Escola Universitària d'Enginyeria
Tècnica Industrial de Barcelona
Consorci Escola Industrial de Barcelona
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

**Volum I**

Memòria - Pressupost - Annexos

TREBALL DE FI DE GRAU

# "DESENVOLUPAMENT DE RECOBRIMENTS POLIMÈRICS ANTIFOULING SOBRE IMPLANTS DE TITANI PER A APLICACIONS BIOMÈDIQUES"

TFG presentat per obtenir el títol de GRAU en ENGINYERIA BIOMÈDICA

Per **Adriana Carreter Sisquella**

Barcelona, 8 de Gener de 2014

Director: Daniel Rodríguez Rius

Departament de Ciència dels materials i enginyeria metal·lúrgica (CMEM)

Universitat Politècnica de Catalunya (UPC)

# MEMÒRIA

Índex memòria ..... 1
Resum ..... 3
Resumen ..... 3
Abstract ..... 4
Agraïments ..... 5
**Capítol 1: INTRODUCCIÓ ..... 6**
1.1 Objectius ..... 6
1.2 Abast del projecte ..... 6
**Capítol 2: ESTAT DE L'ART ..... 8**
2.1 Titani com a biomaterial ..... 8
2.2 Biofilm bacterià ..... 13
2.2.1 Bacteris implicats ..... 14
2.2.2 Periimplantitis ..... 15
2.3 Recobriments *antifouling* ..... 15
2.4 Tractaments estudiats ..... 16
2.4.1 Electrodeposició ..... 17
2.4.2 Activació amb plasma ..... 19
2.5 Tècniques utilitzades ..... 19
2.5.1 Mesura de la mullabilitat ..... 20
2.5.2 Anàlisi de la rugositat ..... 20
2.5.3 Anàlisi química ..... 21
2.5.4 Espectroscòpia d'impedàncies ..... 22
**Capítol 3: MATERIALS I MÈTODES ..... 24**
3.1 Preparació de les mostres ..... 24
3.2 Tractament d'electrodeposició ..... 26
3.2.1 Mostres de titani ..... 29
3.2.2 Activació amb plasma ..... 30
3.3 Caracterització físico-química del recobriment ..... 31
3.3.1 Mesura de la mullabilitat ..... 31
3.3.2 Anàlisi de la rugositat ..... 32

3.3.3 Anàlisi química ..... 34
3.3.4 Espectroscòpia d'impedàncies ..... 35
3.4 Caracterització biològica del recobriment ..... 36
3.4.1 Assaig de citotoxicitat ..... 36
3.4.2 Adsorció de proteïnes ..... 40
3.4.3 Adhesió bacteriana ..... 42
3.5 Funcionalització del recobriment ..... 46
**Capítol 4: RESULTATS I DISCUSSIÓ ..... 48**
4.1 Preparació de les mostres ..... 48
4.2 Tractament d'electrodeposició ..... 48
4.2.1 Mostres de titani ..... 52
4.2.2 Activació amb plasma ..... 52
4.3 Caracterització físico-química del recobriment ..... 53
4.3.1 Mesura de la mullabilitat ..... 53
4.3.2 Anàlisi de la rugositat ..... 55
4.3.3 Anàlisi química ..... 57
4.3.4 Espectroscòpia d'impedàncies ..... 59
4.4 Caracterització biològica del recobriment ..... 61
4.4.1 Assaig de citotoxicitat ..... 62
4.4.2 Adsorció de proteïnes ..... 63
4.4.3 Adhesió bacteriana ..... 63
**Capítol 5: CONCLUSIONS ..... 68**
**Capítol 6: BIBLIOGRAFIA ..... 69**
6.1 Referències bibliogràfiques ..... 69
6.2 Bibliografia de consulta ..... 71
**PRESSUPOST ..... 73**
**ANNEX 1: IMPACTE AMBIENTAL ..... 77**
**ANNEX 2: PROTOCOLS ..... 78**
2.1 Quantificació de bacteris adherits per unitat d'àrea ..... 78
2.2 Assaig d'adhesió cel·lular ..... 81

# RESUM

Malgrat que en la majoria dels casos els implants dentals presenten una elevada taxa d'èxit, hi ha ocasions que fracassen degut a infeccions bacterianes. Per tal de minimitzar el percentatge de fracàs, s'estan estudiant tractaments que permetin recobrir la superfície d'aquests implants amb polímers.

En el present projecte s'ha desenvolupat un recobriment amb propietats *antifouling* amb la finalitat de reduir l'adsorció de proteïnes i bacteris sobre la superfície de titani, i d'aquesta manera evitar la formació d'un *biofilm* bacterià. S'estudia un mètode per optimitzar la unió del polímer amb el titani, es tracta de sotmetre les mostres al tractament d'electrodeposició.

La segona part del projecte consisteix en caracteritzar el recobriment. Pel que fa a les propietats físico-químiques s'avaluen amb el mètode de l'angle de contacte, analitzant la composició química i la rugositat superficial. Finalment es fa una caracterització biològica on s'estudia el comportament que té el recobriment davant l'adsorció de proteïnes i bacteris, i es comprova la seva biocompatibilitat amb un assaig de citotoxicitat.

# RESUMEN

Pese a que en la mayoría de los casos los implantes dentales presentan una elevada tasa de éxito, hay ocasiones que fracasan debido a infecciones bacterianas. Para minimizar el porcentaje de fracaso, se están estudiando tratamientos que permitan recubrir la superficie de estos implantes con polímeros.

En el presente proyecto se ha desarrollado un recubrimiento con propiedades *antifouling* con el fin de reducir la adsorción de proteínas y bacterias sobre la superficie de titanio, y de esta manera evitar la formación de un *biofilm* bacteriano. Se estudia un método para optimizar la unión del polímero con el titanio, se trata de someter las muestras al tratamiento de electrodeposición.

La segunda parte del proyecto consiste en caracterizar el recubrimiento. En cuanto a las propiedades físico-químicas se evalúan con el método del ángulo de contacto, analizando la composición química y la rugosidad superficial. Finalmente se hace una caracterización biológica donde se estudia el comportamiento que tiene el recubrimiento ante la adsorción de proteínas y bacterias, y se comprueba su biocompatibilidad con un ensayo de citotoxicidad.

# ABSTRACT

Although in most cases dental implants show a high success rate, bacterial infections may sometimes cause their failure. In order to minimize the percentage of failure, treatments that allow the surface of the implants to be covered with polymers are under research.

In the present project, a coating with antifouling properties has been developed in order to reduce the adsorption of proteins and bacteria on a titanium surface, this way avoiding/preventing the formation of a bacterial biofilm. A method with the aim of optimizing the binding between the polymer and the titanium has been studied, based on the submission of the samples to an electrodeposition treatment.

The second part of this project consists in the characterization of this coating. Physicochemical properties are evaluated with the contact angle method, analyzing the chemical composition and roughness of the surface. Finally, a biological characterization to study the coat's behavior in front of the adsorption of proteins and bacteria is carried out; and its biocompatibility is tested using a cytotoxicity assay.

# AGRAÏMENTS

Al meu tutor Dr. Daniel Rodríguez que m'ha donat la oportunitat de realitzar aquest projecte, per la confiança i la llibertat que he tingut a l'hora de prendre decisions i pels coneixements que m'ha ensenyat.

A la Judit per la paciència i el temps que m'ha dedicat, per tenir sempre una resposta a les meves preguntes, perquè en tot moment ha estat disposada a ajudar-me. Per rebrem sempre amb un somriure i per animar-me en els moments més difícils.

A tots els companys del grup BIBITE que m'han ajudat sempre que ho he necessitat i han fet que la meva estada al laboratori hagi sigut molt agradable. En especial al Sergi i a la Beatriz per estar sempre de bon humor, disposats a fer-me riure i animar-me, per fer que mai perdés les ganes de continuar amb aquest projecte.

Al servei de Microscòpia Electrònica del CMEM, per permetre l'ús de la seva maquinària.

A l'Akot que sempre hi és, pel suport incondicional que m'ha donat, per aguantar-me ens els moments més difícils, per ensenyar-me que tot és possible i per ser capaç de robar-me un somriure fins i tot en les pitjors situacions.

A la família i amics per aguantar el mal humor dels dies difícils, per mostrar-se sempre al meu costat i per creure en mi.

# CAPÍTOL 1: INTRODUCCIÓ

En aquest treball es realitza un recobriment polimèric sobre titani comercialment pur mitjançant l'electrodeposició. Posteriorment s'avaluen les propietats fisicoquímiques, l'activitat antibacteriana, la citotoxicitat i les propietats *antifouling* del recobriment.

## 1.1 Objectius

Els objectius d'aquest projecte són:

1. Estudi i optimització d'un recobriment de Poli(etilenglicol) sobre una superfície de titani, mitjançant el procés d'electrodeposició.
2. Caracterització físico-química del recobriment polimèric desenvolupat.
3. Estudi de l'activitat antibacteriana i citotoxicitat de la capa de polímer, així com de les seves propietats *antifouling*.

## 1.2 Abast del projecte

Aquest projecte comença amb una sèrie de fonaments teòrics per posar en context al lector, detallant les tècniques i els tractaments utilitzats per desenvolupar un recobriment *antifouling*. A continuació es fa una caracterització tant físico-química com biològica per tal de determinar la presencia del polímer, i finalment es presenten els resultat obtinguts.

Està distribuït de la següent manera:

- Capítol 2. Estat de l'art: fonaments teòrics sobre el desenvolupament del recobriment, detallant-ne els tractaments utilitzats i les tècniques de caracterització.
- Capítol 3. Materials i mètodes: explicació de les condicions de treball de cada una de les tècniques utilitzades per caracteritzar la capa de polímer. També es detalla el procediment per tal de realitzar un estudi biològic.
- Capítol 4. Resultats i discussió: es detallen els resultats obtinguts, seguits de la discussió dels mateixos.
- Capítol 5. Conclusions: extracció de conclusions generals a partir de tots els resultats obtinguts
- Capítol 6. Bibliografia: articles científics utilitzats, que s'han anat referenciant durant la realització de la memòria i consultes d'Internet.

# CAPÍTOL 2: ESTAT DE L'ART

## 2.1 Titani com a biomaterial

Aquells materials que estan en contacte amb els sistemes biològics s'anomenen biomaterials, una definició acceptada per entendre el concepte de biomaterials és la següent:

*Material dissenyat per interaccionar amb sistemes biològics per avaluar, tractar, augmentar o substituir qualsevol teixit, òrgan o funció del cos* (Ratner 2004).

Tots els biomaterials han de complir un requisit essencial i indispensable, de no ser així no seran considerats biomaterials. Aquest requisit és la biocompatibilitat, i es defineix a continuació:

*Biocompatibilitat és l'habilitat d'un material de ser emprat en una aplicació específica amb una resposta apropiada de l'hoste* (Williams 1987).

Finalment aclarir que una resposta apropiada de l'hoste implica: resistència a la colonització bacteriana per evitar infeccions, no trombogènic, és a dir que no contribueixi a la formació de coàguls de sang i en determinades aplicacions es requereix que el material sigui osteoconductiu. Aquestes són algunes de les condicions per poder afirmar que el material en qüestió és biocompatible, però n'hi ha d'altres.

La utilització del biomaterials s'ha estès a totes les branques de la medicina, en funció de l'aplicació i de les seves necessitats s'utilitza el material que millor s'adapta a les característiques requerides. Bàsicament els podem agrupar en 4 famílies: biomaterials naturals, polimèrics, ceràmics i metalls.

El biomaterial utilitzat en aquest projecte és el titani comercialment pur (cp) de grau 2. El titani cp presenta quatre graus de puresa segons el contingut en elements intersticials (N, C, O, Fe) pel seu efecte en la microestructura i propietats mecàniques, i l'hidrogen (H) per l'efecte fragilitzant que té sobre el titani (taula 1).

**Taula 1.** *Classificació del titani comercialment pur (ISO 5832-2).*

| | Composició (% pes) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **N** | **C** | **O** | **Fe** | **H** |
| **Grau 1** | 0,03 | 0,10 | 0,18 | 0,20 | 0,0125 |
| **Grau 2** | 0,03 | 0,10 | 0,25 | 0,30 | 0,0125 |
| **Grau 3** | 0,05 | 0,10 | 0,35 | 0,30 | 0,0125 |
| **Grau 4** | 0,05 | 0,10 | 0,40 | 0,50 | 0,0125 |

Les propietats que ofereix el titani fan que sigui un dels materials més biocompatibles que hi ha actualment al mercat, degut principalment a una excel·lent resistència a la corrosió i a la fatiga. A continuació s'exposen les propietats físiques, químiques i mecàniques que presenta aquest biomaterial.

## Propietats físiques

El titani és un material al·lotròpic, és a dir presenta diferents estructures químiques. A temperatura ambient el titani pur presenta una estructura hexagonal composta (HCP), nomenada fase $\alpha$. Per sobre dels 882ºC l'estructura pateix una transformació al·lotròpica i es converteix en una estructura cúbica centrada en el cos (BCC), nomenada fase β. (F.Gil i J.Planell, 2009).

El titani té un elevat punt de fusió (1675ºC), fet que permet la seva manipulació a altes temperatures. Finalment cal destacar els seus reduïts coeficients de conductivitat tèrmica i elèctrica.

## Propietats químiques

El titani presenta una bona resistència a la corrosió degut al fenomen de passivació que pateix, aquest fenomen és causat per la gran reactivitat que té el titani amb l'oxigen i consisteix en la formació d'una capa d'òxid impermeable. En general la reactivitat química del titani no dóna lloc a productes tòxics, això el converteix en un dels metalls més utilitzats en aplicacions biomèdiques (C. Aparicio et al. 2001).

És tracta d'un metall de transició, per tant inclou l'orbital d parcialment ple a la seva configuració electrònica (figura 1). Un tret característic d'aquests metalls és que poden ser estables per si mateixos, sovint són paramagnètics i presenten diferents estats d'oxidació.

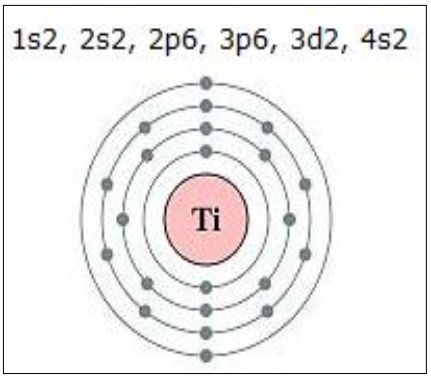


**Figura 1.** *Configuració electrònica del Titani.*

**Propietats mecàniques**

Les propietats mecàniques del titani depenen de la seva puresa. Presenta una resistència mecànica força baixa, però pot endurir-se per solució sòlida, per deformació o per tractament tèrmic.

És el metall que presenta valors de les propietats mecàniques (mòdul elàstic, resistència màxima i deformació a la ruptura) més similars a les de l'os cortical, en comparació amb els metalls més utilitzats en aquest camp o els aliatges de crom cobalt (taula 2).

**Taula 2.** *Comparativa propietats mecàniques de l'os respecte biomaterials més destacats.*

| | **Os cortical** | **Titani grau2** | **Ti6Al4V** | **Acer AISI 316L** | **CrCo** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Mòdul elàstic** | 10GPa | 105GPa | 120GPa | 210GPa | 220GPa |
| **Resistència màxima** | 70-159MPa | 345MPa | 890MPa | 650MPa | 1200MPa |
| **Deformació a ruptura** | 0-8% | 20% | 18% | 12% | 10% |

Les excel·lents propietats que presenta el titani fan que s'utilitzi en diferents aplicacions mèdiques, a continuació es nombren les aplicacions més destacades. En aquest projecte es farà un especial èmfasi a les aplicacions del camp de la odontologia.

## Camp ortopèdic

El titani és molt utilitzat en pròtesis ortopèdiques, com per exemple la pròtesi de maluc (figura 2). Aquest tipus de pròtesi estan compostes per diferents parts, cada part fabricada amb el biomaterial que més s'adapta a la funció que ha de realitzar. La tija d'aquest tipus de pròtesi és de l'aliatge Ti6Al4V (W.Wang i C.Poh 2013).

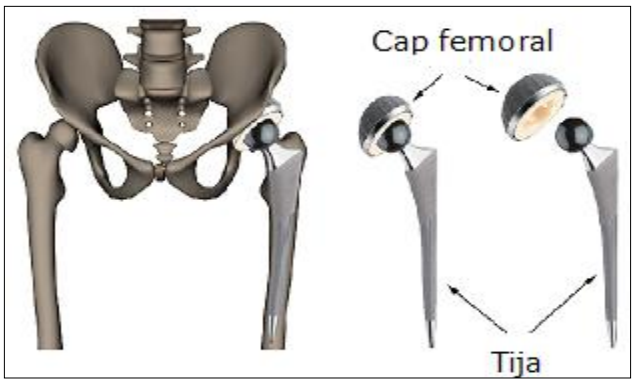


**Figura 2.** *Prótesis de maluc.*

Un altre aplicació del titani és per la fabricació de plaques i cargols d'osteosíntesi (F. Melendi 1997).

## Camp vascular

Juntament amb níquel (NiTi) formant aliatges que es caracteritzen per tenir memòria de forma. Un exemple són els *stents,* que s'utilitzen com a reforç pels vasos sanguinis degut a una reducció del seu diàmetre. El *stent* s'introdueix dins al vas sanguini i s'infla amb l'ajuda d'un globus, a continuació es retira el globus i queda implantat, recuperant l'amplada del vas i permeten així una bona circulació sanguínia (Ratner 2004).

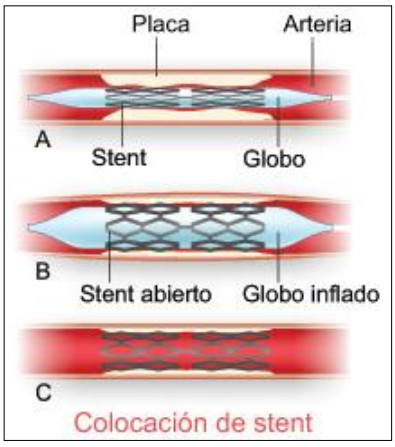


**Figura 3.** *Col·locació del stent.*

## Camp de la odontologia

Els implants dentals són implants dissenyats amb l'objectiu d'adherir-se directament a l'os mandibular per subjectar posteriorment una pròtesis funcional que desenvoluparà la funció de la peça dental perduda. Aquests implants presenten una gran diversitat en quant a disseny i mida (D. Garoña 2011).

El material més utilitzat per a la fabricació dels implants dentals és el titani comercialment pur, gràcies a la seva excel·lent biocompatibilitat i les seves propietats mecàniques.

**Figura 4.** *Arrel d'un implant dental.*

Existeixen diferents tipus d'implants dentals en funció de la posició que ocupen en relació a l'os, en aquest projecte s'estudien els implants endossis (dins de l'os) ja que són els més freqüents (K. Anusavice 2004). Els implants endossis es poden classificar en:

- Cilíndrics: poden ser de superfície roscada és a dir amb aspecte de cargol (figura 5) o bé de superfície no roscada, en aquest cas incorporen forats per possibilitar el creixement de l'os per dins de l'implant. Els de superfície roscada, permeten una bona unió entre l'implant i l'os. (Raspall i Santana 2006)
- Làmines perforades: es tracta de làmines de titani amb perforacions que permeten el creixement de l'os, presenten pilars on s'uneix la pròtesis (figura 6). Aquest tipus d'implants s'utilitza només en aquells casos que l'os no té l'amplada suficient per incorporar els implants cilíndrics.

**Figura 5.** *Implant dental endossi cilíndric*

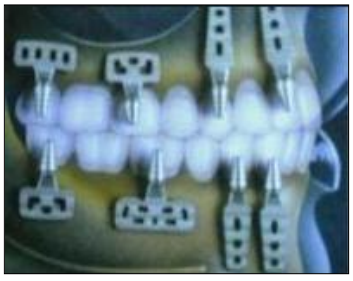

**Figura 6.** *Implant dental endossi de làmines perforades.*

## 2.2 Biofilm bacterià.

Els implants de titani són susceptibles a infeccions degut a la formació d'un biofilm bacterià a la seva superfície. Anomenem biofilm al conjunt de microorganismes que s'adhereixen a una superfície i formen un ecosistema estable. (W. Dunne 2002).

La formació d'un biofilm en una superfície es produeix com una successió d'esdeveniments d'adhesió i multiplicació. Els primers bacteris que s'adhereixen són els colonitzadors primaris, aquests interactuen amb la superfície immediatament després del primer contacte utilitzant proteïnes de membrana específiques o inespecífiques.

Si les condicions són favorables, els colonitzadors primaris es multipliquen exponencialment i formen colònies, facilitant l'arribada d'altres patògens que no són capaços de crear enllaços amb la superfície però si que poden adherir-se a altres bacteris, són els anomenats colonitzadors secundaris. (Alexander H et al. 2003).

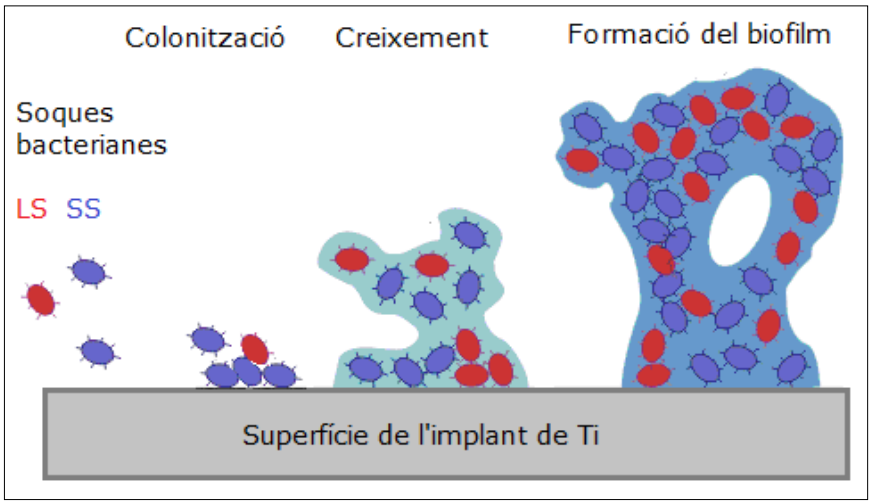


**Figura 7.** *Etapes de la formació d'un biofilm amb diferents espècies bacterianes.*

Tot i que la formació i desenvolupament del biofilm depèn de les característiques biològiques de les més de 200 soques bacterianes que el formen, es poden distingir diferents etapes (figura 7) (Mirjam M et al. 2007):

1. Els bacteris entren en contacte amb la superfície de l'implant i s'adhereixen a la superfície en funció de les propietats químiques i topogràfiques de la mostra (colonització).

2. Els bacteris adherits a la superfície de l'implant recluten més bacteris que es troben en el medi i hi ha una proliferació (creixement).

3. Desenvolupament de la matriu extracel·lular, que forma un biofilm madur amb un metabolisme propi que permet la ruptura del biofilm i l'alliberament de bacteris a una altre part de la superfície de l'implant (formació del biofilm).

Un cop format el biofilm madur, els bacteris queden protegits per la matriu extracel·lular i els tractaments antibiòtics no són efectius. Per tant, la manera més adient de combatre les infeccions en els implants de titani, és evitar l'adhesió dels bacteris.

### *2.2.1 Bacteris implicats*

Dos soques de bacteris relacionades amb la placa bacteriana bucal són els Streptococcus Sanguinis (SS) i els Lactobacillus Salivarius (LS). Les dos soques constitueixen una part important de la flora bacteriana del cos humà.

**Streptococcus Sanguinis**

La soca bacteriana Streptococcus Sanguinis és la primera bactèria que colonitza els teixits durs i sintetitza compostos que faciliten la colonització a altres bacteris com el Lactobacillus Salivarius, amb la interacció d'aquestes soques es forma el biofilm bacterià. (Yamaguchi et al. 2006).

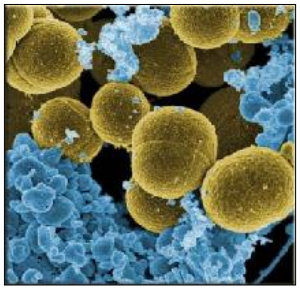

**Figura 8.** *Streptococcus Sanguinis.*

**Lactobacillus Salivarius**

Pel que fa a la soca bacteriana Lactobacillus Salivarius també està present a la flora bocal però en concentracions molt baixes. El seu objectiu és mantenir l'equilibri de la placa dento bacteriana. El seu metabolisme causa l'acidificació de la saliva, disminuint el pH d'aquest medi. Aquest ambient àcid pot provocar un dany important tant a l'implant dental com al seu teixit adjacent.

Es considera que el bacteri LS colonitza sobre les lesions ja formades, per tan és un colonitzador secundari implicat en la progressió de les càries (Negroni 2009).

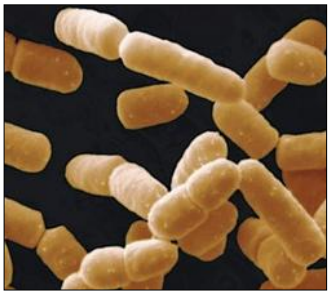

**Figura 9.** *Lactobacillus Salivarius.*

### *2.2.2 Periimplantitis*

El terme periimplantitis s'utilitza per descriure reaccions inflamatòries als teixits que envolten els implants dentals, es caracteritza per la pèrdua de l'os de suport. La periimplantitis és una de les causes més freqüents de fracàs de l'implant dental (J Mouhyi et al. 2009).

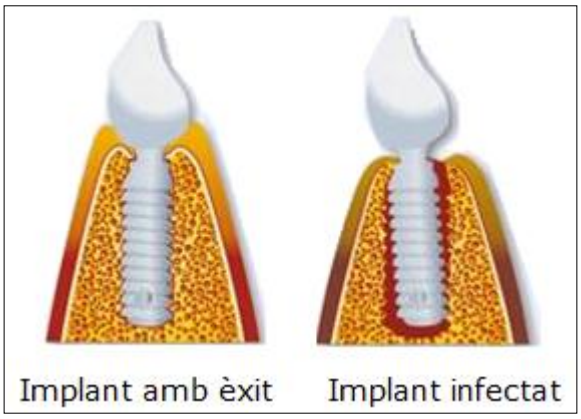


**Figura 10.** *Efecte de la periimplantitis.*

A la figura 10 s'observa un implant dental realitzat amb èxit, i un implant dental amb el teixit periimplantari afectat per una infecció. En el segon cas hi ha una pèrdua de teixit ossi, que pot produir la pèrdua de l'osteointegració prèviament existent i conduir l'implant al fracàs.

## 2.3 Recobriments *antifouling*

Actualment existeixen molts recobriments de superfície que s'apliquen per tal de millorar les característiques que ofereixen els implants, com per exemple recobriments de passivació on s'estimula la creació d'una capa d'òxid, o activació la superfície de l'implant que consisteix en crear grups hidroxils (-OH) per tal d'augmentar la seva reactivitat, aquests són dos exemples entre molts altres. En aquest projecte s'estudia un recobriment *antifouling*.

La paraula *fouling* es refereix en general a un procés no desitjat en què una superfície queda coberta de material provinent del medi que l'envolta. S'anomenen superfícies *antifouling* aquelles que minimitzen l'adsorció proteica i conseqüentment l'adhesió bacteriana.

Alguns exemples de recobriments polimèrics *antifouling* són:

- Copolímers en bloc amb cadenes laterals parcialment fluorades: generen una superfície apolar i hidrofòbica.
- Copolímers en bloc amb cadenes laterals amfifíliques: responen als canvis ambientals, canviant la seva estructura molecular.
- Recobriments de xerogel: auto assemblatge de cadenes alquíliques.

Un polímer és una macromolècula formada per cents o mils de monòmers, capaços de formar com a mínim dos enllaços, els polímers utilitzats en les superfícies *antifouling* han de minimitzar les forces intermoleculars entre les biomolècules i la superfície de l'implant. S'utilitzen aquells polímers que presenten propietats hidrofíliques, com per exemple el poli(etilenglicol) (PEG). Les superfícies hidrofíliques, tenen una energia superficial prou baixa per dificultar l'adhesió de biomolècules (Takao Hanawa 2011).

El polímer utilitzat en aquest projecte és el poli(etilenglicol) (PEG) Jeffamina, un PEG funcionalitzat amb cadena de repetició $CH_2$-$CH_2$-O i dues amines terminals ($NH_2$-PEG-$NH_2$) (figura 11). El $NH_2$ està lliure per reaccionar amb la capa d'òxid de titani de la superfície de l'implant, és important que les condicions de la solució aquosa tinguin un pH bàsic.

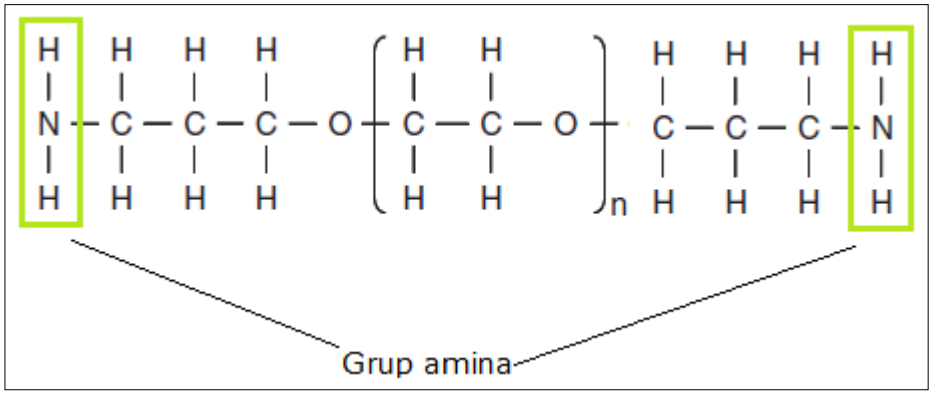


**Figura 11.** *Estructura química del PEG.*

El PEG té l'habilitat de ser molt soluble en aigua de manera que actua com si fos 5-10 vegades més gran que una proteïna soluble de massa molecular similar. Aquesta propietat és la responsable de dificultar l'adhesió de proteïnes, i reduir la seva antigenicitat (J. Ramón et al. 2009).

L'efecte contra l'adhesió de proteïnes que presenta el PEG repercuteix de manera directe en la disminució de la posterior adhesió de cèl·lules i bacteris.

## 2.4 Tractaments estudiats

Per tal d'enllaçar el poli(etilenglicol) a la superfície de titani, és necessari sotmetre'l a un tractament. Els principals mètodes de fixació del PEG són: la deposició química de vapor que s'utilitza per fixar el PEG a la superfície de la mostra amb un enllaç covalent, la deposició física que es basa en la incorporació d'un polímer hidròfob a la cadena de PEG (substància hidròfila) i finalment l'electrodeposició que és la tècnica que s'ha utilitzat en aquest projecte.

S'han estudiat dues condicions que permetran comparar els resultats i arribar a una conclusió, la primera de les condicions ha estat sotmetre les mostres al procediment de polit (detallat al punt 3.1) i posteriorment al tractament d'electrodeposició. La segona condició ha consistit en modificar la superfície de la

mostra químicament mitjançant l'activació per plasma, i finalment sotmetre-la al tractament d'electrodeposició.

### *2.4.1 Electrodeposició*

L'electrodeposició és un procés electroquímic on els cations metàl·lics continguts en una solució aquosa es dipositen formant un capa sobre un objecte conductor. Implica la reducció, és a dir el guany d'electrons, d'un compost metàl·lic dissolt en aigua.

El procés d'electrodeposició consisteix en fer passar una corrent elèctrica a través d'un electròlit (solució que conté NaCl i PEG) entre dos elèctrodes conductors nomenats ànode i càtode. Al connectar els elèctrodes amb una font d'energia (corrent directe) l'elèctrode que s'uneix al pol positiu de la font de voltatge és l'ànode, mentre que el que es connecta al pol negatiu és el càtode (figura 12) (F. D del Castillo 2008).

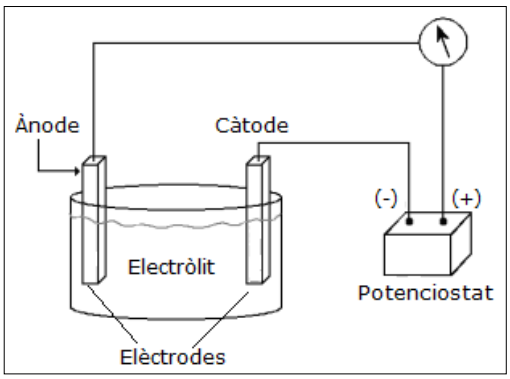


**Figura 12.** *Elements que intervenen a l'electrodeposició. Adaptació (F. D del Castillo 2008).*

Aquesta tècnica consisteix en aplicar un potencial elèctric variable entre la mostra estudiada (càtode) i l'elèctrode de referència, això genera un corrent entre la mostra i el contra elèctrode (ànode). La imposició del potencial elèctric, es realitzen mitjançant un potenciostat.

A continuació es fa una definició dels elements que intervenen durant el tractament d'electrodeposició realitzat en aquest projecte.

**Electròlit**

Material que es dissol completament en aigua per produir una solució que condueix una corrent elèctrica.

La solució iònica (electròlit) utilitzada ha consistit en dissoldre un polímer (PEG) juntament amb la sal comuna (NaCl) en un solvent ($H_2O$). Al mesclar la sal amb l'aigua té lloc la següent reacció:

$$NaCl\ (s) \rightarrow Na^+ + Cl^-$$

**Elèctrode**

Component del circuit elèctric que connecta el cablejat del circuit elèctric a un medi conductor (en aquest cas l'electròlit).

Al col·locar un elèctrode en un electròlit i aplicar un voltatge, l'electròlit condueix electricitat. Com a resultat es produeix una reacció química: es consumeixen els electrons del càtode i es produeixen elèctrodes nous que seran capturats per l'ànode.

La reacció que s'esdevé al càtode és la següent: $2H_2O + 2e^- \rightarrow 2OH^- + H_2$.

Els ions sodi ($Na^+$) i les amines protonitzades ($NH_3^+$) reaccionen cap al càtode per tal de neutralitzar la càrrega negativa de l'$OH^-$. Mentre la reacció que s'esdevé a l'ànode: $2H_2O \rightarrow O_2 + 4H^+ + 4e^-$, on els ions clorur ($Cl^-$) reaccionen cap a l'ànode neutralitzant la càrrega positiva del $H^+$ (figura 13).

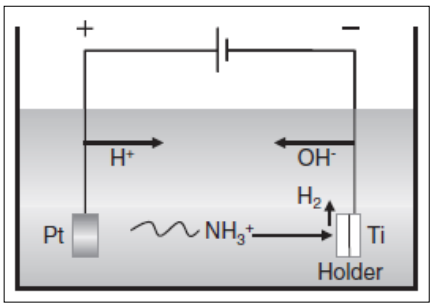


**Figura 13.** *Esquema del procés químic d'electrodeposició.*

El PEG Jeffamina ($NH_2$-PEG-$NH_2$) que hi ha dissolt a la solució és arrastrat cap al càtode (mostra de titani) degut a la protonació de les amines, que el dota d'una càrrega elèctrica positiva . La protonació és una reacció química on el grup amino del $NH_2$-PEG-$NH_2$ guanya un protó ($H^+$), degut al par d'electrons lliure que presenta el nitrogen (figura 14).

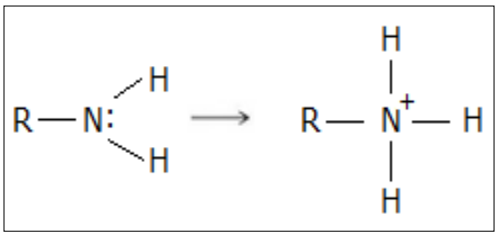


**Figura 14.** *Protonació de l'amina.*

El grup funcional $NH_3^+$ reacciona amb la superfície modificada i forma el recobriment ($NH_3^+$- PEG - $NH_3^+$) (figura 15).

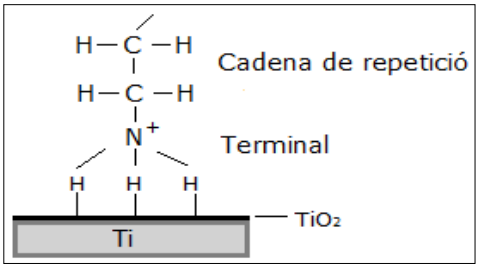


**Figura 15.** *Molècula de PEG enllaçada a la superfície de la mostra.*

### *2.4.2 Activació amb plasma*

L'activació amb plasma és un tractament mitjançant el qual es modifiquen les propietats d'una mostra augmentant la seva activitat superficial, també s'utilitza com a mètode per netejar i eliminar residus de superfícies. L'activació és recomanable en aquells casos que es requereix un procés posterior de recobriment.

L'efecte de l'activació depèn del material a tractar i de la naturalesa del gas del plasma, el gas utilitzat en aquest projecte ha estat l'argó que elimina els àtoms individuals deixant únicament radicals actius a la superfície. Per tant, l'exposició d'una mostra al plasma fa un efecte de neteja ja que elimina elements contaminants, com per exemple residus del procés de polit i rentat.

El principi de funcionament del plasma es basa en transmetre energia de forma massiva a la superfície, el plasma conté electrons amb una alta energia (1 a 10eV), suficient per trencar els enllaços químics que hi ha a la superfície de la mostra. Com a conseqüència estimula la superfície a augmentar els seus grups reactius, formant grups hidroxils (figura 16).

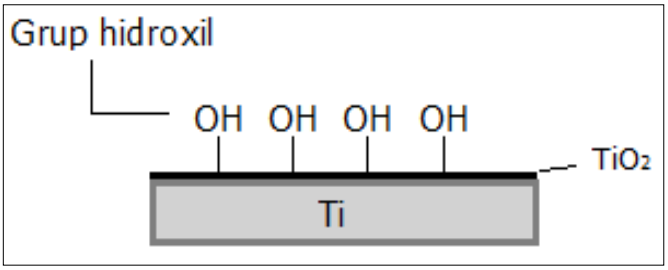


**Figura 16.** *Formació de grups hidroxils.*

Al augmentar els grups hidroxils a la superfície de la mostra, augmenta significativament la seva polaritat convertint-se en una superfície totalment hidrofílica (amb un angle proper a 0º).

És important sotmetre les mostres al posterior tractament desitjat (en aquest cas l'electrodeposició) de manera immediata, ja que s'ha demostrat que amb el pas del temps l'efecte aconseguit amb l'activació per plasma és perd, i la superfície de la mostra recupera les seva hidrofobicitat característica.

## 2.5 Tècniques utilitzades

En aquest projecte s'ha realitzat la caracterització de les mostres de titani després de sotmetre-les al tractament d'electrodeposició, mitjançant la mesura de la mullabilitat (angle de contacte), l'anàlisi de la rugositat amb l'ajuda de l'interferòmetre de llum blanca i el microscopi electrònic de rastreig, l'anàlisi química a partir d'espectroscòpia d'infraroig i finalment l'espectroscòpia d'impedàncies.

### *2.5.1 Mesura de la mullabilitat*

Per mesurar la mullabilitat que té una superfície s'utilitza el mètode de l'angle de contacte. Aquesta tècnica ens permet saber si la superfície de la mostra és hidrofòbica o hidròfila, i això servirà per caracteritzar el recobriment obtingut. La mullabilitat de la superfície depèn de molts tipus d'interaccions, com per exemple les forces de Van der Waals, o els ponts d'hidrogen.

La hidrofilicitat és l'afinitat que té un element amb l'aigua, de manera que al entrar en contacte aquesta s'expandeix al màxim per la superfície de la mostra. Contràriament quan el líquid no mulla la superfície, ja que aquesta el repèl, es parla d'hidrofobicitat (figura 17).

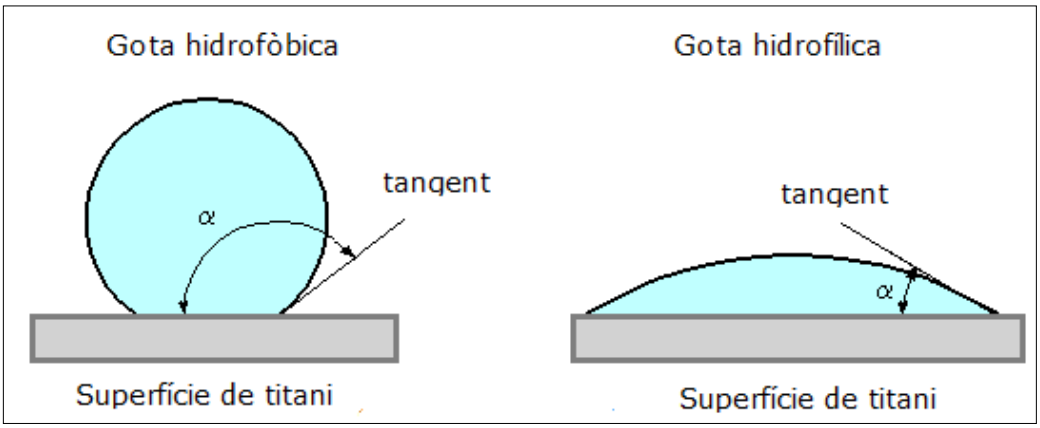


**Figura17.** *Mullabilitat de la superfície.*

Per tal de mesurar l'angle, es disposa d'un aparell (angle de contacte) amb un sistema automàtic de dosificació de gotes amb control micromètric, consta d'una font de llum blanca i una càmera per prendre la imatge. L'aparell mesura l'angle que es forma entre la tangent del perfil de la gota (líquid) i la superfície del titani (sòlid).

### *2.5.2 Anàlisi de la rugositat*

S'han utilitzat dos mètodes diferents per analitzar la rugositat; s'ha quantificat mitjançant interferometria de llum blanca i s'ha observat amb el microscopi electrònic de rastreig.

**Interferometria de llum blanca**

La interferometria és un mètode òptic que ens dona el perfil de la superfície de la mostra gràcies a la interferència d'un feix de llum blanca sobre una superfície de referència. S'obtenen una sèrie de franges d'interferència que permeten reconstruir la topografia de la superfície (Wee K et al. 2012).

El principi de funcionament d'aquest aparell consisteix en un una font d'iluminació que divideix la llum en dos feixos, el primer es transmet a la superfície que s'està analitzant mentre l'altre es transmet a un mirall de referència. La senyal reflectida de les dues superfícies es combina formant una interferència, la intensitat de la qual es registre amb una càmera.

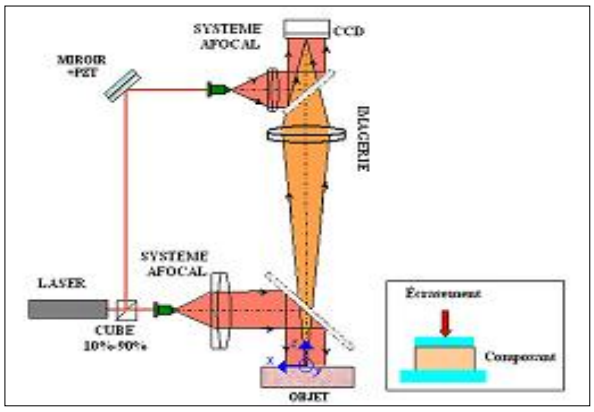


**Figura 18.** *Esquema d'un interferòmetre (Wee K et al. 2012).*

**Microscopi òptic de rastreig**

És un tipus de microscopi electrònic que proporciona una imatge de la mostra a la que se l'hi aplica un feix d'electrons. Aquesta tècnica permet obtenir informació tant de la rugositat com de la composició de la superfície a escala nanomètrica.

El funcionament d'aquesta tècnica es basa en emetre un feix d'electrons amb una energia entre 0,2 i 40keV que es focalitza en un punt entre 0,4 fins a 5nm de diàmetre. L'esquema de la figura 19, mostra de manera simplificada el funcionament de l'equip: el canó d'electrons emet un feix que passa a través de camps electromagnètics i lents que s'encarreguen de focalitzar-lo fins a la mostra. Un cop els electrons arriben a la mostra, surten disparats cap al detector d'electrons que processa la imatge (Joseph I. et al. 2003).

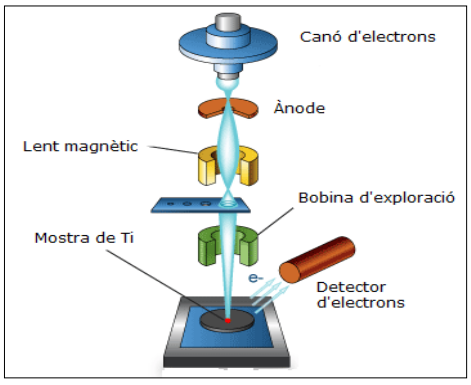


**Figura 19.** *Esquema d'un equip SEM. Adaptació(Joseph I. et al. 2003).*

### *2.5.3 Anàlisi química*

Per fer una anàlisi química de la composició de la mostra, s'utilitza l'espectroscòpia d'infrarojos per Transformada de Fourier és una tècnica que avalua la pèrdua d'energia d'un raig infraroig quan travessa una mostra.

L'espectroscòpia d'infrarojos es basa en el fet que els enllaços químics de les substàncies tenen freqüències de vibració específica. Quan els infrarojos travessen la mostra estimulen les molècules provocant la seva vibració, al vibrar les molècules absorbeixen energia a una longitud d'ona característica (Jesús

Cortés 2006). Finalment es traça un espectre de transmitància o d'absorbància que permet veure a quines longituds d'ona la mostra absorbeix l'infraroig, d'aquesta manera es pot analitzar els enllaços presents a la mostra analitzada i interpretar de quina substància es tracta (figura 20).

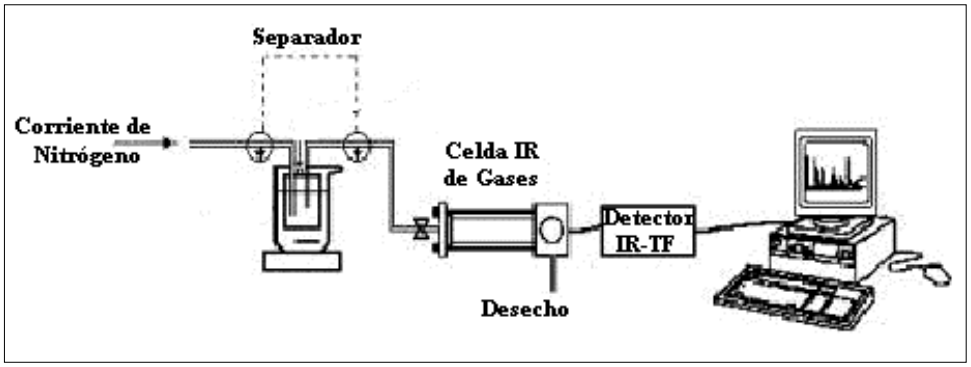


**Figura 20.** *Esquema de l'espectròmetre d'infraroig (M Gallignani et al. 2005).*

### *2.5.4 Espectroscòpia d'impedàncies*

L'espectroscòpia d'impedàncies és una tècnica que consisteix en la mesura de la impedància elèctrica que presenta un metall inserit en un medi aquós. La impedància és defineix com el quocient entre el potencial aplicat i la tensió mesurada a la sortida.

Si es fa una mesura d'impedàncies en un rang de freqüències adequat i es representen els resultats en uns eixos de coordenades, és possible relacionar els resultats amb les propietats físiques i químiques del material que s'està estudiant. Degut a que la impedància és un número complex es representa tan en coordenades cartesianes com polars, de la part real es calcula la conductància i de la part imaginària la capacitància (J. Vázquez Gutiérrez 2007).

La instrumentació que permet obtenir els espectres d'impedància d'un sistema electroquímic es basa en un potenciostat capaç de produir senyals a un rang de freqüències molt ampli. Aquest aplica el senyal elèctric generat a l'elèctrode de treball, immers dins la cel·la electroquímica, que dona una resposta que és mesurada pel potenciostat (figura 21).

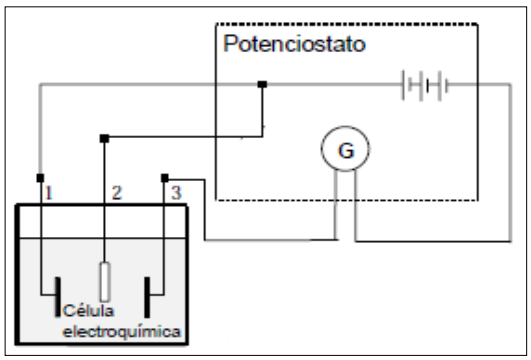


**Figura 21.** *Esquema de la instrumentació en estudis de EIS. Adaptació (D. Rodríguez 1999).*

Els números 1, 2 i 3 de la figura 21 corresponen a l'elèctrode de treball (mostra de titani), l'elèctrode de referència i el contra elèctrode de platí respectivament. Pel que fa a la inicial G, fa referència al generador de senyals.

# CAPÍTOL 3: MATERIALS I MÈTODES

En aquest capítol s'explica la metodologia emprada en cada procés, especificant els equips, materials i condicions de treball que s'han utilitzat.

## 3.1 Preparació de les mostres

Les mostres amb les que s'ha realitzat aquest projecte, són discos de titani comercialment pur de grau 2. S'han rebut com a barres de 10mm de diàmetre i han sigut tallades amb una talladora manual (Minirom, Struers) amb un gruix de 2mm. S'ha seguit el procediment detallat a continuació per tal de polir-les.

**Encastadora de mostres**

El primer que cal fer és embotir les mostres amb baquelita negre. Per fer-ho s'introdueixen 5 discos de titani per baquelita i es programa l'encastadora (LaboPress-3, Struers) amb una força de 150N, un temps d'escalfament de 6 minuts a una temperatura de 180ºC i un temps de refredament de 2 minuts.

**Figura 22.** *Encastadora de mostres.*

### Procés de polit

Aquest procés és necessari per tal d'assegurar que els resultats obtinguts es deuen als mètodes emprats per realitzar el recobriment i no queden emmascarats per les diferents rugositats que poden tenir les mostres al sortir del taller.

Un cop embotides les mostres a la baquelita, es procedeix a polir-les. Disposem d'una polidora automàtica (RotoPol-31, Struers) a la qual se li poden acoblar 6 baquelites, per iniciar el procés de polit s'introdueixen draps de carbur de silici (Buehler) amb mides de partícula diferents.

S'ha polit seguint el procediment especificat a continuació, seguint la norma ASTM E3-11 de preparació de mostres metàl·liques per metal·lografia (E3-11).

**Taula 3.** *Draps de polir, amb la mida de partícula corresponent i el temps de polit.*

| Drap de polir | Mida de la partícula (μm) | Temps aproximat (min) |
|---|---|---|
| **P600** | 25,8 | 10 |
| **P800** | 20 | 15 |
| **P1200** | 15,3 | 30 |
| **P2500** | 5 | 40 |
| **Vellut** | 1 | 30 |
| **Vellut** | 0,05 | 30 |

Els draps més gruixuts (P600 i P800) permeten eliminar els defectes produïts al tallar la barra de titani en discos. Quan la superfície és uniformes cal passar al drap P1200 que permet eliminar les ralles que puguin tenir les mostres, i finalment el drap P2500 per eliminar les ralles visibles al microscopi.

Finalment s'ha acabat el polit amb dues suspensions d'alúmina dissolta en aigua destil·lada per tal d'aconseguir l'efecte mirall desitjat, l'alúmina té una mida de gra de 1μm pel primer drap de vellut i de 0,05μm pel segon drap.

### Extracció de les mostres

A continuació es procedeix a l'extracció de les mostres de la baquelita. Es col·loca la baquelita a una mordassa i amb l'ajuda d'una serra manual es realitzen talls al pla frontal pròxims als discos de titani. Un cop els talls envolten la baquelita, cal fer palanca per tal que els discos de titani es desenganxin de la baquelita.

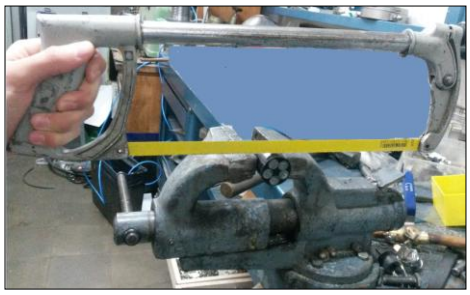

**Figura 23.** *Serra manual per extreure les mostres.*

### Neteja de les mostres

Un cop finalitzat el polit, i extrets els discos de les baquelites, es netegen les mostres per tal d'eliminar possibles impureses que restin a la superfície. Per fer-ho s'introdueixen els discos de titani dins un vas de precipitats de tal manera que quedin coberts amb les substàncies detallades a la taula 4.

**Taula 4.** *Dissolvents utilitzats per netejar les mostres.*

| Medi de neteja | Temps (min) |
|---|---|
| **Acetona** | 10 |
| **Etanol** | 10 |
| **Aigua destil·lada** | 10 |

El vas de precipitats s'introdueix dins un bany d'ultrasons (ultrasonic cleaner, BRASONIC) durant el temps especificat a la taula anterior.

## 3.2 Tractament d'electrodeposició

El tractament d'electrodeposició s'ha realitzat amb el potenciostat (Princeton Applied Research, Parstat 2273).

**Figura 24.** *Muntatge del potenciostat.*

En primer lloc es mesura el potencial de circuit obert del titani, fent servir com a referència un elèctrode de calomelans saturat (SCE). L'elèctrode de SCE es basa en la relació de mercuri i clorur de mercuri. És mante l'elèctrode de referència submergit en una solució saturada de clorur de potassi en aigua, per a tenir un potencial estable i conegut de +0,24V respecte l'elèctrode estàndard de referència d'hidrogen.

A l'exemple mostrat a la figura 25 s'obté un valor de -0,5V, a partir d'aquest valor de potencial obert, es força un potencial de -5V respecte el contra elèctrode de platí de 800mm$^2$ d'àrea. S'arriba al potencial definit a una velocitat de 0,1V/s, i es manté a aquest potencial durant 300 segons (Yuta Tanaka et al. 2007).

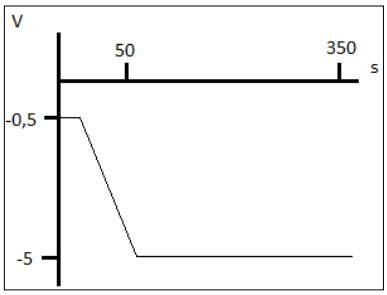


**Figura 25.** *Potencial aplicat Vs temps.*

A causa del camp elèctric aplicat, i com s'ha explicat al punt 2.4.1, el PEG dissolt a la solució migra elèctricament al càtode (disc de titani) i s'hi diposita.

**Preparació de la solució**

Els assajos electroquímics es realitzen amb immersió de les mostres de titani en una solució de 0,3mols/litre de clorur de sodi (NaCl) i una concentració en massa del 2% de PEG Jeffamina (Yuta Tanaka et al. 2007).

La solució es prepara en un vas de precipitats de 100ml, es disposa d'un volum inicial de 30ml d'aigua destil·lada. Es coneix que la massa molecular del clorur de sodi és de 58,49g/mol. Es realitzen els càlculs següents per determinar les quantitats necessàries de cada component.

$$30\ \text{ml}\ H_2O \cdot \frac{0,3\ \text{mols NaCl}}{100\ \text{ml}\ H_2O} \cdot \frac{58,4898\ \text{g NaCl}}{1\ \text{mol NaCl}} = 0,526\ \text{g NaCl} \quad (1)$$

$$30\ \text{ml}\ H_2O \cdot \frac{2\ \text{g PEG}}{100\ \text{ml}\ H_2O} = 0,6\ \text{g PEG} \quad (2)$$

Finalment es pesen les quantitats calculades, i es dissolen en 30 ml d'aigua destil·lada. Per assegurar que el PEG queda ben dissolt, es col·loca el vas de precipitats que conté la solució 15 minuts a un agitador magnètic tal com mostra la figura 26.

**Figura 26.** *Solució preparada a l'agitador magnètic.*

### Condicions de l'assaig

Les variables objecte d'estudi han sigut la concentració de PEG de la solució, i el temps del tractament. Pel que fa al potencial, s'ha vist en estudis previs (Yuta Tanaka et al. 2007) que el valor òptim per aquest tractament és de 5V, per tant en aquest aspecte no s'han realitzat diferents assajos.

Les diferents condicions estudiades pel que fa a la quantitat de PEG dissolt a la solució, han estat:

- Concentració en massa del 0,4% de PEG.
- Concentració en massa del 2% de PEG.

La duració del tractament d'electrodeposició és una variable que s'ha de tenir en compte. Per poder determinar el temps òptim, s'han fet assajos amb tres condicions diferents:

- Tractament d'electrodeposició durant 120 segons.
- Tractament d'electrodeposició durant 300 segons.
- Tractament d'electrodeposició durant 2 hores.

Tant per l'estudi de la concentració de PEG com pel temps de tractament, s'han estudiat tres mostres per a cada condició.

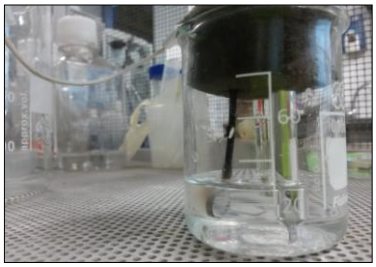

**Figura 27.** *Muntatge per l'electrodeposició.*

Finalment, per poder realitzar una comparació dels resultats i descartar que l'efecte esperat s'ha produït per una condició diferent a la desitjada, es preparen dos assajos addicionals:

- Es submergeix la mostra de titani a la solució que conté PEG amb una concentració del 2%, durant 24 hores, sense aplicar cap potencial.
- Es submergeix la mostra de titani en una solució sense PEG i s'aplica un potencial de 5V seguint el mateix procediment que a l'assaig inicial.

### *3.2.1 Mostres de titani*

Es realitza l'electrodeposició dels discos de titani un cop dut a terme tot el procés de polit (explicat al punt 3.1), abans cal preparar les mostres per poder-les submergir a la solució salina.

**Preparació de les mostres**

Per tal de poder realitzar el tractament amb èxit es prepara la unió elèctrica d'una mostra amb un cable conductor, cal assegurar que la connexió queda segellada per tal de tancar el circuit elèctric sense curtcircuits.

En primer lloc s'agafa un cable de coure, i es pelen els dos extrems, un dels extrems farà contacte amb el disc de titani i l'altre amb el circuit elèctric. A continuació es pinta la superfície de la mostra no polida amb pintura de plata per garantir un bon contacte elèctric.

Es prepara una resina Epoxi (Struers, VersoCit) que permetrà segellar la connexió, evitant el contacte amb la solució aquosa. La resina Epoxi és un polímer orgànic termostable que s'endureix al entrar en contacte amb un agent catalitzador, es tracta de barrejar *2-Hydroxypropyl methacrylate* (VersoCit Liquid) amb *acrylic cold mounting* (VersoCit Powder) (figura 28).

**Figura 28.** *Components VersoCit.*

A mesura que passen els minuts la resina es va tornant més viscosa. Cal esperar fins que obté la textura òptima i llavors es diposita sobre la superfície del disc de titani fins recobrir-la i aïllar per complet tot el cable. Finalment es deixa reposar la resina fins que es torna compacte (figura 29).

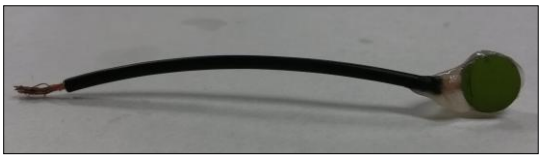

**Figura 29.** *Muntatge de la mostra.*

Per últim es comprova que el muntatge de la mostra s'ha realitzat correctament, es tracta de verificar l'existència del pas de corrent. És a dir, al aplicar corrent a un extrem del cable aquest es transmet fins arribar a la mostra. Aquesta comprovació es fa mitjançant un tester (figura 30).

**Figura 30.** *Comprovació del pas de corrent.*

Confirmat el pas de corrent, les mostres de titani es poden sotmetre al tractament d'electrodeposició.

### *3.2.2 Activació amb plasma*

L'activació per plasma s'ha realitzat amb un equip de plasma de baixa pressió i temperatura, amb formació de plasma per radio freqüència (13,56 MHz) (Santadard Plasma System Femto, Diener) .

**Figura 31.** *Equip de plasma utilitzat.*

La finalitat d'activar les mostres amb plasma abans de dur a terme el tractament d'electrodeposició, és incrementar la força d'adhesió que hi haurà entre el recobriment format i la superfície del titani. Com a resultat d'aquesta activació s'obté una superfície més reactiva, que permetrà una major formació d'enllaços amb el polímer i conseqüentment una major força d'adhesió.

L'activació per plasma consta de les etapes següents:

1. Buit inicial de la cambra, fins a obtenir una pressió baromètrica de 0,10mbar.
2. Entrada de gas, en aquest cas argó, durant 1 minut, mantenint la pressió a 0,40mbar.
3. Tractament de plasma a una potència de 100W durant 5 minuts.
4. Ventilació de la cambra fins arribar a la pressió atmosfèrica.

És recomanable comprovar que el procés del plasma s'està realitzant correctament. Per assegurar un correcte funcionament, la llum emesa pel plasma ha de tenir un color rosat, tal com es mostra a la figura 32.

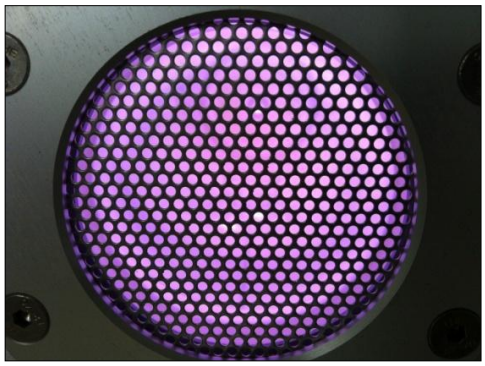

**Figura 32.** *Color característic del plasma*

Després d'activar les mostres, és segueix el mateix procediment (explicat al punt 3.2.1) per tal de poder-les submergir a la solució salina i sotmetre-les al tractament d'electrodeposició.

És important que es realitzi l'electrodeposició del titani immediatament després de l'activació per plasma, ja que estudis realitzats demostren que l'efecte aconseguit pel plasma es degrada amb el pas del temps.

## 3.3 Caracterització físico-química

En aquest apartat s'explica com s'ha caracteritzat el recobriment de polímer sobre els discos de titani. S'han realitzat diferents tècniques, la finalitat de les quals es resumeix a la taula 5.

**Taula 5.** *Tècniques de caracterització utilitzades amb la corresponent propietat mesurada.*

| Tècnica de caracterització | Propietat mesurada |
|---|---|
| **Angle de contacte** | Mullabilitat |
| **Interferometria i SEM** | Rugositat superficial |
| **FTIR** | Composició química |
| **EIS** | Corrent i impedància |

### *3.3.1 Mesura de la mullabilitat*

La mullabilitat de la superfície de les mostres s'ha obtingut mitjançant la determinació de l'angle de contacte amb un sistema de generació de gotes d'aigua ultra pura i el posterior anàlisi amb vídeo (Contact Angle System OCA15plus, Dataphysics). L'equip disposa d'una xeringa amb control de desplaçament micromètric que permet controlar el volum i la velocitat de la gota dipositada.

**Figura 33.** *Angle de contacte*

Per cada mostra s'han pres tres mesures, amb la finalitat de tenir una referència i poder establir una conclusió.

- Abans de realitzar el tractament d'electrodeposició, com a mesura control.
- Després de l'electrodeposició del polímer.
- Abans de realitzar qualsevol tècnica de caracterització, com a mesura per assegurar que el recobriment no s'ha degradat i continua tenint les mateixes característiques d'hidroficitat.

L'assaig s'ha realitzat amb les mateixes condicions per a cada mostra, el líquid dipositat ha estat aigua ultra pura (Milli-Q, Merck Millipore), amb un volum de 3µl i una velocitat de 1µl/s.

### *3.3.2 Anàlisi de la rugositat*

Per tal de determinar la morfologia i la rugositat de la superfície del recobriment, s'han utilitzat dues tècniques: interferometria de llum blanca, i l'equip de microscòpia electrònic de rastreig.

El primer assaig que s'ha realitzat ha estat amb l'interferòmetre de llum blanca (Wyko NT1100 Optical Profiling System, Veeco) i el seu anàlisi posterior amb el software Vision 4.10. Aquest interferòmetre ofereix diferents sistemes de mesura, s'ha utilitzat el sistema d'anàlisi VSI (*Vertical Scanning Interferometry*) ja que la superfície del recobriment obtingut és irregular.

**Figura 34.** *Interferòmetre de llum blanca.*

Els paràmetres utilitzats per cada una de les mesures es mostren a continuació:

**Taula 6.** *Condicions de treball del microscopi òptic interferomètric.*

| | **Paràmetres** |
|---|---|
| **Mode d'anàlisi** | VSI |
| **Objectiu utilitzat** | x5 |
| **Àrea d'estudi** | 1,244 x 0,946mm |
| **Longitud d'escaneig** | 12µm |
| **Velocitat d'escaneig** | x1 |
| ***Backscan*** | 5µm |
| **Nº d'escanejos/mesura** | 3 |

Per cada mostra de titani es calculen tres mesures de la rugositat, per tal de poder comparar i establir l'efecte del recobriment, s'ha estudiat una mostra per cada condició.

- Mostra Titani control.
- Mostra sotmesa a l'electrodeposició del polímer.
- Mostra coberta amb cinta adhesiva (Kapton) i sotmesa posteriorment al tractament d'electrodeposició. S'introdueix la cinta Kapton de manera que només la meitat de la mostra queda exposada al tractament (figura 36). Això permet veure amb claredat la zona intermèdia i el gruix del recobriment.

El procediment a seguir per calcular la rugositat de la superfície és el següent:

1. Buscar interferències que ocupin la major part de la mostra, fent que l'espai entre aquestes sigui el més ample possible. D'aquesta manera la imatge visualitzada a l'ordinador serà majoritàriament vermella.
2. Un cop localitzades les interferències es baixa la intensitat de la llum, fins que desapareixen les tonalitats vermelles.
3. Finalment es captura la imatge i el software avalua la rugositat de la superfície.

La segona de les tècniques utilitzada és el microscopi electrònic de rastreig (JEOL JSM-7001F, Oxford Instruments) del departament de Ciència de Materials i Enginyeria Metal·lúrgica (CMEM).

**Figura 35.** *Microscopi electrònic de rastreig.*

La configuració del microscopi que s'ha utilitzat ha estat un potencial d'acceleració de 20KV i una distància de treball de 10mm per a cadascuna de les imatges que s'ha obtingut.

S'han estudiat tres condicions diferents, analitzant 1 mostra per cada condició:

- Mostra Titani control.
- Mostra sotmesa a l'electrodeposició del polímer.
- Mostra coberta amb cinta adhesiva (Kapton) i sotmesa posteriorment al tractament d'electrodeposició. S'introdueix la cinta Kapton de manera que només la meitat de la mostra queda exposada al tractament (figura 36). Això permet veure amb claredat la zona intermèdia i el gruix del recobriment.

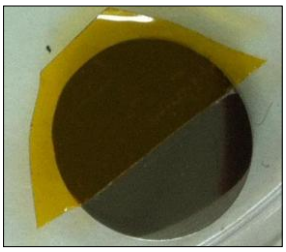

**Figura 36.** *Mostra amb la cinta Kapton*

El procediment que s'ha dut a terme per obtenir les mesures ha estat el següent:

1. S'enganxa la mostra sobre un suport metàl·lic i s'introdueix dins la cambra del SEM.
2. Es fa el buit de la cambra.
3. El feix d'electrons escombra la mostra i el senyal recollit dels electrons que reboten a la mateixa permet generar una imatge de la superfície a una molt elevada resolució.

### *3.3.3 Anàlisi química*

Per a l'anàlisi dels grups funcionals presents al polímer obtingut, s'ha utilitzat un espectròmetre infraroig per transformada de Fourier (Nicolet 6700 FT-IR, Thermo Scientific), amb un adaptador per a mesurar la reflectància total atenuada (ATR).

L'ATR emet un feix de llum sobre la superfície d'una mostra i mesura l'espectre infraroig que s'hi reflecteix. Per fer-ho utilitza un cristall de germani, que es posa en contacte amb la mostra (s'aplica pressió per assegurar un contacte total entre el cristall i la mostra). Totes les mesures s'han realitzat a 512 *scans* amb una amplada de banda de $2cm^{-1}$.

El primer que cal fer és realitzar una pastilla de bromur de potassi (KBr), per tal d'obtenir l'espectre de transmissió del polímer en qüestió (PEG) ja que el titani és opac als infrarojos. Per fer-ho es segueix el procediment següent:

1. S'introdueix aproximadament 1g de KBr en pols a un morter i s'hi afegeix la substància que es vol analitzar (PEG) amb una proporció aproximada 1:10.
2. Es tritura la mostra fins que s'obté una pols fina.
3. Es col·loca la pols obtinguda a una premsa. És important ser molt crític pel que fa a la quantitat de pols introduïda ja que si se'n posa en excés pot obstruir el pas del feix d'infrarojos, i si per contra se'n posa en defecte, la pastilla és susceptible a trencar-se.

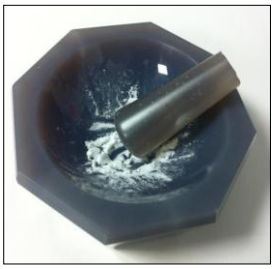

**Figura 37.** *Morter utilitzat per triturar el KBr i el PEG.*

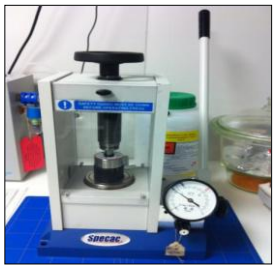

**Figura 38.** *Premsa per compactar la pastilla.*

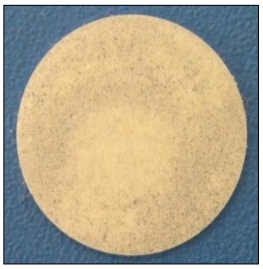

**Figura 39.** *Pastilla de Kbr i PEG*

En aquesta tècnica només s'estudien les mostres sotmeses al tractament d'electrodeposició, s'han estudiat dues mostres per poder fer l'anàlisi posterior.

Abans de realitzar l'espectre de la mostra tractada és necessari prendre una mesura anomenada *background*. Consisteix en fer una exploració sense introduir cap objecte que interfereixi el pas dels infrarojos, d'aquesta manera s'obté la composició química de l'aire.

### *3.3.4 Espectroscòpia d'impedàncies*

L'espectroscòpia d'impedàncies s'ha realitzat amb el potenciostat Princeton Applied Researh, Parstat 2273.

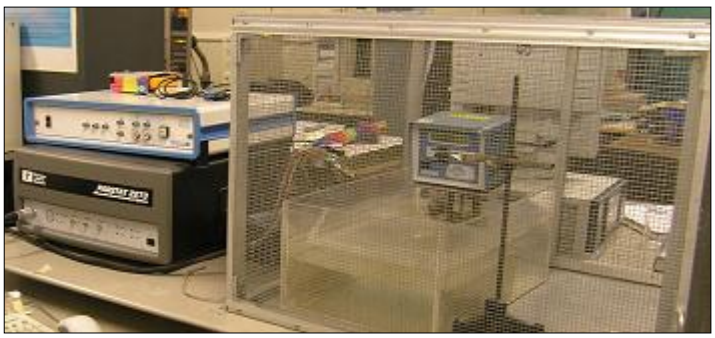

**Figura 40.** *Potenciostat utilitzat.*

Les mostres es preparen seguint el mateix procediment que el tractament d'electrodeposició (especificat al punt 3.2.1). Per realitzar aquesta tècnica es prepara una solució HBSS (Hank's Buffered Salt Solution), es tracta d'una solució salina amb continguts iònics similars al del plasma humà.

L'assaig es realitza imposant un potencial de 10mV, una freqüència inicial de 100KHz que anirà disminuint al llarg de l'assaig fins arribar a 10mHz. Aquest assaig té una durada aproximada d'una hora.

S'analitzen dues condicions i per cada condició s'estudien dues mostres per poder comparar-ne els resultats. Les condicions estudiades són les següents:

- Mostra de titani control.
- Mostra activada amb plasma i sotmesa al posterior tractament d'electrodeposició.

# 3.4 Caracterització biològica del recobriment

La caracterització biològica del recobriment, s'ha portat a terme mitjançant un assaig de citotoxicitat, un assaig d'adsorció de proteïnes i un assaig d'adhesió bacteriana.

## *3.4.1 Assaig de citotoxicitat*

L'objectiu d'aquest assaig és avaluar la toxicitat de les mostres, per fer-ho es mesura l'activitat de l'enzim lactat deshidrogenasa (LDH). Totes les cèl·lules contenen aquest enzim i l'alliberen quan són danyades.

Les cèl·lules utilitzades són fibroblasts humans (human foreskin fibroblasts, hFFb) ja que el recobriment que s'està estudiant està pensat per entrar en contacte amb el teixit tou de la geniva.

Per fer aquest assaig hi ha tres condicions diferents que s'especifiquen a continuació, i per cada condició s'estudien 3 mostres per tal de poder realitzar un anàlisi estadístic posterior.

- Mostra de titani polida.
- Mostra de titani després del tractament d'electrodeposició.

- Mostra activada amb plasma i sotmesa al posterior tractament d'electrodeposició.

A continuació es detalla el procediment a seguir per realitzar aquest assaig.

1. Immersió de les mostres en el medi de cultiu cel·lular

El primer que cal fer és esterilitzar les mostres. Per fer-ho es deixen 10min submergides en etanol i seguidament es fan dos rentats amb PBS per netejar-les. En segon lloc es fabrica un medi de cultiu que afavoreixi la viabilitat de les cèl·lules en qüestió. Es creen 50ml de medi, utilitzant les proporcions indicades a la taula 7.

**Taula 7.** *Composició del medi de cultiu utilitzat durant l'assaig*

| Components | Quantitat |
|---|---|
| **DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)** | 42,5ml |
| **FBS (Fetal Bovine Serum)** | 5ml |
| **Tampó d'HEPES** | 1ml |
| **Antibiòtic (penicil·lina)** | 0,5 ml |
| **L-glutamat** | 0,5 ml |
| **Piruvat de sodi** | 0,5 ml |

A continuació s'introdueixen 400µl de medi a cada una de les mostres, és important assegurar-se que queden totalment cobertes. Finalment es deixen a l'incubador a 37ºC durant 72 hores perquè alliberin els compostos solubles que contenen.

2. Sembrat de les cèl·lules

Per tal d'obtenir les cèl·lules (fibroblasts humans) i poder treballar amb elles, cal extreure-les del flascó on resten enganxades. Per fer-ho es xucla el medi cel·lular en el que es troben, i s'introdueix 2ml de tripsina prèviament escalfada per tal d'activar-la. La tripsina és un enzim que trenca els enllaços peptídics de les proteïnes mitjançant hidròlisi, per tant la seva funció és trencar les proteïnes d'unió entre els fibroblasts i el flascó.

**Figura 41.** *Flascó que conté fibroblasts humans.*

Quan la majoria de les cèl·lules s'han desenganxat de la superfície del flascó (s'observa amb l'ajuda d'un microscopi), es fan dos rentats amb el medi de cultiu creat amb la finalitat d'inhibir l'efecte de la tripsina. Seguidament s'extreu la dissolució del flascó i s'introdueix en un falcon, es centrifuga per tal que les cèl·lules precipitin.

Finalment s'espira el medi amb molta cura, i s'introdueix 2ml més de medi perquè les cèl·lules tornin ha estar en suspensió, la solució ja està preparada per fer el cultiu.

El pas següent és sembrar els fibroblasts introduint 50000cèl·lules/100µl de medi. Es conten les cèl·lules amb una cambra de Neubauer, aquest mètode conté un portaobjectes amb una quadrícula gravada, s'hi diposita una gota de dissolució de 10µl i es cobreix amb un cobreobjectes. Es porta el conjunt al microscopi i es conten les cèl·lules que conté cada quadrant de la cambra (figura 42).

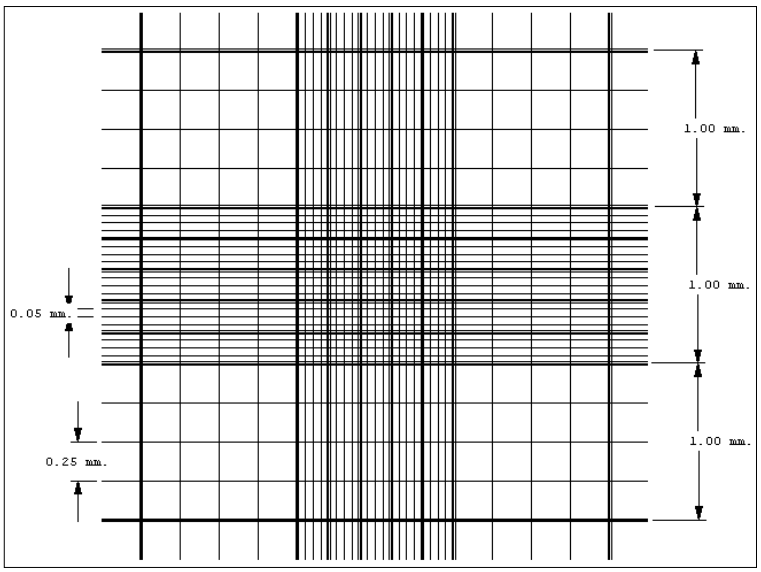


**Figura 42.** *Cambra de Neubauer.*

Es sembren un total de 48 pouets, i es deixen 24 hores a l'incubador per tal que les cèl·lules s'adhereixin a la superfície d'aquest.

3. Posar el medi de les mostres en contacte amb les cèl·lules

Cal preparar 5 dilucions: 1:1, 1:2, 1:10, 1:100 i 1:1000, del medi que ha estat en contacte amb les mostres. A continuació, afegim 100µl de cada dilució al pouet que conté les cèl·lules sembrades i es deixen a l'incubador 24 hores. Les concentracions que caldrà afegir per fer les diferents dilucions es mostren a la taula 8.

**Taula 8.** *Concentracions utilitzades en cada dilució*

| Factor de dilució | Medi de cultiu (µl) | Medi en contacte amb les mostres (µl) |
|---|---|---|
| **1:1** | 0 | 400 |
| **1:2** | 200 | 200 |
| **1:10** | 360 | 40 |
| **1:100** | 396 | 4 |
| **1:1000** | 999 | 1 |

En cas que el recobriment preparat tingui algun efecte citotòxic, les dilucions permeten determinar a partir de quina concertació es produeix aquest efecte.

4. Lisat de les cèl·lules

Per tal d'avaluar l'activitat de les cèl·lules, es procedeix a la mort d'aquestes afegint 100µl de M-PER (*Mammalian Protein Extraction Reagent*) que provoca el trencament de la membrana cel·lular i la conseqüent alliberació del seu contingut al medi. S'introdueix el pouet al congelador a -80ºC.

5. Mesura de l'activitat de l'enzim LDH

El text LDH permet estimar quantitativament la citotoxicitat de la mostra estudiada mitjançant la mesura de lactat deshidrogenasa (LDH) alliberat per les cèl·lules danyades. Es vol doncs conèixer la concentració d'aquest enzim per determinar el percentatge de cèl·lules que han sobreviscut i poder establir, a partir d'una fórmula matemàtica, el percentatge de supervivència cel·lular.

Per mesurar l'activitat de l'enzim LDH es disposa del *Kit de detecció de Citotoxicitat Roche*. L'oxidació permet la reducció del $NAD^+$ a NADH com a conseqüència es produeix la reacció del tetrazoli a sal de formazan. Aquest últim compost dóna un color vermellós a la dissolució.

**Figura 43.** *Alliberació del LDH.*

Per preparar la reacció, s'introdueixen 5,74ml d'una solució de sal de tetrazoli amb 127,5µl de catalitzador. S'afegeix 100µl d'aquesta solució a cadascun dels

pouets amb les cèl·lules lisades. Deixem actuar durant 10 minuts i afegim una solució que conté àcid clorhídric per tal d'aturar la reacció.

Posteriorment es mesura l'absorbància mitjançant un espectrofotòmetre a 440nm, i a partir del resultat es calcula el percentatge de supervivència cel·lular amb l'equació 3.

$$\%\ \text{supervivència} = \frac{\text{Abs}_{\text{experimental}} - \text{Abs}_{\text{control negatiu}}}{\text{Abs}_{\text{control positiu}} - \text{Abs}_{\text{control negatiu}}} \quad (3)$$

### *3.4.2 Adsorció de proteïnes*

Per avaluar les propietats *antifouling* del recobriment s'ha realitzat un assaig d'adsorció de proteïnes amb un marcatge fluorescent, l'adhesió de proteïnes marca la posterior resposta bacteriana.

Per poder observar la quantitat de proteïnes absorbides es realitza una tinció amb una substància fluorescent, amb l'ajuda d'un *kit de tinció* (Pierce FITC Antibody Labeling, ThermoScientific). Aquest kit conté isotiocianat de fluoresceïna (FITC), un tampó de borat (0.67 M), resina de purificació, columnes per la purificació i embuts de filtració per centrifugació.

Per fer aquest assaig hi ha tres condicions diferents que s'especifiquen a continuació, i per cada condició s'estudien dues mostres.

- Mostra de titani polida.
- Mostra de titani després del tractament d'electrodeposició.
- Mostra activada amb plasma i sotmesa al posterior tractament d'electrodeposició.

El procediment a seguir per determinar l'adhesió de la proteïna (albúmina) sobre el recobriment (PEG) consta de les etapes següents.

1. Preparació de la dissolució de proteïna.

En primer lloc s'ha de fer una dissolució de la proteïna que es vol estudiar, en aquest cas, l'albúmina. Per fer-ho es dissolen 2mg de BSA (albúmina d'origen boví) en 925µl de PBS i 75µl de tampó de borat.

2. Tinció de la proteïna

A continuació cal tenyir la proteïna per tal que sigui visible al microscopi de fluorescència. S'afegeixen 0,5ml de la dissolució preparada a un vial de FITC (proporcionat pel kit, conté el fluoròfor) i es deixa reposar 1 hora a temperatura ambient perquè reaccioni. Cal protegir la solució de la llum, ja que el fluoròfor es degrada.

3. Eliminació de l'excés de fluoròfor

Un cop passada l'hora, s'ha d'eliminar l'excés de fluoròfor que no ha reaccionat. Per fer-ho es filtra la dissolució amb una resina de purificació (figura 44). Per accelerar el procés de filtració es centrifuga la dissolució durant 1 minut (Centrifuge 5415R, Eppendorf), s'introdueixen els filtres en posicions oposades per tal d'evitar una descompensació.

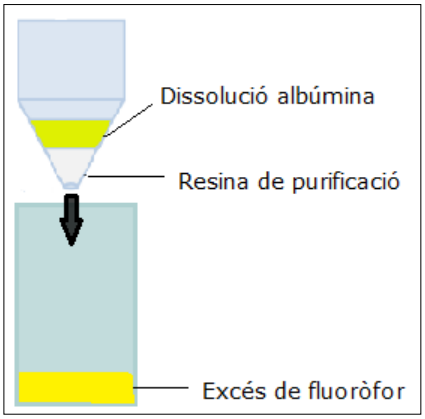


**Figura 44.** *Esquema del procés de filtració.*

Finalment es fa una estimació de la concentració de proteïnes que conté la dissolució (equació 4), per fer-ho es calcula l'absorbància amb dues longituds d'ona, de 280 i 495nm.

$$\%\ \text{de proteïna} = \frac{A_{280} - \left(A_{495} \cdot CF\right)}{\text{coeficient d'extinció molar}} \cdot \text{factor de difusió} \qquad (4)$$

On CF és la relació de $A_{280}$ entre $A_{495}$,.

4. Immersió de les mostres

Per la immersió i posterior adhesió es necessita una dissolució controlada d'albúmina tenyida. Es prepara una dissolució de 100µg/ml de proteïna tenyida en PBS, a continuació s'introdueixen 200µl/mostra per tal que les mostres quedin cobertes i es deixa reposar durant 1 hora, protegit de la llum.

5. Fixació de les proteïnes adsorbides

Un cop s'ha fet la immersió de les mostres, cal fixar les proteïnes. En primer lloc és imprescindible fer 3 rentats de 5 minuts amb PBS, a continuació es submergeixen les mostres 30 minuts en una solució 1:4 de *Paraformaldehid* (PFA) amb PBS. Finalment es fan 2 rentats amb una solució de glicina amb PBS a una concentració de 1,5µg/ml.

6. Preparació de les mostres

Per tal de poder observar les mostres al microscopi de fluorescència és necessari col·locar-les en un portaobjectes, i protegir-les amb un cobreobjectes. Per tal de realitzar aquest pas amb èxit, s'introdueixen 8µl de *Mowiol* a la superfície de cada mostra.

**Figura 45.** *Introducció del Mowiol. sobre la mostra.*

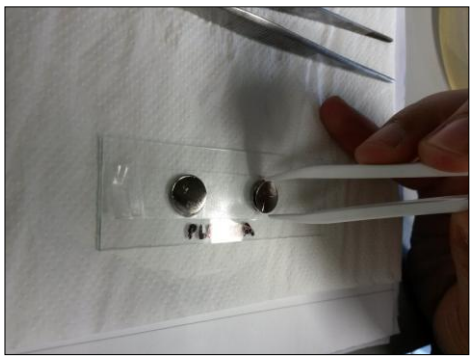

**Figura 46.** *Col·locació del cobreobjectes.*

7. Observació de les proteïnes adsorbides

L'observació de les mostres es fa amb un microscopi de fluorescència (Nikon, Eclipse E600) amb un filtre per tal d'emetre radiació ultraviolada i una càmera (Olympus, DP72).

El microscopi es mostra a continuació:

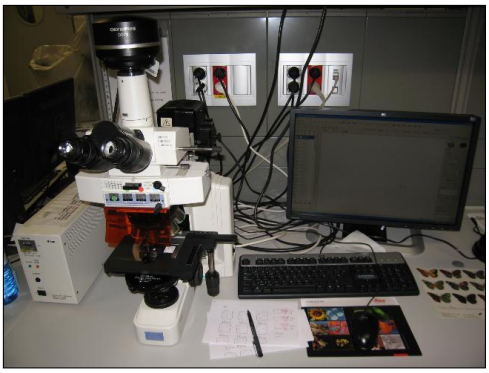

**Figura 47.** *Microscopi de fluorescència.*

### *3.4.3 Adhesió bacteriana*

Aquest assaig indica el número de bacteris adherits a la superfície de les diferents mostres estudiades, això permetrà avaluar l'eficiència del tractament aplicat. S'han utilitzat dues soques bacterianes, *Streptococcus Sanguinis* i *Lactobacillus Salivarius,* sembrades en medi de cultiu sòlid específic per cada soca. *Lactobacillus Salivarius* es sembra en plaques d'agar amb medi de cultiu Man-Rogosa-Sharpe (MRS) i *Streptococcus Sanguinis* es sembren en plaques d'agar amb medi de cultiu Told-Hewitt.

S'ha realitzat aquest assaig amb diferents condicions, i per cada condició s'han estudiat dues mostres.

- Mostra control
- Mostres polides i sotmeses al tractament d'electrodeposició.
- Mostres polides, activades amb plasma i sotmeses al tractament d'electrodeposició.
- Mostres polides, activades amb plasma, sotmeses al tractament d'electrodeposició i a la posterior funcionalització amb la unió d'un pèptid.

Els passos a seguir per realitzar un assaig d'adhesió bacteriana es detallen a continuació.

1. Preparació i esterilització del medi de cultiu.

El medi de cultiu és una solució que conté els nutrients necessaris pel correcte desenvolupament de la vida bacteriana. S'introdueixen 52g/l de medi MRS o 36,4g/l de medi Todd-Hewitt en aigua destil·lada, segons la soca a estudiar. Per esterilitzar el medi s'introdueix a l'autoclau durant 30 minuts a 121ºC.

2. Preparació de les plaques de cultiu.

S'utilitza les mateixes proporcions que el medi de cultiu, però s'afegeixen 1g/l d'agar. A continuació s'esterilitza el medi preparat i immediatament després s'aboca a les plaques de petri. Un cop l'agar a solidificat, es guarden les plaques a 4ºC fins al moment de sembrar.

3. Preparació d l'inòcul.

Es tracta de mesclar colònies de bacteris amb el medi de cultiu preparat. Les quantitats varien en funció del número de mostres que té l'assaig, cal tenir en compte que per cada mostra necessitarem 1ml d'inòcul. Es deixa l'inòcul tota la nit a l'incubador (37ºC).

4. Dilució de l'inòcul.

Es dilueix l'inòcul fins que s'obté una absorbància de 0,2 amb l'ajuda d'un espectrofotòmetre (SHIMADZU, UV 1240) amb una longitud d'ona de 600nm. Aquesta absorbància equival a una concentració de $10^8$ bacteris/ml i és conegut que amb aquesta concentració els bacteris es troben a la fase estacionaria de creixement.

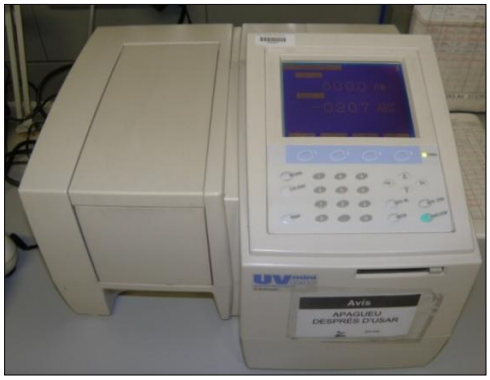

**Figura 48.** *Espectrofotòmetre.*

5. Immersió de les mostres.

En primer lloc s'introdueixen les mostres 10 minuts amb etanol per tal d'esterilitzar-les i se'ls hi fa dos rentats amb PBS estèril. A continuació s'afegeix 1ml del inòcul diluït, i es deixen a l'incubadora (37ºC) durant dues hores.

6. Sembrat dels bacteris.

Passades les dues hores, es treuen les mostres de l'incubadora, se'ls hi fa dos rentats amb PBS per eliminar els bacteris que no s'han adherit a la superfície. S'introdueixen les mostres dins un falcon que conté 1ml de PBS, i s'agiten amb un vòrtex durant 5 minuts, per tal que els bacteris adherits es desenganxin.

Amb una pipeta s'extreuen 100µl de la dissolució sotmesa al vòrtex i s'introdueixen a un eppendorf que conté 900µl de PBS (D1, amb un factor de dissolució 1:10 respecte la inicial). A continuació s'extreuen 100µl de la D1 i s'introdueixen a un *eppendorf* que conté 900µl de PBS (D2, amb un factor de dissolució 1:100) es repeteix aquest procediment per la D3 i per D4, amb factor de dissolució 1:1000 i 1:10000 respectivament (figura 49).

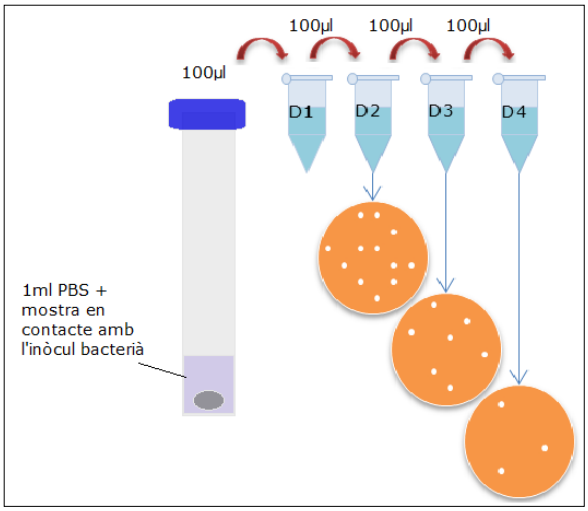


**Figura 49.** *Procés seguit per preparar les dilucions.*

Per a cada dilució (D2, D3 i D4) es sembren dos plaques de petri, introduint 100µl a cada una i repartint el fluid per tota la placa (figura 50). Es deixen reposar entre 24 i 48 hores, en funció de la soca bacteriana.

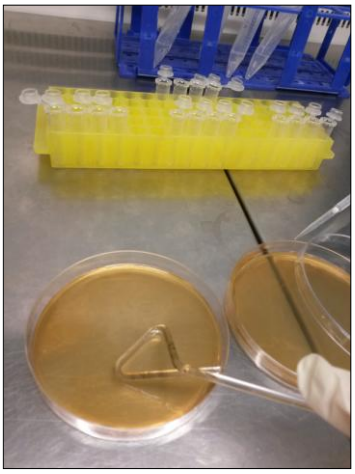

**Figura 50.** *Repartició del fluid pel medi de cultiu.*

7. Recompte de bacteris

Finalitzat el sembrat, es vol saber el nombre de bacteris que hi ha a la superfície de la mostra. Es conten les dilucions que tenen entre 30 i 300 colònies de bacteris, a partir d'aquí s'introdueixen els valors en un Excel i amb l'ajuda d'un gràfic s'extreuen conclusions.

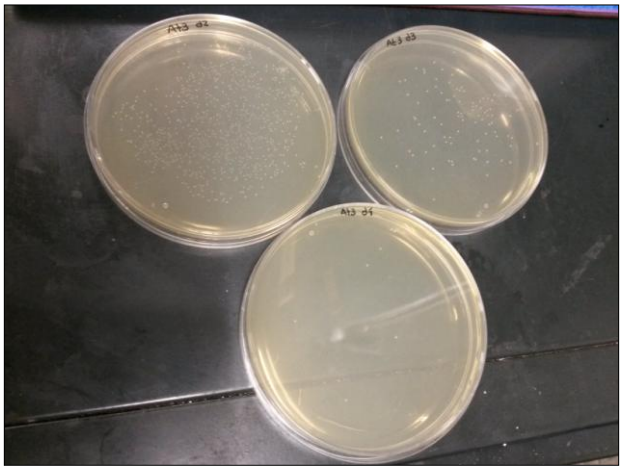

**Figura 51.** *Dilució 1, 2 i 3 un cop finalitzat l'assaig d'adhesió.*

En el cas de la figura 51 caldria contar la dilució 2 (a dalt a la dreta) ja que és la que conté entre 30 i 300 colònies de bacteris. Mentre que la dilució 1 conté més de 300 colònies i la dilució 3 menys de 30.

El material utilitzat durant aquest assaig es mostra a la figura 52.

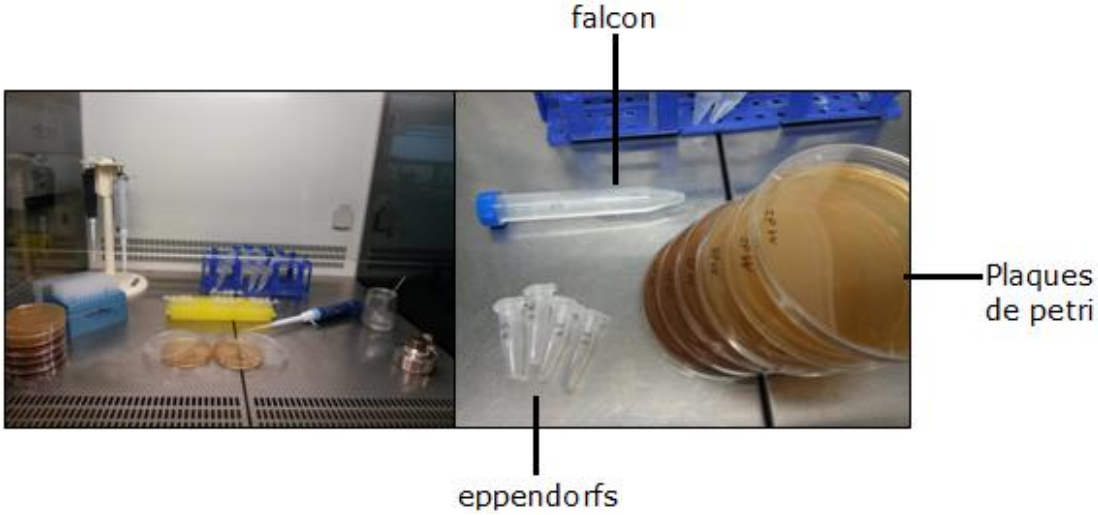


**Figura 52.** *Material utilitzat durant l'assaig de bacteris.*

# 3.5 Funcionalització del recobriment

S'entén per funcionalitzar el procés de revestir la superfície de la mostra tractada amb una molècula bioactiva, anomenada pèptid.

Els pèptids són biomolècules formades per la unió d'aminoàcids mitjançant l'enllaç peptídic, aquest enllaç s'estableix entre el grup carboxil (-COOH) del primer aminoàcid i el grup amina ($-NH_2$) del segon aminoàcid. El que diferència els pèptids de les proteïnes és el número d'aminoàcid que el conformen, quan el nombre d'aminoàcids és major que 100, es parla de proteïnes.

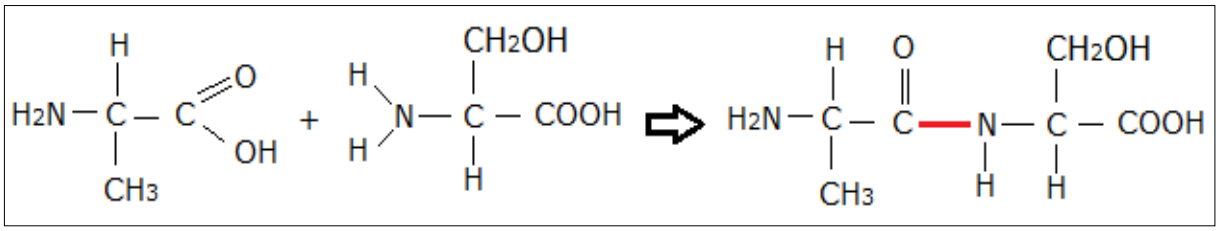

**Figura 53.** *Formació de l'enllaç peptídic.*

El pèptid utilitzat en aquest projecte ha estat sintetitzat a la UPC per l'investigador Carles Mas. Es tracta d'unir el pèptid sintetitzat a la superfície del titani tractat amb l'ajuda d'una molècula *crosslinker*. El pèptid presenta la següent estructura:

- Ancoratge: és l'element que permet la unió del pèptid a la superfície de l'implant, en aquest cas és el tiol (HS).
- L'espaiador: proporciona la distància requerida entre l'ancoratge i la seqüència del pèptid.
- Lligand: pèptid específic.

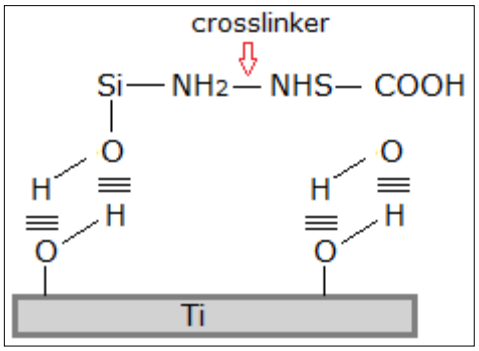


**Figura 54.** *Unió del pèptid a la mostra.*

A la figura 54, s'observa la unió del pèptid amb la superfície de la mostra, on el Silà (Si) s'uneix al titani (Ti) perquè reacciona amb el grup hidroxil de la superfície d'aquest. L'extrem $NH_2$ del silà no reacciona amb el tiol (SH) del pèptid, és per aquest motiu que s'afegeix el *crosslinker.*

Per tal de funcionalitzar el recobriment, s'uneix un pèptid a la superfície de la mostra tractada. Cal seguir el procediment detallat a continuació:

1. Rentat de les mostres

En primer lloc s'introdueixen les mostres en un vas de precipitats que conté aigua destil·lada durant cinc minuts al bany d'ultrasons. A continuació se'ls hi fa tres rentats amb etanol i tres amb acetona.

2. Introducció del *crosslinker*

Per tal de que el pèptid s'uneixi a la superfície de la mostra es necessita un *crosslinker* (N-succinimidyl-3-maleimidopropionate) proporcionat pel laboratori amb estat de pols. Es mesclen 2mg del *crosslinker* amb 10 ml de dissolvent, en aquest cas s'utilitza DFM (N-dimethylformamide).

S'introdueixen les mostres dins un recipient de vidre, s'hi diposita la dissolució preparada i es deixa 1 hora a l'agitador magnètic.

3. Afegir el pèptid

Passada 1 hora, es retiren les mostres del recipient, i se les sotmet a un procés de rentat: 3 rentats amb el dissolvent utilitzat (DMF), 1 rentat amb acetona, 3 rentats amb aigua destil·lada, 3 amb etanol i per acabar 3 amb acetona, finalment es sequen les mostres amb nitrogen.

Es prepara la solució amb el pèptid, tenint en compte que es necessiten 100µl de solució/mostra i que la dilució ha de ser de 1:5. S'utilitzen per 4 mostres, 80µl de pèptid mesclats en 320µl de PBS amb un pH de 6,5 (s'afegeix àcid clorhídric a la solució inicial de PBS fins obtenir el pH desitjat).

Per acabar es diposita una gota de 100µl de la solució preparada a cada mostra i es deixa reposar fins l'endemà.

# CAPÍTOL 4:

# RESULTATS I DISCUSSIÓ

## 4.1 Preparació de les mostres

Després de seguir el procediment explicat a l'apartat anterior (punt 3.1) el resultat obtingut són discos de titani perfectament polits, amb l'efecte mirall desitjat.

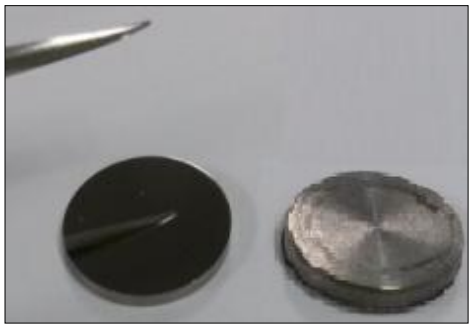

**Figura 55.** *Esquerre: mostra polida amb l'efecte mirall, dreta: mostra sense polir.*

## 4.2 Tractament d'electrodeposició

Pel que fa al tractament d'electrodeposició, s'han tingut en compte dues variables: el temps del tractament i la concentració de poli(etilenglicol) de la solució on es submergien les mostres.

Pel que fa al potencial aplicat, estudis anteriors (Yuta Tanaka et al. 2007) han demostrat que el potencial òptim per aquest tractament és de 5V, i per tant no s'ha cregut necessari considerar diferents valors del potencial.

### Efecte del temps

La duració del tractament d'electrodeposició és una variable que s'ha de tenir en compte. Per poder determinar el temps òptim, s'han fet assajos amb tres condicions diferents:

- Tractament d'electrodeposició durant 120 segons.
- Tractament d'electrodeposició durant 300 segons.
- Tractament d'electrodeposició durant 2 hores.

Per avaluar els resultats s'ha estudiat l'evolució de l'angle de contacte de les mostres després de realitzar el tractament d'electrodeposició.

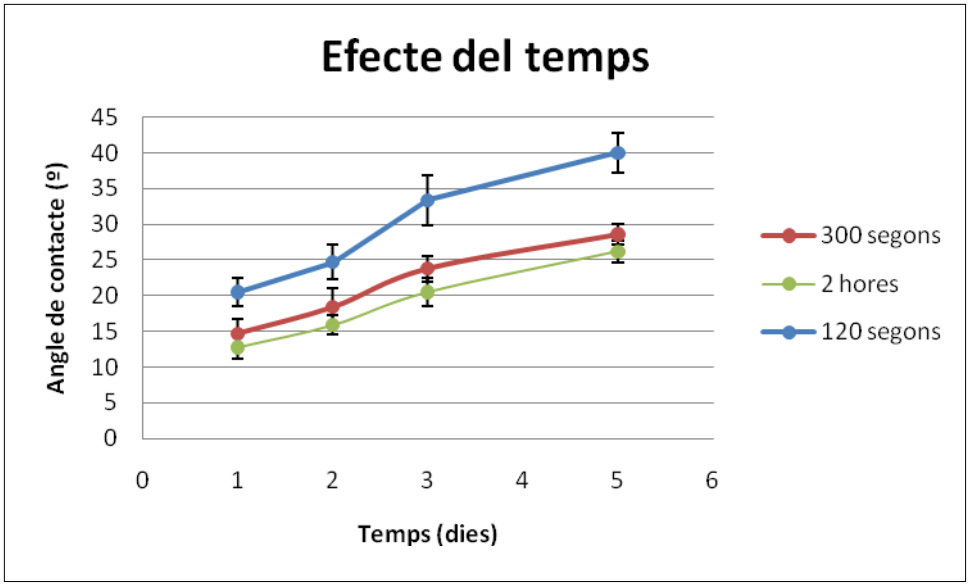


**Figura 56.** *Evolució de l'angle de contacte amb els temps, en funció de la duració del tractament d'electrodeposició.*

S'ha vist que el temps que dona millors resultats és el de 5 minuts, ja que un temps inferior és insuficient perquè s'enllaci el recobriment, i un temps superior no suposa una millora dels resultats. Referent a les desviacions estàndards que presenten cada una de les condicions, les més altes son les corresponents a 120 segons. Això indica una major variabilitat dels resultats entres les diferents mostres, degut a que el temps de tractament no és suficient perquè el polímer s'uneixi a la superfície de la mostra.

### Efecte de la concentració de PEG

S'ha estudiat quina és la concentració òptima de poli(etilenglicol) que ha de tenir la solució, per tal d'assegurar uns bons resultats del recobriment de la superfície del titani.

S'han avaluat dues concentracions:

- Concentració en massa del 0,4% de PEG.
- Concentració en massa del 2% de PEG.

Pel que fa al valors de la intensitat mesurats pel potenciostat durant el tractament d'electrodeposició, no hi ha diferencies significatives entre les dues concentracions estudiades (figura 57).

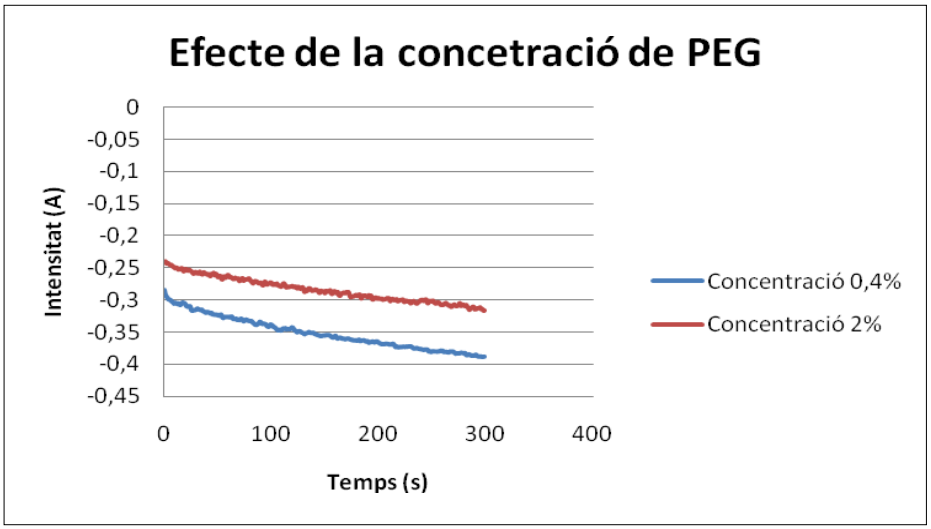


**Figura 57.** *Intensitat de corrent durant l'electrodeposició.*

A priori sembla que la concentració de PEG que conté la solució no serà determinant per confirmar la presència del recobriment sobre la superfície del titani. Però aquest anàlisis no és suficient per arribar a una conclusió, ja que durant el tractament d'electrodeposició s'aplica un potencial i s'avalua la intensitat que hi ha en funció del temps transcorregut, per tant la composició de la solució no influeix de manera directe en aquesta mesura.

El que s'ha fet per avaluar l'efecte de les concentracions esmentades, és realitzar una seguiment de l'evolució de l'angle de contacte amb el pas del temps (figura 58). Cal especificar que la primera mesura (dia 0) correspon a l'instant després del tractament d'electrodeposició.

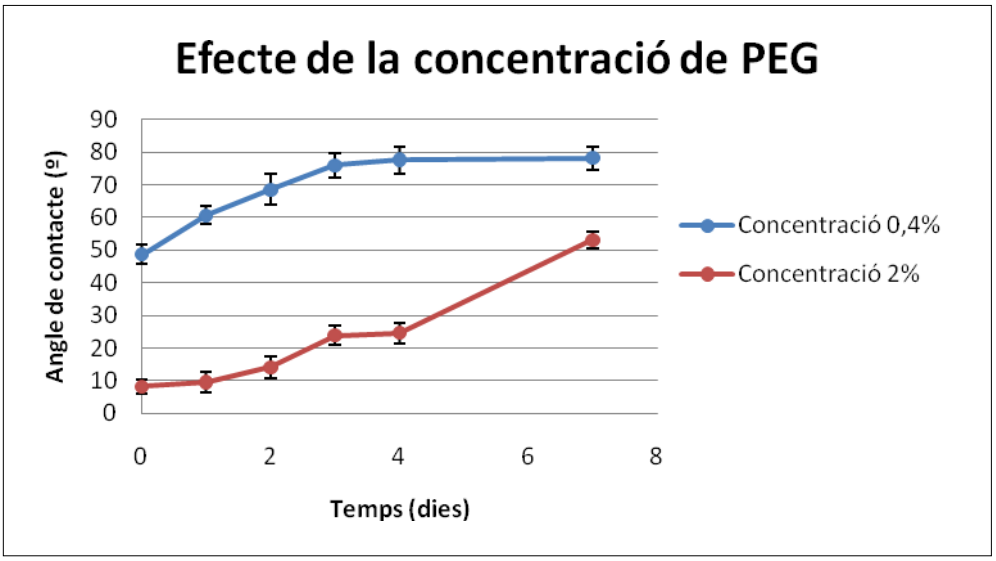


**Figura 58.** *Evolució de l'angle de contacte amb el temps, en funció de la concentració de PEG que conté la solució.*

Com s'observa a la figura 58 en el cas de les mostres que s'han sotmès al tractament d'electrodeposició amb la solució de 0,4% de PEG, tot i que hi ha una disminució significativa de l'angle de contacte respecte una disc de titani no tractat, passats 2 dies de l'electrodeposició aquest angle recupera els valors inicials, per tant no es pot considerar que s'hagi creat un recobriment sobre la superfície de la mostra. La disminució de l'angle de contacte l'instant després de sotmetre la mostra al tractament d'electrodeposició pot ser causada per un efecte de neteja de la superfície i no del recobriment del polímer esperat.

Per contra, les mostres que han estat tractades amb una solució de 2% de PEG, presenten mesures hidrofíliques fins passada una setmana del tractament d'electrodeposició. Per tant, la concentració òptima de la solució durant el tractament d'electrodeposició serà del 2% en massa de PEG Jeffamina.

**Condicions addicionals de l'assaig**

Per poder realitzar una comparació dels resultats i descartar que l'efecte esperat s'ha produït per una condició diferent a la desitjada, es preparen dos assajos addicionals:

- Es submergeix la mostra de titani a la solució que conté PEG amb una concentració del 2 %, durant 24 hores, sense càrrega elèctrica.
- Es submergeix la mostra de titani en una solució sense PEG i s'aplica la càrrega elèctrica seguint el mateix procediment que a l'assaig inicial.

Igual que en el cas anterior, per avaluar-ne els resultats s'estudia l'evolució de l'angle de contacte amb el pas del temps (figura 59). La primera mesura (dia 0) correspon a la mostra polida, a partir del dia 1 les mostres s'han sotmès a les condicions esmentades.

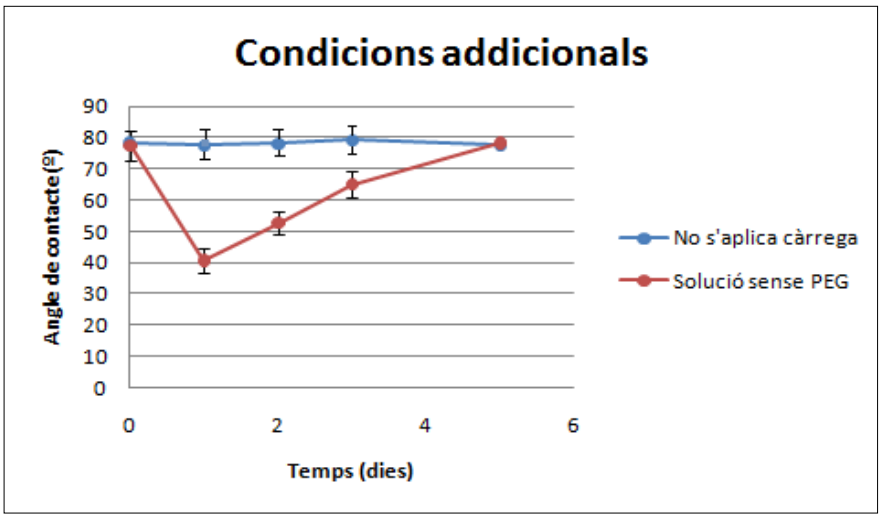


**Figura 59.** *Evolució de l'angle de contacte amb el temps, per les diferents condicions.*

Tal i com s'observa a la figura 59, en el cas de les mostres submergides a una solució que conté PEG però que no se li aplica cap càrrega, l'angle de contacte no varia.

En el cas de les mostres sotmeses al tractament d'electrodeposició submergides en una solució que no conté PEG, a priori l'angle de contacte disminueix significativament però passats 5 dies recupera els valors inicials. Això ens fa pensar que la disminució de l'angle de contacte després del tractament és degut a un efecte de neteja de la superfície provocat pel corrent aplicat.

Finalment, es pot afirmar que l'efecte obtingut es deu al tractament d'electrodeposició.

### *4.2.1 Mostres de titani*

Les mostres de titani polides i sotmeses al tractament d'electrodeposició, mantenen unes mesures de l'angle de contacte hidrofíliques (inferiors a 50º) durant aproximadament 10 dies. El fet que transcorregut aquest període de temps els valors de l'angle augmentin fins arribar a 70º, fa pensar que el recobriment és molt fi i per això es degrada amb un curt termini de temps.

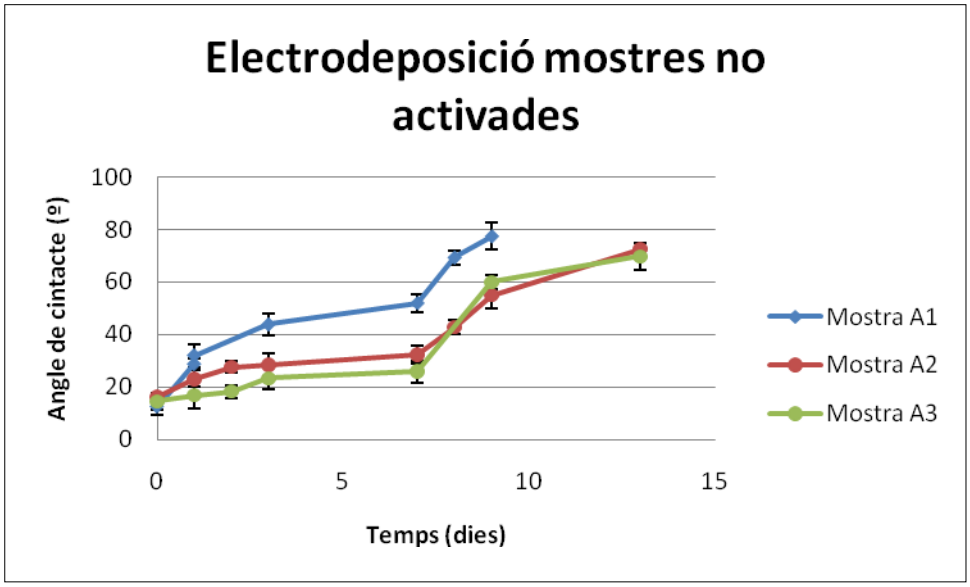


**Figura 60.** *Evolució de l'angle de contacte després del tractament d'electrodeposició.*

Les mostres A1, A2 i A3 de la figura 60 són tres mostres de titani polides que s'han sotmès al tractament d'electrodeposició sota les mateixes condicions. El motiu pel qual es representen tres mostres, és per poder estudiar l'evolució de l'angle de contacte, i per veure que les tres mostres segueixen la mateixa tendència.

### *4.2.2 Activació amb plasma*

Aquest tractament té dos efectes diferents sobre la superfície del titani, en primer lloc serveix per netejar la superfície de la mostra fent augmentar considerablement la seva hidroficitat, i en segon lloc, promou la formació de grups –OH a la superfície del titani que reaccionen amb l'$H_2O$ de l'angle de contacte i formen ponts d'hidrogen.

**Comparativa mostres de titani i mostres activades**

A continuació es mostra un gràfic (figura 61) on s'observa l'efecte d'activar amb plasma les mostres de titani sobre els valors de l'angle de contacte, un cop efectuat el tractament d'electrodeposició.

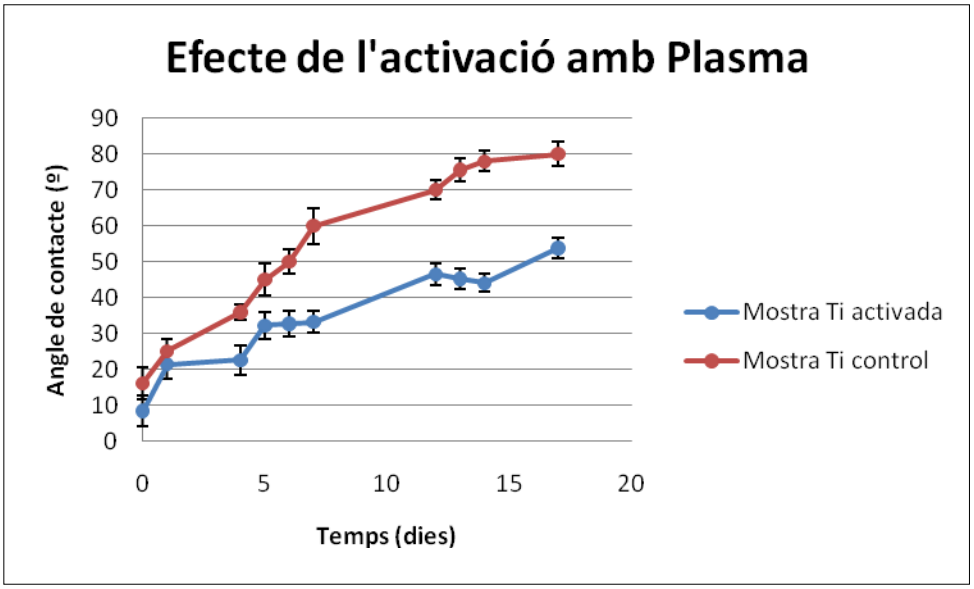


**Figura 61.** *Evolució de l'angle de contacte entre mostres de titani i mostres activades amb plasma després de l'electrodeposició.*

Pel que fa a la mostra de titani activada, l'angle de contacte manté uns valors acceptables (inferiors a 50º) durant més de 10 dies. Fet que indica que els grups amino ($NH_2$) dels extrems del PEG Jeffamina han format enllaços amb els grups -OH de la superfície de la mostra originats per l'activació de plasma.

Per tant es pot afirmar que les mostres activades amb plasma afavoreixen al recobriment de la superfície.

# 4.3 Caracterització físico-química

Un cop determinades les condicions òptimes del tractament d'electrodeposició, s'estudien les variacions de la mullabilitat, la rugositat superficial i l'anàlisi químic dels discs de titani no tractats, els tractats amb una concentració de PEG del 2% i finalment els que s'han sotmès a una activació amb plasma abans del tractament d'electrodeposició.

## *4.3.1 Mesura de la mullabilitat*

S'ha estudiat la mullabilitat dels recobriments obtinguts, a partit de mesures de l'angle de contacte. S'analitza la mesura presa un dia després de sotmetre les mostres al tractament d'electrodeposició i es compara amb una mostra de titani contol.

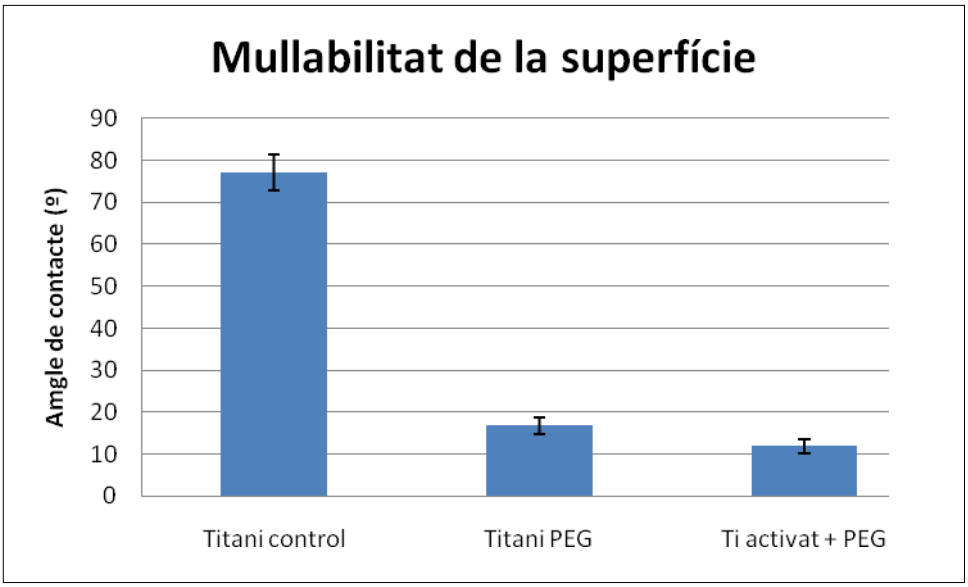


**Figura 62.** *Mesures de l'angle de contacte de les diferents condicions de tractament.*

La figura 62 reflexa la diferencia de l'angle de contacte entre les mostres no tractades i les sotmeses al tractament d'electrodeposició. Tal i com es pot observar, les mostres tractades presenten mesures més hidrofíliques. També cal considerar la disminució de la desviació estàndard de les mostres tractades, això indica que gairebé no hi ha variabilitat entre mesures, pot ser un efecte de la presència del recobriment.

Pel que fa a les mostres amb plasma i sense plasma, la diferència és irrellevant ja que es mostren mesures preses el dia després de l'electrodeposició.

A continuació es mostren les imatges obtingudes de l'angle de contacte, per observar de manera visual la diferència que presenta la mullabilitat de la superfície per cada condició (figura 63).

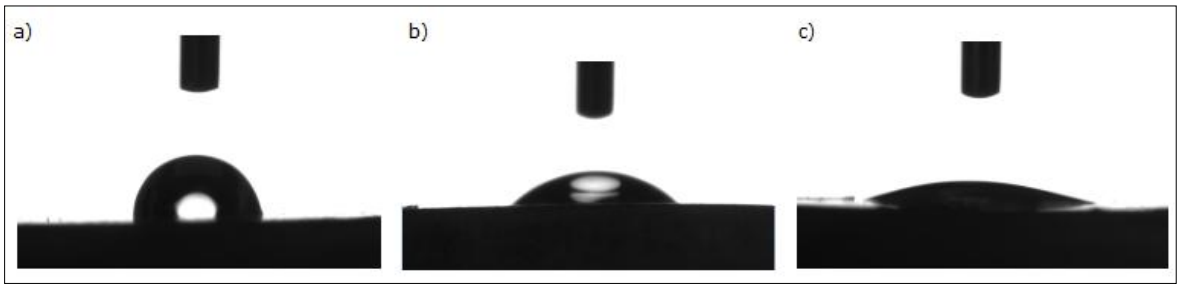


**Figura 63.** *Mullabilitat de la superfície de Titani.*

Les imatges a, b i c de la figura 63, corresponen a una mostra de titani control, una mostra de titani amb PEG i una mostra de titani activada amb plasma + PEG, respectivament. Es pot observar l'augment de la hidrofilicitat que presenten les mostres, degut a la formació d'una capa de PEG.

### *4.3.2 Anàlisi de la rugositat*

**Interferometria de llum blanca**

A continuació es mostren les mesures de rugositat que s'han obtingut per a cada tractament.

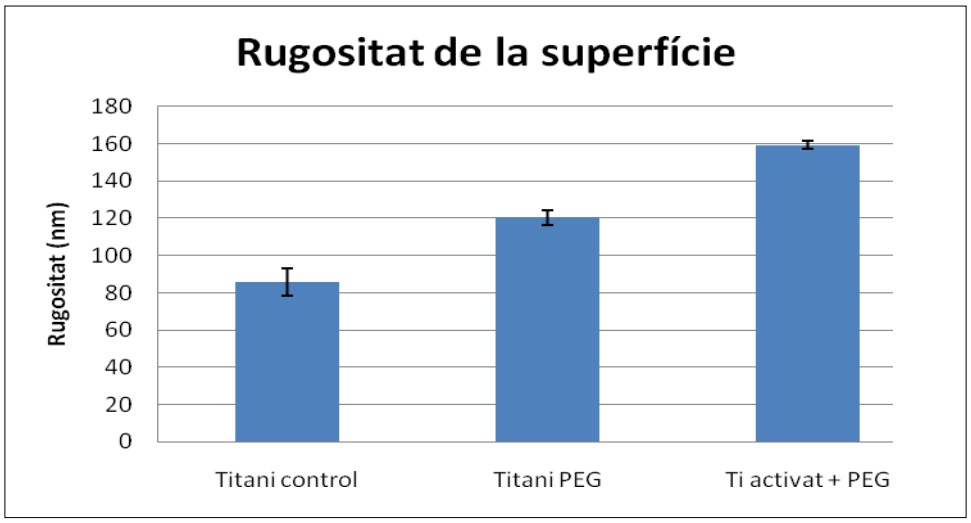


**Figura 64.** *Mesura de la rugositat de les mostres control i les mostres tractades.*

Es pot observar diferencies significatives de rugositat entre les mostres de titani control i les mostres tractades, degut a que el recobriment de PEG no és totalment homogeni. També cal tenir en compte la disminució de la desviació estàndard de les mostres tractades, que indica que les mesures entre diferents mostres tenen resultats similars.

La diferencia entre les mostres que s'han tractat amb una solució del 2% de PEG i les que s'han activat amb plasma prèviament, es deu a que el recobriment en les segones mostres és més sòlid i té un gruix major i per tant fa que la superfície sigui més irregular.

A la figura 65 s'aprecia la variació de la superfície que presenten les diferents mostres.

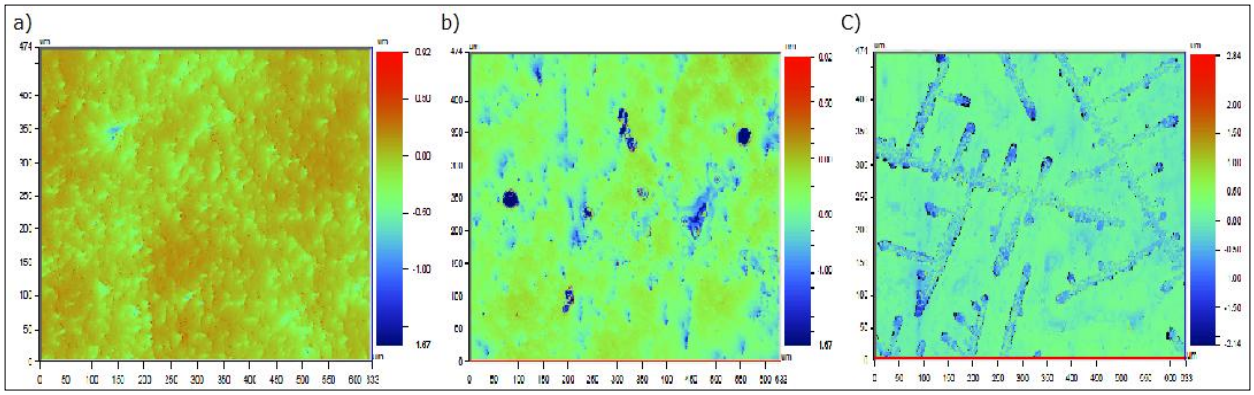


**Figura 65.** *Rugositat de les mostres mesurades amb l'interferòmetre.*

## Microscopi electrònic de rastreig (SEM)

El microscopi electrònic de rastreig, permet avaluar la rugositat a partir de les imatges obtingudes. Cal dir que totes les imatges que es mostren s'han pres a 500 augments, la barra blanca a la imatge indica una longitud de 10μm.

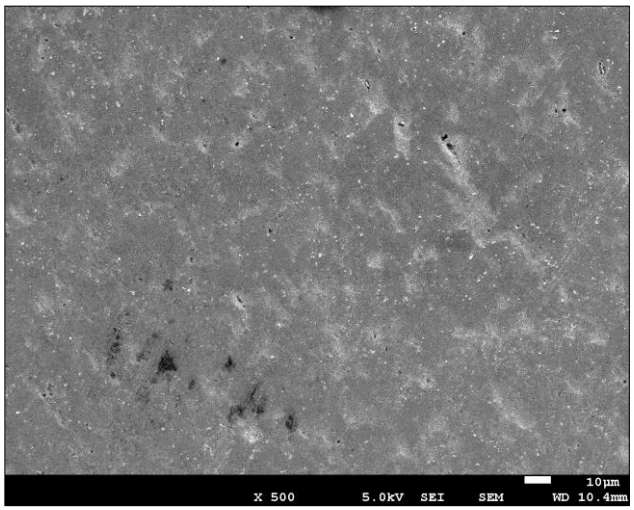


**Figura 66.** *Mostra titani control.*

La figura 66 correspon a una mostra de titani control, és a dir no s'ha sotmès a cap tractament. A la imatge es pot observar que la superfície és força llisa malgrat que hi ha imperfeccions, degudes a errors durant el procés de polit.

A continuació es mesura una mostra la meitat de la qual s'ha cobert amb una cinta i s'ha sotmès al tractament d'electrodeposició. La finalitat de cobrir la meitat de la mostra és determinar el gruix del recobriment.

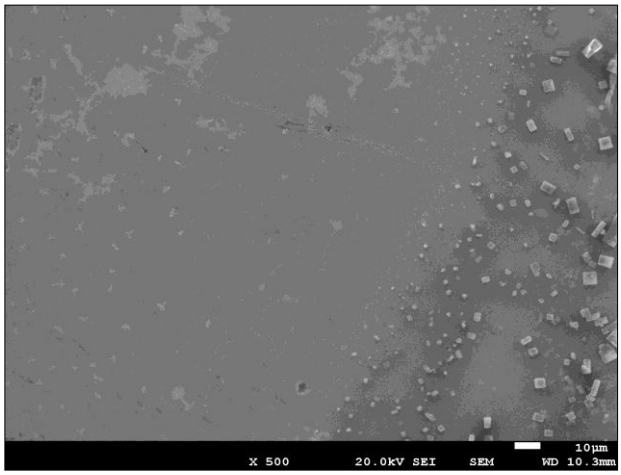


**Figura 67.** *Franja mitja de la mostra (zona esquerre:titani tractat, zona dreta: titani control).*

Malgrat que s'aprecia clarament la franja que divideix la mostra entre la part de titani tractada i la part que es considera titani control, no es pot determinar el gruix del recobriment ja que és una capa molt fina (d'escala nanomètrica) i l'instrument utilitzat no permet detectar dimensions tan petites.

Observant la figura 67 se sap que la part de l'esquerre és la part tractada ja que hi ha irregularitats causades per la presència del polímer. A la part dreta de la imatge (titani control) s'aprecien uns cristalls que s'associen a residus de la cinta kapton ja que es pot distingir la forma clarament.

Finalment es mostra la imatge obtinguda d'una mostra activada amb plasma i sotmesa al posterior tractament d'electrodeposició.

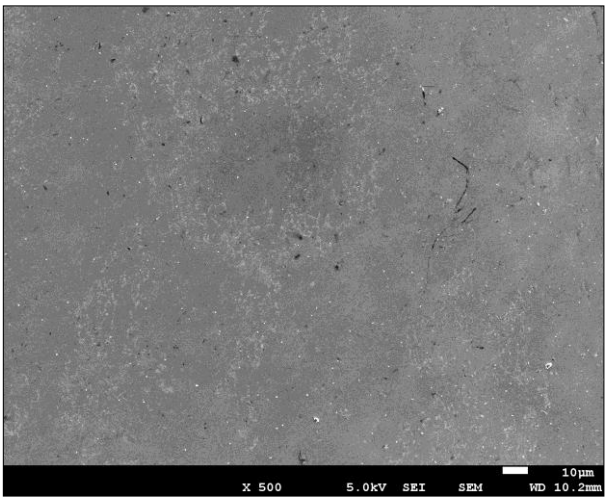


**Figura 68.** *Mostra titani activat amb plasma*

Pel que fa a la figura 68, igual que la imatge anterior es pot afirmar la presencia del recobriment ja que la superfície no és uniforme.

### *4.3.3 Anàlisi química*

El mètode ATR s'ha utilitzat per contrastar la presència dels enllaços químics esperats. Els pics característics del PEG corresponen a nombres d'ona entre 2900 i 3000 $cm^{-1}$ i entre 900 i 1100 $cm^{-1}$ que fan referència als enllaços C-H i C-O respectivament.

S'ha analitzat una mostra de titani activada amb plasma i sotmesa al posterior tractament d'electrodeposició. Tot i que al gràfic de l'espectre resultant hi ha poques bandes d'interès, és suficient per afirmar que existeix una unió entre la mostra de titani i el PEG ja que aquestes bandes corresponen nombres d'ona característics dels PEG (figura 69).

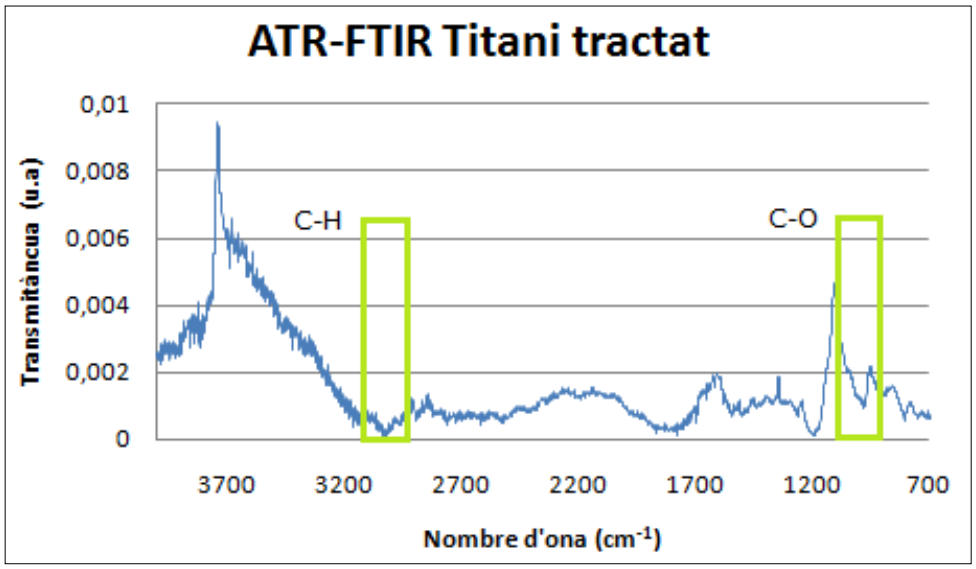


**Figura 69.** *Espectre de la mostra de titani amb poli(etilenglicol).*

A l'espectre obtingut de la mostra tractada es poden observar amb claredat els pics característics del PEG, per tant aquesta tècnica també confirma la presència del recobriment.

Per altre banda, els enllaços N-H dels terminals $NH_2$-PEG-$NH_2$ corresponen a nombres d'ona aproximats de 1645cm$^{-1}$, i els enllaços C-N corresponen aproximadament a 1557 cm$^{-1}$ (Yuta Tanaka et al. 2008). A continuació s'ha ampliat la zona de l'espectre entre 1700 i 1200 cm$^{-1}$ (figura 70) i s'ha comparat amb els resultats obtinguts en estudis realitzats anteriorment (figura 71).

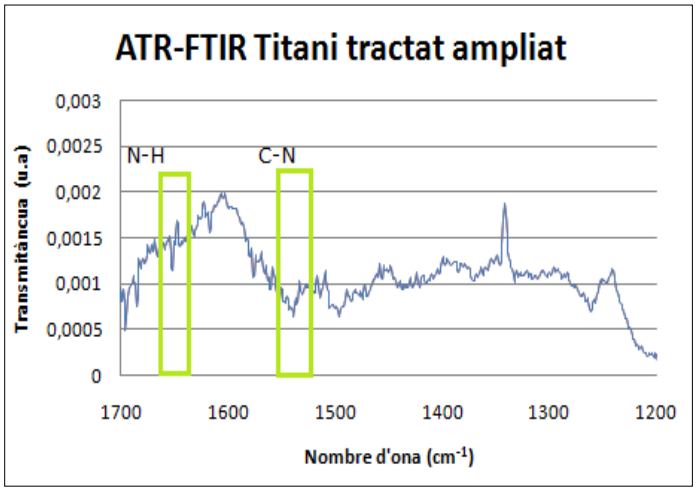


**Figura 70.** *Espectre de la mostra amb la zona d'interès ampliada.*

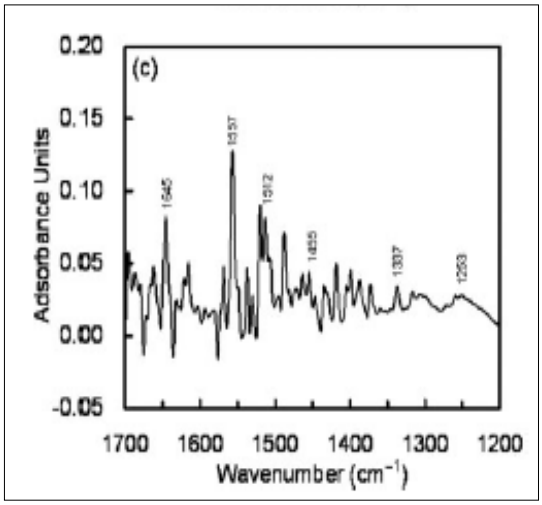


**Figura 71.** *Espectre FTIR (Yuta Tanaka et al. 2008).*

Els espectres presenten similituds pel que fa a la posició dels pics característics.

### *4.3.4 Espectroscòpia d'impedàncies*

Mitjançant l'anàlisi de l'evolució de la impedància amb la freqüència, és possible simular el comportament del metall en el medi d'HBSS.

Per poder interpretar els resultats obtinguts és necessari modelar un circuit equivalent, específic per a cada condició de treball. En el cas de les mostres no tractades, el circuit equivalent que millor s'ajusta és el que es mostra a la figura 72, on R1 és la resistència deguda a la solució d'HBSS , C1 i R2 la capa porosa d'òxid de titani i finalment CPE1 i R3 la capa d'òxid de titani (figura 73).

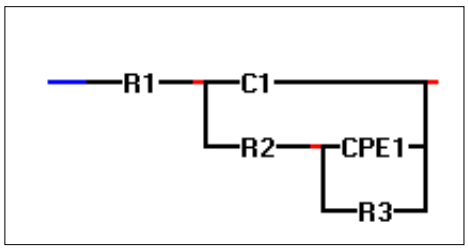


**Figura 72.** *Model d'ajust d'impedàncies per la mostra de titani.*

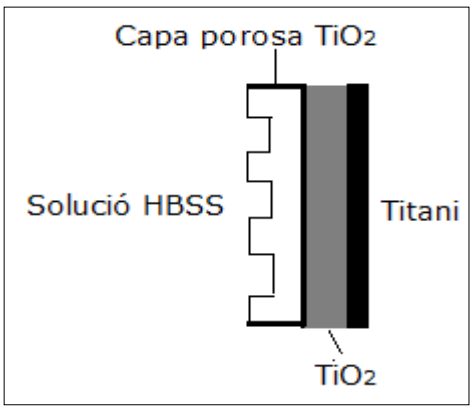


**Figura 73.** *Doble cada d'òxid de titani.*

Pel que fa a les mostres sotmeses al tractament d'electrodeposició, s'ha de complicar el circuit degut a la presència de la capa de PEG adherida a la superfície (figura 74 i 75), on R1 és la resistència deguda a la solució d'HBSS, C1 i R2 el recobriment format, C2 i R3 la capa porosa d'òxid de titani i finalment CPE1 i R4 la capa d'òxid de titani.

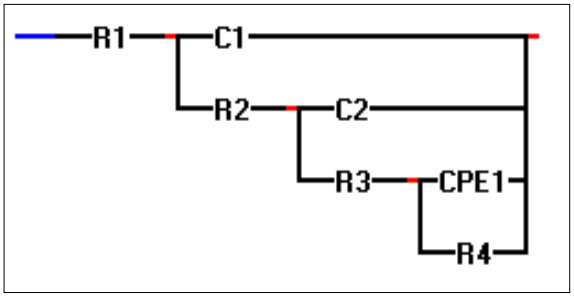


**Figura 74.** *Model d'ajust d'impedàncies per la mostra tractada.*

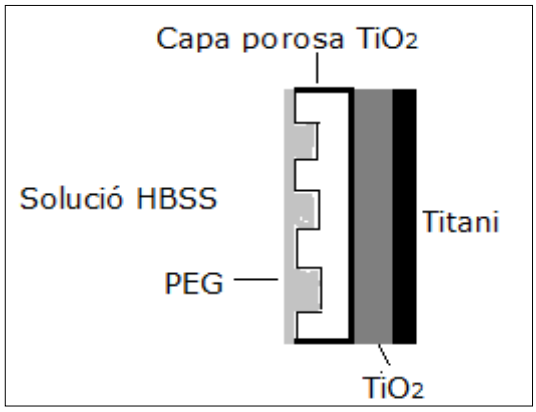


**Figura 75.** *Doble cada d'òxid de titani i capa de PEG.*

Un cop modelats els circuit equivalents, es realitzen simulacions amb un ajust no lineal mitjançant un software d'anàlisi d'EIS, amb la finalitat d'ajustar els valors obtinguts. Els valors de la impedància que presenten les mostres de titani són molt elevats, això indica una molt elevada resistència a la corrosió (D. Rodríguez 1999).

Els valors utilitzats per realitzar un bon ajust de l'espectre experimental pel que fa a la resistències oposada pel titani (R2, R3 i R4) ha estat de l'ordre de 10MΩ, mentre que la resistència deguda a la solució d'HBSS (R1) té un valor molt inferior, aproximadament de 100Ω, ja que és un fluid que conté ions conductors.

Els valors obtinguts després de realitzar l'ajust es mostren a la taula 9.

**Taula 9.** *Valors obtinguts del model equivalent d'impedàncies.*

| Paràmetres | Mostra control | Mostra tractada |
|---|---|---|
| **C1** | $1{,}82 \cdot 10^{-6}$ F | $7{,}57 \cdot 10^{-10}$ F |
| **C2** | - | $5{,}88 \cdot 10^{-6}$ F |
| **R1** | 97,25 Ω | 84,967 Ω |
| **R2** | 80,81 Ω | 155,63 Ω |
| **R3** | $4{,}5 \cdot 10^{5}$ Ω | 68,16 Ω |
| **R4** | - | $5{,}99 \cdot 10^{5}$ Ω |
| **CPE1** | $1{,}27 \cdot 10^{-5}$ F | $9{,}67 \cdot 10^{-6}$ F |
| **Valor de la fase CPE1** | 0,82 | 0,88 |

Els valors que corresponen a la capa de PEG són C1 i R2 (mostra tractada), de la taula 9. Comparant els valors de la capa porosa d'òxid de titani (C1 i R2 de la mostra control i C2 i R3 de la mostra tractada) hi ha una clara diferència entre les dos mostres, això indica la presència del recobriment.

A continuació es mostren els gràfics obtinguts després de realitzar els circuits equivalents amb els ajustos corresponents. Els dos primers gràfics de la figura 76 (a i b) fan referència a l'eix imaginari, mentre que els dos últims gràfics (c i d) fan referència a l'eix real.

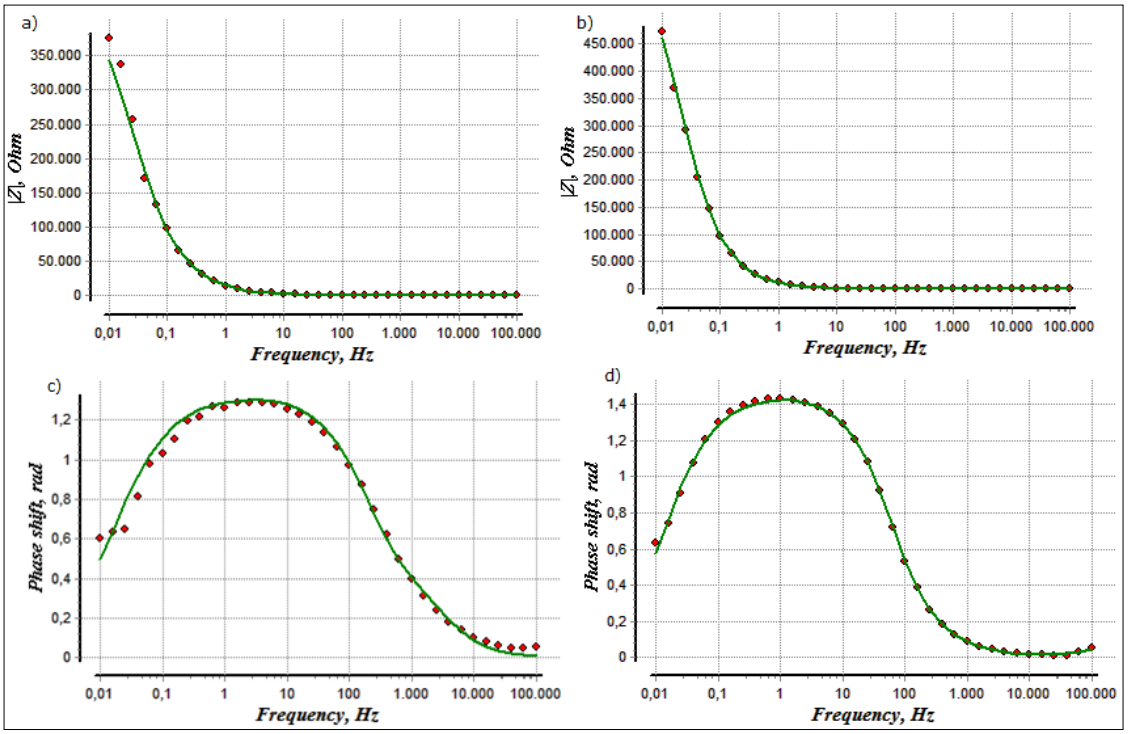


**Figura 76.** *Ajust de l'espectre (imatges esquerre: titani control, imatges dreta: titani tractat).*

Es pot apreciar la diferència dels espectres de les mostres de titani control i les mostres tractades. Pel que fa a les mostres de titani control (a i c) el valor del mòdul de la impedància (|Z|) presenta un increment proporcional a la reducció de la freqüència aplicada en l'assaig (Sandro Báez et al. 2004). La resposta de la fase en la mostra tractada (figura 76d) disminueix ràpidament a les freqüències de l'ordre de 100Hz, el que la diferencia del comportament de les mostres no tractades. Aquest resultat i el model equivalent que les representa, suggereixen la presència d'una capa de polímer sobre la superfície de titani (Jerónimo Agrisuelas 2008) (C. Cabrielli et al. 2000).

## 4.4 Caracterització biològica del recobriment

A continuació es mostren els resultats dels assajos realitzats per tal de determinar el caràcter biològic del recobriment.

### *4.4.1 Assaig de citotoxicitat*

En aquest assaig es comprova que el recobriment produït no causi reaccions citotòxiques a l'organisme, per dur a terme aquest assaig s'avalua la supervivència de les cèl·lules fibroblàstiques.

**Taula 10.** *Supervivència de les cèl·lules per cada dilució estudiada.*

| | **Supervivència (%)** | | |
|---|---|---|---|
| | Titani control | Titani PEG | Ti activat + PEG |
| **Dilució 1** | 99 ± 12 | 70 ± 16 | 74 ± 29 |
| **Dilució 1:2** | 94 ± 9 | 58 ± 23 | 90 ± 37 |
| **Dilució 1:10** | 89 ± 23 | 76 ± 10 | 72 ± 14 |
| **Dilució 1:100** | 91 ± 25 | 77 ± 24 | 94 ± 21 |
| **Dilució 1:1000** | 95 ± 29 | 87 ± 30 | 92 ± 34 |

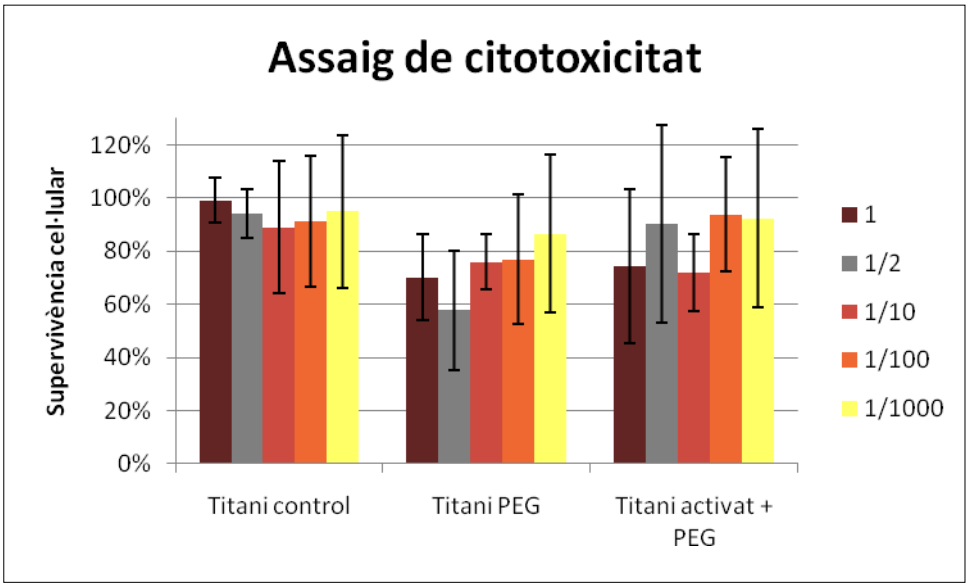


**Figura 77.** *Supervivència de les mostres per cada dilució estudiada*

Un assaig amb resultats excel·lents presentaria una elevada supervivència (valors pròxims a 100%), uniforme per totes les dilucions, mentre que l'assaig d'una substància citotòxica tindria valors molt baixos per la primera dilució (valors inferiors a 40% de supervivència) amb tendència a augmentar en cada dilució.

La taula 10 i la figura 77 mostren el percentatge de supervivència cel·lular després de realitzar l'assaig de citotoxicitat. Pel que fa als valors del titani control els percentatges de supervivència de la dilució 1 són pròxims a 100%, com era

d'esperar, ja que el titani és un material biocompatible. En el cas de les mostres amb el recobriment de PEG i les prèviament activades amb plasma s'observen valors de supervivència superiors al 70%, exceptuant la dilució 1:2 de les mostres de titani electrodepositades degut a un error sistemàtic a la hora de realitzar l'assaig. Es considera que per valors superiors al 60-70% de supervivència cel·lular, el material en qüestió no presenta citotoxicitat.

En cap cas s'observa un efecte citotòxic del recobriment ja que no hi ha relació directe entre la dilució aplicada i el percentatge de supervivència de les cèl·lules.

### *4.4.2 Adsorció de proteïnes*

El caràcter *antifouling* dels recobriments de PEG es pot determinar mitjançant l'adsorció de proteïnes. Aquest assaig permet quantificar l'adsorció d'albúmina, a partir de la intensitat de les imatges obtingudes amb el microscopi de fluorescència.

Després de realitzar l'assaig, s'han visualitzat les mostres amb el microscopi de fluorescència i els resultats no han estat els esperats ja que en cap cas s'ha pogut apreciar la proteïna. S'ha repetit l'assaig, però els resultats obtinguts han sigut els mateixos que els de l'assaig anterior.

El fet que en cap de les mostres dels dos assajos realitzats (mostra de titani control, mostra sotmesa al tractament d'electrodeposició, i mostra activada amb plasma i sotmesa al mateix tractament d'electrodeposició) s'apreciï l'albúmina, fa pensar que no s'ha comès un error experimental sinó que algun dels reactius utilitzats, probablement el responsable de tenyir la proteïna, no estava en bon estat.

Degut a aquest imprevist i donada la limitació temporal del projecte, no ha estat possible solucionar el problema en aquest experiment i per tant, només es mesurarà l'efecte *antifouling* a partir dels assajos d'adhesió bacteriana.

### *4.4.3 Adhesió bacteriana*

Per mesurar l'efecte *antifouling* del polímer, s'ha avaluat l'adhesió bacteriana sobre el recobriment obtingut. Aquests assajos s'han realitzat segons el procediment detallat a l'apartat 3.4.3, utilitzant dues soques bacterianes.

**Lactobacillus Salivarius**

Un cop realitzat l'assaig d'adhesió es conten les colònies formades de *Lactobacillus Salivarius*. Cadascun dels punts blancs que hi ha sobre el medi de cultiu (figura 78) correspon a una colònia o unitat formadora de colònia (CFU), és una unitat de mesura indirecta de la quantitat de bacteris presents en una mostra.

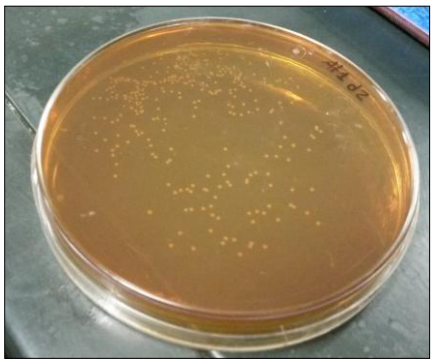

**Figura 78.** *Placa de petri amb cultiu de bacteris.*

A continuació es normalitza el valor obtingut de CFU per la superfície de la mostra (taula 11) i es representa amb un gràfic de barres per poder-ne comparar els resultats (figura 79).

**Taula 11.** *Nombre de bacteris adherits a cada mostra.*

| Condició | Bacteris per mostra (CFU/mm$^2$) |
|---|---|
| **Titani control** | 3100 ± 308 |
| **Titani activat + PEG** | 504 ± 32 |

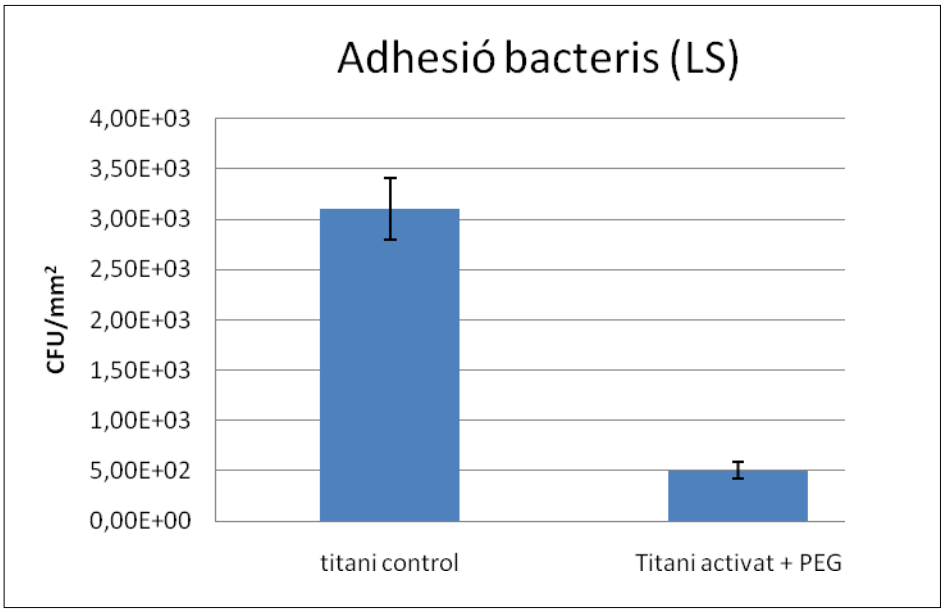


**Figura 79.** *Resultats d'adhesió del bacteris LS.*

Els resultats obtinguts en aquest primer assaig són excel·lents ja que el nombre de bacteris adherits a la mostra tractada disminueix radicalment respecte el de la mostra de titani control.

S'ha cregut convenient comprovar que la resina utilitzada en el procés de preparació de les mostres (per aïllar el contacte elèctric entre el cable i la solució aquosa) no ha influït a la disminució de bacteris adherits a la superfície de la mostra tractada. S'ha realitzat un assaig afegint una mostra de titani control, però preparada amb resina seguint el mateix procediment que per les mostres tractades.

Un altre condició que s'ha afegit és una mostra sotmesa al tractament d'electrodeposició però que no ha estat activada amb plasma. Els valors obtinguts d'aquest assaig es mostren a la taula 12.

**Taula 12.** *Nombre de bacteris adherits a cada mostra.*

| Condició | Bacteris per mostra (CFU/mm$^2$) |
|---|---|
| **Titani control** | 1690 ± 213 |
| **Ti polit + resina** | 1680 ± 28,3 |
| **Titani PEG** | 1270 ± 131 |
| **Titani activat + PEG** | 515 ± 59,9 |

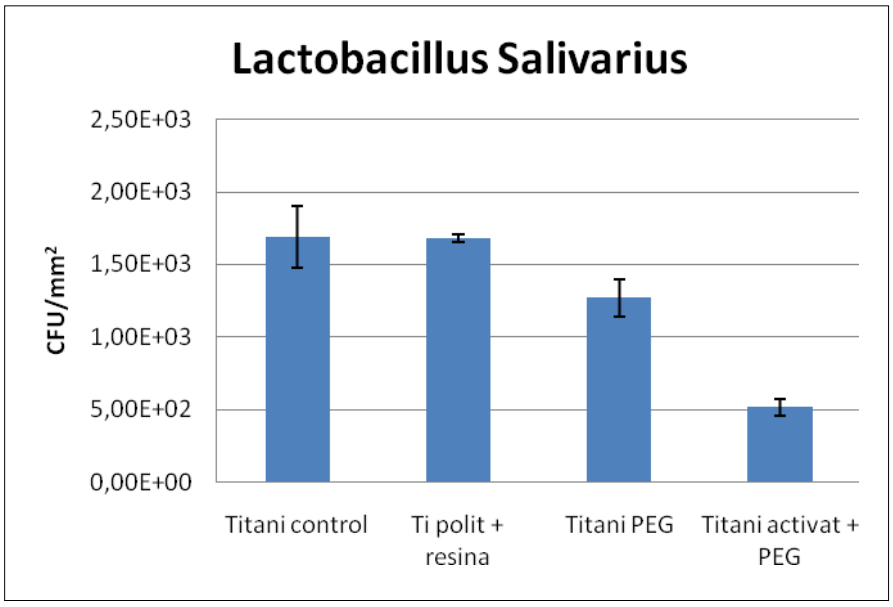


**Figura 80.** *Resultats del segon assaig d'adhesió del bacteri LS.*

Els resultats d'aquest assaig (figura 80) confirmen que la resina utilitzada no té cap efecte sobre els bacteris, ja que dona valors molt similars als del titani control. Pel que fa a les mostres sotmeses al tractament d'electrodeposició hi ha una disminució del nombre de bacteris adherits degut al recobriment format, ja que la unió del polímer a la superfície de la mostra dificulta l'adhesió bacteriana.

Com ja s'ha comentat en apartats anteriors, l'activació amb plasma fa que la capa de PEG sigui més densa i per tant l'adhesió bacteriana és menor (figura 80), això confirma la propietat *antifouling* que presenta el recobriment estudiat.

Finalment s'ha realitzat un últim assaig amb aquesta soca bacteriana per determinar l'efecte del pèptid que s'ha afegit (taula 13 i figura 81).

**Taula 13.** *Nombre de bacteris adherits a cada mostra.*

| Condició | Bacteris per mostra (CFU/mm$^2$) |
|---|---|
| **Titani control** | 4330 ± 360 |
| **Titani PEG** | 2570 ± 484 |
| **Ti activat + PEG** | 1460 ± 102 |
| **Ti PEG + pèptid** | 1600 ± 471 |
| **Ti activat + PEG + pèptid** | 1130 ± 164 |

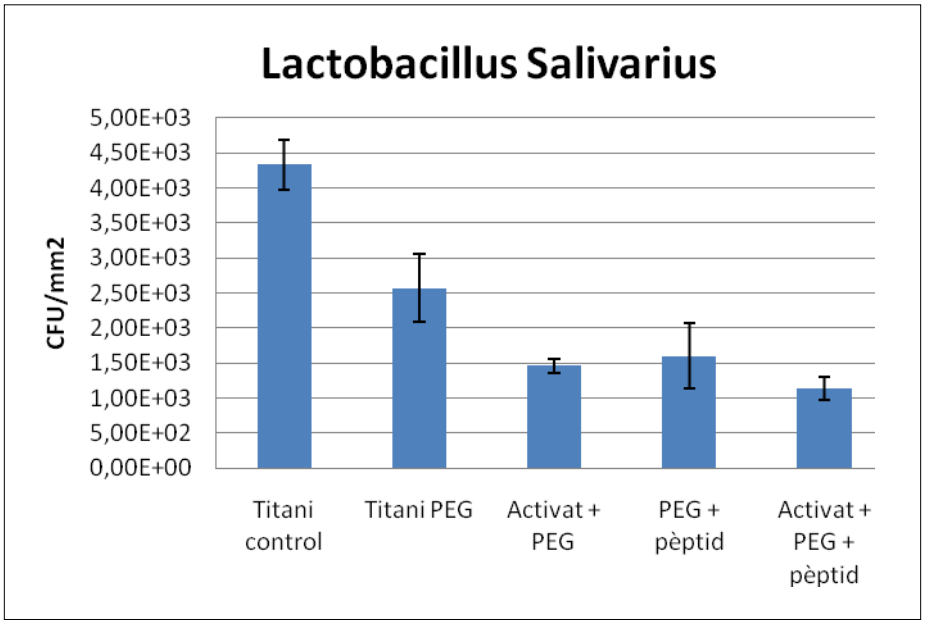


**Figura 81.** *Resultats del tercer assaig d'adhesió del bacteri LS.*

Es verifica que la unió del pèptid fa disminuir el nombre de bacteris que s'adhereixen a la superfície de la mostra. Els resultats de les mostres activades amb plasma, tornen a presentar millors propietats *antifouling*.

**Streptococcus Sanguinis**

Un cop realitzat l'assaig d'adhesió, es conten les CFU de *Streptococcus Sanguinis* presents a cadascuna de les mostres i s'han normalitzat per la superfície del disc de titani.

En el cas d'aquesta soca, només s'ha realitzat un assaig, ja que s'ha confirmat que la resina no és tòxica pel bacteris.

Els resultats es mostren a la taula 14 i s'han representat a la figura 82.

**Taula 14.** *Nombre de bacteris adherits a cada mostra.*

| Condició | Bacteris per mostra (CFU/mm$^2$) |
|---|---|
| **Titani control** | 10300 ± 759 |
| **Titani PEG** | 5200 ± 1200 |
| **Ti activat + PEG** | 3910 ± 1520 |
| **Ti PEG + pèptid** | 3060 ± 2430 |
| **Ti activat + PEG + pèptid** | 1220 ± 270 |

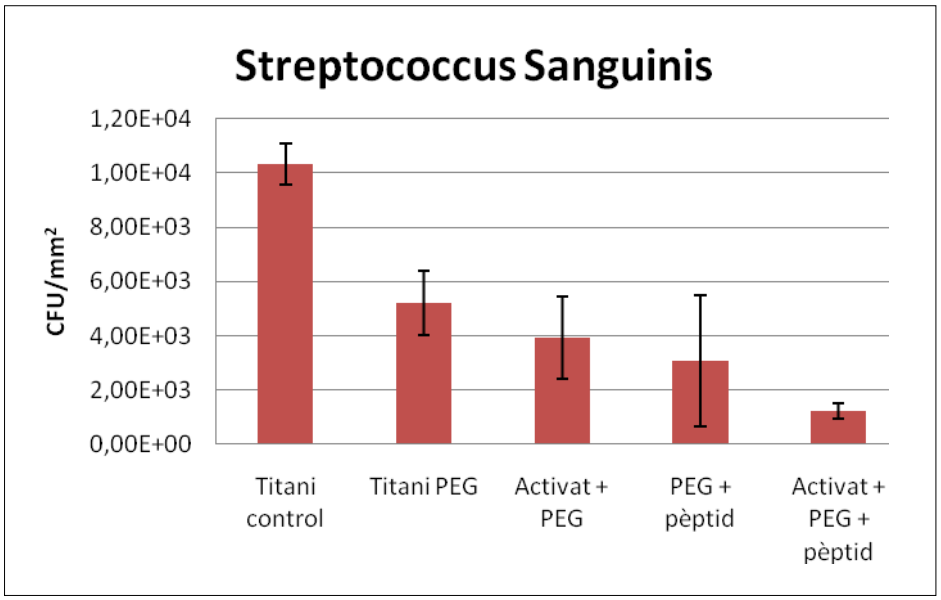


**Figura 82.** *Resultats d'adhesió del bacteris SS.*

Pels *Streptococcus Sanguinis* també disminueix l'adhesió bacteriana de les mostres tractades respecte les mostres no tractades, seguint la mateixa tendència que la soca bacteriana *Lactobacillus Salivarius.*

Finalment es pot concloure que el recobriment estudiat presenta molt bones propietats *antifouling*, tan per bacteris colonitzadors primaris, com secundaris.

# CAPÍTOL 5: CONCLUSIONS

Les conclusions generals que s'extreuen a partir dels resultats obtinguts són les següents:

- S'ha aconseguit desenvolupar un recobriment sobre la superfície de titani, mitjançant l'electrodeposició del polímer $NH_2$-PEG-$NH_2$.
- El recobriment del polímer s'ha realitzat amb èxit malgrat que s'esperava un gruix superior. El gruix de la capa s'estima entre 5-10nm pel resultats obtinguts de l'anàlisi composicional amb l'espectroscòpia d'infraroig per transformada de Fourier.
- S'ha demostrat una millora de les característiques del recobriment en aquells casos que s'ha sotmès les mostres a un tractament previ d'activació amb plasma.
- Pel que fa a la caracterització físico-química del recobriment, el mètode de l'angle de contacte ha permès estudiar l'efectivitat d'activar les mostres amb plasma degut a mesures hidròfiles de les mostres. El mètode que ha permès confirmar la presència del PEG Jeffamina ha estat l'espectroscòpia d'infraroig, pel que fa a les mesures de la rugositat superficial i l'espectroscòpia d'impedàncies, han servit per avaluar les diferencies que presenten les mostres tractades.
- Els assajos de caracterització biològica presenten resultats que permeten concloure que el recobriment de la superfície de titani amb poli(etilenglicol) presenta propietats *antifouling* i no és citotòxic pel cos humà, per tant pot ser emprat en aplicacions biomèdiques.

# CAPÍTOL 6: BIBLIOGRAFIA

## 6.1 Referències bibliogràfiques

Alexander H. Rickard, Peter Gilbert, Nicola J. High, Paul E. Kolenbrander and Pauline S. Handley. "Bacterial coaggegation: an integral process in the development of multi-species biofilm". *Trends in Microbiology (2009).*

Boletin Oficial del Estado. "Ministerio de empleo y seguridad social". Artículo 33 http://boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-2013-11199 (2013)

B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F .J. Schoen, J. E. Lemons. "Biomaterials Sciene: An introduction to Materials in Medicine". *Elseiver* (2011).

C. Aparicio Bádenas, F. X. Gil, J. M. Manero Planella, D. Rodríguez Rius, A. Andrés Domènech, P. M. Arandés Salvadó, J. A. Planell. "Aleaciones ligeras*". Col·lecció Politext 106.*

C. Gabrielli, M. Keddam, N. Nadi, H. Perrot, J. Electroanal. "Electropolymerization: Concepts, Materials and Applications". *WILEY-VCH* (2000)

Daniel Rodríguez Rius. "Obtención de capas de nitruro de titanio mediante tratamiento termoquímico en titanio y Ti6Al4V y caracterización de sus propiedades para aplicaciones biomédicas". *UPC: Dpto de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica* (1999)

Delgado Garoña Luis María. " Optimización del sellado biológico de implantes dentales mediante la estimulación de la adhesión y activación de fibroblastos sobre superficies de titanio mecanizadas" (2011)

E3-11. "Standard guide of preparation of metallographic specimens". *MC Master University* (2010)

F. D del Castillo Rodríguez. "Principios de electrodeposición". *UNAM CUAUTITLÁN* (2008)

F. Gil i J. Planell. "Aplicaciones biomédicas del titanio y sus aleaciones". *UPC: Dpto de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica.*

F. Melendi De Paz. "Quality and properties of titanium used in orthopedic surgery". *Sevilla* (1997)

ISO 5832-2. "Implantes quirúrgicos. Materiales metálicos. Parte 2: Titanio no aleado" (2012)

Jerónimo Agrisuelas Vallés. "Síntesis y caracterización de polímeros electroactivos en sistemas multicapa" *Universitat de Valencia* (2008)

Jesús Cortés Rodicio. "Espectroscopia de Transformada de Fourier". *Departamento de Física aplicada* (2006)

Joseph I. Goldstein, Dale E. Newbury, Patrick Echlin, David C. Joy, Charles E. Lyman, Eric Lifshin, Linda Sawyer, Josep R. Michael. "Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis".

J. A. Ramón, Carlos Peniche, Fidel R. Castro, Vivian M. Saéz, Rosa M.colás, Rolando Páez. "Un método reproducible para obtener PEG biramificado monofuncional de alta pureza". *Química Nova vol.32* (2009)

J. L. Vázquez Gutiérrez. "Empleo de la técnica de espectroscopia de impedancias electroquímicas para la caracterización de biomateriales. Aplicación a una aleación biomédica de Co-Cr-Mo". *Universidad Politecnica de Valencia* (2007)

J. Mouhyi, D. M. Dohan Ehrenfest, T. Albrektsson. "The peri-Implantitis: Implant Surfaces, Microstructure and Physicochemical Aspects". *Clinical Implant Dentristy and Related Research* (2009)

K. J. Anusavice. "Ciencia de los materiales dentales*". Ed. Elsevier* (2004)

Máximo Gallignani, Maribel Valero, Maria del Rosario Brunetto y Carlos Ayala, 2005. "Gaseous Phase Generation - Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectrometry. A New and Powerful Analytical Technique". *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia* (2010)

Mirjan M. Fürst, Giovanni E. Salvi, Niklaus P. Lang and G. Rutger Persson. "Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants". *Clin. Oral Impl.*

Negroni, Marta. "Microbiologia Estomatológica. Fundamentos y guía pràctica". *Ed. Medicina Panamericana* (2009)

Raspall, Guillermo, and Humberto Santana. "Cirugia e implantología". *Médica Panamericana* (2006)

Ratner, Buddy D. "Biomaterials science: an introduction to materials in medicin". *San Diego: Academic Press* (2004)

Sandra Báez P, José Luis Trisancho R, Darío Yesid Peña B, Custodio Vászquez Q, Huber Alexander Anaya P. "La espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) aplicada al estudio del mecanismo de la corrosión*". Universidad Industrial de Santander (*2004)

Takao Hanawa. "A comprehensive review of techniques for biofuncionalization of titanium". *Periodontal Implant Sci*. (2011)

Wee Keat Chong, Xiang Li and Yeng Chai Soh. "Phosphor-Based white light emittind diode for vertical scanning interferometry". *Singapore* (2012)

Williams, D. F. "Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials". *Amsterdam: Elsevier* (1987)

Wilson Wang i Che Khoon Poh,. "Titanium Alloys in Orthopaedics". *Department of Orthopaedic Surgery, National University of Singapore* (2013)

W. M. Dunne. "Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately?". *Clinical Microbiology Reviews* (2002)

Yamaguchi Masaya, Yutaka Terao, Taiji Ogawa, Toshihito Takahashi, Shigeyuki Hamada, and Shigetada Kawabata,. "Role Of Streptococcus Sanguinis Sortase A In Bacterial Colonization". *Microbes and infection* (2006)

Yuta Tanaka, Hisashi Doi, Equo Kobayashi, Takayuki Yoneyama and Takao Hanawa. "Determination of the Immobilization Manner of Amine-Terminated Poly(EthyleneGlycol) Electrodeposited on a Titanium Surface with XPS and GD.OES". *The Japan Institute of Metals* (2007)

Yuta Tanaka, Yuh Matsuo, Takayuki Komiya, Yusuke Tsutsumi, Hisashi Doi, Takayuki Yoneyama, Takao Hanawa. "Characterization of the spatial immobilization manner of poly(ethylene glycol) to a titanium surface with immersion and electrodeposition and its effects on platelet adhesion". *Wiley InterScience* (2008)

## 6.2 Bibliografia de consulta

Elisabeth Engel. "Apunts de càtedra de l'assignatura Enginyeria de teixits". *Escola Universitària d'Enginyeria Tècnica Industrial de Barcelona (UPC)* (2012)

Judit Buxadera. "Obtenció I optimització de recobriments antibacterians en superficies de titani mitjançant polimerització per plasma". *Grup Biomaterials, Biomecànica i Enginyeria de Teixits, Departament Ciència de Materials i Enginyeria Metal·lúrgica (UPC)* (2013)

Juergen Groll, Joerg Fiedler, Erika Engelhard, Thomas Ameringer, Stefano Tugulu, Harm-Anton Klok, Rolf E. Brenner, Martin Moeller. "A novel star PEG-derived surface coating for specific cell adhesion". *Wiley Periodicals, Inc. J Biomed Mater Res 74A: 607-617* (2005)

Qin Tu, Jian-Chun Wang, Rui Liu, Yanrong Zhang, Juan Xu, Jianjun Liu, Mao-Sen Yuan, Wenming Liu, Jinyi Wang. "Synthesis of polyethylene glycol- and sulfobetaine-conjugated zwitterionic poly(L-lactide) and assay of its antifouling properties". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 102 331-340* (2013)

Ratner, Buddy D. "Medical Device". *Department of bioengineering, University of Washington* (2013)

Rodríguez del Rey, Alejandro. "Periodoncia e Implantes Dentales | Dentistas | Periodoncistas." http://www.periodonciaeimplantes.com.mx/ (accessed November 20, 2013).

"Síntesis y Caracterización del Compósito Poly(ethylene glycol)PEG". Universidad Nacional de Colombia sede Manizales. http://www.bdigital.unal.edu.co/3585/1/6708006.2010.pdf (accessed December 3, 2013).

"THI". Texas Heart Institute http://texasheart.org/HIC/Topics_Esp/Proced/angioplasty_sp.cfm (accessed November 29, 2013)

"The Marshall Protocol Knowledge". Trebor Marshall http://mpkb.org/home/pathogenesis/microbiota/biofillm (accessed November 24 2013).

"UPC commons". Universitat Politècnica de Catalunya http://upcommons.upc.edu/revistes/bitstream/2099/6627 (accessed November 14, 2013)

# PRESSUPOST

Els costos econòmics que comporta la realització d'aquest projecte es poden dividir en: costos associats als materials, costos associats a la maquinària utilitzada i finalment costos associats al personal. També cal considerar costos indirectes, com l'electricitat, aigua, llum, etc.

S'ha considerat que el sou d'un enginyer és de 15€/h ja que el salari mínim digne establert pel conveni del col·lectiu d'enginyers, correspon a 1.687,02€ al mes amb 2 pagues dobles, sumen un total de 23.618,28€ a l'any, pel vigent any 2013 (BOE 2013).

**Taula 15.** *Costos associats als materials.*

| Materials | Preu unitari | Quantitat | Cost (€) |
|---|---|---|---|
| **Barra titani grau 2** | 184,42 €/metre | 0,5 metres | 92 |
| **Polir** | | | |
| P600 | 16,80 €/unitat | 10 unitats | 168 |
| P800 | 20,25 €/unitat | 10 unitats | 202,50 |
| P2500 | 20,25 €/unitat | 16 unitats | 324 |
| P4000 | 20,25 €/unitat | 16 unitats | 324 |
| Drap de vellut | 37,80 €/unitat | 2 unitats | 75,60 |
| Alúmina 1µm | 60 €/pot | 1 pot | 60 |
| Alúmina 0,05µm | 60 €/pot | 1 pot | 60 |
| **Rentats** | | | |
| Acetona | 20,50 €/l | 1 l | 20,50 |
| Etanol | 27,50 €/l | 1 l | 27,50 |
| Aigua destil·lada | 20,00 €/l | 5 l | 100 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Resina** | | | |
| VersoCit | 50,45 €/*kit* | 1 *kit* | 50,45 |
| Pintura de plata | 18 €/pot | 1 pot | 18 |
| **Electrodeposició** | | | |
| Clorur de sodi | 120 €/kg | 0,001 g | 1,20 |
| PEG amina | 46 €/5g | 3 g | 27,60 |
| Bromur de potassi | 756 €/Kg | 0,001 Kg | 0,76 |
| **Assaig citotoxicitat** | | | |
| DMEM | 43,66 €/l | 0,08 l | 3,50 |
| Penicil·lina | 125 €/l | 0,001 l | 0,13 |
| FBS | 88,40 €/l | 0,001 l | 0,09 |
| L-glutamat | 513 €/l | 0,001 l | 0,52 |
| Piruvat de sodi | 103 €/l | 0,001 l | 0,11 |
| Tripsina | 69,28 €/l | 0,002 l | 0,14 |
| HEPES buffer | 630 €/l | 0,002 l | 1,26 |
| PBS | 1,36 €/pastilla | 1 pastilla | 1,36 |
| **Assaig adhesió** | | | |
| S.Sanguinis CCUG178268 | 117 €/soca | 1 soca | 117 |
| L.Salivarius CECT4063 | 49 €/soca | 1 soca | 49 |
| Medi MRS | 186,60 €/Kg | 0,5 kg | 93 |
| Medi Todd-Hewitt | 296 €/Kg | 0,5 kg | 148 |
| Agar | 1016 €/Kg | 0,25 kg | 254 |
| Plaques de petri | 0,18 €/unitat | 150 unitats | 27 |
| Puntes de pipeta | 0,01 €/unitat | 350 unitats | 3,50 |
| Cubetes PMMA | 0,06 €/unitat | 25 unitats | 1,50 |
| Pouets | 0,51 €/unitat | 10 unitats | 5 |
| Tubs falcons | 0,84 €/unitat | 30 unitats | 25,20 |
| Tubs Eppendorff | 0,01 €/unitat | 150 unitats | 1,50 |
| **Assaig de proteïnes** | | | |
| Kit FITC | 550 €/Kit | 0,1 kit | 55 |
| | | **TOTAL** | **2.338,92 €** |

A continuació es mostren els costos associats a la maquinaria, en funció de les hores que s'ha utilitzat.

**Taula 16.** *Costos associats a la maquinaria utilitzada.*

| Equip | Preu per hora (€/h) | Temps (h) | Cost (€) |
|---|---|---|---|
| **Polidora automàtica** | 10 €/h | 50 h | 500 |
| **Potenciostat** | 20 €/h | 100 h | 2000 |
| **Equip de plasma** | 40 €/h | 5 h | 200 |
| **Angle de contacte** | 30 €/h | 10 h | 300 |
| **Microscopi interferomètric** | 60 €/h | 10 h | 600 |
| **SEM** | 80 €/h | 3 h | 240 |
| **FTIR** | 60 €/h | 15 h | 900 |
| **Microscopi fluorescència** | 60 €/h | 4 h | 240 |
| **Autoclau** | 30 €/h | 15 h | 45 |
| **Incubadora** | 25 €/h | 75 h | 1874 |
| **Campana microbiologia** | 10 €/h | 50 h | 500 |
| **Campana de cultius** | 15 €/h | 40 h | 600 |
| | | **TOTAL:** | **7.999 €** |

Finalment es calculen els costos associats al personal (taula 17).

**Taula 17.** *Costos associats al personal.*

| Activitat | Preu per hora (€/h) | Temps (h) | Cost (€) |
|---|---|---|---|
| **Polit de les mostres** | 15 €/h | 70 h | 1050 |
| **Estudi electrodeposició** | 15 €/h | 150 h | 2250 |
| **Activació amb plasma** | 15 €/h | 5 h | 75 |
| **Caracterització fisicoquímica** | 15 €/h | 45 h | 675 |
| **Tècnic SEM** | 100 €/h | 3 h | 300 |
| **Assaig citotoxicitat** | 15 €/h | 50 h | 750 |
| **Assaig adhesió** | 15 €/h | 100 h | 1500 |
| **Assaig proteïnes** | 15 €/h | 20 h | 300 |
| | | **TOTAL** | **6.900 €** |

Per tal de calcular el cost total del projecte, es fa un sumatori dels costos directes que comporta la realització del mateix.

**Taula 18.** *Sumatori dels costos directes associats al projecte.*

| | |
|---|---|
| Cost de material | 2.338,92 € |
| Cost de la maquinaria | 7.999,00 € |
| Cost de personal | 6.900,00 € |
| **SUMATORI TOTAL** | **17.237,92** |

També cal tenir en compte altres costos que ha comportat la realització d'aquest projecte. Els costos indirectes que s'han considerat es mostren a la taula 19.

**Taula 19.** *Costos indirectes.*

| **Costos indirectes** | **Preu** | **Temps** | **Cost (€)** |
|---|---|---|---|
| **Recerca bibliogràfica** | 15 €/h | 20 h | 300 € |
| **Anàlisi dels resultats** | 15 €/h | 40 h | 600 € |
| **Elaboració de la memòria** | 15 €/h | 100 h | 1500 € |
| **Aigua, electricitat, llum** | 15 % del total | | 2945,69 € |
| | | **SUBTOTAL** | **22.583,61 €** |

Finalment el cost total del projecte és:

| | |
|---|---|
| **SUBTOTOTAL** | **22.583,61 €** |
| **I.V.A (21 %)** | **4.742,56 €** |
| **TOTAL** | **27.326,17 €** |

# ANNEX 1: IMPACTE AMBIENTAL

L'impacte ambiental d'aquest projecte s'ha tingut en compte en tot moment i s'ha intentat minimitzar. Per això en el laboratori on s'ha realitzat el present projecte, es segueix un protocol de gestió de residus.

**Gestió de residus**

En un laboratori es manipulen diferents residus químics, en funció del tipus de residu s'aboca en un envàs amb una capacitat i identificació determinada segons: residus àcids, residus bàsics, dissolvents, etc.

Per a les implicacions ambientals d'aquest projecte només ha calgut considerar el procés de neteja de les mostres de titani, on s'utilitzen dissolvents orgànics, com l'etanol o l'acetona. Aquests residus són emmagatzemats dins un envàs de 10 litres identificat amb el nom de "Compostos no halogenats" i la data d'inici de l'envàs.

Un cop el recipient és ple, una empresa externa que es dedica a gestionar residus (ECOCAT), s'encarrega d'anar al laboratori cada sis mesos a recollir els residus generats. Aquesta mateixa empresa es fa responsable del posterior tractament d'aquests.

Pel que fa als residus sòlids generats, al no estar en contacte amb reactius tòxics, es llencen a les escombraries normals.

# ANNEX 2: PROTOCOLS

## 2.1 Quantificació de bacteris adherits per unitat d'àrea

1. Preparació de l'inòcul:

Material necessari:

- Campana estèril
- Soca bacteriana
- Pipeta de 10 ml
- Medi (MRS, Todd-Hewitt)

Procés experimental (dins la campana):

- Introduir X ml de medi dins un tub estèril i escalfar-lo a 37ºC.
- Recollir 2 o 3 colònies de bacteris, amb molta cura.
- Agitar les colònies dins el medi calent, de manera que els bacteris quedin dipositats dins el meu.
- Agitar amb l'ajuda del vòrtex .
- Incubar a 37ºC durant 24 hores.

2. Procés de mesura:

Material necessari:

- Plaques de petri
- Eppendorfs
- Vòrtex
- Encenedor
- Fogonet d'etanol

- Pipetes de 200µl
- Pipeta de 1ml
- PBS

Procés experimental

- Introduir les mostres dins un eppendorf amb 1ml de suspensió de bacteris.
- Incubar a 37ºC durant 2 hores.
- Fer dos rentats amb PBS de manera que finalment haguem tret tots els medis, quedant en el eppendorf només la mostra.
- Canviar la mostra d'eppendorf.
- Afegir al nou eppendorf 1ml de PBS.
- Fer vòrtex durant 5 minuts.
- Posar ràpidament 100µl de la solució dins un nou eppendorf que conté 100µl de PBS (dilució1).
- Realitzar dilucions 1:100 de la solució inicial i sembrar-les a les plaques de petri.
- Incubar durant 48 hores a 37ºC.
- Contar els bacteris/$mm^2$ que conté cada placa de petri.

És necessari calcular l'àrea de la mostra, per fer-ho es mesura l'àrea de la circumferència i se li suma el perímetre del disc de titani. D'aquesta manera tenim que:

$$\text{Superfície total de la mostra} = 2 \cdot 2\Pi r^2 + 2\Pi rh$$

On h és el gruix de la mostra, i r el radi del disc.

Composició del medi de cultiu Man-Rogosa-Sharpe (MRS)

| **COMPONENT** | **COMPOSICIÓ (g/l)** |
|---|---|
| Extracte de carn | 10 |
| Caseïna peptona | 20 |
| Glucosa | 2 |
| Bicarbonat de sodi | 2 |
| Clorur de sodi | 2 |
| Fosfat de sodi | 0,4 |
| Agar | 15 |

Composició del medi de cultiu Todd-Hewitt:

| COMPONENT | COMPOSICIÓ (g/l) |
|---|---|
| Proteasa peptona | 10 |
| Extracte de carn | 8 |
| Extracte de llevat | 4 |
| D(+) glucosa | 20 |
| Acetat de sodi | 5 |
| Citrat d'amoni | 2 |
| Sulfat de magnesi | 0,2 |
| Sulfat de manganès | 0,05 |
| Fosfat de potassi | 2 |
| Polisorbat 80 | 1 |
| Agar | 15 |

Corba de creixement típica d'un cultiu bacterià.

On les quatre etapes del creixement bacterià corresponen a:

- Fase de latència: etapa en la qual els bacteris adapten el seu metabolisme a les noves condicions ambientals (elevada concentració de nutrients).
- Fase exponencial: etapa en la qual la velocitat de creixement és màxima. Durant aquesta etapa els bacteris consumeixen els nutrients del medi i es

dupliquen. Aquesta etapa correspon a la infecció dins l'organisme de l'agent infecciós.
- Fase estacionària: durant aquesta etapa el nombre de bacteris deixa d'augmentar, sigui a causa de la falta de nutrients o perquè els metabòlits que ells mateixos excreten els resulten tòxics.
- Fase de mort: etapa on moren la major part dels bacteris presents al cultiu.

## 2.2 Assaig d'adhesió cel·lular

50mL de medi de cultiu està format per:

- McCoy → 42,5mL (85%): Medi ric en sals inorgàniques, aminoàcids i vitamines necessàries per la supervivència de les cèl·lules.
- HEPES buffer solution 1M → 1mL (2%): Manté el pH fisiològic encara que varii el $CO_2$.
- Fetal Bovine Serum (FBS) (100%) → 5mL (10%): Plasma sense cèl·lules sanguínies ni fibronectina, el qual aporta les diferents proteïnes que donen suport al creixement, proliferació i supervivència de les cèl·lules.
- Sodium Pyruvate → 500µL (1%): És la font d'energia
- Penicilina/Streptomycin → 500µL (1%): antibiòtic perquè no es morin les cèl·lules.
- L-glutamine → 500µL (1%): sintetitza les proteïnes, augmenta l'ATP.

Procés experimental

- Fer dos rentats amb PBS per tal de netejar les mostres
- Bloquejar les mostres de la placa amb BSA 1% i esperar entre 30 i 60 minuts.
- Aspirar el medi de cultiu.
- Fer dos rentats amb PBS per acabar d'eliminar possibles cèl·lules mortes i restes de proteïnes del medi perquè la tripsina actuï correctament.
- S'afegeix 2ml de tripsina prèviament escalfada a 37ºC al bany maria.
- S'afegeixen 5ml de medi amb FBS ja que al ser ric en proteïnes para l'activitat enzimàtica de la tripsina. Aquests 5ml es passen a un falcon de 15ml.
- Centrifugació del falcon de 15ml durant 5 minuts a 300RCF amb la finalitat de que les cèl·lules precipitin.
- Aspirar el medi sobrant del falcon.
- Afegir 4ml de medi sense FBS.
- A continuació es conten cèl·lules per veure quina concentració hi ha.

- Dissolució a un eppendorf, amb 10µl de la dissolució + 90µl de medi sense FBS.
- Pipetejar 10µl de l'eppendorf i col·locar a una cambra de Neubauer.
- Al microscopi, es conten les cèl·lules dels 8 quadrats i es fa una mitja que s'ha de multiplicar per 10000 per obtenir la concentració de cèl·lules que tindrà a la dissolució.
- Es fan els càlculs corresponents per saber quina quantitat de dissolució es necessita per tal de tenir 50000 cèl·lules/mostra

Càlculs

Si es tenen 3 condicions, de cada condició 3 mostres, i de cada mostra s'han de fer 5 dilucions. Es necessiten 3 x 3 x 5=45 + 3 pouets per fer de control, suma un total de 48 pouets.

48 pouets ·

$$48 \text{ pouets} \cdot \frac{0,5 \text{ ml}}{1 \text{ pouet}} = 24 \text{ ml de dissolució}$$

$$24 \text{ ml} \cdot \frac{50000 \text{ cells}}{\text{ml}} \cdot \frac{1 \text{ ml}}{\text{concentració dissolució}}$$

A partir d'aquesta operació, sabrem la quantitat de dissolució que es necessita per fer l'assaig.