

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Nanociencias**

**Nano-microestructuras de dióxido de titanio elaboradas por
erosión iónica y anodizado**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Juan Ramón Zazueta López

Ensenada, Baja California, México
2023

Tesis defendida por
Juan Ramón Zazueta López

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Ma. de la Paz Cruz Jáuregui
Codirectora de tesis

Dr. Duilio Valdespino Padilla
Codirector de tesis

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno

Dr. Luis Antonio Ríos Osuna

Dr. Mario Humberto Farías Sánchez



Dra. Catalina López Bastidas
Coordinadora del Posgrado en Nanociencias

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Juan Ramón Zazueta López** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

Nano-microestructuras de dióxido de titanio elaboradas por erosión iónica y anodizado

Resumen aprobado por:

Dra. Ma. de la Paz Cruz Jáuregui
Codirectora de tesis

Dr. Duilio Valdespino Padilla
Codirector de tesis

El Ti es ampliamente usado en implantes que sustituyen hueso debido a su ligereza, alta resistencia a esfuerzos mecánicos y biocompatibilidad; siendo esta última consecuencia de la capa de TiO_2 que se forma en su superficie. Dicha capa, dependiendo de su morfología, puede promover la proliferación celular ósea, tal y como se muestra en este trabajo de tesis, en el que se prepararon y estudiaron superficies de TiO_2 con diferentes morfologías: continuas, nanoestructuradas, microestructuradas y nano-microestructuradas. Las superficies continuas se obtuvieron a partir de películas de Ti (500 nm)/vidrio, mediante erosión iónica. Para preparar las nanoestructuras se utilizó la técnica de anodizado, en la que se varió la concentración de NH_4F (0.3 a 0.9 wt%) en el electrolito, el voltaje (10 a 45 V) y el tiempo de síntesis (1 a 15 min); de donde se determinó que las nanoestructuras con el mayor diámetro promedio de poro, de 64 ± 8 nm, fueron las elaboradas con una concentración de 0.6 wt% de NH_4F , 45 V y 3 min. Para las microestructuras se utilizó fotolitografía por *lift-off*; con ella se obtuvieron poros columnares de 40 μm separados por 106 μm . La combinación de nano-microestructuras se llevó a cabo anodizando las microestructuras en las condiciones señaladas para obtener los nanoporos de mayor diámetro. Todas las superficies fueron sometidas a un tratamiento térmico a 450 °C/4 h, con lo que cristalizaron a la fase anatasa del TiO_2 . Los ensayos de hemólisis demostraron que las muestras no son tóxicas en sangre, a excepción de la continua, pero incluso esta se encuentra solo en un 0.2 % por encima de la norma ISO 10993-4. Las pruebas de proliferación de osteoblastos a las 48, 72 y 96 h, indicaron que la superficie continua y la microestructurada generan una proliferación menor con respecto al control, mientras que en las nano-microestructuradas la proliferación es similar al control. Las superficies nanoestructuras en cambio, promueven una proliferación celular por encima del control (1.5 veces), resultado que motiva estudios subsecuentes en la optimización del tamaño de poro en superficies nanoestructuradas para su aplicación en implantes biomédicos.

Palabras clave: TiO_2 , nano-microestructuras, erosión iónica, anodizado, proliferación celular.

Abstract of the thesis presented by **Juan Ramón Zazueta López** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanosciences

Titanium dioxide nano-microstructures prepared by Sputtering and anodization

Abstract approved by:

Dra. Ma. de la Paz Cruz Jáuregui
Thesis codirector

Dr. Duilio Valdespino Padilla
Thesis codirector

Ti is widely used in implants that replace bone due to its lightness, high resistance to mechanical stress and biocompatibility; the latter being a consequence of the TiO₂ layer that is formed on the surface. Such layer, depending on its morphology, can promote bone cell proliferation, as is shown in this thesis, in which continuous, nanostructured, microstructured and nano-microstructured TiO₂ surfaces were prepared and studied. Continuous surfaces were obtained from Ti films (500 nm)/glass by sputtering. To prepare the nanostructures, the anodization technique was used, varying the NH₄F concentration (0.3 to 0.9 wt%) of the electrolyte, the voltage (10 to 45 V) and the synthesis time (1 to 15 min); from which it was determined that the nanostructures with the largest average diameter of pores, of 64 ± 8 nm, were prepared using 0.6 wt% of NH₄F, 45 V and 3 min. For the microstructures *lift-off* photolithography was used, with it samples with columnar pores of 40 μm separated by 106 μm were obtained. The combination of nano-microstructures was carried out by anodizing the microstructures under the indicated conditions to obtain pores of the largest diameter. All the surfaces were subjected to a heat treatment at 450 °C/4 h, acquiring the crystalline anatase phase of TiO₂. The hemolysis essays showed that samples are non-toxic in blood, except the continuous but even this one is only 0.2% above the ISO 10993-4. The osteoblast proliferation tests at 48, 72, and 96 h indicated that the continuous and microstructured surfaces generate less proliferation with respect to the control, while in the nano-microstructured surfaces proliferation is similar to the control. The nanostructured surfaces in another hand, promote a cell proliferation above the control (1.5 times), a result that motivates subsequent studies on the optimization of pore size in nanostructured surfaces for their application in biomedical implants.

Keywords: TiO₂, nano-microstructures, sputtering, anodization, cell proliferation.

Dedicatoria

A todas aquellas personas y experiencias que contribuyeron a mi crecimiento personal y me guiaron hasta este punto de mi vida.

Así como a los que utilizan la ciencia para la creación de un mundo mejor.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por permitirme realizar mis estudios de maestría en su programa de posgrado en Nanociencias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca #1068876 para realizar mis estudios de maestría.

Al Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Autónoma de México (CNyN-UNAM) por abrirme sus puertas y permitirme hacer uso de sus instalaciones.

Al proyecto CONACyT A1 S 14758-F-2659 por el apoyo financiero al presente trabajo.

Un agradecimiento especial a la Dra. Ma. de la Paz Cruz Jáuregui y el Dr. Duilio Valdespino Padilla, directores de mi tesis, no solo por aceptarme en su grupo de trabajo y dirigir mi tesis, sino por sus enseñanzas y consejos, la gran paciencia mostrada y sobre todo la confianza depositada en mí.

Agradezco a los miembros de mi comité, Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno, Dr. Luis Antonio Ríos Osuna y al Dr. Mario Humberto Farías Sánchez por sus valiosos consejos en las reuniones de avance de tesis.

A la Dra. Karla Juárez, además le agradezco su apoyo con la realización de los ensayos biológicos.

Al Laboratorio Nacional de Nanofabricación (NANOFAB) por dejarme usar sus equipos. Así como al Dr. Wencel de la Cruz y al Dr. Harvi Castillo Cuero por sus apoyo y capacitaciones en el cuarto limpio.

A los Ings. Pedro Casillas y Raúl Campos por su apoyo técnico.

A la M.C Eloísa Aparicio y al Dr. Eduardo Murillo por sus servicios en la caracterización de mis muestras.

A mis compañeros del grupo de investigación, sobre todo a Jessica Tortoledo, M.C. Marcos Luna y Dr. Eduardo Flores por sus consejos y enseñanzas.

Agradezco a mis padres Claudia Evelia López Alapizco y Juan Ramón Zazueta Castañeda por su apoyo incondicional, comprensión, cariño y por fomentar los valores que forman a la persona que soy ahora.

A mis compañeros de maestría, Daniela Frausto, Luz Mercado, Manuel Macías, etc. Por esas tardes de juegos de mesa que hicieron más llevadera la maestría. En especial a Bibiana Sánchez por la alegría que le da a mi vida, por acompañarme incondicionalmente durante esta etapa dándome su apoyo y motivación.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	3
1.2 Justificación.....	7
1.3 Hipótesis.....	7
1.4 Objetivos.....	7
1.4.1 Objetivo general.....	7
1.4.2 Objetivos específicos.....	8
Capítulo 2. Conceptos fundamentales.....	9
2.1 Películas delgadas.....	9
2.1.1 Técnica de erosión iónica.....	9
2.1.2 Crecimiento de películas delgadas.....	12
2.2 Elaboración de nano y microestructuras.....	14
2.2.1 Fotolitografía.....	14
2.2.1.1 Técnica de depósito por centrifugado.....	14
2.2.1.2 Fotolitografía.....	15
2.2.1.3 Fotolitografía por <i>Lift-off</i>	17
2.2.2 Anodizado.....	18
2.2.2.1 Mecanismos de formación.....	19

2.2.2.2	Parámetros de preparación.....	21
2.3	Técnicas de caracterización.....	24
2.3.1	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	24
2.3.2	Espectroscopía de dispersión de energía (EDS)	25
2.3.3	Microscopía de fuerza atómica (AFM)	26
2.3.4	Difracción de rayos X (XRD).....	27
2.4	Ensayos biológicos.....	29
2.4.1	Hemólisis	29
2.4.2	Proliferación celular	29
Capítulo 3.	Metodología.....	30
3.1	Depósito de películas de Ti.....	30
3.1.1	Limpieza de sustratos.....	30
3.1.2	Depósito de películas de titanio por erosión iónica.....	31
3.2	Nano y microestructuras de TiO ₂	32
3.2.1	Preparación de nanoestructuras de TiO ₂ por anodizado	32
3.2.2	Preparación de microestructuras de Ti mediante fotolitografía por <i>Lift-off</i>	35
3.2.3	Combinación de nano y microestructuras	37
3.2.4	Tratamiento térmico	37
3.3	Caracterización de las películas estructuradas de TiO ₂	38
3.4	Evaluación de la respuesta biológica de las películas estructuradas de TiO ₂	38
3.4.1	Ensayo de hemólisis	38
3.4.2	Ensayo de proliferación.....	41
Capítulo 4.	Resultados y discusión	42
4.1	Depósito de películas continuas de Ti.....	42
4.2	Síntesis de nanoestructuras de TiO ₂	43
4.2.1	Envejecimiento del electrolito	43
4.2.2	Determinación del espesor	44

4.2.3	Variación de la concentración del electrolito	44
4.2.4	Variación del tiempo de anodizado.....	45
4.2.5	Variación del voltaje.....	47
4.2.6	Variación del sustrato.....	48
4.2.7	Parámetros optimizados	49
4.3	Fabricación de microestructuras en películas de Ti	49
4.4	Combinación de nano y microestructuras	50
4.5	Composición, estructura cristalina y rugosidad	50
4.5.1	Composición elemental.....	51
4.5.2	Difractogramas de rayos X	51
4.5.3	Rugosidad	52
4.6	Pruebas biológicas.....	53
4.6.1	Hemólisis	53
4.6.2	Proliferación celular	54
Capítulo 5.	Conclusiones	56
5.1	Conclusiones.....	56
5.1.1	Superficies continuas	56
5.1.2	Superficies nanoestructuradas.....	56
5.1.3	Superficies microestructuradas y nano-microestructuradas	57
5.1.4	Biocompatibilidad y proliferación celular	57
5.2	Trabajo a futuro	57
	Literatura citada	58

Lista de figuras

Figura	Página
1. Nanopatrones de TiO ₂ formados en la superficie de Ti mediante la técnica de anodizado, donde la plantilla se recoció en a) con disolvente de vapor de tetrahidrofurano y en b) con disolvente de vapor de cloroformo (Sjöström et al., 2012).....	4
2. Nanopatrones de TiO ₂ en la superficie de microesferas de Ti formados mediante la técnica de anodizado (Sjöström et al., 2012).	4
3. Micrografías de SEM de nanotubos de TiO ₂ producidos por anodizado a 20 V y tratados térmicamente a: a) 200 °C y b) a 350 °C (Aguirre Ocampo et al., 2022).	5
4. Imágenes SEM de una película de TiO ₂ : a) continua, b) con estructura de rejilla, c) con estructura cuadrada y d) con estructura hexagonal (Liu et al., 2019).	6
5. Esquema del proceso de erosión iónica.....	10
6. Representación gráfica del equipo de erosión iónica.....	11
7. Esquema del proceso de crecimiento de las películas delgadas.....	12
8. Nucleación tipo: a) Frank-Van der Weber, b) Volmer-Weber y c) Stranski-Krastanov.....	13
9. Proceso de depósito de películas mediante la técnica de depósito por centrifugado.	15
10. Esquema del proceso de fotolitografía con fotoresina positiva.	16
11. Esquema del proceso de fotolitografía por <i>Lift-off</i> con fotoresina negativa.....	17
12. Representación del sistema de anodizado.	18
13. Curva densidad de corriente contra tiempo durante el crecimiento de una película de TiO ₂ nanoestructurada a voltaje constante en un electrolito con iones de flúor (Hernández López, 2015).	21
14. Curvas de densidad de corriente contra tiempo de electrolitos de NH ₄ F con diferentes tiempos de uso previo, en un anodizado de 6 h (Sopha et al., 2015).....	22
15. Dependencia del voltaje con el diámetro de los poros en las nanoestructuras, para un electrolito con etilenglicol, 0.2 wt % de H ₂ O y HF (Albu et al., 2007).	23
16. Esquema del microscopio electrónico de barrido (SEM).	25
17. Principio básico del funcionamiento de la técnica de EDS: a) expulsión de electrones de los niveles atómicos internos y b) decaimiento de electrones de niveles superiores y emisión de rayos X.....	26

18. Esquema del microscopio de fuerza atómica (AFM).	27
19. Esquema de la difracción de rayos X en planos atómicos separados por una distancia d.	29
20. Ilustración del baño ultrasónico de sustratos contenidos en un vaso de precipitado.	30
21. Equipo de Erosión Iónica INTERCOVAMEX.....	31
22. Sustratos de vidrio a) antes y b) después del depósito de Ti.....	31
23. Proceso de la obtención de nano y microestructuras de TiO ₂	32
24. Preparación de los electrolitos: a) agitación a 1100 rpm y b) almacenamiento en un vaso de polipropileno, sellado con papel encerado y papel aluminio.	33
25. Arreglo experimental de la técnica de anodizado.	34
26. Películas de TiO ₂ : a) recién anodizada y b) después de la limpieza y el secado.	34
27. a) diseño de la fotomáscara realizado en CleWin 5, b) fotomáscara con el patrón y c) equipo para lavado de fotomáscaras PicoTrack PCT-200 RRE MC	35
28. Depósito de la fotoresina: a) equipo MIDAS SPIN-3000TD para la técnica de depósito por centrifugado, b) plancha térmica Hot Plate AS ONE Corporation y c) sustratos con fotoresina después del proceso de secado.	36
29. Exposición de luz ultravioleta: a) alineadora de máscaras Midas MDA-400M, b) colocación de la fotomáscara y c) alineación de las muestras con fotoresina bajo la fotomáscara.	36
30. a) Horno Thermolyne 47900 y b) muestras dentro del horno antes del calcinado.....	37
31. Placa de pozos de cultivo con las muestras estructuradas, continuas y los controles negativo (-) y positivo (+).....	40
32. Eritrocitos después de la incubación y el centrifugado en tubos de 1.5 mL.....	40
33. Esquema del ensayo de proliferación celular mediante reducción de resazurina.	41
34. SEM de sección transversal de películas continuas de Ti/Si depositadas por erosión iónica con espesores de: a) 330 nm y b) 600 nm.	42
35. SEM de la superficie de una película continua de Ti (600 nm)/Si depositada por erosión iónica.	43
36. SEM de películas de Ti (500 nm)/Si anodizadas por 3 min con un electrolito de 0.3 wt% de NH ₄ F y 35 V: a) sin envejecimiento y b) con más de 100 min de uso previo.	44
37. SEM de sección transversal de una película de Ti (500 nm)/Si: a) antes y b) después del anodizado, por 15 min con electrolito de 0.3 wt% de NH ₄ F y 15 V.	44

38. SEM de películas de Ti (500 nm)/Si anodizadas por 3 min, con 30 V y una concentración de NH_4F en el electrolito de: a) 0.3 wt%, b) 0.6 wt% y c) 0.9 wt%.....	45
39. SEM de películas de Ti (500 nm)/Si anodizadas con electrolito de 0.6 wt% de NH_4F , 30 V y tiempos de: a) 3 min, b) 6 min y c) 9 min.	46
40. SEM del corte transversal de una película de Ti (500 nm)/Si anodizada por 6 min con electrolito de 0.6 wt% de NH_4F y 30 V.....	46
41. SEM de películas de Ti (500 nm)/Si anodizadas por 3 min con electrolito de 0.6 wt% de NH_4F y voltajes de: a) 25 V, b) 35 V y c) 45 V.....	47
42. Gráfica el tamaño de poro vs voltaje utilizado en muestras de Ti (500 nm)/Si anodizados por 3 min con un electrolito de 0.6 wt% de NH_4F	47
43. SEM de una película de Ti (500 nm)/vidrio anodizada por 3 min con electrolito de 0.6 wt% de NH_4F y 45 V.....	48
44. Histogramas de tamaño de poro de las películas Ti (500 nm) depositadas sobre sustratos de: a) Si y b) vidrio, anodizadas por 3 min con electrolito de 0.6 wt% de NH_4F y 45 V.	49
45. a) Patrón de la fotomáscara y b) micrografía de SEM de la película de Ti microestructurada fabricada mediante fotolitografía por <i>Lift-off</i>	49
46. SEM de una película de TiO_2 nano-microestructurada.	50
47. EDS de una película nanoestructurada obtenida a partir de películas de Ti (500 nm)/vidrio anodizadas por 3 min con electrolito de 0.6 wt% de NH_4F y 45 V.....	51
48. XRD de las películas continua, microestructurada, nanoestructurada y nano-microestructurada comparada con los patrones de Ti y TiO_2 en su fase anatasa.	52
49. Hemólisis de superficies de TiO_2 con diferentes morfologías.	53
50. Proliferación celular (línea celular MC3T3-E1) en superficies de TiO_2 con diferentes morfologías.	54
51. Imágenes incubación de osteoblastos en una superficie de TiO_2 : a) microestructurada (a las 48 h) y b) nano-microestructurada (a las 96 h).....	55

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Parámetros para el depósito de las películas de Ti.	32

Capítulo 1. Introducción

A lo largo de la historia se ha hecho uso de los materiales que nos rodean, los que se han adaptado a las necesidades del ser humano. Las primeras evidencias del uso de estos materiales en la medicina remontan de aproximadamente 32 000 años, donde se utilizaban principalmente para cauterizar y suturar (B. D. Ratner, 1996). Después vino el uso de materiales artificiales, por ejemplo, en prótesis para reponer miembros dañados, cuyo registro más antiguo está datado entre 1065-740 a. C., correspondiente a una prótesis de madera encontrada en el dedo gordo del pie de un humano momificado en Tebas, Egipto. En la edad media otros materiales, como cuero y metales, se utilizaron para realizar patas de palo y manos de gancho (Thurston, 2007). Posteriormente se llevaron a cabo los primeros implantes, que son aquellas prótesis introducidas quirúrgicamente en el cuerpo, pero se carecía del conocimiento no solo del procedimiento médico en general, sino también sobre los riesgos del material implantado. Dicho conocimiento se fue adquiriendo con el tiempo y permitió identificar la biocompatibilidad de los materiales, la cual implica la integración de estos en el sistema biológico sin causar daño al mismo.

Los materiales que se usan para remplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo, son conocidos como biomateriales (Moreno et al., 2009). El mercado relacionado con estos tiene un crecimiento anual compuesto del 13%, el que se proyecta valdrá \$212 mil millones de dólares para el 2027, impulsado en gran parte por la necesidad de mejorar la calidad de vida de los pacientes (Suraj et al., 2022). En particular, para los biomateriales con aplicaciones ortopédicas se calcula una tasa de crecimiento anual compuesta superior al 5% y un mercado global de alrededor de los \$73 mil millones de dólares para el 2032 (Swapna & Onkar, 2023).

Los biomateriales ortopédicos más socorridos son aquellos usados como implantes que reemplazan al tejido duro, en especial las prótesis artificiales que sustituyen al tejido óseo. Por ejemplo, en el 2019 se colocaron en México 5 000 prótesis de rodilla y 800 000 en Estados Unidos (Stewart, 2022), país en el que se estima que habrá 3.48 millones de personas con una de dichas prótesis en el 2030 (Kurtz et al., 2007). No obstante, pese a la gran demanda, aún es necesario el desarrollo de materiales más apropiados para sustituir al hueso (Romero Villareal, 2015).

Entre los materiales utilizados en implantes que reemplazan el hueso, destaca el titanio (Ti) debido a su ligereza, alta resistencia a esfuerzos mecánicos y biocompatibilidad. Esta última es consecuencia de la capa de dióxido de titanio (TiO₂) que se forma en la superficie cuando el Ti entra en contacto con un

medio acuoso, como la sangre. Dicho óxido a diferencia de los óxidos de otros metales queda fuertemente enlazado, evitando la liberación de iones metálicos que causan el rechazo del sistema inmune (Ramakrishna et al., 2010).

Así entonces, el TiO_2 es en sí mismo biocompatible y dependiendo de sus características podría ser utilizado en implantes que funcionen como soporte para el crecimiento de tejido óseo. Para ello se requeriría la presencia de poros de diferentes tamaños, tal y como ocurre en los huesos, ya que los poros en el intervalo de nanómetros favorecen la adhesión y proliferación celular, mientras que los que están en el orden de micrómetros son necesarios para la alimentación y crecimiento de las células puesto que facilitan la transferencia de nutrientes y la expulsión de desechos generados por las mismas (Yang et al., 2001).

Valdespino y colaboradores (Valdespino Padilla, 2019) lograron elaborar cerámicas de TiO_2 con tamaños promedio de poro en el orden de decenas de micras demostrando que en ellas la proliferación celular era mayor. Además, estas cerámicas tuvieron un módulo de Young del orden del que presenta el hueso, lo que es importante para disminuir las microfracturas en la interface con el tejido óseo. Tales microfracturas surgen como consecuencia de la gran diferencia entre los Módulos de Young del TiO_2 no poroso (~ 151 GPa en su fase anatasa (Borgese et al., 2012)) con el hueso (de 0.05 a 60 GPa (Hutmacher et al., 2007)), las que se agravan con el tiempo, dañando el tejido óseo circundante (Romero Villareal, 2015) y haciendo necesario reemplazar la pieza implantada.

De acuerdo con lo anterior, en implantes de Ti sería deseable que la interfase de TiO_2 con el hueso promoviera el crecimiento celular óseo, para lo cual debería combinar estructuras nano-microporosas. Sin embargo, aunque ya se ha demostrado que las superficies rugosas favorecen la adhesión (Martinez et al., 2020) y proliferación celular (Huang et al., 2023), e incluso la formación de diferentes estructuras, incrementa la rugosidad (Durdu et al., 2021) y mejora la resistencia a la corrosión (Bertolini & Gastaldi, 2011). Los trabajos donde se elaboran superficies nano-microestructuradas de TiO_2 son escasos debido a la dificultad de obtener ambas estructuras de manera combinada (A. Deng et al., 2018).

Se pueden elaborar superficies microestructuradas por la técnica de erosión iónica en conjunto con la fotolitografía, ya que la erosión iónica es ampliamente utilizada por su gran reproducibilidad y por producir películas de alta calidad (Arshi et al., 2012). Por otro lado, las nanoestructuras se pueden obtener mediante el anodizado, proceso sencillo y económico usado de manera regular para modificar superficies

de metales, tanto a nivel industrial como en investigación. La combinación de estas técnicas permite producir superficies nano-microestructuradas.

De manera similar se podrían elaborar superficies de TiO_2 mediante las técnicas de erosión iónica y anodizado, que combinen estructuras nano-micrométricas, las que podrían incrementar la proliferación celular y favorecer el acoplamiento de las propiedades mecánicas entre el hueso y los implantes de Ti, así como mejorar la resistencia a la corrosión.

Así entonces, este trabajo de tesis se enfoca en la elaboración de nano y microestructuras combinadas de TiO_2 y su influencia en la proliferación de células óseas.

A continuación, se presenta un apartado que resume los trabajos más representativos sobre recubrimientos estructurados de Ti y su óxido, con lo cual se plantean los objetivos y la hipótesis del trabajo de investigación.

1.1 Antecedentes

La modificación de la superficie de un material es un tema de relevancia científica y tecnológica debido a que dicha modificación se realiza para satisfacer necesidades específicas en aplicaciones que involucran áreas como la electrónica, óptica, almacenamiento de información, celdas fotovoltaicas, recubrimientos anticorrosivos y biocompatibles, entre otras (Albella Martín, 2003).

En el caso de los implantes de Ti que sustituyen el hueso, su debida integración requiere que su superficie, donde se forma la capa nativa de TiO_2 , promueva el crecimiento de células óseas. Al respecto, los estudios indican que la rugosidad afecta directamente la adhesión y el anclaje de las células, promoviendo así la proliferación celular (Neoh et al., 2012). Lo que fue corroborado por Martínez y colaboradores, quienes estudiaron la respuesta celular en superficies con diferentes tratamientos químicos y físicos, los que tienen influencia en la composición química y rugosidad de la superficie, y por ende en la adhesión y la proliferación celular (Martinez et al., 2020).

Puesto que la rugosidad, y la morfología en general, tienen influencia en el crecimiento celular, se hace necesario modificar las superficies para crear morfologías con diferentes estructuras, lo que puede hacerse utilizando métodos físicos o químicos.

Los métodos químicos más usados para crear estructuras en la superficie de Ti implican una reacción directa. La estructura así creada tiene una mayor estabilidad en comparación con algunos métodos físicos que tienden a formar una interface.

Uno de los métodos químicos más usados para crear estructuras superficiales en metales es el anodizado, debido a su simpleza y bajo costo. Con este, Sjöström y colaboradores (Sjöström et al., 2012) generaron nanopatrones ordenados de TiO_2 en superficies de Ti, los que se observan en la **Figura 1**. Mostraron además que dichos nanopatrones se podían obtener en superficies de Ti más complejas, como las formadas por microesferas como se visualiza en la **Figura 2**. En ambos casos, con o sin microesferas, el diámetro de los patrones fue de 21 ± 4 nm, y las distancias entre puntos de 30 ± 3 nm. Cabe resaltar que en dichas microesferas se obtuvo adhesión celular, dando resultados más favorables cuando se tenían nanopatrones.

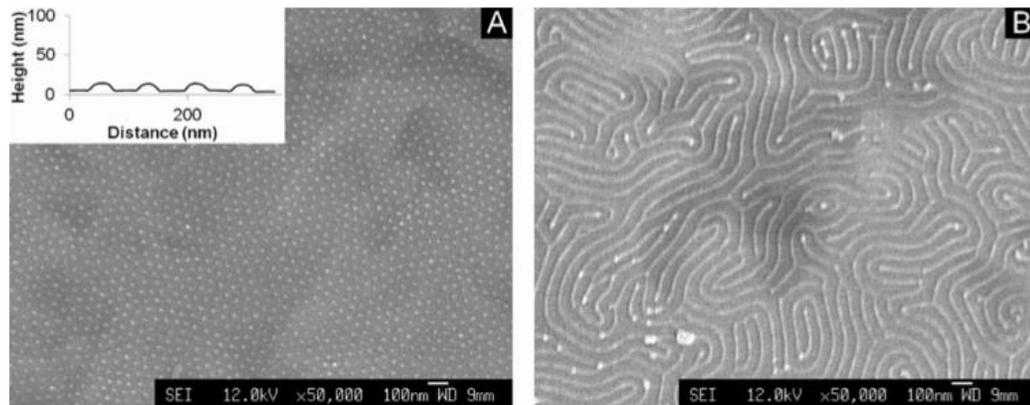


Figura 1. Nanopatrones de TiO_2 formados en la superficie de Ti mediante la técnica de anodizado, donde la plantilla se recoció en **a)** con disolvente de vapor de tetrahidrofurano y en **b)** con disolvente de vapor de cloroformo (Sjöström et al., 2012).

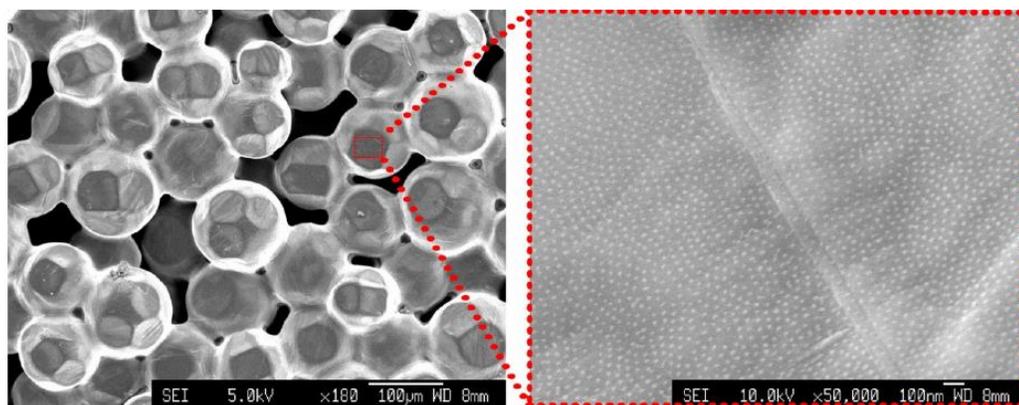


Figura 2. Nanopatrones de TiO_2 en la superficie de microesferas de Ti formados mediante la técnica de anodizado (Sjöström et al., 2012).

La técnica de anodizado también se utilizó en el trabajo de Aguirre et al (Aguirre Ocampo et al., 2022), donde se sintetizaron nanotubos de TiO_2 , que se observan en la **Figura 3**, a partir de placas de Ti. Mostraron que los componentes químicos utilizados durante el proceso de anodizado, no afectan en la viabilidad celular ya que no alteran la biocompatibilidad del material. Además, concluyeron que las características fisicoquímicas de la superficie sí afectan el comportamiento de las células, por ejemplo, el aumento de la rugosidad por la presencia de nanotubos mejoró la adhesión celular.

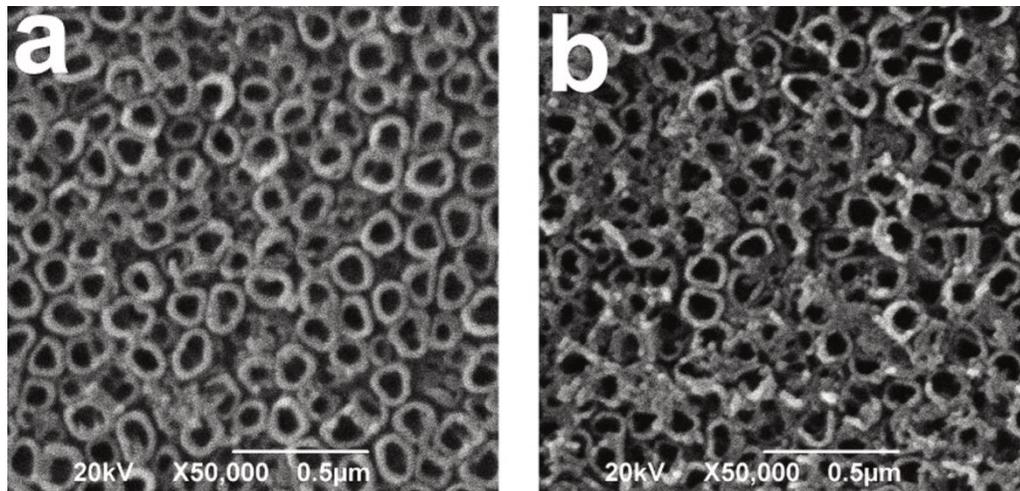


Figura 3. Micrografías de SEM de nanotubos de TiO_2 producidos por anodizado a 20 V y tratados termicamente a: **a)** 200 °C y **b)** a 350 °C (Aguirre Ocampo et al., 2022).

Por otro lado, la modificación de superficies por métodos físicos implica el depósito de recubrimientos, los que pueden o no tener una gran influencia en la morfología, pero que en general sí tienen una fuerte influencia en las propiedades, como se puede ver en el estudio de Pan y colaboradores (Pan et al., 1997). Ellos utilizaron la técnica de depósito asistido mediante haz de iones para depositar TiO_2 sobre Ti con el fin de estudiar la resistencia a la corrosión de este recubrimiento, en comparación con tener solo la capa nativa de TiO_2 sobre Ti. Sus resultados mostraron que la resistencia a la corrosión es mayor con el recubrimiento debido a su menor concentración de defectos.

Otro ejemplo del uso de un método físico se tiene en el estudio de Liu y colaboradores (Liu et al., 2019), quienes realizaron recubrimientos de TiO_2 utilizando una de las técnicas más socorridas para depositar películas, la de erosión iónica, ya que es ampliamente usada en la industria por producir películas de alta calidad y con buena reproducibilidad. A partir de estos recubrimientos de TiO_2 elaboraron diferentes microestructuras superficiales utilizando la fotolitografía **Figura 4**, la cual es una técnica de fabricación de gran precisión que se suele utilizar para modificar la morfología superficial.

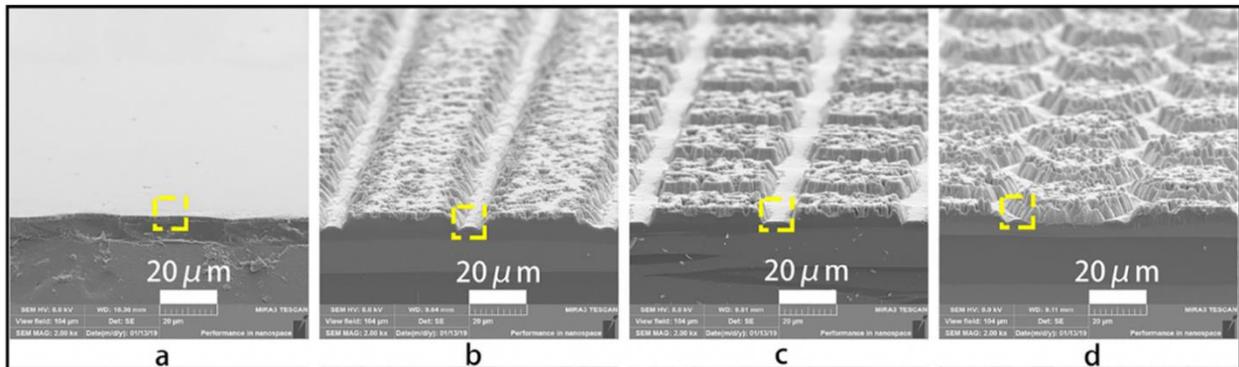


Figura 4. Imágenes SEM de una película de TiO_2 : **a)** continua, **b)** con estructura de rejilla, **c)** con estructura cuadrada y **d)** con estructura hexagonal (Liu et al., 2019).

La estructura cristalina y el módulo de Young son otras de las características susceptibles de ser modificadas en una superficie. Así, por ejemplo, los depósitos de TiO_2 pueden ser amorfos o tener una estructura cristalina, de anatasa o rutilo dependiendo de las condiciones de depósito, particularmente la temperatura (Keskin et al., 2020). Tales estructuras tienen asociado un módulo de Young particular, siendo el mayor la del rutilo (entre 230 y 288 GPa) (Chung & Buessem, 1968) en comparación con la anatasa (~151 GPa) (Borgese et al., 2012). En ocasiones se combinan métodos físicos y químicos para crear las estructuras deseadas como se reporta en el trabajo de Selman y colaboradores (Selman & Hassan, 2013), que depositaron TiO_2 sobre sustratos de vidrio mediante erosión iónica y posteriormente usaron la técnica de baño químico a diferentes temperaturas, para generar estructuras de TiO_2 en fase rutilo. Por otro lado, Kimura *et al* (Kimura et al., 2015) en su trabajo sobre sensores de gas, usaron las técnicas de anodizado y fotolitografía, mostrando que con ellas es posible generar superficies de TiO_2 con estructuras de diferentes tamaños.

La importancia de generar estructuras de tamaños combinados en las superficies de TiO_2 se desprende del hecho de que la rugosidad generada por nanoestructuras mejora la adhesión (Martínez et al., 2020) y la proliferación celular (Huang et al., 2023); mientras las estructuras microporosas en cerámicas de TiO_2 con poros promedio de algunas cuantas decenas de micras también favorecen la proliferación celular, disminuyendo además el módulo de Young del TiO_2 hasta ser del orden del que presenta el hueso (Valdespino Padilla, 2019), lo que a su vez reduciría las microfracturas en la interface con el mismo hueso.

Por lo anterior, en el trabajo de tesis que aquí se presenta, cuya justificación y objetivos se proporcionan enseguida, se generaron superficies de TiO_2 con estructuras nano y micrométricas

combinadas, utilizando para ello dos técnicas: la de anodizado, para obtener las nanoestructuras; y la de erosión iónica en conjunto con fotolitografía, para las microestructuras. Así mismo, se evaluó la influencia de las estructuras en la proliferación de células óseas.

1.2 Justificación

Los implantes de Ti han sido ampliamente utilizados en aplicaciones ortopédicas debido a su ligereza, alta resistencia a la corrosión y excelente biocompatibilidad. Estas dos últimas propiedades se deben a la capa de TiO_2 que se forma sobre la superficie del Ti al tener contacto con la sangre. Sin embargo, con el paso del tiempo suelen crearse microfracturas en el hueso del paciente que se acumulan hasta que la pieza implantada deba sustituirse. Se necesitaría entonces que tales implantes tuvieran superficies que promovieran la regeneración del tejido óseo circundante. Para ello las superficies podrían combinar estructuras tanto nano como micrométricas, lo que puede lograrse mediante recubrimientos de TiO_2 elaborados por las técnicas de erosión iónica y fotolitografía en conjunto con la de anodizado.

1.3 Hipótesis

Se pueden producir superficies nano-microestructuradas de TiO_2 , combinando las técnicas de erosión iónica y fotolitografía en conjunto con la de anodizado, que podrían favorecer la proliferación celular.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Elaborar superficies de TiO_2 que combinen estructuras desde nano hasta micrométricas, mediante las técnicas de erosión iónica y fotolitografía en conjunto con la de anodizado; y evaluar la influencia de tales estructuras en la proliferación celular.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Optimizar las condiciones de depósito de películas de Ti, preparadas con la técnica de erosión iónica.
2. Elaborar, mediante el proceso de fotolitografía y a partir de las películas de Ti, estructuras con poros micrométricos.
3. Obtener, por la técnica de anodizado, nanoestructuras de TiO_2 con diferentes morfologías variando el tiempo y voltaje aplicados, así como la concentración del electrolito.
4. Reproducir las nanoestructuras de TiO_2 del punto anterior, sobre las microestructuras elaboradas por fotolitografía, para obtener nano-microestructuras.
5. Cristalizar las estructuras de TiO_2 mediante tratamientos térmicos.
6. Determinar la morfología y el tamaño de las estructuras.
7. Determinar la influencia de la morfología en la proliferación de células óseas.

Capítulo 2. Conceptos fundamentales

El capítulo se divide en cuatro secciones: 1) películas delgadas, 2) elaboración de nano y microestructuras, 3) técnicas de caracterización y 4) pruebas biológicas.

2.1 Películas delgadas

Una película delgada es un material en la que una de sus dimensiones es muy inferior con respecto a las otras dos, su espesor puede ir desde algunos cuantos nanómetros hasta algunos micrómetros. El interés por el estudio y preparación de películas delgadas se debe fundamentalmente a tres razones: i) la tendencia de las tecnologías hacia la miniaturización, ii) la capacidad de otorgar atributos adicionales al usarse como recubrimiento de otro material, y iii) las propiedades únicas que el material adquiere al estar en forma de película delgada.

Las características básicas de las películas delgadas, tales como la composición, morfología, tamaño de grano, defectos y cristalinidad, son producto del proceso de crecimiento (L. Smith, 1995) y por ende, de la técnica de depósito.

Una de las técnicas que produce películas de alta calidad y reproducibilidad es la de erosión iónica, que fue utilizada para depositar las películas base del presente trabajo de tesis, por lo que en esta sección se proporciona su descripción y el proceso de crecimiento asociado a ella.

2.1.1 Técnica de erosión iónica

La técnica de erosión iónica consiste en bombardear un material, denominado como blanco, con iones acelerados mediante una diferencia de potencial. Al colisionar con la superficie del blanco, transfieren su momento a las moléculas y átomos, provocando su expulsión (ver **Figura 5**). El material erosionado se condensa como una película delgada.

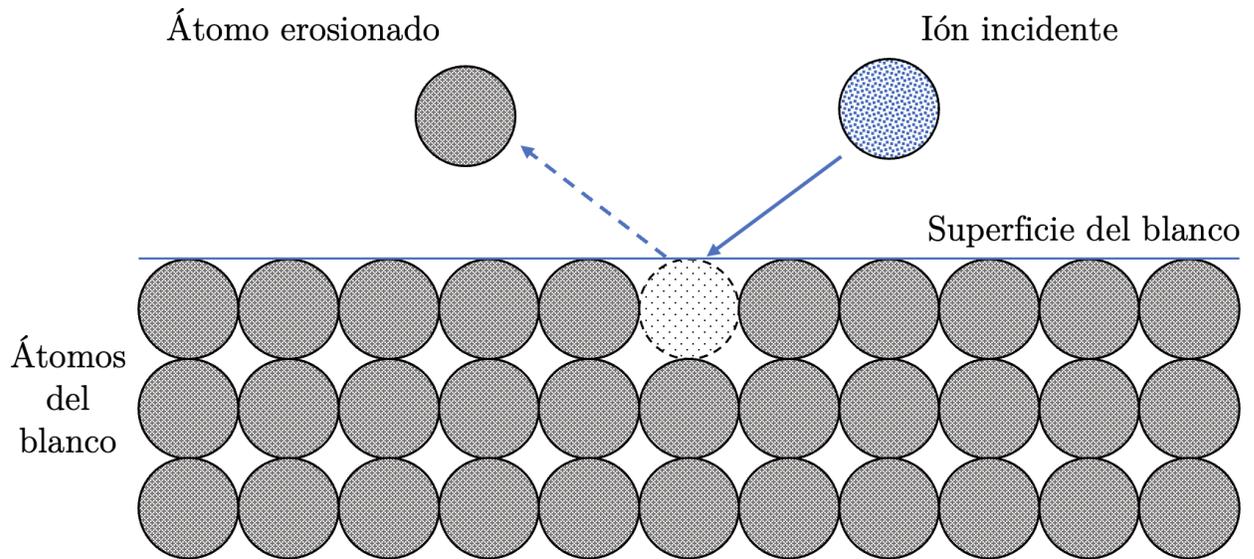


Figura 5. Esquema del proceso de erosión iónica.

El arreglo experimental, representado en la **Figura 6**, está dado por una cámara de vacío conectada a una bomba mecánica, para realizar un vacío previo en el orden de militorr, y a una turbomolecular a fin de alcanzar vacío en el orden de los microrr para reducir el número de partículas que pueden interferir en el depósito. Una vez alcanzado un alto vacío se introduce un gas inerte para ionizar, que por lo general es argón debido a su masa molecular, baja reactividad y costo. Esto genera un aumento de la presión dentro de la cámara. Dicha presión, llamada presión de trabajo, es un parámetro importante para la erosión iónica, ya que, si la presión del gas es muy baja, las colisiones entre los iones y la superficie del blanco serán insuficientes para erosionar este último. Si por el contrario la presión es muy alta, los electrones no alcanzarán la energía suficiente para ionizar los átomos de argón antes de colisionar con ellos. La presión de trabajo que se suele usar está en el orden de los militorr.

En el interior de la cámara se cuenta con dos electrodos, el ánodo y el cátodo. Comúnmente se coloca el blanco en el cátodo y perpendicular a este se sitúa el sustrato en el que se creará la película. Pese a las bajas presiones dentro de la cámara existen electrones libres, los cuales son acelerados por una diferencia de potencial que se establece entre el ánodo y el cátodo. Estos ganan la suficiente energía para arrancar electrones de los átomos de argón, generando iones positivos que son acelerados mayoritariamente hacia el blanco debido a su carga y provocando su erosión. Los átomos expulsados del blanco adquieren trayectorias aleatorias hasta la superficie más cercana, sin embargo, la configuración

espacial del equipo permite que se dirijan preferentemente hacia el sustrato, adhiriéndose a él y formando la película.

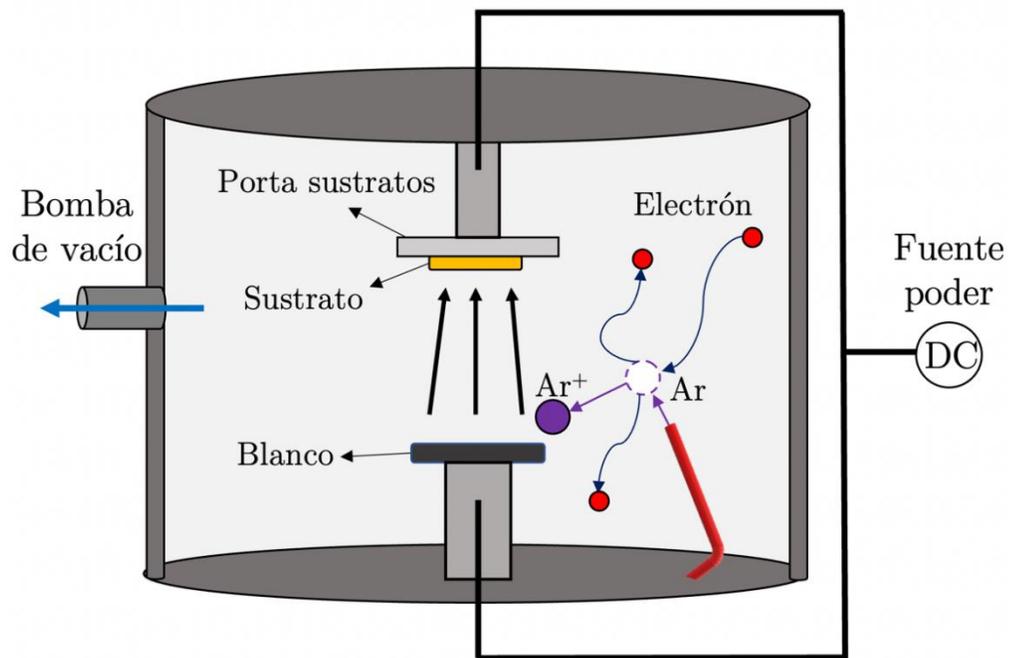


Figura 6. Representación gráfica del equipo de erosión iónica.

Los sistemas de erosión iónica pueden trabajar con una diferencia de potencial de corriente directa (DC) o de radiofrecuencias (RF), dependiendo del material que se quiera depositar. El voltaje DC se usa para blancos conductores o semiconductores para que estos se polaricen negativamente y atraigan los iones positivos de argón. Además, hace que los electrones que ionizan los átomos de argón describan trayectorias rectas del ánodo al cátodo. Por otro lado, el voltaje RF se utiliza para blancos aislantes a fin de evitar la acumulación de cargas positivas en la superficie del blanco que generan la repulsión de los iones y consigo el detenimiento de la erosión; así como para inducir que los electrones describan trayectorias sinusoidales, de tal manera que al ionizar un átomo de argón, readquieran la energía suficiente para repetir el proceso (Wasa et al., 2004).

Con el fin de aumentar la tasa de depósito se suele utilizar un sistema magnetrón, el cual consiste en una configuración de imanes colocados debajo del cátodo que sirve para superponer un campo magnético entre el blanco y el sustrato, de forma que las líneas de campo obliguen a los electrones a seguir trayectorias cicloidales con el propósito de incrementar el número de iones cerca del blanco y con esto, la erosión del mismo (Wasa et al., 2004).

La tasa de depósito de la película depende de la presión base y de trabajo, la potencia y el flujo de argón.

2.1.2 Crecimiento de películas delgadas

La erosión iónica está clasificada dentro del grupo de técnicas que utilizan una fase en vapor a partir de la cual se realiza el depósito de las películas. El crecimiento de tales películas se puede dividir en cuatro etapas: adsorción, difusión, nucleación y crecimiento (Ratsch & Venables, 2003), como se muestra en la **Figura 7**. Los átomos en fase vapor viajan con cierta energía hasta llegar al sustrato, donde posteriormente crece la película. Si los átomos llegan con mucha energía, son reflejados; en caso contrario, cuando están a distancias interatómicas de los átomos de la superficie del sustrato, comienza la interacción entre ellos.

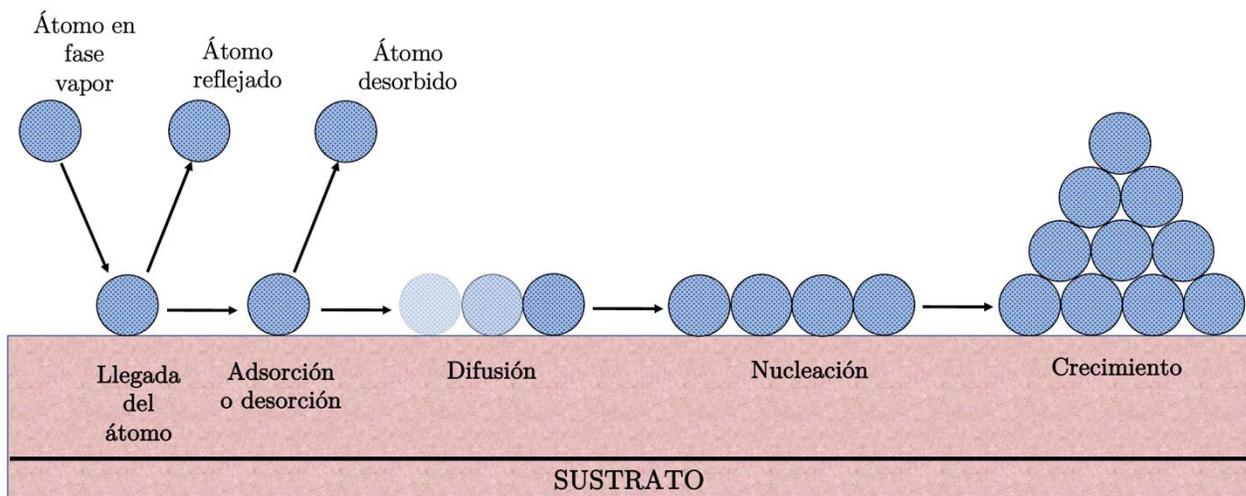


Figura 7. Esquema del proceso de crecimiento de las películas delgadas.

La primera etapa del crecimiento de las películas delgadas es la de adsorción, la cual se divide en fisorción y quimisorción. La primera de ellas involucra fuerzas de Van der Waals, que son aquellas de atracción débil (menores a 0.4 eV) que se generan entre dipolos inducidos temporalmente por fluctuaciones en la distribución de carga de un átomo. En caso de que el átomo fisorbido adquiriera suficiente energía térmica, este rompe su enlace y se desplaza sobre la superficie hasta que forma un enlace químico con un átomo o molécula, entonces se dice que hubo quimisorción, cuyo enlace es más fuerte que en la fisorción. No obstante, en ambos casos los enlaces se pueden romper si la temperatura

es suficientemente alta, provocando que los átomos se desorban y vuelvan a evaporarse (Albella Martín, 2003).

Luego de la adsorción ocurre la difusión, en la que los átomos adsorbidos migran sobre la superficie a sitios donde haya una mayor adsorción, que se da por una alta energía de enlace. Esto da lugar a la acumulación de material en dichos puntos, llamados sitios de nucleación.

En la etapa de nucleación se pueden dar tres tipos de crecimiento, dependiendo de la energía de adsorción y la de enlace entre los átomos incidentes (L. Smith, 1995). Si la primera energía es mayor que la segunda se tiene la nucleación de Frank-Van der Merwe (**Figura 8a**), donde se tiene una buena afinidad entre los átomos del sustrato y los depositados (O'Keefe & Rigsbee, 1995), provocando un crecimiento de capa por capa. Por otro lado, la nucleación de Volmer-Weber (**Figura 8b**) ocurre cuando la energía de enlace entre los átomos es mayor a la energía de adsorción, dando lugar a que los átomos se aglomeren y formen islas, las cuales crecen en ancho y espesor, y que, eventualmente, se agrupan con otras islas cercanas (Wasa et al., 1992). Por último, se tiene la nucleación tipo Stranski-Krastanov (**Figura 8c**), que es una combinación de las formas de nucleación antes mencionadas, en la que se forma una monocapa que es precedida por islas (Bunshah, 1994). El tipo de nucleación más común es el de Volmer-Weber, donde la película crece en forma de islas que posteriormente coalescen.

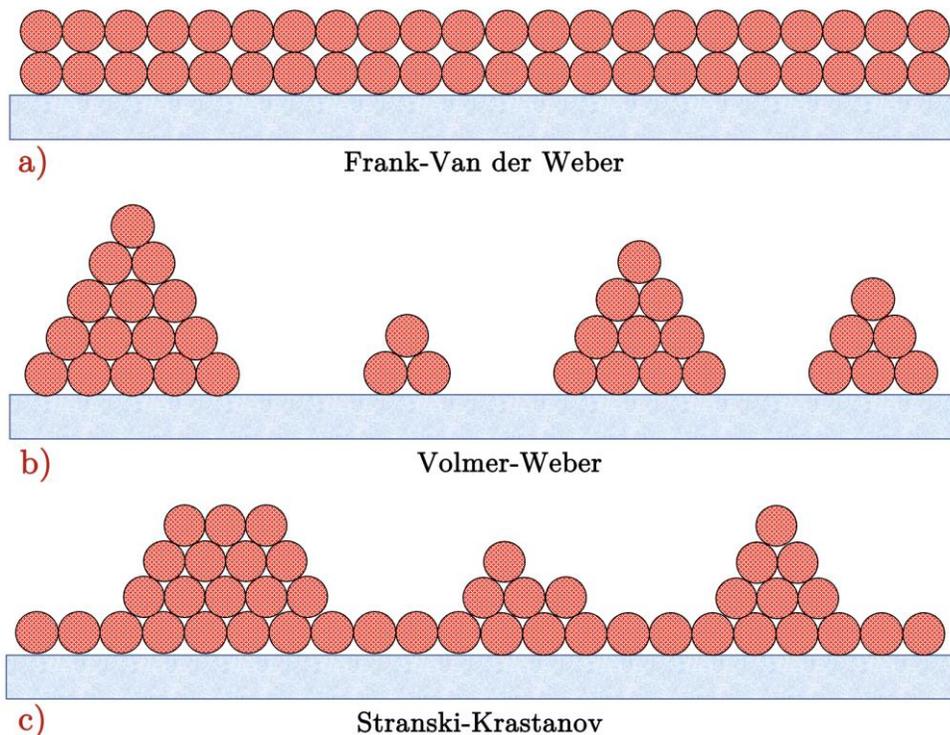


Figura 8. Nucleación tipo: **a)** Frank-Van der Weber, **b)** Volmer-Weber y **c)** Stranski-Krastanov.

El crecimiento de la película afecta su morfología final, la cual está relacionada con las propiedades físicas y químicas del material.

2.2 Elaboración de nano y microestructuras

A partir de las películas depositadas por erosión iónica se obtuvieron las microestructuras y nanoestructuras. Para las microestructuras se utilizó fotolitografía, en donde se hizo uso de la técnica de depósito por centrifugado. Ambas técnicas se incluyen en esta sección. Igualmente, se proporcionan los conceptos básicos asociados a la técnica de anodizado utilizada para obtener las nanoestructuras.

2.2.1 Fotolitografía

2.2.1.1 Técnica de depósito por centrifugado

La técnica de depósito por centrifugado, o mejor conocida por su nombre en inglés como *spin coating*, es sencilla, barata y rápida, por lo que es muy utilizada para la microfabricación de patrones y dispositivos mediante fotolitografía. Consiste en depositar películas delgadas mediante la aplicación de una solución en estado líquido, sobre un sustrato que se hace girar a altas velocidades. La fuerza centrífuga hace que el fluido se distribuya sobre la superficie, obteniéndose películas desde nanómetros hasta algunos cuantos micrómetros de espesor. Este último depende de la velocidad y el tiempo de centrifugado, así como de la cantidad y la viscosidad de la sustancia.

Los equipos de depósito por centrifugado comúnmente sujetan el sustrato mediante succión para evitar que se mueva mientras se gira. La cantidad de solución aplicada sobre el sustrato dependen del área del sustrato y el espesor que se requiera, tomando en cuenta que aproximadamente el 95 % de la solución es lanzada fuera del sustrato durante el centrifugado. Generalmente, después del recubrimiento se necesita un proceso de secado u horneado. El procedimiento completo se observa en la **Figura 9**. En caso de que se requiera realizar multicapas se debe repetir todo el proceso.

Las características finales de las películas dependen de la composición, concentración y viscosidad de la solución; así como de los parámetros de depósito, tales como velocidad y tiempo de giro; y del

proceso de secado u horneado.

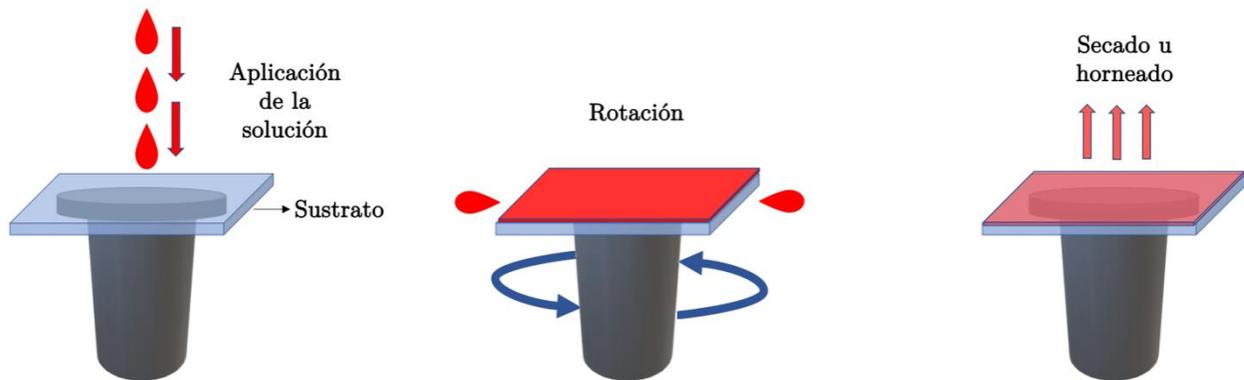


Figura 9. Proceso de depósito de películas mediante la técnica de depósito por centrifugado.

2.2.1.2 Fotolitografía

La técnica de fotolitografía consiste en generar patrones sobre un material utilizando una resina fotosensible (fotoresina) que tiene resistencia tanto a ataques físicos (plasma) como químicos (ácidos). El patrón se genera degradando la fotoresina mediante la exposición a luz ultravioleta a través de una fotomáscara, la cual es un sustrato transparente con zonas específicas recubiertas con un material opaco que evita que pase la luz. Después, la muestra se sumerge en una solución que provoca que las áreas degradadas sean removidas. Como se muestra en la **Figura 10**, el proceso se puede dividir en 5 pasos:

- 1) Se aplica la fotoresina en la superficie del material mediante la técnica de depósito por centrifugado. Después se coloca la muestra sobre una plancha térmica para que se evaporen los solventes de la fotoresina y se vuelva sólida, haciéndose también sensible a la luz ultravioleta. En caso de que el proceso de secado no se realice correctamente, la luz ultravioleta podría degradar la fotoresina por exceso de solventes; o bien un sobre secado de la fotoresina podría aumentar su sensibilidad a la luz ultravioleta y dañar el componente fotoactivo, evitando que la fotoresina se pueda remover. Por lo general, la temperatura y el tiempo del tratamiento térmico son sugeridas por el proveedor de la fotoresina.
- 2) La superficie con fotoresina se irradia con luz ultravioleta para transferirle el patrón de la fotomáscara. Las zonas expuestas a la luz sufren reacciones químicas que la debilitan la fotoresina.

- 3) Se realiza el revelado, que consiste en sumergir la muestra en una solución alcalina, llamada revelador, para remover la fotoresina degradada, dejando expuestas las zonas que desean eliminarse.
- 4) Se lleva a cabo el decapado, que consiste en erosionar el material que quedó desprotegido hasta removerlo por completo, mediante un ataque químico (usando ácidos) o físico (con plasma).
- 5) Se remueve la fotoresina restante utilizando un solvente.

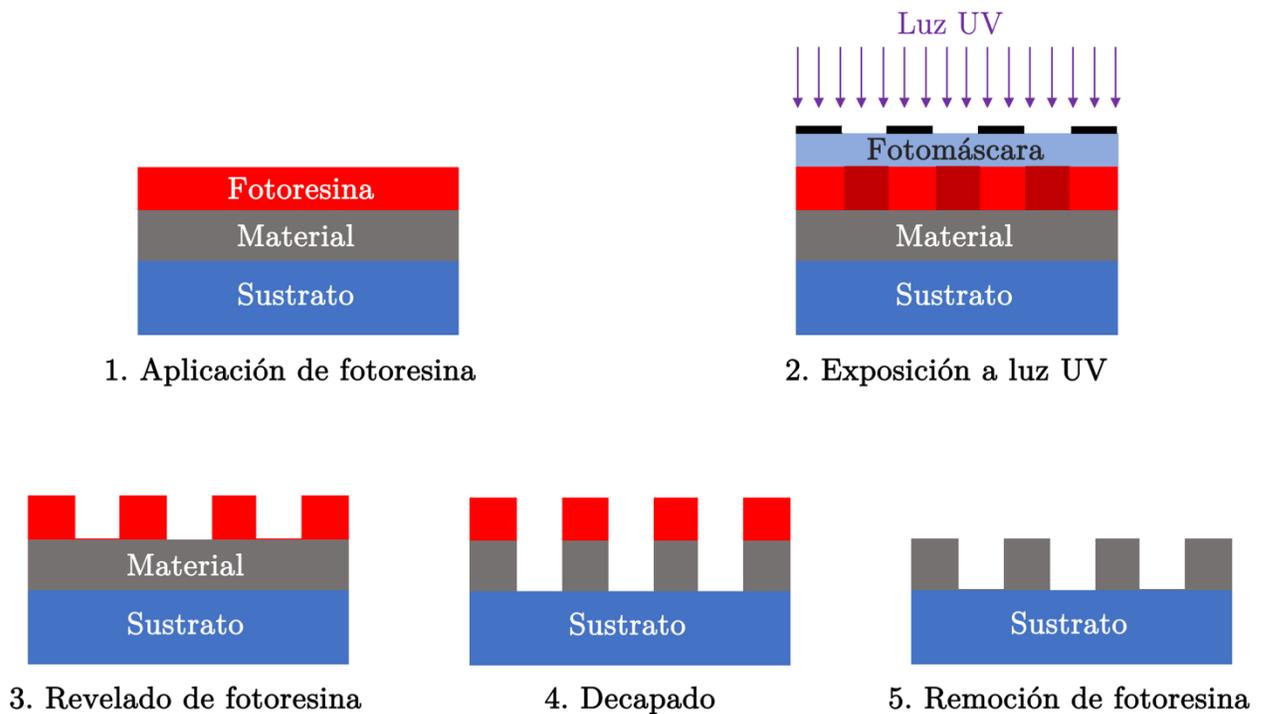


Figura 10. Esquema del proceso de fotolitografía con fotoresina positiva.

La técnica de fotolitografía se tiene que realizar dentro de un cuarto limpio con iluminación amarilla, ya que el proceso debe llevarse a cabo en espacios libres de partículas suspendidas y donde se pueda prevenir la exposición de la fotoresina a la luz de longitudes de onda corta.

En cuanto a la fotoresina, existen dos tipos; la positiva y la negativa, la que se utilice depende de los requerimientos para obtener la estructura deseada. La usada en el proceso antes descrito (ver **Figura 10**), es fotoresina positiva, la cual se hace soluble al ser expuesta a luz ultravioleta y, consecutivamente, a un revelador. Por otro lado, la fotoresina negativa es soluble al sumergirse en un revelador, pero pasa a ser

insoluble al ser expuesta a la luz ultravioleta. Esta última se suele utilizar para una variante de la fotolitografía conocida como *Lift-off*, la que se explica a continuación.

2.2.1.3 Fotolitografía por *Lift-off*

La técnica de fotolitografía por *Lift-off*, a diferencia de la explicada en la sección anterior, utiliza una fotoresina negativa que se aplica sobre el sustrato, donde se genera el patrón, y luego se deposita el material, por lo que no es necesario ningún ataque físico o químico. Esta técnica se usa normalmente cuando el material es difícil de erosionar o si no hay acceso a algún método de decapado, debido a esto, en ciertas circunstancias puede ser más económica que la fotolitografía. En la **Figura 11** se puede observar el proceso, que está dividido en los siguientes cinco pasos:

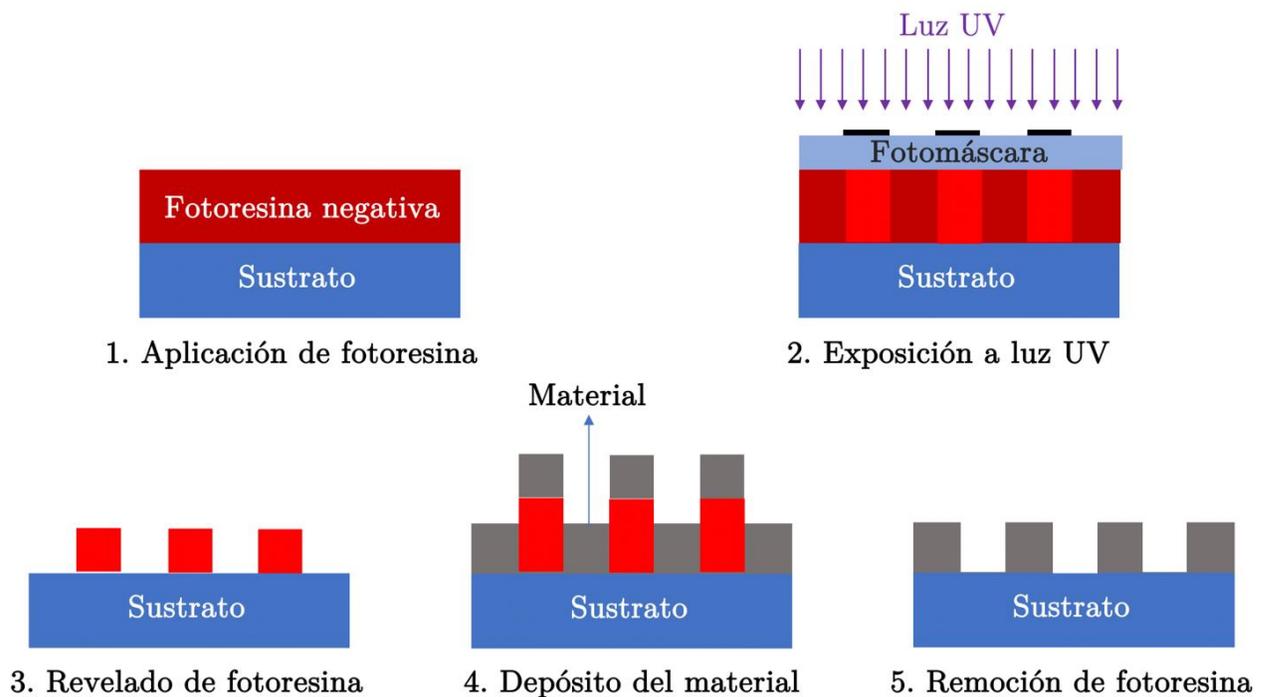


Figura 11. Esquema del proceso de fotolitografía por *Lift-off* con fotoresina negativa.

- 1) Se deposita una fotoresina negativa sobre la muestra mediante la técnica de depósito por centrifugado y luego se evaporan los solventes mediante un proceso de secado.

- 2) La muestra se expone a luz ultravioleta a través de una fotomáscara con el patrón requerido. Al ser fotoresina negativa, las zonas expuestas a la luz son las que no serán removidas.
- 3) Se realiza el revelado para retirar la fotoresina que no fue irradiada con luz.
- 4) Se deposita el material sobre el sustrato y la fotoresina restante.
- 5) Se remueve en su totalidad la fotoresina que queda sobre el sustrato.

2.2.2 Anodizado

El anodizado es un proceso electroquímico que permite la síntesis de películas de óxidos nanoestructurados sobre una superficie metálica. El sistema del anodizado, que se ilustra en la **Figura 12**, utiliza como ánodo el metal a oxidar (de ahí el nombre del proceso). Como cátodo se usa un material químicamente inerte, en forma de placa o varilla, que suelen ser de platino, titanio o grafito (este último es ampliamente utilizado debido a su bajo costo). Ambos electrodos están sumergidos en un electrolito, cuya composición es determinante en la estructura final de la película oxidada. Si se quiere formar una capa continua, son necesarias soluciones neutras o ligeramente alcalinas (pH entre 8.5 a 9), de tal forma que la película de óxido sea insoluble o que se disuelva a una velocidad menor a la velocidad con la que se genera. Por otro lado, se necesitan electrolitos ácidos con iones de flúor o cloro, para que estos generen nanoestructuras en la capa de óxido que va creciendo (Luna Cervantes, 2018).

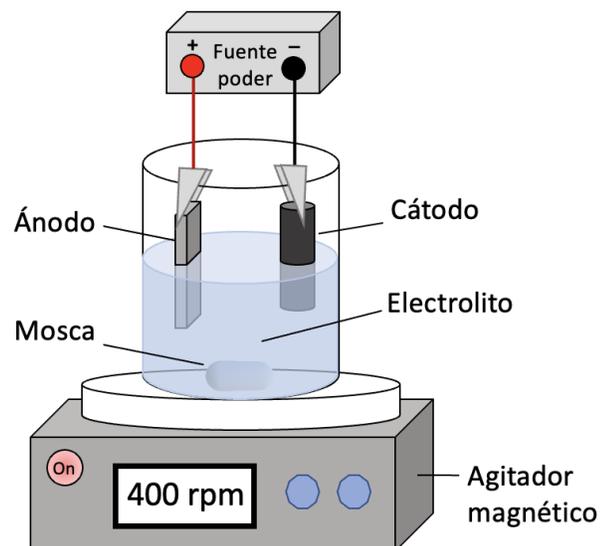


Figura 12. Representación del sistema de anodizado.

El proceso de anodizado comienza cuando se aplica un voltaje entre los electrodos, que provoca que los electrones se trasladen del cátodo al ánodo por medio del electrolito, haciendo que los átomos metálicos de la superficie reaccionen con los iones de oxígeno dentro del electrolito y formen la capa de óxido. A continuación, los electrones regresan al cátodo a través de la fuente de poder, donde reaccionan con iones de hidrógeno generando gas residual. En el caso de que se tengan iones de flúor o cloro en el electrolito, estos causarán la disolución del óxido en puntos específicos, lo que comenzará la formación de nanoporos e incrementará la corriente. Progresivamente se llegará a un equilibrio entre la oxidación de la superficie del metal y la disolución de la capa de óxido, alcanzando a su vez una corriente constante y dando lugar a la formación de las nanoestructuras (Gong et al., 2001).

Utilizar un sistema de agitación del electrolito mejora el proceso de difusión de las especies de reacción y su reacción, y en consecuencia, facilita la formación de las nanoestructuras (Lucas-Granados et al., 2017). La agitación también promueve la migración de iones de flúor, que pudiera estar limitada por la viscosidad del electrolito, haciendo que la disolución química pueda formar nanoestructuras en toda la superficie del metal (Pawlik et al., 2017).

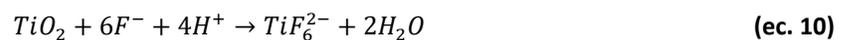
2.2.2.1 Mecanismos de formación

El mecanismo de formación para una película de óxido nanoporosa de TiO_2 utilizando un electrolito de NH_4F se puede resumir en dos etapas, la de oxidación y la de disolución. En la etapa de oxidación se da el crecimiento de la película de óxido en la superficie del ánodo de Ti, que inicia con la formación de iones Ti^{4+} (**ec. 1**) que reaccionan con los iones OH^- de la reducción del H_2O en el electrolito (**ec. 2**) y con los O^{2-} de la desprotonación del OH^- (**ec. 3**). De esto, se forma óxido de Ti sobre la superficie de Ti (**ec. 4**) y un óxido hidratado (**ec. 5**) que puede convertirse en óxido de Ti (**ec. 6**). Además, se produce una liberación de O_2 por el proceso de oxidación (**ec. 7**). Con respecto al cátodo, en este se produce la evolución del hidrógeno a partir de la reducción de H_2O (**ec. 2**) y la formación de H_2 (**ec. 8**). Todas estas reacciones dan como resultado la reacción global de la (**ec. 9**). A la película formada se le conoce como capa de barrera (Hernández López, 2015).





A continuación, se lleva a cabo la disolución del óxido y comienza la formación de los nanoporos. En esta etapa los iones de F^- presentes en el electrolito reaccionan con el TiO_2 y el $Ti(OH)_4$, dando lugar al compuesto soluble TiF_6^{2-} (**ec. 10**) y (**ec. 11**). Esto genera una disolución localizada de los iones de flúor asistida por el campo eléctrico y fractura la película del óxido en distintos sitios, donde se forman los nanoporos (Hernández López, 2015).



En la **Figura 13** se puede observar de manera esquemática el proceso de crecimiento de las nanoestructuras de TiO_2 , así como la evolución de la densidad de corriente durante un proceso de anodizado a voltaje constante. El esquema presenta una gráfica de densidad de corriente contra tiempo, que está dividida en tres fases. En la primera fase se tiene la formación de la capa barrera de TiO_2 sobre la superficie del titanio, donde la densidad de corriente disminuye exponencialmente por el aumento del espesor de la película de óxido, disminuyendo a su vez, la fuerza del campo eléctrico. En la segunda fase, se manifiesta un aumento de la corriente debido a la disminución de la resistencia de la película de TiO_2

por la formación de los poros que se generan, por efecto de la disolución asistida por el campo eléctrico que debilita las uniones entre el titanio y el oxígeno, y por la disolución química que involucra presencia de iones flúor en el medio de anodizado. Por último, en la tercera fase la corriente alcanza un valor constante que conlleva un estado de equilibrio entre la formación del óxido en la superficie del metal y la velocidad de disolución química en la interfase entre el óxido y el electrolito (Hernández López, 2015).

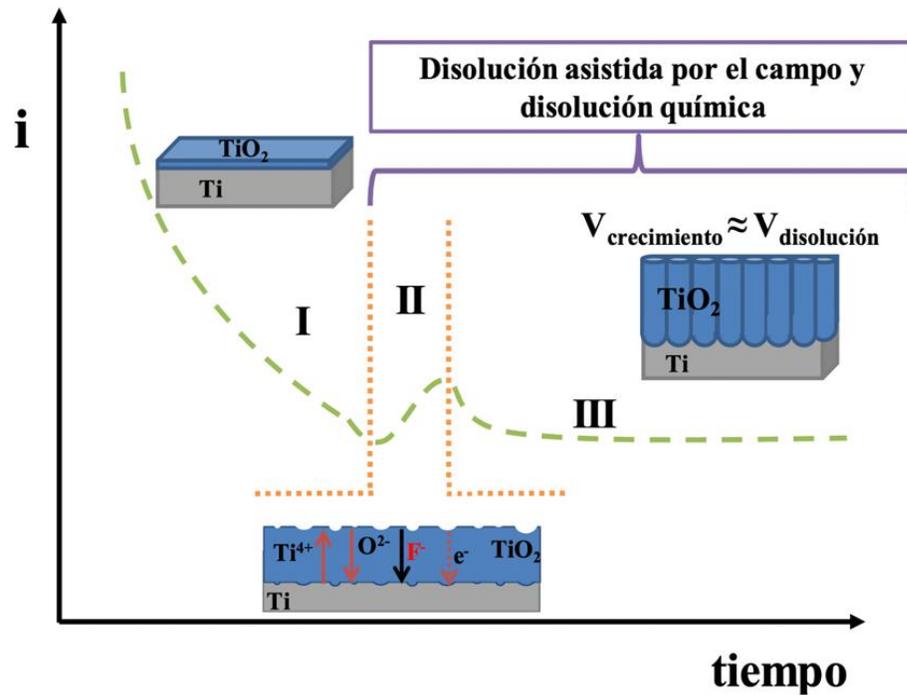


Figura 13. Curva densidad de corriente contra tiempo durante el crecimiento de una película de TiO_2 nanoestructurado a voltaje constante en un electrolito con iones de flúor (Hernández López, 2015).

2.2.2.2 Parámetros de preparación

Además del tiempo, los otros dos parámetros más importantes del proceso de anodizado son el electrolito y el voltaje. Su influencia se describe enseguida.

Electrolito

El electrolito que se utilice depende del metal empleado como ánodo y la morfología requerida. Para formar una película continua, se utilizan soluciones neutras o ligeramente alcalinas (pH de 8.5 a 9), mientras que para una película nanoestructurada se usan electrolitos ácidos, como por ejemplo NH_4F . Para este último caso, la concentración de los iones de flúor tiene influencia en la tasa de formación y la

morfología de la capa de óxido. Si la concentración de NH_4F es muy grande, no habrá formación del óxido puesto que el flúor reaccionará con todo el Ti^{4+} y genera TiF_6^{2-} , que es el compuesto soluble. Sin embargo, si la concentración es muy baja se formará la capa de barrera, pero los iones de flúor no serán suficientes para la formación de los nanoporos (Zhang et al., 2015). Además, para el crecimiento de las películas de TiO_2 nanoestructuradas la velocidad de agitación del electrolito tiene influencia en el espesor, la tasa de crecimiento y el diámetro de los nanoporos (Syrek et al., 2015).

Cuando el electrolito es nuevo, la tasa de disolución es demasiado alta por el exceso de iones de flúor, por lo que se disolverá la mayoría del óxido formado. Por ello se recomiendan unos minutos de uso del electrolito, proceso que se le conoce como envejecimiento (Sopha et al., 2015). Sin embargo, si ese tiempo es muy grande, la concentración de iones de flúor disminuye por las reacciones químicas del anodizado, lo que reduce la densidad de corriente y en consecuencia se requiere de más tiempo para generar la nanoestructura requerida. Por ejemplo, la edad óptima para un electrolito con NH_4F para anodizaciones a 60 V está en el rango de 0 a 35 h después del envejecimiento. En la **Figura 14** se presenta una curva de la densidad de corriente contra tiempo para electrolitos con NH_4F con diferentes tiempos de uso previo en un anodizado de 6 h, donde se puede observar cómo disminuye la densidad de corriente conforme aumenta el tiempo de uso previo de los electrolitos (Sopha et al., 2015).

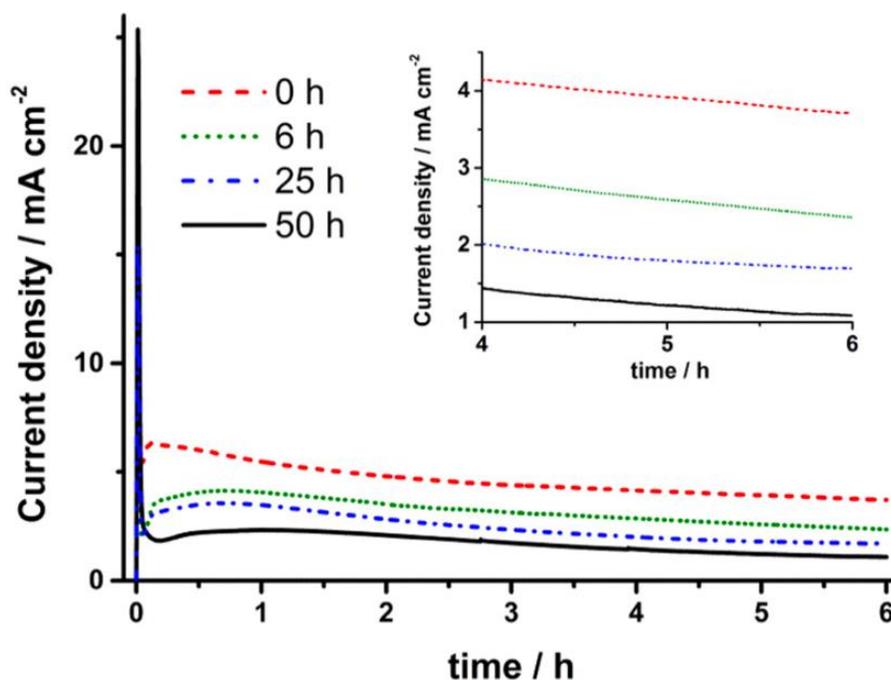


Figura 14. Curvas de densidad de corriente contra tiempo de electrolitos de NH_4F con diferentes tiempos de uso previo, en un anodizado de 6 h (Sopha et al., 2015).

Voltaje

El voltaje, directamente relacionado con la intensidad del campo eléctrico, impacta en los procesos de oxidación y disolución que dan lugar a la formación de nanoestructuras. Para la generación de nanoporos, se suele aplicar un voltaje entre 5 y 30 V para electrolitos acuosos (Roy et al., 2011), mientras que para los electrolitos orgánicos entre 10 y 60 V (Regonini et al., 2013).

Así mismo, a medida que se forman productos de reacción durante el anodizado, la conductividad del electrolito aumenta y, por lo tanto, se observa un crecimiento del diámetro conforme se prolonga el tiempo de anodizado. En consecuencia, se tienen un comportamiento lineal que hace posible controlar el diámetro de los nanoporos mediante el voltaje aplicado (Roy et al., 2011). En la **Figura 15** se observa la dependencia del voltaje con el diámetro de nanoestructuras para un electrolito con etilenglicol, 0.2 wt % de H₂O y HF (Albu et al., 2007).

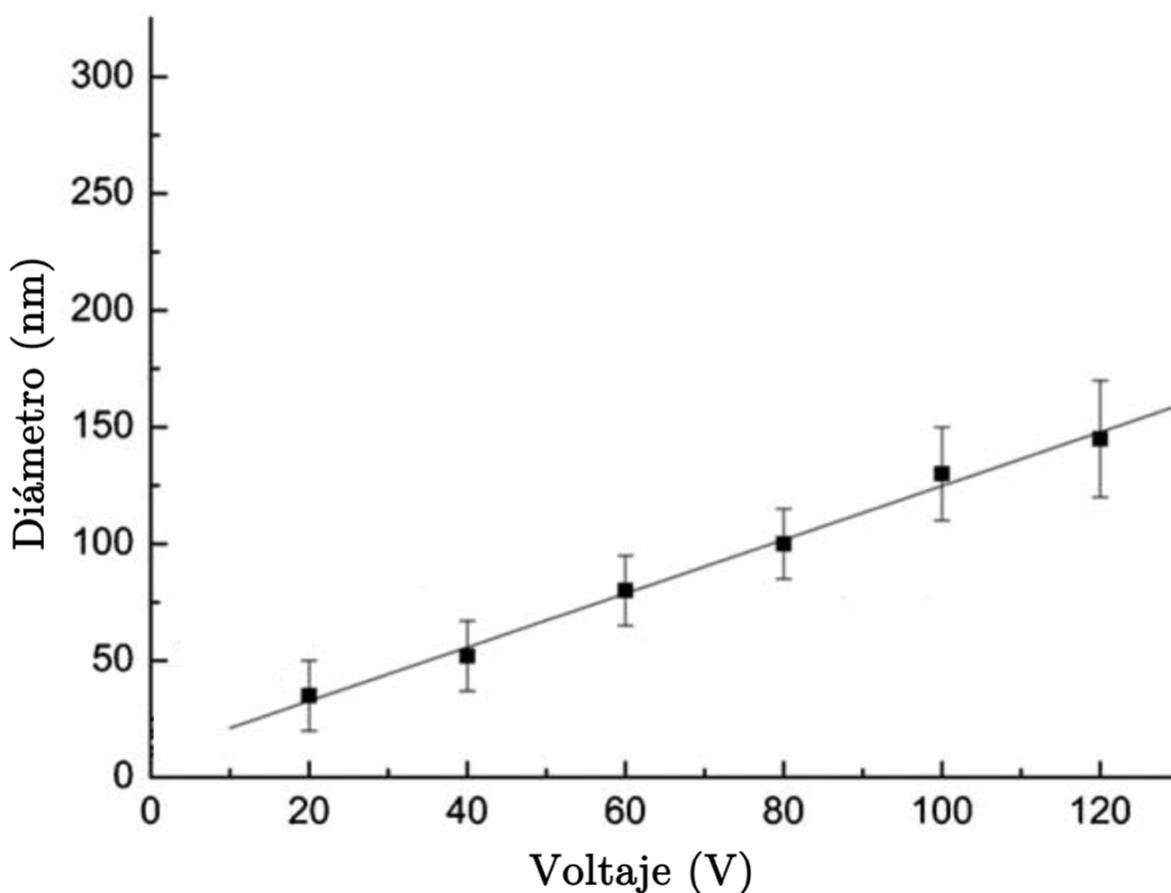


Figura 15. Dependencia del voltaje con el diámetro de los poros en las nanoestructuras, para un electrolito con etilenglicol, 0.2 wt % de H₂O y HF (Albu et al., 2007).

2.3 Técnicas de caracterización

En esta sección se describen las técnicas que se utilizaron para la caracterización de las películas delgadas elaboradas.

2.3.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés *Scanning Electron Microscopy*) se utiliza para obtener imágenes topográficas, con resolución nanométrica, de la muestra analizada. Dicha técnica, esquematizada en la **Figura 16**, se lleva a cabo en condiciones de alto vacío (orden de μTorr). Su funcionamiento se basa en la interacción de un haz de electrones con la superficie del material a estudiar. Los electrones son generados por emisión termoiónica de un filamento de tungsteno al que se le hace circular una corriente eléctrica. Estos electrones son acelerados por una diferencia de potencial entre 0.1 a 30 keV y son enfocados en la muestra mediante un arreglo de lentes magnéticas condensadoras y objetivas. El haz de electrones puede barrer la superficie de interés a partir del campo eléctrico que producen bobinas deflectoras.

La interacción de los electrones con la muestra provoca varios procesos, dependiendo de su energía y de las características del material. Entre los procesos se encuentra la emisión de electrones retrodispersados, secundarios y Auger, además de rayos-X y calor. Por lo general, la especie resultante está dada por el orden de penetración, H , de los electrones en el material, lo que depende del número atómico, Z ; el peso atómico, A (g/mol); el voltaje de aceleración, V (kV); y la densidad, ρ (g/cm³), como se describe en la **(ec. 12)** (Kanaya & Okayama, 1972):

$$H = \frac{0.0276AV^{1.67}}{Z^{0.89}\rho} \quad \text{(ec. 12)}$$

Los electrones secundarios, aquellos que son arrancados de los niveles energéticos más externos de los átomos en la superficie de la muestra, y que tienen una energía menor a 50 eV, son recogidos mediante un detector sincronizado con el barrido del haz. Con los electrones detectados se forma una imagen de claro-oscuros que está relacionada directamente con la topografía de la muestra. Las zonas con mayor altura son más claras debido a la facilidad con la que los electrones llegan al detector, mientras que en las zonas más profundas estos no alcanzan a ser detectados y, en consecuencia, se ven oscuras (Goldstein et al., 2003).

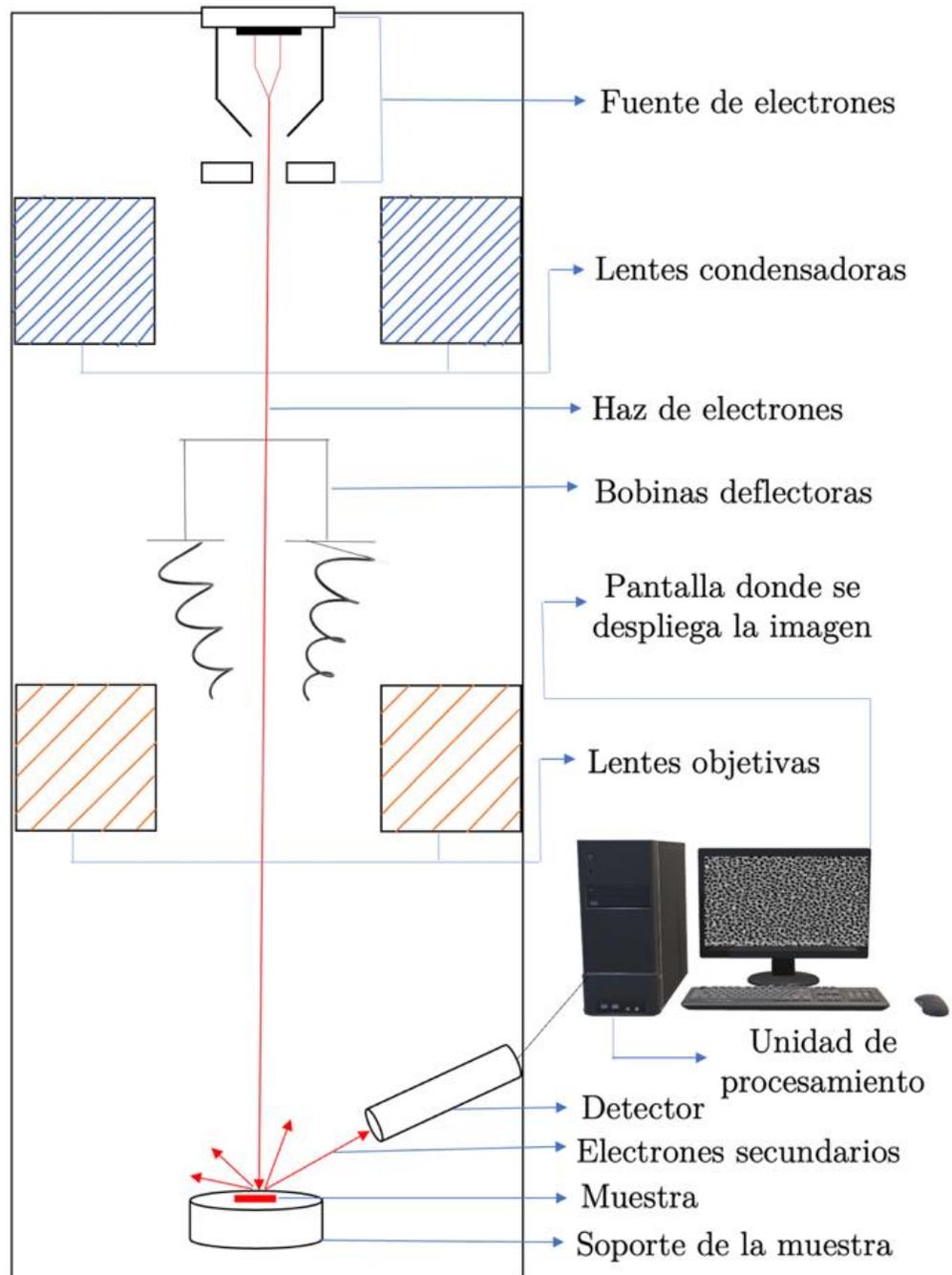


Figura 16. Esquema del microscopio electrónico de barrido (SEM).

2.3.2 Espectroscopía de dispersión de energía (EDS)

La espectroscopía de dispersión de energía (EDS, por sus siglas en inglés *Energy Dispersive Spectroscopy*) es una técnica que permite conocer la composición elemental de una muestra. Se basa en la producción de un haz de electrones que se aceleran hasta alcanzar energías entre 5 y 20 KeV para que

estos impacten con los electrones de los niveles más internos de los átomos en la muestra y los expulsan, como se ilustra en la **Figura 17a**. Para minimizar la energía del sistema, los electrones de los niveles superiores decaen y ocupan los sitios dejados anteriormente, produciendo fotones con longitud de onda del orden de los rayos X, como se muestra en la **Figura 17b** (Goldstein et al., 2003).

Los rayos X liberados cuentan con energías características de los niveles energéticos de los átomos, por lo que es posible identificar los elementos que conforman la muestra utilizando la ley de Moseley (**ec. 13**):

$$E = c_1(Z - c_2)^2 \quad (\text{ec. 13})$$

donde c_1 y c_2 son constantes relacionadas con las capas atómicas involucradas, E es la energía del fotón y Z es el número atómico del elemento que compone la muestra.

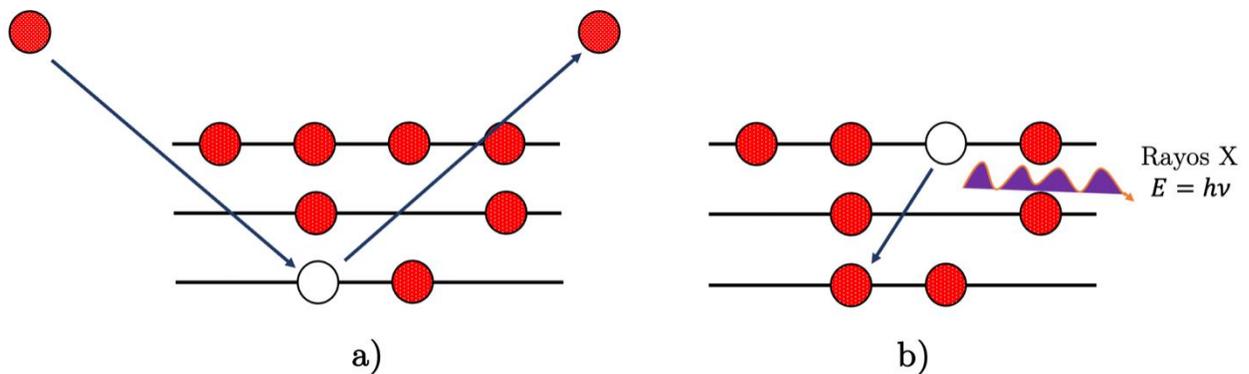


Figura 17. Principio básico del funcionamiento de la técnica de EDS: **a)** expulsión de electrones de los niveles atómicos internos y **b)** decaimiento de electrones de niveles superiores y emisión de rayos X.

2.3.3 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

La microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés *Atomic Force Microscopy*) es una técnica capaz de obtener imágenes tridimensionales de topografía de una muestra. El principio de funcionamiento se basa en la detección de fuerzas del orden de los nanonewtons a través de una sonda constituida por una punta de ~ 5 nm de diámetro unida a una ménsula, la cual se flexiona al interactuar con los átomos de la superficie de la muestra. Dicha deflexión varía según las fuerzas presentadas, las cuales dependen de la distancia entre la punta y la superficie, así como de las propiedades de la muestra. Así entonces, la deflexión de la ménsula es medida por un láser que incide sobre ella y es reflejado a un

fotodetector, como se ilustra en la **Figura 18**. De esta manera, el barrido de la punta sobre la muestra y el registro de la deflexión de la ménsula, permiten generar una imagen de topografía con la que, posteriormente, se calcula la rugosidad de la superficie.

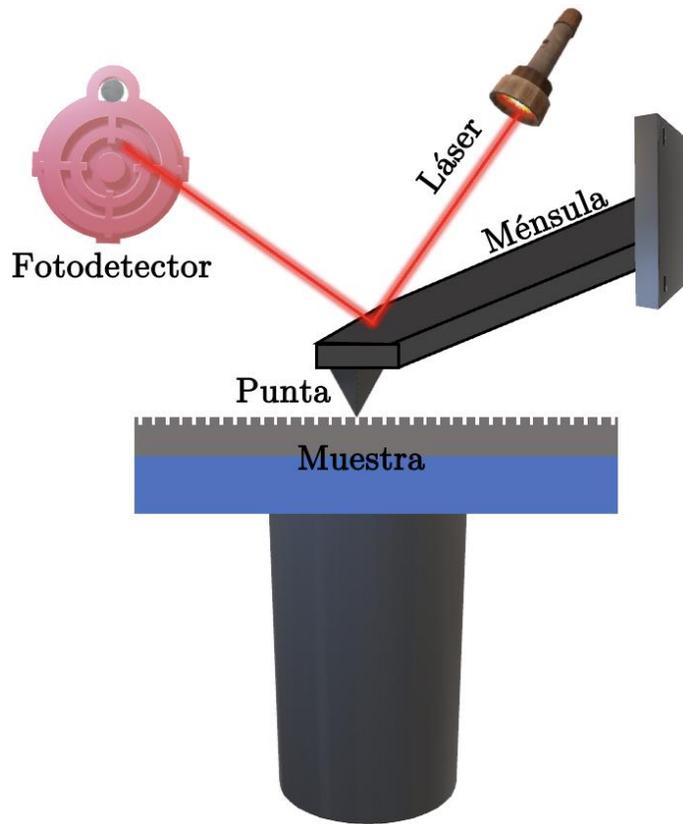


Figura 18. Esquema del microscopio de fuerza atómica (AFM).

2.3.4 Difracción de rayos X (XRD)

La difracción de rayos X (XRD, por sus siglas en inglés *X-Ray Diffraction*) es una técnica de caracterización que permite identificar la estructura cristalina de un material, ya que proporciona el tamaño y forma de la red cristalina, además de las posiciones de los átomos. El principio de funcionamiento de la técnica se basa en generar rayos X por expulsión y posterior decaimiento de electrones en los orbitales atómicos (ver sección **2.3.2**), solo que en este caso, los electrones inciden en una placa metálica de un elemento particular (cobre o molibdeno) y se escogen los rayos X característicos de una sola línea de emisión. Si la placa es de cobre, generalmente se escoge la línea de emisión $K_{\alpha, \text{Cu}}$ cuya longitud de onda es de 1.5404 \AA . Estos rayos X, los cuales generan un haz coherente y monocromático, se

hacen incidir sobre la muestra a analizar. Si la muestra es cristalina, los rayos difractados tendrán interferencia constructiva a ciertos ángulos determinados de la siguiente manera.

Considere por simplicidad, dos rayos del haz que inciden y son reflejados a un ángulo, θ , por una familia de planos cristalinos separados por una distancia, d , como se ilustra en la **Figura 19**. Para que estos rayos estén en fase y tengan interferencia constructiva, es necesario que su diferencia de camino óptico sea un múltiplo entero, n , de su longitud de onda, λ . De acuerdo con el análisis geométrico se expresa como:

$$n\lambda = 2d \sin(\theta) \quad (\text{ec. 14})$$

Expresión conocida como ley de Bragg. Si un detector de rayos X barre un ángulo 2θ , que es el ángulo entre el haz sin difractar y el difractado (ver **Figura 19**), se puede generar un difractograma, i.e., una gráfica de intensidad de la radiación en función de 2θ , con picos de mayor intensidad. Cada pico se observa a un ángulo donde se cumple la ley de Bragg para una familia planos con una distancia interplanar específica (Kittel, 1995). Así entonces, del difractograma se extraen los ángulos θ y mediante la ley de Bragg (**ec. 14**) se calculan las distancias interplanares en el cristal y, con ello, la forma y tamaño de la celda cristalina. Además, la intensidad de los picos permite conocer la posición de los átomos.

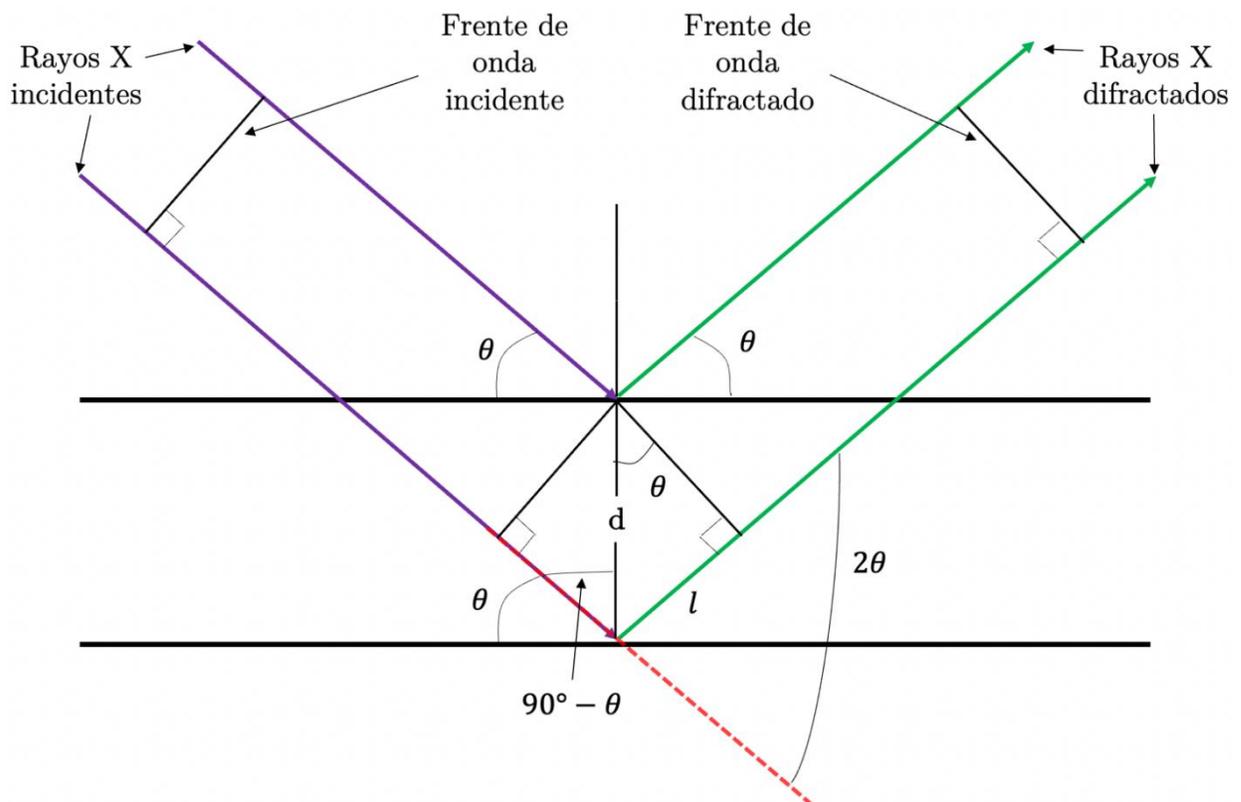


Figura 19. Esquema de la difracción de rayos X en planos atómicos separados por una distancia d .

2.4 Ensayos biológicos

2.4.1 Hemólisis

La hemólisis es una prueba utilizada para evaluar la biocompatibilidad de una muestra en sangre. Consiste en sumergir la muestra en una solución salina de eritrocitos (glóbulos rojos) para evaluar si las membranas de estos se rompen por estar en contacto con el material, lo que liberaría una proteína llamada hemoglobina. Si el porcentaje de hemoglobina liberada es mayor al 5%, el material es tóxico para la sangre, ello según la norma con el ISO 10993-4; por debajo de este porcentaje la muestra se considera biocompatible. Para medir dicho porcentaje se hace la comparación entre la absorbancia de la solución de eritrocitos después de estar en contacto con la muestra, y las absorbancias de dos muestras control: una de un material que provoca la liberación de toda la hemoglobina (por lo que existe un 100% de hemólisis y por ello se llama control positivo); y otra de un material no tóxico (que no genera más del 5% de hemólisis por lo que constituye el control negativo).

2.4.2 Proliferación celular

La proliferación celular es un proceso en el cual las células crecen y se dividen, por lo que es fundamental para la formación de tejidos. El ensayo consiste en cultivar las células de interés, en las muestras a estudiar, por un determinado tiempo. Para este trabajo de tesis, tales células son los osteoblastos, ya que ellas son las encargadas de la formación del tejido óseo. Una de las maneras de realizar la medición de la proliferación es utilizando el método de reducción de resazurina, el cual consiste en usar un colorante no tóxico llamado azul de alamar o resazurina, que al ser reducido mediante encimas mitocondriales a resorufina se vuelve altamente fluorescente, teniendo una longitud de onda de excitación de 563 nm y una longitud de onda de emisión de 587 nm. Así entonces, a partir de las medidas de fluorescencia antes y después del ensayo, es posible determinar la cantidad de células en el pozo de cultivo y, por lo tanto, conocer la proliferación celular.

Capítulo 3. Metodología

La metodología usada en este trabajo se dividió en cuatro etapas: 1) el depósito de películas continuas de Ti mediante la técnica de erosión iónica, 2) la elaboración de nano y microestructuras de TiO_2 a partir de las técnicas de anodizado y fotolitografía, 3) la caracterización de las películas nano y microestructuradas de TiO_2 y 4) la evaluación de la respuesta biológica de las nano y microestructuras de TiO_2 . Los detalles sobre cada una de ellas se proporcionan a continuación.

3.1 Depósito de películas de Ti

Enseguida se especifica el proceso usado para el depósito de tales películas de Ti, empezado con los pasos llevados a cabo para la limpieza de los sustratos.

3.1.1 Limpieza de sustratos

Los sustratos fueron sometidos al siguiente proceso de limpieza usando el baño ultrasónico (**Figura 20**):

1. Veinte minutos en baño ultrasónico en una solución de microjabón al 1%, con previa desgasificación por cinco minutos para retirar burbujas.
2. Diez minutos en baño ultrasónico en cada una de las siguientes sustancias: agua desionizada, acetona y finalmente etanol.
3. Secado con una pistola de aire caliente.

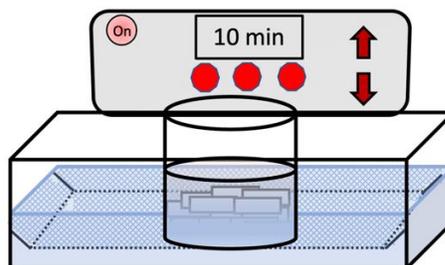


Figura 20. Ilustración del baño ultrasónico de sustratos contenidos en un vaso de precipitado.

3.1.2 Depósito de películas de titanio por erosión iónica

El depósito de películas continuas de Ti se realizó mediante la técnica de erosión iónica en la cámara de depósito marca INTERCOVAMEX que se muestra en la **Figura 21**. Esta se usó con un cañón de DC y un blanco de Ti Kurt J. Lesker con 99.995% de pureza. Los sustratos de silicio o vidrio fueron colocados como se muestra en la **Figura 22**. Los parámetros que se utilizaron para el depósito se muestran en la **Tabla 1**.



Figura 21. Equipo de Erosión Iónica INTERCOVAMEX.

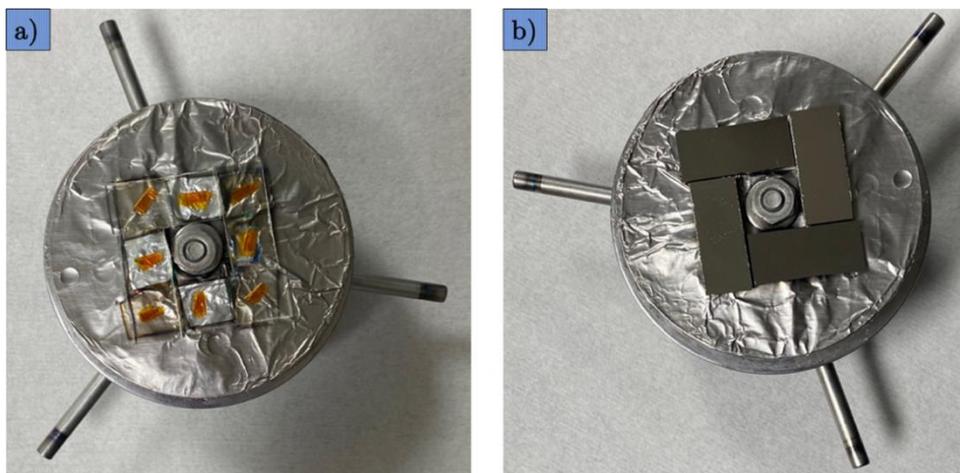


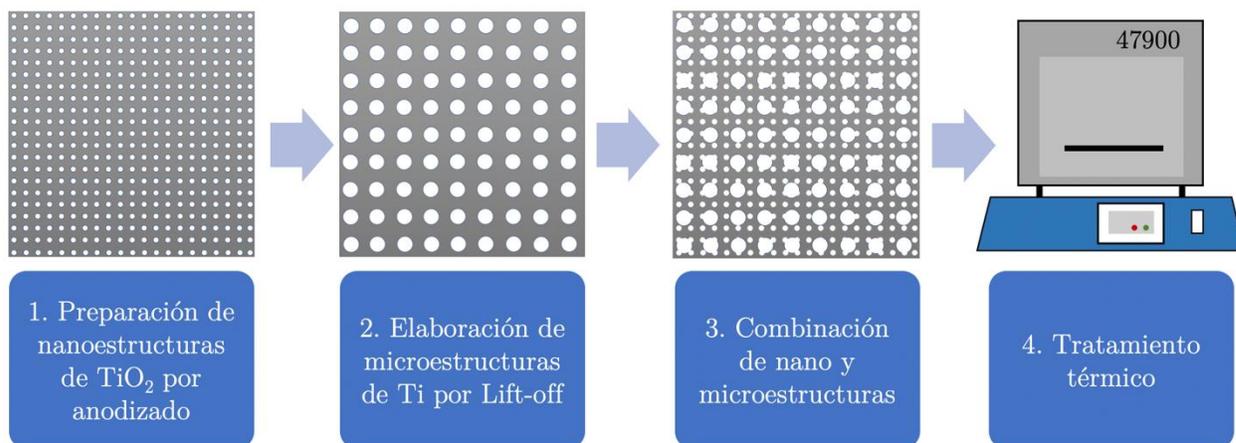
Figura 22. Sustratos de vidrio a) antes y b) después del depósito de Ti.

Tabla 1. Parámetros para el depósito de las películas de Ti.

Presión base	6.5 μ Torr
Presión de trabajo	2.0 mTorr
Voltaje (DC)	100 watts
Flujo de argón	20 sccm

3.2 Nano y microestructuras de TiO₂

A partir de las películas de Ti depositadas en el punto anterior, se prepararon las diferentes estructuras de TiO₂ de acuerdo al procedimiento esquematizado en la **Figura 23**: 1) primero se sintetizaron las nanoestructuras mediante la técnica de anodizado, 2) después se construyeron las microestructuras usando fotolitografía por *Lift-off*, 3) luego se obtuvieron nano-microestructuras combinadas realizando el paso (2) y enseguida el (1), y 4) por último se realizó un tratamiento térmico a todas las muestras para obtener TiO₂ cristalino.

**Figura 23.** Proceso de la obtención de nano y microestructuras de TiO₂.

3.2.1 Preparación de nanoestructuras de TiO₂ por anodizado

Las nanoestructuras de TiO₂ se sintetizaron mediante la técnica de anodizado. Se comenzó preparando electrolitos con 2% de H₂O desionizada (H₂O DI), 98% de etilenglicol y diferentes

concentraciones de NH_4F (0.3 wt%, 0.6 wt% y 0.9%), donde los gramos calculados para cada concentración se midieron usando una balanza analítica y las componentes, contenidas en un matraz, se mezclaron utilizando un agitador magnético a 1100 rpm durante 30 min (**Figura 24a**). Después los electrolitos se vertieron en vasos de polipropileno para evitar la corrosión del vaso de precipitado y acumulación de residuos que influyeran en la conductividad (**Figura 24b**).

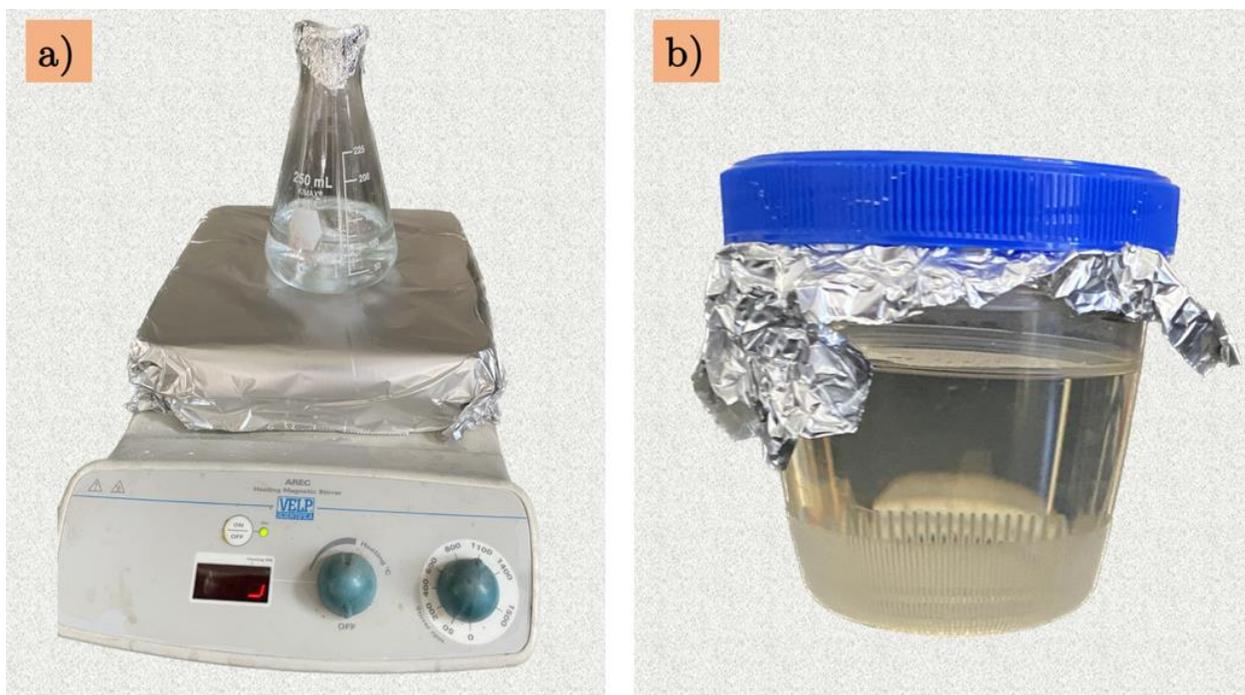


Figura 24. Preparación de los electrolitos: **a)** agitación a 1100 rpm y **b)** almacenamiento en un vaso de polipropileno, sellado con papel encerado y papel aluminio.

El arreglo experimental del sistema de anodizado se observa en la **Figura 25**. La película de Ti preparada previamente por erosión iónica se usó como ánodo, mientras que el cátodo fue una barra de grafito de 6.35 mm de diámetro y 30.48 mm de largo; ambos electrodos separados por 2 cm y conectados con caimanes-banana a una fuente poder GW INSTEK GP0-43038 con un límite de voltaje de 45V. Se sumergieron aproximadamente 1.5 cm del cátodo y el ánodo en el electrolito, con cuidado de no mojar los caimanes para evitar su anodización y corrosión, respectivamente. Se agregó una barra agitadora magnética y se colocó el matraz sobre una plancha VELS Científica seleccionando una velocidad de agitación de 200 rpm.

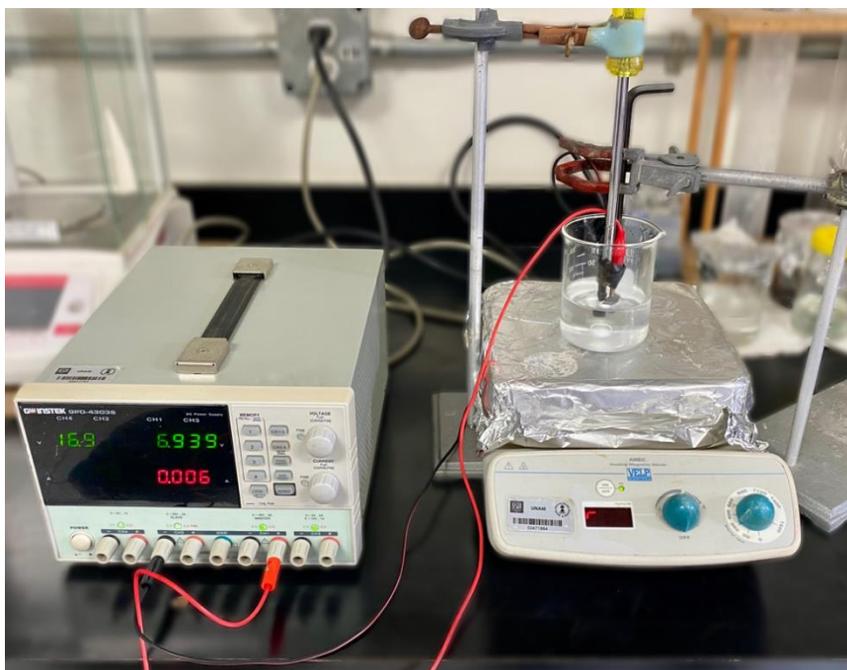


Figura 25. Arreglo experimental de la técnica de anodizado.

Los anodizados se llevaron a cabo variando el voltaje, entre 10 y 45 V, y el tiempo, desde 1 hasta 15 min. La película anodizada (**Figura 26a**) se enjuagó en agua desionizada con agitación manual y posteriormente, en etanol y, por último, se secó utilizando una pistola de aire (**Figura 26b**).

Todos los electrolitos usados fueron envejecidos previamente con 4 anodizados de 3 min a 30 V para disminuir la densidad de iones de fluor del proceso.

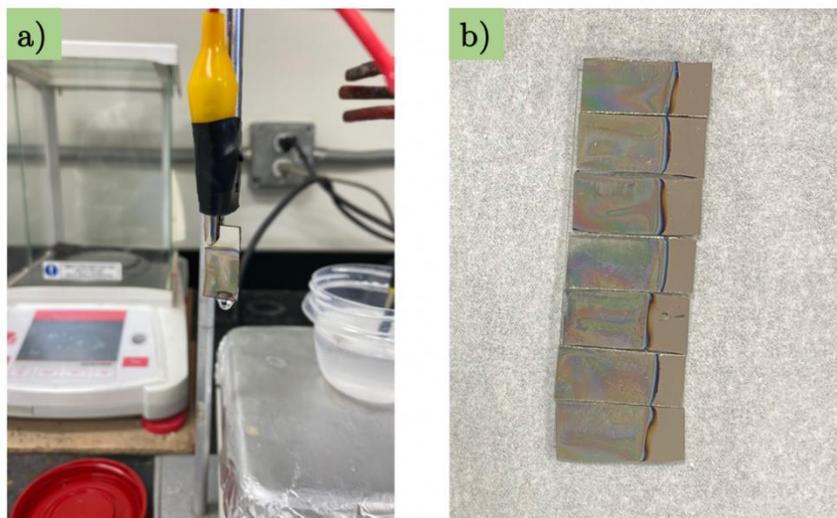


Figura 26. Películas de TiO_2 : a) recién anodizada y b) después de la limpieza y el secado.

3.2.2 Preparación de microestructuras de Ti mediante fotolitografía por *Lift-off*

Para la elaboración de microestructuras se utilizó la variante *Lift-off* de la técnica de fotolitografía debido a la complejidad para decapar el Ti (T. Deng et al., 2020). Se comenzó con la fabricación de la fotomáscara, siguiendo con el depósito y tratamiento de la fotoresina, después el depósito de la película de Ti y al final la remoción de la fotoresina. Todo el proceso, detallado a continuación, se llevó a cabo en el cuarto limpio de la UNaFab del CNYN-UNAM, que cuenta con las condiciones ambientales y los equipos necesarios para realizar el proceso de fotolitografía.

Para la fabricación de la fotomáscara, primero se hizo su diseño (**Figura 27a**), mediante el software CleWin 5, y el patrón se transfirió a una oblea de cuarzo de 5x5 pulgadas que se recubrió con óxido de Cromo utilizando una escritora laser MicroWriter ML[®]3. La fotomáscara obtenida, mostrada en la **Figura 27b**, se lavó en el equipo PicoTrack PCT-200 RRE MC antes de cada uso (**Figura 27c**).

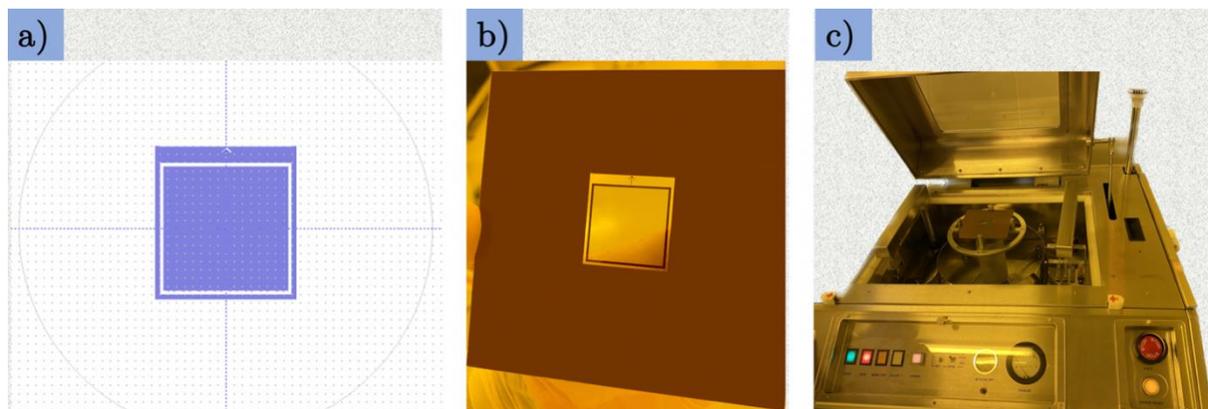


Figura 27. a) diseño de la fotomáscara realizado en CleWin 5, b) fotomáscara con el patrón y c) equipo para lavado de fotomáscaras PicoTrack PCT-200 RRE MC .

Se depositó la fotoresina positiva comercial Microposit S1813TM sobre sustratos de vidrio de 2.2 cm x 1 cm mediante la técnica de depósito por centrifugado en un equipo MIDAS SPIN-3000TD (**Figura 28a**). Para ello se colocó el sustrato en el equipo sujetándolo mediante succión, se distribuyó la fotoresina sobre el sustrato, el que se hizo girar a 2000 rpm durante 60 s. El secado de la fotoresina se realizó a 115 °C en una plancha térmica Hot Plate AS ONE Corporation (**Figura 28b**). En la **Figura 28c** se observan los sustratos con fotoresina después del proceso de secado, donde la fotoresina tuvo un espesor aproximado de 2 μm .



Figura 28. Depósito de la fotoresina: **a)** equipo MIDAS SPIN-3000TD para la técnica de depósito por centrifugado, **b)** plancha térmica Hot Plate AS ONE Corporation y **c)** sustratos con fotoresina después del proceso de secado.

Para la exposición a luz ultravioleta se empleó la alineadora de máscaras Midas MDA-400M (**Figura 29a**), la cual cuenta con una lámpara de luz ultravioleta de 364 nm de longitud de onda. En la **Figura 29b** se observa la colocación de la fotomáscara en la alineradora y en la **Figura 29c**, la alineación de las muestras de fotoresina bajo la fotomáscara. Los tiempos de exposición para todas las muestras fueron de 8.2 s. Después se realizó el revelado de fotoresina sumergiendo la muestra durante 35 s, en el revelador comercial Microposit MF 319 Developer.

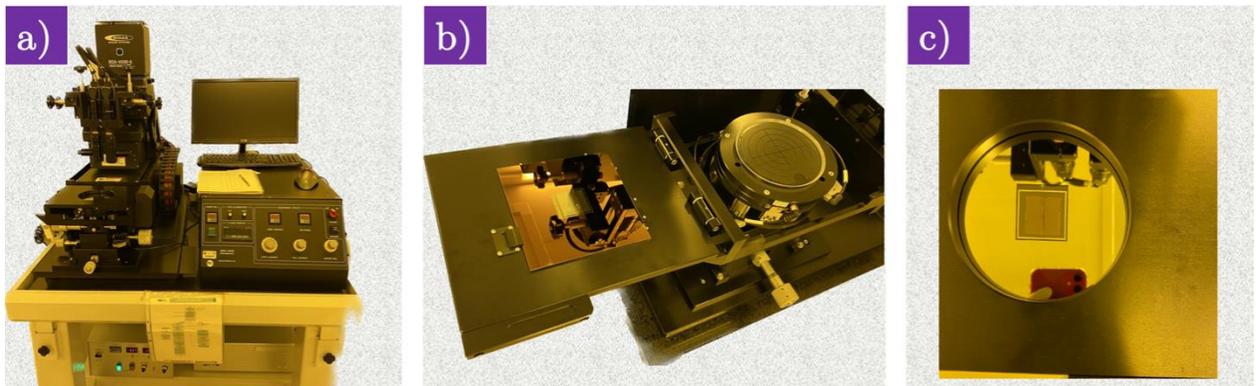


Figura 29. Exposición de luz ultravioleta: **a)** alineadora de máscaras Midas MDA-400M, **b)** colocación de la fotomáscara y **c)** alineación de las muestras con fotoresina bajo la fotomáscara.

A continuación, se depositaron películas de Ti de 500 nm sobre las muestras con los patrones de fotoresina, mediante la técnica de erosión iónica, siguiendo el procedimiento de la sección 3.1.2 con un tiempo de depósito de 37.5 min. Se retiró la fotoresina utilizando acetona como solvente y se realizó otro

depósito de Ti durante 4 min para cubrir las partes sin Ti del sustrato. La microestructura generada se revisó utilizando un microscopio óptico Leica XLM3.

3.2.3 Combinación de nano y microestructuras

Para la elaboración de las nano-microestructuras combinadas se usaron las técnicas de anodizado y fotolitografía por *lift-off*: se fabricaron primero las microestructuras de Ti siguiendo el procedimiento de la sección 3.2.2 y, después, sobre ellas, se sintetizaron nanoestructuras de TiO₂ mediante la técnica de anodizado, como se describe en la sección 3.2.1.

3.2.4 Tratamiento térmico

Todas las muestras (películas continuas, nanoestructuradas, microestructuradas y nano-microestructuradas) se sometieron a un tratamiento térmico con una rampa de 4 °C/min hasta 450 °C durante 4 h con una rampa de enfriamiento con la misma tasa hasta temperatura ambiente en un horno Thermolyne 47900 (Figura 30a), con el objetivo de obtener TiO₂ cristalino. En la Figura 30b se observan las muestras dentro del horno antes del calcinado.

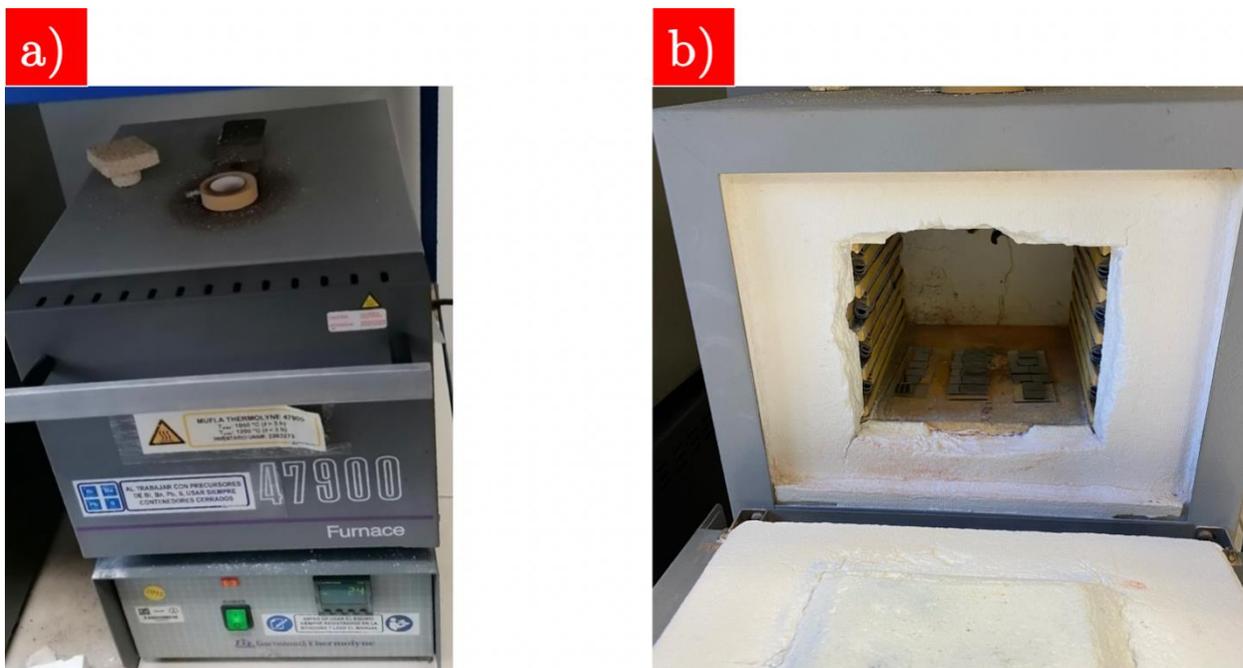


Figura 30. a) Horno Thermolyne 47900 y b) muestras dentro del horno antes del calcinado.

3.3 Caracterización de las películas estructuradas de TiO₂

Se caracterizaron las películas continuas, nanoestructuradas, microestructuradas y nano-microestructuradas de TiO₂ utilizando las siguientes técnicas: con la finalidad de conocer la fase cristalina se utilizó XRD en un equipo Philips C'pert MPD, la rugosidad se midió utilizando las imágenes generadas por AFM en un microscopio Park System XE-70, la determinación de la morfología se realizó por SEM en un microscopio JEOL JMS-5300 y la verificación de la composición química elemental se llevó a cabo con EDS en el mismo equipo. A partir de las imágenes de SEM y el software ImageJ, se midió el espesor de las películas y el diámetro de las nano y microestructuras.

3.4 Evaluación de la respuesta biológica de las películas estructuradas de TiO₂

El procedimiento usado para la evaluación de la respuesta biológica en las películas continua, nanoestructurada, microestructurada y nano-microestructurada, se proporciona a continuación. La evaluación se realizó por duplicado y en controles positivos y negativos.

3.4.1 Ensayo de hemólisis

El protocolo que se utilizó para el ensayo de hemólisis es el siguiente:

Preparación de los eritrocitos

1. Se obtuvieron 25 ml de sangre de un donador humano y se colocó en un tubo BD Vacutainer con el aditivo EDTA- K2 para prevenir la coagulación.
2. Se centrifugó a 3000 rpm por 5 min, provocando que los eritrocitos y la fase líquida de la sangre (plasma) se separaran, por lo que se marcaron en el tubo los niveles de la capa superior de plasma y de la capa inferior de eritrocitos. Luego se retiró el plasma con una micropipeta y se agregaron 150 mM de NaCl hasta la marca del nivel de plasma original.

3. Se repitió el paso 2, a excepción de marcar las capas en el tubo, para limpiar las células y luego de retirar el sobrenadante se añadió PBS 1X (solución no tóxica para las células que contiene NaCl y Na_3PO_4) hasta la marca del plasma original, mezclando al invertir el tubo cuidadosamente.
4. Se realizó una dilución 1:50 de eritrocitos utilizando como diluyente el PBS 1X, agregando 1mL de eritrocitos en 49 mL de PBS 1X.

Ensayo de hemólisis

1. Como control negativo se utilizaron 270 μL de los eritrocitos diluidos en PBS 1X con 30 μL de este último.
2. El control positivo fue de Triton 20% X100, el cual es un surfactante no iónico que suele usarse en productos de limpieza. 30 μL de este compuesto químico se colocaron en un pozo con 270 μL de la dilución de eritrocitos preparada anteriormente.
3. Las muestras estructuradas y continuas fueron esterilizadas con radiación UV durante 15 min por cada lado, después se colocaron en una placa de pozos de cultivo y se les agregaron 270 μL de la dilución anterior de eritrocitos.
4. La placa de pozos con lo añadido anteriormente, observada en la **Figura 31**, se incubó por 1 h a 37 °C utilizando 5% de CO_2 .
5. Después de la incubación, el contenido de los pozos se centrifugó por 5 minutos a 3000 rpm en tubos para centrifuga de 1.5 mL (ver **Figura 32**).
6. 250 μL de los sobredonantes se tomaron para medir la absorbancia, para lo cual se usó un lector de microplacas Thermo Scientific Multiskan Go a 541 nm.
7. Los resultados obtenidos se promediaron con su duplicado y se normalizaron al promedio del control positivo, que representa el 100 % de hemólisis. Luego, cada valor se multiplicó por 100 para obtener el porcentaje de hemólisis respecto al control positivo.

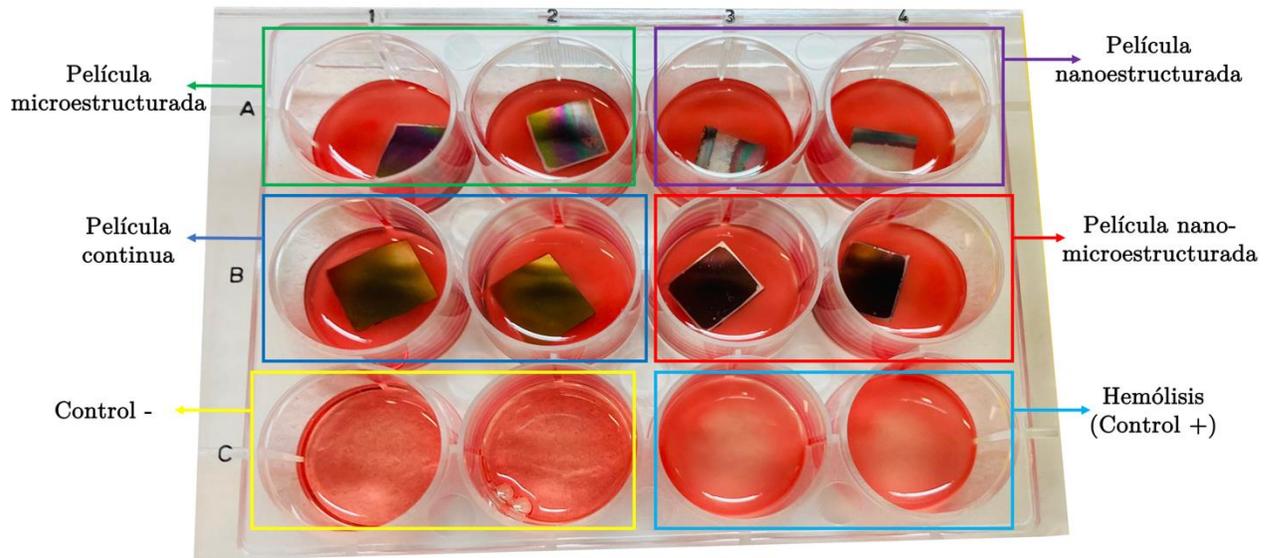


Figura 31. Placa de pozos de cultivo con las muestras estructuradas, continuas y los controles negativo (-) y positivo (+).

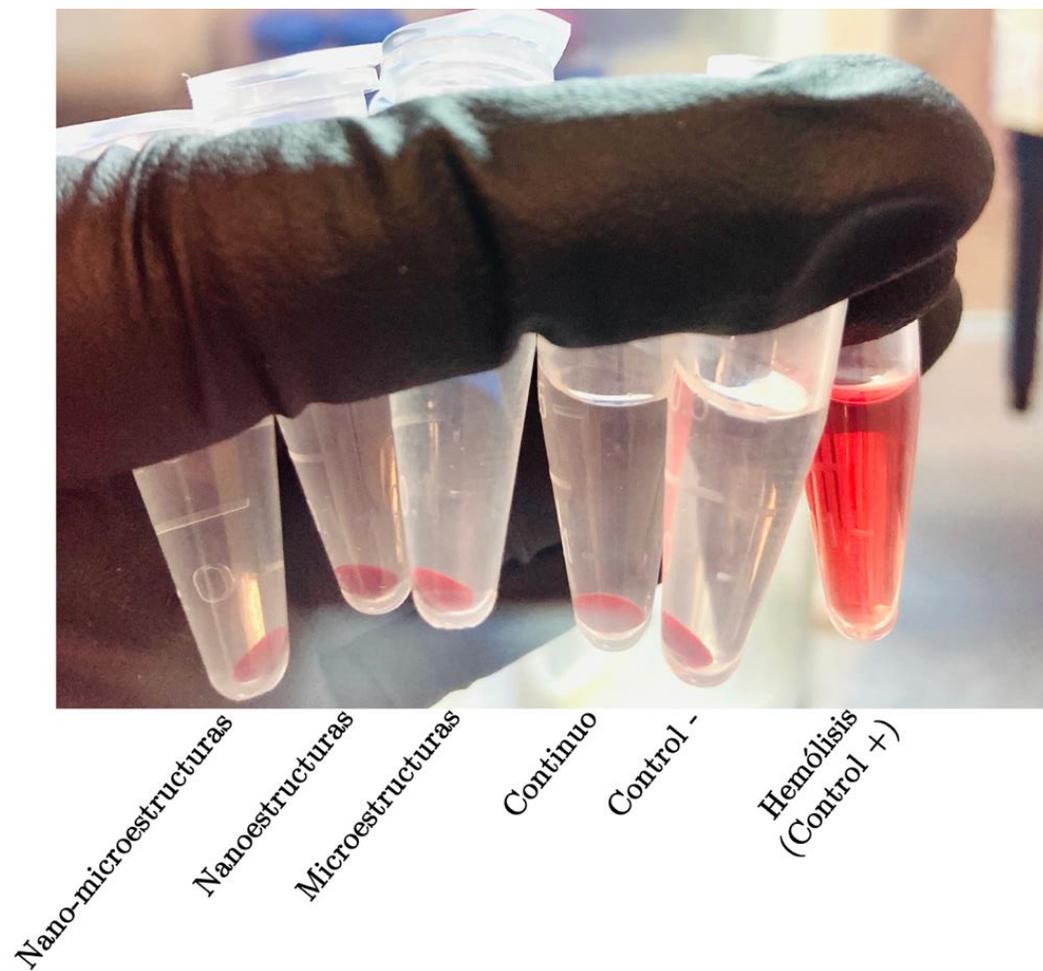


Figura 32. Eritrocitos después de la incubación y el centrifugado en tubos de 1.5 mL.

3.4.2 Ensayo de proliferación

Previo al ensayo de proliferación, las muestras fueron sometidas a esterilización por calentamiento y radiación ultravioleta por ambos lados. Después, las muestras se colocaron en pozos de cultivos con suero nutritivo y se añadieron 20,000 osteoblastos de la línea celular MC3T3-E1 en cada pozo. Posteriormente, los pozos se incubaron con 5% de CO₂ a 37 °C durante 24 h. Pasando dicho tiempo, las muestras fueron trasladadas a nuevos pozos con medio nutritivo para que no hubiera células sobre las paredes o el fondo del pozo, que pudieran interferir con la medición de la proliferación de las células implantadas en las muestras. Se realizaron las mediciones de proliferación a las 48, 72 y 96 h. Una vez pasado estos tiempos, las muestras fueron sometidas a una tinción con resazurina al 10%, que posteriormente se redujo a resorufina por medio de enzimas mitocondriales. La medición se realizó excitando con una longitud de onda de 570 nm y 600 nm. El esquema del proceso de proliferación celular se ilustra en la **Figura 33**.

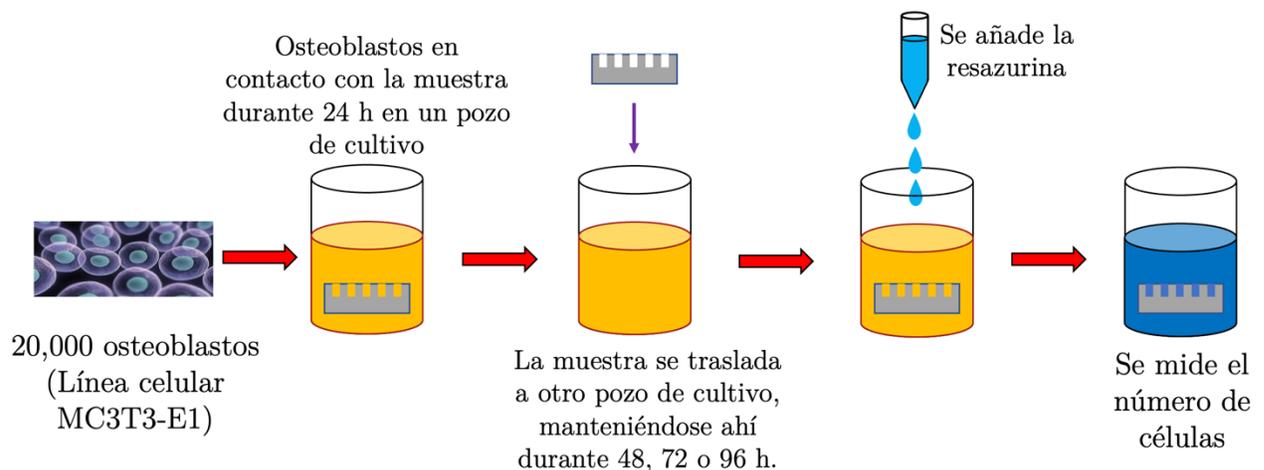


Figura 33. Esquema del ensayo de proliferación celular mediante reducción de resazurina.

Capítulo 4. Resultados y discusión

Los resultados y discusión se presentan en seis secciones: 1) depósito de películas continuas de Ti; 2) síntesis de las nanoestructuras de TiO_2 ; 3) fabricación de las microestructuras en las películas de Ti; 4) combinación de nano y micro estructuras; 5) caracterización por EDS, XRD y rugosidad mediante AFM y 6) pruebas biológicas de hemólisis y proliferación celular.

4.1 Depósito de películas continuas de Ti

Las películas de Ti depositadas por erosión iónica, sobre sustratos de Si, en las condiciones de la **Tabla 1** y tiempos de 25 y 45 min, tuvieron respectivamente un espesor de 330 y 600 nm, obtenido a partir de las imágenes de SEM de la sección transversal mostradas en la **Figura 34**. Con estos valores se calculó una tasa de depósito de ~ 13 nm. Cabe mencionar que la clara apreciación del espesor de las películas de Ti se debe al uso del sustrato de Si, ya que este, por ser conductor, evita la acumulación de carga en la muestra (contrario a lo que se obtenía usando sustratos de vidrio).

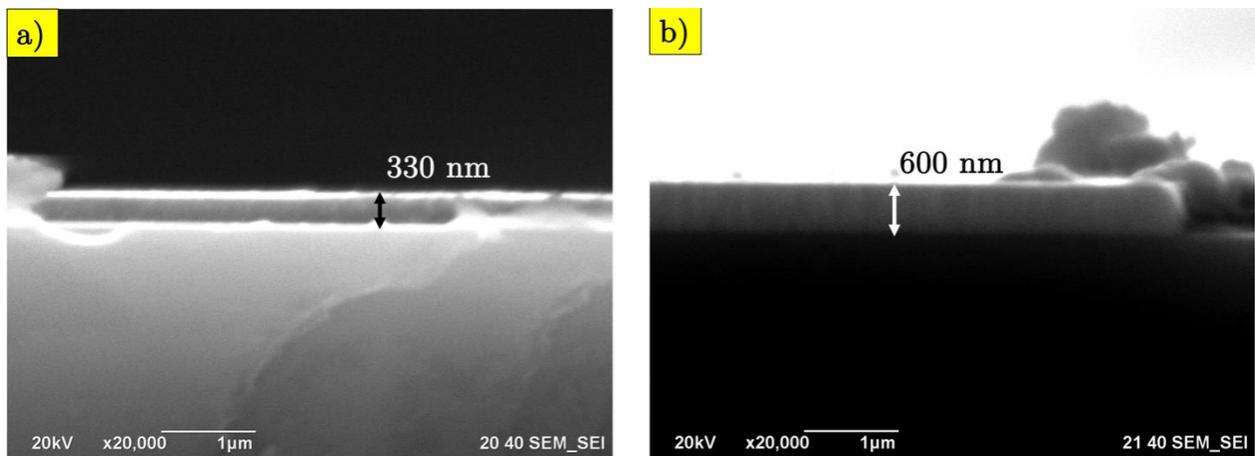


Figura 34. SEM de sección transversal de películas continuas de Ti/Si depositadas por erosión iónica con espesores de: **a)** 330 nm y **b)** 600 nm.

La micrografía superficial de SEM, observada en la **Figura 35**, muestra la continuidad de la película de 600 nm de Ti.

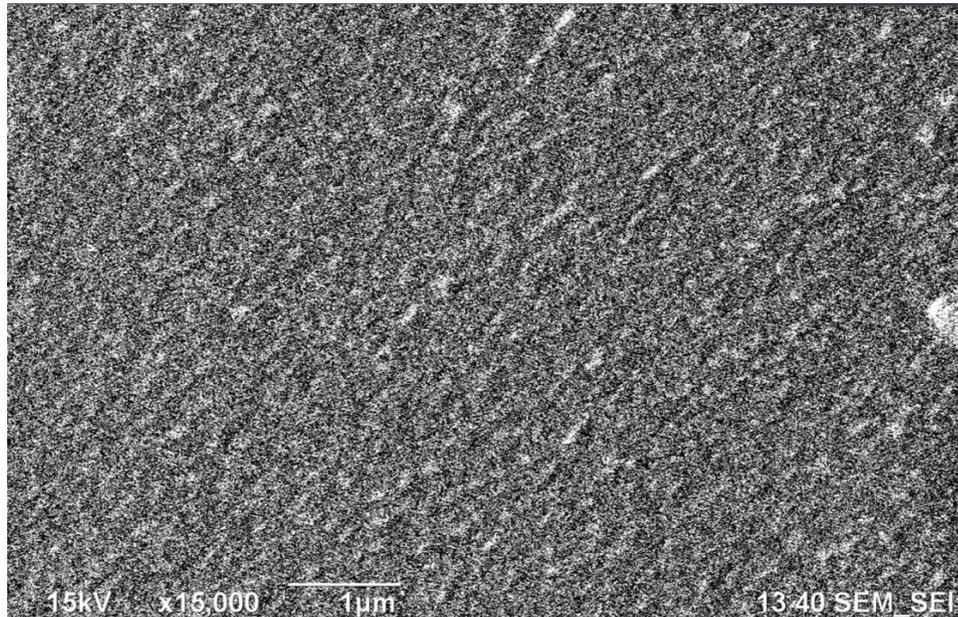


Figura 35. SEM de la superficie de una película continua de Ti (600 nm)/Si depositada por erosión iónica.

4.2 Síntesis de nanoestructuras de TiO_2

Las capas nanoestructuradas de TiO_2 se sintetizaron por la técnica de anodizado, usando como ánodo las películas compactas de Ti depositadas por erosión iónica descritas en la sección anterior. Los estudios realizados acerca de estas capas se detallan en lo que sigue.

4.2.1 Envejecimiento del electrolito

En la **Figura 36** se observa la imagen de SEM de películas de Ti (500 nm) sobre Si anodizadas en un electrolito sin envejecimiento y con uso previo por más de 100 min. Con el electrolito que no se ha envejecido, la muestra no presenta poros apreciables (**Figura 36a**), lo que es debido a un exceso de iones de flúor que provoca la disolución de la mayoría del óxido formado (Sopha et al., 2015). En cambio, con el electrolito con uso previo de 100 min se forman nanoporos en la superficie, pero no bien definidos (**Figura 36b**) ya que la concentración de F^- disminuye por las reacciones químicas del anodizado, siendo necesario un mayor tiempo de anodizado para obtener las estructuras deseadas (Sopha et al., 2015). Así entonces, el electrolito envejecido, pero con uso previo menor a 100 min, es adecuado para crear nanoestructuras porosas cuyo tamaño de poro. Como se verá más adelante, esto dependerá de la variación en las condiciones de anodizado.

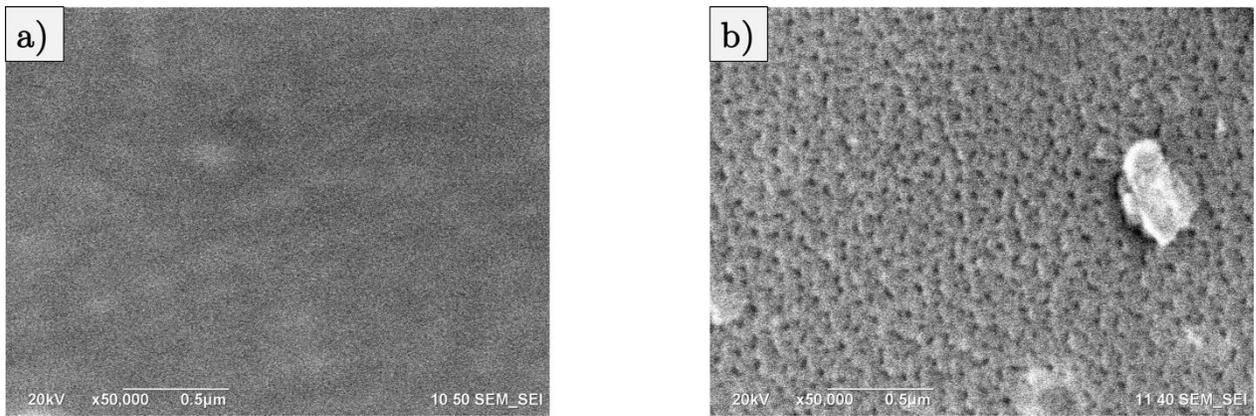


Figura 36. SEM de películas de Ti (500 nm)/Si anodizadas por 3 min con un electrolito de 0.3 wt% de NH_4F y 35 V: **a)** sin envejecimiento y **b)** con más de 100 min de uso previo.

4.2.2 Determinación del espesor

La sección transversal de una película de Ti (500 nm) sobre Si, antes y después del anodizado, se observa en las micrografías de SEM de la **Figura 37**. El anodizado se realizó por 15 min con 15 V y 0.3 wt% de NH_4F en el electrolito. Se destaca el incremento del espesor, a ~ 800 nm, después del anodizado debido a la formación de la capa de TiO_2 , lo que ha sido reportado en la literatura (Hou et al., 2022).

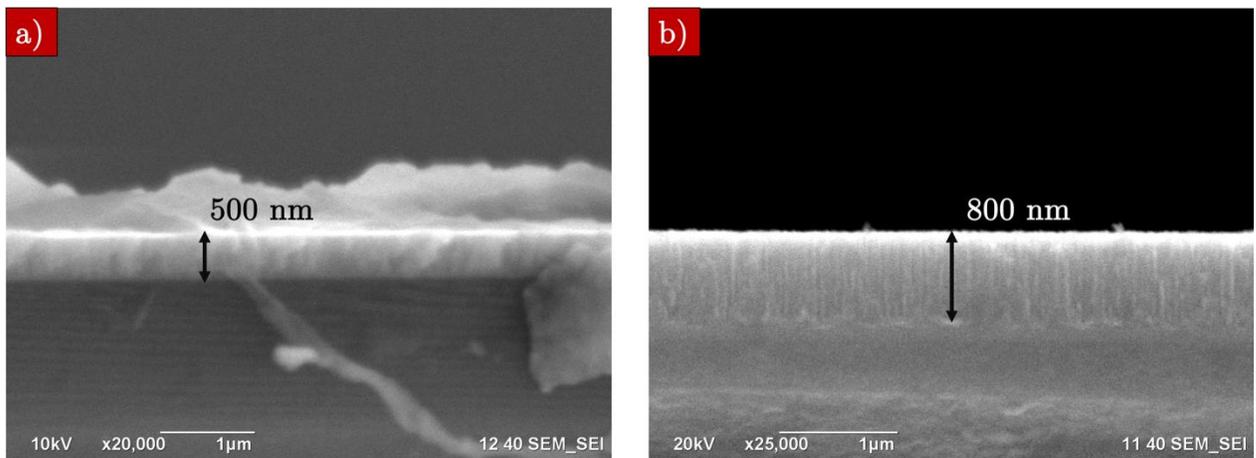


Figura 37. SEM de sección transversal de una película de Ti (500 nm)/Si: **a)** antes y **b)** después del anodizado, por 15 min con electrolito de 0.3 wt% de NH_4F y 15 V.

4.2.3 Variación de la concentración del electrolito

En la **Figura 38** se presenta la imagen de SEM superficial de la película de TiO_2 del punto anterior, obtenida con una concentración de 0.3 wt% de NH_4F en el electrolito, pero anodizando por 3 min, junto

con otras películas anodizadas en las mismas condiciones, pero variando la concentración del electrolito a 0.6 wt% y 0.9 wt% de NH_4F . Si el voltaje de anodizado es menor de 25 V y la concentración es la más baja (0.3 wt%), no se generan nanoestructuras, lo que es acorde a la literatura (Regonini et al., 2013), por ello es que se escogió trabajar con un voltaje de anodizado de 30 V. Se observa que a medida que se incrementa la concentración, el diámetro de poro promedio se incrementa ligeramente de 37 ± 5 nm, a 39 ± 6 nm y 42 ± 6 nm. Esto se debe a que conforme se incrementa la cantidad de F^- en el electrolito, mayor es la velocidad de disolución (Zhang et al., 2015).

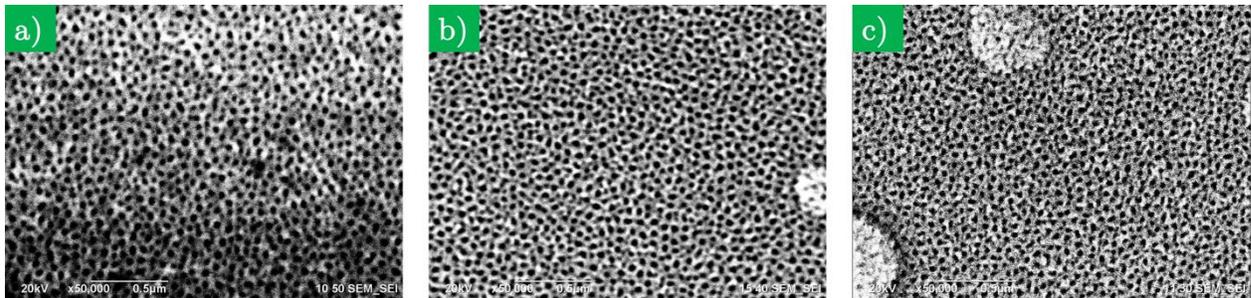


Figura 38. SEM de películas de Ti (500 nm)/Si anodizadas por 3 min, con 30 V y una concentración de NH_4F en el electrolito de: **a)** 0.3 wt%, **b)** 0.6 wt% y **c)** 0.9 wt%.

Dado que los poros son más pequeños para la concentración del electrolito más baja, de 0.3 wt% de NH_4F ; mientras que, para la concentración mayor, de 0.9 wt% de NH_4F , se alcanza a apreciar la disolución de las de las estructuras; los subsecuentes anodizados se realizaron escogiendo la concentración intermedia, de 0.6 wt% de NH_4F .

4.2.4 Variación del tiempo de anodizado

La variación del tiempo de anodizando de 3 a 6 y 9 min, fijando la concentración del electrolito en 0.6 wt% de NH_4F y en 30 V el voltaje aplicado, resulta en las morfologías de la **Figura 39**, donde hay un ligero incremento del diámetro promedio de poro a 39 ± 6 nm, 42 ± 6 nm y 43 ± 7 nm, respectivamente. En el corte transversal de la muestra anodizada por 6 min (**Figura 39b**), presentada en la micrografía de SEM de la **Figura 40**, se aprecia la formación característica de nanotubos que se obtiene al incrementar el tiempo de anodizado (Hou et al., 2022).

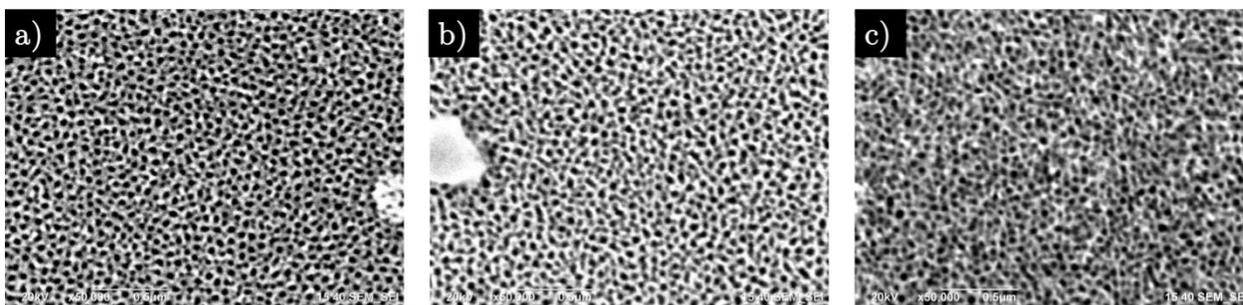


Figura 39. SEM de películas de Ti (500 nm)/Si anodizadas con electrolito de 0.6 wt% de NH_4F , 30 V y tiempos de: a) 3 min, b) 6 min y c) 9 min.

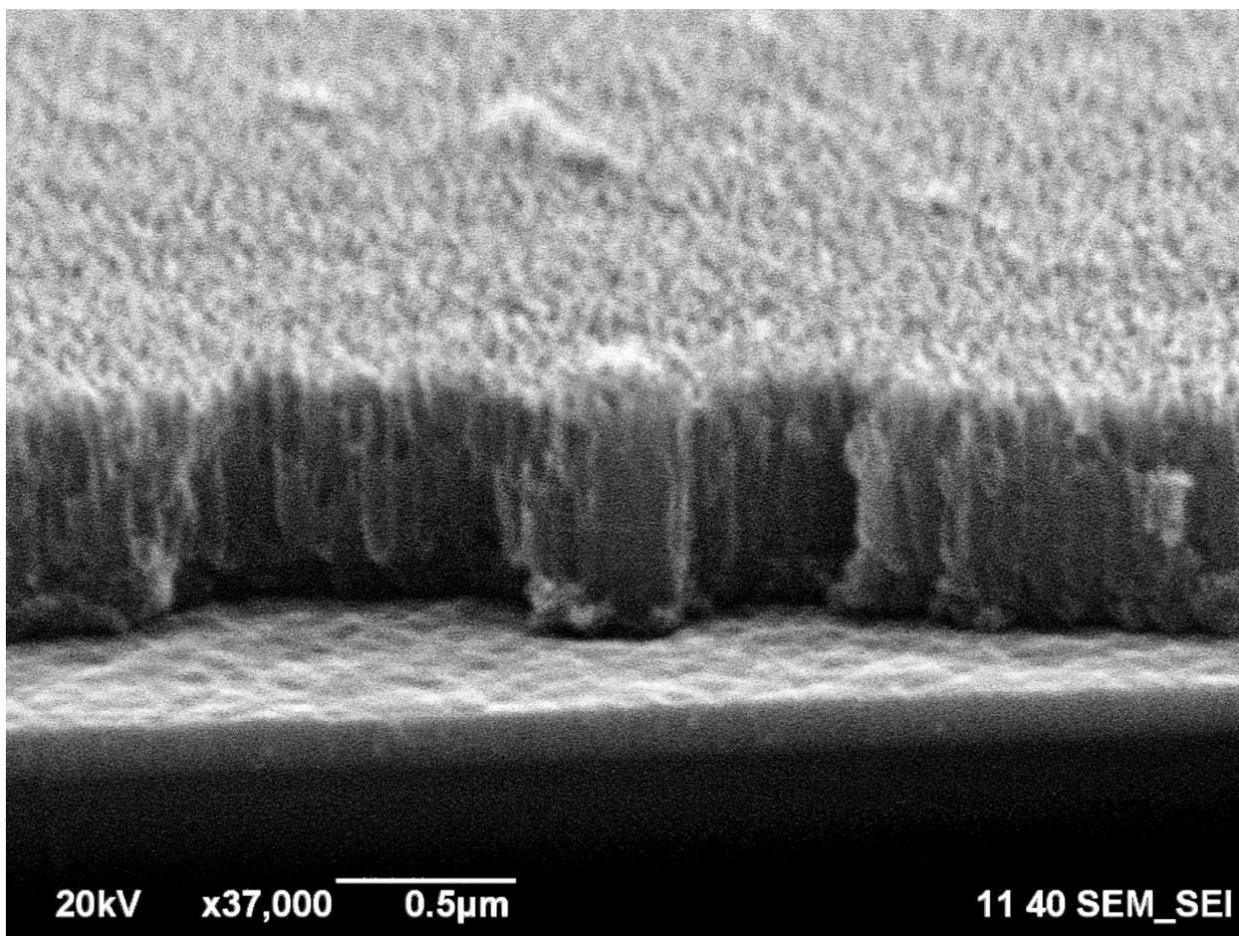


Figura 40. SEM del corte transversal de una película de Ti (500 nm)/Si anodizada por 6 min con electrolito de 0.6 wt% de NH_4F y 30 V.

Debido a que el tiempo de anodizado influye poco en el tamaño de poro, las nanoestructuras obtenidas en adelante se anodizaron con el tiempo mínimo requerido, de 3 min.

4.2.5 Variación del voltaje

La variación del voltaje en el proceso de anodizado por 3 min y con un electrolito de 0.3 wt% de NH_4F , produce las morfologías observadas en la **Figura 41** para las muestras elaboradas a 25, 35 y 45V.

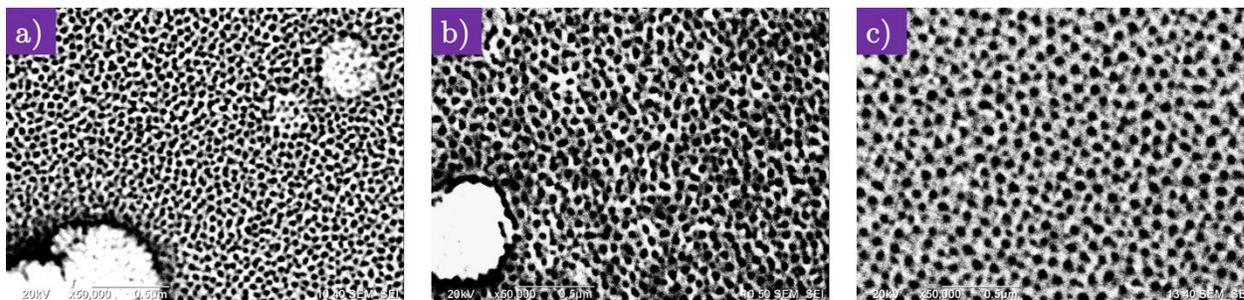


Figura 41. SEM de películas de Ti (500 nm)/Si anodizadas por 3 min con electrolito de 0.6 wt% de NH_4F y voltajes de: a) 25 V, b) 35 V y c) 45 V.

El tamaño de poro aumenta conforme el voltaje aplicado lo hace, como se muestra en la gráfica de la **Figura 42** para 25, 30, 35, 40 y 45 V, resultado que es acorde a la literatura (Albu et al., 2007). La relación entre el tamaño y el voltaje es lineal de acuerdo con la ecuación $y = (1.1 \pm 0.2)x + (9.5 \pm 7.2)$ (donde se consideró las barras de error asociadas a la desviación estándar). Demostrando que se puede controlar el tamaño de poro al variar el voltaje.

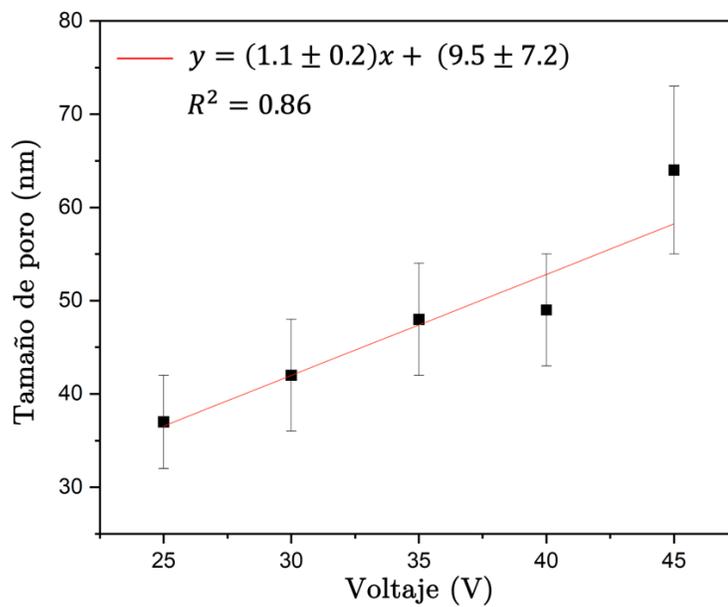


Figura 42. Gráfica el tamaño de poro vs voltaje utilizado en muestras de Ti (500 nm)/Si anodizados por 3 min con un electrolito de 0.6 wt% de NH_4F .

El mayor tamaño de poro, de 64 ± 9 nm, se obtiene usando 45 V (el voltaje límite proporcionado por el equipo usado). De tal manera que este fue el voltaje usado en adelante para anodizar las muestras, ya que un mayor tamaño de poro incrementa la rugosidad (Durdu et al., 2021) y, por ende, favorecería la proliferación celular (Neoh et al., 2012).

4.2.6 Variación del sustrato

En lugar de una película de Ti de 500 nm depositada sobre Si, se usó una depositada sobre vidrio y, después, se anodizó con los parámetros ya encontrados de 3 min, 0.6 wt% de NH_4F y 45 V. En la **Figura 43** se tiene la imagen de SEM correspondiente. Los histogramas del diámetro de poro para esta muestra sobre vidrio y aquella sobre Si (presentada en la **Figura 41c**) pueden verse en la **Figura 44**. Como se aprecia, el tamaño de poro promedio es el mismo, de $64 \text{ nm} \pm 8 \text{ nm}$, y las desviaciones estándar son prácticamente iguales (8 nm para vidrio y 9 nm para silicio). Por lo que se usarán sustratos de vidrio ya que son más baratos y se obtienen nanoestructuras con las mismas características.

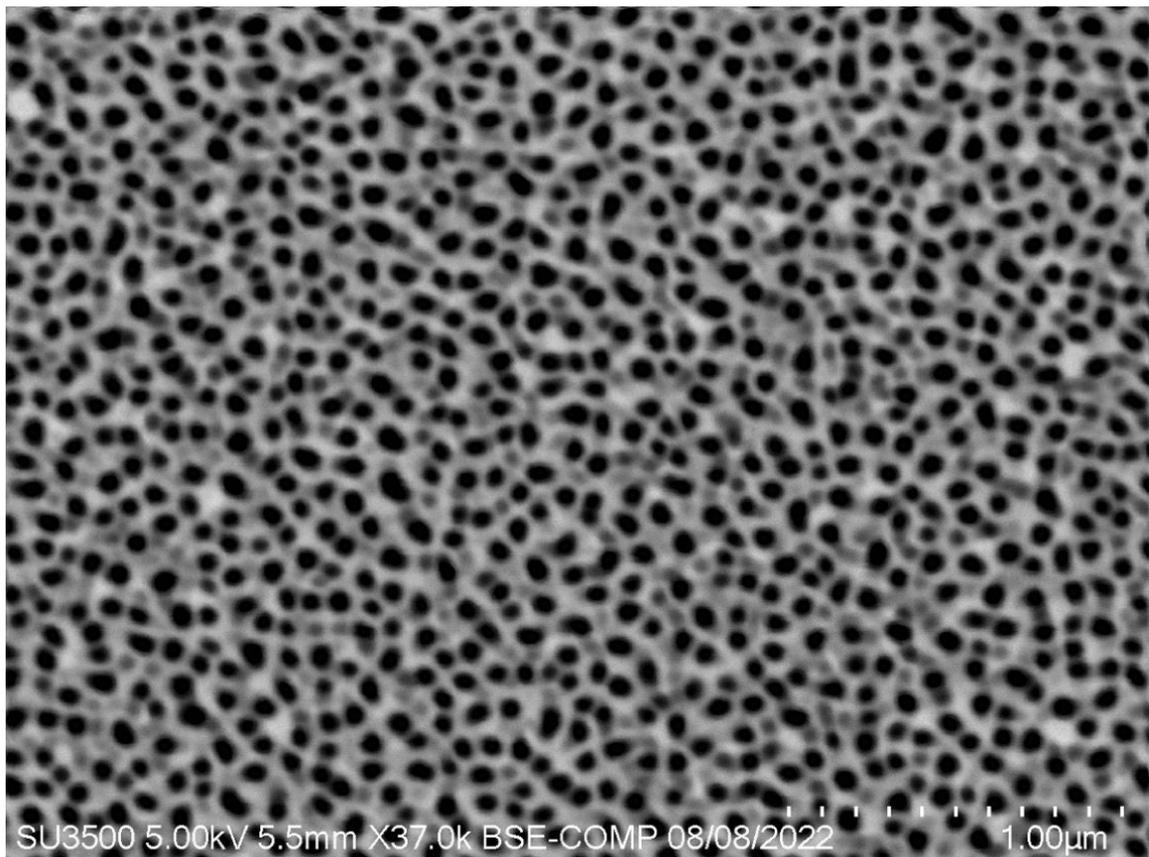


Figura 43. SEM de una película de Ti (500 nm)/vidrio anodizada por 3 min con electrolito de 0.6 wt% de NH_4F y 45 V.

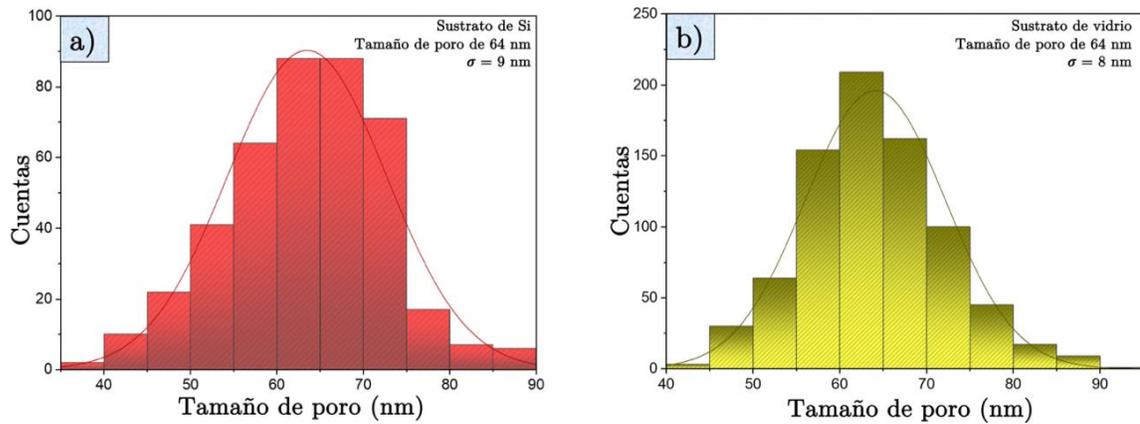


Figura 44. Histogramas de tamaño de poro de las películas Ti (500 nm) depositadas sobre sustratos de: **a)** Si y **b)** vidrio, anodizadas por 3 min con electrolito de 0.6 wt% de NH_4F y 45 V.

4.2.7 Parámetros optimizados

De acuerdo a los resultados anteriores, las películas nanoestructuradas utilizadas en el resto de la investigación fueron preparadas a partir del anodizado de películas de Ti (500 nm)/vidrio, por 3 min utilizando un electrolito de 0.6 wt% de NH_4F envejecido por 12 min y 45 V.

4.3 Fabricación de microestructuras en películas de Ti

La fabricación de las microestructuras de Ti se realizó de acuerdo con lo descrito en la sección 3.2.2, usando fotolitografía *Lift-off* y erosión iónica. La fotografía de la fotomáscara construida se observa en la **Figura 45a**, mientras que las microestructuras, constituidas por superficies de Ti con poros de $40 \mu\text{m}$ con una altura de 450 nm y separados por $106 \mu\text{m}$, se aprecian en la imagen de SEM de la **Figura 45b**.

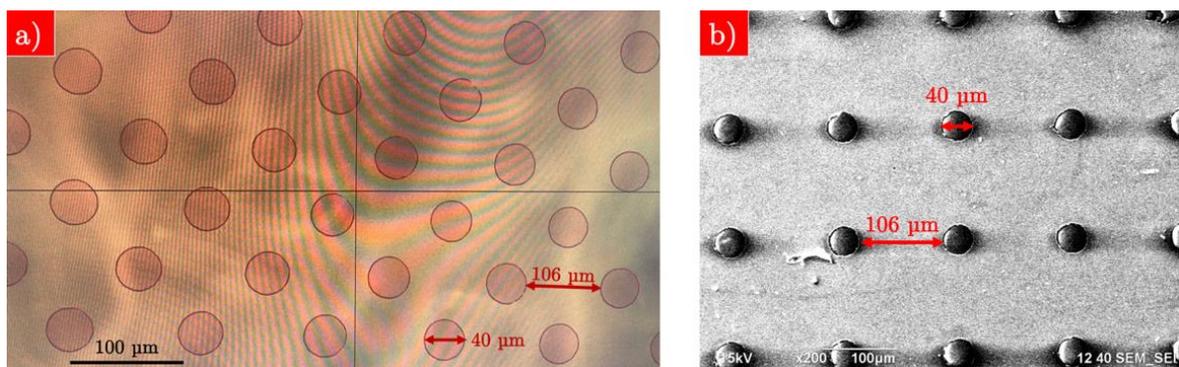


Figura 45. **a)** Patrón de la fotomáscara y **b)** micrografía de SEM de la película de Ti microestructurada fabricada mediante fotolitografía por *Lift-off*.

4.4 Combinación de nano y microestructuras

La combinación de nano y microestructuras se obtuvieron a partir de las películas de Ti microestructuradas de la sección anterior (4.3), anodizándolas con los parámetros determinados en la sección 4.2. En la Figura 46 se tienen las micrografías de SEM con diferentes aumentos para apreciar tanto las nano como las microestructuras. Las imágenes confirman que las dimensiones de la microestructura no se ven afectadas por el anodizado y que este produce nanoestructuras con tamaño de poro promedio de 61 ± 7 nm, el que concuerda con lo ya obtenido (sección 4.2.6).

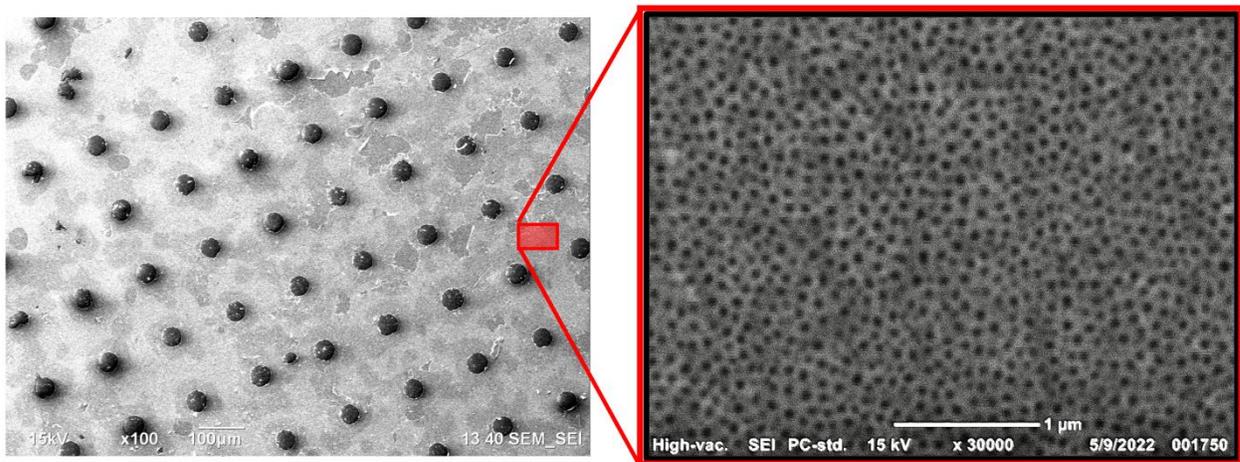


Figura 46. SEM de una película de TiO_2 nano-microestructurada.

En consecuencia, las técnicas de fotolitografía por *Lift-off* y anodizado se combinaron de manera exitosa para obtener películas nano-microestructuradas de TiO_2 .

4.5 Composición, estructura cristalina y rugosidad

En esta sección se presenta la composición elemental, la estructura cristalina y la rugosidad de las películas continuas, nanoestructuradas, microestructuradas y nano-microestructuradas, después de ser sometidas a un tratamiento térmico a 450°C durante 4 h.

4.5.1 Composición elemental

Los espectros de EDS de todas las muestras son similares. En la **Figura 47** se presenta, como representativo, uno de ellos, perteneciente a las nanoestructuras (**Figura 43**). En ellos se identifican el Ti, asociado al TiO_2 ; Si, Na y Ca, correspondientes al vidrio, y el O presente, tanto en el TiO_2 como en el vidrio.

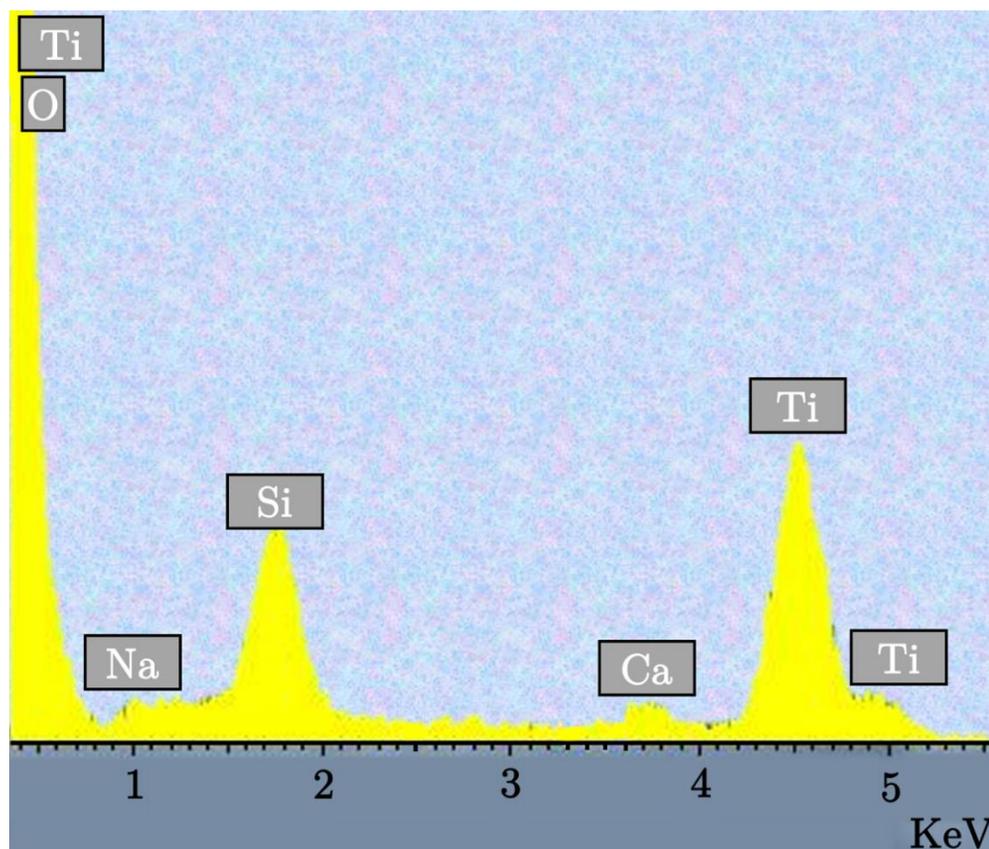


Figura 47. EDS de una película nanoestructurada obtenida a partir de películas de Ti (500 nm)/vidrio anodizadas por 3 min con electrolito de 0.6 wt% de NH_4F y 45 V.

4.5.2 Difractogramas de rayos X

En la **Figura 48** se observan los difractogramas de todas las muestras junto con las referencias para el Ti (JCPDS-ICDD No. 44-1294) y el TiO_2 en su fase anatasa (JCPDS-ICDD No. 21-1272). En la película continua, al igual que en la microestructurada, se observan, junto con picos de Ti, el pico del plano (004) correspondiente al TiO_2 en fase anatasa, la que debe encontrarse en la superficie debido a la exposición al oxígeno durante el tratamiento térmico. Las muestras nanoestructuradas y las nano-microestructuradas, dado que pasaron por un proceso de anodizado donde se formó TiO_2 y se adquirió una estructura porosa, cristalizaron completamente como TiO_2 en su fase anatasa y con una orientación preferencial en los planos

(004), en $2\theta = 37.75^\circ$, similar a la observada en otras superficies nanoestructuradas de TiO_2 (Pang et al., 2018). En el difractograma de las muestras nanoestructuradas y las nano-microestructuradas se observa un corrimiento de 0.5° hacia la derecha, debido al equipo.

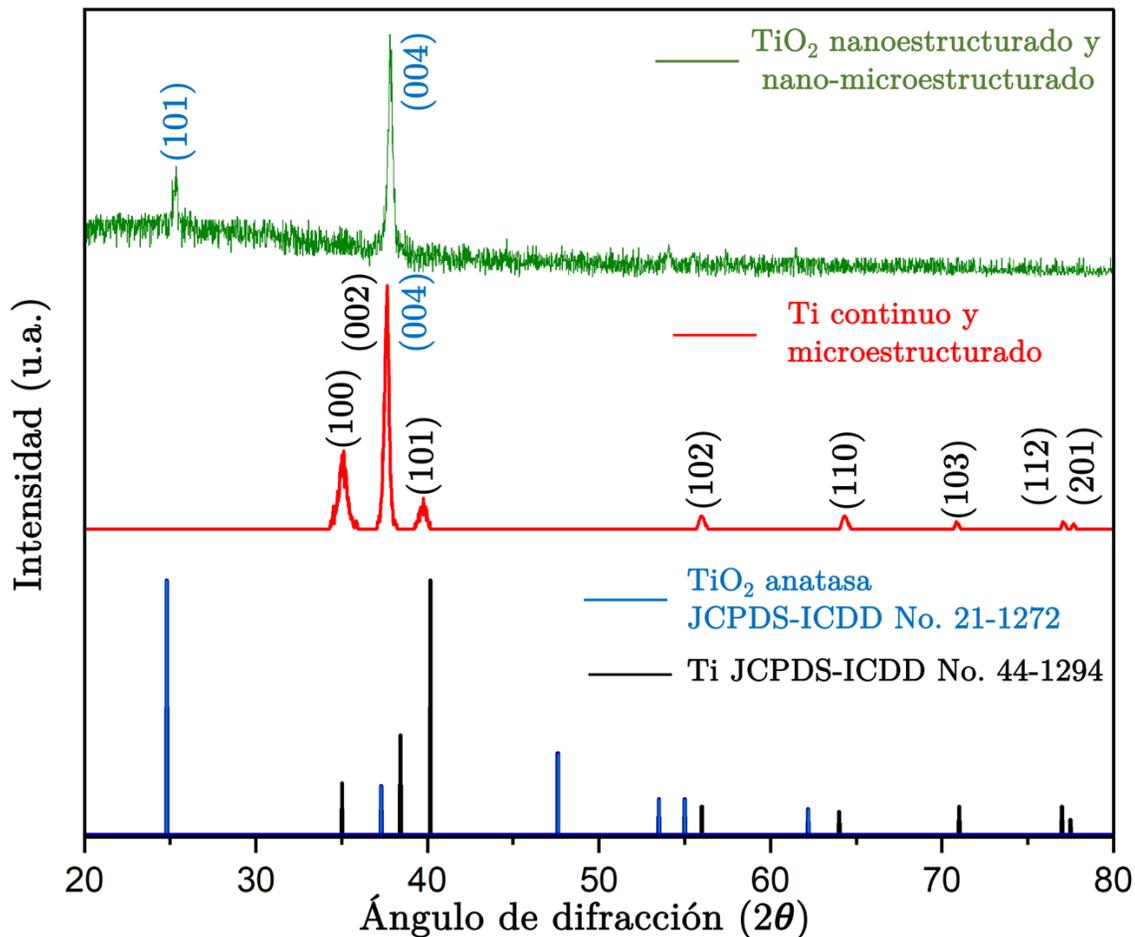


Figura 48. XRD de las películas continua, microestructurada, nanoestructurada y nano-microestructurada comparada con los patrones de Ti y TiO_2 en su fase anatasa.

4.5.3 Rugosidad

La rugosidad RMS obtenida por AFM para las superficies de TiO_2 continua y microestructurada fue de 21 nm, indicando que el diámetro de los poros y la separación entre ellos son demasiado grandes para tener una influencia en la rugosidad. Las nanoestructuras inducen el incremento de la rugosidad a 33 nm, que corresponde a las superficies nanoestructuradas y nano-microestructuradas.

4.6 Pruebas biológicas

4.6.1 Hemólisis

Los resultados de las pruebas de hemólisis en las superficies de TiO_2 con diferentes morfologías se presentan en la **Figura 49**. Se observa que el porcentaje de hemólisis es menor al 5% en todas las muestras nano y microestructuradas, por lo que ninguna resulta tóxica y por lo tanto son biocompatibles, ello de acuerdo con la norma ISO 10993-4:2002 (incluso la muestra continua esta solo 0.20% por encima de este límite).

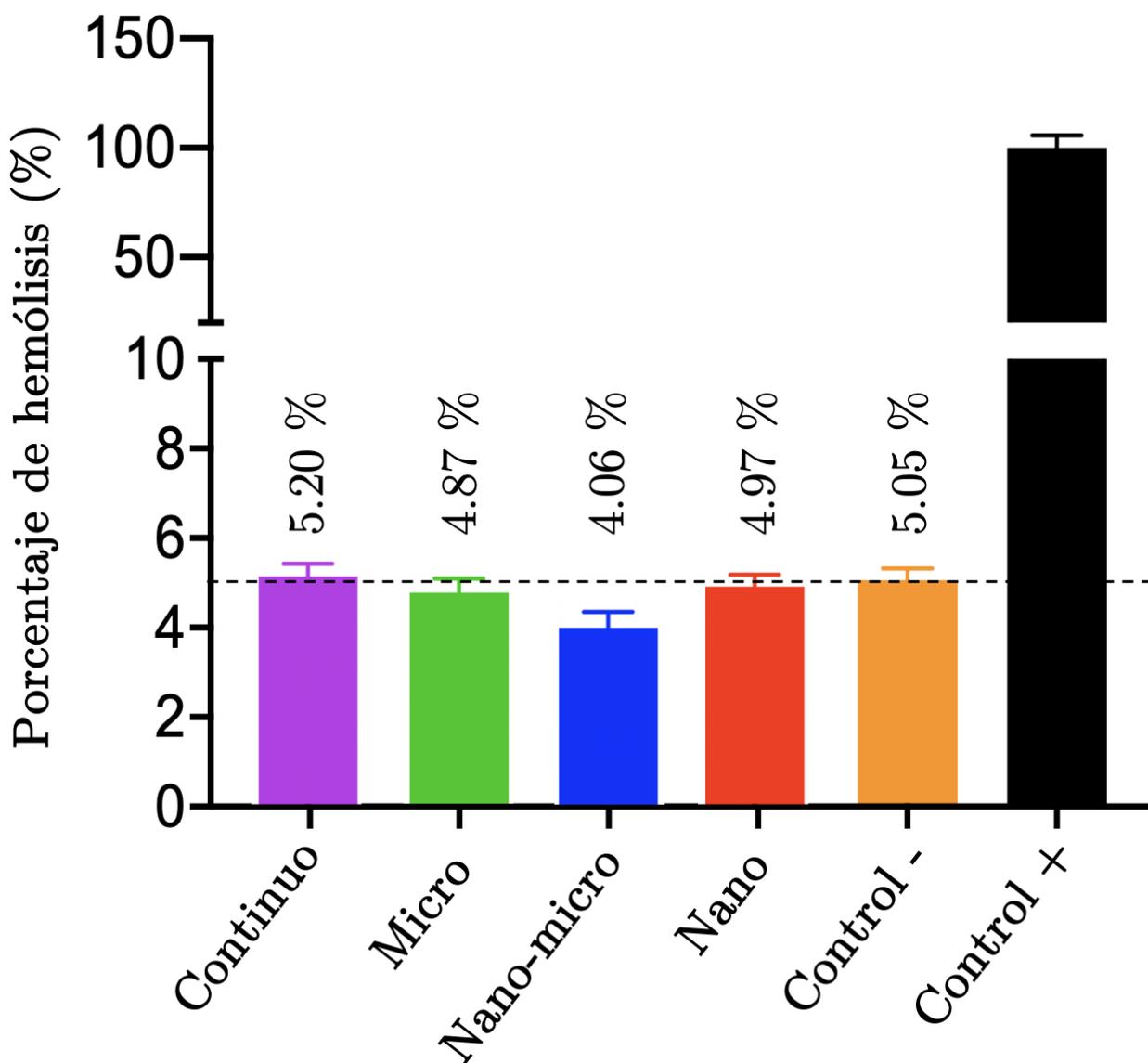


Figura 49. Hemólisis de superficies de TiO_2 con diferentes morfologías.

4.6.2 Proliferación celular

La **Figura 50** muestra los resultados de la proliferación celular en las superficies de TiO_2 con diferentes morfologías, para tiempos de exposición a las células de 48, 72 y 96 h. Se usaron osteoblastos de la línea celular MC3T3-E1 y se normalizó con su respectivo control. En todas las muestras se observa proliferación celular, pero destaca la superficie nanoestructurada, la que promueve la mayor proliferación (de ~ 1.5 más que en el control). Esto se debe a que la presencia de nanoporos incrementa la rugosidad (Durdu et al., 2021), lo que favorece, primero la adhesión y, después, la proliferación (Neoh et al., 2012). Esto explica, también, la menor proliferación observada en la superficie continua. En la superficie microestructurada, la proliferación, excepto en el caso del tiempo más corto de 48 h, es ligeramente menor a la observada en la superficie continua, lo que podría asociarse al tamaño de poro de $40 \mu\text{m}$ y la separación de $106 \mu\text{m}$ que aíslan las células (entre 20 y $30 \mu\text{m}$) que se albergan dentro de los poros, como se observa en la **Figura 51a**. La adición de nanoporos en estas microestructuras incrementa la proliferación (observada en la **Figura 51b**), pero sin llegar al nivel de la obtenida cuando solo se tienen nanoestructuras.

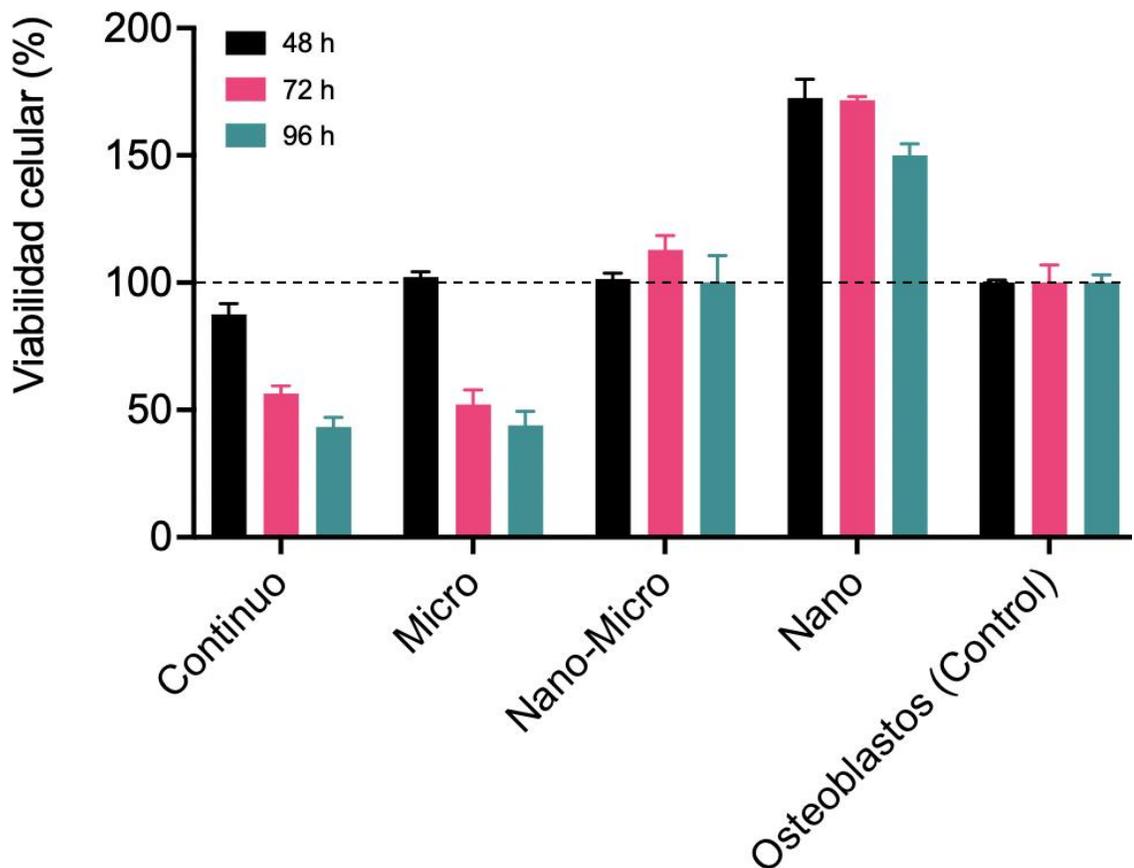


Figura 50. Proliferación celular (línea celular MC3T3-E1) en superficies de TiO_2 con diferentes morfologías.

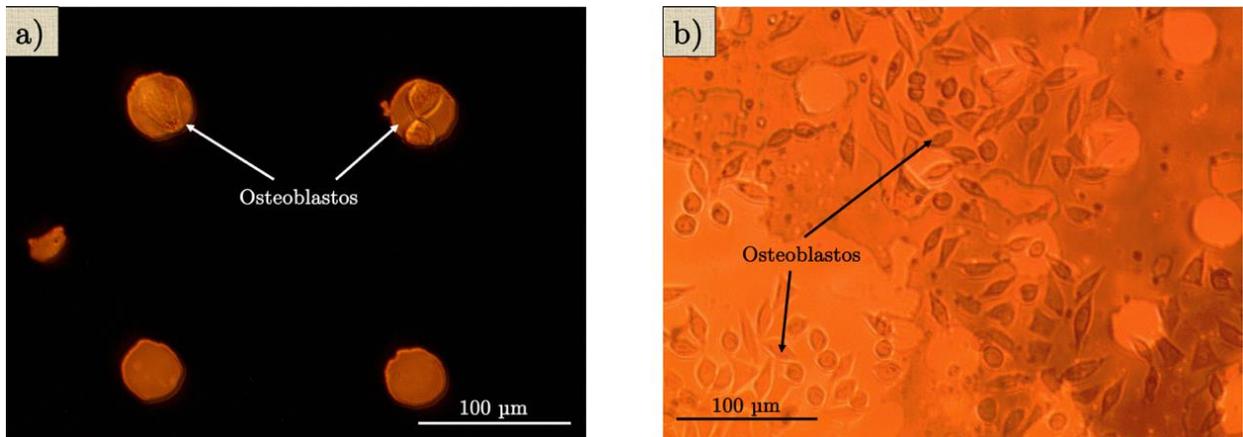


Figura 51. Imágenes incubación de osteoblastos en una superficie de TiO_2 : **a)** microestructurada (a las 48 h) y **b)** nano-microestructurada (a las 96 h).

Capítulo 5. Conclusiones

5.1 Conclusiones

5.1.1 Superficies continuas

Mediante la técnica de erosión iónica DC, en la cámara de Intercovamex del departamento de materiales avanzados, se obtienen películas continuas de Ti, sobre sustratos de vidrio y de silicio, a una tasa de depósito de 13 nm/min, cuando se aplican 100 V, y se usa un flujo y presión de argón de 20 sccm y 2.0 mTorr, respectivamente. Las superficies de estas películas adquieren la fase cristalina anatasa de TiO_2 , con una rugosidad de 21 nm y una orientación preferencial en los planos (004), cuando se someten a un tratamiento térmico a 450 °C/4 h.

5.1.2 Superficies nanoestructuradas

Las condiciones de anodizado de películas de Ti de 500 nm, que generan nanoestructuras con poros del mayor diámetro promedio, 64 ± 9 nm, son: un electrolito de 0.6 wt% de NH_4F , envejecido por 12 min y un uso previo menor a 100 min, y la aplicación de 45 V por 3 min.

El tamaño de poro de las nanoestructuras: i) es independiente del sustrato usado, de Si o de vidrio; ii) prácticamente no varía con la concentración del electrolito (de 0.3 wt% a 0.9 wt% de NH_4F) o el tiempo de anodizado (1 a 15 min) y iii) se ve mayormente influenciado por el voltaje de anodizado (entre 25 y 45 V), del que depende linealmente de acuerdo con la relación $y = (1.1 \pm 0.2)x + (9.5 \pm 7.2)$.

El tratamiento térmico a 450 °C/4 h, hace que las nanoestructuras adquieran la fase cristalina anatasa del TiO_2 con una orientación preferencial en la dirección [004] y una rugosidad RMS de 33 nm.

5.1.3 Superficies microestructuradas y nano-microestructuradas

Las microestructuras de Ti con poros columnares de 40 μm de diámetro separados por 106 μm , obtenidas mediante fotolitografía por *Lift-off*, pueden combinarse exitosamente con el anodizado para producir nano-microestructuras con poros adicionales de 64 ± 8 nm de diámetro promedio.

Las microestructuras y las nano-microestructuras también cristalizan en la fase anatasa del TiO_2 después del tratamiento térmico a 450 $^\circ\text{C}/4$ h. Sin embargo, las superficies microestructuradas mantienen la misma orientación y rugosidad que las películas continuas, mientras que las nano-microestructuradas adquieren la rugosidad y orientación preferencial de las superficies nanoestructuradas.

5.1.4 Biocompatibilidad y proliferación celular

Todas las superficies, nano y microestructuradas, de TiO_2 carecen de toxicidad y por lo tanto son biocompatibles en sangre, e incluso las superficies continuas sobrepasan solo por un 0.2% el valor de la norma establecida (ISO 10993-4).

En todas las muestras se observa proliferación celular, pero destaca la superficie nanoestructurada, la que promueve la mayor proliferación (de ~ 1.5 más que en el control).

5.2 Trabajo a futuro

Realizar estudios sobre la optimización del tamaño de nanoporo que maximiza la proliferación celular y de la influencia de microporos de mayor diámetro, además de los estudios de diferenciación celular y de propiedades mecánicas.

Literatura citada

- Aguirre Ocampo, R., Echeverry-Rendón, M., Robledo, S., & Echeverría Echeverría, F. (2022). Effect of TiO₂ nanotubes size, heat treatment, and UV irradiation on osteoblast behavior. *Materials Chemistry and Physics*, 275, 125137. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2021.125137>
- Albella Martín, J. M. (2003). *Láminas delgadas y recubrimientos. Preparación, propiedades y aplicaciones*. CSIC.
- Albu, S. P., Ghicov, A., Macak, J. M., & Schmuki, P. (2007). 250 μm long anodic TiO₂ nanotubes with hexagonal self-ordering. *Physica Status Solidi - Rapid Research Letters*, 1(2), R65–R67. <https://doi.org/10.1002/pssr.200600069>
- Arshi, N., Lu, J., Joo, Y. K., Lee, C. G., Yoon, J. H., & Ahmed, F. (2012). Study on structural, morphological and electrical properties of sputtered titanium nitride films under different argon gas flow. *Materials Chemistry and Physics*, 134(2–3), 839–844. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2012.03.078>
- Bertolini, L., & Gastaldi, M. (2011). Corrosion resistance of low-nickel duplex stainless steel rebars. *Materials and Corrosion*, 62(2), 120–129. <https://doi.org/10.1002/maco.201005774>
- Borgese, L., Gelfi, M., Bontempi, E., Goudeau, P., Geandier, G., Thiaudière, D., & Depero, L. E. (2012). Young modulus and Poisson ratio measurements of TiO₂ thin films deposited with Atomic Layer Deposition. *Surface and Coatings Technology*, 206(8–9), 2459–2463. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2011.10.050>
- Bunshah, R. F. (1994). *Handbook of Deposition Technologies for Films and Coatings: Science, Technology and Applications* (2a ed.). Noyes Publications.
- Chung, D. H., & Buessem, W. R. (1968). The voigt-reuss-hill (vrh) approximation and the elastic moduli of polycrystalline zno, tio₂ (rutile), and α-al₂o₃. *Journal of Applied Physics*, 39(6), 2777–2782. <https://doi.org/10.1063/1.1656672>
- Deng, A., Zhu, Y., Guo, X., Zhou, L., & Jiang, Q. (2018). Synthesis of various TiO₂ micro-/nano-structures and their photocatalytic performance. *Materials*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/MA11060995>
- Deng, T., Zhu, Z., Li, X., Ma, T., & Wang, Q. (2020). Experimental study on electrochemical etching for titanium printed circuit heat exchanger channels. *Journal of Materials Processing Technology*, 282, 116669. <https://doi.org/10.1016/J.JMATPROTEC.2020.116669>
- Durdu, S., Cihan, G., Yalcin, E., & Altinkok, A. (2021). Characterization and mechanical properties of TiO₂ nanotubes formed on titanium by anodic oxidation. *Ceramics International*, 47(8), 10972–10979. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.12.218>
- Goldstein, J. I., Newbury, D. E., Echlin, P., Joy, D. C., Lyman, C. E., Lifshin, E., Sawyer, L., & Michael, J. R. (2003). *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0215-9>
- Gong, D., Grimes, C. A., Varghese, O. K., Hu, W., Singh, R. S., Chen, Z., & Dickey, E. C. (2001). Titanium oxide nanotube arrays prepared by anodic oxidation. *Journal of Materials Research*, 16(12), 3331–3334. <https://doi.org/10.1557/JMR.2001.0457>

- Hernández López, J. M. (2015). *Funcionalización superficial de aleaciones de titanio mediante anodizado para aplicaciones biomédicas* [Tesis de doctorado en electroquímica]. Universidad Autónoma de Madrid.
- Hou, X., Lund, P. D., & Li, Y. (2022). Controlling anodization time to monitor film thickness, phase composition and crystal orientation during anodic growth of TiO₂ nanotubes. *Electrochemistry Communications*, 134, 107168. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2021.107168>
- Huang, C. L., Huang, K. T., & Lee, T. M. (2023). The biological responses of osteoblasts on titanium: Effect of oxygen level and surface roughness. *Journal of the Formosan Medical Association*. <https://doi.org/10.1016/J.JFMA.2023.01.009>
- Hutmacher, D. W., Schantz, J. T., Lam, C. X. F., Tan, K. C., & Lim, T. C. (2007). State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1(4), 245–260. <https://doi.org/10.1002/term.24>
- Kanaya, K., & Okayama, S. (1972). Penetration and energy-loss theory of electrons in solid targets. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 5(1), 43–58. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/5/1/308>
- Keskin, A. V., Gençten, M., Bozar, S., Arvas, M. B., Güneş, S., & Sahin, Y. (2020). Preparation of anatase form of TiO₂ thin film at room temperature by electrochemical method as an alternative electron transport layer for inverted type organic solar cells. *Thin Solid Films*, 706, 138093. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2020.138093>
- Kimura, Y., Kimura, S., Kojima, R., & Niwano, M. (2015). *Fabrication of micro hydrogen gas sensors by local anodization of titanium wires*. <https://doi.org/10.7567/ssdm.2012.ps-13-2>
- Kittel, C. (1995). *Introducción a la física del estado sólido* (3a ed.). Reverté.
- Kurtz, S., Ong, K., Lau, E., Mowat, F., & Halpern, M. (2007). Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 89(4), 780–785. <https://doi.org/10.2106/JBJS.F.00222>
- L. Smith, D. (1995). *Thin-Film Deposition: Principles and Practice*. McGrawHill.
- Liu, J., Liu, H., Zuo, X., Wen, F., Jiang, H., Cao, H., & Pei, Y. (2019). Micro-patterned TiO₂ films for photocatalysis. *Materials Letters*, 254, 448–451. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.07.098>
- Lucas-Granados, B., Sánchez-Tovar, R., Fernández-Domene, R. M., & García-Antón, J. (2017). Controlled hydrodynamic conditions on the formation of iron oxide nanostructures synthesized by electrochemical anodization: Effect of the electrode rotation speed. *Applied Surface Science*, 392, 503–513. <https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2016.09.073>
- Luna Cervantes, M. (2018). *Nanotubos de TiO₂ por oxidación anódica: síntesis y caracterización* [Tesis de maestría en ciencias]. Universidad Veracruzana.
- Martinez, M. A. F., Balderrama, Í. de F., Karam, P. S. B. H., de Oliveira, R. C., de Oliveira, F. A., Grandini, C. R., Vicente, F. B., Stavropoulos, A., Zangrando, M. S. R., & Sant'Ana, A. C. P. (2020). Surface roughness of titanium disks influences the adhesion, proliferation and differentiation of osteogenic properties derived from human. *International Journal of Implant Dentistry*, 6(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40729-020-00243-5>

- Moreno, B., Carballo, M., Jurado, J., & Peraleda, L. (2009). Una revisión del uso del TiO₂ en terapias e ingeniería tisular. *Bol. Soc. esp. Ceram. V*, 48, 321–328. <https://digital.csic.es/handle/10261/36667>
- Neoh, K. G., Hu, X., Zheng, D., & Kang, E. T. (2012). Balancing osteoblast functions and bacterial adhesion on functionalized titanium surfaces. *Biomaterials*, 33(10), 2813–2822. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2012.01.018>
- O’Keefe, M. J., & Rigsbee, J. M. (1995). The Science, Technology and Materials Applications of Physical Vapor Deposition Processes. En *Materials and Processes for Surface and Interface Engineering* (pp. 151–183). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0077-9_5
- Pan, J., Leygraf, C., Thierry, D., & Ektessabi, A. M. (1997). Corrosion resistance for biomaterial applications of TiO₂ films deposited on titanium and stainless steel by ion-beam-assisted sputtering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 35(3), 309–318. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19970605\)35:3<309::AID-JBM5>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19970605)35:3<309::AID-JBM5>3.0.CO;2-L)
- Pang, Y., Xu, G., Feng, Q., Lv, J., Qin, Y., Zhang, Y., Zheng, Z., & Wu, Y. (2018). Crystalline orientation preference for TiO₂ nanotube arrays with efficient photoelectrochemical properties. *Physics Letters A*, 382(38), 2759–2762. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSLETA.2018.07.021>
- Pawlik, A., Hnida, K., Socha, R. P., Wiercigroch, E., Małek, K., & Sulka, G. D. (2017). Effects of anodizing conditions and annealing temperature on the morphology and crystalline structure of anodic oxide layers grown on iron. *Applied Surface Science*, 426, 1084–1093. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.07.156>
- Ramakrishna, S., Ramalingam, M., Sampath Kumar, T. S., & Soboyejo, W. O. (2010). Biomaterials: A nano approach. En *Biomaterials: A Nano Approach*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/B15739>
- Ratner, B. D. (1996). Composites in Biomaterials Science. *Journal of Biomaterials Science*, 1, 94–105.
- Ratsch, C., & Venables, J. A. (2003). Nucleation theory and the early stages of thin film growth. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, 21(5), S96–S109. <https://doi.org/10.1116/1.1600454>
- Regonini, D., Bowen, C. R., Jaroenworarluck, A., & Stevens, R. (2013). A review of growth mechanism, structure and crystallinity of anodized TiO₂ nanotubes. *Materials Science and Engineering R: Reports*, 74(12), 377–406. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2013.10.001>
- Romero Villareal, C. (2015). *Efecto del tamaño de poro en el comportamiento biomecánico y biofuncional de implantes de titanio*. [Tesis de licenciatura]. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Universidad de Sevilla.
- Roy, P., Berger, S., & Schmuki, P. (2011). TiO₂ Nanotubes: Synthesis and Applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(13), 2904–2939. <https://doi.org/10.1002/ANIE.201001374>
- Selman, A. M., & Hassan, Z. (2013). Influence of deposition temperature on the growth of rutile TiO₂ nanostructures by CBD method on seed layer prepared by RF magnetron sputtering. *Superlattices and Microstructures*, 64, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.spmi.2013.09.018>

- Sjöström, T., McNamara, L. E., Yang, L., Dalby, M. J., & Su, B. (2012). Novel anodization technique using a block copolymer template for nanopatterning of titanium implant surfaces. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 4(11), 6354–6361. <https://doi.org/10.1021/am301987e>
- Sopha, H., Hromadko, L., Nechvilova, K., & Macak, J. M. (2015). Effect of electrolyte age and potential changes on the morphology of TiO₂ nanotubes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 759, 122–128. <https://doi.org/10.1016/J.JELECHEMA.2015.11.002>
- Stewart, C. (2022). *Knee replacements number select countries 2019 | Statista*. <https://www-statista-com.grenoble-em.idm.oclc.org/statistics/236586/number-of-knee-operations-in-selected-countries/>
- Suraj, S., Monika, D., & Onkar, S. (2022). *Biomaterials Market*. Allied Market Research.
- Swapna, S., & Onkar, S. (2023). *Orthopedic Implants Market*. Allied Market Research.
- Syrek, K., Kapusta-Kołodziej, J., Jarosz, M., & Sulka, G. D. (2015). Effect of electrolyte agitation on anodic titanium dioxide (ATO) growth and its photoelectrochemical properties. *Electrochimica Acta*, 180, 801–810. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.09.011>
- Thurston, A. J. (2007). Paré and prosthetics: The early history of artificial limbs. *ANZ Journal of Surgery*, 77(12), 1114–1119. <https://doi.org/10.1111/j.1445-2197.2007.04330.x>
- Valdespino Padilla, D. (2019). *Preparación y estudio de soportes porosos de TiO₂ con recubrimiento de fosfato de calcio para el crecimiento de células óseas*. [Tesis de doctorado en ciencias]. CICESE.
- Wasa, K., Adachi, H., & Kitabatake, M. (2004). *Thin Films Materials Technology*. William Andrew.
- Wasa, K., Hayakawa, S., Kiyotaka Wasa; Shigeru Hayakawa, Wasa, K., Hayakawa, S., & Kiyotaka Wasa; Shigeru Hayakawa. (1992). Handbook of Sputter Deposition Technology: Principles, Technology, and Applications. En *Handbook of Sputter Deposition Technology*. Park Ridge, NJ (United States); Noyes Publications.
- Yang, S., Leong, K. F., Du, Z., & Chua, C. K. (2001). The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Engineering*, 7(6), 679–689. <https://doi.org/10.1089/107632701753337645>
- Zhang, Y., Fan, H., Ding, X., Yan, Q., Wang, L., & Ma, W. (2015). Simulation of anodizing current-time curves and morphology evolution of TiO₂ nanotubes anodized in electrolytes with different NH₄F concentrations. *Electrochimica Acta*, 176, 1083–1091. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.07.110>