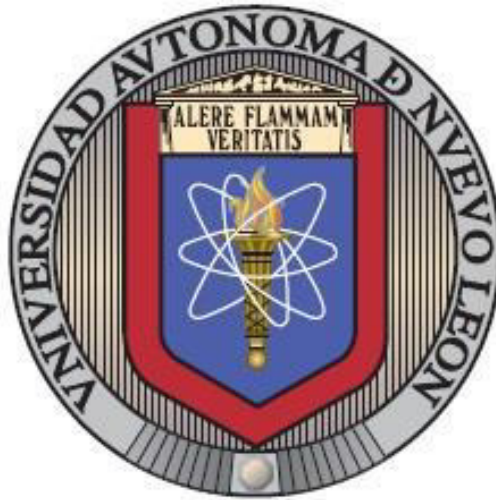


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA**



**TESIS**

**TRATAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA SUPERFICIE  
QUÍMICAMENTE MODIFICADA DE LA ALEACIÓN Ti6Al4V POR  
INMERSIÓN EN SOLUCIÓN ALCALINA CALIENTE QUE CONTIENE  
EL ION  $[Zn(OH)_4]^{2-}$**

**POR**

**ING. ALEJANDRO LÓPEZ CRUZ**

**EN OPCIÓN AL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA  
INGENIERÍA CON ORIENTACIÓN EN MATERIALES**

**NOVIEMBRE, 2019**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA**  
**SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**TESIS**

**TRATAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA SUPERFICIE  
QUÍMICAMENTE MODIFICADA DE LA ALEACIÓN Ti6Al4V POR  
INMERSIÓN EN SOLUCIÓN ALCALINA CALIENTE QUE CONTIENE  
EL ION  $[Zn(OH)_4]^{2-}$**

**POR**

**ING. ALEJANDRO LÓPEZ CRUZ**

**EN OPCIÓN AL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA  
INGENIERÍA CON ORIENTACIÓN EN MATERIALES**

**SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN, MÉXICO.      NOVIEMBRE DE 2019**



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA

SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Los miembros del comité de tesis recomendamos que la tesis TRATAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA SUPERFICIE QUÍMICAMENTE MODIFICADA DE LA ALEACIÓN Ti6Al4V POR INMERSIÓN EN SOLUCIÓN ALCALINA CALIENTE QUE CONTIENE EL ION  $[Zn(OH)_4]^{2-}$  realizada por el alumno(a) ALEJANDRO LÓPEZ CRUZ, con número de matrícula 1940818, sea aceptada para su defensa como opción al grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA CON ORIENTACIÓN EN MATERIALES.

El Comité de Tesis

Dr. Marco Antonio Loudovic Hernández Rodríguez

Director de Tesis

Dr. Edgar Omar García Sánchez

Revisor

Dr. Melvyn Alvarez Vera

Revisor

Vo. Bo.

Dr. Simón Martínez Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado



San Nicolás de los Garza, Nuevo León. Noviembre de 2019

## DEDICATORIA

*A mi familia,  
por siempre apoyarme en cada una de las metas  
que me propongo en la vida.  
Desde la distancia son mi fuente de energía  
para seguir adelante cada día*

## AGRADECIMIENTOS

*Al Dr. Marco A. L. Hernández Rodríguez por la oportunidad de formar parte de esta nueva familia y su apoyo en todo momento.*

*Al Dr. Jesús E. González Ruíz, gracias por sus valiosos conocimientos.*

*A mis amigos, mi familia de México, por su apoyo incondicional y su ayuda en la realización de este trabajo.*

*Al grupo de investigación de Biomateriales del Posgrado en Ingeniería de Materiales de la FIME que de una u otra forma contribuyeron al desarrollo de este trabajo.*

*A la Dra. Myriam A. de la Garza por su colaboración durante la realización de este trabajo.*

*A los profesores del Posgrado en Ingeniería de Materiales de la FIME.*

*Al CONACyT por el apoyo económico durante la maestría.*

*Y por supuesto, a México. Hermoso país que me recibió y me ha brindado todo lo necesario para desarrollarme personal y profesionalmente.*

*A todos gracias por su apoyo para que esta meta fuera cumplida.*

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo 1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Introducción .....	1
1.2. Justificación .....	2
1.3. Antecedentes.....	4
1.4. Hipótesis .....	5
1.5. Objetivos.....	5
1.5.1. Objetivo General .....	5
1.5.2. Objetivos Específicos .....	5
Capítulo 2 FUNDAMENTO TEÓRICO .....	6
2.1. El titanio y sus aleaciones.....	6
2.2. Pasivación del Titanio .....	9
2.3. La oseointegración .....	11
2.4. La rugosidad superficial.....	13
2.5. Modificación superficial de las aleaciones de titanio.....	14
2.5.1. Métodos mecánicos .....	15
2.5.2. Métodos físicos .....	16
2.5.3. Métodos químicos y electroquímicos .....	16
2.6. Contaminación microbiana de implantes y prótesis. Estrategias para prevenir la contaminación microbiana de los implantes .....	19
2.7. El Zn como agente antimicrobiano. Incorporación de iones $Zn^{2+}$ en la superficie de aleaciones de titanio .....	20
Capítulo 3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	22
3.1. Procedimiento Experimental.....	22
3.2. Preparación inicial de las muestras .....	23
3.3. Grabado ácido .....	23

3.4.	Tratamientos con peróxido de hidrógeno.....	24
3.5.	Tratamiento con solución alcalina caliente que contiene el ion $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$ para incorporar Zn en la superficie.....	25
3.6.	Caracterización y evaluación <i>in vitro</i> de las superficies modificadas ...	26
3.6.1.	Microscopía Electrónica de Barrido.....	26
3.6.2.	Espectroscopía de Energía Dispersiva de Rayos X.....	26
3.6.3.	Difracción de Rayos X.....	26
3.6.4.	Espectrometría de Fotoelectrones Emitidos por Rayos X.....	26
3.6.5.	Microscopía Óptica.....	27
3.6.6.	Liberación de iones $\text{Zn}^{2+}$ al medio fisiológico .....	27
3.6.7.	Ensayo de Citotoxicidad.....	28
3.6.8.	Ensayo de sensibilidad antibacteriana .....	30
Capítulo 4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	31
4.1.	Caracterización inicial del sustrato .....	31
4.2.	Morfología y topografía de las superficies obtenidas.....	32
4.3.	Rugosidad superficial.....	36
4.4.	Composición elemental y de fases de las superficies obtenidas .....	37
4.5.	Liberación de iones $\text{Zn}^{2+}$ al medio fisiológico.....	41
4.6.	Citotoxicidad de las superficies obtenidas .....	43
4.7.	Actividad antibacteriana de las superficies obtenidas.....	44
Capítulo 5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	47
5.1.	Conclusiones .....	47
5.2.	Recomendaciones .....	48

## RESUMEN

La oseointegración de implantes y prótesis de Ti6Al4V depende en gran medida de las características superficiales del dispositivo. Diferentes métodos se han usado para modificar la superficie de esta aleación y mejorar la interfase hueso-implante. Varios estudios muestran la capacidad antibacteriana del Zn, así como su participación en la mineralización y formación de nuevo tejido óseo. El objetivo de este trabajo fue obtener, mediante métodos químicos y/o termoquímicos, superficies en la aleación Ti6Al4V que permitan liberar Zn en niveles que prevengan la contaminación microbiana. Discos de Ti6Al4V fueron cortados, desbastados y posteriormente sometidos a tratamientos sucesivos que incluyen una modificación final utilizando una solución alcalina caliente que contiene el ion  $[Zn(OH)_4]^{2-}$ : (1) Grabado Ácido (GA); (2) Grabado Ácido + Zn (GAZn); (3) Grabado Ácido + Peróxido-Ácido Clorhídrico (PCI); (4) Grabado Ácido + Peróxido-Ácido Clorhídrico + Zn (PCIZn); (5) Grabado Ácido + Peróxido-Ácido Clorhídrico + Tratamiento Termoquímico (PCITT); (6) Grabado Ácido + Peróxido-Ácido Clorhídrico + Tratamiento Termoquímico + Zn (PCITTZn); (7) Grabado Ácido + Peróxido-Ácido Sulfúrico (PS) y (8) Grabado Ácido + Peróxido-Ácido Sulfúrico + Zn (PSZn). Los resultados de este trabajo muestran que las superficies obtenidas mediante tratamiento en solución alcalina que contiene el ion  $[Zn(OH)_4]^{2-}$  presentan diferentes morfologías. Por otro lado, las cantidades de Zn liberadas al medio fisiológico por las superficies evaluadas no causan toxicidad celular y a las 24 horas exhiben buena actividad antimicrobiana en presencia de *E. Coli* y *S. Aureus*. Además, se observó que el tratamiento en solución alcalina que contiene el ion  $[Zn(OH)_4]^{2-}$  aumentó la viabilidad celular en comparación con las superficies modificadas y se evidencia que el *S. Aureus* es más sensible ante las superficies evaluadas que la *E. Coli*, mostrando un 100 % de reducción de UFC para las superficies PCITTZn y PSZn.

**Palabras Clave:** capacidad antibacteriana, modificación superficial, Ti6Al4V, tratamientos químicos, viabilidad celular, Zn.



# Capítulo 1

## INTRODUCCIÓN

### 1.1. Introducción

Diferentes tipos de materiales (metales, cerámicos, polímeros y compuestos) se usan actualmente para fabricar implantes, prótesis y dispositivos biomédicos de forma general. No obstante, los metales constituyen el estándar de oro en implantología para sustitución ósea debido, entre otros factores, a sus propiedades mecánicas y biocompatibilidad.<sup>[1]</sup>

El titanio y sus aleaciones son los materiales metálicos más utilizados en el campo de la medicina para la fabricación de implantes dentales, maxilofaciales, ortopédicos, cardíacos y cardiovasculares.<sup>[2]</sup> Lo anterior se debe a sus excelentes propiedades mecánicas, alta resistencia a la corrosión cuando se encuentra en contacto con los fluidos biológicos, bajo peso específico, bajo módulo de elasticidad y excelente biocompatibilidad en las aplicaciones mencionadas.<sup>[3, 4]</sup>

Acortar el período de oseointegración de los implantes de titanio, así como mejorar la adherencia entre el hueso y el implante y evitar el fracaso de los dispositivos por contaminación microbiana es una tarea abordada por diversos grupos de investigación.<sup>[5-9]</sup>

Uno de los enfoques para modificar la superficie de los biomateriales metálicos consiste en introducir cambios en su arquitectura o topografía basado en que la rugosidad superficial puede incrementar el anclaje del implante al hueso y finalmente la oseointegración.<sup>[9-12]</sup>

Para evitar la formación de tejido fibroso en lugar de tejido óseo, las superficies de los implantes de titanio son expuestas a tratamientos que crean patrones a escala macro, micro y nanométrica. Los métodos empleados para modificar la superficie de los implantes pueden clasificarse, de forma general, en tres tipos principales: mecánicos, físicos y químicos y electroquímicos.<sup>[2]</sup>

Los métodos químicos de modificación superficial se basan en la ocurrencia de reacciones químicas en la interfaz entre el sustrato y la solución a la que es sometido. Se aplican fundamentalmente para alterar la rugosidad, la composición elemental y de fase de la superficie, así como para mejorar la mojabilidad y la energía superficial. <sup>[2, 13]</sup>

Varios trabajos han demostrado que los cambios en la topografía, la energía superficial y la composición de la fase en la superficie de titanio, pueden influir significativamente en su tasa de oseointegración.<sup>[14]</sup> Además, se conoce que algunos metales, como la plata, el cobre y el zinc (Zn) y algunos de sus óxidos presentan actividad antimicrobiana.<sup>[15]</sup> Por otra parte, el Zn constituye un micronutriente necesario para el funcionamiento de muchos procesos en los seres humanos y desempeña un importante papel en la formación y mineralización del hueso.

La modificación de la superficie de las aleaciones de titanio mediante procesos que permiten la incorporación de Zn es una alternativa que comienza a ser investigada. A esto se suma que la actividad antimicrobiana de las referidas superficies se encuentra relacionada con su capacidad de liberar Zn al medio biológico y por la configuración, composición de fases y dimensiones de las estructuras formadas en la superficie del titanio.

## **1.2. Justificación**

En las últimas décadas se ha incrementado el número de pacientes que necesitan implantes o prótesis articulares debido, entre otras causas, al envejecimiento y aumento gradual de la esperanza de vida de la población y a

una mayor incidencia de enfermedades degenerativas asociadas a edades avanzadas. Adicionalmente, se ha observado un aumento de la cantidad de lesionados en deportes extremos y conflictos bélicos, un incremento de las opciones quirúrgicas para enfermedades crónicas, así como la ocurrencia de accidentes de tránsito que originan politraumatismos en pacientes jóvenes.

Como alternativa para dar solución a dicho problema se desarrollan nuevos biomateriales para reemplazar el tejido faltante y devolver la funcionalidad al órgano afectado. Para esto, los biomateriales necesitan interactuar con el medio biológico y enlazarse adecuadamente con los tejidos circundantes.<sup>[16]</sup>

El éxito de cualquier implante endoóseo se basa en la creación de una interfaz mecánica fuerte entre la superficie del material del implante y el tejido óseo, sin la intervención de ningún tejido fibroso.<sup>[9]</sup> Esfuerzos considerables se han realizado en los últimos años para optimizar la topografía de implantes de titanio para su uso en contacto con el tejido óseo. Dichos esfuerzos se han concentrado principalmente en desarrollar superficies que reduzcan los tiempos de curación y que aceleren la integración del implante con el tejido receptor.

Una de las principales causas de fracaso de los implantes y prótesis de titanio es la contaminación microbiana. Una vez colocado el dispositivo, este interactúa con los microorganismos eventualmente presentes en el organismo produciéndose la colonización de su superficie y la formación del *biofilm*.<sup>[17]</sup>

Modificar la superficie de los implantes y prótesis de titanio incorporando compuestos químicos que exhiban propiedades antibacterianas reduce la adhesión de bacterias sobre la superficie del dispositivo y constituye una forma eficiente para incrementar las posibilidades de éxito del tratamiento clínico.

Con el presente trabajo de investigación se pretende desarrollar superficies con diferentes niveles de rugosidad y que prevengan la contaminación microbiana de los implantes y prótesis de aleaciones de titanio.

### 1.3. Antecedentes

En el año 2017, Gao y colaboradores [18] plantearon que las modificaciones de la superficie son significativas para mejorar la oseointegración de los implantes de titanio durante el período de implantación temprano. Asimismo, se evidencia en este trabajo que el Zn es un oligoelemento esencial para el crecimiento óseo al promover la formación de hueso e inhibir la reabsorción ósea. Además, el Zn puede mejorar la diferenciación osteogénica regulando la expresión de genes relacionados. Por lo tanto, puede promover aún más la mineralización de la matriz extracelular al mejorar la síntesis de colágeno y la deposición de calcio para la formación de hueso. [18]

Gao y colaboradores también reportan la posibilidad de toxicidad celular si se liberan grandes cantidades de Zn al medio fisiológico. Aún no existe un consenso en cuanto a la concentración máxima inhibitoria de iones  $Zn^{2+}$  que puedan ser liberados al organismo sin causar toxicidad celular. [18]

Song y colaboradores informaron que la concentración inhibitoria media máxima de iones Zn fue de 10 ppm.[19] Por otra parte, Ito y colaboradores demostraron que 3 ppm de Zn no era citotóxico en un estudio *in vitro* realizado.[20] Sin embargo, otros estudios confirmaron que la concentración más alta de iones Zn sin toxicidad celular fue de 2 ppm.[21] Por lo tanto, es importante controlar estrictamente la concentración de Zn que se libera al medio.

Gao y colaboradores también describen los principales métodos que se han empleado para la modificación superficial de aleaciones de titanio empleando diferentes compuestos de Zn. [18] En este análisis destaca un método empleado por varios grupos de investigadores que consiste en la aplicación de un tratamiento alcalino en caliente empleando una solución que contiene el ion complejo  $[Zn(OH)_4]^{2-}$ . [22-24]

## **1.4. Hipótesis**

Por medio de tratamientos químicos sucesivos que incluyen una modificación final utilizando una solución alcalina que contiene Zn, es posible obtener en la superficie de la aleación Ti6Al4V topografías que se caracterizan por su capacidad de liberar Zn, inhibir la contaminación microbiana y no resultar citotóxicos.

## **1.5. Objetivos**

### **1.5.1. Objetivo General**

Obtener, mediante métodos químicos y/o termoquímicos, modificaciones superficiales en la aleación Ti6Al4V que permitan liberar Zn en niveles que prevengan la contaminación microbiana.

### **1.5.2. Objetivos Específicos**

1. Modificar la superficie de la aleación Ti6Al4V mediante procesos químicos y(o) termoquímicos.
2. Formar compuestos de Zn en las superficies previamente modificadas de la aleación Ti6Al4V mediante procesos químicos.
3. Caracterizar las superficies obtenidas.
4. Evaluar *in vitro* las superficies obtenidas.

## Capítulo 2

# FUNDAMENTO TEÓRICO

### 2.1. El titanio y sus aleaciones

Diferentes tipos de materiales (metales, cerámicas, polímeros, compuestos) se usan actualmente para fabricar implantes, prótesis y dispositivos biomédicos de forma general. No obstante, los metales constituyen el estándar de oro en implantología debido, entre otros factores, a sus propiedades mecánicas, resistencia a la corrosión y biocompatibilidad.

Los aceros inoxidable (como el AISI-316L), así como el titanio y sus aleaciones (como el Titanio comercialmente puro (CP), la aleación Ti6Al4V y la aleación con memoria de forma TiNi) son empleados extensamente en ortopedia, odontología y cardiología.<sup>[1]</sup> Por otro lado, debido a su bajo coeficiente de fricción y alta resistencia al desgaste, las aleaciones Cr-Co se emplean en la fabricación de componentes para prótesis articulares de cadera y rodilla.

El tántalo se ha empleado para crear estructuras porosas tridimensionales que favorecen el crecimiento óseo para su implantación en la columna vertebral. Los biomateriales metálicos degradables (como las aleaciones a base de magnesio y hierro) han adquirido cada vez mayor interés para aplicaciones esqueléticas y cardiovasculares (por ejemplo: alambres, placas de fijación, stent) que no requieren la presencia permanente de un dispositivo implantado.<sup>[1]</sup>

Varios estudios evalúan la biocompatibilidad de diferentes materiales de uso común en la fabricación de dispositivos implantables para sustitución ósea. Se

reporta que el titanio es el material a escoger debido a su alta resistencia a la corrosión causada por el ambiente fisiológico y su estabilidad mecánica durante todo el proceso de cicatrización.

El titanio es un metal de transición muy abundante en la naturaleza. Fue descubierto en 1794, pero no fue hasta 1936 que se lograra desarrollar una metodología factible para separarlo del mineral debido a su alta afinidad con el oxígeno. Después del aluminio, el hierro y el magnesio, el titanio es considerado el cuarto elemento metálico más empleado en la industria actualmente. Aun cuando su densidad es de  $4,51 \text{ g.cm}^{-3}$ , es considerado como un metal ligero. El titanio puede formar soluciones sólidas y compuestos, con enlace metálico, covalente o iónico al alearse con determinados elementos (Figura 1) para producir componentes muy resistentes que son utilizados por las industrias aeroespacial, aeronáutica, militar, petroquímica, agroindustrial, automovilística y médica.

Así, las aleaciones de titanio se pueden clasificar en 4 grupos fundamentales en función de la microestructura que presentan a temperatura ambiente y según la capacidad de los aleantes de estabilizar la fase  $\alpha$  o  $\beta$ : Ti c.p., aleaciones tipo  $\alpha$ , aleaciones tipo  $\beta$  y aleaciones  $\alpha/\beta$ .

H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	Uun	Uuu	Uub	Uut	Uuq	Uup	Uuh	Uus	Uuo

— Elementos estabilizadores de la fase  $\alpha$   
— Elementos estabilizadores de la fase  $\beta$   
— Elementos neutros

**Figura 1.** Tabla periódica de los elementos estabilizadores de las fases  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\alpha/\beta$ .

Algunos elementos aleantes en estado puro, como el cobalto, el níquel, el aluminio o el vanadio, son en general tóxicos y en muchas ocasiones producen reacciones alérgicas. Sin embargo, estando aleados como soluciones sólidas, la cantidad de iones que se liberan en el medio fisiológico es insignificante y por tanto no suponen riesgo.<sup>[25]</sup>

Características como: excelente biocompatibilidad, adecuadas propiedades mecánicas, alta resistencia a la corrosión en medio biológico, su relativamente bajo módulo de elasticidad y su gran capacidad para oseointegrarse, hacen de las aleaciones de titanio una de las principales familias de metales seleccionadas para la fabricación de prótesis e implantes para sustituir el tejido óseo. El niobio, el tántalo, el circonio, el vanadio, el aluminio y el molibdeno son los elementos más favorables para ser usados en aleaciones de titanio con fines biomédicos.

Dentro de la gama de aleaciones de titanio reportadas en la actualidad, el titanio comercialmente puro (Ti c.p.) y la aleación Ti6Al4V son las más empleadas en la industria biomédica para la fabricación de dispositivos implantables como sustitutos óseos. En la Tabla 1 se muestra la composición de la aleación Ti6Al4V comercial según la norma ASTM F136-13.

**Tabla 1.** Composición química según la norma ASTM F136-13 para la aleación Ti6Al4V.

Elemento	%e.p.
Aluminio	5.5 - 6.5
Vanadio	3.5 – 4.5
Carbono máx.	0.08
Hierro máx.	0.25
Oxígeno máx.	0.13
Nitrógeno máx.	0.05
Hidrógeno máx.	0.012
Titanio	Balance

La aleación Ti6Al4V (denominada también Ti grado 5, según norma ASTM B367-13(2017) pertenece al grupo del tipo  $\alpha/\beta$  y es la aleación de titanio más utilizada. Presenta una composición química de 6 %e.p. de aluminio, 4 %e.p. de vanadio,



0.25 %e.p. (máximo) de hierro, 0.2 %e.p. (máximo) de oxígeno, y el resto de titanio.

## **2.2. Pasivación del Titanio**

Los metales que tienen la capacidad de formar una película de óxido en su superficie que los proteja de la corrosión, son los adecuados para la fabricación de dispositivos biomédicos. Los metales y aleaciones que poseen esta característica se denominan pasivables y a la película, pasivante.

Una vez que el titanio entra en contacto con el aire, en cuestión de nanosegundos se comienza a crear una capa superficial de óxido de titanio, y en menos de 1 segundo queda creada la capa externa con un grosor entre 3 y 7 nm.

El titanio y sus aleaciones desarrollan óxidos superficiales sumamente estables, de alta integridad, tenacidad y adherencia. Si este óxido superficial es rayado o dañado, se regenera inmediatamente en presencia de aire o agua.

La película protectora de óxido es favorecida a medida que aumenta el carácter oxidante del ambiente. Por ello el titanio resiste a la corrosión en ambientes levemente reductores, neutros y altamente oxidantes hasta temperaturas elevadas. Resiste la acción de ácidos agresivos -excepto en altas concentraciones de ácido clorhídrico y fluorhídrico- que destruyen rápidamente a otros metales como el acero inoxidable.

La formación de esta capa pasivante de óxido, químicamente estable, altamente adherente y protectora es la causa de la excelente resistencia a la corrosión del titanio y sus aleaciones. La naturaleza, composición y espesor de la capa de óxido protectora formada en el titanio y sus aleaciones depende de las condiciones ambientales.

Desde el punto de vista microscópico, la capa pasivante se forma y se disuelve continuamente en soluciones acuosas. Como consecuencia de lo anterior, es posible incorporar diferentes elementos en la disolución para que formen parte

de la capa de óxido que se genera. Esto posibilita la adsorción de iones calcio y fosfato en la capa de óxido.

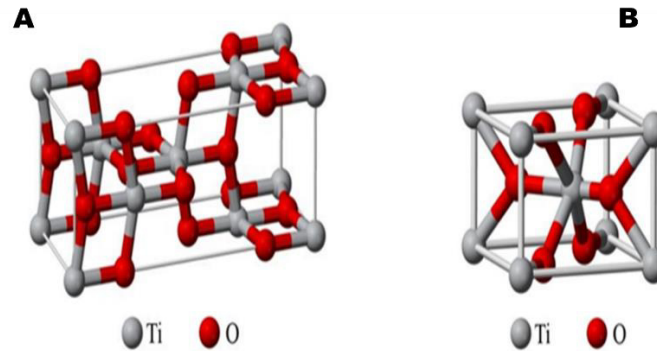
Generalmente, la composición de la capa de óxido se basa en el monóxido de titanio u óxido de titanio II (TiO), en el óxido de titanio III o trióxido de dititanio (Ti<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) o en el óxido de titanio IV o dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>); siendo esta última la que se presenta con mayor frecuencia. El TiO<sub>2</sub>, debido a su amplio espectro de aplicaciones, es considerado el óxido de titanio por excelencia.

El TiO<sub>2</sub> es un material alotrópico, encontrándose de forma natural en tres fases cristalinas: la brookita (romboédrica), la anatasa y el rutilo (ambas tetragonales, como se muestra en la Figura 2).<sup>[26]</sup> Estas fases presentan elevada resistividad eléctrica, considerable dureza, estimada en el intervalo entre 5 – 6,5 en la escala de Mohs, son transparentes en el espectro visible (ancho de banda prohibida alrededor de 3 eV), birrefringentes y poseen los mayores valores de índice de refracción entre todos los óxidos conocidos (Tabla 2).

**Tabla 2.** Propiedades físicas del TiO<sub>2</sub>.<sup>[26]</sup>

Fase	Parámetros de red (Å)			Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	Resistividad eléctrica (Ωm)	Índice de refracción
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>			
Brookita	9,18	5,45	5,15	4,14	10 <sup>13</sup>	2,58
Anatasa	3,79	3,79	9,51	3,89	10 <sup>13</sup>	2,55
Rutilo	4,59	4,59	2,96	4,25	10 <sup>13</sup>	2,62

La superficie de la fase anatasa permite un elevado intercambio de iones calcio (Ca<sup>2+</sup>) y fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>). Por lo anterior es la variedad de mayor interés en el campo de los biomateriales (Figura 2) pues favorece el crecimiento óseo. Además, esta fase ofrece una enorme resistencia a la acción de sustancias corrosivas e impide la difusión de iones desde el interior del implante hacia el organismo.



**Figura 2.** Estructura cristalina de la anatasa (A) y del rutilo (B).

### 2.3. La oseointegración

Cuando un cuerpo extraño, como un implante o prótesis, es colocado dentro del organismo humano; su superficie interactúa con los tejidos vivos que rodean el sitio de la implantación. En dependencia de la localización donde se implante el dispositivo, hay varios factores que deben ser considerados. Por ejemplo, si el dispositivo está destinado a estar en contacto con la sangre (catéter, stent, etc.), es crucial analizar la hemocompatibilidad del biomaterial; mientras que, para aplicaciones óseas, la oseointegración es el parámetro principal a considerar.<sup>[9]</sup>

La oseointegración es la conexión firme, estable y duradera entre un dispositivo biomédico implantado y el hueso que lo rodea. <sup>[9, 27, 28]</sup> Una adecuada oseointegración está sujeta a la aceptación del implante por parte de los tejidos vivos sin la formación de tejido fibroso en la interfaz hueso-implante y sin la presencia de síntomas de inflamación severa.

La interfaz hueso-implante debe considerarse como el resultado de la interacción de un conjunto de factores que modulan la respuesta biológica y que determinan el éxito de la oseointegración. Para lograr una adecuada oseointegración el implante debe tener una correcta fijación inicial o estabilidad primaria una vez colocado en el sitio receptor. Esta estabilidad primaria es el resultado del contacto o fricción que se establece siguiendo la colocación del implante, entre el hueso mineralizado, frecuentemente el hueso cortical en el sitio receptor y la superficie del implante. <sup>[9]</sup>

Son varios los factores esenciales para conseguir una buena oseointegración y que constituyen la base de la práctica clínica e ingenieril en la implantología. Algunos de ellos son: el estado del hueso receptor y la técnica quirúrgica empleada para colocar el dispositivo, así como las condiciones de carga a la que se somete el dispositivo una vez implantado. Además, desempeñan un rol fundamental en la oseointegración: el diseño macroscópico y dimensional del dispositivo; su material de fabricación y la calidad superficial del implante pues es en la superficie donde se desarrollan los procesos de adhesión, diferenciación y proliferación celular.<sup>[9]</sup>

Por otro lado, el proceso de oseointegración ocurre en la superficie del implante, lugar donde el hueso se adhiere al material y crece. Esta reacción, normalmente, sólo se presenta en los materiales bioactivos, razón por la cual se ha reportado la necesidad de conseguir que la superficie del material pase a ser bioactiva, mediante la realización de diferentes tratamientos.

Entre los diversos parámetros que influyen en el éxito de los implantes, la interfaz hueso-implante juega un papel importante en prolongar la longevidad y mejorar la función de las prótesis implanto-soportadas. Son varios los métodos para mejorar la interfaz hueso-implante y promover una osteointegración más rápida y eficaz.<sup>[27, 29]</sup>

La calidad de los implantes depende de las características químicas, físicas, mecánicas y topográficas de la superficie. La composición química, topografía, mojabilidad, carga, energía superficial, estructura cristalina, rugosidad, potencial químico, presencia de impurezas y espesor de la capa de óxido de titanio influyen significativamente en el logro de una adecuada oseointegración, así como en acortar los tiempos de cicatrización. Estas propiedades interactúan y determinan la actividad de las células cercanas a la superficie del implante.

La osteogénesis en la superficie del implante está influenciada por diferentes mecanismos. Una serie de eventos coordinados, incluyendo la proliferación celular, la transformación de osteoblastos y la formación de tejido óseo se

encuentran afectados por la topografía. Aumentar la rugosidad superficial y el área de contacto entre el hueso y el implante constituye, actualmente, una meta.

Entre los factores que influyen sobre el contacto hueso implante se encuentran la topografía, la composición química, la energía superficial y la mojabilidad, siendo esta última la de mayor influencia. La mojabilidad superficial depende en gran medida de la energía superficial y actúa sobre el contacto del implante con el ambiente fisiológico.<sup>[14]</sup>

Por otro lado, las superficies rugosas influyen positivamente sobre la migración y proliferación celular, lo que a su vez conduce a mejorar el contacto hueso-implante. Lo anterior sugiere que la microestructura del implante influye en la interacción biomaterial-tejido.

## **2.4. La rugosidad superficial**

La topografía desempeña un rol fundamental en la oseointegración de implantes de titanio.<sup>[30]</sup> Estudios *in vitro* e *in vivo* muestran que la rugosidad superficial influye sobre determinados eventos que condicionan el comportamiento de los osteoblastos. Algunos de estos eventos son la propagación y proliferación, la diferenciación y la síntesis de proteínas. La rugosidad superficial se divide, según las dimensiones de la topografía en macro, micro y nano-rugosidad.<sup>[7]</sup>

La macro-rugosidad comprende topografías en el intervalo de los milímetros a las decimas de micrómetros. Esta escala se encuentra directamente relacionada con la geometría del implante y con la presencia de macro poros como consecuencia de tratamientos superficiales. Niveles apropiados de macro-rugosidades pueden mejorar la fijación primaria del implante, así como su estabilidad mecánica a largo plazo.

La micro-rugosidad se define en el intervalo de 1-10  $\mu\text{m}$ . Este nivel de rugosidad maximiza la unión entre el hueso mineralizado y la superficie del implante. Las superficies micro-rugosas, en aleaciones de titanio, generalmente se caracterizan

por ser biocompatibles, así como mejorar la formación de nuevo hueso y prevenir la reabsorción ósea. Los métodos más comunes para crear superficies micro-rugosas en el titanio son, por ejemplo: el plasma espray, el bombardeo con partículas cerámicas, la anodización y el grabado ácido.<sup>[7]</sup>

El uso de superficies con topografías a escala nanométricas (nano-rugosas) se ha extendido en los últimos años. La nanotecnología involucra materiales de dimensiones nanométricas o que presentan topografías en el intervalo entre 1 y 100 nm. La rugosidad a escala nanométrica desempeña un rol fundamental en la adsorción de proteínas, en la adhesión de osteoblastos y por tanto en el éxito de la oseointegración.<sup>[7]</sup>

## **2.5. Modificación superficial de las aleaciones de titanio**

Esfuerzos considerables se han realizado en los últimos años para optimizar la topografía de implantes de titanio para su uso en contacto con el tejido óseo. Dichos esfuerzos se han concentrado principalmente en desarrollar superficies que reduzcan los tiempos de curación y que aceleren la integración del implante con el tejido receptor.<sup>[29]</sup>

La modificación superficial de los biomateriales puede dividirse en dos enfoques principales con el objetivo de acelerar la unión del implante al hueso. La primera variante es incorporar fases inorgánicas como fosfatos de calcio en la superficie del biomaterial, las cuales estimulan la formación de hueso y mejoran la interconexión bioquímica entre el hueso y la superficie del material. Además, es posible incorporar moléculas orgánicas como péptidos y proteínas en la superficie para estimular respuestas específicas en las células.<sup>[29]</sup>

El segundo enfoque se basa en la modificación de la arquitectura de la superficie o topografía debido a que la rugosidad superficial puede incrementar el anclaje del implante al hueso. Además, la rugosidad incrementa el área superficial, así como la energía de la superficie del material, lo cual mejora la adsorción de proteínas, la adhesión y proliferación celular y finalmente la oseointegración.<sup>[29]</sup>

Para evitar la formación de tejido fibroso en lugar de tejido óseo, las superficies de los implantes de titanio son expuestas a tratamientos que crean patrones a escala macro, micro y nanométrica. Estos patrones aumentan la retención de moléculas y/o células osteoprogenitoras presentes en la interfaz hueso-implante que conducen a un aumento en el grado de formación de los nuevos tejidos.<sup>[31]</sup>

Los métodos empleados para modificar la superficie de los implantes pueden clasificarse, de forma general, en tres tipos: mecánicos, físicos y químicos y electroquímicos.<sup>[2]</sup> Estos métodos son usados para cambiar la estructura, la composición química y la morfología de la superficie del implante. Estas técnicas se emplean con el objetivo de mejorar las propiedades biomecánicas del implante, así como para estimular la formación de hueso nuevo y mejorar la oseointegración. Además, se usan también para eliminar contaminantes de la superficie del implante y mejorar la resistencia al desgaste y a la corrosión de dichos dispositivos.<sup>[2]</sup>

### **2.5.1. Métodos mecánicos**

Los métodos mecánicos de modificación superficial incluyen el chorreado, el mecanizado y el pulido, entre otros. Generalmente, estas técnicas resultan en superficies que pueden ser tanto ásperas como lisas. Dichas superficies pueden mejorar la adhesión, proliferación y diferenciación celular.<sup>[2]</sup>

El chorreado consiste en bombardear pequeñas partículas, generalmente comprimidas en aire, con determinadas formas y tamaños sobre la superficie del implante.<sup>[32]</sup> Las superficies de titanio sometidas a esta técnica presentan microtopografías irregulares. El grado específico de rugosidades obtenido mediante este método depende de varios parámetros. Tal es el caso del tamaño y forma de las partículas, la duración del bombardeo, la presión del aire y la distancia entre la fuente de las partículas y la superficie del implante. Además, este método es empleado para limpiar la superficie del implante e incrementar su bioactividad. Se ha demostrado que superficies de implantes de titanio sometidas a esta técnica aceleran significativamente la adhesión y proliferación de osteoblastos al mismo tiempo que compromete estos procesos para los

fibroblastos. Lo anterior promueve la oseointegración del implante. Las partículas más empleadas son la sílice ( $\text{SiO}_2$ ), la alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), el dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) y la hidroxiapatita (HA).<sup>[33-35]</sup>

### **2.5.2. Métodos físicos**

Gran variedad de métodos físicos ha sido empleada para generar topografías bioactivas en la superficie de los metales.<sup>[1]</sup> Los métodos físicos de modificación superficial incluyen el *plasma spray*, la deposición de iones y capas finas, la oxidación térmica, entre otros.<sup>[1, 2]</sup>

La técnica del *plasma spray* es considerada el método de recubrimiento más popular. Se basa en la inyección de polvos en un plasma o chorro de gas ionizado a altas temperaturas (10 000 °C). El chorro de gas proyecta las partículas sobre la superficie del implante, donde se depositan, fundiéndose en la superficie de las mismas, resolidificándose y uniéndose a las otras partículas. Esta técnica crea macrotopografías en la superficie del titanio con mayores niveles de rugosidad que las obtenidas empleando grabado ácido o recubrimientos con HA. Lo anterior beneficia el crecimiento de hueso, así como la oseointegración.

### **2.5.3. Métodos químicos y electroquímicos**

Los métodos químicos de modificación superficial se basan en la ocurrencia de reacciones químicas en la interfaz entre el sustrato y la solución a la que es sometido. Estas técnicas incluyen tratamientos químicos ácidos, alcalinos, con peróxido de hidrógeno, recubrimientos de HA, sol-gel, anodización, entre otros. Se aplican fundamentalmente para alterar la rugosidad, la composición elemental y de fase de la superficie, así como para mejorar la mojabilidad y la energía superficial.<sup>[2, 13]</sup>

A su vez, las técnicas electroquímicas constituyen uno de los métodos más comunes para modificar las superficies metálicas a escala nanométrica. La oxidación anódica se ha empleado exitosamente para transformar superficies lisas en estructuras nanotubulares con diámetros inferiores a los 100 nm.<sup>[1]</sup>



El grabado ácido consiste en sumergir el implante en ácidos fuertes como es el caso del ácido fluorhídrico (HF), el ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>), el ácido clorhídrico (HCl), el ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) o mezclas de estos por determinados periodos de tiempo y empleando temperaturas inferiores a 100 °C. Las soluciones que se emplean en el grabado ácido incluyen una mezcla de HNO<sub>3</sub> y HF o una mezcla de HCl y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.<sup>[32]</sup>

Con este método se pueden obtener en la superficie del titanio rugosidades de 0.5-3 µm con cavidades irregulares de diferentes profundidades. A su vez, esta técnica puede emplearse para eliminar los óxidos nativos y demás contaminantes presentes en la superficie del titanio.<sup>[34-36]</sup>

El ataque ácido provoca la formación de una delgada capa de óxido sobre la superficie, la cual presenta un espesor de alrededor de 10 nm. Dicha capa se encuentra constituida principalmente de TiO<sub>2</sub>, aunque pueden aparecer residuos de la mezcla ácida. Estas impurezas pueden permanecer en la capa de óxido incluso después de realizar un posterior tratamiento térmico, por lo cual el tratamiento ácido es generalmente combinado con un segundo tratamiento para mejorar las propiedades bioactivas de las superficies.<sup>[27, 32, 36]</sup> El inconveniente de esta técnica es que puede ocasionar la formación de microgrietas en la superficie del titanio. Dichas microgrietas comprometen las propiedades mecánicas del implante, principalmente su resistencia a la fatiga.<sup>[35]</sup>

El grabado ácido puede ser empleado en combinación con otros métodos. En el caso en que se usa combinado con el *sandblasting* (chorreado con sílice, alúmina, dióxido de titanio, entre otros) se le conoce como SLA. Esta combinación de tratamientos acelera la oseointegración y a su vez mejora la estabilidad de los implantes de titanio.<sup>[32]</sup> La superficie es sometida a *sandblasting* con partículas grandes lo que provoca topografías en escala macrométrica. Posteriormente, los implantes son sometidos a grabado ácido para formar microcavidades en esta superficie.<sup>[33, 35, 37]</sup>

Los tratamientos químicos con peróxido de hidrógeno dan como resultado la oxidación de la superficie del titanio. Sobre la superficie del titanio se forma una

capa delgada y amorfa, compuesta fundamentalmente por una mezcla de peróxocomplejos de titanio. Esta estructura amorfa cristaliza en la fase anatasa del dióxido de titanio al ser calentada a temperaturas superiores a 300 °C, con lo cual se obtiene una superficie altamente bioactiva.<sup>[38-41]</sup> En la realización de este tratamiento se utilizan generalmente concentraciones de peróxido de hidrógeno entre 0.3 y 30 %, así como temperaturas hasta 80 °C y períodos de exposición entre 15 min y 6 h. También se pueden utilizar bajas concentraciones de los ácidos sulfúrico y clorhídrico para incrementar el poder oxidante del peróxido.<sup>[33, 38-40]</sup>

Los recubrimientos con HA ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) tienen su base en que esta fase es el componente inorgánico fundamental del tejido óseo. En la práctica, la HA artificial es comúnmente usada como un biomaterial que presenta excelente biocompatibilidad. De esta forma se logra combinar las propiedades mecánicas del titanio con la bioactividad y biocompatibilidad de la HA.<sup>[35]</sup> En dependencia del método empleado en la síntesis de la HA, el material resultante puede ser tanto macro como microporoso. La HA puede depositarse en la superficie del titanio por *plasma spray*, deposición sol-gel, prensado isostático en caliente, electrodeposición, pulverización por haz de iones o empleando el método biomimético. Con este último, se producen recubrimientos de HA en soluciones acuosas a temperaturas fisiológicas.<sup>[35]</sup>

La anodización es un proceso mediante el cual se deposita una capa de óxido en la superficie del titanio mediante reacciones electroquímicas. En este proceso, la superficie a ser oxidada funciona como ánodo en una celda electroquímica donde una solución de ácidos funciona como electrolito. El espesor de la capa de óxido obtenida mediante este método puede cambiarse al variar los parámetros del proceso electroquímico.<sup>[32, 35]</sup>

La técnica del sol-gel representa un procedimiento simple y barato para depositar capas finas de recubrimientos con composición química homogénea sobre sustratos de dimensiones grandes y diseños complejos. Se emplea para depositar recubrimientos cerámicos, fundamentalmente de HA, sobre la

superficie de los implantes metálicos. Mediante este método es posible obtener recubrimientos de espesor inferior a los 10  $\mu\text{m}$ . Este proceso mejora la actividad biológica del titanio y contribuye a la formación de hueso y la oseointegración. Empleando esta técnica se pueden obtener recubrimientos de diferentes materiales. Tal es el caso del  $\text{TiO}_2$ , CaP, compuestos de  $\text{TiO}_2$ -CaP y recubrimientos basados en sílice.<sup>[35]</sup>

## **2.6. Contaminación microbiana de implantes y prótesis. Estrategias para prevenir la contaminación microbiana de los implantes**

La contaminación microbiana de los dispositivos biomédicos implantados constituye uno de los problemas más serios en cirugía debido a que causa infecciones devastadoras y, en muchos casos, la pérdida del implante. Son varios los factores que condicionan la contaminación microbiana. Algunos de estos son: la composición química del material, las propiedades físicas de la superficie del dispositivo, el diseño del mismo, el sitio anatómico implantado, la extensión de la invasión quirúrgica y el tiempo de permanencia del dispositivo.<sup>[42-44]</sup>

Varias estrategias han sido desarrolladas para prevenir o reducir la contaminación en el campo de los biomateriales.<sup>[45]</sup> Las mismas incluyen modificaciones morfológicas o en las propiedades físicas y química de la superficie. Lo anterior puede realizarse mediante diferentes tecnologías, incluyendo la implantación de iones, los tratamientos con plasma y la deposición electroquímica. Modificaciones químicas de la superficie pueden obtenerse con las mismas técnicas. Además, se ha propuesto lograr efectos antimicrobianos mediante la adhesión de moléculas inhibidoras.<sup>[42]</sup>

## **2.7. El Zn como agente antimicrobiano. Incorporación de iones Zn<sup>2+</sup> en la superficie de aleaciones de titanio**

Cuando ocurre la infección, las bacterias tienden a agregarse en una matriz polimérica hidratada y formar el *biofilm* en la superficie del implante. Dicha matriz puede ser destruida mediante el empleo de agentes antibacterianos provenientes del exterior.<sup>[15]</sup>

Modificar la superficie de los implantes y prótesis de aleaciones de titanio empleando recubrimientos con compuestos químicos que exhiban propiedades antibacterianas reduce la adhesión de bacterias sobre la superficie del dispositivo y constituye una forma eficiente para incrementar las posibilidades de éxito del tratamiento clínico.<sup>[22, 46]</sup> Un gran número de formas químicas de la plata (metal, sales y nano partículas de plata) han sido investigadas como agentes antibacterianos debido a su amplio espectro de acción antimicrobiana. Sin embargo, el empleo de la plata como agente antibacteriano se encuentra limitado debido a la toxicidad de dicho elemento. La difusión de iones de plata al interior de las células puede causar daños en las funciones intracelulares.<sup>[47-50]</sup> Debido a lo anterior es necesario desarrollar agentes inorgánicos con alta actividad antibacteriana, que no causen daños al organismo y que además sean osteoconductivos.<sup>[15]</sup>

El Zn es el segundo elemento traza más abundante en el hueso humano (110–300 µg/kg) y participa activamente en su mineralización. Las especies de Zn participan en diversas funciones biológicas en el organismo, tales como: síntesis de ADN, actividad enzimática, metabolismo de ácidos nucleicos, biomineralización y actividad hormonal. A su vez, el Zn también posee excelentes cualidades antibacterianas.<sup>[15, 51-53]</sup>

El empleo de materiales que contienen Zn ha sido de interés debido a su amplio uso en tratamientos clínicos estomatológicos por su fuerte actividad antimicrobiana que puede inhibir el crecimiento de bacterias. Además, el óxido de Zn ha sido empleado como recubrimientos en tratamientos clínicos

ortopédicos y dentales como agente antibacteriano.<sup>[46, 54]</sup> La incorporación de Zn en biovidrios y biocerámicas de fosfatos de calcio (Ca-P) y de silicatos de calcio (Ca-Si) para mejorar sus propiedades mecánicas y la interacción célula-material ha atraído considerable atención en diferentes grupos de investigación. Por otro lado, la actividad antibacteriana del Zn y su capacidad para incidir sobre la formación del tejido óseo no han sido muy investigadas en conjunto.<sup>[15]</sup>

A pesar de que el TiO<sub>2</sub> posee buena biocompatibilidad y estabilidad *in vivo* a largo plazo, y que es posible incorporar Zn en recubrimientos de TiO<sub>2</sub> para mejorar su actividad antibacteriana y la interacción célula-material,<sup>[15]</sup> el uso de biomateriales basados en óxido de titanio dopado con Zn no ha sido ampliamente estudiado.

Diferentes métodos han sido empleados para incorporar Zn en la superficie de dispositivos biomédicos fabricados base titanio.<sup>[18, 52]</sup> La técnica de *Plasma Electrolytic Oxidation* (PEO), también conocida como *micro-arc oxidation*, ha sido empleada para preparar recubrimientos de TiO<sub>2</sub> con Zn incorporado.<sup>[15]</sup>

EL método conocido como *electroplating* ha sido empleado para depositar ZnO sobre placas de titanio.<sup>[46]</sup> Estructuras en forma de nanotubos que incorporan Zn han sido fabricadas en el titanio para mejorar tanto las propiedades osteogénicas del material como el efecto antibacteriano.<sup>[55]</sup> Disoluciones con diferentes concentraciones de ZnCl<sub>2</sub> han sido empleadas para recubrir placas de titanio empleando la técnica del *spin-coated*. Dichas placas fueron previamente pulidas y sometidas a grabado ácido empleando HF antes de ser recubiertas.<sup>[56]</sup> Por otro lado, se han empleado procesos hidrotérmicos con soluciones de [Zn(OH)<sub>4</sub>]<sup>2-</sup> para incorporar iones Zn<sup>2+</sup> en la superficie del titanio.<sup>[23]</sup> Además, soluciones de acetato de zinc y además, diferentes métodos como el sol-gel y el *plasma-spray* se han utilizado para incorporar dicho elemento a la superficie del titanio.<sup>[52]</sup>

# Capítulo 3

## METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 3.1. Procedimiento Experimental

El procedimiento experimental para el desarrollo de este trabajo de investigación se muestra en la Figura 3. La Tabla 3 muestra la nomenclatura empleada para identificar cada una de las superficies obtenidas en función de la combinación de tratamientos a la que fueron sometidas las muestras de cada uno de los grupos experimentales.

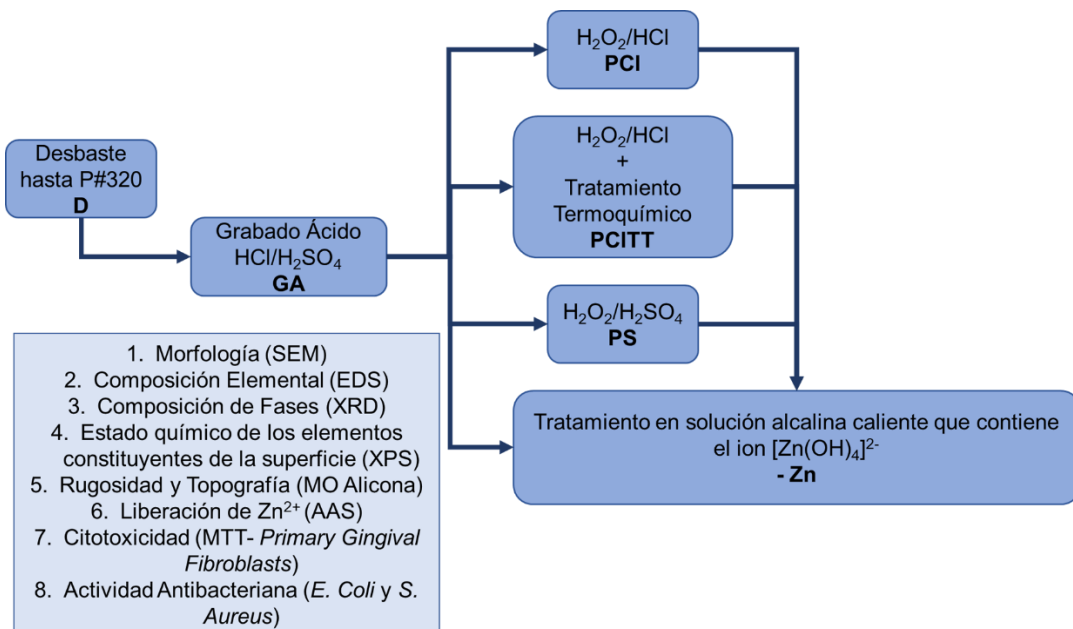


Figura 3. Metodología experimental desarrollada.

**Tabla 3.** Nomenclatura para cada grupo de superficies obtenidas.

<b>Grupo</b>	<b>Combinación de Tratamientos</b>
<b>D</b>	Desbaste
<b>GA</b>	D + Grabado Ácido
<b>GAZn</b>	D + Grabado Ácido + Zn
<b>PCI</b>	D + Grabado Ácido + Peróxido-Ácido Clorhídrico
<b>PCIZn</b>	D + Grabado Ácido + Peróxido-Ácido Clorhídrico + Zn
<b>PCITT</b>	D + Grabado Ácido + Peróxido-Ácido Clorhídrico + T. Termoquímico
<b>PCITTZn</b>	D + Grabado Ácido + Peróxido-Ácido Clorhídrico + T. Termoquímico + Zn
<b>PS</b>	D + Grabado Ácido + Peróxido-Ácido Sulfúrico
<b>PSZn</b>	D + Grabado Ácido + Peróxido-Ácido Sulfúrico + Zn

### **3.2. Preparación inicial de las muestras**

Para el desarrollo de esta investigación se empleó muestras cilíndricas de 8 mm diámetro y 3 mm de espesor de la aleación Ti6Al4V *ELI*. En una primera etapa, luego de realizado el corte de las muestras, estas fueron desbastadas (D) gradualmente empleando papel abrasivo de carburo de silicio (SiC) para lograr una rugosidad homogénea en su superficie.

El desbaste de la superficie de las muestras se realizó en una pulidora de platos rotatorios (*Struers Labopol-1*) empleando la siguiente secuencia de lijas: P#80, P#120, P#220 y P#320. A continuación, las muestras se colocaron en un baño ultrasónico, en agua destilada durante 20 minutos y se dejaron secar a temperatura ambiente.

### **3.3. Grabado ácido**

Las muestras desbastadas se sometieron a un tratamiento de grabado ácido (GA) empleando una variante de solución ácida compuesta por una mezcla de ácido clorhídrico (HCl) y ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) al 67 % con relación v/v 1:1. Las muestras se sumergieron en esta mezcla durante 20 minutos a 80 °C. Luego, fueron extraídas de la mezcla ácida y se enjuagaron con abundante agua destilada. Por último, se colocaron en un baño ultrasónico, en agua destilada, durante 20 minutos y se dejaron secar a temperatura ambiente.

### 3.4. Tratamientos con peróxido de hidrógeno

Luego de realizada la limpieza superficial empleando el grabado ácido, se manejaron tres variantes de tratamiento de oxidación superficial para activar la superficie de la aleación. Para la aplicación de estos tratamientos se dividieron las muestras en tres grupos.

La variante 1 (PCI) de dicho tratamiento consistió en sumergir las muestras en una mezcla de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y ácido clorhídrico (HCl) a  $80\text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 minutos ( $H_2O_2$  8.8 mol/L y HCl 0.1 mol/L con relación v/v 1:1). Al finalizar el proceso, las muestras se extrajeron de la mezcla oxidante y se enjuagaron con abundante agua destilada para dejarlas secar a temperatura ambiente.

La variante 2 (PCITT) de tratamiento con peróxido consistió en una combinación de la variante 1 con un tratamiento termoquímico.

Una parte de las muestras sometidas a la variante 1 de oxidación con peróxido de hidrógeno se sometió a un posterior proceso de tratamiento térmico en una mufla, colocando las muestras de forma tal que la mayor parte de la superficie quedara expuesta para garantizar las condiciones adecuadas de oxidación. El régimen de temperatura empleado fue de  $400\text{ }^\circ\text{C}$  durante 1 hora, a presión atmosférica y ambiente de aire.

La variante 3 (PS) de tratamiento de oxidación superficial consistió en sumergir las muestras en una mezcla de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) a temperatura ambiente ( $\sim 25\text{ }^\circ\text{C}$ ) durante 2 horas ( $H_2O_2$  30% y  $H_2SO_4$  37N en una relación v/v 50:50). Luego, las probetas se extrajeron de la solución y se enjuagaron con abundante agua destilada para dejarlas secar a temperatura ambiente.

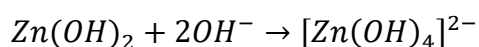


### 3.5. Tratamiento con solución alcalina caliente que contiene el ion $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$ para incorporar Zn en la superficie

Para incorporar iones  $\text{Zn}^{2+}$  en las superficies previamente modificadas, tanto con grabado ácido como con las tres variantes de tratamientos de oxidación superficial con peróxido de hidrógeno, las muestras se sometieron a un tratamiento alcalino caliente en una solución que contenía el ion complejo tetrahidroxozincato  $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$ . Las muestras fueron remojadas en 100 mL de esta solución a 60 °C durante 24 horas con agitación.

El ion  $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$  es un derivado del hidróxido de zinc que se puede obtener por diferentes vías. En este trabajo, para obtener el ion  $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$ , se preparó una solución con 100 mL de agua destilada agregando, con agitación, 15 g de nitrato de zinc hexahidratado  $[\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ . Posteriormente, se fue agregando gradualmente 25 g de hidróxido de sodio (NaOH).

Al inicio del proceso, según se va agregando el NaOH, se forma un precipitado de color blanco de  $\text{Zn}(\text{OH})_2$  y la solución se torna turbia y viscosa. Posteriormente, según se continúa agregando el NaOH, el precipitado blanco comienza a disolverse hasta obtener una solución transparente homogénea que contiene el ion  $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$  según la reacción química siguiente:



Luego de sumergir las muestras en la solución, esta no cambia de color ni se forman nuevos precipitados. Posteriormente, al transcurrir las 24 horas de tratamiento, las muestras fueron extraídas de la solución alcalina caliente y se enjuagaron con abundante agua destilada para dejarse secar a temperatura ambiente.

### **3.6. Caracterización y evaluación *in vitro* de las superficies modificadas**

Con el fin de evaluar la calidad de los tratamientos superficiales realizados sobre las muestras, se emplearon diferentes técnicas de caracterización y ensayos de evaluación *in vitro*, los cuales se mencionan a continuación.

#### **3.6.1. Microscopía Electrónica de Barrido**

La morfología y topografía de las diferentes superficies obtenidas se caracterizó empleando un Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo (*FESEM HITACHI SU8000*) con un voltaje de aceleración de electrones de 2.0 kV y una corriente de 10  $\mu$ A.

#### **3.6.2. Espectroscopía de Energía Dispersiva de Rayos X**

Para determinar la composición elemental de las superficies obtenidas se empleó un detector de energía dispersiva de Rayos X (EDS) acoplado a un Microscopio Electrónico de Barrido (*JEOL JSM– 6510LV*) utilizando un voltaje de aceleración de 20 kV.

#### **3.6.3. Difracción de Rayos X**

Para el análisis de las fases cristalinas formadas en cada una de las superficies obtenidas se utilizó un equipo de difracción de rayos X (*PANalytical Empyrean XRD*) empleando radiación Cu K $\alpha$  con  $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ . Se aplicó un voltaje de 45 kV y una corriente de 40 mA. El análisis se realizó en un intervalo ( $2\theta$ ) de 10-90 ° con un paso de 0.013 ° y un tiempo por paso de 10 seg.

#### **3.6.4. Espectrometría de Fotoelectrones Emitidos por Rayos X**

Los elementos presentes en las superficies se comprobaron mediante un Espectrómetro de Fotoelectrones Emitidos por Rayos X (*K-alpha<sup>TM</sup> Thermo Scientific<sup>TM</sup> XPS*) con una radiación monocromática de Al K $\alpha$  ( $h\nu=1486.68\text{eV}$ ). Todos los espectros se registraron con referencia al pico de C1s (284.6 eV). Se realizó un análisis de espectro completo y de alta resolución para los

elementos (Ti, Zn, Na, O y C) en cada una de las superficies y posteriormente se repitió el mismo análisis luego de realizar un decapado con iones  $\text{Ar}^+$  a una velocidad de 1.19 nm/seg durante 30 seg. Se empleó el software *Thermo Scientific™ Advantage™* para procesar las curvas obtenidas mediante el XPS.

### **3.6.5. Microscopía Óptica**

Para caracterizar la rugosidad y los parámetros topográficos de las diferentes superficies obtenidas se empleó un sistema de análisis superficial 3D *Alicona IF EdgeMaster*. Por medio de este sistema de medición óptica, empleando una magnificación x10, se determinaron los siguientes parámetros:

Ra- Rugosidad promedio del perfil.

Rz- Altura media del pico al valle del perfil de rugosidad.

Rmáx- Altura máxima de pico a valle del perfil de rugosidad dentro de una longitud de muestreo.

Sa- Altura promedio del área seleccionada.

### **3.6.6. Liberación de iones $\text{Zn}^{2+}$ al medio fisiológico**

La cantidad de iones  $\text{Zn}^{2+}$  liberados desde las superficies con Zn incorporado se evaluó en solución buffer fosfato salino (PBS1x pH=7.4). Las muestras se sumergieron en 100 mL de solución y se colocaron en un agitador orbital (*Orbital Incubator Prendo INO-650 M*) a 60 rpm y a temperatura de 37°C.

La solución fue reemplazada por solución fresca y las concentraciones de  $\text{Zn}^{2+}$  fueron medidas para 1, 3 y 7 días de incubación. Esta medición se realizó por Espectrometría de Absorción Atómica (*AAS Thermo Scientific™ iCE™ 3000*) controlada por software SOLAAR. De esta forma se obtuvo una curva acumulativa de concentraciones de iones  $\text{Zn}^{2+}$  liberados al medio para cada una de las superficies estudiadas.

Para preparar 1 L de solución buffer fosfato salino (PBS1x pH=7.4) se siguió el siguiente procedimiento:

1. Agregar 800 mL de agua ultra pura Tipo 1 en un beaker.
2. Adicionar 8 g de NaCl.
3. Adicionar 0.2 g de KCl.
4. Adicionar 1.44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.
5. Adicionar 0.24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
6. Ajustar el pH a 7.4 con HCl.
7. Agregar el agua necesaria para completar 1 L de solución.

Se empleó un límite de detección de 0.002 µg/mL (0.002 ppm) en una línea de emisión de 213.9 nm para las mediciones por AAS, obteniéndose las concentraciones de Zn<sup>2+</sup> en µg/mL de solución.

### **3.6.7. Ensayo de Citotoxicidad**

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño que puede ser detectado. Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* se incluyen en los estudios de la primera fase de evaluación de los biomateriales y equipos médicos implantables.

Para la evaluación de la citotoxicidad de las superficies desarrolladas se empleó el método de reducción del Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5 difeniltetrazólico (MTT) siguiendo los estándares de la norma ISO 10991-5: 2009 *Biological Evaluation of Medical Devices, Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity* en su Anexo C.

El MTT es captado por las células y reducido por el enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazán. La capacidad de las células para reducir el MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular.

Para este ensayo, se preparó una suspensión de Fibroblastos Gingivales Primarios (*HGF- Primary Gingival Fibroblast*, ATCC® PCS-201-108 TM) con una concentración celular de aproximadamente 40 000 células/mL en *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)* complementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), 100 units/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina.

Se colocó 1 mL de la suspensión celular en cada pozo en una placa petri de 24 pozos y se dejó incubar por 24 horas a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> para permitir la adherencia de las células. Se empleó una incubadora (*Thermo Scientific Series 8000 WJ Incubator*).

Transcurrido el tiempo de incubación, se colocó el material a evaluar en los pozos, así como los controles de medio negativos (100 µL de FBS) y controles positivos (300 µL de Tritón al 5 %) y se dejó incubar durante 24 horas bajo las condiciones anteriores.

Posteriormente se retiró las muestras del material evaluado y el medio de cultivo y se realizó la prueba colorimétrica de reducción del MTT agregándose 200 µL de medio de cultivo fresco y 60 µL de MTT en cada pozo. Las placas se dejaron incubar durante 4 horas, protegiéndose de la luz para permitir la formación de cristales de formazán por reducción del MTT por las mitocondrias celulares.

Una vez transcurrido este tiempo, la solución de MTT fue retirada y se solubilizaron los cristales de formazán obtenidos con 200 µL de dimetilsulfoxido (DMSO) por pozo. Las placas se colocaron en una incubadora orbital (*Orbital Incubator Prendo INO-650 M*) durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente, se pasó el contenido de cada pozo de la placa de 24 hacia una de 96 pocillos, colocando 100 µL por pocillo, de esta forma, el contenido de un pozo en la placa de 24 se pasó a dos pozos en la placa de 96.

Finalmente se empleó un lector de microplacas (*IMark™ Microplate Absorbance Reader - Bio-RAD*) con una longitud de onda de 595 nm para cuantificar la formación de cristales registrando los cambios en la absorbancia.

Los resultados del ensayo de citotoxicidad se expresaron como porcentaje (%) de células vivas, según la siguiente relación:

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{(D.O \text{ de células tratadas})}{(D.O \text{ de células control negativo})} \times 100 \%$$

D.O: Densidad Óptica

### 3.6.8. Ensayo de sensibilidad antibacteriana

Para determinar la sensibilidad de las superficies obtenidas ante la presencia de microorganismos se realizó un estudio *in vitro* evaluando la actividad antibacteriana en presencia de bacterias gram negativas *E. Coli* (ATCC 43895) y gram positivas *S. Aureus* (ATCC 33592).

Para la realización de este experimento se ajustó una solución bacteriana de cada tipo de bacterias a 0.5 en la escala de McFarland a partir de un preinóculo incubado en medio *Brain Heart Infusion* (BHI) por 24 horas a 37 °C. Para las mediciones de absorbancia se empleó un espectrofotómetro (*Spectrophotometer SmartSpec™ Plus Bio-RAD Model: 273 BR 05577*) a una longitud de onda de 600 nm.

Las muestras con las diferentes superficies obtenidas se inocularon en 4 mL de la solución de bacterias correspondiente y posteriormente se colocaron en tubos de cultivo cargados previamente con 3 mL de BHI. Posteriormente se dejó incubar los tubos con las muestras inoculadas y el medio de cultivo durante 24 h a 37 °C.

Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron 10 diluciones seriadas en agua estéril y se sembraron 100 µL de la última dilución en placas Petri de cultivo en Agar Nutritivo para su incubación durante 24 horas y realizar el conteo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC).

El porcentaje de reducción de colonias de bacterias luego de ser recultivadas por 24 horas en agar se realizó empleando como control la superficie desbastada según la siguiente relación:

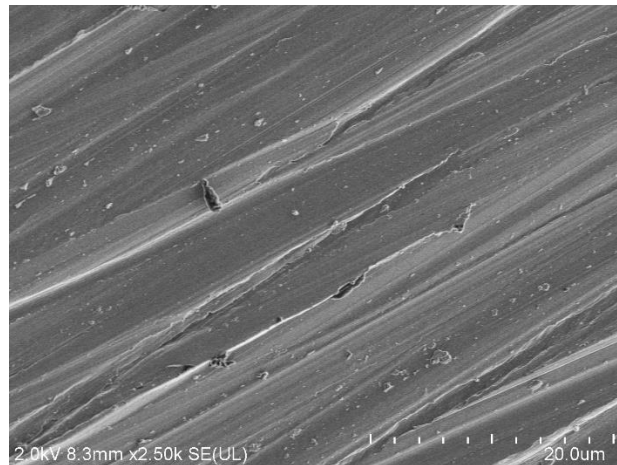
$$\% \text{ reducción de colonias} = 100\% - \left[ \frac{(\text{UFC de la superficie control}) \times 100\%}{(\text{UFC de la superficie evaluada})} \right]$$

## Capítulo 4

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

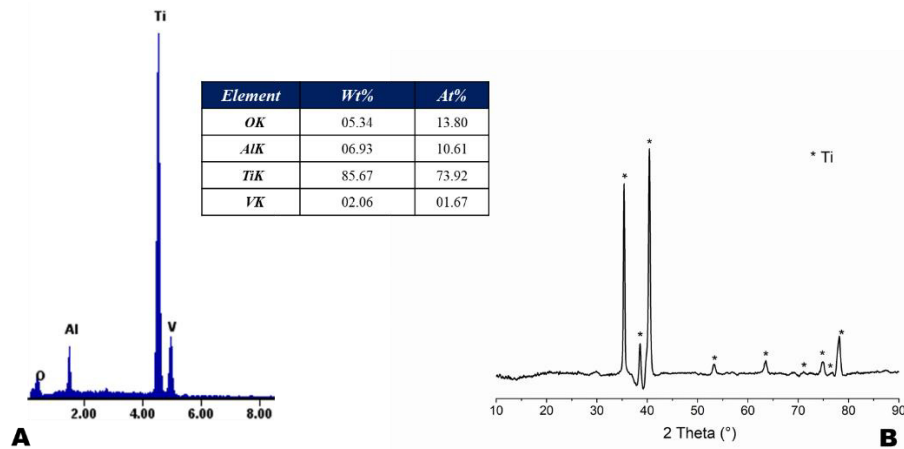
### 4.1. Caracterización inicial del sustrato

En la realización de este trabajo se emplearon muestras de Ti6Al4V, las que en su primera etapa fueron desbastadas (Superficie D) para homogenizar la superficie de todas las muestras. En la Figura 4 se muestra una micrografía de FESEM, donde se puede observar en esta superficie la presencia de rayas alineadas en la dirección en la que las partículas abrasivas se desplazaron durante el proceso de desbaste. Las caracterizaciones realizadas a esta superficie muestran valores de rugosidad superficial media (Ra) de  $0.44 \pm 0.14$   $\mu\text{m}$ .



**Figura 4.** Micrografía de FESEM de la superficie de la aleación Ti6Al4V desbastada.

En la Figura 5A se muestra el análisis de la composición elemental realizado por EDS para la superficie D. Se puede observar la presencia de los picos correspondientes al Titanio, Aluminio y Vanadio, propios de la aleación base. Se observa, además, la presencia de un pico correspondiente al oxígeno, debido a la pasivación propia de las aleaciones de titanio. Estos resultados se corresponden con los obtenidos mediante XRD (Figura 5B).



**Figura 5.** Espectros de EDS (A) y patrón de difracción por XRD (B) de la superficie desbastada.

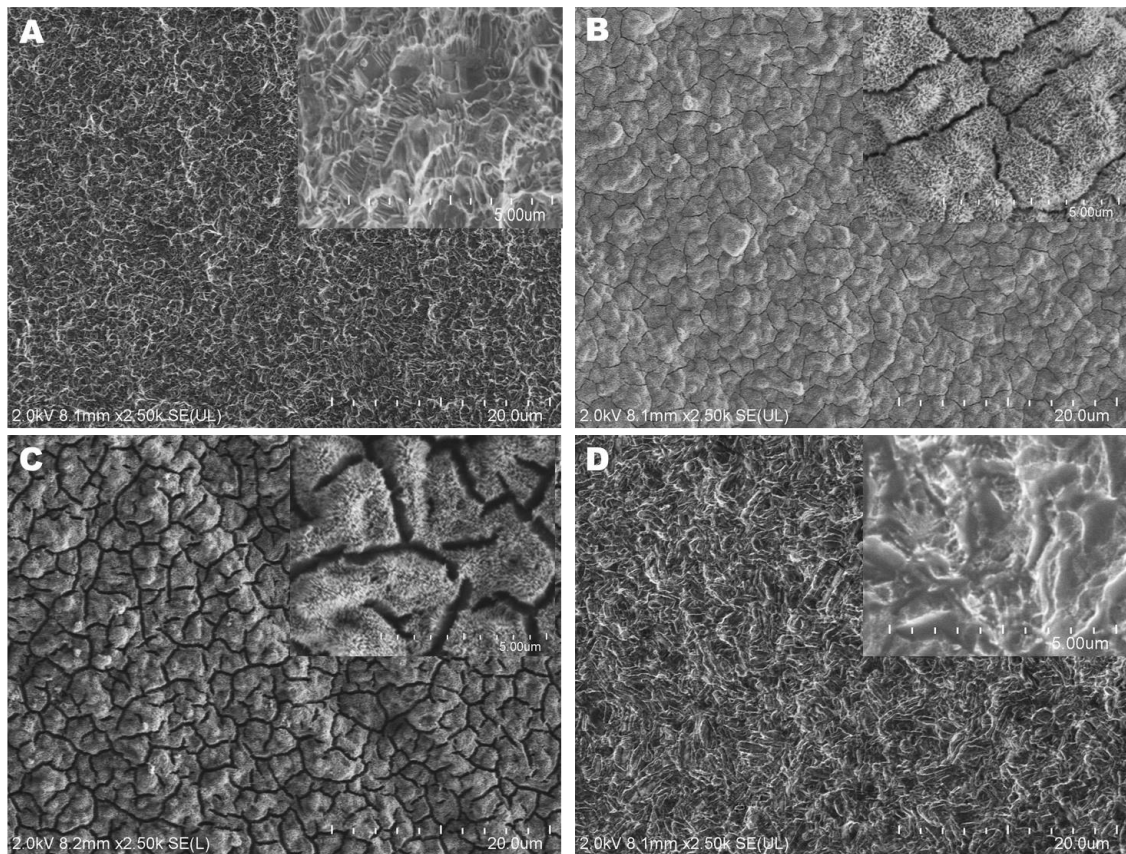
## 4.2. Morfología y topografía de las superficies obtenidas

El proceso de Grabado Ácido (superficie GA) limpia la superficie de óxidos nativos e impurezas generadas durante las etapas previas. En esta superficie (Figura 6A) se observó la ausencia de las rayas generadas durante el desbaste de las muestras. La superficie GA se caracteriza por la presencia de cavidades en escala micro y que presentan bordes muy agudos. Esta morfología coincide con los resultados expuestos en varios trabajos de acuerdo con el *review* presentado por Souza, J.C.M. y colaboradores en el año 2019.<sup>[31]</sup>

Con los tratamientos con peróxido de hidrógeno se obtiene en la superficie de las muestras una capa de óxido. La superficie de las muestras sometidas a la primera



variante de estos tratamientos (superficie PCI) se caracteriza presentar una elevada porosidad. Se puede observar la formación de cavidades a escala nanométrica (Figura 6B) que se encuentran separadas por nanoláminas a través de toda la superficie. Además, se observa la formación de microgrietas asociadas con este tipo de tratamientos.<sup>[41]</sup>



**Figura 6.** Micrográficas obtenidas por FESEM de las superficies modificadas: GA (A), PCI (B), PCITT (C) y PS (D).

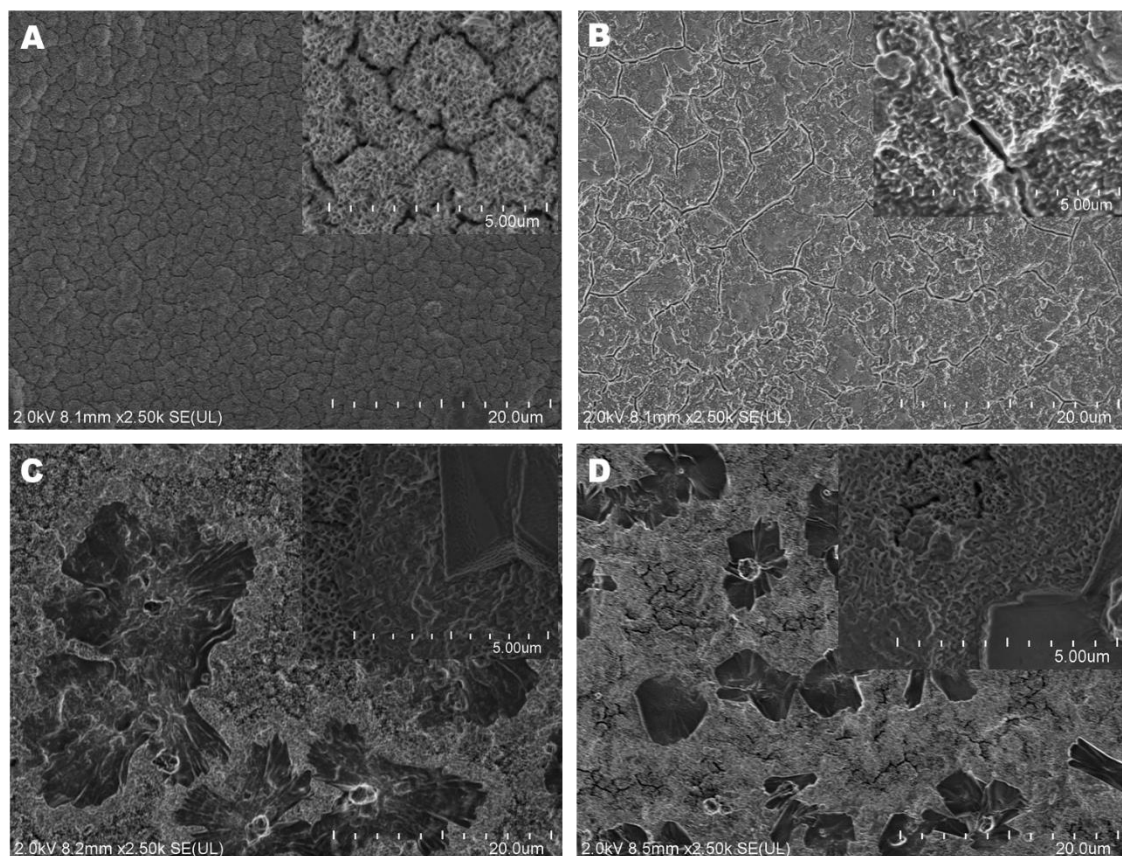
Por su parte, la superficie PCITT (Figura 6C), correspondiente a la segunda variante de tratamiento con peróxido de hidrógeno muestra que con un tratamiento térmico posterior se obtiene una morfología similar a la PCI. Se observa una distribución homogénea de nanocavidades separadas por nanoláminas. Lo anterior indica que el tratamiento termoquímico tiende a hacer más densa la capa de óxido formada sobre la superficie, pero no altera significativamente la morfología. Se puede apreciar también como el proceso de

densificación de la capa de óxidos trae como consecuencia un aumento en el espesor de las microgrietas que se forman durante estos tratamientos.

La superficie PS, correspondiente a la variante 3 de tratamientos de oxidación superficial con peróxido de hidrógeno y ácido sulfúrico muestra una morfología totalmente diferente a las obtenidas mediante las otras dos variantes de este tipo de tratamiento. Esta variante de tratamiento, aplicado sobre una superficie previamente atacada con una combinación de ácido clorhídrico y ácido sulfúrico no se encuentra reportada en la literatura. Como se observa en la Figura 6D, esta superficie se caracteriza por presentar poros con morfologías aleatorias. Además, con esta variante de tratamiento no se forman las microgrietas características de las otras dos variantes de oxidación con peróxido.

Los tratamientos de incorporación de Zn en las superficies previamente modificadas muestran morfologías no homogéneas. Para el caso de la superficie GAZn (Figura 7A), correspondiente a la realización del tratamiento alcalino directamente sobre la superficie GA, se observa una morfología formada por estructuras globulares porosas con la presencia de microgrietas. Por su parte, la superficie PCIZn (Figura 7B), exhibe una morfología compuesta por una capa densa donde se observa la formación de estructuras globulares y la presencia de microgrietas. No obstante, se puede apreciar el cambio morfológico al comparar estas superficies (GAZn y PCIZn) con las obtenidas en los tratamientos previos GA y PCI respectivamente.

En las superficies PCITTZn (Figura 7C) y PSZn (Figura 7D) se observa la formación de una capa superior que presenta una morfología y topografía diferente a las anteriormente descritas. En estas superficies se perciben estructuras densas con diferentes morfologías. Estas estructuras se encuentran distribuidas aleatoriamente sobre toda la superficie de las muestras sometidas a estas dos combinaciones de tratamiento. En las Figuras 7C y 7D se observa que la capa superior es menos porosa que las superficies formadas en los tratamientos previos. Además, se aprecia como se eliminan las microgrietas descritas anteriormente.



**Figura 7.** Micrografías obtenidas por FESEM de las superficies con depósitos de Zn: GAZn (A), PCIZn (B), PCITTZn (C) y PSZn (D).

Al observar detenidamente las superficies PCITTZn (Figura 7C) y PSZn (Figura 7D), se pueden apreciar tres zonas: 1- las estructuras densas con un color oscuro que se encuentran distribuidas aleatoriamente, 2- una capa también densa que rodea a las estructuras de la zona 1 y que se observa en un color gris más claro, similar a la morfología de la superficies PCIZn (Figura 7B) y 3- por último una zona porosa y agrietada, similar a la que se presenta en las superficies GAZn (Figura 7A). Esta última zona descrita (zona 3) se encuentra distribuida uniformemente en todas las superficies con Zn y se aprecia la formación de las zonas 1 y 2 sobre esta.

### 4.3. Rugosidad superficial

La rugosidad superficial desempeña un rol fundamental en la oseointegración de implantes y prótesis de titanio y sus aleaciones. Estos parámetros han sido estudiados por diversos grupos de investigación con el propósito de obtener dispositivos con mayores tasas de éxito a largo plazo. Varios estudios in vitro e in vivo centrados en las respuesta ósea muestran que superficies de titanio moderadamente rugosas presentan mejor oseointegración que las lisas e incluso que las de mayor rugosidad.<sup>[57]</sup>

Los parámetros principales de la topografía fueron obtenidos mediante microscopía óptica con un sistema para análisis superficial 3D *Alicona IF EdgeMaster* y se muestran en la Tabla 4. Los mayores valores de Ra y Sa se obtuvieron en las superficies GAZn y PSZn como se muestra en la Figura 8. Para el caso de Rmáx, los mayores valores fueron obtenidos en las superficies PCITT y PSZn (Figura 8). De forma general, la rugosidad media de las superficies tratadas es de 0.42  $\mu\text{m}$ .

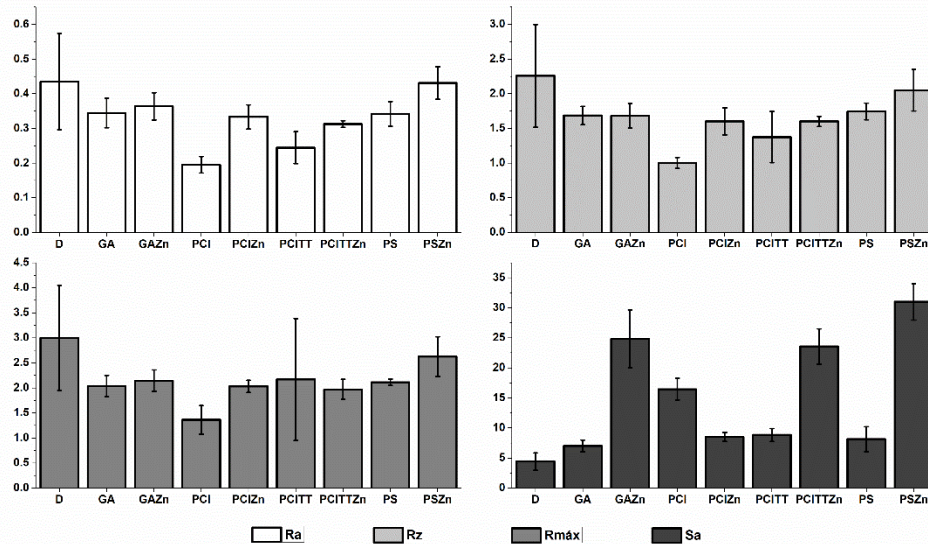
**Tabla 4.** Parámetros topográficos obtenidos en las superficies estudiadas.

Superficie	Ra ( $\mu\text{m}$ )	Rz ( $\mu\text{m}$ )	Rmáx ( $\mu\text{m}$ )	Sa ( $\mu\text{m}$ )
D	0.44 $\pm$ 0.13	2.26 $\pm$ 0.74	3.00 $\pm$ 1.05	4.42 $\pm$ 1.45
GA	0.34 $\pm$ 0.04	1.69 $\pm$ 0.13	2.04 $\pm$ 0.21	7.03 $\pm$ 0.97
GAZn	0.36 $\pm$ 0.04	1.68 $\pm$ 0.18	2.15 $\pm$ 0.21	24.86 $\pm$ 4.81
PCI	0.19 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.08	1.36 $\pm$ 0.29	16.456 $\pm$ 1.81
PCIZn	0.33 $\pm$ 0.04	1.60 $\pm$ 0.19	2.03 $\pm$ 0.12	8.51 $\pm$ 0.75
PCITT	0.24 $\pm$ 0.05	1.37 $\pm$ 0.37	2.17 $\pm$ 1.22	8.834 $\pm$ 1.07
PCITZn	0.31 $\pm$ 0.01	1.60 $\pm$ 0.07	1.97 $\pm$ 0.20	23.57 $\pm$ 2.95
PS	0.34 $\pm$ 0.04	1.74 $\pm$ 0.12	2.11 $\pm$ 0.06	8.13 $\pm$ 2.07
PSZn	0.43 $\pm$ 0.05	2.05 $\pm$ 0.30	2.62 $\pm$ 0.40	31.00 $\pm$ 3.05

Por su parte, los menores valores de estos parámetros los exhiben las superficies PCI y PCITT para el caso de la Ra y la PCI y la PCITZn para la Rmáx. En el caso de la Sa, los menores valores se obtuvieron en las superficies GA y PS. Además, se puede observar en la Figura 8, como los valores de la rugosidad superficial media (Ra) y la altura media del pico al valle del perfil de rugosidad

(Rz) aumentan con la inmersión de las muestras en la solución alcalina caliente para incorporar el Zn.

Los valores de rugosidad obtenidos en las superficies analizadas no deben afectar la migración celular, de acuerdo con lo planteado por Andrukhov, O., et al. en el 2016.<sup>[58]</sup>



**Figura 8.** Influencia de los tratamientos sobre la rugosidad superficial.

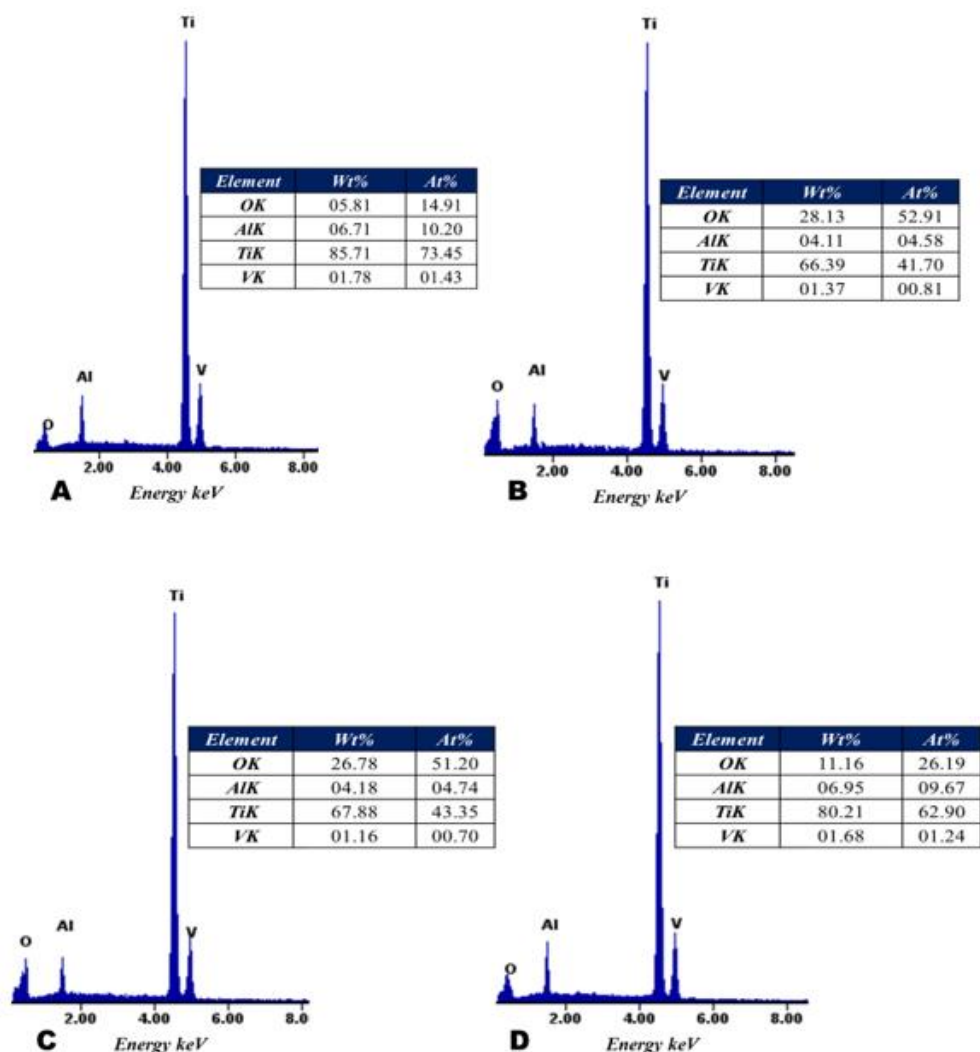
#### 4.4. Composición elemental y de fases de las superficies obtenidas

El análisis semicuantitativo de la composición elemental (EDS) realizado a la superficie de los sustratos luego de aplicados los tratamientos de modificación, muestra los picos fundamentales correspondientes a la aleación Ti6Al4V y la presencia de oxígeno debido a la formación de capas de óxido de titanio durante los tratamientos (Figura 9). Estos resultados fueron corroborados mediante XPS (Figura 11).

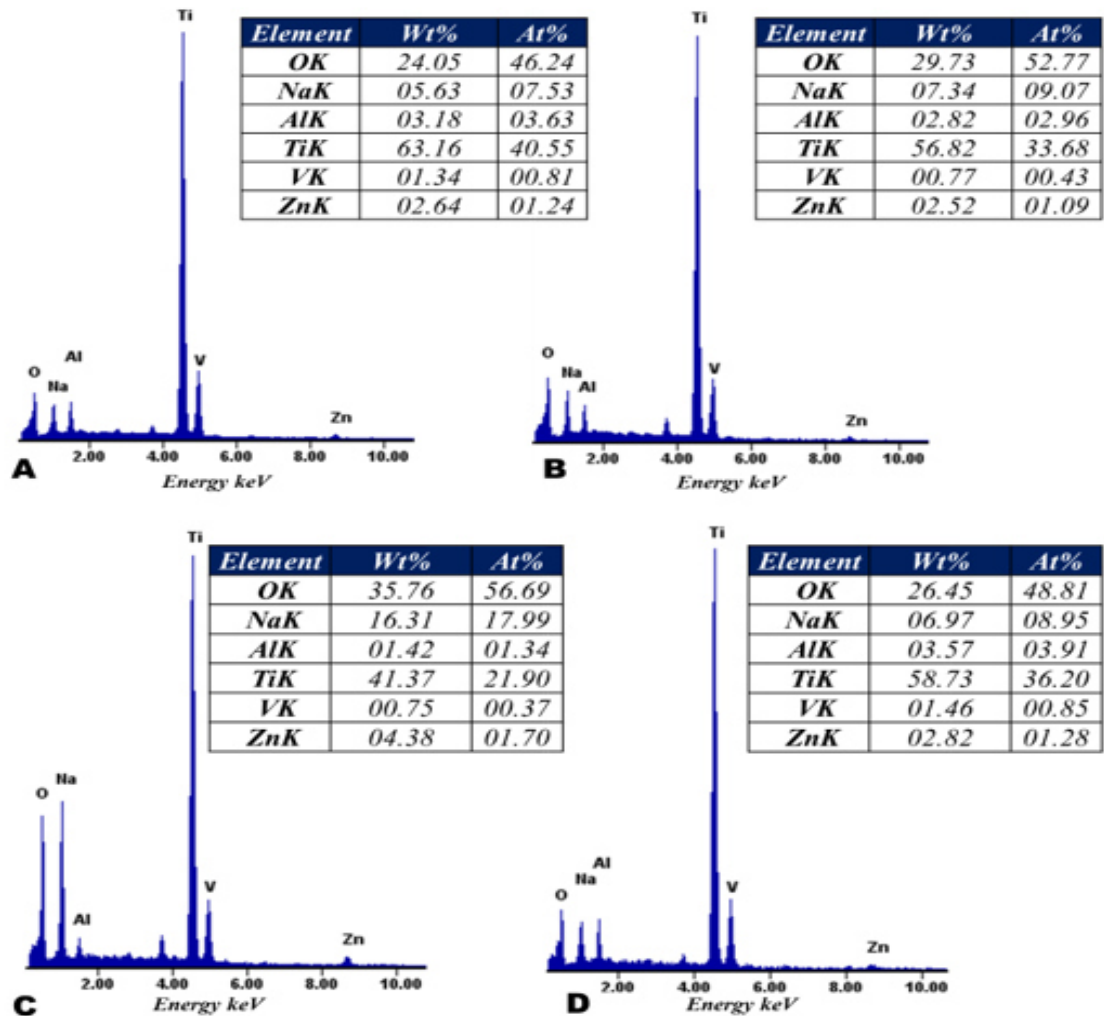
Los espectros EDS de las superficies después de la deposición de Zn muestran los picos correspondientes al sustrato (Ti, Al y V). Además, se aprecian picos

correspondientes al Zn y Na, elementos incorporados a las superficies como resultado del tratamiento alcalino caliente (Figura 10).

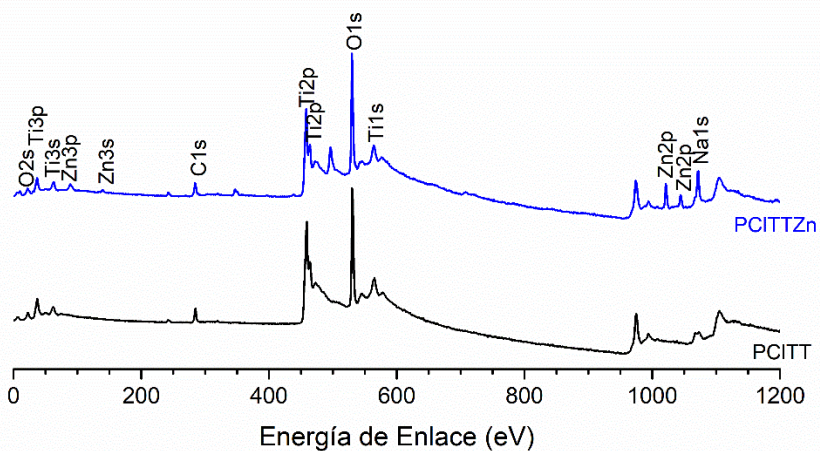
En la Figura 11 se muestra el espectro completo de XPS de las superficies PCITTZn y PSZn. Las superficies modificadas (GA, PCI, PCITT y PS) mostraron espectros de XPS similares, comportamiento análogo al observado al comparar los espectros de XPS de las superficies tratadas con la solución alcalina caliente que contiene el ion complejo tetrahidroxozincato.



**Figura 9.** Espectro EDS de las superficies modificadas: GA (A), PCI (B), PCITT (C) y PS (D).



**Figura 10.** Espectro EDS de las superficies tratadas con la disolución alcalina que contiene iones  $[Zn(OH)_4]^{2-}$ : GAZn (A), PCIZn (B), PCITTZn (C) y PSZn (D).



**Figura 11.** Espectro completo de XPS de las superficies PCITT y PCITTZn.

Los elementos detectados por XPS en las superficies modificadas fueron el titanio, el oxígeno y el carbono. Este resultado sugiere que dichas superficies están compuestas principalmente por  $\text{TiO}_2$ . En las superficies tratadas con la solución alcalina caliente, se detectó además los picos correspondientes al Na y al Zn. Los resultados obtenidos por EDS y XPS coinciden con los reportados en varios estudios para este tipo de modificaciones superficiales en titanio y sus aleaciones.<sup>[3, 4, 15, 23]</sup>

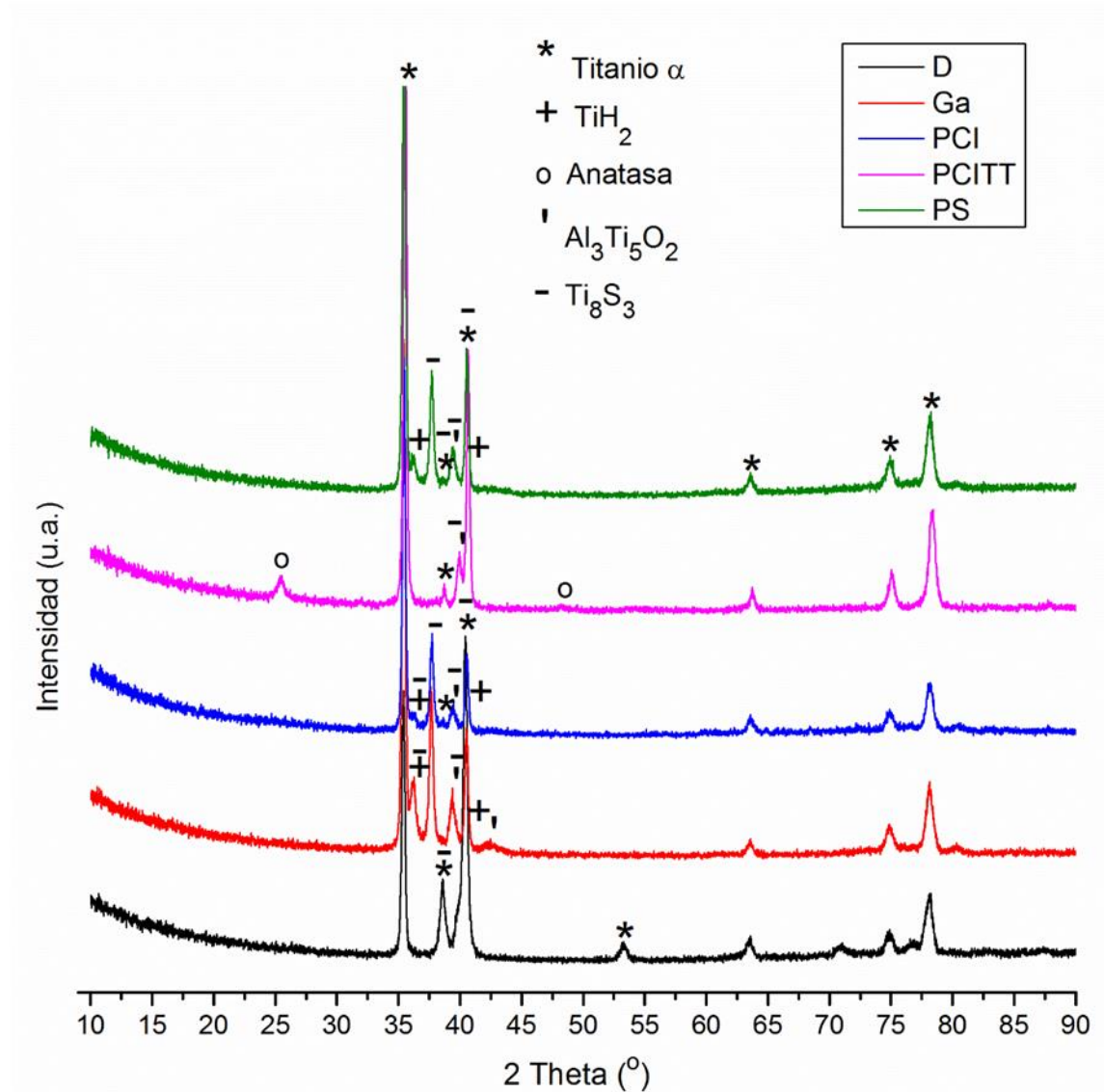
Las Figuras 12 y 13 muestran los patrones de difracción por DRX obtenidos de cada una de las superficies antes y después de los tratamientos para incorporar Zn. En las superficies modificadas, se destacan las reflexiones características del titanio, proveniente del sustrato, así como del óxido de titanio aluminio  $\text{Al}_3\text{Ti}_5\text{O}_2$ . Adicionalmente, los picos con baja intensidad presentes en  $2\theta = 36^\circ, 37.4^\circ, 38.6^\circ, 39.65^\circ, 40.4^\circ$  y  $41^\circ$  de las superficies GA, PCI y PS fueron asignados al hidruro de titanio ( $\text{TiH}_2$ ) y/o al  $\text{Ti}_8\text{S}_3$ . La presencia de dichas fases se justifica por la incorporación de hidrógeno y azufre durante el proceso de grabado ácido. No obstante, es recomendable corroborar su existencia mediante Espectroscopía Electrónica de Rx (XPS) y Espectroscopía Electrónica Auger (AES). Por otro lado, después del tratamiento termoquímico (superficie PCITT) desaparecen los picos de dichas fases y se aprecia la formación de anatasa ( $\text{TiO}_2$ ).

Al analizar los patrones de difracción obtenidos de las superficies luego del tratamiento alcalino, se observan las reflexiones características del Ti proveniente del sustrato, así como las demás fases presentes en las superficies modificadas (Figura 13). Adicionalmente, en la superficie GAZn se observaron reflexiones que fueron asignados a la fase  $\text{Na}_{10}\text{Zn}_4\text{O}_9$ . No obstante, en el resto de las superficies (PCIZn, PCITTZn, PSZn) no se observó dicha fase u otros compuestos de Zn, Na y Ti, los que, si se consideran los resultados obtenidos por EDS y XPS, en los que se determinó la presencia de Na y Zn, deben encontrarse presentes. Este comportamiento pudiera estar relacionado con: a) la fase(s) es(son) amorfa(s), b) posee(n) un pequeño espesor c) sus reflexiones características se solapan con otras fases.



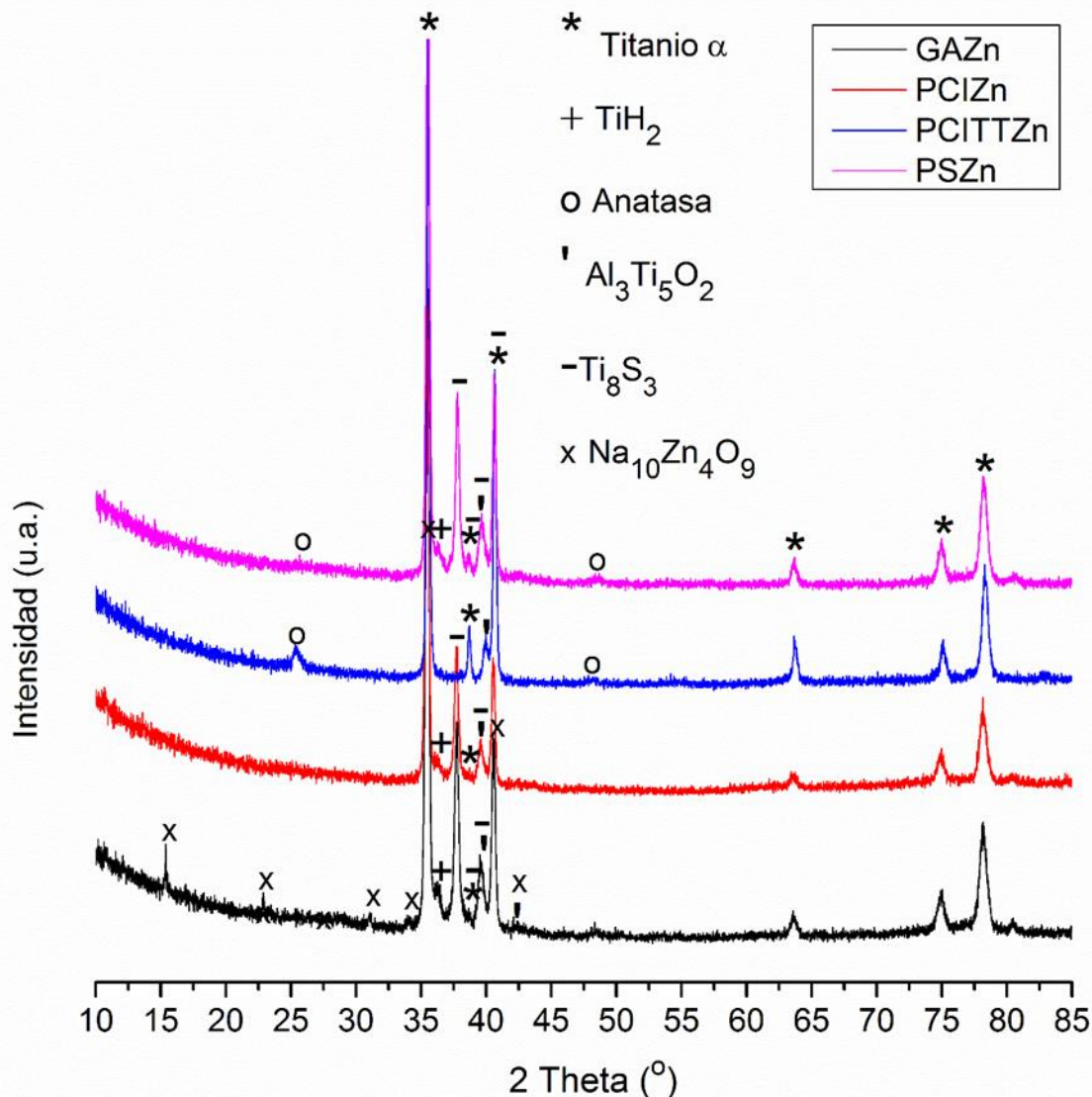
#### 4.5. Liberación de iones $Zn^{2+}$ al medio fisiológico

La concentración de Zn es un parámetro muy importante para la mineralización de la Matriz Extracelular. Varios estudios reportan diferentes concentraciones de Zn liberados al medio fisiológico. Aunque aún no se llega a un consenso sobre la cantidad óptima de iones de Zn que pueden ser liberados sin que cause toxicidad celular, lo que sí está claro es que es un parámetro que hay que controlar cuidadosamente.<sup>[18]</sup>



**Figura 12.** Patrones de difracción (DRX) de las superficies modificadas.

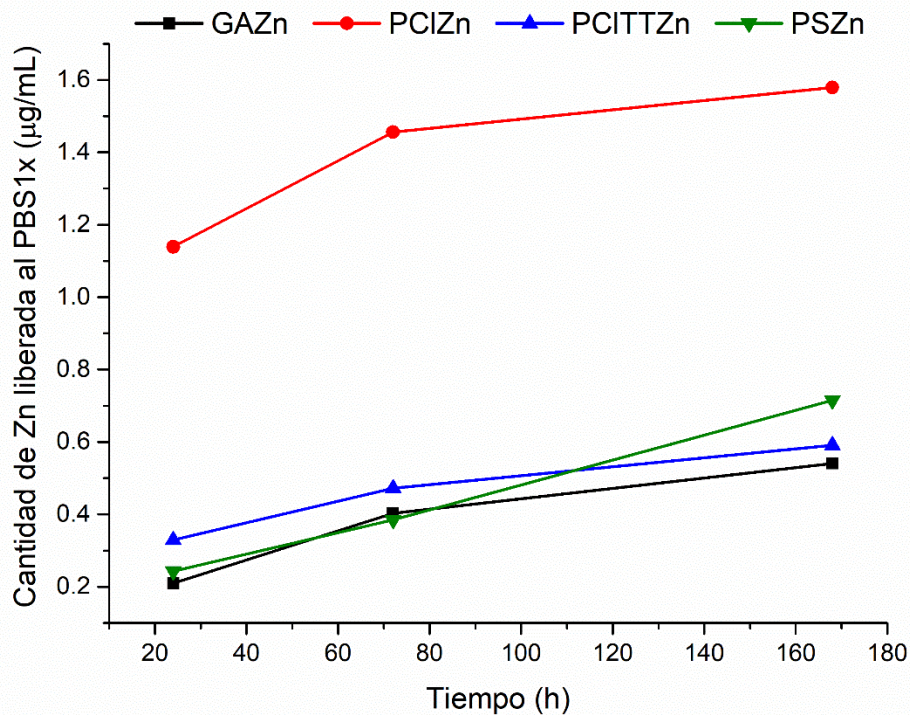
Para analizar la cinética de liberación de Zn al medio fisiológico se utilizó la Espectroscopía de Absorción Atómica. En la Figura 14 se muestran las curvas de liberación generadas por cada una de las superficies posterior al tratamiento alcalino en disolución que contiene el ion  $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$ .



**Figura 13.** Patrones de difracción (DRX) de las superficies tratadas con la disolución alcalina que contiene iones  $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$ .

Durante la observación a 7 días, todos los perfiles acumulativos exhiben un comportamiento similar en cuanto a la tendencia de liberación. Al aumentar el

tiempo de exposición a la solución PBS, se observa un incremento en la cantidad de Zn liberado. Sin embargo, se observa una mayor liberación en las primeras 24 horas para la superficie PCIZn, alcanzándose un máximo de concentración de iones  $Zn^{2+}$  en el medio de  $1.58 \mu\text{g/mL}$  para esta superficie. El mayor contenido de Zn liberado por la superficie PCIZn, no provoca toxicidad celular. No obstante, esto podría indicar una menor estabilidad de la superficie a largo plazo pues la liberación de Zn se hace más rápida que en las restantes superficies analizadas. Esto también pudiera afectar el comportamiento antibacteriano de esta superficie a largo plazo.



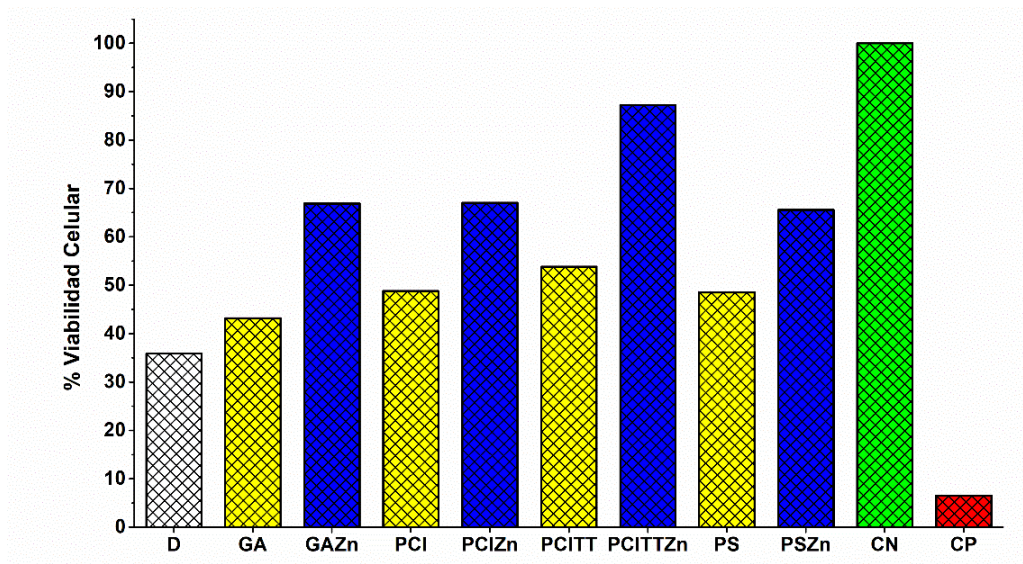
**Figura 14.** Perfil de liberación de Zn en 100 mL de PBS1x.

#### 4.6. Citotoxicidad de las superficies obtenidas

La capacidad de las células para reducir el MTT es un indicador de la integridad mitocondrial y su actividad funcional se interpreta como una medida de la

actividad celular. Los Fibroblastos Gingivales Primarios (*Primary Gingival Fibroblast, HGF-ATCC® PCS-201-018™*) produjeron relativamente altas cantidades de formazán violeta luego de la incubación por 24 horas en contacto con las superficies estudiadas.

Como se observa en la Figura 15, las superficies estudiadas muestran porcentajes de viabilidad celular que oscilan entre un 35.9 y un 87.2 %. Todas las superficies que contienen Zn exhiben un mayor porcentaje de viabilidad celular que la correspondiente superficie sin Zn. Además, estos resultados indican que las cuatro superficies con depósitos de Zn evaluadas no resultan citotóxicas. La mayor viabilidad celular se obtuvo para la superficie PCITZn. Esta superficie presenta el mayor contenido de Zn y probablemente el mayor espesor de recubrimiento.



**Figura 15.** Viabilidad celular de Fibroblastos Gingivales Primarios (*Primary Gingival Fibroblast, HGF-ATCC® PCS-201-018™*) cultivadas en contacto con las superficies estudiadas (CN-Control Negativo, CP-Control Positivo).

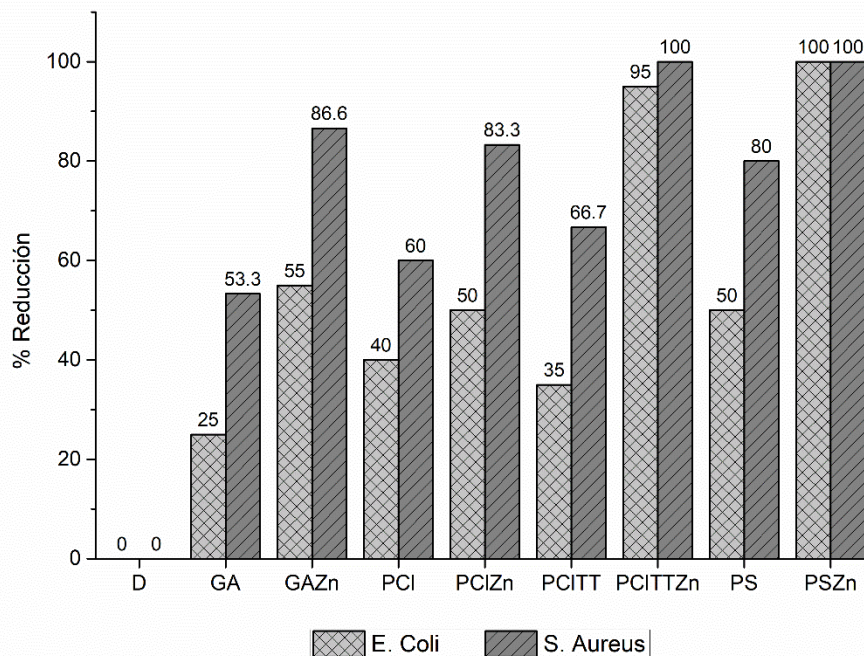
#### 4.7. Actividad antibacteriana de las superficies obtenidas

La actividad antibacteriana de las superficies fue evaluada mediante el conteo de UFC de bacterias gram negativas *E. Coli* (ATCC 43895) y gram positivas *S.*

*Aureus* (ATCC 33592). Todas las superficies exhiben un mejor comportamiento antibacteriano cuando se incubaron en contacto con *S. Aureus*, al presentar mayores porcentajes de reducción de colonias.

Las superficies con depósitos de Zn muestran mayor capacidad antibacteriana que la presentada por las superficies modificadas como se puede apreciar en la Figura 16. Las superficies PCITTZn y PSZn exhibieron los mayores porcentajes de reducción y por tanto la mejor actividad antimicrobiana entre todas las superficies evaluadas. Dichas superficies presentan los mayores contenidos de Zn según los resultados obtenidos por EDS (Figura 10 C y D). Por otro lado, la superficie PCIZn mostró el menor efecto antibacteriano, lo que también permite correlacionar la actividad antibacteriana de los recubrimientos con el contenido de Zn que estos presentan.

Estos resultados demuestran que las superficies con depósitos de Zn muestran buena habilidad para inhibir ambas bacterias: *E. Coli* y *S. Aureus*. Además, las bacterias *S. Aureus* exhiben mayor sensibilidad a las superficies con depósitos de Zn.



**Figura 16.** Porcentaje de reducción de colonias de *E. Coli* y *S. Aureus* recultivadas en agar durante 24 horas.

## Capítulo 5

# CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

Del análisis de los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

1. Por medio de tratamientos químicos sucesivos que incluyen una modificación final empleando una disolución alcalina que contiene el ion  $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$  se obtuvo en la aleación Ti6Al4V superficies con topografías y composiciones elementales y de fases que liberan Zn al medio fisiológico.
2. Se observó que la topografía de las muestras modificadas superficialmente (GA, PCI, PCITT y PS) varió significativamente después de su tratamiento en solución alcalina que contiene el ion  $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$  y que además las superficies obtenidas mediante dicho tratamiento (GAZn, PCIZn, PCITZn y PSZn) presentan diferencias en su morfología.
3. Se demostró que las cantidades de Zn liberadas al medio por las superficies evaluadas (GAZn, PCIZn, PCITZn y PSZn) no causan toxicidad celular y que a las 24 horas exhiben actividad antimicrobiana en presencia de *E. Coli* o de *S. Aureus*.
4. Se observó que el tratamiento en la disolución alcalina que contiene el ion  $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$  aumentó la viabilidad celular en comparación con las superficies modificadas, obteniéndose el mayor porcentaje de viabilidad celular en la superficie PCITZn.

5. Se demostró que las superficies evaluadas, antes y después de su tratamiento en disolución alcalina que contiene el ion  $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$ , poseen mayor actividad antimicrobiana en presencia del *S. Aureus* que ante la *E. Coli* (excepción de ese comportamiento es la superficie PSZn). Además, se observó un 100 % de reducción de UFC para las superficies PCITZn y PSZn.

## 5.2. Recomendaciones

1. Aplicar un tratamiento térmico a 600 °C a las muestras tratadas en la disolución alcalina que contiene el ion  $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$ , para cristalizar las posibles fases amorfas formadas durante el tratamiento.
2. Realizar un estudio detallado de los espectros de alta resolución obtenidos por XPS de cada uno de los elementos constituyentes de las superficies para estimar las fases formadas.
3. Realizar estudios de viabilidad celular usando una línea celular que diferencie en osteoblastos, pues estas superficies están diseñadas para su interacción directa con el tejido óseo.
4. Realizar un estudio de implantación para caracterizar la capacidad de oseointegración de las superficies obtenidas.
5. Evaluar la adherencia de las capas superficiales obtenidas mediante una prueba de *Scratch Test*.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Variola, F., et al., *Nanoscale surface modifications of medically-relevant metals: state-of-the art and perspectives*. *Nanoscale*, 2011. **3**(2): p. 335–353.
2. Vetrone, F., et al., *Nanoscale Oxidative Patterning of Metallic Surfaces to Modulate Cell Activity and Fate*. *Nano Lett.*, 2009. **9**(2): p. 659-665.
3. Chen, X.-b., et al., *Influence of calcium ion deposition on apatite-inducing ability of porous titanium for biomedical applications*. *Acta Biomaterialia*, 2009: p. 1808-1820.
4. Kodama, A., et al., *Bioactivation of titanium surfaces using coatings of TiO<sub>2</sub> nanotubes rapidly pre-loaded with synthetic hydroxyapatite*. *Acta Biomaterialia*, 2009. **5**(6): p. 2322-2330.
5. Vanzillotta, P.S., et al., *Improvement of in vitro titanium bioactivity by three different surface treatments*. *Dental Materials*, 2006(3): p. 275-282.
6. He, F.M., et al., *Early bone response to sandblasted, dual acid-etched and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HCl treated titanium implants: an experimental study in the rabbit*. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2009. **38**(6): p. 677-681.
7. Junker, R., et al., *Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review*. *Clinical oral implants research*, 2009(4): p. 185-206.
8. Lakstein, D., W. Kopelovitch, and Z. Barkay, *Enhanced osseointegration of grit-blasted , NaOH-treated and electrochemically hydroxyapatite-coated Ti– 6Al– 4V implants in rabbits*. *Acta Biomaterialia*, 2009: p. 2258-2269.
9. Khan, S.N., et al., *Osseointegration and more: A review of literature*. *Indian Journal of Dentistry*, 2012. **3**(2): p. 72-76.
10. Rosales-Leal, J.I., et al., *Effect of roughness, wettability and morphology of engineered titanium surfaces on osteoblast-like cell adhesion*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2010. **365**(1): p. 222-229.

11. Alla, R.K., et al., *Surface Roughness of Implants : A Review*. Trends Biomater. Artif. Organs, 2011. **25**(3): p. 112-118.
12. Gittens, R.A., et al., *The roles of titanium surface micro/nanotopography and wettability on the differential response of human osteoblast lineage cells*. Acta Biomaterialia, 2013. **9**: p. 6268–6277.
13. Kokubo, T. and S. Yamaguchi, *Bioactive titanate layers formed on titanium and its alloys by simple chemical and heat treatments*. The open biomedical engineering journal, 2015. **9**: p. 29-41.
14. Lai, H.-C., et al., *The influence of surface energy on early adherent events of osteoblast on titanium substrates*. J Biomed Mater Res, 2010. **93A**: p. 289-296.
15. Hu, H., et al., *Antibacterial activity and increased bone marrow stem cell functions of Zn-incorporated TiO<sub>2</sub> coatings on titanium*. Acta Biomaterialia, 2012. **8**(2): p. 904-915.
16. Ferraris, S., et al., *Antibacterial and bioactive nanostructured titanium surfaces for bone integration*. Applied Surface Science, 2014. **311**: p. 279-291.
17. Tamai, K., et al., *Inorganic antimicrobial coating for titanium alloy and its effect*. J Orthop Sci, 2009. **14**: p. 204-209.
18. Gao, C., et al., *Advances in the induction of osteogenesis by zinc surface modification based on titanium alloy substrates for medical implants*. Journal of Alloys and Compounds, 2017. **726**: p. 1072-1084.
19. Song, W., et al., *Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles*. Toxicology Letters, 2010. **199**(3): p. 389-397.
20. Ito, A., et al., *Zinc-releasing calcium phosphate for stimulating bone formation*. Materials Science and Engineering: C, 2002. **22**(1): p. 21-25.
21. Wätjen, W., et al., *Induction of apoptosis in mammalian cells by cadmium and zinc*. Environmental Health Perspectives, 2002. **110**(suppl 5): p. 865-867.
22. Yusa, K., et al., *Zinc-modified titanium surface enhances osteoblast differentiation of dental pulp stem cells in vitro*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 29462.
23. Alvarez, K., M. Fukuda, and O. Yamamoto, *Titanium Implants after Alkali Heating Treatment with a [Zn(OH)<sub>4</sub>]<sup>2-</sup> Complex: Analysis of Interfacial*

- Bond Strength Using Push-Out Tests*. Clinical Implant Dentistry and Related Research, 2010. **12**(1): p. e114-e125.
24. Yamaguchi, S., et al., *Bioactive Ti Metal with Ca-Enriched Surface Layer Able to Release Zn Ion*. Key Engineering Materials, 2013. **529-530**: p. 547-552.
  25. Li, Y., et al., *Cytotoxicity of Titanium and Titanium Alloying Elements*. Journal of Dental Research, 2010. **89**(5): p. 493-497.
  26. Park, Y.R. and K.J. Kim, *Structural and optical properties of rutile and anatase TiO<sub>2</sub> thin films : Effects of Co doping*. Thin Solid Films, 2005. **484**: p. 34 - 38.
  27. Elias, C.N., *Titanium dental implant surfaces*. Revista Métrica, 2010. **15**(2): p. 138-142.
  28. Lin, D., et al., *Mandibular bone remodeling induced by dental implant*. Journal of Biomechanics, 2010. **43**: p. 287-293.
  29. Dohan Ehrenfest, D.M., et al., *Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography*. Trends in Biotechnology, 2010. **28**(4): p. 198-206.
  30. Le Guehennec, L., et al., *Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration*. Dental Materials, 2007(7): p. 844-854.
  31. Souza, J.C.M., et al., *Nano-scale modification of titanium implant surfaces to enhance osseointegration*. Acta Biomaterialia, 2019. **94**: p. 112-131.
  32. Bauer, S., et al., *Engineering biocompatible implant surfaces Part I: Materials and surfaces*. Progress in Materials Science, 2013. **58**: p. 261–326.
  33. Zhang, E.W., et al., *In vitro and in vivo evaluation of SLA titanium surfaces with further alkali or hydrogen peroxide and heat treatment*. Biomed.Mater., 2011. **6**: p. 1-7.
  34. Bandi, S., D. chadalavada, and S.k. A, *Evaluation and Comparison of Surface Modifications of Commercially Pure Grade-I Titanium by Combination Technique of Blasting with Alumina Followed by Acid Etching and Oxidation with NaOH*. Annals and Essences of Dentistry, 2012. **4**(4): p. 1-8.
  35. Guo, C.Y., A.T.H. Tang, and J.P. Matinlinna, *Insights into Surface Treatment Methods of Titanium Dental Implants*. Journal Of Adhesion Science and Technology, 2012. **26**(1-3): p. 189-205.

36. Chrcanovic, B.R. and M.D. Martins, *Study of the influence of acid etching treatments on the superficial characteristics of Ti*. Materials Research, 2014. **17**: p. 373-380.
37. Zhang, E., et al., *Enhanced bioactivity of sandblasted and acid-etched titanium surfaces*. Advanced Materials Research, 2009. **79-82**: p. 393-396.
38. Wu, J.-m., et al., *Porous titania films prepared from interactions of titanium with hydrogen peroxide solution*. Scripta Materialia, 2002. **46**: p. 101-106.
39. Chen, Y., et al., *Effect of Ti–OH formation on bioactivity of vacuum plasma sprayed titanium coating after chemical treatment*. Surface & Coatings Technology, 2007: p. 494 - 498.
40. Zhang, F., et al., *Effect of heat treatment on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HCl etched pure titanium dental implant: an in vitro study*. Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research, 2012. **18**(7): p. BR265-BR272.
41. Wang, X.-X., et al., *Bioactive titania gel layers formed by chemical treatment of Ti substrate with a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HCl solution*. Biomaterials, 2002. **23**(5): p. 1353-1357.
42. Rimondini, L., M. Fini, and R. Giardino, *The microbial infection of biomaterials: A challenge for clinicians and researchers. A short review*. Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics, 2005. **3**(1): p. 1-10.
43. Norowski Jr., P.A. and J.D. Bumgardner, *Biomaterial and antibiotic strategies for peri-implantitis: A review*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2009. **88B**(2): p. 530-543.
44. Veerachamy, S., et al., *Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: A review*. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine, 2014. **228**(10): p. 1083-1099.
45. Campoccia, D., L. Montanaro, and C.R. Arciola, *A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces*. Biomaterials, 2013. **34**(34): p. 8533-8554.
46. Chang, Y.-Y., et al., *Antibacterial properties and human gingival fibroblast cell compatibility of TiO<sub>2</sub>/Ag compound coatings and ZnO films on titanium-based material*. Clinical Oral Investigations, 2012. **16**(1): p. 95-100.
47. Hadrup, N., A.K. Sharma, and K. Loeschner, *Toxicity of silver ions, metallic silver, and silver nanoparticle materials after in vivo dermal and mucosal surface exposure: A review*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2018. **98**: p. 257-267.

48. Vrček, I.V., et al., *Comparison of in vitro toxicity of silver ions and silver nanoparticles on human hepatoma cells*. Environmental toxicology, 2016. **31**(6): p. 679-692.
49. Marin, S., et al., *Applications and toxicity of silver nanoparticles: a recent review*. Current topics in medicinal chemistry, 2015. **15**(16): p. 1596-1604.
50. Gunsolus, I.L., et al., *Effects of humic and fulvic acids on silver nanoparticle stability, dissolution, and toxicity*. Environmental science & technology, 2015. **49**(13): p. 8078-8086.
51. Yusa, K., et al., *In vitro prominent bone regeneration by release zinc ion from Zn-modified implant*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011. **412**(2): p. 273-278.
52. Kellesarian, S.V., et al., *Does incorporating zinc in titanium implant surfaces influence osseointegration? A systematic review*. The Journal of Prosthetic Dentistry, 2017. **117**(1): p. 41-47.
53. Qiao, Y., et al., *Stimulation of bone growth following zinc incorporation into biomaterials*. Biomaterials, 2014. **35**(25): p. 6882-6897.
54. Trino, L.D., et al., *Zinc oxide surface functionalization and related effects on corrosion resistance of titanium implants*. Ceramics International, 2018. **44**(4): p. 4000-4008.
55. Huo, K., et al., *Osteogenic activity and antibacterial effects on titanium surfaces modified with Zn-incorporated nanotube arrays*. Biomaterials, 2013. **34**(13): p. 3467-3478.
56. Shen, X., et al., *Regulation of the Biological Functions of Osteoblasts and Bone Formation by Zn-Incorporated Coating on Microrough Titanium*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2014. **6**(18): p. 16426-16440.
57. Rupp, F., et al., *Surface characteristics of dental implants: A review*. Dental Materials, 2018. **34**(1): p. 40-57.
58. Andrukhov, O., et al., *Proliferation, behavior, and differentiation of osteoblasts on surfaces of different microroughness*. Dental Materials, 2016. **32**(11): p. 1374-1384.

## ÍNDICE DE FIGURAS

No. Figura	Título	Pág.
<b>Figura 1.</b>	Tabla periódica de los elementos estabilizadores de las fases $\alpha$ , $\beta$ y $\alpha/\beta$ .	7
<b>Figura 2.</b>	Estructura de la anatasa (A) y del rutilo (B).	11
<b>Figura 3.</b>	Esquema de la metodología experimental desarrollada.	22
<b>Figura 4.</b>	Micrografías de FESEM de la superficie de la aleación Ti6Al4V desbastada	31
<b>Figura 5.</b>	Espectros de EDS (A) y patrón de difracción por XRD (B) de la superficie desbastada.	32
<b>Figura 6.</b>	Micrografías obtenidas por FESEM de las superficies modificadas: GA(A), PCI(B), PCITT(C) y PS(D).	33
<b>Figura 7.</b>	Micrografías obtenidas por FESEM de las superficies con depósitos de Zn: GAZn(A), PCIZn(B), PCITZn(C) y PSZn(D).	35
<b>Figura 8.</b>	Influencia de los tratamientos sobre la rugosidad superficial.	37
<b>Figura 9.</b>	Espectro EDS de las superficies modificadas: GA(A), PCI(B), PCITT(C) y PS(D).	38
<b>Figura 10.</b>	Espectro EDS de las superficies tratadas con la disolución alcalina que contiene iones $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$ : GAZn(A), PCIZn(B), PCITZn(C) y PSZn(D).	39
<b>Figura 11.</b>	Espectro completo de XPS de las superficies PCITT y PCITZn.	39
<b>Figura 12.</b>	Patrón de difracción (DRX) de las superficies modificadas.	41
<b>Figura 13.</b>	Patrones de difracción (DRX) de las superficies tratadas con la disolución alcalina que contiene iones $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$ .	42
<b>Figura 14.</b>	Perfil de liberación de Zn en 100 mL de PBS1x.	43
<b>Figura 15.</b>	Viabilidad celular de Fibroblastos Gingivales Primarios ( <i>Primary Gingival Fibroblast</i> , HGF-ATCC® PCS-201-018™) cultivados en contacto con las superficies estudiadas (CN-Control Negativo, CP-Control Positivo)	44
<b>Figura 16.</b>	Porcentaje de reducción de colonias de <i>E. Coli</i> y <i>S. Aureus</i> recultivadas en agar durante 24 horas.	45

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>No. Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b>	Composición química según la norma ASTM F136-13 para la aleación Ti-6Al-4V.	8
<b>Tabla 2.</b>	Propiedades físicas del TiO <sub>2</sub> .	10
<b>Tabla 3.</b>	Nomenclatura para cada grupo de superficies obtenidas.	23
<b>Tabla 4.</b>	Parámetros topográficos para cada una de las superficies evaluadas.	36