

MODIFICACIÓN QUÍMICA SUPERFICIAL DE TITANIO PARA FIJAR PROTEÍNAS: CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA (MEB) Y ESPECTROSCÓPICA (FTIR).

J.V. Cauich-Rodríguez¹, M. Aguilar-Vega¹, A. Valadez-González¹, R. Vargas-Coronado¹,
H. Vázquez-Torres²

¹ Unidad de Materiales, Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) Unidad de Materiales, Calle 43 No. 130 Col. Chuburná de Hidalgo, C.P. 97200, Mérida, Yucatán, México, jvcr@cicy.mx

² Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I), Depto. de Física, Área de Polímeros, San Rabel Atlix 186, C.P. 09340, México, D.F. – hvto@xanum.uam.mx

Introducción

La biocompatibilidad de los materiales depende de las propiedades químicas y físicas de los mismos, así como aspectos médicos y de diseño. La afinidad de la superficie con el medio acuoso, determinada por la estructura química de ambos, debe de ser suficiente para que se efectúe un contacto íntimo entre ambos. Los factores físicos, como la rugosidad superficial, también influyen en la interacción de los biomateriales con el medio, pero se pueden considerar de segundo orden. En general, la naturaleza de la superficie de un implante rige su interacción con los fluidos corporales, en particular con las proteínas, y, en conjugación con la respuesta del cuerpo al implante, dependiente de tipo de célula con la que interactúa, determinan la naturaleza de la interfase sustrato-tejido (1,2). Las células se adhieren y crecen más en superficies hidrófilas que en hidrófobas, y dicha adhesión se favorece mediante la adsorción preferencial de proteínas. Hasta ahora, los grupos funcionales más apropiados para favorecer la biocompatibilidad célula-sustrato no han sido plenamente identificados, pero existen indicios sobre los grupos ácido sulfónico, ácido carboxílico, grupo amino y grupo hidroxilo (3).

El titanio y sus aleaciones son materiales biocompatibles que han sido probados bajo distintas aplicaciones médicas, como ortopedia, implantes dentales y “stents” vasculares. Se sabe que son las propiedades superficiales inherentes al titanio las que favorecen su biocompatibilidad; en particular, la presencia de una capa superficial de óxido, que protege al material de corrosión, modera la carga eléctrica superficial bajo condiciones biológicas y le imparte una constante dieléctrica semejante a la del agua. Se ha tratado de anclar biomoléculas específicas sobre la superficie del titanio para crear condiciones químicas superficiales que favorezcan su interacción con células específicas. Entre tales estudios podemos mencionar la silanización de la superficie, donde la respuesta biológica depende de los grupos terminales del organosilano (4) y el uso de moléculas con capacidad de entrecruzamiento para anclar mediadores biológicamente activos (5). Sin embargo, hasta la fecha no se ha endido totalmente la respuesta de tejidos celulares a las diferencias en las propiedades químicas superficiales de los sustratos. En el presente trabajo se informan los resultados obtenidos en la modificación superficial de titanio mediante silanización y su posterior reacción con glutaraldehído, con el propósito de fijar proteínas en estudios futuros.

Sección Experimental

Modificación del titanio

Oxidación del titanio

Discos de titanio de 9 mm de diámetro fueron tratados con una solución (50/50) de peróxido de hidrógeno (30%) y ácido sulfúrico concentrado o con soluciones 90:10 (peróxido:ácido sulfúrico concentrado) o

50:50 de peróxido de hidrógeno y ácido sulfúrico 0.1 M. Los discos se mantuvieron en agitación durante 2 h y fueron secados posteriormente a 120°C durante 24 h en una estufa de vacío.

Silanización

La silanización se llevó a cabo utilizando una solución de 3-amino propil trimetoxisilano (APTS) al 10% en tolueno seco. Durante el reflujo, los discos de titanio se mantuvieron en agitación durante 4 h para que el proceso fuera homogéneo en las dos caras. Al finalizar este periodo de tiempo, los discos fueron lavados con tolueno y posteriormente secados 2 h a 120°C en una estufa de vacío.

Injerto de glutaraldehído

Los discos de titanio previamente silanizados fueron tratados durante 4 h con una solución de glutaraldehído al 1%. Esta solución fue preparada disolviendo 1 ml de glutaraldehído al 25% en 100 ml de un buffer de fosfatos de pH 7. Después de este tratamiento la muestra fue secada como ya se mencionó anteriormente.

Injerto de Cisteína

Los discos injertados con glutaraldehído fueron tratados con L-Cisteína. Para ello, se preparó una solución al 0.2% de este aminoácido en el buffer de fosfatos de pH 7 y se dejó en agitación durante 24 h. Finalmente estos discos fueron secados con papel filtro.

Caracterización del titanio modificado

Espectroscopia de Infrarrojo

Con un espectrofotómetro Nicolet Protege 460, utilizando una celda fotoacústica con helio y una resolución de 4 cm⁻¹, se obtuvieron espectros de FT-IR de discos de titanio sin tratamiento, y posteriormente de los discos de titanio modificados, inmediatamente después de cada etapa. Asimismo, se obtuvieron espectros usando un equipo Spectrum GX FT-IR System de Perkin Elmer con accesorio de Reflectancia Total Atenuada (ATR) de diamante, *DuraSamp*IR, en una resolución de 4 cm⁻¹.

Microanálisis por EDX

El análisis elemental se obtuvo mediante un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM 6360 LV acoplado con un detector de energía dispersiva de Rayos X Oxford Inca Energy 200.

Resultados y Discusión

En términos de composición, el titanio sin tratamiento presentó dos zonas bien diferenciadas. Una zona granular con un 92.82% (porcentaje en peso) de titanio, 5.38% de carbono y 1.8% de oxígeno y una zona de grietas con un mayor contenido de carbono (34%), oxígeno (15%) y cantidades menores de sodio, potasio y calcio (0.73%).

El tratamiento inicial del titanio con la mezcla de peróxido de hidrógeno y ácido sulfúrico concentrado afectó considerablemente la superficie, ya que bajo estas condiciones se induce la formación de microagujeros como resultado de la corrosión del titanio (Fig. 1). Adicionalmente, la superficie granular original del titanio fue modificada conduciendo a un sistema más rugoso. Por lo anterior, se decidió probar con una menor proporción del ácido sulfúrico, y se observó el mismo patrón de corrosión. Finalmente, se escogió el sistema peróxido:ácido diluido 0.1 M (50:50) (Fig. 2).

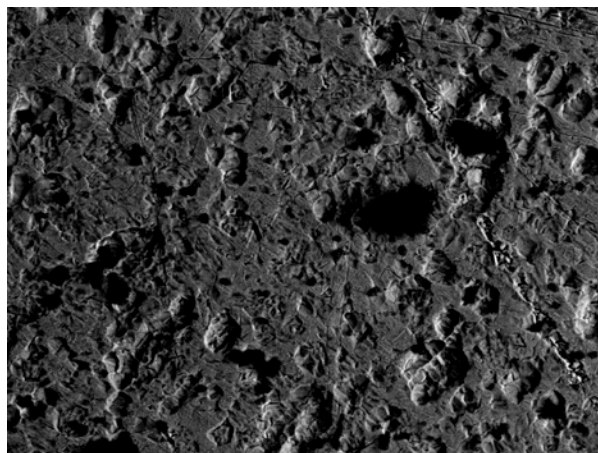


Fig. 1. Superficie de titanio tratada con peróxido de hidrógeno:ácido sulfúrico concentrado (50:50).

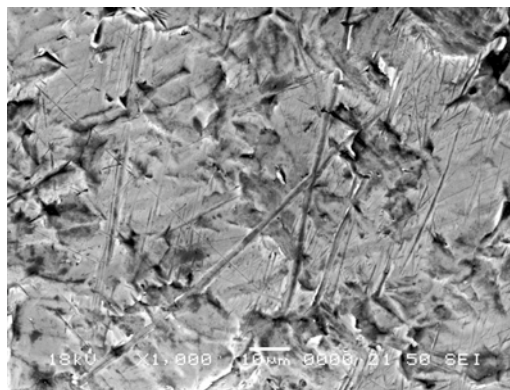
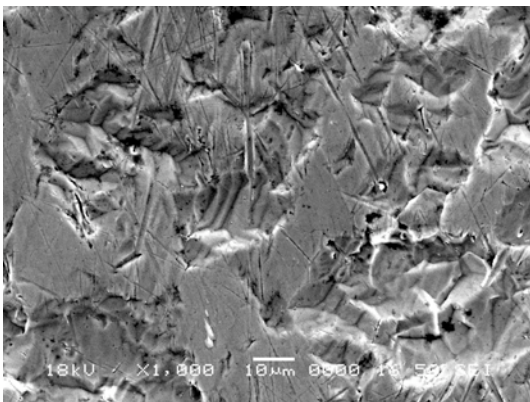


Fig. 2. Superficie de titanio tratada con peróxido de hidrógeno:ácido sulfúrico 0.1M (50:50).

La silanización bajo estas condiciones fue corroborada mediante microanálisis cuantificándose la presencia de silicio (0.76%) y de nitrógeno (4.57%). Sin embargo, no fue posible la identificación y cuantificación de carbono y oxígeno después del tratamiento con glutaraldehído, ya que las muestras silanizadas contenían estos dos elementos. Del mismo modo, la presencia de azufre proveniente de la L-Cisteína no se pudo observar por microanálisis.

Los espectros de infrarrojo de los discos de titanio tratado con ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno se muestran en la Figura 3 (obtenidos en una celda fotoacústica).

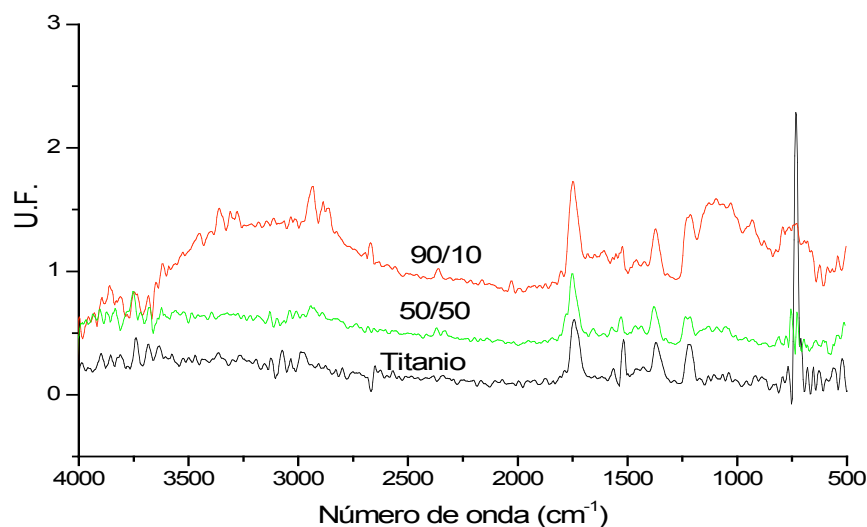


Fig. 3. Espectros de infrarrojo de los discos de titanio tratados con $\text{H}_2\text{O}_2\text{:H}_2\text{SO}_4$

Como puede apreciarse en la Figura 3, el espectro de FT-IR del titanio por sí sólo muestra bandas que parecen corresponder a grupos orgánicos. Estos pueden ser resultado del proceso de limpieza del titanio con acetona o debido a su manipulación. Posteriormente, en la Figura 4, se muestra el efecto de la silanización sobre los discos de titanio previamente tratados con $\text{H}_2\text{O}_2\text{:H}_2\text{SO}_4$.

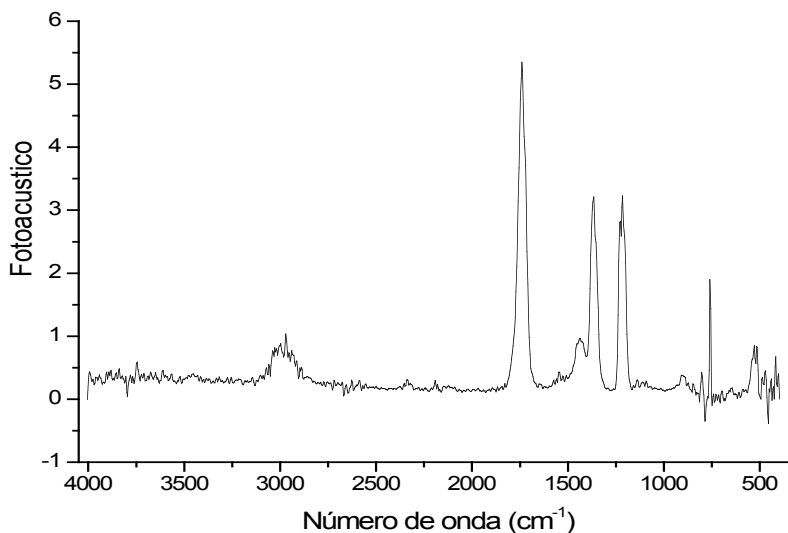


Fig. 4. Espectros de infrarrojo de los discos de titanio después de la silanización.

Al comparar las figuras 3 y 4 podemos observar que las bandas localizadas entre 1800 y 1200 cm^{-1} de la figura 4 son 10 veces más intensas y más agudas que las de la figura 3. Además, la banda ancha y débil en 3000 cm^{-1} parece indicar la presencia de metilos o metilenos. La cisteína injertada sobre la superficie silanizada y tratada con glutaraldehído fue también muy poca, pues depende necesariamente de la cantidad de silano injertado. No obstante, estos resultados no son lo suficientemente claros para

identificar el silano en la superficie del titanio. Por esta razón se usó la técnica de ATR de diamante para obtener el espectro de FT-IR del titanio silanizado y tratado con glutaraldehído. Es importante enfatizar que al obtener este espectro se usó el titanio, previamente tratado, como “blanco”, para compensar las posibles bandas presentes en el espectro del titanio, observadas en la Figura 3.



Fig. 5. Espectro de FT-IR-ATR del titanio silanizado y modificado posteriormente con glutaraldehído.

En la Fig. 5 se observa claramente una banda en 3217 cm^{-1} correspondiente a los grupos amino de la superficie de titanio silanizada, sobrepuesta con las bandas, que aparecen por esto como hombros, de enlaces C-H alifáticos en número de onda menores de 3000 cm^{-1} , así como la banda localizada en 1649 cm^{-1} que se atribuye a la vibración de estiramiento de aldehídos. Asimismo, se aprecia la banda en 1064 cm^{-1} , que se puede asignar a los enlaces C-Si, ensanchada hacia mayores números de onda por la probable sobreposición con las bandas de los enlaces C-H aldehídicos. Finalmente, las bandas a 980 y 850 cm^{-1} se pueden atribuir a las vibraciones de flexión de los enlaces C-H presentes en el silano y en el glutaraldehído.

Conclusiones

El proceso más adecuado para tratar la superficie de titanio fue usando peróxido de hidrógeno:ácido sulfúrico 0.1M (50:50). La silanización de la superficie de titanio fue evidenciada por los resultados obtenidos con Microanálisis EDX, pero no suficientemente corroborada mediante FT-IR. No obstante, mediante la técnica de FT-IR con accesorio de ATR de diamante fue posible confirmar la presencia de silano y de glutaraldehído en la superficie de titanio. Para mejorar el grado de injerto de estos dos reactivos, se modificará el tratamiento en experimentos que le darán continuidad al presente trabajo y, con esto, poder fijar proteínas en mayor cantidad.

Referencias

- 1) F.H. Jones, Surf. Sci. **42**(3-5), 79,2001.
- 2) R. Hazan, R. Brerer, Biomaterials, **14**, 970-974 (1993).
- 3) B.K. Bradley, O.A. Weiz, R.L. Schanaar, J. Biol. Chem., **262**, 6431 (1997).
- 4) C.N. Sukenk, N. Balachander, L.A. Culp, K. Lewandowska, K. Merit, J. Biomed Mater Res., **24**, 1307 (1990).
- 5) A. Nanci, J.O. Wuest, L. Peru, P. Brunet, V. Sharma, S. Zalzal, M.D. Mckee, J. Biomed Mater Res., **40**, 324 (1998).

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo económico de SEP-PROMEP mediante el Proyecto *"Inmovilización de Proteínas sobre Superficies Biocompatibles"* (PROMEP/103.5/04/2278); Convenio PROMEP-UAM Núm. 33871.