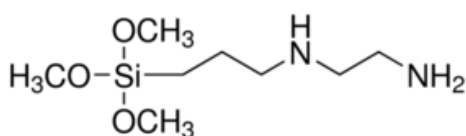


Figura 43: Estructura química de la molécula de EDS

Funcionalización

La unión de la monocapa EDS al sustrato se realiza de forma análoga al proceso descrito para el precursor GOPTS. Como disolvente del precursor se han utilizado diferentes sustancias buscando el mejor resultado posible. Siguiendo el proceso realizado por Stile R.A. et al [54] se ha preparado una disolución al 1% (v/v) de EDS en metanol anhídrido al 94% (v/v) y agua desionizada al 5% (v/v), sumergiendo las muestras durante 5 minutos.

Aun así, el mejor resultado se obtuvo con una disolución de EDS al 2% (w/v) en etanol, manteniendo el sustrato sumergido y tapado durante 22 horas. Después de la deposición de EDS, las muestras se enjuagan en etanol y, para conseguir un mejor resultado, se calientan en la estufa a 120°C durante 1h. El resultado esquemático se describe en la figura 44.

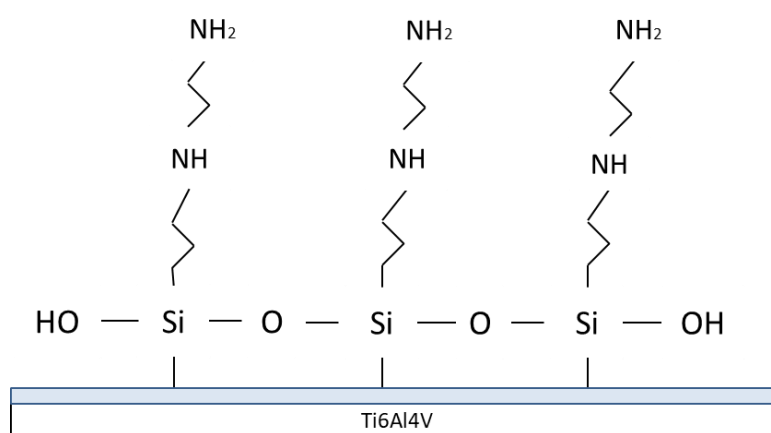


Figura 44: Monocapa del silano aminofuncional sobre la superficie de titanio grado 5

Como se observa, la monocapa está formada por una cadena donde se enlazan el silicio y la amina, quedando esta última como grupo de cola. Lo que permite la posterior unión al ácido hialurónico del hidrogel.

En este proceso, el inconveniente es la longitud de la cadena. Como se ha mencionado anteriormente, el ácido hialurónico está formado por una molécula muy grande (en comparación con las que forman la monocapa) con tendencia a hincharse. Lo que puede generar que en la unión de la monocapa y el gel no tenga sitio, y se termine rompiendo y arrastrando la monocapa del sustrato.

Ácido hialurónico

El ácido hialurónico es un glicosaminoglicano que se encuentra presente en la matriz extracelular de forma natural. Está formado por largas cadenas de los disacáridos ácido glucurónico y N-acetil glucosamina unidos por enlaces β -1,3-glicosídicos, tal como se muestra en la figura 45.

Se trata de un polímero soluble en agua, no tóxico y degradable enzimáticamente por la hialuronidasa que provoca la ruptura de los enlaces β -1,3-glicosídicos que lo componen.

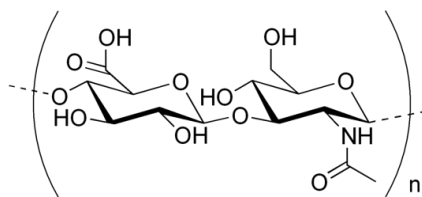


Figura 45: Estructura química de la molécula del ácido hialurónico

El ácido hialurónico es uno de los principales componentes de la matriz extracelular de los tejidos blandos y puede ser modificado químicamente para posibilitar su entrecruzamiento y obtener hidrogeles estables. En cuanto a su función biológica, participa en el proceso de curación de heridas, regula la actividad celular y proporciona puntos de unión entre distintos tipos celulares y la matriz extracelular, regulando la adhesión celular y las interacciones que se establecen entre ellas.

En el campo de la biomedicina es habitual el empleo del ácido hialurónico en el tratamiento de defectos en tejidos blandos, en sistemas de liberación controlada de fármacos y en forma de apósito o adhesivo para el tratamiento de heridas y quemaduras cutáneas [55].

4.3.8 Ensayos realizados en la fase 8

En este punto, el único paso que falta es la unión del hidrogel. Como se ha descrito a lo largo del proceso experimental, se han ido tomando decisiones en función de los resultados obtenidos en los diferentes ensayos. Para poder decidir que capa de enlace es la más óptima, es necesario analizar no solo el enlace de esta con el sustrato, también el enlace al hidrogel.

Por eso se han llevado a cabo diferentes ensayos partiendo de la fase 6 y de la fase 7, aunque de ese punto en adelante el proceso que se realiza es el mismo.

Gel de ácido hialurónico

Terminar recubriendo un dispositivo de estimulación cardíaca, o en este caso un sustrato semejante, es el objetivo de este proyecto. Para ello, hay que diluir el ácido hialurónico en un buffer de pH neutro, también es necesario mezclarlo con agentes de acoplamiento que ayuden en la unión de las moléculas del ácido hialurónico a las aminos y hay que depositar esta disolución sobre el sustrato [54].

El proceso comienza diluyendo el ácido hialurónico (HA) en el buffer. Se busca una disolución ligera, para que sea fácil de distribuir sobre el sustrato y que quede una fina capa inapreciable. Por ello se ha utilizado un ácido hialurónico de bajo peso molecular disuelto al 1% (w/v). Los pasos son los siguientes:

1. Pesar la cantidad necesaria de HA en una bandeja de pesada de aluminio.
2. En una probeta medir la cantidad de buffer calculada.
 - a. El buffer que se utiliza es el PSB (phosphate buffered saline) de pH=7.4
3. Verter la mitad del buffer en un frasco con tapa.
4. Empezar a agitar mientras se añaden los polvos de HA. El buffer sobrante se utiliza para limpiar la bandeja y que todo el ácido hialurónico caiga en el frasco.

5. Se tapa, se agita bien y se deja toda la noche en el frigorífico sobre el roller. Para conseguir una mezcla homogénea.

Una vez preparada la disolución de ácido hialurónico se puede utilizar a lo largo de diferentes días.

Cuando ya se tiene una disolución de ácido hialurónico preparada, solo falta añadirle los agentes de acople. Se van a utilizar el 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida hidrocloreto (EDC·HCl) y el N-hidroxisuccinimida (Sulfo-NHS) (figura 46 y 47). Siguiendo los resultados obtenidos por Stile R.A. et al. la relación óptima de estas sustancias es 200mM de EDC·HCl y 50mM de Sulfo-NHS [54], para que se produzca la reacción que se esquematiza en la figura 48.

Hay que mencionar que también se han realizado ensayos sin estos aditivos, pero la unión que se creaba entre el sustrato y el hidrogel era mucho más débil. Por ello se tomó la decisión de utilizarlos.

1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC·HCl)

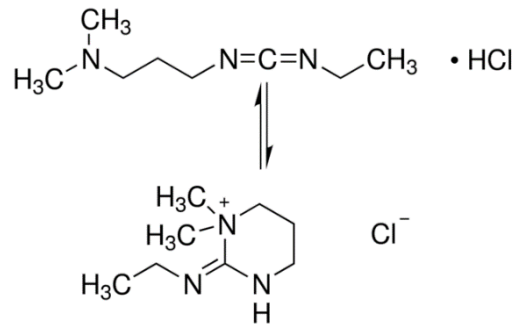


Figura 46: Estructura química del EDC·HCl

La EDC es una carbodiimida soluble en agua, obtenida generalmente con su clorhidrato. Normalmente se usa como un agente activante de grupos carboxilos para el acople de aminas primarias que generen enlaces amida. Además, esta sustancia también se puede utilizar para activar grupos fosfato. Sus usos más habituales incluyen la síntesis de péptidos, la reticulación de proteínas a ácidos nucleicos y la preparación de inmunoconjugados. En la mayor parte de los casos, esta sustancia se usa junto con la N-hidroxysulfosuccinimida (Sulfo-NHS) para incrementar la eficiencia en el acoplamiento o para crear productos estables reactivos a aminas.

Sulfo-NHS

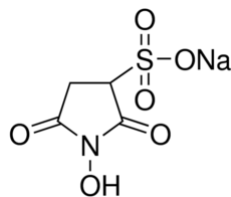


Figura 47: Estructura química del Sulfo-NHS

Esta sustancia se utiliza para preparar esteres de ácido carboxílicos reactivos a las aminas, para aplicaciones de marcado químico, crosslinking e inmovilización en fase sólida. Los carboxílicos (-COOH) reaccionan con el Sulfo-NHS al estar en presencia de carbodiimidias, como el EDC, dando como resultado un ester Sulfo-NHS semi-estable, que posteriormente reacciona con las aminas formando enlaces cruzados. Aunque su uso no es necesario para provocar esta reacción, mejora en gran medida la eficacia del acoplamiento.

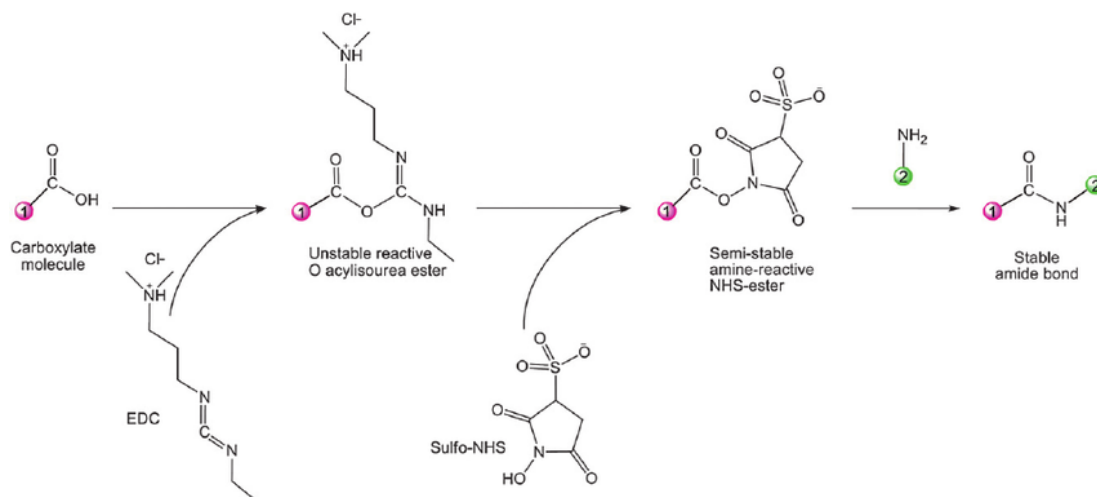


Figura 48: Esquema de la reacción que se produce [56]

El Sulfo-NHS es soluble tanto en agua como en solventes acuosos y orgánicos. Además, ayuda a preservar o incrementar la solubilidad en agua de las moléculas creadas en la activación. Aunque los esteres de Sulfo-NHS son suficientemente estables, se hidrolizan en cuestión de horas o minutos, dependiendo del contenido de agua y del pH de la solución de reacción (los esteres de NHS tienen una vida media de 4-5 horas en pH 7, de 1 hora a pH 8 y solo 10 minutos a pH 8,6). Por ello, los mejores resultados se obtienen cuando las moléculas activadas por NHS se utilizan de inmediato para reaccionar con las aminas [57].

Recubrimiento con el hidrogel

El hidrogel se prepara en el momento en el que se va a recubrir el sustrato. Es importante mencionar que esta disolución no se puede utilizar trascurridas las horas. El recubrimiento de las muestras se prepara de la siguiente manera:

1. En un tubo de ensayo, donde se va a realizar la mezcla, se pesa el Sulfo-NHS calculado.
2. En una bandeja de pesada de aluminio se pesa la cantidad de EDC·HCl y se añade al tubo de ensayo.
3. Con una jeringuilla se coge la disolución de HA necesaria y se suma a la mezcla.
4. El gel se agita en el agitador mecánico hasta que sea homogéneo.

En este punto el hidrogel estará preparado para realizar el recubrimiento.

5. El sustrato que se quiere recubrir se coloca sobre una placa Petri, para poder manejarlo con facilidad.
6. Con una micropipeta, se coge la cantidad de gel requerida y se vierte sobre la superficie.

- a. Dependiendo del tamaño de la superficie que se quiera recubrir la cantidad de gel necesaria será diferente.
7. Se tapa con otra placa y se recubre con papel de aluminio, para evitar que la muestra se contamine.
8. Se deja durante 24 horas sin tocar y tras este tiempo, la muestra se limpia en agua para quitar los restos que no se hayan adherido de forma covalente.

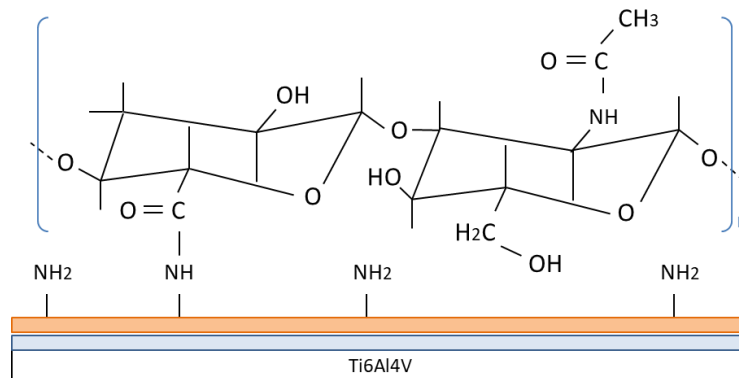


Figura 49: Recubrimiento creado sobre el sustrato de Titanio

4.4 CARACTERIZACIÓN

Como se ha descrito, se han llevado a cabo dos formas de crear la capa de unión del sustrato de Titanio grado 5 y el hidrogel. Para analizar cuál es la mejor opción se han llevado diferentes muestras a caracterizar.

La caracterización se ha realizado una vez ensayados todos los pasos. De esta forma, se ha podido ver el cambio en cada uno de ellos, desde la activación, pasando por las diferentes capas de unión hasta el enlace con el hidrogel.

Gracias a la ayuda de los compañeros de i+Med se han podido realizar diferentes pruebas de caracterización.

4.4.1 Ángulo de contacto

Esta medida se ha realizado de la misma forma que en la caracterización de la quinta fase. Se han enviado muestras de los diferentes pasos de ambos procesos, para confirmar que la modificación de la superficie realizada en cada paso es el que se cree. Las muestras enviadas se describen en la tabla 10.

1.	Arandela limpia + Activada (Piraña)
2.	Arandela limpia + Activada + Monocapa EDS (3h sumergida)
3.	Arandela limpia + Activada + Monocapa EDS + Recubrimiento hidrogel
4.	Arandela limpia + Activada (Piraña) + Monocapa GOPTS (22h sumergida)
5.	Arandela limpia + Activada (Piraña) + Capa GOPTS + Capa TAEA (20h sumergida)
6.	Arandela limpia + Activada (Piraña) + Capa GOPTS + Capa TAEA + Recubrimiento hidrogel

Tabla 10: Características de las muestras analizadas

El equipo empleado para realizar estas medidas es de la marca DataPhysics OCA-Series, el cual dispone del software SCA20 Versión 4.5.14 build 1064. Como se puede observar en la siguiente tabla 11, a cada una de las muestras se le han realizado diversos ensayos, para tener un resultado global de la superficie.

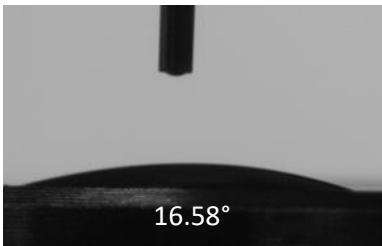
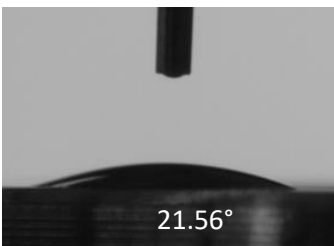
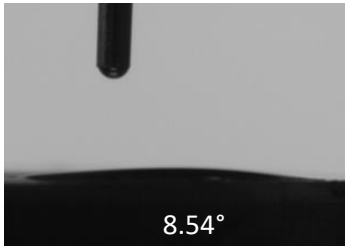
	Superficie activada	Monocapa EDS	Recubierta EDS + HA	Monocapa GOPTS	Monocapa GOPTS + TAEA	Recubierta GOPTS+TAEA+HA
	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Medida 1	16.87	14.92	8.54	63.60	20.86	16.71
Medida 2	16.58	21.56	-*	55.44	33.06	14.60
Medida 3	14.59	21.74	-*	59.16	19.54	15.27
Media	16.01	19.40	≈0	59.4	24.48	15.53

*El equipo no ha podido medir los ángulos ya que no distinguía la superficie de la gota

Tabla 11: Resultados de la caracterización por ángulo de contacto

En este caso se realiza un análisis comparativo de los dos procesos ensayados.

- El proceso para activar la superficie es igual en ambos casos, y el valor del ángulo obtenido sobre esta muestra indica que es una superficie hidrófila, al igual que en análisis anteriores.
- La superficie de las muestras 2 y 5, en el grupo de cola, tienen una amina enlazada. Las aminas son hidrófilas, por lo que el valor obtenido en ambas muestras debía ser pequeño, aunque no tanto como en la primera muestra, y parecido. Como se observa, el resultado coincide con lo esperado.
- En la superficie con una monocapa de epóxidos también se han dado unos buenos resultados. El epóxido es la sustancia más hidrófoba que se utiliza, y así se muestra en las medidas.
- Por último, entre las superficies recubiertas con hidrogel, muestras 3 y 6, se observa una gran diferencia. En el primer caso, donde el hidrogel está unido con una monocapa de EDS, se puede decir que la superficie es totalmente hidrófila. Al realizar las medidas la gota se extendía tanto que la máquina no la localizaba como gota. En el segundo, los ángulos obtenidos también indican un buen resultado, ya que son pequeños y concuerdan con lo esperado, pero no tanto como en el caso anterior.

Superficie activada	Monocapa EDS	Recubierta EDS + HA
		
Monocapa GOPTS	Monocapa GOPTS + TAEA	Recubierta GOPTS+TAEA+ HA

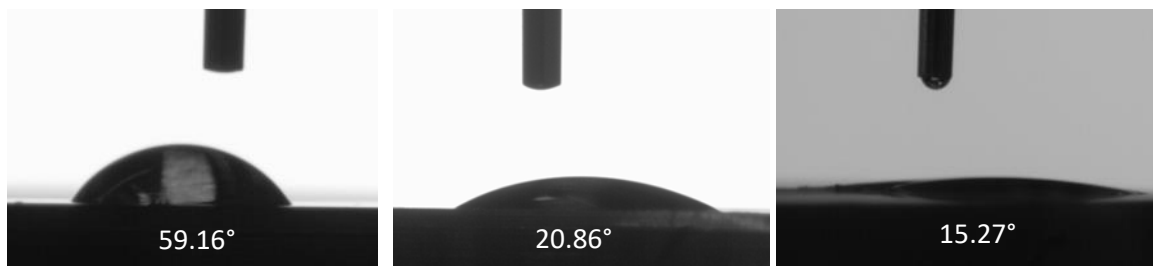


Figura 50: Imágenes de los resultados de la caracterización por ángulo de contacto en las diferentes muestras

Cómo conclusión se puede decir que en ambos procesos se da una modificación de la superficie de un paso a otro. El resultado obtenido al unir la superficie del sustrato y el hidrogel con EDS ha sido muy bueno, pero se necesitan más pruebas de caracterización morfológica y química para conocer mejor las características de las superficies finales de los diferentes procesos.

4.4.2 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Se ha utilizado un espectrofotómetro FT-IR Equinox 55 de Bruker (Billerica, USA) con un objetivo de microscopio de ángulo rasante y con polarización del haz de luz incidente. Esta configuración del espectrofotómetro permite analizar la superficie de las arandelas mediante una espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier. Las medidas fueron realizadas por el Profesor de Ikerbasque Alexander M. Bittner del CIC nanoGUNE de Donostia – San Sebastián.

1.	Arandela limpia + Activada (Piraña)
2.	Arandela limpia + Activada (Piraña)+ Monocapa EDS
3.	Arandela limpia + Activada (Piraña) + Capa GOPTS + Capa TAEA (20h sumergida)
4.	Arandela limpia + Activada (Piraña) + Monocapa EDS + Recubrimiento hidrogel
5.	Arandela limpia + Activada (Piraña) + + Capa GOPTS + Capa TAEA + Recubrimiento hidrogel

Tabla 12: Resultados de la caracterización por IR

La muestra 2 presenta en la región $\sim 3200\text{ cm}^{-1}$ (tensión N-H), en el área $1200\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$ (tensión C-N) y en la región $1000\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ las bandas de absorción propias de la superficie monocapa de EDS (figura 51).

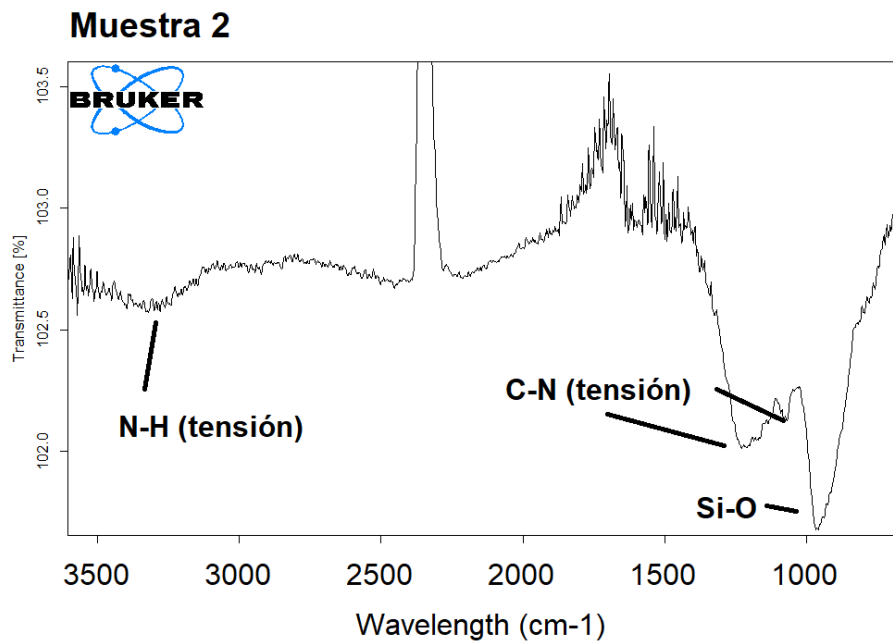


Figura 51: Espectro de infrarrojo de la muestra 2

En la muestra 3 se observan las bandas de absorción de IR que corresponden a los grupos N-H (flexión y tensión) así como al grupo Si-O del anclaje siloxano Si-O. Así mismo se observa una banda de absorción N-O debida a la oxidación en aire de la monocapa NH₂ terminada. Estos resultados nos permiten confirmar la reacción de la TAEA con los residuos epoxi de la capa GOPTS (figura 52).

Por otro lado hay que señalar que el espectro de la muestra 5 es prácticamente idéntico que el de la muestra 3, lo que sugiere que el acoplamiento del ácido hialurónico no funcionó (Figura 47).

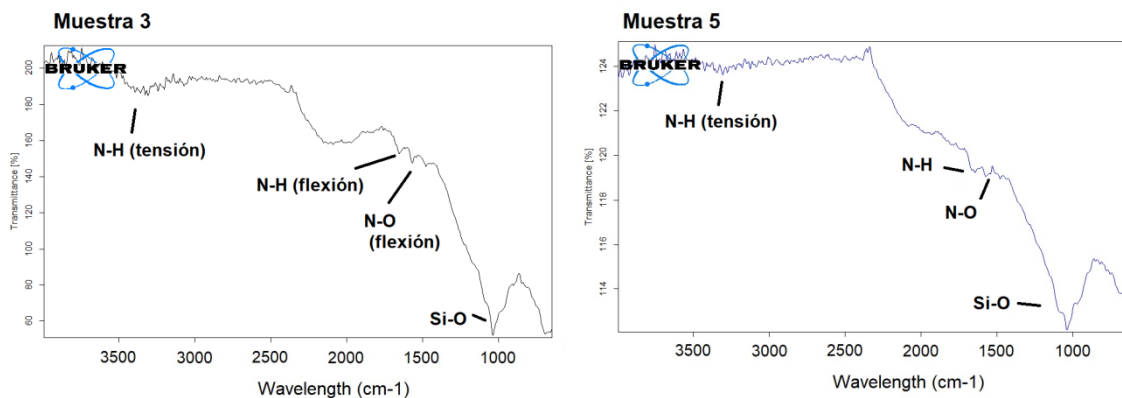


Figura 52: Espectro de infrarrojo de la muestra 3 y 5

La muestra 4 presenta en las regiones $\sim 3200\text{ cm}^{-1}$ (tensión O-H & N-H), $1700\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$ (tensión C=O y C-N) y en $1100\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ (tensión C-O) las bandas típicas de absorción en infrarrojo de ácido hialurónico entrecruzado en presencia de la carbodiimida EDC [58] lo que confirma la inmovilización exitosa de este biopolímero (figura 53).

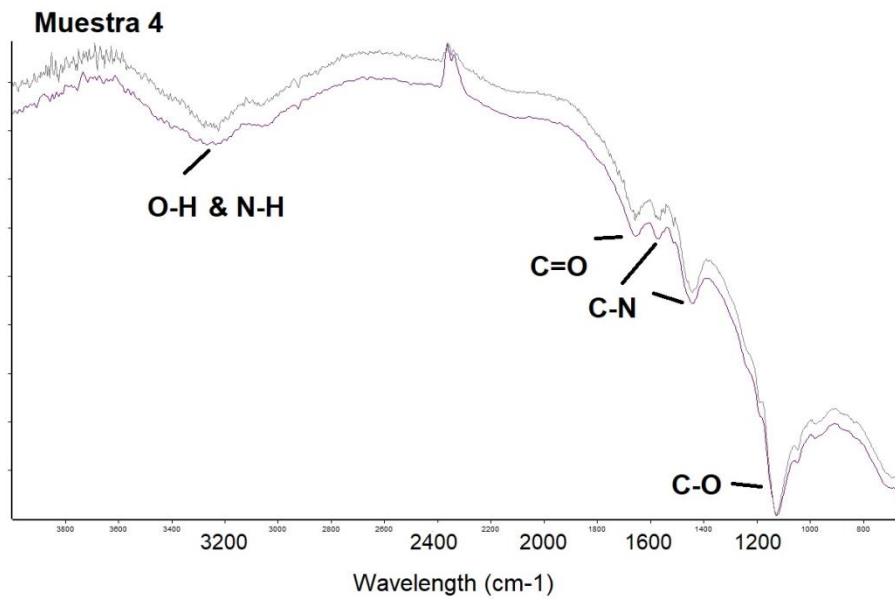


Figura 53: Espectros de infrarrojo de la muestras 4

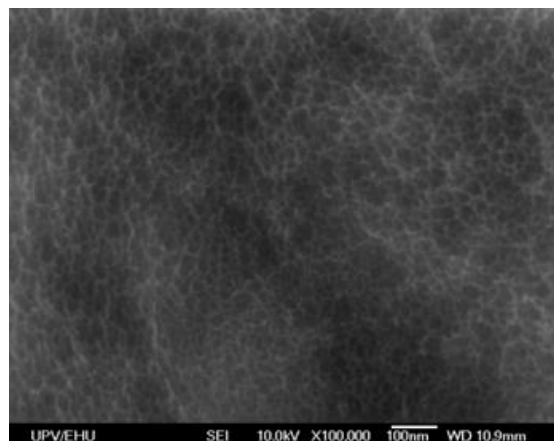
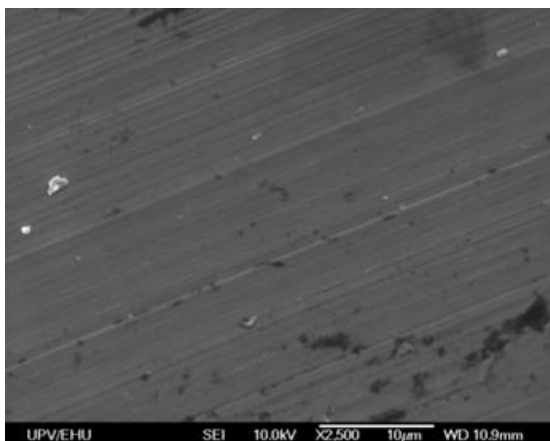
4.4.3 SEM

Para estudiar la morfología de la superficie de las muestras y conocer la estructura de las monocapas que se ha adherido al titanio, se llevaron a caracterizar cuatro muestras, de diferentes características, mediante la técnica del SEM (Scanning Electron Microscope).

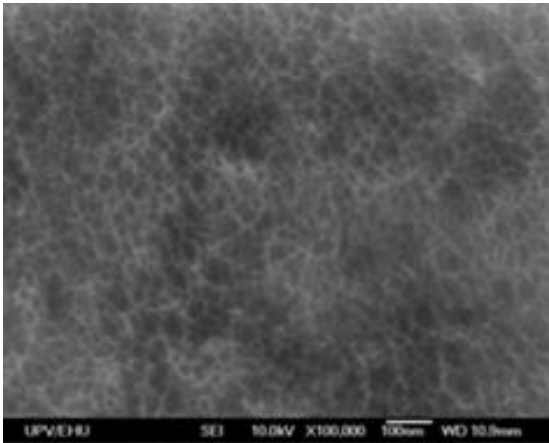
1.	Arandela sin tratamiento
2.	Arandela limpia + Activada (Piraña)
3.	Arandela limpia + Activada + Monocapa EDS (22h sumergida)
4.	Arandela limpia + Activada + Monocapa EDS + Recubierta hidrogel

Tabla 13: Características de las muestras llevadas a analizar

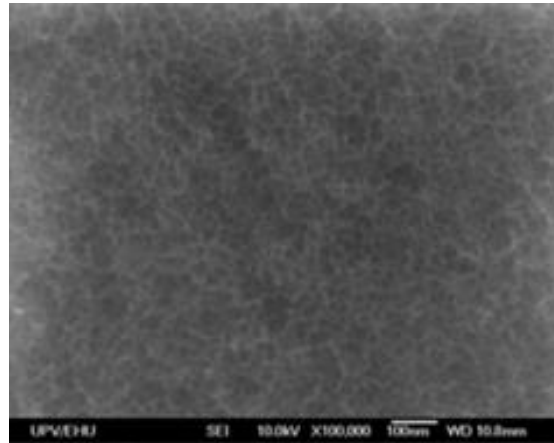
El análisis se ha realizado en el equipo FEG-SEM JEOL JSM-7000F situado en los servicios generales de investigación SGIker creados por la UPV/EHU. Se hicieron fotos en dos puntos distintos de cada muestra, utilizando los mismos aumentos para cada caso x2.500, 10.000, 25.000 y 100.000. El mayor aumento es el que más información ha dado. De las imágenes obtenidas, las más relevantes son las que se muestran en la figura 54.



Muestra 1



Muestra 2



Muestra 3

Muestra 4

Figura 54: Imágenes de las superficies obtenidas con el SEM

De las imágenes obtenidas se pueden sacar las siguientes conclusiones:

- La primera muestra se ha analizado para utilizarla como referencia. A esta arandela no se le ha realizado ningún tratamiento, y como se observa, no tiene ninguna capa sobre la superficie.
- En las imágenes de la segunda muestra se ve un cambio respecto a la primera. Sobre la superficie se observa la morfología de una capa. Al realizar la activación de la superficie, como ya se ha descrito, lo que se hace es generar una capa de óxido sobre esta. Esa es la capa que se visualiza [49].
- En la tercera muestra se ve la estructura que forma la monocapa de EDS, muy parecida a la anterior. Aun así, se puede decir que la capa se ha creado, como se esperaba.
- Por último, la superficie de la muestra 4 está recubierta con una monocapa de EDS y un hidrogel de ácido hialurónico. El aspecto de la morfología de esta superficie y de la superficie de la muestra 3 es muy similar. Esto ocurre porque la monocapa creada es la misma y el hidrogel no se ve en esta prueba. El hidrogel es una sustancia que se amolda a la forma de la superficie donde se deposita, por lo que ha podido adquirir la misma morfología de la capa de debajo.

5. FABRICACIÓN PROTOTIPO

5.1 INTRODUCCIÓN

En este capítulo se describe el prototipo final definido a lo largo de todas las pruebas de ensayo, la mayoría descritas en el proceso experimental. A lo largo de los últimos meses se han ido tomando decisiones, paso a paso, en función de los resultados y se ha optado por un procedimiento concreto para conseguir el prototipo que cumple el objetivo marcado.

En los siguientes puntos se describe de forma esquemática este procedimiento, se detallan de forma ordenada y se explica que es lo que se busca, y que es lo que ocurre, en cada uno de los pasos.

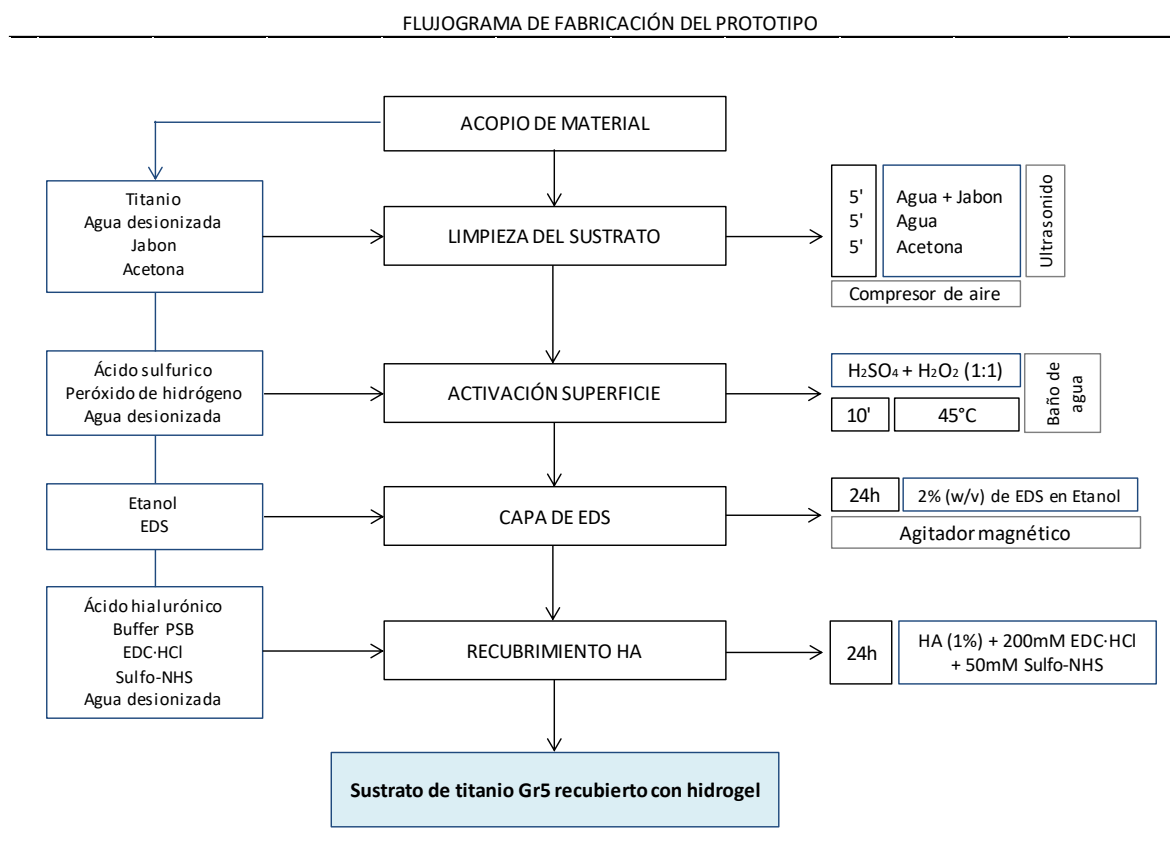


Figura 55: Flujograma de fabricación del prototipo

5.1 DISEÑO DEL PROTOTIPO

Siguiendo el flujograma que se muestra en la figura 55, en este apartado se explica cada paso de la fabricación, de una forma más concreta y visual que en el proceso experimental. Por otro lado, en el Anexo I se describe el mismo proceso con la ayuda de imágenes obtenidas en los ensayos.

La descripción se centra en los pasos fundamentales del proceso, en los que se ha experimentado y se han debatido las diferentes opciones. Ya que, el acopio de material y la limpieza del sustrato son procesos que ya se han descrito y que pueden ser modificados.

5.1.1 Activación de la superficie del sustrato

Para terminar de limpiar y activar la superficie del sustrato de Titanio grado 5, se ha optado por la Disolución Piraña. Esta se crea mezclando ácido sulfúrico (95-98% EPR Ph. Eur. USP, Labbox) y peróxido de hidrógeno (30% v/v EPR, labbox). Tras probar con diferentes parámetros en los ensayos, el mejor resultado se ha obtenido con una relación (1:1), enfriando la disolución a unos 45°C de temperatura y dejando el sustrato sumergido durante 10 minutos [51].

Es importante limpiar la superficie al extraerla de la disolución, ya que los restos de la disolución piraña pueden ser peligrosos. La limpieza se realiza sumergiendo el sustrato en un par de vasos con agua desionizada, como se ha explicado en la fase 1 del proceso experimental.

5.1.2 SAM de enlace entre el sustrato y el hidrogel

Una vez que la superficie está hidroxilada, se adhiere la capa de silano y de aminos. El sustrato se recubre con un silano aminofuncional, utilizando una disolución de 2% (w/v) (N-[3-(Trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine) (97%, Sigma Aldrich) disuelto en etanol (Etanol Absoluto EPR Ph. Eur, Labbox). El sustrato se mantiene sumergido unas 24 horas, intentando crear una atmosfera de nitrógeno, y que entre en contacto con el aire lo menos posible.

Para darle a la unión surgida entre las partículas de la monocapa más estabilidad, se calienta el sustrato en la estufa, durante 1 hora a 120°C.

5.1.3 Recubrimiento de Titanio Gr.5 con hidrogel

Para recubrir el sustrato con hidrogel el primer paso es crear el gel. El gel está formado por una disolución de ácido hialurónico (HA) y dos agentes reticulantes. Se utiliza un ácido hialurónico de bajo peso molecular disuelto al 1% en buffer PSB (pH=7.4) fabricado en el laboratorio de i+Med. Una vez la disolución de HA es homogénea se añaden los reticulantes, el EDC·HCl (purum, ≥98.8%(AT), Sigma-Aldrich) con una concentración de 200mM y el Sulfo-NHS (≥98% (HPLC), Sigma-Aldrich) con una concentración de 50mM.

El sustrato recubierto con la SAM de silano y aminos se coloca en una placa fácil de manejar y mediante la técnica drop-coating el hidrogel se vierte sobre la superficie. Se vierten alrededor de 100 µL por cada 2.35 cm² de superficie, o lo que es lo mismo 42.5µL/ cm².

Se deja reposar durante 24 horas, intentando que no se contamine. Trascurrido este tiempo el sustrato recubierto se limpia en agua para quitar el hidrogel que no se ha unido con enlaces covalentes.

5.2 ESQUEMA DE FABRICACIÓN

El esquema del proceso químico que se lleva a cabo en la fabricación se muestra en la siguiente figura.

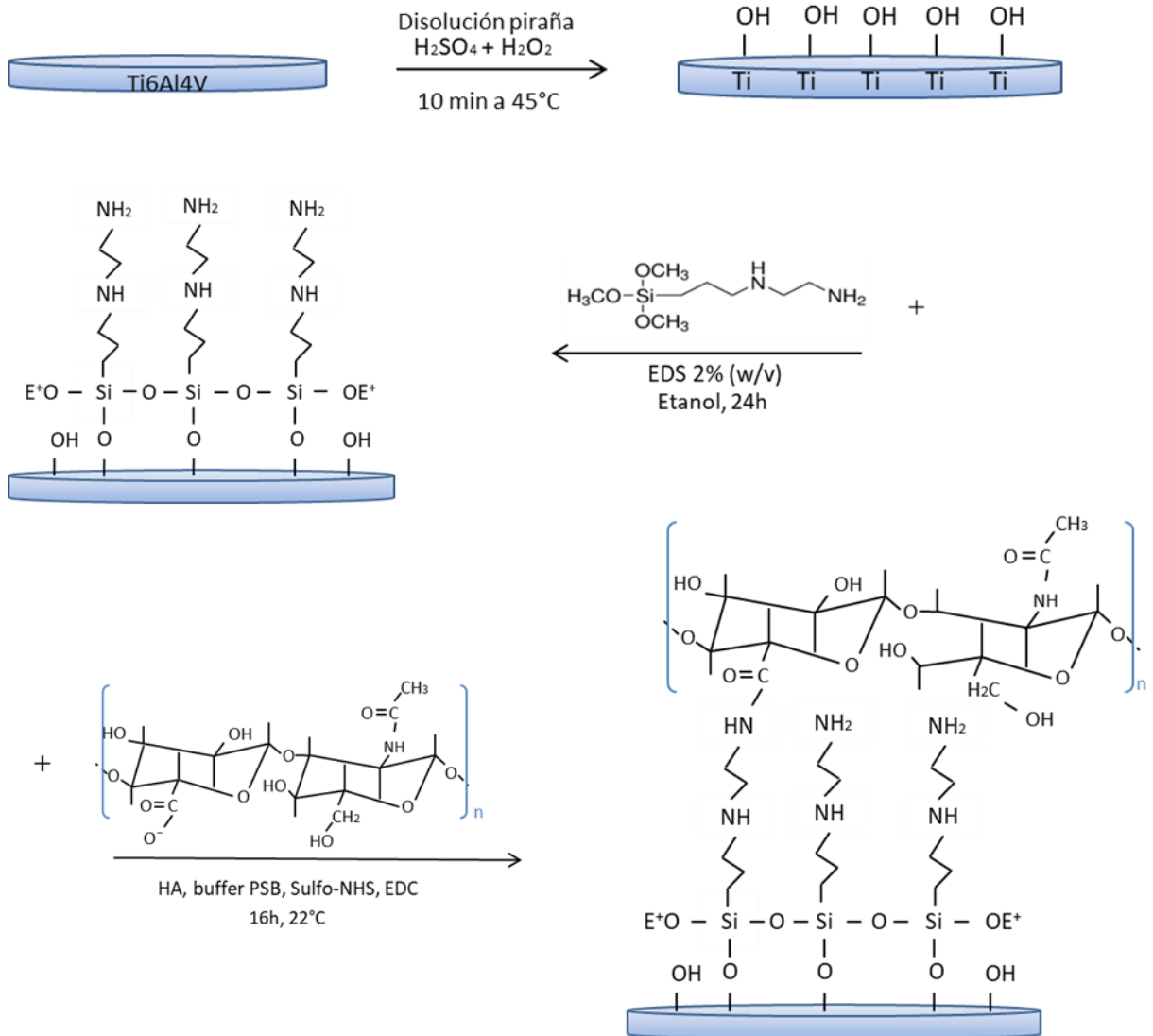


Figura 56: Esquema del proceso químico que sucede

6. MEMORIA ECONOMICA

La realización de un recubrimiento de hidrogel para los dispositivos de estimulación cardíaca supone un gasto económico, tanto a nivel de equipamiento y material empleados como por el tiempo dedicado al desarrollo de cada uno de los pasos. En este capítulo se detalla la memoria económica de los diferentes procesos que se han llevado a cabo, los cuales se describen a continuación:

- Por una parte se detallan los gastos que genera realizar el desarrollo de los recubrimientos biocompatibles utilizando los precursores GOPTS y TAEA, proceso que se ha utilizado para definir el prototipo.
- Por otra parte, se detallan los gastos generados al desarrollar el recubrimiento biocompatible con el precursor EDS. Aunque no se ha escogido este como prototipo final, es un proceso que se ha realizado a lo largo del proyecto y que también ha tenido buenos resultados.

Se va a realizar la memoria económica de cada proceso por separado, pero ambas seguirán el mismo patrón. Para poder definir los gastos de una forma simple, se van a dividir en dos tablas. Por un lado se contabilizará el coste del material empleado y por otro lado se contabilizará el coste de personal y/o equipamiento, donde a cada fase se le sumará el coste de la primera tabla.

Es importante definir algunos de los apartados:

- **Tiempo:** Dentro de este parámetro se ha establecido el tiempo necesario para llevar a cabo cada paso, en función de la dedicación personal o del equipamiento. Puede ocurrir que el tiempo indicado corresponda a la duración de la tarea por parte del operario, o en caso de no ser un proceso dependiente corresponderá al uso del equipamiento o al tiempo de reacción necesario. En los apartados contiguos se indica a cuál de las opciones pertenece.
- **Equipamiento/Persona:** En este apartado se contabilizará el coste generado por el personal, por el equipamiento o por la suma de ambos. Si la tarea es llevada a cabo por un operario se contabilizará el tiempo que este ha dedicado, si el proceso no es dependiente se contabilizará el gasto realizado por el equipamiento y si es un paso que requiere tanto de personal como de equipamiento se contabilizará una suma de ambos gastos.

El coste de mano de obra directa es de 22€/h y el coste del uso de maquinaria es de 10€/h, estos costes han sido facilitados por la empresa i+Med, establecidos desde la dirección para cada uno de los trabajadores y tipo de maquinaria.

Hay que mencionar que el coste que se va a describir pertenece a la realización de una única muestra. Aunque, en la realización de la mayoría de los ensayos que se han llevado a cabo se ha aprovechado para recubrir más de una pieza. También, es importante decir, que el tiempo dedicado a cada procedimiento suele solaparse en algunos pasos, por lo que la suma de todos los tiempos no es el tiempo real del proceso.

6.1 COSTE DEL RECUBRIMIENTO UTILIZANDO LOS POLIMEROS GOPTS Y TAEA

MATERIAL	CANTIDAD UTILIZADA	PRECIO BOTE	COSTE (€)
Ácido sulfúrico	15 mL	6.13 €/L	0.092
Peróxido de hidrógeno	15 mL	7.4 €/L	0.111
Sodio hidróxido	22.5 g	24.2 €/500g	1.089
Acetona	10 ml	16.65 €/5L	0.033
Etanol	60 mL	18.75 €/L	1.125
GOPTS	0.75 mL	46.3 €/0.1L	0.347
Tolueno	19.5 mL	15.51 €/L	0.302
TAEA	0.5 mL	46.25 €/10mL	2.312
EDC	3.38 mg	21.75 €/g	0.073
Sulfo-NHS	1.085 mg	73.1 €/0.25g	0.317
GASTO TOTAL:			5.083

Tabla 14: Gasto de material en el proceso de recubrimiento mediante GOPTS y TAEA

Como se ha descrito en los puntos anteriores, en la tabla 14 se detalla la cantidad de material utilizado y el coste total de este. Recubrir una pieza, de 2.35 cm² de superficie, utilizando los polímeros GOPTS y TAEA como capa de enlace entre el sustrato y el hidrogel supone un coste de 5,083€.

A continuación se detalla el coste total de cada paso, se contabilizan tanto el material como la mano de obra y/o equipo utilizados.

FASE	TIEMPO UTILIZADO			COSTE (€)		
	PERSONA	EQUIPO	TIEMPO(min)	MATERIAL	EQUIPO/ PERSONA	TOTAL
Preparación						
Lavado pieza	Sí	Sí	15	0.03	2.50	2.53
Secado pieza	Sí	No	5	0.00	1.83	1.83
Activación de la superficie						
Disolución piraña	Sí	Sí	10	0.20	5.33	5.54
Inmersión pieza	No	Sí	10	0.00	1.67	1.67
Limpieza	No	No	7	0.00	0.00	0.00
Secado	Sí	Sí	4	0.00	1.47	1.47
Neutralización						
Disolución NaOH	No	Sí	15	1.09	2.50	3.59
Mezcla	Sí	Sí	30	0.00	16.00	16.00
Monocapa silano						

Disolución GOPTS	Sí	Sí	15	1.10	5.50	6.60
Inmersión pieza	No	Sí	1320	0.00	220.00	220.00
Limpieza	No	No	4	0.19	0.00	0.19
Secado	Sí	Sí	6	0.00	2.20	2.20
Estufa	No	Sí	60	0.00	10.00	10.00
Monocapa amina						
Disolución TAEA	Sí	Sí	10	2.46	3.67	6.13
Inmersión pieza	No	Sí	1200	0.00	200.00	200.00
Limpieza	No	No	6	0.37	0.00	0.37
Secado	Sí	Sí	4	0.00	1.47	1.47
Recubrimiento hidrogel						
Mezcla hidrogel	Sí	No	10	0.39	3.67	4.06
Drop-coating	Sí	No	5	0.00	1.83	1.83
Reposo	No	No	1440	0.00	0.00	0.00
Pieza recubierta						
Limpieza	Sí	Sí	10	0.00	3.67	3.67
Secado	Sí	Sí	6	0.00	2.20	2.20
GASTO TOTAL:						504.53

Tabla 15: Gastos generados en el proceso de recubrimiento

El gasto total asciende a 504,53€. De este total el 1.01% supone gasto de material y el 98.99% al gasto por mano de obra y maquinaria utilizada. Este gasto se optimiza al realizar el recubrimiento de varias piezas simultáneamente, como se ha estado realizando a lo largo de todo el proyecto.

6.2 COSTE DEL RECUBRIMIENTO UTILIZANDO EL POLIMERO EDS

MATERIAL	CANTIDAD UTILIZADA	PRECIO BOTE	COSTE (€)
Ácido sulfúrico	15 mL	6.13 €/L	0.092
Peróxido de hidrógeno	15 mL	7.4 €/L	0.111
Sodio hidróxido	22.5 g	24.2 €/500g	1.089
Acetona	10 ml	16.65 €/5L	0.033
Etanol	30 mL	18.75 €/L	1.125
EDS	0.4 mL	80.8 €/100mL	0.323
EDC	3.38 mg	21.75 €/g	0.073
Sulfo-NHS	1.085 mg	73.1 €/0.25g	0.317
GASTO TOTAL:			5.626

Tabla 16: Gastos de material en el proceso de recubrimiento con EDS

En este segundo caso, en la tabla 16, se detalla la cantidad de material utilizado y el coste total de este al usar el polímero EDS como monocapa de enlace. Recubrir una pieza, de 2.35 cm² de superficie, supone un coste de 5,626€. Casi el mismo que en el proceso anterior.

A continuación se detalla el coste total de cada paso, se contabilizan tanto el material como la mano de obra y/o equipo utilizados.

FASE	TIEMPO UTILIZADO			COSTE (€)		
	PERSONA	EQUIPO	TIEMPO(min)	MATERIAL	EQUIPO/ PERSONA	TOTAL
Preparación						
Lavado pieza	Sí	Sí	15	0.03	2.50	2.53
Secado pieza	Sí	No	5	0.00	1.83	1.83
Activación de la superficie						
Disolución piraña	Sí	Sí	10	0.20	5.33	5.54
Inmersión pieza	No	Sí	10	0.00	1.67	1.67
Limpieza	No	No	7	0.00	0.00	0.00
Secado	Sí	Sí	4	0.00	1.47	1.47
Neutralización						
Disolución NaOH	No	Sí	15	1.09	2.50	3.59
Mezcla	Sí	Sí	30	0.00	16.00	16.00
Monocapa EDS						
Disolución EDS	Sí	Sí	15	0.51	5.50	6.01
Inmersión pieza	No	Sí	1440	0.00	240.00	240.00
Limpieza	No	No	4	0.09	0.00	0.09
Secado	Sí	Sí	6	0.00	2.20	2.20
Estufa	No	Sí	60	0.00	10.00	10.00
Recubrimiento hidrogel						
Mezcla hidrogel	Sí	No	10	0.39	3.67	4.06
Drop-coating	Sí	No	5	0.00	1.83	1.83
Reposo	No	No	1440	0.00	0.00	0.00
Pieza recubierta						
Limpieza	Sí	No	10	0.00	3.67	3.67
Secado	Sí	Sí	6	0.00	2.20	2.20
GASTO TOTAL:						310.31

Tabla 17: Gastos generados en el proceso de recubrimiento

El gasto total del segundo proceso asciende a 310,31€. De este total el 1.81% supone gasto de material y el 98.19% al gasto por mano de obra y maquinaria utilizada. La relación entre los

costes es muy parecida al proceso anterior, y en este caso el gasto también se optimiza al realizar el recubrimiento de varias piezas simultáneamente.

6.3 RESUMEN Y COMPARACIÓN PRESUPUESTOS

El gasto que supone recubrir una superficie de titanio grado 5 con los polímeros GOPTS y TAEA, implica un coste en material, personal y equipamiento, que se puede resumir de la siguiente manera:

Personal/horas empleadas _____	49.50€
Equipos/horas empleadas _____	449.95€
Material _____	5.08€

El gasto de este proceso asciende a la cantidad total de quinientos cuatro euros con cincuenta y tres céntimos.

Por otro lado, el gasto que supone recubrir la misma superficie de titanio grado 5 con el polímero EDS como monocapa de enlace entre el sustrato y el hidrogel, implica un coste en material, personal y equipamiento que se resume a continuación:

Personal/horas empleadas _____	37.03€
Equipos/horas empleadas _____	270.23€
Material _____	5.63€

El gasto de este proceso asciende a la cantidad total de trescientos doce euros con ochenta y nueve céntimos.

El coste del segundo proceso analizado es menor que el del proceso empleado para definir el prototipo de fabricación, porque requiere de menos pasos, por lo tanto de menos tiempo de mano de obra y menos tiempo de maquinaria empleada. Además, los resultados obtenidos en la caracterización también han sido mejores en este segundo proceso, por eso se ha optado por este proceso para la fabricación del prototipo.

Fdo: Nagore Martínez de Cestafe Rodríguez

7. CONCLUSIONES

A nivel personal, realizar este proyecto en i+Med me ha aportado un gran conocimiento en cuanto a el funcionamiento interno y el modo de trabajar en una empresa. Tanto a nivel general como en el proyecto en particular, he comprendido la importancia de la conexión entre los diferentes departamentos (ingeniería, laboratorio, calidad, compras, i+D, etc.) para poder llevar adelante una empresa de estas características y obtener el mejor resultado posible.

En cuanto a este proyecto en particular, en el que he estado trabajando a lo largo de seis meses, me ha proporcionado conocer mucho más de cerca los sectores de la biomedicina y de la química, ya que, teniendo en cuenta los detalles del proyecto, la inmersión en ambos sectores ha sido imprescindible para llevarlo a cabo. En todo momento se ha trabajado bajo la normativa vigente respecto al producto sanitario (UNE-EN ISO 13485:2016) y teniendo siempre en mente que el producto final está clasificado como producto sanitario de clase III.

Ha sido fundamental la investigación que se ha realizado a lo largo de todo el proyecto para conocer la intervención quirúrgica, la forma de trabajar y la tecnología para la que este proyecto está enfocado. Conocer, también, las características de los distintos dispositivos de estimulación cardíaca, y la causa de las infecciones que genera su implantación, ha sido imprescindible para comenzar a trabajar y poder escoger la mejor tecnología y las mejores técnicas disponibles para conseguir un buen resultado final.

Una vez seleccionada la tecnología con la que llevar a cabo el recubrimiento y la materia prima con la que se ha trabajado, la realización de diversas pruebas ha sido fundamental para encontrar el camino más adecuado, superando los resultados inesperados gracias a la literatura encontrada.

El proceso que se ha llevado a cabo en este proyecto ha sido un acierto, puesto que se han ido apreciando los avances en cada una de las fases, sin necesidad de muchos ensayos ni muchas pruebas de caracterización. Activar la superficie gracias a la disolución piraña y crear una monocapa de enlace con el tensioactivo EDS, para unir el hidrogel al sustrato, ha generado que el resultado haya sido óptimo y eficaz.

Además, hay que mencionar, que se puede llevar a cabo el recubrimiento del generador de un dispositivo de estimulación cardíaca por un valor menor. Ya que, si se compara el precio señalado en la memoria económica y el coste sanitario de un explante de dispositivo a causa de una infección, la diferencia es apreciable.

Como conclusión final, puedo decir, que el desarrollo del proyecto me ha llevado a lograr el objetivo fijado desde un principio, conseguir un recubrimiento polimérico biocompatible para los dispositivos de estimulación cardíaca. Aunque es cierto, que con el tiempo disponible, solo se han dado los primeros pasos, y todavía queda camino para llegar al prototipo final.

8. LÍNEAS FUTURAS

Como se ha dicho en el apartado anterior, todavía queda camino por recorrer para llegar al prototipo final. Los resultados obtenidos en los ensayos de caracterización de este proyecto han sido buenos, y por ello, en i+Med existe la intención de seguir trabajando en él.

El primer paso estará enfocado a analizar con más detalle los resultados obtenidos. Para ello se modificará el sustrato de titanio grado cinco por uno más óptimo, que permita realizar análisis con más facilidad y conseguir unos resultados más certeros y, centrados en el recubrimiento. Se realizarán estudios de estabilidad y de liberación controlada, así como ensayos microbiológicos.

También, se buscará mejorar la adherencia del hidrogel al sustrato. Ya que, aunque se haya conseguido crear ciertos enlaces, éste tiene que permanecer en un ambiente agresivo largos periodos de tiempo sobre el sustrato. Además, no hay que olvidar la doble función que se espera conseguir con este recubrimiento. Una vez conseguido que el hidrogel permanezca sobre el dispositivo en el medio biológico, se buscará que sea capaz de administrar de forma controlada sustancias activas, y así conseguir un verdadero desarrollo tecnológico en el sector de la implantología biomédica.

La aplicación sistemática de antibiótico actual supone una medicalización del organismo completo, lo que puede causar un deterioro de la función renal, entre otros, al tener que procesar grandes cantidades de fármacos. El uso de un vehículo que permita la administración directa de un antibiótico en la zona que se desea proteger tiene como consecuencia una disminución de la dosis necesaria, de los efectos secundarios y además, aumenta la efectividad del tratamiento, suponiendo un menor coste económico al necesitar de una menor cantidad de fármaco. Así mismo, generar recubrimientos biocompatibles capaces de degradarse en el medio biológico es de gran interés, ya que se conseguirá reducir la cantidad de agentes externos dentro del cuerpo una vez solucionado el problema.

Finalmente, teniendo en cuenta que los dispositivos son híbridos, una vez que se obtenga el recubrimiento de la parte metálica, será necesario realizar el mismo proceso con la parte de poliuretano. Para al fin, poder poner a disposición de los pacientes y especialistas este nuevo sistema. Y seguir avanzando e investigando para poder ampliarlo a los diferentes implantes disponibles en el mercado.

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J.Yu, M.NordmanMontelius, and M.Paulsson, "Adhesion of coagulase-negative staphylococci and adsorption of plasma proteins to heparinized polymer surfaces," *Biomaterials*, vol. 15, pp. 805–814, Agosto 1994.
- [2] T. KÜHME, B. ISAKSSON, and L.G. DAHLIN, "A systematic quantitative and qualitative study of bacterial growth in sternal wounds in cardiac surgery patients," *Journal of Pathology, microbiology and immunology*, vol. 115, pp. 1001–1007, Oct. 2007.
- [3] E. Gutiérrez Carretero, E. Arana Rueda, and J. Manuel Lomas Cabezas, "Infecciones en dispositivos de estimulación cardiaca: diagnóstico y tratamiento en un centro de referencia," *Revista Española de cardiología*, vol. 70, pp. 355–362, Oct. 2016.
- [4] Osakidetza, TARIFAS PARA FACTURACIÓN DE SERVICIOS SANITARIOS Y DOCENTES DE OSAKIDETZA PARA EL AÑO 2018, vol. Tarifas 2018. 2018.
- [5] Sociedad Española de Cardiología, Cuadernos de Estimulación Cardiaca - Número 28, vol. 10. Medtronic Ibérica S.A, 2017.
- [6] J. Renteria, «Desarrollo de un recubrimiento compatible con diferentes métodos de fabricación y materiales». jun-2017.
- [7] I. Sánchez Pérez y A. Hernández Madrid, «Nociones básicas sobre marcapasos y desfibriladores automáticos implantables», Hospital Universitario Ramón y Cajal Madrid, pp. 491-508.
- [8] Dr. C. Arowne Carrasco y Dr. A. Villeda, «Marcapasos Cardíacos Permanentes», *Revista Médica Hondureña*, vol. 68, sep. 2000.
- [9] N. Jaramillo, «GUIA PARA PACIENTES CON MARCAPASO», *Cardiocaribe.com*, jun-2001.
- [10] «Overview of Biomaterials and Their Use in Medical Devices», en *Handbook of Materials for Medical Devices*.
- [11] V. Sáenz de Viteri y E. Fuentes, «Titanium and Titanium Alloys as Biomaterials», *INTECH*, may 2013.
- [12] «Implantes Dentales», Centro Clínico, 2016.
- [13] J.F. Gil y J.A Planell, «Aplicaciones biomédicas del titanio v sus aleaciones», *Biomecánica-Originales*, pp. 34-42, 1993.
- [14] F. Melini de Paz, «Calidad y cualidad del titanio para su uso en cirugía ortopédica», en *Biomecánica*, vol. 8, Hospital Universitario de Valme, Sevilla, 1997, pp. 64-70.
- [15] A. Burke y N. Hasirci, «Polyurethane in Biomedical Applications», *Springer, Boston, MA*, vol. 553, 2004.
- [16] W. Wang y C. Wang, «Polyurethane for biomedical applications: A review of recent developments», pp. 115-151, mar. 2014.
- [17] J. I. Wright, «Using Polyurethanes in Medical Applications», mar-2006.
- [18] N. A. Peppas y A. S. Hoffman, «Biomaterials Science an Introduction to Materials in Medicine Ti and hydrogels», pp. 166-177.
- [19] F. J. Romero Gabilan, «Recubrimientos bioactivos. Estudio del efecto de la variación del contenido en TEOS en una red vitrea de alcóxidos de silicio», Universidad Jaume I, Madrid, 2013.
- [20] P. Van de Wetering, A. T. Metters, y R. G. Schoenmakers, «Poly(ethylene glycol) hydrogels formed by conjugate addition with controllable swelling, degradation, and release of pharmaceutically active proteins.», *Journal of Controlled Release*, vol. 102, pp. 619-627, feb. 2005.
- [21] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*. Elsevier Science, 2010.
- [22] X. Liu, P. K. Chu, y C. Ding, «Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications», *Materials Science and Engineering*, vol. 47, pp. 49-121, ene. 2005.

- [23] B. Palla Rubio, «Recubrimientos antibacterianos basados en silicio para implantes dentales», UPV/EHU, 2016.
- [24] L.A. Dobrzański y M. Szindler, «Sol gel TiO₂ antireflection coatings for silicon solar cells», *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering*, vol. 52, pp. 7-14, may 2012.
- [25] C. García y E. Mendoza, «RECUBRIMIENTOS POR SOL-GEL SOBRE SUSTRATOS DE ACERO INOXIDABLE, REVISIÓN DEL ESTADO DEL ARTE», *DYNA*, vol. 74, n.º 153, pp. 101-110, feb-2007.
- [26] A. Mahapatro, «Bio-functional nano coatings on metallic biomaterials», *Materials Science and Engineering C*, vol. 55, pp. 227-251, oct. 2015.
- [27] S. P. Pujari, L. Scheres, y A. T. M. Marcelis, «Covalent Surface Modification of Oxide Surfaces», *Angewandte Chemie*, vol. 53, pp. 6322–6356, may 2014.
- [28] F. Zhang, K. Sautter, y A. M. Larsen, «Chemical Vapor Deposition of Three Aminosilanes on Silicon Dioxide: Surface Characterization, Stability, Effects of Silane Concentration, and Cyanine Dye Adsorption», *Langmuir*, vol. 26, n.º 18, pp. 14648–14654, ago. 2010.
- [29] K. Wen, R. Maoz, y H. Cohen, «Postassembly Chemical Modification of a Highly Ordered Organosilane Multilayer: New Insights into the Structure, Bonding, and Dynamics of Self-Assembling Silane Monolayers», *ACS Nano*, vol. 3, pp. 579–599, mar. 2008.
- [30] J. Zhang, J. Hoogboom, y P. H.J. Kouwer, «Uniform N-(2-Aminoethyl)(3-aminopropyl)trimethoxysilane Monolayer Growth in Water», vol. 112, pp. 20105–20108, nov. 2008.
- [31] M. V. Curia, «Estudio Físicoquímico y Catalítico del Sistema Mn-O-V», Universidad Nacional de la Plata, La Plata, 2010.
- [32] O. Rodríguez Montoro, «ESTUDIO ESPECTROSCÓPICO DE LA FORMACIÓN DE ANÁLOGOS DE RESINAS FÓSILES», universidad Complutense de Madrid, 2013.
- [33] A. Mahapatro, «Bio-functional nano-coatings on metallic biomaterials», *Materials Science and Engineering*, vol. 55, pp. 227-251, oct. 2015.
- [34] S. Suriñach, M.D. Baro, y S. Bordas, «La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la Ciencia de Materiales», *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, vol. 31, ene-1992.
- [35] a) A. Flores Ledesma, F. H. Barceló Santana, y L. Bucio Galindo, «Análisis químico elemental y de fases por medio de PIXE, DSC, TGA y DRX en MTA Angelus® y un cemento Portland blanco», *Revista Odontológica Mexicana*, vol. 20, pp. 187-192, sep. 2016.
b) L. Thermal Analysis, «Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)», <https://www.linseis.com/es/nuestros-productos/calorimetria-diferencial-de-barrido/>.
- [36] A. Zabala Eguren, «The use of 3D surface topography analysis techniques to analyse and predict the alteration of endosseous titanium dental implants generated during the surgical insertion», 2015.
- [37] «Pacemaker», *How products are Made*.
- [38] Shimadzu, «Q: Is FTIR affected by the environment?», Services and support. Shimadzu.
- [39] El-hadad, Amir Abdel-Samie, «An Approach to Design New Coatings for Biomedical Applications», Universidad Carlos III de Madrid, 2012.
- [40] M. Ostabal Artigas, E. Fragero Blesa, y A. Comino García, «Los marcapasos cardíacos», *Medicina Integral*, vol. 41, mar-2003.
- [41] A. J. Molinero Ochoa, O. Gallardo Barrancos, y M. Puertas Calvero, «Implante quirúrgico de un marcapasos», en *Manual de enfermería es estimulación cardíaca y dispositivos implantables*, 2010, p. 302.
- [42] «Protocolo Implante de Marcapasos definitivo».
- [43] J. de Juan Montiel y J. Olagüe de Ros, «Seguimiento del paciente con marcapasos. Disfunciones del sistema de estimulación. Efectos de indicación o programación incorrecta: síndrome de marcapasos», *Revista Española de Cardiología*, 2007.
- [44] R. Oter Rodríguez y J. de Juan Montiel, «Guías de práctica clínica de la Sociedad Española

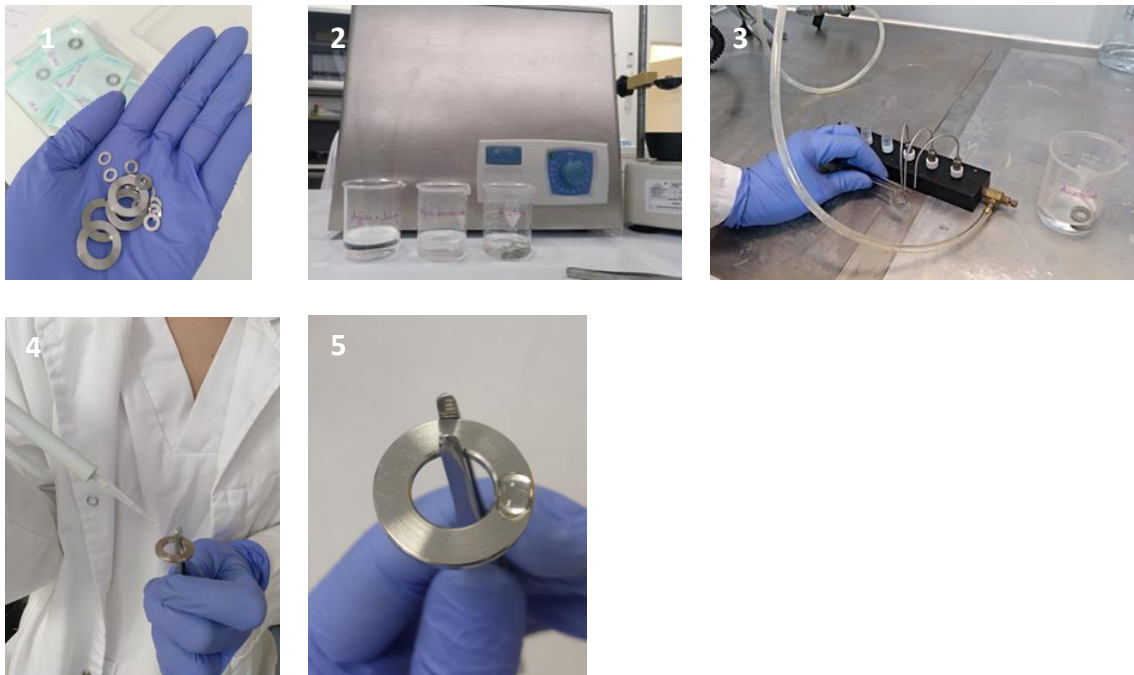
- de Cardiología en marcapasos», *Sociedad Española de Cardiología*, vol. 53, p. 2000.
- [45] O. Cano Pérez, Marta Pombo Jiménez, y M. Luisa Fidalgo Andrés, «Registro Español de Marcapasos. XIV Informe Oficial de la Sección de Estimulación Cardíaca de la Sociedad Española de Cardiología», *Revista Española de Cardiología*, vol. 70, dic-2007.
- [46] J. Silvestre García, J. M. Aguado García, y J. J. García Guerrero, «Infecciones en el sistema de marcapasos. Extracción de electrodos. Estimulación permanente por vía femoral», *Revista Española de Cardiología*, vol. 7, oct-2007.
- [47] European Commission, «Guidelines on medical devices clinical evaluation: A guide for manufacturers and notified bodies clinical investigation clinical evaluation».
- [48] J. Limpo, J. Rubio, y J.L. Otero, «Estudio por FT-IR de la hidrólisis del tetraetilortosilicato», *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, vol. 32, feb-1993.
- [49] R. Pruna, F. Palacio, y M. Martínez, «Organosilane-functionalization of nanostructured indium tin oxide films», *Interface focus*, vol. 6, oct. 2016.
- [50] D. V. Nazarov, E. G. Zemtsova, y A. Yu. Solokhin, «Modification of the Surface Topography and Composition of Ultrafine and Coarse Grained Titanium by Chemical Etching», *Nanomaterials*, vol. 7, ene. 2017.
- [51] A. Rodríguez-Cano, Pedro Cintas, y M. Coronada Fernández Calderón, «Controlled silanization–amination reactions on the Ti6Al4V surface for biomedical applications», *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 106, feb. 2013.
- [52] F. Variola, A. Lauria, y A. Nanci, «Influence of Treatment Conditions on the Chemical Oxidative Activity of H₂SO₄/H₂O₂ Mixtures for Modulating the Topography of Titanium», *ADVANCED ENGINEERING MATERIALS*, vol. 11, 2009.
- [53] «N-[3-(Trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine (AEAPTMS)». UNEP PUBLICATIONS, nov-2003.
- [54] R. A. Stile, T. A. Barber, y D. G. Castner, «Sequential robust design methodology and X-ray photoelectron spectroscopy to analyze the grafting of hyaluronic acid to glass substrates», *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 61, pp. 391-398, may 2002.
- [55] E. Sanmartín Masiá, «SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES INYECTABLES INSPIRADOS EN LA MATRIZ EXTRACELULAR PARA LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS BLANDOS», Universitat Politècnica de València, 2016.
- [56] J. Bart, R. Tiggelaar, y M. Yang, «Room-temperature intermediate layer bonding for microfluidic devices», *Lab on a Chip*, vol. 9, pp. 3481–3488, dic. 2009.
- [57] Thermo SCIENTIFIC, «INSTRUCTIONS. NHS and Sulfo-NHS».
- [58] Si-Nae Park, Jong-Chul Park, Hea Ok Kim, Min Jung Song, Hwal Suh, «Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking», *Biomaterials*, vol. 23, pp. 1205–1212, 2002.

ANEXO I

A.1 FABRICACIÓN DEL PROTOTIPO

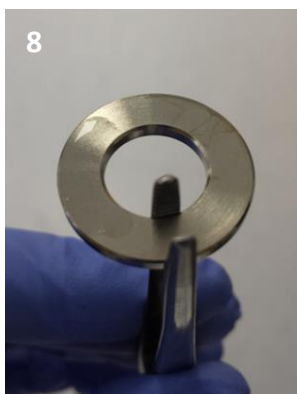
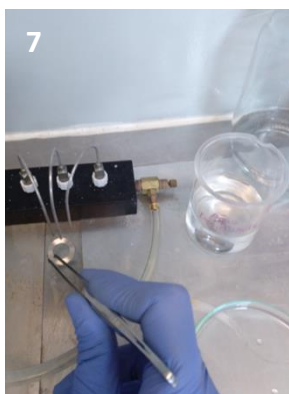
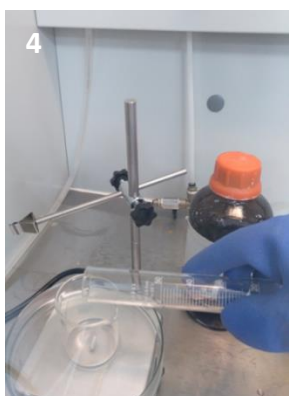
Aunque el flujograma de fabricación del prototipo está descrito en el capítulo PROCESO EXPERIMENTAL, se añade este apartado para permitir visualizar el proceso de una forma más práctica y no tan teórica, y de este modo comprender bien en que se basa cada uno de los pasos.

A.1.1 Limpieza del sustrato



1. Se escoge el sustrato con el que se quiere trabajar.
2. Este se limpia en un baño de ultrasonidos, primero en agua y jabón, después en agua deionizada y por último con acetona. En los tres casos se sónica durante cinco minutos y al pasar el sustrato de un disolvente a otro se seca con el compresor de aire (3).
4. Para comprobar el ángulo de contacto de la superficie se cogen 8.00 μL de agua con una micropipeta y se vierten con cuidado sobre ella (5).

A.1.2 Activación de la superficie del sustrato

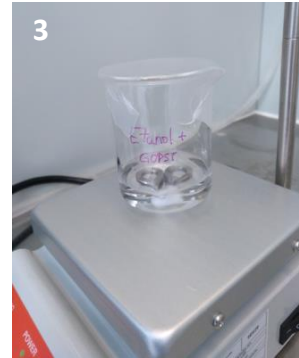


1. Para activar la superficie, lo primero que hay que hacer es poner a calentar el baño de agua dentro de la campana, a 45°C.
2. Se mete el material necesario dentro de la campana. Como se sabe, (3) la disolución piraña tiene mucha acidez por lo que mientras se manipule se trabajara con gafas y guantes de protección ácida.
4. Se vierte la cantidad de ácido sulfúrico necesaria al vaso que se ha colocado dentro del baño y después, se coge el peróxido necesario (5) y se vierte sobre el disolvente gota a gota, con cuidado.
6. Se mete el sustrato dentro y se deja durante 10 minutos. Después, el sustrato se limpia en dos vasos con agua desionizada. Primero se sumergirán en uno para quitar todos los restos de la disolución piraña y después, se pasaran a otro.

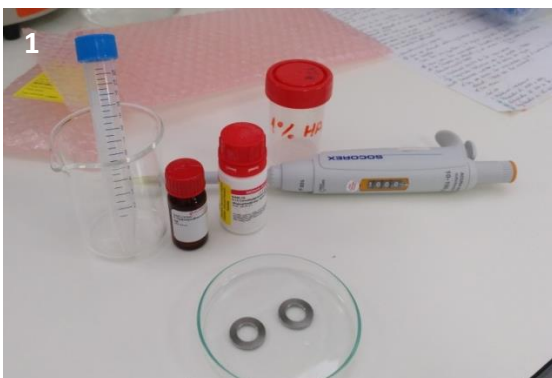
- Una vez limpios se secan con el compresor de aire, y al igual que tras la limpieza se comprobara el ángulo de contacto de la superficie (8).

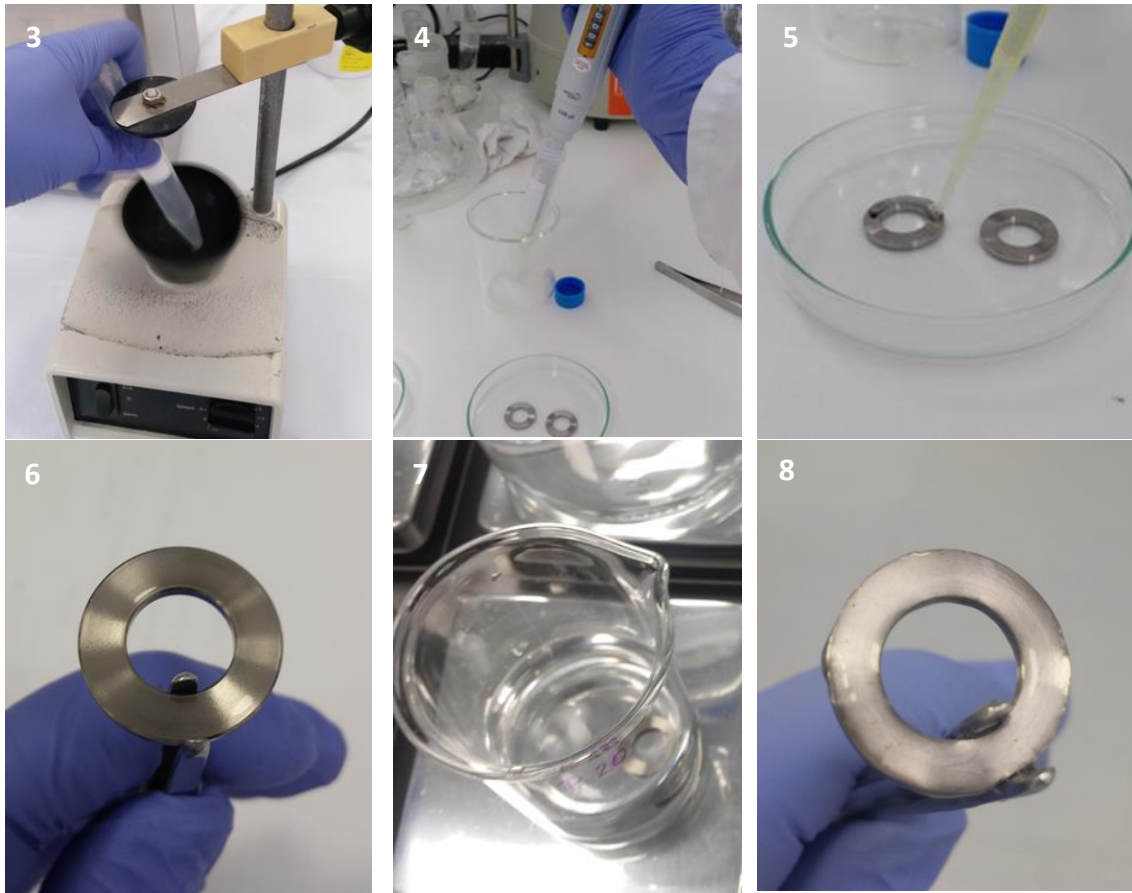
A.1.3 SAM de enlace entre el sustrato y el hidrogel

Monocapa de EDS



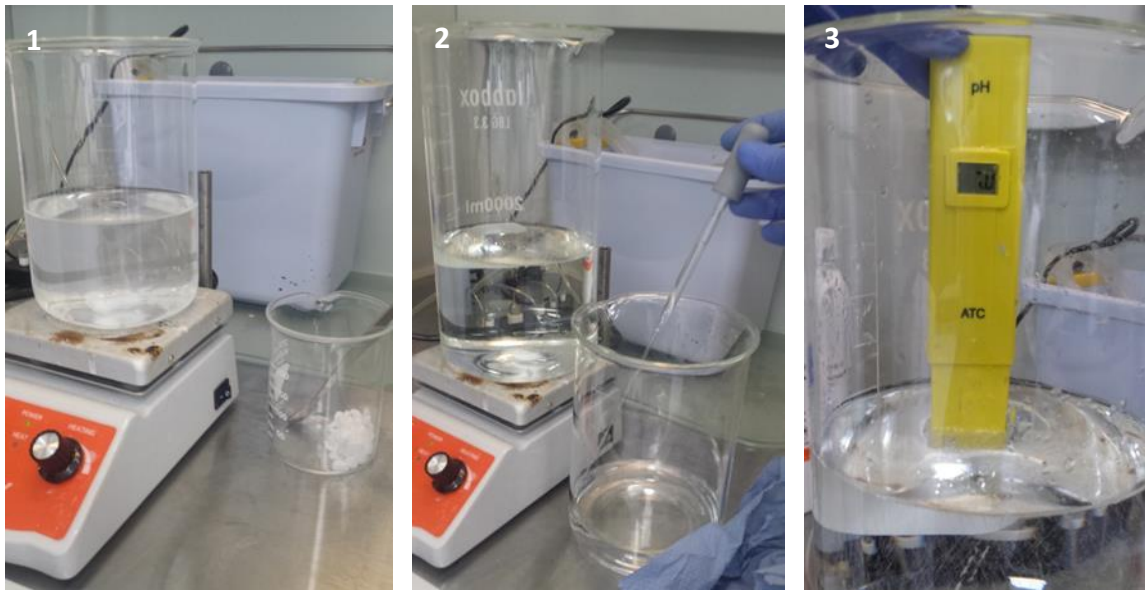
A.1.4 Recubrimiento de Titanio Gr.5 con hidrogel





1. Se recopila el material necesario para generar el hidrogel y recubrir el sustrato con este.
2. Se pesan las cantidades necesarias de sales y de ácido hialurónico y se mezcla. Para que la mezcla quede homogénea se utiliza el agitador mecánico (3).
4. Una vez la mezcla sea homogénea se coge la cantidad requerida con la pipeta y se vierte sobre la superficie (5).
5. Se deja reposar durante 24 horas, y el recubrimiento se habrá solidificado en una capa fina, casi invisible.
6. Para limpiar el hidrogel sobrente, se mete el sustrato en una vaso con agua desionizada y se coloca sobre el agitador magnético. Al meterlo en agua el recubrimiento se hinchará (8). Habra que dejarlo sumergido hasta que no se aprecie la capa de hidrogel y después secar el sustrato con el compresor de aire.

A.1.5 Neutralización de la disolución piraña



1. Para la neutralización, se disuelve NaOH en agua.
2. La disolución piraña, mezclada con 0,5L de agua, se coloca sobre el agitador magnético y con una pipeta se le añade poco a poco la disolución NaOH preparada en el paso 1.
3. Se le añade esta disolución hasta que el pH sea neutro (pH=7)