

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA**

**SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**BIOCOMPATIBILIDAD DE NANOESTRUCTURAS FORMADAS  
POR ANODIZADO EN ALEACIONES DE BASE TITANIO PARA  
APLICACIONES BIOMÉDICAS**

**POR**

**M.C. FRANK EDUARDO MELÉNDEZ ANZURES**

**TESIS**

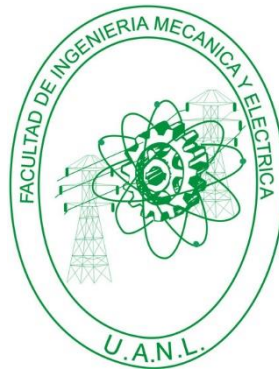
**CON OPCIÓN AL GRADO DE  
DOCTOR EN INGENIERÍA DE MATERIALES**

**SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN, SEPTIEMBRE DE 2023**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA**

**SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**BIOCOMPATIBILIDAD DE NANOESTRUCTURAS FORMADAS  
POR ANODIZADO EN ALEACIONES DE BASE TITANIO PARA  
APLICACIONES BIOMÉDICAS**

POR

**M.C. FRANK EDUARDO MELÉNDEZ ANZURES**

**TESIS**

CON OPCIÓN AL GRADO DE  
DOCTOR EN INGENIERÍA DE MATERIALES

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN, SEPTIEMBRE DE 2023

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica**  
**Posgrado**

Los miembros del Comité de Evaluación de Tesis recomendamos que la Tesis “Biocompatibilidad de nanoestructuras formadas por anodizado en aleaciones de base titanio para aplicaciones biomédicas”, realizada por el estudiante Frank Eduardo Meléndez Anzures, con número de matrícula 1413954, sea aceptada para su defensa como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ingeniería de Materiales.

**El Comité de Evaluación de Tesis**

Dr. Enrique Manuel López Cuéllar\*  
Director

Dr. Luis Alberto López Pavón  
Co-Director

Dr. Azael Martínez de la Cruz  
Revisor

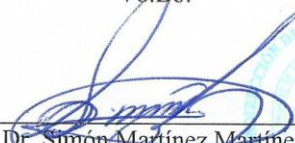
Dr. Francisco Aurelio Pérez González  
Revisor

Dra. Diana Ginette Zárate Triviño  
Revisor

Dra. María Porfiria Barrón González  
Revisor

Dra. Norma Patricia Puente Ramírez  
Revisor

Vo.Bo.

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Simón Martínez Martínez  
Subdirector de Estudios de Posgrado



Institución 190001

Programa 122608

Acta Núm. 332

Ciudad Universitaria, a 25 de Septiembre de 2023.

# DEDICATORIAS

*Con mucho amor, este proyecto de tesis está dedicado a:*

*A mi esposa*

***Stephany Alejandra Martínez Balderas***

*Gracias por cada momento a tu lado, por amarme tanto, eres mi inspiración,  
te amo siempre mi cielo*

*A mi hijo*

***Franco Meléndez Martínez***

*Te espero con mucho amor, te amo campeón*

*A mis padres*

***Rocío Anzures Ayón y Francisco Antonio Meléndez González***

*Gracias por todo su amor, sacrificio y respaldo incondicional*

*A mi hermano*

***Anttony Erick Meléndez Anzures***

*Gracias por tu apoyo y por los momentos que hemos compartido juntos.*

*Les agradezco infinitamente por estar siempre a mi lado*

***Dios los proteja***



# AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Enrique Manuel López Cuéllar, quien me brindó su apoyo a lo largo del proceso de elaboración de esta tesis, así como por su dedicación como director de esta investigación.

Al Dr. Azael Martínez de la Cruz y al Dr. Luis Alberto López Pavón por su constante ayuda profesional, sin su ayuda esta tesis no hubiera sido posible.

A la Dra. Diana Ginette Zárate Triviño, a la Dra. Norma Patricia Puente Ramírez y al Dr. Francisco Aurelio Pérez González por brindarme la oportunidad de colaborar con ustedes.

A la Dra. María Porfiria Barrón González, por darme la confianza y la oportunidad de trabajar en su laboratorio, gracias por brindarme siempre su amable amistad.

A la Dra. María Guadalupe Orozco Sandoval y al Dr. Juan José Martínez Sanmiguel por su invaluable contribución y el inestimable respaldo proporcionado a lo largo de todas las fases de esta investigación.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, a la Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, y a la Facultad de Ciencias Biológicas por brindarme la oportunidad y permitirme utilizar sus instalaciones para llevar a cabo esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por otorgarme la beca que financió mi doctorado durante todo el periodo de realización. Estoy enormemente agradecido por su apoyo y confianza, ya que esta beca fue fundamental para el éxito de mi investigación y formación académica.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS .....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
LISTA DE SIMBOLOS .....	VII
ABREVIATURAS .....	VIII
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT .....	XII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Contribución científica .....	3
1.2. Hipótesis.....	4
1.3. Objetivos .....	4
1.3.1. Objetivo general .....	4
1.3.2. Objetivos específicos.....	4
2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO .....	5
2.1. Aleaciones de titanio.....	5
2.2. Aleaciones base titanio con memoria de forma.....	6
2.3. Superaleaciones base titanio .....	10
2.4. Funcionalización superficial de aleaciones de titanio .....	12
2.5. Sistemas de liberación de fármacos para el tratamiento de infecciones postoperatorias.....	15
2.6. Pruebas de biocompatibilidad en aleaciones de titanio.....	21
2.7. Electrodeposición de iones bioactivos aleaciones base titanio .....	26
3. METODOLOGÍA.....	29
3.1. Preparación de las aleaciones .....	31
3.2. Funcionalización superficial por anodizado.....	31
3.3. Técnicas de caracterización .....	32
3.4. Carga y liberación de antibióticos en aleaciones de titanio .....	33
3.5. Análisis microbiológico de las aleaciones .....	34
3.5.1. Método de espectrofotometría .....	34
3.5.2. Método de recuento bacteriano en placa .....	35
3.5.3. Método de antibiograma .....	35
3.6. Pruebas de biocompatibilidad <i>in vitro</i> .....	36

3.6.1.	Cultivo celular sobre aleaciones de titanio .....	36
3.6.2.	Ensayo de citotoxicidad por MTT.....	37
3.6.3.	Pruebas de adhesión celular por técnicas de Microscopía .....	38
3.7.	Deposición de iones bioactivos por la técnica de electrodeposición .....	40
3.8.	Diseño y fabricación de una placa de osteosíntesis.....	41
3.9.	Pruebas de biocompatibilidad <i>in vivo</i> .....	42
3.9.1.	Implantación quirúrgica de las aleaciones .....	42
3.10.	Análisis Estadístico .....	43
4.	RESULTADOS Y DISCUSIONES PARTE 1: Ti-24Zr-10Nb-2Sn.....	44
4.1.	Introducción.....	44
4.2.	Síntesis y caracterización de nanotubos de titanio .....	45
4.2.1.	Análisis de las curvas de corriente-tiempo.....	45
4.2.2.	Caracterización de la morfología y composición elemental por SEM-EDS .....	49
4.2.3.	Caracterización superficial por Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS).....	57
4.3.	Liberación de antibióticos a partir de las aleaciones anodizadas .....	61
4.3.1.	Espectroscopía Infrarroja (FT-IR) de las aleaciones cargadas con antibióticos.....	64
4.4.	Determinación de las propiedades antibacterianas de las aleaciones anodizadas y aleaciones cargadas con antibióticos .....	65
4.4.1.	Medición de turbidez por espectrofotometría .....	65
4.4.2.	Recuento bacteriano en placa .....	67
4.4.3.	Prueba de antibiograma .....	70
4.5.	Pruebas de biocompatibilidad <i>in vitro</i> .....	71
4.5.1.	Actividad citotóxica de las aleaciones por el ensayo colorimétrico de MTT .....	71
4.5.2.	Estudio de la adhesión de osteoblastos a las aleaciones mediante microscopía de fluorescencia .....	73
5.	RESULTADOS Y DISCUSIONES PARTE 2: Ti-407 .....	75
5.1.	Introducción.....	75
5.2.	Síntesis y caracterización de nanotubos de titanio .....	76
5.2.1.	Análisis de las curvas de corriente-tiempo.....	76
5.2.2.	Caracterización de la morfología y composición elemental por SEM-EDS .....	79

5.2.3. Caracterización superficial por Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS).....	89
5.3. Liberación de antibióticos a partir de las aleaciones anodizadas .....	95
5.3.1. Espectroscopía Infrarroja (FT-IR) de las aleaciones cargadas con antibióticos.....	102
5.4. Determinación de las propiedades antibacterianas de las aleaciones anodizadas y aleaciones cargadas con antibióticos .....	104
5.4.1. Medición de turbidez por espectrofotometría .....	104
5.4.2. Recuento bacteriano en placa .....	110
5.4.3. Prueba de antibiograma .....	118
5.5. Mediciones de ángulos de contacto.....	120
5.6. Pruebas de biocompatibilidad <i>in vitro</i> .....	122
5.6.1. Actividad citotóxica de las aleaciones por el ensayo colorimétrico de MTT .....	122
5.6.2. Estudio de la adhesión de osteoblastos a las aleaciones mediante técnicas de microscopía .....	125
5.7. Electrodeposición de iones bioactivos sobre aleaciones de Ti-407.....	133
5.7.1. Caracterización de la morfología y composición elemental de los recubrimientos bioactivos por SEM-EDS .....	133
5.7.2. Actividad citotóxica de los recubrimientos bioactivos por el ensayo colorimétrico de MTT .....	136
5.8. Estudio de la biocompatibilidad <i>in vivo</i> mediante la implantación quirúrgica de la aleación Ti-407 .....	138
6. CONCLUSIONES.....	142
7. BIBLIOGRAFÍA.....	146
8. ANEXOS .....	204

# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis de la composición elemental mediante la técnica de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS) en los nanotubos generados en la superficie de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn, utilizando diferentes voltajes de anodización .....	53
Tabla 2. Composición elemental relativa obtenida por XPS de la capa de óxido nanotubular formada en Ti-24Zr-10Nb-2Sn a diferentes potenciales de anodización durante 30 minutos a 25°C .....	60
Tabla 3. Características morfológicas (longitud, diámetro, densidad, volumen encerrado y tiempo para liberar el 50% del antibiótico) por los nanotubos generadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn.....	63
Tabla 4. Análisis de la composición elemental mediante la técnica de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS) en los nanotubos generados en la superficie de la aleación Ti-407, utilizando diferentes voltajes de anodización .....	85
Tabla 5. Composición elemental relativa obtenida por XPS de la capa de óxido nanotubular formada en la aleación Ti-407 a diferentes potenciales de anodización durante 30 minutos a 25°C .....	94
Tabla 6. Características morfológicas (longitud, diámetro, densidad, volumen encerrado y tiempo para liberar el 50% del antibiótico) por los nanotubos generados de Ti-407 .....	99
Tabla 7. Comparación entre las nanoestructuras con mejor desempeño obtenidas para la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn y la aleación Ti-407. ....	101
Tabla 8. Análisis de la composición elemental (EDS) de la electrodeposición de iones bioactivos sobre la superficie nanoestructurada de la aleación Ti-407 .....	135

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrategia general que muestra el desarrollo experimental realizado en este proyecto de investigación para la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn. ....	30
Figura 2. Estrategia general que muestra el desarrollo experimental realizado en este proyecto de investigación para la aleación Ti-407.....	30
Figura 3. Esquema de la celda electroquímica empleada para la funcionalización superficial por anodizado.....	32
Figura 4. Microscopio electrónico de barrido marca FEI modelo Nova NanoSEM™ 200.....	33
Figura 5. Pruebas de carga/liberación de antibióticos a partir de nanotubos de titanio. ....	34
Figura 6. Pruebas antibacterianas en aleaciones de titanio .....	36
Figura 7. Técnica de cultivo celular <i>in vitro</i> sobre aleaciones de titanio. ....	37
Figura 8. Pruebas de biocompatibilidad <i>in vitro</i> para aleaciones de titanio.....	38
Figura 9. Pruebas de adhesión celular a las aleaciones de titanio por Microscopía de fluorescencia. ....	40
Figura 10. Esquema representativo de la placa de osteosíntesis fabricada con la aleación Ti-407. ....	41
Figura 11. Pruebas de biocompatibilidad <i>in vivo</i> .....	43
Figura 12. Esquema representativo de la curva de densidad de corriente-tiempo que representa la formación de nanotubos por medio de la técnica de anodizado.....	46
Figura 13. (A) la densidad de corriente eléctrica y (B) la resistencia eléctrica durante el anodizado de la aleación Ti-24-Zr-10Nb-2Sn a distintos voltajes. ....	48
Figura 14. Vistas superiores de los nanotubos sintetizados sobre la superficie de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn a diferentes voltajes de anodización: 10, 15, 20 y 25 V. ....	51
Figura 15. Vistas en sección transversal de los nanotubos sintetizados sobre la superficie de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn a diferentes voltajes de anodización: 10, 15, 20 y 25 V. ....	52

Figura 16. Influencia del potencial anodizado en el crecimiento de estructuras nanotubulares: Relación de la longitud de los nanotubos (línea negra) y diámetros (línea azul). Recuadro: relación de aspecto de los nanotubos de Ti-24Zr-10Nb-2Sn.....	55
Figura 17. Influencia del potencial anodizado en el crecimiento de estructuras nanotubulares en Ti-24Zr-10Nb-2Sn: (A) Relación de la densidad de los nanotubos (línea negra) y volumen encerrado de los nanotubos (línea azul), (B) volumen total encerrado por unidad de área. ....	57
Figura 18. Espectros XPS para la superficie de aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn después de la anodización por 30 minutos a 10, 15, 20 y 25 V. ....	58
Figura 19. Espectros XPS de alta resolución para (A) O1s, (B) F1s, (C) Ti2p, (D) Nb3d, (E) Zr3d, y (F) Sn3d obtenidos para la capa pasiva nativa en la superficie de aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn anodizada a 25 V. ....	59
Figura 20. Porcentaje de liberación de gentamicina en función del tiempo. Las curvas corresponden a las muestras de la figura 14 y 15. Recuadro: la liberación de ráfaga del antibiótico se observa en los primeros minutos de liberación.....	62
Figura 21. Espectros FT-IR de nanotubos formados en la superficie de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn cargados con el antibiótico gentamicina.....	64
Figura 22. Propiedades antibacterianas por método de espectrofotometría de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn, no cargadas y cargadas con el antibiótico gentamicina sobre <i>S. aureus</i> . *Representa P<0.05 en comparación con el grupo de control. ....	67
Figura 23. Propiedades antibacterianas por ensayo de recuento bacteriano en placa de aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn, no cargadas y cargadas con el antibiótico gentamicina sobre <i>S. aureus</i> . *Representa P<0.05 en comparación con el grupo de control. ....	69
Figura 24. Determinación de las propiedades antibacterianas de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn cargadas y no cargadas con gentamicina sobre <i>S. aureus</i> por el método de antibiograma. ....	70
Figura 25. Actividad citotóxica de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn sobre osteoblastos de la línea celular MG-63 mediante el ensayo colorimétrico de MTT. ....	72
Figura 26. Imágenes de fluorescencia de osteoblastos MG-63 adheridos a las superficies de Ti-24Zr-10Nb-2Sn. (A) Control, (B) 10 V, (C) 15 V, (D) 20 V, (E) 25 V. ....	74

Figura 27. (A) la densidad de corriente eléctrica y (B) resistencia eléctrica durante el anodizado de la aleación Ti-407 a distintos voltajes.....	77
Figura 28. Vista superior (A), transversal (B) y posterior (C) de nanotubos sintetizados sobre la superficie de la aleación Ti-407 a 40 V durante 30 minutos a temperatura ambiente.....	80
Figura 29. Vista superior (A), transversal (B) y posterior (C) de nanotubos sintetizados sobre la superficie de la aleación Ti-407 a 50 V durante 30 minutos a temperatura ambiente.....	81
Figura 30. Vista superior (A), transversal (B) y posterior (C) de nanotubos sintetizados sobre la superficie de la aleación Ti-407 a 60 V durante 30 minutos a temperatura ambiente.....	82
Figura 31. Influencia del potencial anodizado en el crecimiento de estructuras nanotubulares: Relación de la longitud de los nanotubos (línea negra) y diámetros (línea azul). Recuadro: relación de aspecto de los nanotubos de Ti-407. ....	86
Figura 32. Influencia del potencial anodizado en el crecimiento de estructuras nanotubulares en Ti-407: (A) Relación de la densidad de los nanotubos (línea negra) y volumen encerrado de los nanotubos (línea azul), (B) volumen total encerrado por unidad de área. ....	88
Figura 33. Espectros XPS para la superficie de aleación Ti-407 después de la anodización por 30 minutos a 40, 50 y 60 V. ....	89
Figura 34. Espectros XPS de alta resolución para (A) Ti2p, (B) Al2p, (C) V2p, (D) O1s, (E) F1s, y (F) C1s para la superficie de aleación Ti-407 después de la anodización por 30 minutos a 40, 50 y 60 V. ....	92
Figura 35. Porcentaje de liberación de ceftriaxona en función del tiempo. Las curvas corresponden a las muestras de la figura 28, 29 y 30. La liberación total del antibiótico se observa a los 280 minutos. ....	96
Figura 36. Espectros FT-IR de nanotubos formados en la superficie de la aleación Ti-407 cargados con el antibiótico ceftriaxona. ....	103
Figura 37. Propiedades antibacterianas por método de espectrofotometría de las aleaciones anodizadas de Ti-407, no cargadas y cargadas con el antibiótico ceftriaxona sobre <i>E. coli</i> . *Representa P<0.05 en comparación con el grupo de control. ....	105



Figura 38. Propiedades antibacterianas por método de espectrofotometría de las aleaciones anodizadas de Ti-407, no cargadas y cargadas con el antibiótico ceftriaxona sobre <i>P. aeruginosa</i> . *Representa $P < 0.05$ en comparación con el grupo de control. ....	106
Figura 39. Propiedades antibacterianas por método de espectrofotometría de las aleaciones anodizadas de Ti-407, no cargadas y cargadas con el antibiótico ceftriaxona sobre <i>S. aureus</i> . *Representa $P < 0.05$ en comparación con el grupo de control. ....	107
Figura 40. Propiedades antibacterianas por el ensayo de recuento bacteriano en placa de las aleaciones anodizadas de Ti-407, no cargadas y cargadas con el antibiótico Ceftriaxona sobre <i>E. coli</i> . *Representa $P < 0.05$ en comparación con el grupo de control. ....	111
Figura 41. Propiedades antibacterianas por el ensayo de recuento bacteriano en placa de las aleaciones anodizadas de Ti-407, no cargadas y cargadas con el antibiótico Ceftriaxona sobre <i>P.aeruginosa</i> . *Representa $P < 0.05$ en comparación con el grupo de control. ....	113
Figura 42. Propiedades antibacterianas por el ensayo de recuento bacteriano en placa de las aleaciones anodizadas de Ti-407, no cargadas y cargadas con el antibiótico Ceftriaxona sobre <i>S. aureus</i> . *Representa $P < 0.05$ en comparación con el grupo de control. ....	115
Figura 43. Determinación de las propiedades antibacterianas de las aleaciones anodizadas de Ti-407 cargadas y no cargadas con ceftriaxona sobre bacterias patógenas relacionadas con infecciones postoperatorias por el método de antibiograma.....	119
Figura 44. Los ángulos de contacto en la superficie de Ti-407 y en las aleaciones anodizadas a 40, 50 y 60 V. *Representa $P < 0.05$ en comparación con el grupo de control. ....	121
Figura 45. Actividad citotóxica de las aleaciones anodizadas de Ti-407 sobre osteoblastos de la línea celular MG-63 mediante el ensayo colorimétrico de MTT. ....	123
Figura 46. Imágenes de fluorescencia (DAPI) de osteoblastos MG-63 adheridos a las superficies de Ti-407. (A) Control, (B) 40 V, (C) 50 V, (D) 60 V.....	126
Figura 47. Imágenes de fluorescencia (Actina) de osteoblastos MG-63 adheridos a las superficies de Ti-407. (A) Control, (B) 40 V, (C) 50 V, (D) 60 V.....	128

Figura 48. Imágenes obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido de los osteoblastos MG-63 adheridos a las superficies de Ti-407. Control (A-B), vista superficial a 20 y 5 $\mu\text{m}$ respectivamente y 40 V (C-D), vista superficial a 20 y 5 $\mu\text{m}$ respectivamente.....	131
Figura 49. Imágenes obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido de los osteoblastos MG-63 adheridos a las superficies de Ti-407. 50 V (A-B), vista superficial a 20 y 5 $\mu\text{m}$ respectivamente y 60 V (C-D), vista superficial a 20 y 5 $\mu\text{m}$ respectivamente.....	132
Figura 50. Vista superior (A, B, C y D) y sección transversal (E y F) de la electrodeposición de iones bioactivos sobre la superficie nanoestructurada de la aleación Ti-407. ....	134
Figura 51. Actividad citotóxica de las aleaciones anodizadas y electrodepositadas de Ti-407 sobre osteoblastos de la línea celular MG-63 mediante el ensayo colorimétrico de MTT. ....	137
Figura 52. Procedimiento quirúrgico realizado sobre el fémur de ratas Wistar como modelo de experimentación <i>in vivo</i> . (A) incisión y empleo de la pieza de mano de alta velocidad, (B, C) obtención de los surcos de fijación, (D) fijación del implante óseo de Ti-407.....	139
Figura 53. Procedimiento quirúrgico realizado sobre el fémur de ratas Wistar como modelo de experimentación <i>in vivo</i> , (A) posición final de la placa sobre el fémur (B) procedimiento de sutura para unir los tejidos, (C) formación de tejido nuevo en el área donde se realizó la fractura sin signos de inflamación (D) modelo animal evaluado, el animal sobrevivió al proceso quirúrgico, conservó el implante durante el periodo de evaluación y su comportamiento biológico no se vio alterado. ....	141

## LISTA DE SIMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
[ ]	Concentración
°C	Grados Celsius
=	Igual
™	Marca comercial
®	Marca registrada
±	Más/menos
>	Mayor
≥	Mayor que
<	Menor
≤	Menor que
μ	Micro/Micra
-	Negativo
#	Número
*	Por
x	Por
%	Porcentaje
+	Positivo
&	Y

# ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
A	Amperaje
alt	Altura
at.%	Porcentaje atómico
BLEE	Betalactamasas de espectro extendido
BCC	Estructura Cúbica Centrada en el Cuerpo
MTT	Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico
cm <sup>2</sup>	Centímetro cuadrado
CIIDIT	Centro de Innovación, Investigación y Desarrollo en Ingeniería y Tecnología
CEIBA	Comité de Ética de Investigación y Bienestar Animal
D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDM	Mecanizado por descarga eléctrica
eV	Electron-volt
e <sup>-</sup>	Electrón
EDS	Espectroscopía de Energía Dispersiva
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FT-IR	Espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier
Gpa	Gigapascal

g/cm <sup>3</sup>	Gramo por centímetro cúbico
HCP	Empaquetamiento hexagonal compacto
h	Hora
ICC	Infusión cerebro corazón
m/min	Metro por minuto
μL	Microlitros
μm	Micrómetro
mm	Milímetro
mL	Mililitros
mA/cm <sup>2</sup>	Miliamperio por centímetro cuadrado
nm	Nanómetros
PBS	Solución Salina Tamponada con Fosfato
π	Pi
pH	Escala logarítmica de la concentración de iones hidrógeno en el H <sub>2</sub> O
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBPs	Penicilina de unión a proteínas
r <sup>2</sup>	Radio al cuadrado
SEM	Microscopio Electrónico de Barrido
s	Segundos
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
UFC	Unidades formadoras de colonias
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León

UV/Vis

Ultravioleta-visible

V

Volumen

wt.%

Porcentaje en peso

XPS

Espectroscopía de Fotoelectrones de  
Rayos X

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue desarrollar estructuras nanotubulares en las aleaciones de Ti-24Zr-10Nb-2Sn y Ti-407 para estudiar sus propiedades biocompatibles y explorar su aplicación como sistemas de administración de antibióticos para prevenir infecciones bacterianas en posibles dispositivos médicos. Para esto las estructuras nanotubulares fueron sintetizadas mediante anodizado electroquímico en las superficies de las aleaciones, determinando las variables eléctricas que controlan su crecimiento a potencial constante. Con la microscopía electrónica de barrido (SEM) se mostró que las nanoestructuras presentan una estructura cilíndrica hueca con un crecimiento positivo en función del potencial aplicado y con el análisis superficial realizado por espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) se dilucidó que existen diferentes estados de valencia que evidenciaban la presencia de óxidos superficiales como  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ,  $\text{SnO}_2$  y  $\text{ZrO}_2$  para la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn y  $\text{Al}_2\text{O}_x$ , VO y  $\text{VO}_2$  para la aleación Ti-407. La incorporación del antibiótico gentamicina en los nanotubos de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn y ceftriaxona en los nanotubos de la aleación Ti-407 fue confirmada por espectrometría infrarroja (FT-IR). La liberación de antibióticos se evaluó en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 24 horas y se observó mediante pruebas microbiológicas que la liberación de los antibióticos cargados dentro de los nanotubos tenía un efecto bactericida. Mediante cultivos celulares y pruebas de adhesión celular se demostró que las aleaciones control y las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn y Ti-407 mostraron excelentes propiedades de biocompatibilidad *in vitro*. Finalmente, mediante la implantación quirúrgica de la aleación Ti-407 en modelos animales se demostró por primera vez que la aleación tiene buenas propiedades de biocompatibilidad *in vivo*.

# ABSTRACT

The objective of the present study was to develop nanotubular structures in Ti-24Zr-10Nb-2Sn and Ti-407 alloys to study their biocompatible properties and explore their application as antibiotic delivery systems to prevent bacterial infections in potential medical devices. For this purpose, nanotubular structures were synthesized through electrochemical anodization on the surfaces of the alloys, determining the electrical variables that control their growth at a constant potential. Scanning electron microscopy (SEM) showed that the nanostructures have a hollow cylindrical structure with growth depending on the applied potential. Surface analysis conducted by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) elucidated the presence of different valence states, indicating the presence of surface oxides such as  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ,  $\text{SnO}_2$ , and  $\text{ZrO}_2$  for the Ti-24Zr-10Nb-2Sn alloy, and  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{VO}$ , and  $\text{VO}_2$  for the Ti-407 alloy. The incorporation of the antibiotic gentamicin into the nanotubes of the Ti-24Zr-10Nb-2Sn alloy and ceftriaxone into the nanotubes of the Ti-407 alloy was confirmed by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). Antibiotic release was evaluated in a phosphate-buffered saline (PBS) solution for 24 hours, and microbiological tests revealed that the release of the loaded antibiotics within the nanotubes had a bactericidal effect. Through cell cultures and cell adhesion tests, it was demonstrated that both the control alloys and the anodized alloys of Ti-24Zr-10Nb-2Sn and Ti-407 exhibited excellent *in vitro* biocompatibility properties. Finally, through surgical implantation of the Ti-407 alloy in animal models, it was demonstrated for the first time that the alloy possesses good *in vivo* biocompatibility properties



# 1. INTRODUCCIÓN

Los biomateriales de titanio han demostrado ser una opción invaluable en una amplia gama de aplicaciones médicas debido a sus propiedades mecánicas, su excelente biocompatibilidad y su resistencia a la corrosión [1–4]. Sin embargo, a pesar de sus numerosas ventajas, existen complicaciones potenciales asociadas con su uso. Algunas de estas complicaciones incluyen la metalosis, alergias e hipersensibilidad, infecciones postoperatorias, el apantallamiento de tensiones y los costos de fabricación [5,6].

La metalosis es una condición en la que partículas de titanio pueden liberarse en el cuerpo debido a la fricción o desgaste de los implantes de titanio. Esto puede provocar una reacción inflamatoria y daño a los tejidos circundantes [5]. Algunas aleaciones de titanio pueden provocar reacciones alérgicas o hipersensibilidad, lo cual puede desencadenar una respuesta inmunológica severa en ciertos pacientes. En particular, las aleaciones de titanio-níquel pueden causar estas reacciones ya que el níquel es conocido por ser un alérgeno común. Además del níquel, otros componentes de las aleaciones de titanio, como el aluminio o el vanadio, también pueden desencadenar reacciones alérgicas en casos excepcionales [6]. Otra de las complicaciones más importantes asociadas al empleo de prótesis o implantes de titanio son las infecciones causadas por la presencia de microorganismos en el lugar donde se ha realizado una intervención quirúrgica. Esto puede tener graves consecuencias, entre las cuales se incluyen el rechazo del material, dolor, malestar, pérdida de función, daño tisular, septicemia y un mayor tiempo de recuperación [5]. Otro de los desafíos actuales es la falta de compatibilidad mecánica entre el hueso y los biomateriales de titanio utilizados en prótesis e implantes. Esto se debe a que las aleaciones utilizadas en estas aplicaciones deben tener un valor de módulo elástico muy similar al de los huesos para promover la regeneración ósea en caso de fractura y evitar la resorción del tejido. Este fenómeno, conocido como apantallamiento de tensiones, ocurre cuando el módulo elástico de la prótesis de titanio es considerablemente mayor que el del hueso, lo que hace que toda la carga recaiga sobre la prótesis al caminar. Esto significa que hay una carga mecánica limitada en el hueso, lo que conduce a una disminución gradual de la masa ósea con el tiempo y como resultado, las prótesis de titanio tienden a aflojarse y su vida útil se ve limitada [6]. Las superaleaciones base titanio pueden presentar dificultades en términos de maquinabilidad. El mecanizado de estas aleaciones puede ser complicado debido a su alta resistencia y baja conductividad térmica, lo que resulta en altas temperaturas de corte y un mayor desgaste de las herramientas. Esta dificultad en el proceso de fabricación puede plantear un desafío para los

fabricantes de dispositivos médicos complejos que utilizan titanio y sus aleaciones debido a los costos y el tiempo que pueden llegar a generar para su producción [6].

Con base en lo anterior, para abordar estas complicaciones, en este proyecto doctoral se propuso estudiar la biocompatibilidad y funcionalidad de dos aleaciones de titanio, con el objetivo de impulsar el desarrollo de nuevos biomateriales de titanio más seguros y efectivos para su desempeño clínico en el futuro.

Ti-24Zr-10Nb-2Sn es una aleación que tiene un efecto superelástico superior a las aleaciones de titanio libres de níquel con memoria de forma, presentando excelentes propiedades de deformación cuando se trata térmicamente, con un porcentaje de recuperación de hasta el 7%, el doble que otras aleaciones libres de níquel [7]. Esta aleación podría ser utilizada en aplicaciones como: implantes ortopédicos, stents vasculares, instrumentos quirúrgicos, prótesis dentales o dispositivos de fijación de tejidos.

Ti-407 es una superaleación base titanio cuya composición es de 0.85% Al y 3.9% V. Estudios previos muestran que esta aleación presenta una menor resistencia, pero una ductilidad significativamente mayor en comparación con la Ti-6Al-4V. Esta aleación en respuesta a una carga aplicada resulta más sensible a la texturización presentando una mayor elongación y rotación del grano en comparación con el Ti-6Al-4V. Su capacidad para acomodar deformaciones significativamente mayores antes del fallo en comparación con Ti-6Al-4V, brindará oportunidades para mejorar las propiedades de absorción de energía de impacto y una mejor maquinabilidad a costos de fabricación potencialmente más bajos [8,9]. Esta aleación podría ser utilizada en aplicaciones como: implantes ortopédicos, implantes dentales, stents vasculares, instrumentos quirúrgicos o componentes de dispositivos médicos.

En los últimos años, la modificación de la superficie de las aleaciones de titanio ha adquirido una gran importancia en el campo de las aplicaciones biomédicas [10,11]. Las características superficiales de las aleaciones de titanio, como su forma, rugosidad y composición química, ejercen una influencia significativa en las respuestas biológicas, tales como la integración ósea o las propiedades antimicrobianas. El anodizado es un proceso utilizado para funcionalizar la superficie de las aleaciones de titanio. Consiste en la creación de una capa de óxido de titanio controlada y densa en la superficie del material mediante la aplicación de corriente eléctrica en un electrolito. Si el anodizado se realiza bajo ciertas condiciones específicas, esta capa de óxido puede desarrollar estructuras tubulares nanométricas, conocidas como nanotubos de titanio [12]. Los

nanotubos en aleaciones de titanio debido a su tamaño, estructura y área superficial tienen un gran potencial en diversas aplicaciones biomédicas, que van desde la liberación de fármacos controlada y la prevención de infecciones postoperatorias hasta la mejora de la integración ósea. La estructura porosa de los nanotubos puede ser utilizada para cargar fármacos en su interior y luego liberarlos de manera controlada y sostenida en el sitio de implantación, lo que podría mejorar la eficacia del tratamiento postquirúrgico y reducir la adhesión y proliferación de bacterias en la superficie, disminuyendo el riesgo de infecciones asociadas y disminuyendo los efectos secundarios de los antibióticos [13–15]. Los nanotubos de titanio pueden proporcionar una superficie rugosa a nanoescala que favorece la adhesión y proliferación de las células óseas, lo que podría mejorar la capacidad para integrarse de manera más eficiente con el hueso circundante, lo que resultaría en una mejor estabilidad y durabilidad del implante de titanio [16–18]. Junto con las complicaciones asociadas a los biomateriales de titanio, es importante tener en cuenta los tiempos prolongados de regeneración ósea después de una fractura [19–21]. Estos períodos prolongados de recuperación pueden causar molestias y limitaciones significativas para los pacientes. Como parte de la investigación doctoral, también se ha explorado el uso de la electrodeposición para abordar este desafío y reducir los tiempos de recuperación de fracturas. Al reducir los tiempos de recuperación de fracturas, se puede mejorar significativamente la calidad de vida de los pacientes al permitir una rehabilitación más temprana y una pronta recuperación funcional. Además, la reducción de los tiempos de recuperación también tiene implicaciones económicas importantes al disminuir los costos asociados con largos períodos de inactividad y rehabilitación prolongada.

## **1.1. Contribución científica**

Generar nuevo conocimiento sobre la biocompatibilidad de nuevas aleaciones libres de elementos tóxicos, con modificaciones superficiales, para desarrollar implantes médicos que aceleren la regeneración de fracturas óseas, prevengan infecciones postoperatorias y mejoren la calidad de vida de las personas.

## 1.2. Hipótesis

La modificación superficial de aleaciones base titanio por ataque electroquímico permite la formación de nanoestructuras para la liberación de fármacos de manera controlada, lo que reduce el riesgo de infecciones postoperatorias. Además, mediante la electrodeposición de iones bioactivos en aleaciones de titanio se promueve el crecimiento celular, lo que acelera los tiempos de regeneración de fracturas óseas.

## 1.3. Objetivos

### 1.3.1. Objetivo general

Desarrollar estructuras nanotubulares en las aleaciones de Ti-24Zr-10Nb-2Sn y Ti-407 para estudiar sus propiedades biocompatibles y explorar su aplicación como sistemas de administración de antibióticos para prevenir infecciones postoperatorias en posibles dispositivos médicos.

### 1.3.2. Objetivos específicos

- Funcionalizar la superficie de las aleaciones Ti-24Zr-10Nb-2Sn y Ti-407 empleando la técnica de anodizado.
- Caracterizar la morfología de las nanoestructuras y los recubrimientos desarrollados por las técnicas SEM-EDS, XPS y FT-IR.
- Determinar la liberación *in vitro* de antibióticos a partir de aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn y Ti-407.
- Determinar las propiedades antibacterianas de las aleaciones de Ti-24Zr-10Nb-2Sn y Ti-407 cargadas con antibióticos sobre bacterias relacionadas con infecciones postoperatorias.
- Estudiar la biocompatibilidad de las aleaciones Ti-24Zr-10Nb-2Sn y Ti-407 anodizadas mediante pruebas experimentales *in vitro*.
- Fabricar recubrimientos bioactivos sobre la superficie nanoestructurada de la aleación Ti-407 mediante la técnica de electrodeposición.
- Estudiar la biocompatibilidad de la aleación Ti-407 mediante pruebas de experimentación *in vivo*.

## 2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

### 2.1. Aleaciones de titanio

El titanio es uno de los metales más utilizados en el área biomédica. Su baja densidad ( $4.7 \text{ g/cm}^3$ ) comparada con otros materiales metálicos como el acero inoxidable AISI 316 ( $7.9 \text{ g/cm}^3$ ), la aleación CoCrMo ( $8.3 \text{ g/cm}^3$ ) y la aleación CoNiCrMo ( $9.2 \text{ g/cm}^3$ ) junto a sus buenas propiedades mecánicas como un módulo elástico más cercano al hueso (103 Gpa) así como su alta resistencia a la corrosión y buena biocompatibilidad hacen del titanio un biomaterial de gran interés para aplicaciones en prótesis e implantes quirúrgicos [22–24]. El titanio puede endurecerse mediante la adición de elementos aleantes o mediante procesos de deformación. El titanio puro sufre una transformación alotrópica alrededor de los  $882 \text{ }^\circ\text{C}$ , arriba de este valor, presenta una fase  $\beta$  centrada en el cuerpo (BCC), y cambia a una fase  $\alpha$  hexagonal compacta (HCP) al bajar la temperatura. Además, las aleaciones de Titanio pueden presentar fases martensíticas metaestables con estructura hexagonal u ortorrómbica [24–26]. Esta transformación ofrece la posibilidad de obtener aleaciones de titanio con diferente microestructura y propiedades, que pueden ser divididas en tres tipos: aleaciones de una sola fase, tipo  $\alpha$  (HCP), tipo  $\beta$  (BCC) y aleaciones en las que encuentran ambos tipos de fases ( $\alpha$ - $\beta$ ) [25,27,28]. La temperatura de transición entre las fases  $\alpha$ -HCP y  $\beta$ -BCC se puede estabilizar agregando elementos al titanio. Los elementos que pueden estabilizar la fase  $\alpha$  del titanio aumentan la temperatura de transformación y se les denomina elementos  $\alpha$  estabilizadores [24,29]. El aluminio, el carbono, el oxígeno y el nitrógeno son los elementos más representativos y presentan diferentes propiedades: el aluminio es un elemento de sustitución en la estructura cristalina del titanio, mientras que el oxígeno, el nitrógeno y el carbono son intersticiales y aumentan la resistencia mecánica del titanio [29]. El aluminio es el elemento estabilizador más utilizado en la mayoría de las aleaciones de titanio comerciales debido a su baja densidad, sin embargo, la cantidad de este elemento que se puede agregar a las aleaciones de titanio es limitada debido a que a partir del 8% en peso, la fragilidad aumenta por la formación de compuestos intermetálicos [30]. Otros elementos reportados como  $\alpha$  estabilizadores son: B, Ga, Ge y elementos de tierras raras, pero su solubilidad en el titanio es mucho menor en comparación con el aluminio y ninguno de estos elementos tiene grandes aplicaciones en la actualidad [31,32]. Entre los elementos que pueden estabilizar la fase  $\beta$  del titanio se encuentra el níquel, vanadio, molibdeno, niobio, talio, cromo, hierro y silicio [29,30]. Estos elementos proporcionan a las aleaciones una mayor tenacidad a la fractura en comparación

con las aleaciones  $\alpha$ . La principal desventaja de estas aleaciones es que pueden llegar a presentar una segregación intermetálica debido a la alta concentración de estabilizadores  $\beta$ , este problema se puede minimizar aplicando un tratamiento térmico apropiado para homogeneizar la composición química durante la solidificación de la aleación [32,33]. Por otra parte, las aleaciones  $\alpha$ - $\beta$  contienen una concentración suficiente de elementos  $\beta$  estabilizadores para provocar que la fase  $\beta$  persista hasta temperatura ambiente [32]. Estas aleaciones presentan una mayor dureza que las aleaciones  $\alpha$  y pueden someterse a tratamientos térmicos de envejecimiento para obtener mayor resistencia mecánica. Por lo tanto, los elementos estabilizadores de ambas fases como los elementos llamados neutros, que no modifican en gran medida las temperaturas de transición elevan la resistencia mecánica del titanio puro, mejorando sus propiedades y permitiendo así su uso en distintas aplicaciones industriales [32,34]. Actualmente las aleaciones de Ti-Ni y Ti-6Al-4V, debido a sus propiedades mecánicas superiores, han sido hasta el momento los materiales metálicos más utilizados en prótesis, implantes y dispositivos médicos. Las aleaciones de Ti-Ni son de gran interés, por sus propiedades mecánicas de superplasticidad y memoria de forma [35–37], mientras que las superaleaciones de Ti-6Al-4V lo son, por su elevada resistencia a la fatiga y a la fractura a temperatura ambiente [23,38,39]. En las siguientes secciones se explicará con mayor detalle las propiedades de las aleaciones que serán estudiadas en este trabajo de tesis.

## **2.2. Aleaciones base titanio con memoria de forma**

Las aleaciones con memoria de forma se comportan de manera muy diferente a los materiales convencionales [40]. Por ejemplo, mientras que se considera que la gran mayoría de los metales se deforman plásticamente a partir del 0.2 % de elongación cuando se someten a una tensión, las aleaciones con memoria de forma pueden deformarse hasta un 10 % sin alcanzar su límite de elasticidad o sin sufrir deformaciones permanentes, lo que se conoce como superelasticidad. [41,42]. Una aleación de titanio tiene memoria de forma si recupera su forma original por simple calentamiento después de haber sido deformada “permanentemente” a baja temperatura [43,44]. El efecto de memoria de forma se puede describir como la capacidad de una aleación para deformarse en gran medida a partir de su forma original, sin que la deformación sea permanente y cuando la aleación se somete a una temperatura específica, la forma original es recuperada [41,44]. Las aleaciones con memoria de forma se pueden deformar

de forma reversible a través de un mecanismo de transformación de fase [35,45,46]. La austenita y la martensita son dos fases cristalinas importantes que están involucradas en el fenómeno de memoria de forma. La martensita es una fase cristalina que se forma en las aleaciones de titanio cuando se someten a un enfriamiento rápido desde una temperatura elevada, lo que se conoce como transformación martensítica. La austenita es una fase cristalina que se forma cuando la aleación se calienta por encima de su temperatura de transformación martensítica [47,48]. La temperatura de transformación martensítica se refiere entonces a la temperatura a la que ocurre la transformación de la fase austenítica a la fase martensítica en una aleación con memoria de forma [49].

En las aleaciones de titanio con memoria de forma, la martensita se forma a través de una transformación martensítica reversible, lo que permite que la aleación cambie de forma y luego vuelva a su forma original (austenita) cuando se le aplica un estímulo externo, como cambios de temperatura o estrés mecánico. Esto se debe a los defectos (dislocaciones y maclas) de la estructura cristalina de la martensita que permite cambios reversibles en su geometría y orientación. La martensita maclada y deformada son dos tipos de martensita que pueden formarse en aleaciones de titanio durante la transformación martensítica. La martensita maclada se caracteriza por la presencia de maclas (agrupaciones simétricas), que son planos de deformación que se producen durante la transformación martensítica. Por otro lado, la martensita deformada se forma cuando la tasa de enfriamiento es más lenta y se produce una deformación plástica (un proceso irreversible en el que un material se deforma permanentemente debido a la aplicación de una carga o tensión) en la martensita durante su formación [50–53].

La martensita en aleaciones de titanio está estrechamente relacionada con la superelasticidad. El efecto superelástico también conocido como superelasticidad se describe como la capacidad de una aleación para soportar una gran deformación cuando se aplica una carga y recuperar su forma cuando la carga se retira a una temperatura superior a la de transformación, de tal manera que la fase presente es la austenítica [54–56]. La superelasticidad en las aleaciones de titanio se logra mediante la creación controlada de martensita, que puede ser transformada de nuevo en la fase original mediante la aplicación de calor, permitiendo que los materiales sean deformados a grandes tensiones y luego vuelvan a su forma original al calentarse. Esto se da ya que al aplicar una carga a alta temperatura (temperatura austenítica), la fase austenítica se deformará elásticamente, por lo que el trabajo realizado por la carga externa reconfigura el orden atómico, resultando en una fase martensítica maclada, en este punto, si la carga externa se aplica con suficiente fuerza, el material puede

cambiar de fase a martensita deformada, presentando un cambio importante de deformación en dirección de la carga aplicada. Si se retira la carga en este punto, el sistema volverá a su fase austenítica de equilibrio, recuperando su forma original [42,54,57,58]. Se han desarrollado diferentes aleaciones con memoria de forma para el diseño y fabricación de materiales funcionales. Dentro del grupo de las aleaciones con memoria de forma, las aleaciones base Ti-Ni son las más utilizadas, después de las aleaciones base Cu como: CuZn, CuZnAl, CuAlBe CuAlNi [59–62].

Las aleaciones con memoria de forma de Ti-Ni son compuestos intermetálicos basados en una composición equiatómica (50 % atómico de Ti y Ni). Exhiben memoria de forma y propiedades superelásticas debido a la transformación martensítica termoelástica entre las fases austenita y martensita. Es una aleación que puede volver a su forma original después de una deformación elástica de hasta un 10%. Tiene buena resistencia a la corrosión y buena biocompatibilidad [42,63].

Para el caso que nos interesa en este trabajo de tesis sobre las aplicaciones biomédicas, dos propiedades deben cumplirse; biocompatibilidad y biofuncionalidad y es por esto por lo que el interés por los materiales con memoria de forma y superelasticidad ha crecido en los últimos años. Debido a sus propiedades mecánicas superiores y su biocompatibilidad el Ti-Ni es el material más utilizado en aplicaciones biomédicas [64,65].

Algunos ejemplos de aplicaciones del Ti-Ni son:

- Alambres de ortodoncia: Durante la etapa de colocación del alambre en la cavidad oral, el ortodoncista deforma el alambre, provocando una transformación de fase austenita (forma original) a una fase martensita. Una vez posicionado, el alambre intentará volver a su forma original; fase austenita (estable a temperatura de la cavidad oral), generando esfuerzos constantes para corregir la posición de los dientes [66].
- Grapas óseas: Durante el proceso de fabricación (alta temperatura) las grapas se encuentran en estado austenítico, teniendo una forma rectangular cerrada, durante su aplicación a temperatura ambiente la grapa se deforma, se abre y se inserta a ambos lados de la fractura sin aplicar fuerza (estado martensítico), debido al calor corporal, la grapa vuelve a su forma austenítica original, por lo que cierra y une las partes del hueso fracturado [67].



- *Stents* cardiovasculares: Se utilizan para desobstruir las arterias que llevan la sangre al corazón, los *stents* se introducen deformados con diámetros reducidos en los vasos sanguíneos y por sus propiedades superelásticas recuperan su forma y tamaño, abriendo la obstrucción que impide el flujo sanguíneo y evitando que los vasos sanguíneos se vuelvan a cerrar [68].

A pesar de que las aleaciones de Ti-Ni han sido las más utilizadas en el área biomédica, existe la preocupación por el níquel, el cual ha sido reportado como elemento causante de alergias e hipersensibilidad en pacientes, además de ser reportado como cancerígeno [69–73]. Los iones de níquel tienden a acumularse en las células, lo que afecta el metabolismo celular, como la síntesis de ADN [74,75].

Debido a esto, se están llevando a cabo investigaciones para desarrollar aleaciones base-titanio con memoria de forma libres de níquel, que pueden sustituir al níquel por materiales que sean completamente biocompatibles. [76–80]. Por tanto, las investigaciones se han centrado en el desarrollo de nuevas aleaciones para su aplicación como implantes a partir de elementos como el Nb, Ta, Zr o Mo, elementos que han sido reportados como seguros y biocompatibles por no presentar citotoxicidad o rechazo por alergias a estos metales [54,81,82]. Algunos ejemplos de estas aleaciones son: Ti-12Mo-6Zr-2Fe [83], Ti-15Mo-2.7Nb-3Al-0.2Si [84], Ti-15Mo-5Zr3Al [85], Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr [86], Ti-29Nb-13Ta-4Mo [87], Ti-35Nb-7Zr-5Ta [88], y Ti-36Nb-2Ta-3Zr-O [89].

Las aleaciones de Ti-Nb han destacado por su utilización como material superconductor y por sustituir al Ti-Ni en aplicaciones en la que es necesario utilizar biomateriales con memoria de forma [90]. En aplicaciones biomédicas se han utilizado por su alta tenacidad a la fractura, por su resistencia a la corrosión y por presentar un bajo módulo elástico, propiedades que se mejoran en las aleaciones base titanio ya que el niobio es un elemento que estabiliza la fase  $\beta$  [91].

Como se ha mencionado anteriormente, los módulos elásticos de las aleaciones de titanio suelen ser menores que otros biomateriales metálicos, como las aleaciones Co-Cr y los aceros inoxidables, uno de los problemas que existen en la actualidad en el área biomédica es la incompatibilidad mecánica de los huesos y los biomateriales (prótesis/implantes) ya que los biomateriales metálicos utilizados para estos propósitos deben tener un valor de módulo elástico muy similar al de los huesos para poder promover en caso de una fractura la regeneración ósea y evitar el proceso de resorción [92]. Este fenómeno conocido también como apantallamiento de tensiones, se debe a que el módulo elástico

de la prótesis es mucho mayor que la del hueso, lo que hace que al caminar toda la carga recaiga sobre la prótesis [93]. El tejido óseo se autorregula según la carga mecánica que recibe y se reabsorbe en ausencia de carga. Esto significa que hay poca carga mecánica sobre el hueso y, como resultado, la masa ósea del hueso disminuye con el tiempo, esto hace que las prótesis se aflojen, limitando así su vida media [93–95].

Con base en lo anterior, recientemente se ha llevado a cabo una caracterización mecánica de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn, elaborada en la Universidad de Tsukuba Japón buscando potenciales aplicaciones médicas [7]. Esta aleación exhibió un efecto superelástico notablemente mejor que las aleaciones de titanio libres de níquel con memoria de forma, presentando excelentes propiedades de deformación cuando se trata térmicamente, con un porcentaje de recuperación de hasta el 7%, el doble que otras aleaciones libres de níquel [7], y presentó un módulo elástico bajo en fase austenita a temperatura ambiente (52.6 Gpa) en comparación con otras aleaciones de titanio como el Ti-Ni austenítico (70-110 Gpa) [92,96]. La remodelación ósea es un proceso continuo que se produce en el hueso y que permite su adaptación a las cargas mecánicas a las que está sometido [97]. Los cambios en la carga mecánica del hueso por la implantación de un material pueden afectar la remodelación ósea, por lo cual existe una relación entre el valor del módulo elástico del material y la remodelación que tendrá el tejido óseo. El módulo elástico bajo que presenta la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn podría prevenir o evitar el fenómeno de apantallamiento de tensiones que afectan la remodelación ósea. Por esta razón, fue propuesta esta investigación sobre sus efectos directos sobre medios biológicos ya que no ha sido estudiada desde un punto de vista de biocompatibilidad.

### **2.3. Superaleaciones base titanio**

Las superaleaciones de titanio son un grupo de aleaciones que presentan excelentes propiedades mecánicas, caracterizándose por una combinación única de resistencia a la corrosión a altas temperaturas, resistencia a la oxidación y resistencia a la fluencia [98,99]. Actualmente la investigación y el desarrollo de las superaleaciones de titanio ha sido impulsado principalmente por la industria aeroespacial, aeronáutica y médica [100].

Dentro de la industria médica, las superaleaciones de titanio se utilizan principalmente en aplicaciones como implantes para osteosíntesis y prótesis articulares. Una prótesis consiste en una serie de elementos implantados, a

través de un procedimiento quirúrgico que sustituyen una articulación dañada [100,101]. Estos elementos buscan reproducir la forma y las propiedades originales de la articulación por lo que se requieren materiales resistentes y biocompatibles para los diseños de estos dispositivos médicos [102–104]. Como ya se mencionó, el titanio y sus aleaciones son los materiales más utilizados en el área médica gracias a su gran biocompatibilidad, su baja densidad y su valor de módulo elástico cercano al hueso, propiedades que lo convierten en un material clave para la fabricación de prótesis e implantes médicos, sin embargo, las superaleaciones base titanio presentan el inconveniente de ser materiales de difícil maquinabilidad que plantea un problema a la hora de abordar su proceso de fabricación [105–107].

En la actualidad, la superaleación más utilizada en el área médica es la Ti-6Al-4V que es una aleación de titanio  $\alpha+\beta$  cuya composición es de 6% Al y 4% V [30,108]. El aluminio incrementa la temperatura de la transformación entre las fases  $\alpha$  y  $\beta$ , mientras que el vanadio la disminuye [29]. Es una superaleación con excelentes propiedades mecánicas y buena biocompatibilidad con una gran resistencia a la corrosión y oxidación a temperaturas altas que se produce en diferentes grados, siendo los más usados los de grado: 5, 23 y 29, relacionados con la cantidad de oxígeno que contienen, lo que hace variar las propiedades mecánicas de la aleación [109].

El Ti-6Al-4V puede ser mecanizado para adaptarse a la forma irregular de los huesos en aplicaciones que requieren la unión de huesos fracturados como placas o prótesis óseas, sin embargo, esto no sólo tiene un alto costo de producción, sino que su maquinabilidad es muy difícil, lo que puede plantear desafíos para la fabricación de estos dispositivos [102,107,110]. Aunado a esto, se ha reportado que esta aleación presenta citotoxicidad en los pacientes a largo plazo [111], condición que pueden llegar a presentarse debido a los esfuerzos mecánicos provocados por el movimiento corporal, que desgastan la aleación y que con el paso del tiempo se pueden liberar iones metálicos en los tejidos circundantes, provocando el aflojamiento del material (metalosis), y por lo tanto la pérdida de funcionalidad de la prótesis [112–114].

Con base en lo anterior, las investigaciones se han centrado en la búsqueda de nuevos biomateriales como alternativa al Ti-6Al-4V que mejoren sus propiedades como material protésico. Estudios recientes han reportado que la aleación de Ti-407 puede ser un sustituto rentable del Ti-6Al-4V [8,9]. El Ti-407 es una nueva aleación  $\alpha+\beta$  formulada en el 2015 cuya composición es de .85% Al y 3.9% V, también puede encontrarse aleada con elementos como O (0.15 %), Si (0.25 %) o Fe (0.25 %), cuya composición dependerá de su proceso de fabricación [9]. Estudios previos experimentales de tensión-deformación muestran que la

aleación Ti-407 presenta una menor resistencia, pero una ductilidad significativamente mayor en comparación con la Ti-6Al-4V [8,9]. Esto debido al contenido reducido de aluminio en la aleación de Ti-407 que permite un movimiento de dislocación adicional retrasando el inicio y la propagación de grietas, lo que demuestra la flexibilidad de procesamiento de esta aleación para ciertas aplicaciones [8]. El Ti-407 en respuesta a una carga aplicada resulta más sensible a la texturización presentando una mayor elongación (24 %) y rotación del grano en comparación con el Ti-6Al-4V (14 %). Su capacidad para acomodar deformaciones significativamente mayores antes del fallo en comparación con Ti-6Al-4V, brindará oportunidades para mejorar las propiedades de absorción de energía de impacto (Ti-6Al-4V (60 Nm) / Ti-407 (108 Nm)) y una mejor maquinabilidad (Ti-6Al-4V (V15 m/min: 72) / Ti-407 (V15 m/min: 153)) a costos de fabricación potencialmente más bajos [9,105].

Actualmente no existen reportes del uso de Ti-407 como biomaterial por lo que en este trabajo de tesis se estudiará por primera vez sus propiedades biocompatibles con el objetivo de elucidar estas propiedades en busca de nuevos biomateriales de fácil maquinabilidad que mejoren los procesos de fabricación y costos de prótesis articulares.

## **2.4. Funcionalización superficial de aleaciones de titanio**

La mejora de las propiedades superficiales es un factor crucial para lograr el éxito de un material biocompatible, ya que, en el caso de un material implantado, es la superficie la que establece un contacto directo con los sistemas biológicos [37,115–117]. Las características superficiales de las aleaciones de titanio como la morfología, la rugosidad y la composición química tienen un gran impacto en las respuestas biológicas como la osteointegración o las propiedades antibacterianas [116,118,119]. Está reportado que las aleaciones de titanio forman de manera natural una capa nanométrica de óxido que le confiere cierto grado de biocompatibilidad y resistencia a la corrosión, sin embargo, este óxido presenta bajas propiedades mecánicas superficiales, tales como baja dureza, reducida resistencia al desgaste y a la abrasión [111,120]. En este sentido, un biomaterial metálico utilizado como implante o prótesis médica con bajas propiedades mecánicas superficiales está destinado al fallo temprano. Una de las principales causas de fallo en prótesis o implantes médicos es debido a la liberación de iones metálicos o de partículas desgastadas de la superficie del implante debido al estrecho contacto con otras superficies biológicas [121,122].

Aunque las partículas sean de materiales que no son tóxicos, estas pueden provocar una respuesta inflamatoria debido a su tamaño, además el desgaste de la superficie metálica aumenta su área superficial y en consecuencia aumenta la cantidad de iones metálicos liberados [123]. Estas partículas o iones de desgaste impiden la formación de una interfase entre el material y el tejido óseo, lo que induce la falla del implante.

Las propiedades mecánicas superficiales de las aleaciones de titanio pueden ser mejoradas mediante procesos electroquímicos como la anodización, técnica que permite obtener capas de óxido de mayor espesor y densidad que la capa que se forma naturalmente, mejorando así la resistencia a la corrosión y al desgaste de estos materiales [27,124–126]. En esta técnica se utiliza una celda electroquímica, dispositivo en el cual dos electrodos se encuentran sumergidos en una solución electrolítica para aplicar una variación de voltaje o corriente entre ellos [127,128]. Como electrodo positivo o ánodo, se utilizan los materiales a oxidar, en este caso, las aleaciones de titanio, mientras que el electrodo negativo o cátodo se utilizan materiales inertes como el platino [129]. Entre los parámetros de la técnica que afectan en mayor grado las características de los óxidos como el tamaño, espesor, uniformidad, color, homogeneidad y densidad, son: la concentración, pH y temperatura del electrolito, el tiempo de anodizado, la diferencia de potencial entre cátodo y ánodo (voltaje) y la densidad de corriente [126,127]. Dentro de las variables de anodización, el cátodo utilizado en el proceso influye en la tasa de crecimiento de la capa de óxido, lo que afecta directamente la sobretensión generada entre los electrodos, lo que resulta en cambios en la estructura y dimensiones de la capa de óxido [106].

Cuando se trata de titanio y sus aleaciones, el crecimiento de nanocapas se logra utilizando electrolitos acuosos que contienen iones fluoruro o cloruro. Esto se debe a que la solubilidad del óxido de titanio en estos electrolitos tiene un impacto directo en las propiedades y características de los óxidos resultantes [130,131]. Se ha reportado que la técnica de anodizado permite funcionalizar la superficie de aleaciones de titanio con óxidos nanoestructurados para mejorar la interacción con los sistemas biológicos [115,129]. La funcionalización por anodizado permite sintetizar diferentes morfologías de nanoestructuras de óxido de titanio, sin embargo, para generar capas nanotubulares sobre aleaciones de titanio por esta técnica es necesario emplear electrolitos que contengan iones fluoruros por la alta solubilidad del óxido de titanio en estos electrolitos [132,133]. Con base en lo anterior, la capa de óxido que se forma a través de reacciones de oxidación electroquímica es dependiente de la concentración del electrolito, del voltaje aplicado, de la composición del material a anodizar y del tiempo de anodización, por lo que se reportan tres reacciones para la formación de nanotubos: [134–136]

- Los iones metálicos de la aleación se disuelven continuamente en el electrolito, dando como resultado la corrosión del metal o el electro pulido.
- Los iones metálicos reaccionan con el oxígeno presente en el agua del electrolito, formando un óxido denso e insoluble.
- Se produce una competencia entre la formación del óxido insoluble y la disolución química de la aleación, lo cual resulta en la aparición de poros. Estos poros tienen la capacidad de crecer y formar estructuras nanotubulares, logrando un equilibrio entre la formación del óxido en la interfaz metal/óxido y la disolución química en la interfaz óxido/electrolito. Este proceso es asistido por el campo eléctrico aplicado y el tiempo de reacción.

Existen varias técnicas de caracterización que se pueden utilizar para confirmar la formación de nanotubos en aleaciones de titanio. Algunas de las técnicas empleadas se mencionan a continuación:

- La microscopía electrónica de barrido (SEM) es una técnica que permite observar la superficie de los materiales con una alta resolución espacial. Mediante un haz de electrones que incide sobre la muestra, se generan diferentes señales que pueden ser detectadas y analizadas para obtener información sobre la morfología, la composición y la estructura de los materiales [137,138]. El SEM permite caracterizar la forma, el tamaño, la distribución y la orientación de los nanotubos de titanio, así como su interacción con otros materiales o agentes biológicos. Además, mediante técnicas complementarias como la espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS), se puede determinar la composición elemental de los nanotubos de titanio [139,140]. Por lo que el SEM es una herramienta indispensable para el desarrollo de los nanotubos de titanio y sus aplicaciones.
- La Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) es una técnica de caracterización superficial que permite determinar la composición química y el estado de oxidación de los átomos presentes en la superficie de un material. Esta técnica se basa en el efecto fotoeléctrico, que consiste en la emisión de electrones por parte de un material al ser irradiado con rayos X. Los electrones emitidos tienen una energía cinética que depende de la energía de los rayos X y del potencial de ionización del átomo del que proceden. Al medir la energía cinética de los electrones y el número de electrones emitidos por unidad de energía, se obtiene un espectro XPS que contiene información sobre los elementos químicos y sus estados de oxidación presentes en la superficie del material [141–143].
- El ángulo de contacto es una medida de la mojabilidad de una superficie sólida por un líquido. Se define como el ángulo formado por la tangente a

la interfaz líquido-sólido y la tangente a la interfaz líquido-aire en el punto de contacto. El ángulo de contacto depende de las propiedades físicas y químicas de la superficie sólida, así como de la tensión superficial del líquido [144–147].

La literatura menciona que la formación de nanotubos en aleaciones de titanio puede realizarse a voltajes constantes que oscilan entre 1 a 60 V en un electrolito acuoso o un electrolito orgánico base fluoruro a temperatura ambiente [127,148,149]. En estudios recientes, se han publicado investigaciones que abordan la fabricación de nanotubos de TiO<sub>2</sub> utilizando aleaciones que contienen elementos como Nb y Zr. Estas nanoestructuras exhibieron propiedades biológicas destacadas, según los resultados obtenidos [124,125]. Asimismo, se ha reportado que la formación de nanotubos sobre aleaciones de titanio es una ruta prometedora para mejorar las propiedades mecánicas superficiales promoviendo la osteointegración y la biocompatibilidad de los implantes utilizados para fracturas óseas [14,127,150]. Para probar la biocompatibilidad de un nuevo material, es necesario realizar pruebas en un entorno *in vitro* y posteriormente en un modelo *in vivo*. El desarrollo de este tipo de pruebas será discutido en la sección 2.6.

## **2.5. Sistemas de liberación de fármacos para el tratamiento de infecciones postoperatorias**

Entre las principales complicaciones médicas asociadas al uso de prótesis o implantes médicos es la aparición de procesos infecciosos debido a la colonización de microorganismos en el lugar de implantación durante una cirugía. A estas infecciones que ocurren después de una intervención quirúrgica y afectan la herida se les denomina infecciones postoperatorias [151–154]. La administración de antibióticos es el proceso médico utilizado para tratar o prevenir las infecciones postoperatorias después de una intervención quirúrgica. El tipo de antibiótico empleado para tratar una infección postoperatoria dependerá del tipo de microorganismo presente y su sensibilidad, según la gravedad de la infección y de las condiciones del paciente, los antibióticos se pueden administrar por vía oral, tópica o intravenosa [155–158]. Algunos ejemplos de antibióticos que se pueden utilizar para tratar infecciones postoperatorias son: penicilinas, quinolonas, carbapenémicos, metronidazol, aminoglucósidos como la gentamicina y cefalosporinas como la ceftriaxona [159–161]. A continuación, se describen los antibióticos utilizados en esta tesis.

La gentamicina es un antibiótico bactericida utilizado para tratar infecciones provocadas por bacterias gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Providencia*, *Serratia* y cepas de estafilococos coagulasa positivos y negativos. La gentamicina funciona uniéndose a la subunidad 30S de los ribosomas, impidiendo que estos organelos puedan leer la información que se encuentra en el ADN para fabricar proteínas, por lo que se interrumpe su síntesis, al no producir proteínas, las bacterias no pueden realizar sus funciones metabólicas y mueren. La gentamicina se puede usar para tratar infecciones graves como endocarditis, sepsis, meningitis, neumonía y el tracto urinario mediante su administración vía intramuscular o intravenosa o para tratar infecciones en la piel, ojos, oídos con ungüentos o cremas vía tópica [162–164]. La gentamicina también se puede usar para prevenir o tratar las infecciones por implantes quirúrgicos. Un estudio mostró que el uso de esponjas de colágeno con gentamicina disminuye significativamente las infecciones del sitio quirúrgico [165]. Otro producto es el Garacoll®, que ayuda a proporcionar concentraciones elevadas de gentamicina en las heridas quirúrgicas para prevenir o eliminar infecciones locales. Estos implantes se pueden colocar directamente sobre el tejido infectado o alrededor del implante [166]. La administración oral de gentamicina no es eficaz, al igual que otros aminoglucósidos. Esto se debe a que, una vez administrada, se absorbe en el intestino delgado y luego se dirige hacia el hígado, donde sufre inactivación, perdiendo así su efectividad [167].

La ceftriaxona es un antibiótico bactericida de tercera generación utilizado para tratar infecciones provocadas por bacterias grampositivas y gramnegativas como *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. La ceftriaxona funciona inhibiendo la síntesis de la pared celular de las bacterias al unirse a unas proteínas específicas llamadas proteínas ligandos de la penicilina (PBPs), al impedir la formación de la pared celular las bacterias mueren al no poder crecer ni dividirse. La ceftriaxona se puede usar para tratar infecciones como la gonorrea, enfermedad pélvica inflamatoria, meningitis, infecciones de los pulmones, oídos, piel, tracto urinario, sangre, huesos, articulaciones, abdomen, infecciones de los senos nasales, endocarditis, enfermedad de Lyme, fiebre recurrente, infección por shigella o salmonella, fiebre tifoidea y enfermedad de Whipple [161,168–170]. La ceftriaxona también se puede utilizar para prevenir o tratar infecciones postoperatorias. Se ha utilizado para prevenir la infección de las válvulas y el revestimiento del corazón (endocarditis) antes de una cirugía [171]. Ha sido empleado para el tratamiento de infecciones de los órganos reproductivos de la mujer (enfermedad pélvica inflamatoria) que puede causar infertilidad [172] y también para tratar infecciones de los huesos y las



articulaciones (osteomielitis y artritis séptica) que puede ocurrir después de una fractura o una prótesis [173]. La ceftriaxona se puede administrar por vía intravenosa o intramuscular y tiene una acción prolongada por lo que suele bastar con una dosis al día [170].

Las infecciones que se desarrollan en el sitio de implantación durante o después de una cirugía pueden desencadenar el rechazo de una prótesis o un implante. Estas infecciones pueden ser causadas por microorganismos que se encuentran en el ambiente hospitalario, en el personal que brinda la atención médica o provenir de la piel y el cuerpo de los pacientes. Los microorganismos relacionados con estas infecciones pueden ser bacterias, hongos o virus, los cuales pueden variar según el tipo y la localización de la cirugía [174,175]. Algunas de las bacterias más relacionadas con las infecciones postoperatorias y las cuales fueron estudiadas en esta tesis son: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

La *Escherichia coli* es una bacteria que se encuentra comúnmente en el medio ambiente, los alimentos o los intestinos de personas y animales. *E. coli* es un bacilo gramnegativo, no esporulado, anaerobio facultativo con un desarrollo óptimo entre 35°C y 43°C, tiene un tamaño de 1-3 µm de largo por 0.4-0.7 µm de diámetro, es una bacteria productora de indol a partir de triptófano, no utiliza el citrato como fuente de carbono y fermenta la glucosa o la lactosa con producción de gas. En medios de cultivo como el agar soya tripticaseína las colonias de *E. coli* crecen con un patrón de crecimiento constante y un color blanquecino o beige con una textura brillante. El tiempo que tardan en crecer las colonias de *E. coli* depende de la temperatura y el medio de cultivo, por ejemplo, en una placa de agar nutritivo incubada a 37°C, pueden aparecer colonias visibles de 24 a 48 horas. La mayoría de las cepas de *E. coli* son inocuas, sin embargo, algunas cepas pueden llegar a causar graves complicaciones como intoxicaciones alimentarias, insuficiencia renal o infecciones postoperatorias en heridas quirúrgicas [176–180].

La *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria que se encuentra usualmente en el medio ambiente como suelo o agua y en la piel, las mucosas o el tracto intestinal de las personas. *P. aeruginosa* es un bacilo gramnegativo, aerobio, no esporulado y móvil por la presencia de un flagelo polar con un desarrollo óptimo a 37°C, aunque puede crecer a temperaturas entre 45°C y 50°C, tiene un tamaño de 1-4 µm de largo por 0.5-1 µm de diámetro. Son bacterias formadoras de biofilm cuando se adhieren a una superficie, lo que les confiere una mayor resistencia a los agentes antimicrobianos y al sistema inmunitario del huésped. En medios de cultivo como el agar soya tripticaseína, después de un período de incubación de 18 a 24 horas, las colonias de *P. aeruginosa* comienzan a crecer, formando

colonias circulares, planas, lisas con márgenes regulares que pueden producir pigmentos fluorescentes como la piocianina y la fluoresceína que le otorgan un color verdoso a las colonias y se pueden observar bajo la luz ultravioleta. Es un patógeno oportunista que causa infecciones nosocomiales o intrahospitalarias, es especialmente peligrosa para las personas con alteraciones en su sistema inmunológico en enfermedades como fibrosis quística, quemaduras graves, heridas crónicas o que fueron sometidas a procedimientos invasivos como cirugías, cateterismo o ventilación mecánica. Las infecciones por *P. aeruginosa* pueden afectar a diferentes partes del cuerpo como la piel, los folículos pilosos, los ojos, los oídos, los pulmones, el tracto urinario, el sistema cardiovascular o el sistema nervioso central [181–185].

La *Staphylococcus aureus* es una bacteria que vive normalmente en la piel o en las fosas nasales de las personas. *S. aureus* es un coco grampositivo, no móvil, no esporulado, no posee cápsula, anaerobio facultativo y catalasa positivo, que tiene un rango óptimo de desarrollo entre 35°C y 37°C, aunque puede crecer a temperaturas entre 7 y 48°C, tiene un diámetro de 0.5-1.5 µm y pueden presentar diferentes patrones de agrupación, como células únicas, pares, tétradas, cadenas cortas o racimos de uvas. En medios de cultivo como el agar infusión cerebro corazón (ICC), estas colonias crecen después de un período de incubación de 24 a 48 horas, mostrando una apariencia de colonias circulares, lisas, elevadas, brillantes de bordes enteros con diámetros de 2 a 3 mm con una consistencia cremosa y pigmentación que va del gris al amarillo o dorado intenso debido a la producción de carotenoides. Las personas pueden ser portadoras de *S. aureus* sin desarrollar infecciones (asintomáticas), sin embargo, cuando entra en el organismo a través de una herida o vía intravenosa, es considerada una de las bacterias más virulentas y es responsable de un amplio espectro de enfermedades, que van desde infecciones de la piel, infecciones respiratorias, infecciones del sistema nervioso central, infecciones del sistema cardiovascular, infecciones gastrointestinales, infecciones del sistema osteoarticular hasta infecciones asociadas a prótesis o implantes médicos [186–191].

Los factores que influyen en la aparición de las infecciones postoperatorias son el número y la virulencia de los microorganismos contaminantes, las condiciones de los pacientes como edad, nutrición, enfermedades asociadas o defensas del sistema inmunológico y el ambiente hospitalario como la higiene, esterilización o profilaxis antibiótica [192–194]. Como ya se mencionó, la administración antibiótica puede ser por vía oral, intravenosa o tópica, estas vías de administración no son tan efectivas debido a que el fármaco no puede llegar fácilmente al sitio de infección después de una intervención quirúrgica. El aumento de la dosis como intento de superar esta limitante puede resultar en

toxicidad sistémica de los antibióticos a concentraciones más altas durante una administración prolongada [195,196]. Por lo que, la terapia antibiótica local se ha consolidado como una de las principales opciones para el tratamiento y prevención de infecciones postoperatorias, ya que la administración de antibióticos se realiza directamente en el sitio de la infección evitando los efectos de toxicidad sistémica y las interacciones con otros medicamentos, por lo que la acción de los antibióticos es más efectiva, ya que se ataca directamente a las bacterias causantes de la infección, reduciendo el riesgo de resistencia bacteriana ya que se usa una menor cantidad de antibiótico [197–199].

La terapia antibiótica local basada en estructuras nanométricas pueden presentar ventajas potenciales significativas para la prevención y tratamiento de infecciones postoperatorias. Los nanotubos obtenidos mediante la anodización de aleaciones de titanio han demostrado ser uno de los sistemas de liberación de fármacos más prometedores y se consideran como una alternativa para superar los tratamientos convencionales de administración de antibióticos en intervenciones quirúrgicas que involucran la colocación de prótesis o implantes médicos [14,200,201]. Los nanotubos de óxido de titanio pueden ser utilizados como sistemas de liberación de fármacos debido a sus características estructurales ya que su forma tubular de poro abierto en la parte superior y cerrado en la parte posterior con un espesor de pared y diámetro interno nanométrico que le otorga forma y masa por unidad de longitud en micrómetros le permite cargar en su interior una gran cantidad de antibióticos y liberarlos de forma controlada manteniendo una concentración efectiva de antibiótico en el sitio de implantación durante un periodo prolongado [102,126,132,202–204].

Existen diversas técnicas de caracterización que se pueden utilizar para estudiar el perfil de liberación de antibióticos en aleaciones de titanio. Algunas de las técnicas empleadas se mencionan a continuación:

- La espectrofotometría UV-Vis Nanodrop, permite medir la absorbancia de los antibióticos liberados por los nanotubos de titanio en el rango de longitud de onda ultravioleta-visible (UV-Vis). La intensidad de la luz que se transmite a través de las diversas muestras de antibiótico liberado es detectada por un sensor del equipo y el resultado obtenido se registra en forma de un espectro de absorbancia. La cantidad de luz absorbida se correlaciona con la concentración de la muestra [205–207].
- La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), es una técnica que se basa en la identificación de grupos funcionales dentro de moléculas en las que dichos grupos vibran por la absorción de la luz infrarroja, ya sea estirándose o doblándose de diversas formas cuando se

irradian con longitudes de onda de luz específicas. Estas vibraciones y su intensidad son detectadas (% de transmisión) y se representan gráficamente frente a la frecuencia de luz ( $\text{cm}^{-1}$ ) a la que se expone la muestra para producir un espectro FT-IR [208–210].

Diversos estudios han reportado el proceso el mecanismo de liberación de fármacos mediante el uso de nanotubos de titanio cargados con diversos tipos de medicamentos, incluyendo antibióticos como: vancomicina [211], gentamicina [212], doxorubicina [213] con antiinflamatorios como la indometacina [214], naproxeno sódico [215] e ibuprofeno [216] y la administración conjunta de fármacos gentamicina e ibuprofeno [217].

Existen diversas pruebas microbiológicas que se pueden utilizar para evaluar el efecto antibacteriano de la liberación de antibióticos a partir de nanotubos de titanio. Algunas de las pruebas empleadas se mencionan a continuación:

- La prueba de medición de turbidez por espectrofotometría. Este método se basa en la dispersión de la luz por las partículas en suspensión en una muestra líquida. El principio del método consiste en medir la variación de la turbidez de una muestra bacteriana antes y después de la exposición a los nanotubos de titanio cargados con el antibiótico gentamicina utilizando un espectrofotómetro. La reducción de la turbidez indica una disminución del número de bacterias viables, lo que refleja el efecto antibacteriano de los nanotubos de titanio, por el contrario, un aumento de la turbidez en el medio indicará un aumento en el número de bacterias viables en las muestras [218–220].
- La prueba de recuento bacteriano en placa. Esta prueba consiste en diluir la muestra de bacterias (provenientes de la medición de turbidez por espectrofotometría) e inocularla en un medio de cultivo semisólido donde cada bacteria puede crecer y formar una colonia visible. Después de un periodo de incubación, se cuentan las colonias visibles que las bacterias sobrevivientes al tratamiento han formado y se multiplica por el factor de dilución para obtener el número de colonias de la muestra original. Al número de colonias presentes en las placas de Petri se les denomina unidades formadoras de colonias (UFC) y puede expresarse por mililitro o gramo de muestra [221,222].
- La prueba de antibiograma, que consiste en sembrar un inóculo de las bacterias en una placa de Petri con medio de cultivo semisólido e introducir las placas de titanio cargadas con el antibiótico. Después de un período de incubación, se mide el diámetro de los halos de inhibición que se forman alrededor de las placas, lo que indica el grado de sensibilidad o resistencia de las bacterias al antibiótico [223].

Por lo general, uno de los retos principales en los sistemas de liberación por nanotubos de titanio es la liberación controlada y sostenida del fármaco para reducir o eliminar la adhesión bacteriana en aleaciones de titanio, la tasa de liberación puede mejorarse mediante el uso de recubrimientos poliméricos o ajustando la morfología de las nanoestructuras.

## **2.6. Pruebas de biocompatibilidad en aleaciones de titanio**

Debido a la naturaleza de este trabajo de tesis enfocado al área de los biomateriales metálicos, se va a profundizar en los diversos tipos de pruebas que se emplean para evaluar la biocompatibilidad de estos materiales.

Por definición, los biomateriales metálicos son materiales diseñados para interactuar con sistemas biológicos para evaluar, tratar, mejorar o reemplazar tejidos, órganos o funciones específicas del cuerpo [224–226]. En ese sentido, para el desarrollo de nuevos biomateriales metálicos, se debe tener en consideración las siguientes propiedades:

- Ser biofuncionales, es decir, deben ser capaces de realizar las funciones para las que fueron diseñados [227].
- Presentar buenas propiedades mecánicas sin efectos tóxicos; en los sistemas biológicos se requiere una elevada capacidad de resistencia a la corrosión y al desgaste, ya que los materiales en los sistemas biológicos no deben liberar iones o partículas en el medio biológico en el que residen. Si esto ocurre, el material puede ser altamente tóxico y puede reaccionar de forma nociva en los sistemas biológicos con los que interactúa [228].
- Promover la osteointegración, los biomateriales metálicos utilizados como prótesis o implantes médicos, deben establecer una conexión directa tanto estructural como funcional con el tejido óseo para facilitar su regeneración [229,230].

Para evaluar estas propiedades, las pruebas de biocompatibilidad *in vitro* forman parte de la primera fase de estudio debido a que son pruebas confiables y económicas debido a su facilidad de ejecución con resultados consistentes que permiten reducir el número de ensayos que se realizan en modelos animales [231–233]. Han sido desarrolladas diversas pruebas *in vitro* que permiten anticipar los posibles efectos tóxicos de sustancias y materiales, utilizando

cultivos celulares como modelos experimentales. Las pruebas de viabilidad celular *in vitro* proporcionan información sobre la respuesta biológica de nuevos materiales y dispositivos [234,235]. La viabilidad celular se puede definir como la capacidad que tiene un cultivo celular de seguir desarrollando sus funciones metabólicas ante la presencia de un biomaterial. Una de las pruebas más utilizadas para el estudio de los biomateriales es la prueba de viabilidad celular por reducción del compuesto MTT, fundamentada en la evaluación de la supervivencia celular en relación con el recuento de células presentes en un cultivo [236].

El MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico) es un compuesto perteneciente a la familia de las sales de tetrazolio, es soluble en agua y presenta un color amarillo. En una prueba de viabilidad al agregar este compuesto será captado por las células y metabolizado por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, resultando en la formación de un producto insoluble denominado formazán, un compuesto perteneciente a la familia de los formazanos, que son insolubles en agua y presentan un color púrpura. Tras la interacción del MTT con las enzimas mitocondriales, este compuesto se retendrá dentro de las células y posteriormente podrá ser liberado mediante su disolución en dimetilsulfóxido (DMSO). De esta manera se determina la viabilidad celular, a través de un cambio de coloración de amarillo a púrpura con una absorbancia máxima en 570 nm, ya que, la cantidad de formazán que se produzca en el cultivo celular es directamente proporcional al número de células vivas [237–239]. El análisis de la capacidad de las células para convertir el MTT en formazán, tras su exposición a un material, proporciona información sobre la citotoxicidad del biomaterial bajo evaluación [232]. La citotoxicidad de los biomateriales la podemos definir como la capacidad de algunos materiales para causar daño a las células vivas [231]. A pesar de que el titanio y sus aleaciones son los materiales más utilizados para el desarrollo de prótesis e implantes médicos, se ha reportado que los elementos que mejoran las propiedades mecánicas del titanio pueden llegar a presentar actividad citotóxica, algunos ejemplos de aleaciones de titanio con reportes de actividad citotóxica son:

- Ti-6Al-4V: es la aleación más utilizada en implantes ortopédicos y dentales, puede liberar iones metálicos que causan inflamación, estrés oxidativo y daño celular [240].
- Ti-6Al-7Nb: es una alternativa a Ti-6Al-4V que tiene menor liberación de iones metálicos pero mayor resistencia mecánica, puede inducir efectos citotóxicos en cultivos celulares de fibroblastos humanos [241].

- Ti-21Nb-6Zr-15Ta, Ti-25Nb-10Zr-9Ta: son aleaciones con bajo módulo elástico y alta biocompatibilidad. Sin embargo, puede generar especies reactivas del oxígeno que afectan la viabilidad celular y la diferenciación osteogénica [242].
- Ti-Ni: es una aleación que se usa en algunas endoprótesis aórticas, implantes ortopédicos y dentales. Algunos pacientes pueden tener alergia o hipersensibilidad al níquel, lo que puede causar reacciones adversas después de la colocación de la prótesis [74].

Con base en lo anterior, para el desarrollo de dispositivos médicos, es importante considerar no solo la composición química de las aleaciones de titanio sino también la morfología superficial ya que ambas propiedades son determinantes en el grado de biocompatibilidad que presentará el biomaterial, dado que la superficie del biomaterial es el primer punto de contacto con el tejido vivo al ser implantado en el cuerpo [243]. La adhesión celular es importante para mantener la estructura y la función de los tejidos del cuerpo, en este sentido, si las células del cuerpo no son capaces de adherirse a la superficie de un biomaterial, las células pueden perder su forma y su función metabólica normal y serán propensas a la invasión por microorganismos patógenos por lo que el material no podrá integrarse a los tejidos y habrá un rechazo del material por el sistema inmunitario del cuerpo [244–246].

Para el estudio de la biocompatibilidad de materiales, las pruebas de adhesión celular permiten evaluar la interacción entre las células y las superficies de los biomateriales. Estudiar la adhesión celular en los biomateriales nos permitirá conocer el grado de integración que tendrán con los tejidos del cuerpo [243,247,248]. Las pruebas de adhesión celular *in vitro* se realizan sembrando células en la superficie de los materiales, observando la morfología y el anclaje de las células con técnicas de microscopía. La microscopía de fluorescencia es una técnica que utiliza marcadores fluorescentes para visualizar y evaluar la interacción entre las células y las superficies de los materiales [249–251]. El DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) es un marcador fluorescente que se une fuertemente a las regiones ricas en adenina y timina en el ADN, emite luz azul cuando se ilumina con luz ultravioleta a 358 nm y se utiliza para visualizar el núcleo de las células que se adhieren a las superficies de los materiales [77,116,241].

Se ha establecido que la adhesión celular está relacionada con la adecuada rugosidad del material, a medida que aumenta la rugosidad aumenta el área de contacto entre el material y el tejido, por lo que las células que interactúan con el material implantado podrán crecer y desarrollar sus funciones metabólicas normales, permitiendo la integración del material en el tejido vivo [89,252,253].

Con base en lo anterior, los dispositivos como prótesis o implantes óseos deben tener una buena adhesión celular para permitir la fijación y el crecimiento de las células óseas en la superficie para evitar el desgaste y el aflojamiento del material. Se ha reportado que la rugosidad de las aleaciones de titanio puede modificarse mediante procesos electroquímicos como el anodizado. Estudios recientes han demostrado que las modificaciones superficiales de estas aleaciones con nanotubos de óxido titanio favorecen la adhesión y la proliferación de células óseas promoviendo la osteointegración [254–256]. El término osteointegración se utiliza para describir el proceso mediante el cual un material implantado se integra con el hueso en el lugar donde se coloca, creando una interfase en la cual interactúan y promueven la generación de nuevo tejido óseo [257–259].

Los osteoblastos son células especializadas en la formación ósea. Estas células son responsables de sintetizar y depositar la matriz ósea desempeñando un papel fundamental en la reparación y regeneración del tejido óseo [260–262]. La adhesión de los osteoblastos es un factor crítico en la osteointegración de las prótesis e implantes metálicos, ya que la adhesión celular tiene un impacto significativo en la diferenciación y la actividad osteogénica de estas células [263,264]. Las pruebas de adhesión celular por técnicas de microscopía como fluorescencia o microscopía electrónica de barrido permitirán estudiar la viabilidad y la morfología de las células óseas que se adhieren a las superficies de las aleaciones de titanio, lo que es fundamental para comprender cómo la composición química y la rugosidad de la superficie afectan la adhesión celular en las aleaciones de titanio.

La biocompatibilidad de las aleaciones de titanio también puede ser evaluada mediante pruebas de biocompatibilidad *in vivo*. Estas pruebas consisten en implantar los materiales en modelos animales para observar la respuesta biológica y asegurar que su uso no causará daño a los humanos. Estas pruebas se complementan con las pruebas de biocompatibilidad *in vitro*, que se realizan en cultivos celulares [265–268]. Entre las pruebas para evaluar la biocompatibilidad *in vivo* se encuentran, la irritación local, la sensibilización cutánea, la toxicidad sistémica y la implantación subcutánea u ósea [269–271].

Las pruebas de implantación ósea se realizan para evaluar la biocompatibilidad, la osteointegración y la estabilidad de los materiales que se colocan en el tejido óseo. De manera general, para realizar estas pruebas, se lleva a cabo una intervención quirúrgica para colocar el material en el hueso que sea objeto de estudio, después de un tiempo determinado (entre 1 y 14 semanas), se extraen los implantes y los tejidos circundantes analizándolos con técnicas histológicas. Estas pruebas son importantes para determinar el éxito y la seguridad de los



implantes o prótesis con el objetivo de evitar posibles complicaciones como el rechazo o las infecciones [272–275].

Las ratas Wistar son los animales de laboratorio más utilizados para la experimentación *in vivo*, por su tamaño, manejo y ciclo de vida corto. Para las pruebas de biocompatibilidad, se pueden emplear ratas de ambos sexos con un peso entre 200 y 300 gramos que se mantienen en condiciones controladas de temperatura, humedad y luz. Se ha reportado el uso de ratas Wistar para la evaluación de implantes de titanio porque son un modelo animal que permite estudiar el proceso de cicatrización e integración ósea de los implantes [276–281].

Estas pruebas de biocompatibilidad *in vivo* permiten evaluar el efecto biológico de las aleaciones implantadas y su interacción con el tejido circundante, a continuación, se describen brevemente algunos estudios:

- Un estudio donde utilizaron implantes ortodónticos autoperforantes de Ti-6Al-4V insertados en el fémur de las ratas Wistar para determinar la influencia de la carga inmediata con fuerzas leves en la respuesta tisular del tejido alrededor del implante [282].
- Un estudio donde se evalúa la genotoxicidad y la citotoxicidad de órganos como hígado, riñón y pulmones tras la implantación de materiales de fijación interna de titanio en ratas Wistar [283].
- Un estudio sobre la implantación de aleaciones Ti-6Al-4V con tratamiento térmico en hueso femoral de ratas Wistar para determinar el efecto de los cambios microestructurales en la osteointegración [284].
- Un estudio donde evalúan los niveles de titanio en los órganos y la sangre de ratas Wistar con un implante de titanio para evaluar la biodisponibilidad y toxicidad de los materiales [285].
- Un estudio sobre el efecto de recubrimientos de doble capa que consisten en una capa interna de titanio y una externa de hidroxiapatita sobre la bioactividad y la osteointegración de implantes endodónticos dentales [286].

## **2.7. Electrodeposición de iones bioactivos aleaciones base titanio**

Una fractura ósea es una rotura parcial o total de un hueso, las fracturas óseas pueden ocurrir debido a lesiones, accidentes o enfermedades como la osteoporosis. El tratamiento de las fracturas óseas depende de la gravedad de la lesión, la edad y el nivel de actividad de la persona, el tratamiento consiste en alinear los huesos fracturados en las posiciones correctas y mantenerlos en su lugar hasta que se regeneren empleando materiales fijadores internos o externos [287–291]. Las aleaciones de titanio se pueden utilizar como materiales fijadores (alambres, grapas, agujas, tornillos, placas, etc.) para tratar diferentes tipos de fracturas óseas, dependiendo de la localización, la gravedad y la extensión del daño [258].

Según el tipo de daño, las fracturas óseas se pueden clasificar de la siguiente manera: [288,292,293]

- Fracturas simples: son aquellas que presentan una línea de fractura, por lo que el hueso se fractura solo por una parte generando dos fragmentos. Las aleaciones de titanio pueden ayudar a fijar los fragmentos y a mantener la alineación del hueso.
- Fracturas abiertas: son aquellas en las que el hueso fracturado atraviesa la piel y queda expuesto al exterior. Las aleaciones de titanio pueden evitar la infección y la pérdida de tejido óseo al cubrir el defecto y aportar estabilidad.
- Fracturas complejas: son aquellas que implican múltiples líneas de fractura, conminución o desplazamiento de los fragmentos óseos. Las aleaciones de titanio pueden reconstruir la forma y la función del hueso al reemplazar las partes dañadas o ausentes.

El tiempo de regeneración de una fractura puede variar según la edad, la capacidad de recuperación, el tipo o localización de la fractura y el tratamiento recibido. En general, se estima que una fractura simple puede tardar entre 20 días y 60 días en regenerarse, mientras que una fractura abierta o compleja se puede demorar de 6 a 9 meses o más en regenerarse e incluso puede dejar secuelas permanentes.

A continuación, se citan algunos ejemplos de tiempos estimados de regeneración de fracturas óseas: [290,294]

- Tibia: 6 semanas a 6 meses
- Peroné: 6 semanas

- Fémur: 6 a 9 meses
- Radio y cúbito: 2 a 3 meses
- Húmero: 3 o 4 meses
- Vértebra: 2 a 3 meses
- Clavícula: 6 a 8 semanas
- Falanges o metacarpianos de manos: 4 a 6 semanas
- Falanges o metatarsianos de pies: 4 a 6 semanas
- Maxilar: 6 a 8 semanas

Como se puede observar, el tiempo que tarda en regenerarse una fractura ósea es relativamente largo. El proceso de regeneración de fracturas óseas consta de tres etapas principales: [295]

- Etapa inflamatoria y proliferativa: Cuando un hueso se fractura, inicialmente se produce una hemorragia y una inflamación en la localización de la fractura, posteriormente se liberan factores de crecimiento y células madre que estimulan la formación de tejido de granulación y vasos sanguíneos. Esta etapa dura unos días.
- Etapa de formación del callo de fractura: El tejido de granulación se transforma en un callo blando compuesto por fibrocartílago y tejido óseo inmaduro. El callo blando une los fragmentos óseos y proporciona estabilidad. Luego, el callo blando se endurece y se convierte en un callo duro formado por hueso esponjoso. Esta etapa dura unas semanas o meses.
- Etapa de remodelación: El callo duro se reabsorbe y se sustituye por hueso compacto que restaura la forma y la función del hueso original. Esta etapa puede durar meses o años, dependiendo de la gravedad de la fractura y otros factores.

Para reducir los tiempos de regeneración de fracturas óseas no solo se necesita la fijación y la estabilidad del hueso fracturado, también se requieren de iones que ayuden a la formación y la reparación del tejido óseo. Los huesos fracturados pueden tardar en regenerarse ya que el transporte de nutrientes a través del flujo sanguíneo puede ser limitado por la pérdida de vasos sanguíneos, el traumatismo de los tejidos, la inflamación o la inmovilización de la fractura [19,295–297]. Con base en lo anterior, reducir el tiempo de regeneración de fracturas óseas permitirá disminuir el dolor, la inflamación, el riesgo de infección y las complicaciones generadas a largo plazo mejorando la recuperación postoperatoria de los pacientes.

Como ya se mencionó, una de las alternativas para promover la regeneración de fracturas óseas es la síntesis de nanoestructuras sobre la superficie de aleaciones base titanio, esto debido a que las estructuras nanotubulares se adaptan mejor a la forma y la elasticidad de los huesos en comparación con la superficie dura y rígida del titanio convencional, asimismo por medio de estas modificaciones superficiales se crean sitios de anclaje para la adhesión y la proliferación celular que favorecen la integración de las aleaciones con el tejido óseo [298–301].

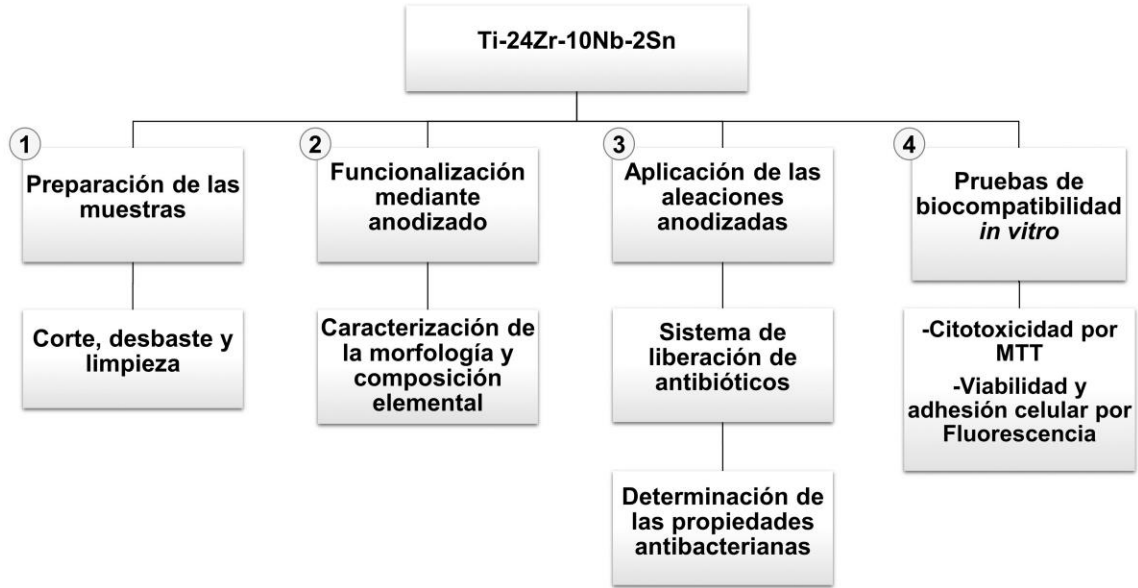
Las aleaciones base titanio pueden diseñarse para liberar iones bioactivos de forma controlada y localizada, lo que podría favorecer la regeneración del tejido óseo. Los iones bioactivos son sustancias que pueden interactuar con el tejido óseo, estimulando su crecimiento y reparación. Estos iones pueden obtenerse de fuentes naturales o sintéticas y pueden incorporarse en los materiales que se implantan en el sitio de la fractura ósea [302–304]. Estudios recientes, han reportado que, a través de tratamientos electroquímicos, se pueden generar superficies bioactivas sobre aleaciones de titanio por medio del recubrimiento con iones, tales como los fosfatos de calcio, debido a la afinidad que presentan con los tejidos óseos [305–307]. La incorporación de iones bioactivos sobre superficies nanoestructuradas es un campo relativamente nuevo, la técnica de electrodeposición hace posible migrar e incorporar iones biocompatibles hacia el interior de las nanoestructuras mediante la aplicación de un campo eléctrico. La electrodeposición es una técnica que permite obtener recubrimientos bioactivos empleando una celda electroquímica en la que iones metálicos como fosfatos de calcio o metales como magnesio, zinc, y potasio, contenidos en una solución acuosa, se depositan sobre una superficie conductora empleando una corriente eléctrica [308]. Al momento de aplicar una diferencia de potencial a la celda, se crea un campo eléctrico entre los electrodos y por consiguiente un flujo de corriente entre ellos, que es dependiente de la resistividad del medio electrolítico, lo que provoca que los iones positivos inmersos en la disolución acuosa se muevan hacia el cátodo (aleaciones de Ti) y los iones negativos hacia el ánodo (electrodo de platino). Cuando los iones llegan a la superficie de los electrodos, estos se comienzan a depositar, recubriendo el material de manera uniforme hasta que se deja de suministrar la corriente eléctrica. Esta técnica presenta múltiples ventajas con respecto a otros métodos de deposición, ya que se puede trabajar con materiales metálicos que tengan geometrías complejas, controlar el espesor y la uniformidad del recubrimiento, así como la velocidad de deposición [309–313]. Sin embargo, se desconoce las propiedades biocompatibles y los mecanismos de deposición de iones bioactivos sobre aleaciones de titanio, así como la influencia que ejercen las variables del proceso en el recubrimiento, como la densidad de corriente, la conductividad, la concentración, el movimiento

y la temperatura del electrolito, la distancia entre los electrodos, el área del material, la geometría de la celda y el tiempo de electrodeposición [314–316]. En esta investigación, se pretende obtener recubrimientos de iones bioactivos sobre aleaciones de titanio funcionalizadas superficialmente, teniendo en consideración que, los nanotubos generados a través del proceso de anodización son considerados uno de los sistemas de liberación más prometedores en el campo de los implantes médicos. Con la ayuda de estos recubrimientos bioactivos, estas nanoestructuras podrían llegar a ser consideradas como una de las principales alternativas para reducir los tiempos de regeneración de fracturas óseas.

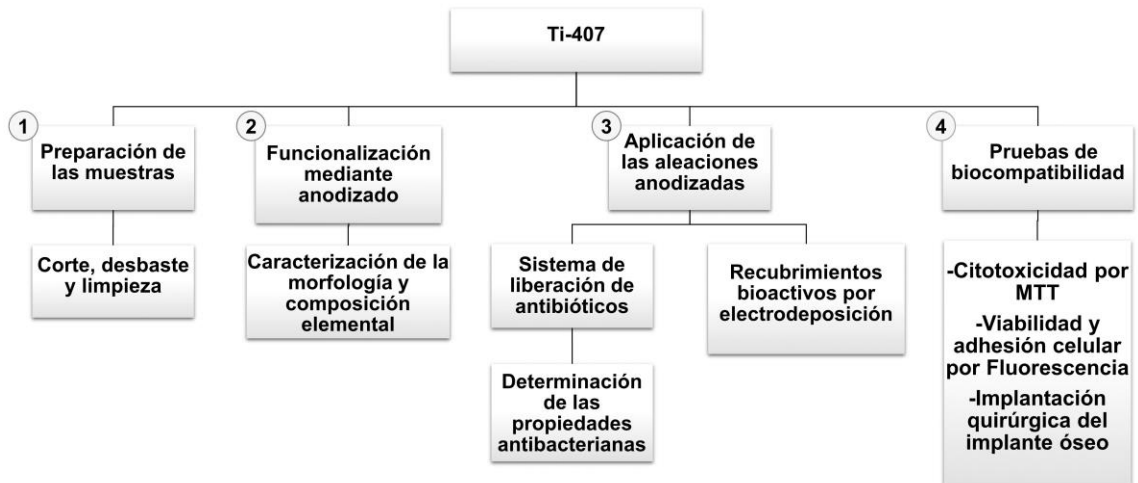
### 3. METODOLOGÍA

En el presente capítulo se describe en detalle la metodología experimental empleada en esta tesis. El capítulo comienza con la descripción de la preparación de las muestras; corte, desbaste y limpieza de las aleaciones a estudiar, seguido de la funcionalización de las muestras por la técnica de anodizado para la obtención de los nanotubos sobre la superficie de las aleaciones. Posteriormente, se especifican las técnicas de caracterización, que fueron: Microscopía electrónica de barrido (SEM), Análisis elemental por dispersión de energías de rayos X (SEM-EDX) y Espectroscopía de Fotoelectrones Emitidos por Rayos X (XPS). Además, se describe la metodología para cargar y liberar antibióticos a partir de los nanotubos sintetizados, incluyendo las técnicas microbiológicas para la evaluación de las propiedades antibacterianas de las muestras contra bacterias relacionadas con infecciones postoperatorias. Asimismo, se establecen las pruebas *in vitro* para evaluar la biocompatibilidad de las muestras. Adicionalmente se definen los parámetros para la obtención de los recubrimientos bioactivos a partir de la técnica de electrodeposición con el objetivo de estudiar y promover la osteointegración de las aleaciones. Para finalizar se explican las pruebas de biocompatibilidad *in vivo* para estudiar el grado de osteointegración de las muestras a través de la implantación quirúrgica de placas de osteosíntesis fabricadas con la aleación Ti-407, analizando la evolución y regeneración del tejido óseo por un periodo de 30 días.

A continuación, se incluyen dos esquemas en que se resume el desarrollo experimental realizado para cada aleación estudiada en este proyecto de investigación (ver figura 1 y 2).



**Figura 1.** Estrategia general que muestra el desarrollo experimental realizado en este proyecto de investigación para la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn.



**Figura 2.** Estrategia general que muestra el desarrollo experimental realizado en este proyecto de investigación para la aleación Ti-407.

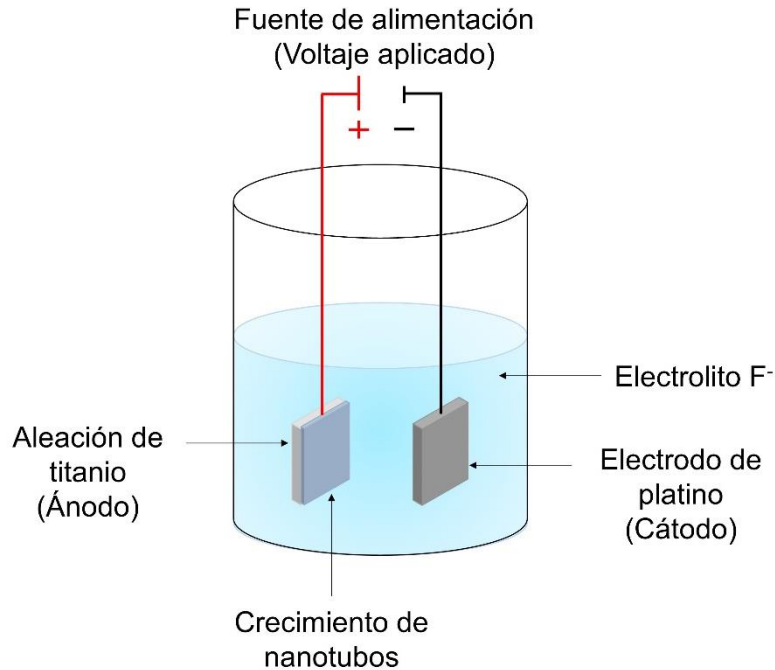
### **3.1. Preparación de las aleaciones**

Las aleaciones de Ti-24Zr-10Nb-2Sn y Ti-407 fueron cortadas en piezas de 1 cm<sup>2</sup> con un espesor de 0.11 mm y 3 mm respectivamente. Se realizó un desbaste de las piezas con papel de carburo de silicio (SiC) hasta una lija #2400 y un pulido fino en un paño con alúmina en suspensión de 0.3 μm. Las placas se limpiaron por sonicación en alcohol etílico, acetona y agua destilada (10 minutos por solución) para ser almacenadas en un desecador hasta su uso.

### **3.2. Funcionalización superficial por anodizado**

Para llevar a cabo la técnica de anodización, se utilizó una celda electroquímica que consta de dos electrodos. Las aleaciones de Ti-24Zr-10Nb-2Sn y Ti-407 fueron empleadas como ánodos, donde se formó la capa de nanotubos. Como cátodo, se utilizó una placa de platino, un material químicamente inerte en el baño de anodización. Ambos electrodos se conectaron a un circuito eléctrico externo mediante el uso de una fuente de alimentación (BK PRECISION Modelo 9110) para establecer una diferencia de potencial entre ellos con voltajes de 10 a 60 V, con una intensidad de corriente de 1 A, manteniendo una distancia entre electrodos de 20 mm (ver figura 3). Cada muestra fue anodizada en un volumen de 100 mL, con un tiempo de exposición entre 5 y 30 minutos a temperatura ambiente en electrolitos que contenían iones fluoruros, específicamente dos soluciones:

1. Una solución de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 1M + NH<sub>4</sub>F 0.25 M + agua, para aleación de Ti-24Zr-10Nb-2Sn
2. Una solución de glicerol + 0.1 M NH<sub>4</sub>F + agua, para la aleación de Ti-407

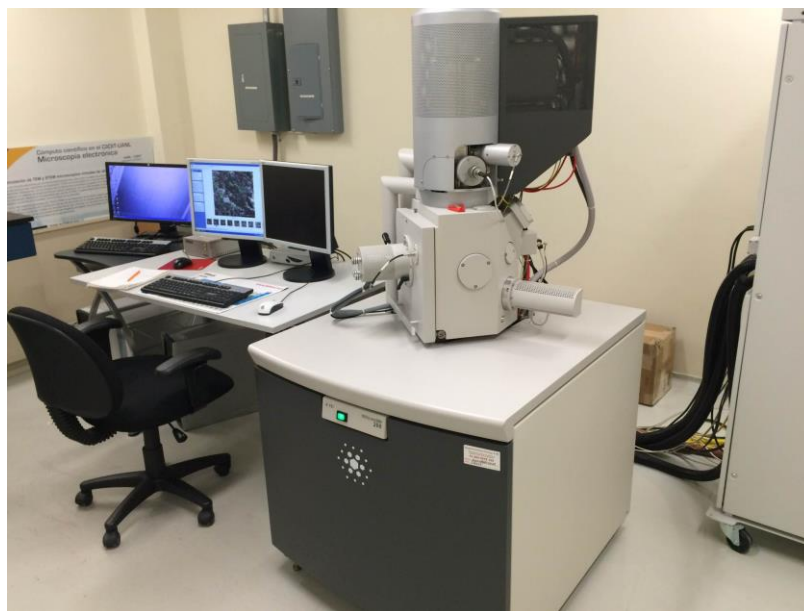


**Figura 3.** Esquema de la celda electroquímica empleada para la funcionalización superficial por anodizado.

### 3.3. Técnicas de caracterización

La caracterización morfológica y elemental de las aleaciones anodizadas y los recubrimientos bioactivos fue llevada a cabo utilizando un Microscopio Electrónico de Barrido de la marca FEI, modelo Nova NanoSEM™ 200. Este microscopio está equipado con un detector EDS (Energía dispersiva de rayos X) como se muestra en la figura 4. Mientras que el análisis cuantitativo y cualitativo de los elementos presentes en las muestras se efectuó con un Espectrómetro de Fotoelectrones Emitidos por Rayos X (XPS) modelo K Alpha ThermoScientific. Estos equipos están disponibles en el Centro de Innovación Investigación y Desarrollo en Ingeniería y Tecnología (CIIDIT) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

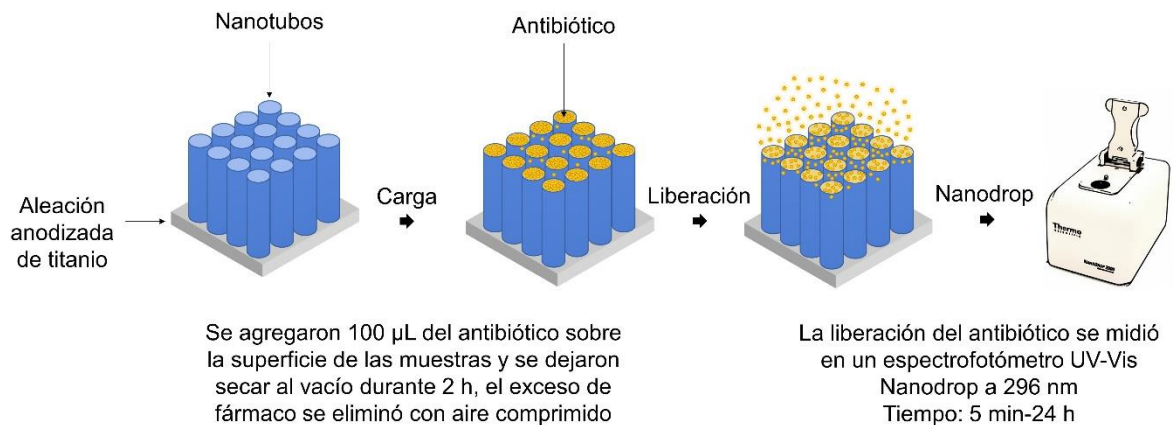




**Figura 4.** Microscopio electrónico de barrido marca FEI modelo Nova NanoSEM™ 200.

### **3.4. Carga y liberación de antibióticos en aleaciones de titanio**

En este proyecto de investigación se emplearon dos antibióticos (gentamicina y ceftriaxona al 1% (p/v) en agua) en los sistemas de liberación. En la figura 5 se muestran los pasos del proceso de carga y liberación del antibiótico. Para determinar el proceso de liberación, primeramente, las aleaciones (cada una por triplicado), fueron limpiadas utilizando agua desionizada y posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente. A continuación, se aplicaron 500 mL del antibiótico sobre la superficie de los anodizados y se procedió a secar mediante la técnica de secado al vacío a una presión de  $2 \times 10^{-3}$  mbar y a temperatura ambiente. Luego, las aleaciones cargadas con los antibióticos fueron sumergidas en 1.5 mL de una solución de PBS (Fosfato Salino Balanceado) para medir la liberación de los antibióticos en dicha solución. Después de eso, se extrajeron 2  $\mu$ L de las muestras y se llevaron a cabo las mediciones correspondientes. La fracción de antibiótico liberado de los nanotubos fue cuantificada utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Nanodrop a una longitud de onda de 296 nm. El proceso de liberación se monitoreó durante un periodo de tiempo que abarcó desde los primeros 5 minutos hasta 24 horas, utilizando PBS como control de referencia. Asimismo, para estudiar e identificar la presencia del antibiótico cargado en los nanotubos de titanio, se utilizó un espectrofotómetro FT-IR (Perkin-Elmer Frontier FT-IR).



**Figura 5.** Pruebas de carga/liberación de antibióticos a partir de nanotubos de titanio.

## 3.5. Análisis microbiológico de las aleaciones

### 3.5.1. Método de espectrofotometría

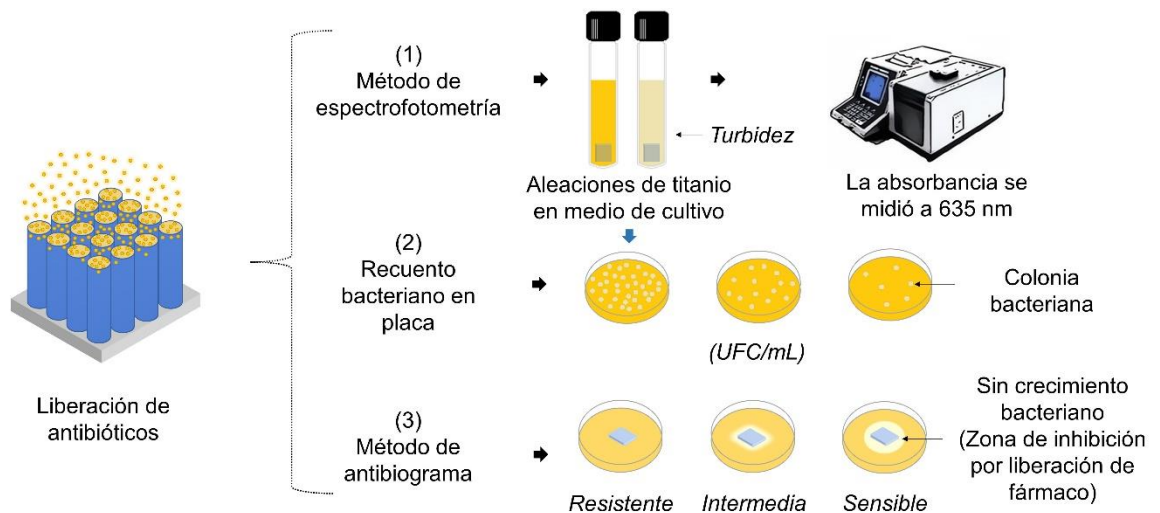
Este método permite evaluar el efecto de la liberación de antibióticos de los nanotubos formados en las aleaciones Ti-24Zr-10Nb-2Sn y Ti-407 sobre el crecimiento *in vitro* de las bacterias *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Las aleaciones que se evaluaron se colocaron en tubos de 13x100 mm que contenían 5 mL de medio de cultivo ICC estéril. Posteriormente, se inoculó cada tubo con 100 µL de bacterias (activadas a través de resiembras sucesivas, tres días antes de llevar a cabo las pruebas). Los tubos con el cultivo y las aleaciones se incubaron a 37°C por 24 h, para permitir el crecimiento de las bacterias. A continuación, se tomaron lecturas de absorbancia de los tubos utilizando un espectrofotómetro de marca Genway modelo 6320D a una longitud de onda de 635 nm. Los valores obtenidos fueron sometidos a cálculos pertinentes y se representaron los resultados gráficamente utilizando el software OriginPro-8. En la figura 6 (1) se muestra un esquema de este método. Es importante destacar que este ensayo nos permite únicamente monitorear el crecimiento bacteriano en presencia de las aleaciones y los antibióticos liberados por los nanotubos. Es decir, no nos proporciona información acerca de si las aleaciones impiden la reproducción del microorganismo o provocan una reducción en la población bacteriana. Para determinar esto, es necesario llevar a cabo el recuento bacteriano en placas, utilizando el método ilustrado en la figura 6 (2) y descrito en detalle en el apartado siguiente.

### 3.5.2. Método de recuento bacteriano en placa

Para llevar a cabo este método, se utilizaron tubos de 13x150 mm que contenían un volumen de 9 mL de solución salina fisiológica estéril al 0.85%. A estos tubos se les añadió 1 mL de las muestras obtenidas por espectrofotometría. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas  $10^{-1}$  a  $10^{-12}$  de las muestras, con el objetivo de disminuir la cantidad de bacterias, para que puedan ser cuantificadas. A continuación, se añadió 1 mL de las diluciones  $10^{-8}$  a  $10^{-12}$  en placas de Petri estériles para determinar la actividad antibacteriana. Posteriormente, se vertieron 15 mL de agar ICC en cada placa, asegurándose de homogeneizar la muestra y permitiendo que el agar se solidificara a temperatura ambiente. Finalmente, las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Después de este tiempo, se contaron el número de colonias obtenidas (UFC/mL) y se representaron los resultados gráficamente utilizando el software OriginPro-8 (ver figura 6 (2)).

### 3.5.3. Método de antibiograma

Se llevó a cabo la evaluación de la sensibilidad de las bacterias *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* a los antibióticos gentamicina y ceftriaxona. Para este fin, se prepararon placas de aleaciones anodizadas, tanto cargadas como no cargadas con los antibióticos (1 cm<sup>2</sup>). En condiciones de esterilidad, estas placas se colocaron sobre la superficie de agar ICC en una placa de Petri previamente inoculada con las bacterias mencionadas (activadas a través de resiembras sucesivas, tres días antes de llevar a cabo las pruebas). Durante la prueba, una vez que las placas de aleaciones cargadas con los antibióticos hicieron contacto con la superficie del agar, se produjo una difusión radial del antibiótico, generando un gradiente de concentración. Después de un periodo de incubación de 24 horas a 37 °C, se observó la formación de halos de inhibición alrededor de las placas. Estos halos indicaron la acción de los antibióticos sobre las bacterias. El diámetro de los halos de inhibición formados se utilizó para determinar la sensibilidad de las bacterias al antibiótico, y los resultados se interpretaron de la siguiente manera: ≤ 12 mm indica resistencia, 13-14 mm indica resistencia intermedia y ≥ 15 mm indica sensibilidad. Para fines de control, se empleó un disco de papel filtro impregnado con los antibióticos como control positivo de inhibición. Además, se utilizaron placas de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn y Ti-407 sin anodizar como controles de las aleaciones, con dimensiones de 1 cm<sup>2</sup> por placa. Para una referencia visual, se puede consultar la figura 6(3).



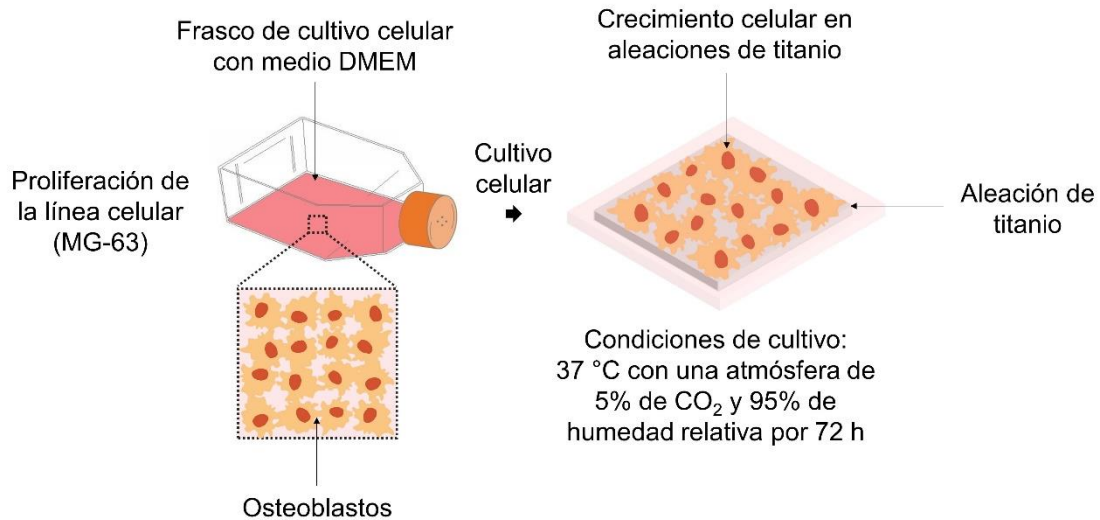
**Figura 6.** Pruebas antibacterianas en aleaciones de titanio

### 3.6. Pruebas de biocompatibilidad *in vitro*

#### 3.6.1. Cultivo celular sobre aleaciones de titanio

Para llevar a cabo las pruebas de biocompatibilidad *in vitro*, se inició el cultivo de las líneas celulares inoculando una cantidad de  $5 \times 10^4$  células de la línea de osteoblastos MG-63 en frascos de cultivo celular F-25. Se agregaron 4 mL de medio D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) suplementado con un 10% de suero fetal bovino a una temperatura de 37 °C, en una atmósfera que contenía un 5% de CO<sub>2</sub> y una humedad relativa del 95%. Una vez que las células alcanzaron la confluencia (después de 3-5 días de incubación), se procedió a tratar el cultivo con tripsina. Se retiró el medio de la placa de cultivo y se realizaron dos lavados con 2 mL de PBS estéril para debilitar la adherencia de las células al frasco. Luego, se agregaron 500 mL de tripsina al frasco de cultivo y se movió horizontalmente durante un minuto para cubrir toda la superficie. A continuación, el frasco se incubó durante 3 minutos a 37 °C. Después de este tiempo, se agregó 1 mL de suero fetal bovino y se homogeneizó la suspensión con una micropipeta para evitar la aglomeración celular. Posteriormente, se ajustó la densidad celular contando las células en una cámara de Neubauer. El número de células a inocular en las aleaciones de titanio varió según el ensayo y el número de células obtenidas por mililitro. Este procedimiento se estandarizó para realizar las pruebas de biocompatibilidad *in vitro*, que incluyeron el ensayo de citotoxicidad mediante el uso de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difeniltetrazolio),

así como las pruebas de adhesión celular mediante microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de barrido. En la figura 7 se muestra un esquema de esta técnica utilizada en el presente estudio.

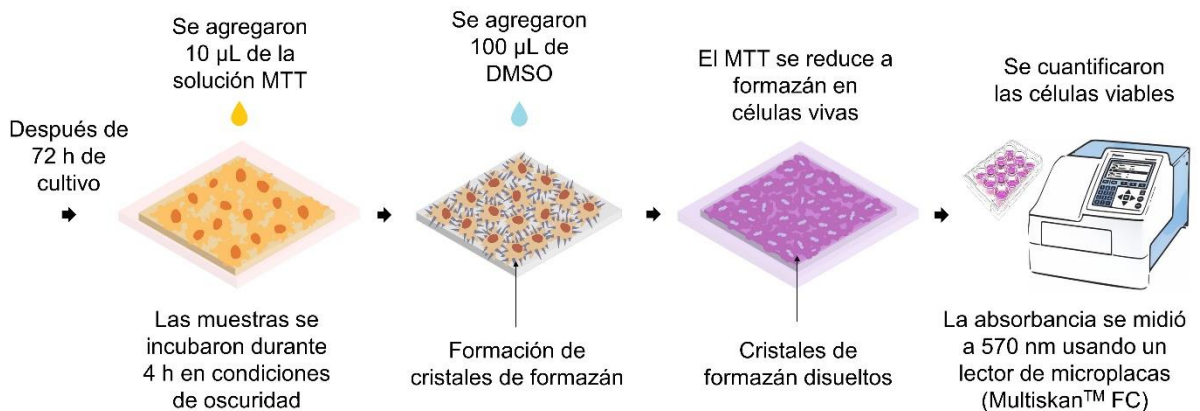


**Figura 7.** Técnica de cultivo celular *in vitro* sobre aleaciones de titanio.

### 3.6.2. Ensayo de citotoxicidad por MTT

Se estudió el impacto citotóxico de las aleaciones anodizadas/electrodepositadas utilizando el método de ensayo colorimétrico de MTT. Para esto, se emplearon microplacas de 24 pozos, cada pozo para cada una de las condiciones de anodizado/electrodepósito, así como para los controles (Ti-24Zr-10Nb-2Sn/ Ti-407 sin modificación superficial y células libres de aleación) por triplicado. En condiciones de esterilidad, se inocularon sobre la superficie de las aleaciones aproximadamente 250,000 células de una línea celular de osteoblastos (MG-63). El conteo celular se realiza por microscopía óptica con portaobjetos especial llamado cámara de Neubauer. Tras esto, las microplacas fueron incubadas a una temperatura de 37 °C durante 30 minutos, con el propósito de facilitar la adhesión de las células a las aleaciones. A continuación, se agregó a cada pozo, 1 mL de medio D-MEM suplementado con 10% de Suero fetal bovino. Las muestras se incubaron durante periodos de 3, 5, 7 y 14 días a una temperatura de 37 °C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa. Una vez finalizado el periodo de incubación, se agregaron 10 µL de MTT a cada pocillo, y las muestras se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa,

en condiciones de oscuridad, durante 4 horas. Es muy importante durante la incubación tener en cuenta que el MTT es fotosensible y las incubaciones deben ser hechas en la oscuridad para evitar que se degrade. Después de este período, el medio de cultivo fue removido y se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de DMSO (dimetilsulfóxido) para disolver el producto formado, es decir, los cristales de formazán. Una vez terminado este proceso, se procedió a cuantificar las células viables mediante la medición de la cantidad de formazán producido, ya que esta cantidad es proporcional a la cantidad de células vivas. Para esto, se utilizó un lector de microplacas Multiskan FC Thermo Scientific™ con una absorbancia de 540 nm, utilizando DMSO como referencia. Posteriormente, se realizaron los cálculos correspondientes utilizando la densidad óptica obtenida y se representaron los resultados en un gráfico utilizando el programa OriginPro 8 (ver Figura 8).



**Figura 8.** Pruebas de biocompatibilidad *in vitro* para aleaciones de titanio.

### 3.6.3. Pruebas de adhesión celular por técnicas de Microscopía

Se llevó a cabo un estudio sobre la capacidad de adhesión de las células a las aleaciones anodizadas utilizando técnicas de microscopía. Para realizar esta prueba, se utilizaron microplacas de 24 pozos, asignando un pozo para cada una de las condiciones de anodizado, así como para los controles (aleaciones Ti-24Zr-10Nb-2Sn/ Ti-407 sin modificación superficial y células libres de aleación). En condiciones estériles, se inoculó aproximadamente un total de 250,000

células sobre la superficie de cada aleación. Luego, las microplacas se incubaron a 37 °C durante 30 minutos para permitir la adhesión de las células a las aleaciones. Una vez transcurrido este tiempo, se agregaron 2 mL de medio D-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino sobre el borde de cada pozo, y las muestras se incubaron durante 72 horas a una temperatura de 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa. Al finalizar el tiempo de incubación, se retiró el medio y se realizaron 2 lavados con 2 mL de PBS estéril. Después de los lavados, las células se fijaron con 500 µL de paraformaldehído al 4% durante 5 minutos, luego se eliminó la solución fijadora y se realizaron otros 2 lavados con 2 mL de PBS estéril. A continuación, las células se permeabilizaron con tritón 1x durante 2 minutos, se retiró la solución y se lavaron las células con PBS estéril. Finalmente, las células se tiñeron utilizando el marcador fluorescente DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol). Adicionalmente para las muestras de Ti-407 se utilizó un marcador fluorescente para observar la actina presente en el citoesqueleto de la línea de osteoblastos MG-63 sobre aleaciones de titanio. El procedimiento implicó el uso de un anticuerpo primario anti-β-actina de ratón y un anticuerpo secundario conjugado anti-ratón con PE (ficoeritrina). Por último, las muestras fueron examinadas utilizando un microscopio de fluorescencia marca ZEISS modelo Axio Imager, con una longitud de onda de excitación de 358 nm. Se capturaron imágenes utilizando la cámara digital incorporada al microscopio y se analizaron utilizando el software AxioVision, suministrado por el fabricante. El proceso descrito se encuentra ilustrado en la figura 9.

Por otra parte, para las muestras de Ti-407 se estudió la adhesión de osteoblastos a las aleaciones mediante microscopía electrónica de barrido. Para realizar esta prueba se emplearon microplacas de 24 pozos, cada pozo para cada una de las muestras (aleación Ti-407 sin modificación superficial y aleaciones anodizadas). Bajo condiciones estériles, se inoculó aproximadamente un total de 250,000 células sobre la superficie de cada aleación. Posteriormente, las microplacas se incubaron a 37 °C durante 30 minutos para permitir la adhesión de las células a las aleaciones. Pasado ese tiempo, se agregaron 2 mL de medio D-MEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino sobre el borde de cada pocillo. Las muestras se incubaron durante 72 horas a una temperatura de 37 °C en una atmósfera que contenía un 5% de CO<sub>2</sub> y una humedad relativa del 95%. Al finalizar el periodo de incubación, se removió el medio y se realizaron dos lavados utilizando 2 mL de PBS estéril. Luego de los lavados, las células fueron fijadas con 500 µL de formol al 3% durante 5 minutos. Posteriormente, se retiró la solución fijadora y se realizaron nuevamente dos lavados con 2 mL de PBS estéril. Para finalizar, las muestras se colocan sobre los porta muestras y se introducen en el microscopio ajustando las condiciones a bajo vacío con la introducción de vapor de agua controlada. Estas condiciones de vacío y humedad



se mantienen durante la observación para preservar las características de la muestra. Terminando este proceso, se generaron las imágenes de la superficie de la aleación y de las células adheridas a ella, lo que permitió evaluar la morfología celular, la extensión de la adhesión y las características de la interfaz célula-material.



**Figura 9.** Pruebas de adhesión celular a las aleaciones de titanio por Microscopía de fluorescencia.

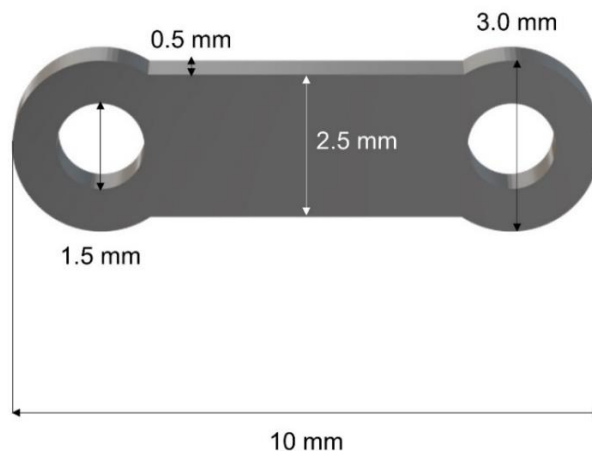
### 3.7. Deposición de iones bioactivos por la técnica de electrodeposición

En la técnica de electrodeposición utilizada, se empleó una celda electroquímica similar a la ilustrada en la Figura 3, con la diferencia de que se invirtió la polaridad. En esta configuración, la placa de platino se utilizó como ánodo, mientras que las aleaciones anodizadas de Ti-407 se emplearon como cátodo. Los dos electrodos fueron conectados a un circuito eléctrico externo mediante una fuente de alimentación DC (BK PRECISION Model 9110), con el objetivo de establecer una diferencia de potencial entre ellos. Se aplicó un voltaje de 5 V y se ajustó una intensidad de corriente de 1 A. La distancia de separación entre los electrodos se mantuvo en 20 mm. Cada muestra fue electrodepositada en 100 mL de un electrolito mineral variando la concentración molar de:  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $ZnCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  y  $K_2HPO_4$  con un tiempo de tratamiento entre 5 y 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez obtenidos los recubrimientos, las muestras se secaron a 150 °C durante 5 minutos, retirando el exceso de recubrimiento con aire comprimido durante 30 segundos.



### 3.8. Diseño y fabricación de una placa de osteosíntesis

Con la finalidad de probar por primera vez la aleación de Ti-407 en una prueba *in vivo*, se diseñó una placa femoral. Las dimensiones de las placas utilizadas en los estudios *in vivo* se determinaron considerando el tamaño del animal de experimentación, en este caso, ratas macho albinas de la variedad Wistar con una edad de 3 meses, y el hueso seleccionado, el fémur. La forma de la placa es recta, de 2 orificios (1.58 mm de ancho) con un largo de 10 mm por 3 mm de ancho en los extremos con una terminación circular; posición donde se colocan los tornillos autorroscantes de fijación. La parte central de la placa, la cual estuvo en contacto con la fractura, tiene un ancho de 2.5 mm. El espesor de la placa es de 0.5 mm. La placa junto con los dos tornillos de titanio grado 1 de dimensiones 1.5 mm de ancho por 2.5 mm de largo, desempeñaron un papel fundamental en la estabilización de la fractura ósea y en su posterior regeneración. Los orificios presentes en la placa permitieron la colocación de los tornillos autorroscantes de manera centralizada. Durante la inserción de los tornillos, se aplicó una fuerza perpendicular a su eje, lo cual garantizó la compresión entre los fragmentos femorales, logrando así la estabilización adecuada de la fractura. La fabricación de la placa se realizó en un taller especializado, siguiendo el diseño propuesto. Para su fabricación, se utilizó una cortadora de hilo por electroerosión (EDM), lo cual permitió evitar un calentamiento excesivo y modificaciones significativas en la microestructura de la pieza. De tal manera que en este trabajo de investigación se logró estudiar por primera vez el grado de biocompatibilidad y osteointegración *in vivo* de la placa femoral fabricada con la aleación Ti-407 (figura 10).



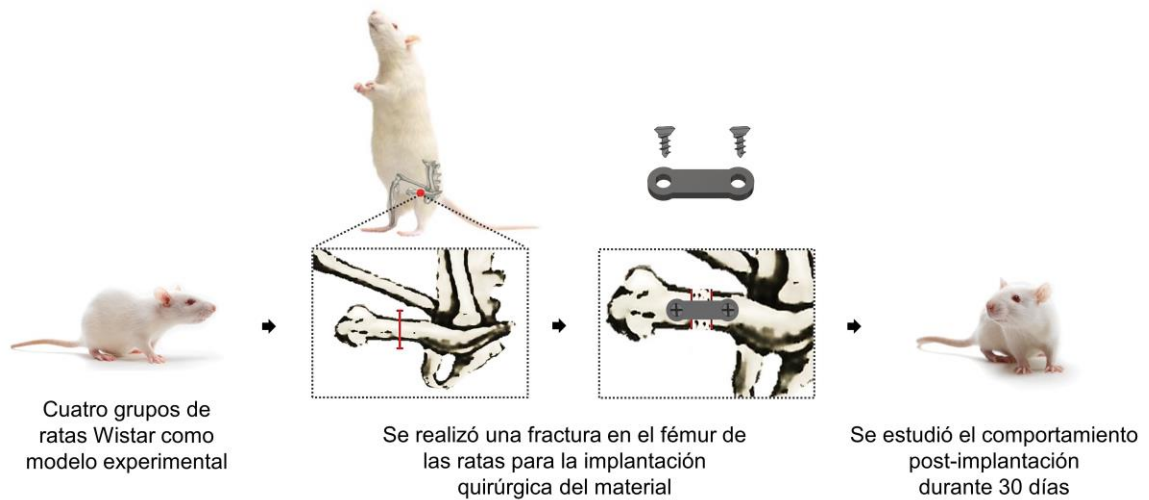
**Figura 10.** Esquema representativo de la placa de osteosíntesis fabricada con la aleación Ti-407.

## **3.9. Pruebas de biocompatibilidad *in vivo***

### **3.9.1. Implantación quirúrgica de las aleaciones**

Para llevar a cabo las pruebas de biocompatibilidad *in vivo* en este proyecto, se utilizaron un total de 6 ratas macho de la cepa Wistar, con una edad de 12 semanas, adquiridas por el proyecto: IT1792-21-PAICYT 2021. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación y Bienestar Animal, (CEIBA) de la UANL. Se siguieron rigurosamente las directrices establecidas en la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 al cuidar y utilizar estos animales de experimentación, respetando así todas las especificaciones técnicas correspondientes. Los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de ketamina (95 mg/kg) y xylacina 10 mg/kg), y posteriormente se infiltró localmente con mepivacaina (Ultracaín®, 0.5 mL sin vasoconstrictor). Una vez anestesiados los animales se colocaron posición decúbito dorsal, se inmovilizó el fémur y se colocaron gasas estériles en la zona genital por la posible micción. En la región anatómica donde se encuentra el cuerpo del fémur, se realizó un corte de 12 mm con un bisturí #15, separando cuidadosamente la dermis, el tejido graso y el músculo en el sentido de sus fibras hasta alcanzar la cara anterior del hueso femoral, posteriormente se realizó una fractura vertical de 2.5 mm en el hueso femoral de las ratas con una fresa de carburo #6 utilizando un micromotor de baja velocidad. Se irrigó la zona de la herida con solución salina para evitar necrosis por la elevación de la temperatura y se presionó la herida con una gasa estéril durante 2 minutos para detener el sangrado. Una vez controlado el sangrado, se utilizaron una pieza de mano de baja velocidad y una fresa de acero de 1.5 mm de diámetro para realizar dos surcos de fijación. Después, las superficies de la fractura se colocaron en contacto sin aplicar compresión, y se procedió a colocar la placa de aleación para la fijación interna. Esta placa se estabilizó utilizando dos tornillos de 1 mm de longitud por 1.5 mm de ancho, restableciendo así la alineación anatómica del fémur. El proceso quirúrgico se puede observar en la figura 11. Posteriormente, se tomaron radiografías a los animales para visualizar la posición de la placa, y se les administró una solución inyectable de ketorolaco (10 mg/kg/día) para el tratamiento del dolor, así como gentamicina (1 mg/kg) como medida preventiva contra posibles infecciones postoperatorias. Se realizó un seguimiento postquirúrgico, valorándose las siguientes condiciones: estado general del animal, aspectos de la herida y de la zona intervenida, sangrados y cambios degenerativos por lesión femoral.

Una vez terminado el periodo experimental de 4 semanas, se procedió al sacrificio de los animales apegados a la norma NOM-033-ZOO-1995 [317].



**Figura 11.** Pruebas de biocompatibilidad *in vivo*

### 3.10. Análisis Estadístico

Se realizó un diseño experimental y un análisis estadístico en donde los datos de cuantificación se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) con una  $P < 0.05$  empleando las pruebas de Dunnett y Tukey para comparaciones múltiples con el software estadístico Minitab para Windows versión 21, para determinar si existe diferencia significativa entre las muestras y los tratamientos utilizados en este proyecto de tesis.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### PARTE 1: Ti-24Zr-10Nb-2Sn

#### 4.1. Introducción

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos para la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn, la cual es una aleación con memoria de forma y superelasticidad base titanio con potenciales aplicaciones biomédicas. El capítulo inicia con la evaluación de las curvas de corriente-tiempo que revelan el crecimiento de los nanotubos en la superficie de las aleaciones durante el proceso de anodización. Más adelante, se exponen y analizan los resultados obtenidos de la caracterización de la morfología y composición elemental de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM) con Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS). Lo anterior fue la base para obtener información sobre la forma, el tamaño y la distribución de los nanotubos, así como la determinación de los elementos químicos presentes en la capa de óxido. Además, el estado químico de los elementos de la superficie de los nanotubos se caracterizó por espectroscopía de fotoemisión de rayos X (XPS). Posteriormente, se estudiaron los perfiles de liberación del antibiótico gentamicina en las aleaciones anodizadas, lo que permitió confirmar la incorporación del antibiótico en los nanotubos después del proceso de carga a través de mediciones por espectroscopía infrarroja (FT-IR). Además, se determinaron las propiedades antibacterianas sobre el crecimiento *in vitro* de *S. aureus*, bacteria patógena asociada a infecciones postoperatorias empleando las técnicas microbiológicas de espectrofotometría, de recuento bacteriano en placa y de antibiograma. Por último, se detallan y analizan los resultados de las pruebas de biocompatibilidad *in vitro*. En primer lugar, se exponen los resultados obtenidos del ensayo colorimétrico de MTT, que evalúa la actividad citotóxica de las aleaciones anodizadas sobre células óseas. A continuación, se presentan los hallazgos del estudio realizado mediante microscopía de fluorescencia, con el cual se determinó la capacidad de adhesión de las células óseas a las aleaciones anodizadas con la finalidad de estudiar la interacción entre las células y las superficies nanoestructuradas de las aleaciones de Ti-24Zr-10Nb-2Sn.

## 4.2. Síntesis y caracterización de nanotubos de titanio

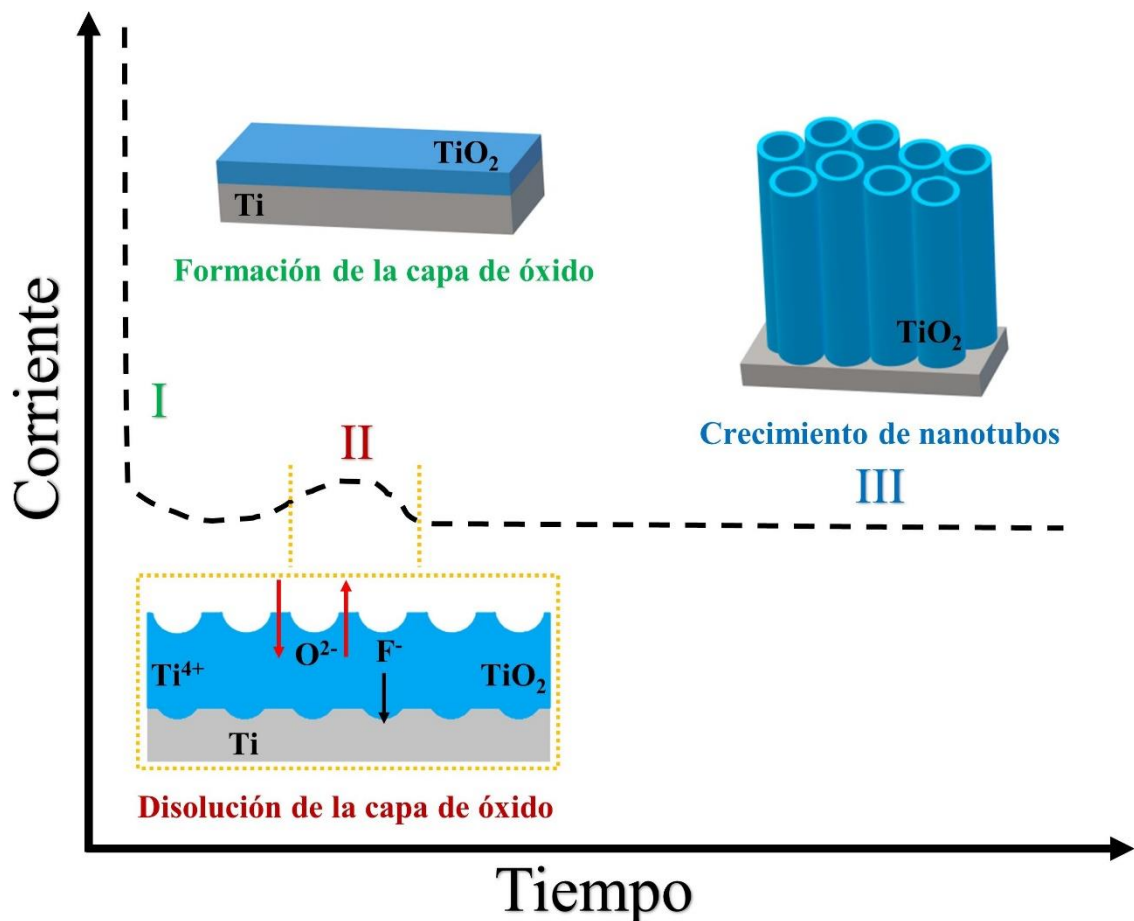
Los nanotubos de titanio son nanoestructuras interesantes en el campo de la ingeniería biomédica debido a sus propiedades mecánicas y biocompatibles. En esta tesis, la síntesis de nanotubos de titanio sobre la superficie de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn se realizó por medio de la técnica de anodizado. Durante la síntesis de nanotubos, se graficó la densidad de corriente-tiempo para monitorear la formación de los nanotubos sintetizados en la superficie de las aleaciones, se estudió la morfología y las dimensiones de los nanotubos por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM), mientras que el análisis químico elemental de la capa de óxido se realizó por Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS), además el estado químico de los elementos de la superficie de los nanotubos se caracterizó por espectroscopía de fotoemisión de rayos X (XPS). A continuación, se presentan y discuten los resultados obtenidos.

### 4.2.1. Análisis de las curvas de corriente-tiempo

Las curvas de densidad de corriente-tiempo son una representación gráfica de la densidad de corriente en función del tiempo durante el crecimiento de los nanotubos o el ataque electroquímico. La densidad de corriente es una medida de la cantidad de corriente eléctrica que fluye a través de una unidad de área en un material conductor. Estas curvas se utilizan para analizar la cinética de reacciones electroquímicas y para determinar las constantes cinéticas de las reacciones [318,319]. En la formación de nanotubos, la densidad de corriente-tiempo se utiliza para optimizar la formación y la calidad de los nanotubos sintetizados en la superficie de aleaciones de titanio. La formación de los nanotubos por medio de la técnica de anodizado se produce a través de un proceso de ataque y disolución química que involucra tres etapas, donde están involucrados fenómenos de transporte de masa.

La primera etapa (I) comienza con oxidación del titanio ( $\text{Ti} \rightarrow \text{Ti}^{4+} + 4\text{e}^-$ ) y la formación de una capa de óxido ( $\text{TiO}_2$ ) en la superficie de titanio debido al voltaje aplicado. Durante esta etapa se observa la máxima densidad de corriente alcanzada por el anodizado seguido por una caída repentina en la densidad de corriente. Este fenómeno se debe a que los iones de titanio presentes en la aleación reaccionan con el oxígeno que aporta el electrolito para formar un óxido denso e insoluble ( $\text{Ti}^{4+} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{TiO}_2 + 4\text{H}^+$ ). Posteriormente, en la segunda etapa (II) hay un ligero aumento en la corriente debido a una disminución en la resistencia de la capa de óxido a los defectos superficiales causados por la

disolución continua de la capa óxido por la presencia y la migración del elemento flúor en la reacción gracias al campo aplicado ( $\text{TiO}_2 + 6\text{F}^- + 4\text{H}^+ \rightarrow [\text{TiF}_6]^{2-} + 2\text{H}_2\text{O}$ ). Esto conduce a la formación de poros que crecen principalmente debido a la acidificación causada por la disolución asistida por el campo eléctrico generado y la hidrólisis oxidativa del titanio en el fondo de los poros. Finalmente, en la tercera etapa (III) se alcanza un estado de equilibrio entre la formación del óxido insoluble y la disolución química de la aleación que conduce a la formación de poros. En el transcurso esta etapa, los poros crecen generando estructuras nanotubulares, creando una competencia entre la formación del óxido en la interfaz titanio/capa de óxido y la disolución química en la interfaz capa de óxido/electrolito, asistido por campo eléctrico aplicado y el tiempo de reacción [320–325]. En la figura 12, se esquematizan las tres etapas correspondientes a la formación de nanotubos por medio de la técnica de anodizado.

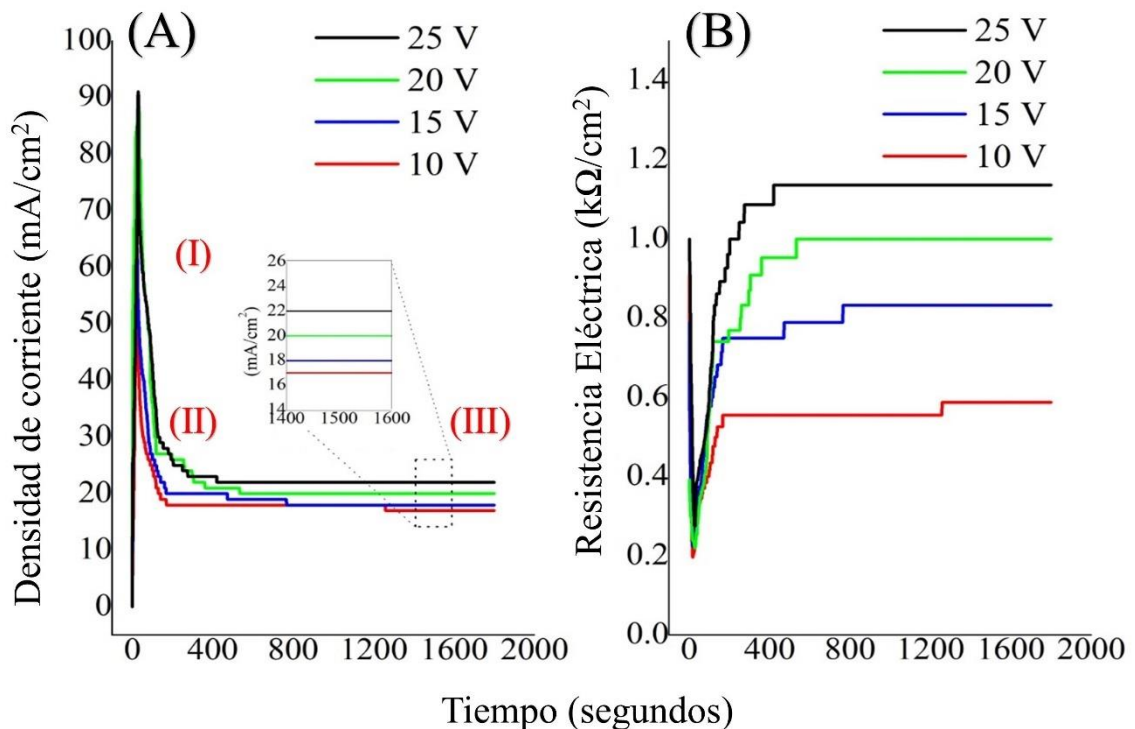


**Figura 12.** Esquema representativo de la curva de densidad de corriente-tiempo que representa la formación de nanotubos por medio de la técnica de anodizado.

La figura 13 muestra las curvas de densidad de corriente-tiempo (A) y de resistencia eléctrica (B) registradas durante el proceso de anodización de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn.

Este proceso se llevó a cabo aplicando voltajes de 10, 15, 20 y 25 V en una solución electrolítica compuesta por  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  a una concentración de 1 M y  $\text{NH}_4\text{F}$  a una concentración de 0.25 M, durante un período de 30 minutos a una temperatura de 25°C. La línea de color rojo de la figura 13 (A), muestra la densidad de corriente-tiempo a un potencial constante de 10 V. Se observa un rápido aumento en la densidad de corriente, alcanzando aproximadamente 55  $\text{mA}/\text{cm}^2$  en los primeros segundos de reacción. Luego, la densidad de corriente disminuye y se estabiliza en un valor constante de 19  $\text{mA}/\text{cm}^2$  hasta que la anodización finaliza después de 1800 segundos. Por otro lado, la línea de color azul representa el comportamiento de la densidad de corriente-tiempo a un potencial constante de 15 V. En este caso, la densidad de corriente aumenta rápidamente hasta aproximadamente 68  $\text{mA}/\text{cm}^2$  y luego disminuye a un valor constante de 20  $\text{mA}/\text{cm}^2$  durante los primeros 800 segundos. Posteriormente, experimenta otra disminución en la corriente, aproximadamente a 19  $\text{mA}/\text{cm}^2$ , hasta que se completa la anodización. Estas disminuciones de corriente se atribuyen, como se mencionó previamente, a la interferencia entre los poros, lo que resulta en el crecimiento continuo de la capa de nanotubos autoorganizada a lo largo del tiempo de anodización [326,327]. Por otra parte, la línea de color verde de la figura 13 (A) muestra la densidad de corriente-tiempo a un potencial de 20 V, donde la densidad de corriente aumenta rápidamente hasta alcanzar aproximadamente 84  $\text{mA}/\text{cm}^2$  en la primera etapa. Luego, disminuye y se estabiliza en un valor constante de 21  $\text{mA}/\text{cm}^2$  durante los primeros 500 segundos. Después, experimenta otra disminución en la corriente, aproximadamente a 20  $\text{mA}/\text{cm}^2$ , hasta que se completa la anodización después de 1800 segundos. Por otro lado, la línea negra en la figura 13 (A) muestra la densidad de corriente-tiempo obtenida durante el anodizado a 25 V. En este caso, la densidad de corriente aumenta hasta aproximadamente 90  $\text{mA}/\text{cm}^2$ , luego disminuye a un valor constante de alrededor de 28  $\text{mA}/\text{cm}^2$  durante los primeros 200 segundos de anodización. Más tarde, experimenta una disminución progresiva hasta alcanzar un valor constante de 22  $\text{mA}/\text{cm}^2$  durante los siguientes segundos y hasta el final de la anodización. En general, en cada uno de los procesos de anodización, se observa un pico en la densidad de corriente que aumenta a medida que aumenta el voltaje. Como se mencionó anteriormente, esto ocurre durante la formación de la capa compacta de óxido, seguido de una disminución de corriente que se estabiliza entre 22 y 19  $\text{mA}/\text{cm}^2$ , lo cual indica la formación y crecimiento de nanotubos. Esta información se destaca en el recuadro de la figura 13 (A) [328]. Los resultados indican que, a mayor voltaje de anodizado, la densidad de corriente incrementa en las tres etapas, aunque para la de 25 V, parece en una proporción mayor. Los cambios observados en la densidad de corriente son indicativos de que hay una variación

en la morfología debido al potencial aplicado. Esto será discutido en la próxima sección 4.2.2. El mismo comportamiento se ha reportado previamente para nanoestructuras formadas en otras aleaciones de titanio [329–331]. Esta formación está correlacionada con una disminución de la corriente eléctrica, y se asocia con un aumento de la longitud de difusión dentro de los nanotubos en crecimiento. La figura 13 (B) muestra el comportamiento de la resistencia eléctrica en función del tiempo para cada una de las muestras anodizadas, que se calculó de acuerdo con la ley de Ohm. Si se aumenta el voltaje aplicado, la resistencia eléctrica también crece. Esto se atribuye a un aumento en el espesor de la capa de óxido cuando el voltaje aplicado aumenta [332]. Además, se necesita más tiempo para lograr la estabilización del sistema a medida que aumenta el voltaje aplicado, lo que también sugiere que se desarrolla una capa de óxido más compleja y grande. Por lo que el control del tiempo durante la anodización es importante para controlar las dimensiones de la capa de nanotubos que se forman durante el proceso [254,333]. Además, la concentración de iones fluoruro es clave en la formación de nanotubos de dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) mediante anodización electroquímica. Durante este proceso, el titanio se expone a soluciones que contienen iones fluoruro. El fluoruro ayuda a disolver el óxido de titanio en la superficie del metal, lo que permite la formación de poros y posteriormente nanotubos [150,334].



**Figura 13.** (A) la densidad de corriente eléctrica y (B) la resistencia eléctrica durante el anodizado de la aleación Ti-24-Zr-10Nb-2Sn a distintos voltajes.



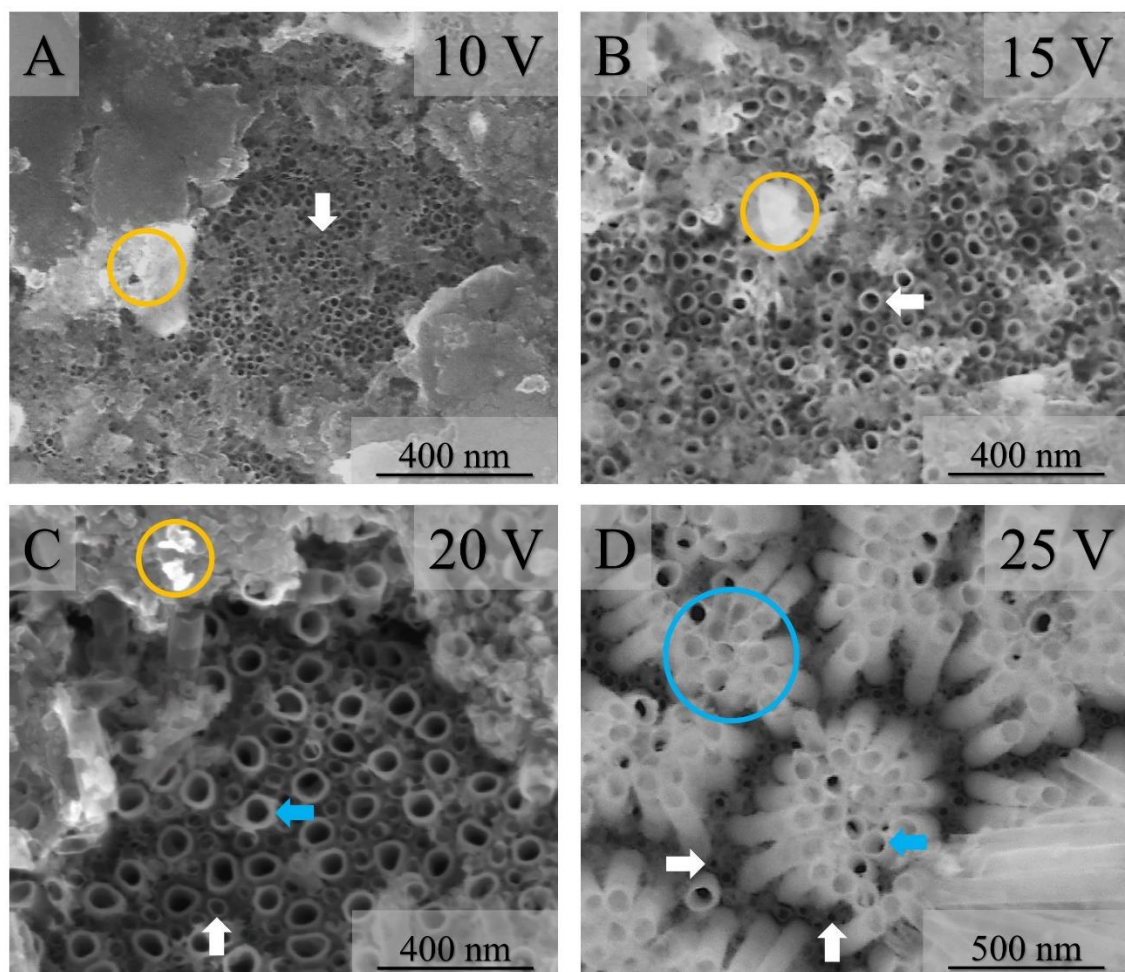
#### 4.2.2. Caracterización de la morfología y composición elemental por SEM-EDS

Las figuras 14 y 15 muestran imágenes desde una vista superior y secciones transversales a la superficie por SEM respectivamente, de los nanotubos sintetizados por anodizado sobre la superficie de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn a 10, 15, 20 y 25 V.

En la figura 14 (A), se muestra la vista superior de los nanotubos formados por anodizado a 10 V. Se puede apreciar una estructura ordenada compuesta por nanotubos abiertos (señalados con una flecha de color blanco). Estos nanotubos están rodeados por un depósito denso de óxido que se ha formado como resultado del proceso de anodización (señalado con un círculo amarillo). En la sección transversal de la figura 15 (A), se puede apreciar una estructura irregular de matriz nanotubular para el anodizado a 10 V (señalada con una flecha de color blanco). Debido a la aplicación de un voltaje bajo durante el proceso de anodización, la formación en la base de los nanotubos y la disolución en la parte superior ocurren a una velocidad lenta. Esto da como resultado una longitud reducida de los nanotubos con una estructura irregular [335].

Por otro lado, en la figura 14 (B), se muestra la vista superior de los nanotubos formados por anodizado a 15 V. La distribución general de la capa de nanotubos de poro abierto muestra ligeras variaciones en tamaño y orientación en toda la superficie de la aleación (señaladas con una flecha de color blanco). En esta síntesis también se logra apreciar óxido residual sobre la superficie, pero la presencia de este óxido es menos compacta (señalado con un círculo de color amarillo). En la sección transversal de la figura 15 (B), se puede observar una capa ordenada de nanotubos altamente compactados con diferentes longitudes, obtenidos mediante el anodizado a 15 V. Estos nanotubos presentan una morfología lineal con una superficie rugosa. Es evidente que la estructura y morfología de las capas de nanotubos pueden ser alteradas mediante los parámetros electroquímicos [325,336,337]. En este caso particular, al aumentar el voltaje de anodización de 10 V a 15 V, se produce un aumento en las dimensiones y configuración de los nanotubos. Conforme avancemos en los siguientes anodizados, veremos que un incremento en el voltaje de anodización resulta en un mayor tamaño de poro y longitud de los nanotubos. Esto se debe a que la fuerza motriz para el transporte iónico a través de la capa de óxido en el fondo del poro se incrementa, lo que a su vez acelera la migración de los iones oxígeno-fluoruro y, en consecuencia, aumenta las dimensiones de los nanotubos [132,338,339]. En la figura 14 (C), se muestra una vista superior de los nanotubos formados mediante el anodizado a 20 V. Se puede observar una capa organizada de nanotubos con claras diferencias en diámetro, los cuales están abiertos y rodeados por una capa de óxido resultante del proceso de anodización. Es

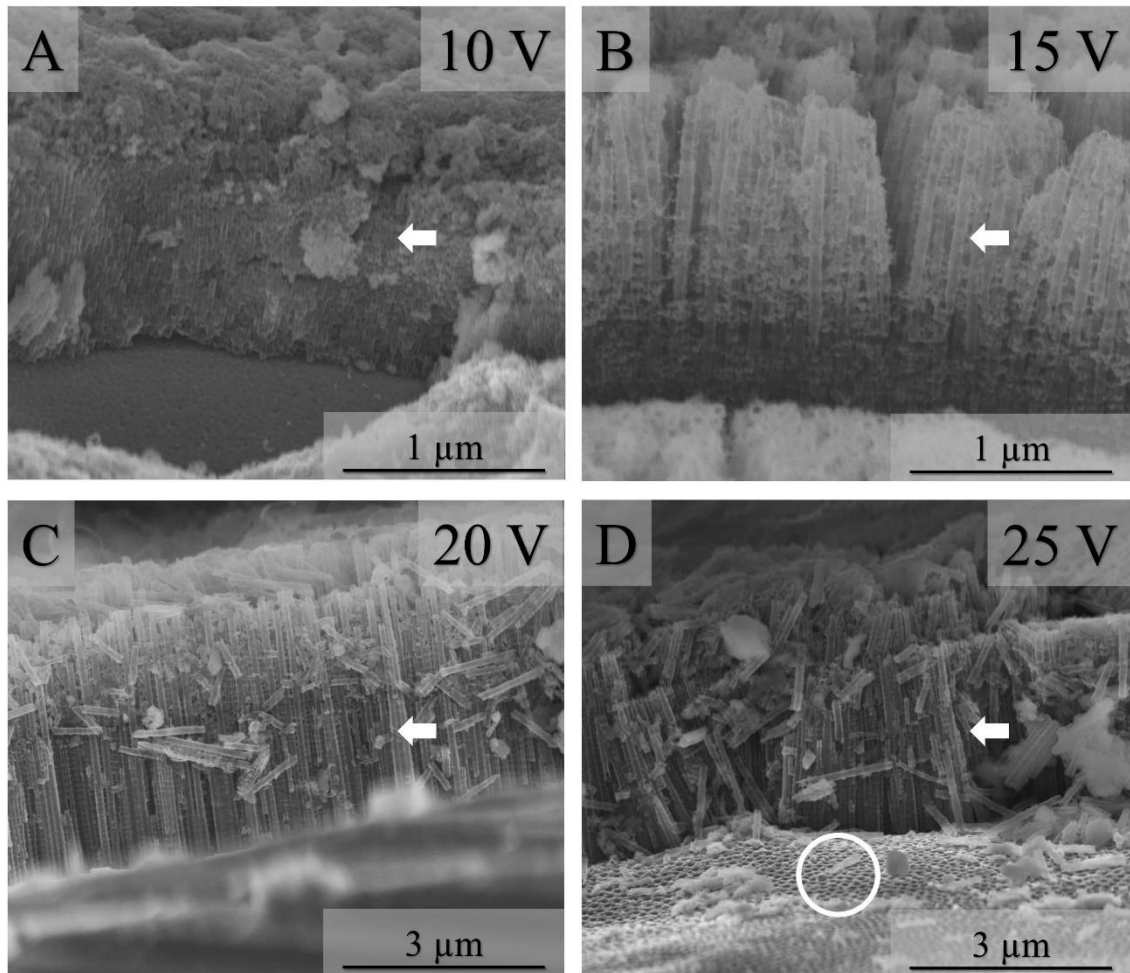
notable que los nanotubos de mayor diámetro (indicados con una flecha de color azul) están rodeados por nanotubos de menor diámetro (señalados con una flecha de color blanco). En la sección transversal de la figura 15 (C), se puede observar una capa ordenada de nanotubos altamente compactados (señalados con una flecha de color blanco). Esta capa presenta una superficie rugosa visualmente y muestra variaciones en las longitudes de los nanotubos. Estas características son el resultado del proceso de anodizado realizado a 20 V. De igual manera, en la figura 14 (D), se muestra la vista superior de los nanotubos formados por anodizado a 25 V. Se pueden ver la formación de capas de nanotubos autoorganizadas con dos diámetros diferentes, similar a otras aleaciones Ti-Zr-Nb [340–342], estas estructuras formaron un grupo de cúmulos nanotubulares con diámetros de gran tamaño (señalados con un círculo y una flecha de color azul) y rodeados de pequeños nanotubos de menor diámetro (señalados con flechas de color blanco), cuya distribución de tamaño bimodal se puede atribuir a la composición de la aleación y los efectos geométricos de estabilización bajo ciertos potenciales de anodización [332]. Además, en la superficie de la aleación no se observan precipitados ni productos de reacción intermedia como óxidos. Esta característica de autoorganización con diferentes diámetros también se puede apreciar en la vista transversal de la figura 15 (D). La capa nanotubular obtenida mediante el anodizado a 25 V muestra una superficie visualmente rugosa y nanotubos rectos altamente compactados (señalados con una flecha de color blanco). Las ondulaciones en las paredes de los nanotubos se atribuyen a las inestabilidades durante el proceso de crecimiento [336]. También, se pueden observar poros en la superficie de la aleación (señalados con un círculo de color blanco), los cuales están relacionados con la formación de grietas localizadas en la capa de óxido debido a la disolución química del óxido causada por la presencia de iones fluoruro en la solución de anodizado [343].



**Figura 14.** Vistas superiores de los nanotubos sintetizados sobre la superficie de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn a diferentes voltajes de anodización: 10, 15, 20 y 25 V.

Se ha reportado que, durante la etapa inicial del proceso de anodizado, se forma una capa de óxido irregular en la superficie, la cual se elimina gradualmente a medida que avanza la anodización [327]. Sin embargo, según nuestros resultados, después de 30 minutos de anodizado a voltajes de 10, 15 y 20 V, esta capa de óxido no se elimina completamente, lo que sugiere un proceso incompleto de menor formación de nanotubos. Esto podría explicarse como resultado del campo eléctrico aplicado, en la solución de anodizado, el  $H_2O$  se desprotona formando  $H^+$ ,  $O^-$  o iones  $OH^-$ , los aniones migran a la interfaz de metal/óxido y con el aumento del potencial aplicado, se espera que la tasa de crecimiento de óxido aumente de la misma manera que aumenta la tasa de ataque químico del  $F^-$  en la superficie de los nanotubos [331,344,345]. Esto sugiere que la formación de nanotubos con voltajes bajos podría requerir más

tiempo de anodizado para eliminar el óxido residual con el propósito de presentar de manera clara la estructura nanotubular subyacente.



**Figura 15.** Vistas en sección transversal de los nanotubos sintetizados sobre la superficie de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn a diferentes voltajes de anodización: 10, 15, 20 y 25 V.

Después, en este proyecto de investigación, se llevó a cabo la caracterización de la composición química de las muestras anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn utilizando la técnica de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS). Como se puede observar en la Tabla 1, los análisis realizados en diferentes posiciones de la capa de nanotubos mostraron que cada muestra estaba mayoritariamente compuesta por los elementos Ti, Zr, Nb y Sn.

**Tabla 1.** Análisis de la composición elemental mediante la técnica de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS) en los nanotubos generados en la superficie de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn, utilizando diferentes voltajes de anodización

Muestra	Concentraciones atómicas (at. %)					
	Ti	Zr	Nb	Sn	O	F
Control	34.1	22.4	8.5	1.6	---	---
10 V	26.9	4.5	5.8	0.9	48.8	6.6
15 V	28.1	6.8	6.3	0.3	37.9	12.1
20 V	29.6	8.6	2.3	0.7	57.5	13.9
25 V	27.9	8.9	2.9	0.6	39.4	5.9

Con la incorporación de los elementos O y F durante la anodización, cambiaron los porcentajes de elementos originales. Al incrementar el porcentaje de O, se observa una disminución en el porcentaje del elemento Zr en todos los anodizados. Este comportamiento también se observa en los elementos Ti, Nb y Sn. La reducción en el porcentaje atómico de estos elementos puede explicarse considerando las diferencias en la tasa de disolución entre los distintos sistemas de óxidos. La literatura menciona que la formación de nanotubos en diferentes metales presenta tasas de disolución química distintas en electrolitos que contienen flúor como base [346].

La presencia de elemento flúor varía entre las capas anódicas después de 30 minutos de reacción. Los nanotubos formados a 10, 15, 20 y 25 V mostraron contenidos de flúor (at %) de aproximadamente 6.6, 12.1, 13.9 y 5.9 %, respectivamente. Es interesante destacar que el contenido de flúor en los nanotubos formados a 10 V es similar al de los formados a 25 V, a pesar de que las dimensiones de los nanotubos son menores. Se ha informado en la literatura que el flúor tiende a incorporarse principalmente en la parte porosa de los

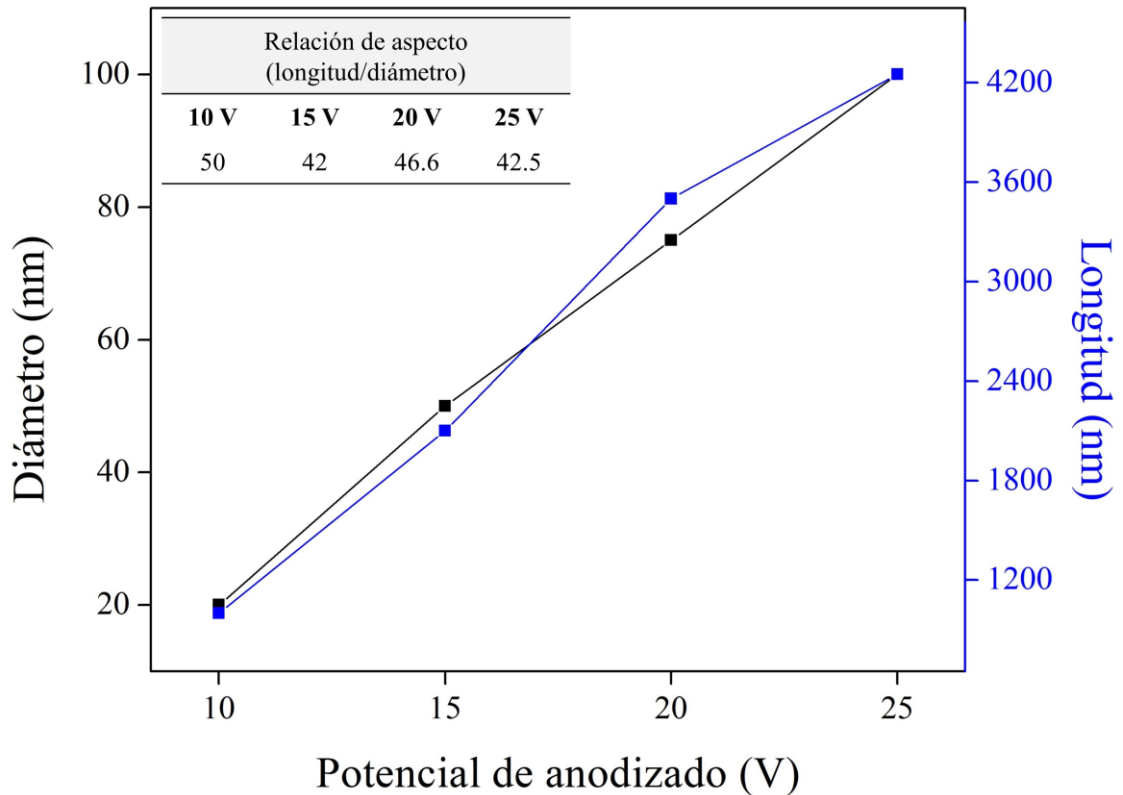
nanotubos por lo que la variación en la concentración de flúor es dependiente no solo de los tamaños, sino de la porosidad de las nanoestructuras [136,347].

El estudio del contenido de flúor en las aleaciones anodizadas es de gran interés debido a que se ha relacionado la presencia de este elemento con propiedades antibacterianas. Es importante destacar que se ha informado en la literatura que la presencia de flúor no altera la respuesta celular en comparación con aleaciones que no han sido sometidas al proceso de anodización. Esta información resalta la prometedora aplicación de estas aleaciones anodizadas en diversas áreas, donde se busca un efecto antibacteriano sin afectar negativamente las respuestas celulares [136]. En la sección 4.4 de este capítulo veremos la importancia del contenido de flúor en las propiedades antibacterianas de estas aleaciones.

Después de caracterizar la morfología y composición de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn, se llevó a cabo el análisis de las dimensiones de los nanotubos obtenidos a diferentes voltajes. La relación entre la longitud (línea negra) y el diámetro (línea azul) en función del potencial de anodización se presenta en la figura 16. Se puede observar una dependencia lineal positiva para cada uno de los parámetros en el rango de 10-25 V. Estos resultados demuestran cómo las dimensiones de los nanotubos formados pueden verse afectadas por condiciones electroquímicas [348]. El diámetro medio de los nanotubos aumentó alrededor de 20 nm a 10 V a 115 nm a 25 V y la tasa de crecimiento del diámetro fue de 5.3 nm/V, muy cercana a la tasa de crecimiento de titanio puro de 5 nm/V reportada en la literatura [349]. La longitud de los nanotubos aumentó de 1  $\mu\text{m}$  a 10 V a 4.2  $\mu\text{m}$  a 25 V, arrojando una tasa de longitud de crecimiento del óxido nanoestructurado de 213 nm/V.

Un factor importante por considerar es la relación de aspecto de las dimensiones de los nanotubos (ver tabla insertada en la figura 16). La relación de aspecto es importante debido a su influencia en las propiedades físicas, químicas, mecánicas y de transporte de moléculas. Una relación de aspecto alta puede resultar en una mayor área superficial, lo que se relaciona con la capacidad de adsorción y absorción de moléculas en los nanotubos, la relación de aspecto promedio obtenida mediante este proceso de anodizado es de 45.2, considerada una relación de aspecto intermedia. Esta relación puede ser ajustada y controlada mediante la optimización de las condiciones de anodización y la composición del electrolito, lo que permite adaptar las dimensiones de los nanotubos según las necesidades específicas de las aplicaciones médicas [336,343,350,351]. Otro factor importante por determinar en este tipo de superficie debe ser la densidad de los nanotubos por unidad de área. Con los datos anteriores y las imágenes de SEM, fue posible determinar una densidad de nanotubos por unidad de área, como se muestra en la figura 17 (A). Se puede observar (línea y puntos de color negro) que existe una tendencia a la baja de la densidad a medida que aumenta el voltaje de anodizado, esta disminución se

debe a que, cuando el potencial aumenta, el diámetro y la longitud de algunos de los nanotubos crecen, en detrimento de otros nanotubos que se hacen más pequeños, formando las especies de racimo como los obtenidos en la figura 14 (D) a 25 V.



**Figura 16.** Influencia del potencial anodizado en el crecimiento de estructuras nanotubulares: Relación de la longitud de los nanotubos (línea azul) y diámetros (línea negra). Recuadro: relación de aspecto de los nanotubos de Ti-24Zr-10Nb-2Sn.

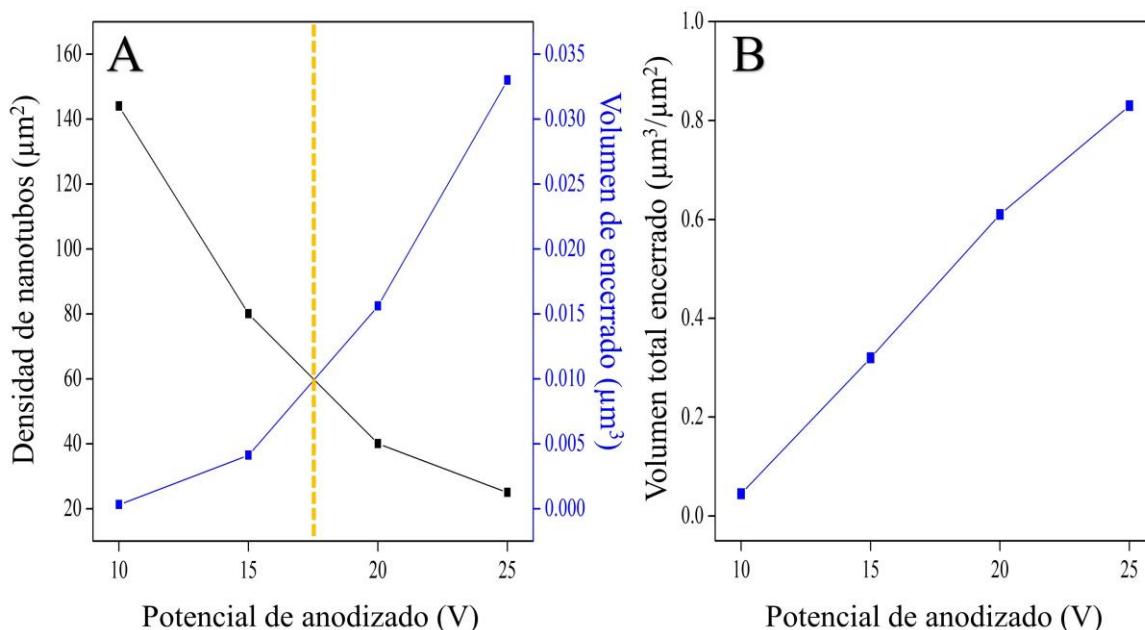
Estos clústeres disminuyen la densidad considerablemente ya que los nanotubos más grandes tienen un mayor diámetro interno (ver figura 14 D), lo que contribuye a una menor densidad a medida que aumenta el voltaje de anodizado.

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, el volumen encerrado de los nanotubos se calculó utilizando el promedio del diámetro interno, la longitud y la densidad de los nanotubos. En la figura 17 (A), los puntos azules representan el volumen encerrado de los nanotubos. Se observó una relación positiva con el potencial aplicado. En esta síntesis, el aumento en el tamaño del nanotubo juega un papel más importante en el volumen encerrado que en la densidad de los

nanotubos. Cuando se trata de la liberación de antibióticos utilizando nanotubos de titanio, hay dos aspectos clave a considerar: la cantidad de antibiótico liberado y la uniformidad de la liberación [352–354]. En este sentido, estos resultados son importantes para diseñar una arquitectura deseada de nanotubos ajustando el voltaje aplicado en el proceso de anodización.

Para lograr una liberación deseada de antibióticos, es necesario encontrar un equilibrio entre la cantidad de antibiótico liberado y la uniformidad de la liberación. La cantidad de antibiótico liberado está relacionada con el volumen encerrado de los nanotubos. La estructura hueca de los nanotubos, les permiten actuar como contenedores para los antibióticos. Cuanto mayor sea el volumen interno de los nanotubos, más antibióticos podrán contener y, por lo tanto, más cantidad podrán liberar. Por otro lado, la uniformidad de la liberación se relaciona con la densidad de los nanotubos. La densidad de los nanotubos se refiere a qué tan cerca están empaquetados unos de otros. Si los nanotubos están muy densamente empaquetados, la liberación del antibiótico será más uniforme, ya que los poros de los nanotubos estarán más cerca entre sí y permitirán una difusión más homogénea de los antibióticos. Por lo tanto, la intersección de ambas líneas en torno a 17 V (ver figura 17 (A), línea de color amarillo) representa el punto donde se logra el mejor compromiso entre la cantidad de antibiótico liberado y la uniformidad de la liberación. Por otro lado, calcular el volumen total encerrado por unidad de área de los nanotubos es otro factor importante por considerar en sistemas de liberación de antibióticos, ya que influye directamente en la cantidad de antibióticos que se pueden cargar y, por lo tanto, en la eficacia y duración de la liberación [355–357]. En la figura 17 (B) podemos ver que, a medida que aumenta el voltaje de anodizado, se observa un incremento en el volumen total encerrado de los nanotubos. Esto significa que las aleaciones anodizadas a 25 V podrían liberar una mayor cantidad de antibióticos en comparación con los anodizados a voltajes más bajos. El volumen total encerrado también está relacionado con el control de la velocidad de liberación de los antibióticos. Cuanto mayor sea el volumen total encerrado, más espacio habrá para que los antibióticos difundan desde el interior de los nanotubos. Esto permitiría una liberación más prolongada en el tiempo, evitando la necesidad de dosis frecuentes y manteniendo una concentración terapéutica durante un período prolongado. Por lo tanto, se esperaría que los nanotubos a 25 V tardaran más tiempo en liberar el antibiótico con respecto a los anodizados a voltajes más bajos. Con base en lo anterior, la geometría de los nanotubos es importante al diseñar sistemas de liberación de antibióticos ya que afectarán la eficacia y la forma en que los antibióticos se distribuyen en el entorno donde se liberan. En la sección 4.3 de este capítulo veremos el perfil de liberación del antibiótico gentamicina a partir de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn a diferentes voltajes.





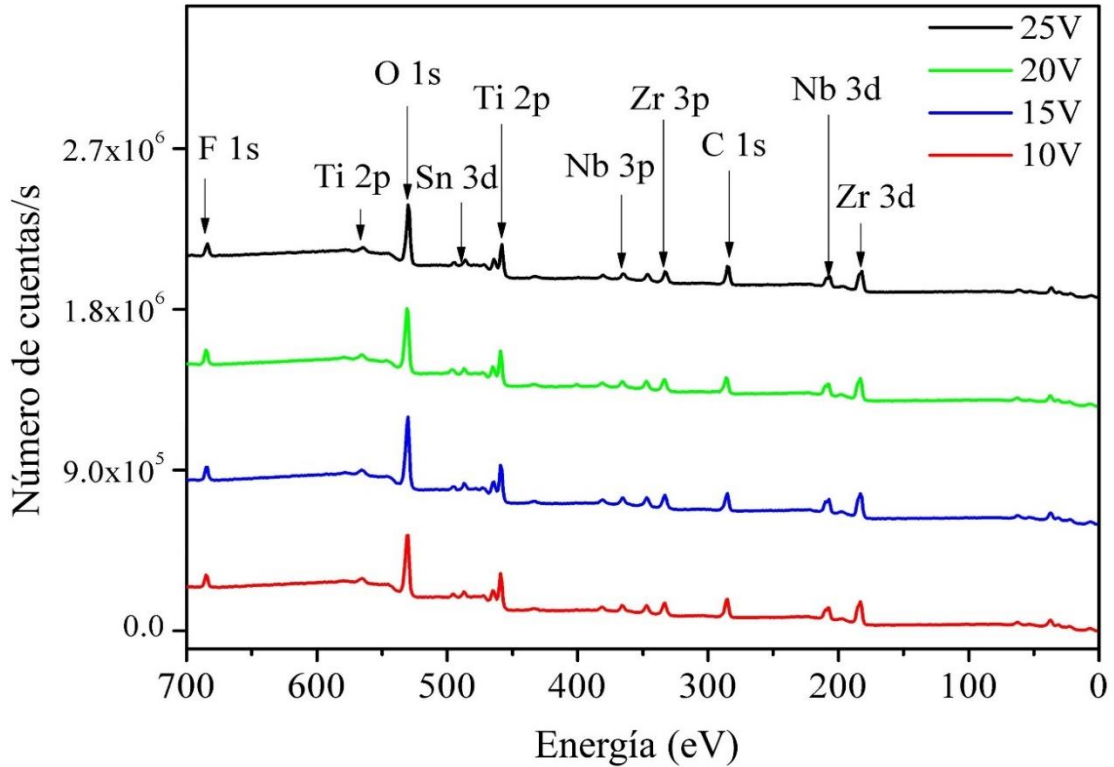
**Figura 17.** Influencia del potencial anodizado en el crecimiento de estructuras nanotubulares en Ti-24Zr-10Nb-2Sn: (A) Relación de la densidad de los nanotubos (línea negra) y volumen encerrado de los nanotubos (línea azul), (B) volumen total encerrado por unidad de área.

#### 4.2.3. Caracterización superficial por Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

La caracterización superficial por XPS de los nanotubos de titanio permitió conocer la composición química y el estado de oxidación de los átomos presentes en la superficie de los nanotubos, así como la presencia de posibles impurezas o contaminantes. Estos datos fueron relevantes para comprender las propiedades de los nanotubos de titanio bajo diferentes condiciones de anodizado y con esta información optimizar su síntesis y funcionalización superficial.

Para conocer la composición química superficial de los diferentes sustratos, se realizó la caracterización por XPS. La figura 18 muestra los espectros XPS de las muestras anodizadas a 10, 15, 20 y 25 V marcados con una línea roja, azul, verde y negra, respectivamente. En todos los casos, los espectros del estudio indican la presencia de elementos Ti, Zr, Nb, Sn, O y F, marcados con una flecha negra.

Como los espectros de cada muestra anodizada son similares, en la figura 19 solo se presenta el espectro XPS de alta resolución de la muestra anodizada a 25 V.

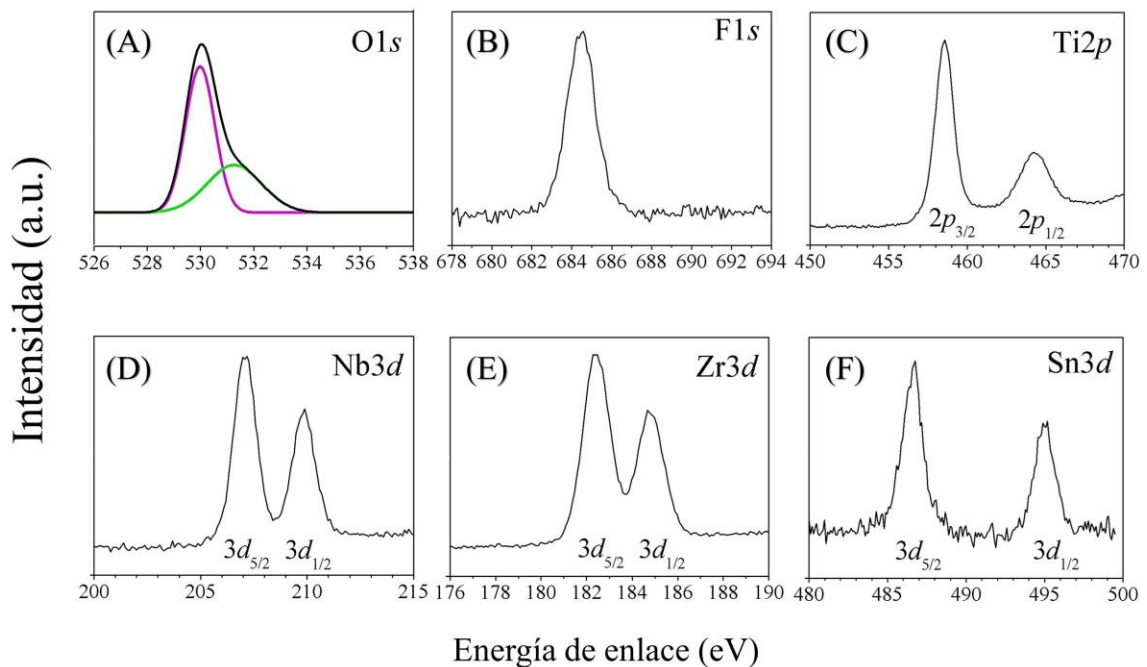


**Figura 18.** Espectros XPS para la superficie de aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn después de la anodización por 30 minutos a 10, 15, 20 y 25 V.

Los espectros de fotoemisión de O1s muestran una señal a 530.08 eV, que puede estar relacionada con la existencia de óxidos metálicos, la otra señal a 531.08 eV se atribuye a grupos hidroxilo que están presentes en la superficie del nanotubo (véase la figura 19 A) [358]. El espectro F1s se muestra en la figura 19 (B), esta contribución cercana a 684.3 eV, indica que el flúor se presenta en la muestra principalmente como fluoruros metálicos y a F<sup>-</sup> físicamente adsorbido en la superficie [358]. En la figura 19 (C), los estados de valencia del titanio fueron determinados por los picos Ti2p<sub>3/2</sub> y Ti2p<sub>1/2</sub> a 458.5 y 464.3eV, respectivamente, con una división de 5.8 eV típica de Ti<sup>4+</sup> en dióxido de titanio [330,358,359].

La formación de Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> fue confirmada por los picos Nb3d<sub>3/2</sub> a 209.88 eV y Nb3d<sub>5/2</sub> a 206.98eV con una órbita de giro dividida de 2.9ev (figura 19 D) y de acuerdo con los valores reportados para Nb<sup>5+</sup> en Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [358,360,361]. Los espectros Zr<sub>3d</sub> se muestran en la figura 19 (E) en energías de unión de 182.48 y 184.64 eV, que corresponde a Zr3d<sub>5/2</sub> y Zr3d<sub>3/2</sub> con una órbita de espín dividida de 2.16eV que confirma que el zirconio está en la forma de Zr<sup>4+</sup> [362]. Finalmente, la formación de SnO<sub>2</sub> fue confirmada por los picos Sn3d<sub>5/2</sub> y Sn3d<sub>3/2</sub> a 486.58 y 494.88 eV, respectivamente (figura 19 F) con una órbita de giro dividida de 8.3eV [360,361].

Con base en estos resultados, la formación de una capa de óxido nanotubular en la superficie de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn podría seguir la ruta propuesta por Liu *et al.* [341], Yasuda y Schmuki [363], y Li *et al.* [364], donde se menciona que la formación de nanotubos en aleaciones Ti-Nb-Zr se debe a la competencia entre la formación de óxido electroquímico y la disolución química del óxido por iones de fluoruro. Los autores mencionan que la síntesis de nanotubos se produce preferentemente en algunas ubicaciones del sustrato Ti-Nb-Zr, donde la tasa de crecimiento de los nanotubos depende del campo eléctrico local y la tasa de difusión de la solución. Además, el crecimiento de nanotubos en este tipo de aleaciones puede ser influenciada por otros factores como la temperatura, el tiempo, la concentración de electrolito y la presencia de otros iones en la solución, por lo que es importante controlar estos parámetros ya que podrían afectar significativamente la calidad y las propiedades de la capa de óxido. Si alguno de estos parámetros se desvía de los valores óptimos o estandarizados, se puede formar una capa de óxido inadecuada, con poca resistencia a la corrosión, baja biocompatibilidad o incluso la formación de defectos en la superficie de la aleación [341,363,364].



**Figura 19.** Espectros XPS de alta resolución para (A) O1s, (B) F1s, (C) Ti2p, (D) Nb3d, (E) Zr3d, y (F) Sn3d obtenidos para la capa pasiva nativa en la superficie de aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn anodizada a 25 V.

Los resultados de la composición elemental relativa se resumen en la Tabla 2. Podemos observar que, las concentraciones atómicas de oxígeno son relativamente altas, oscilando alrededor del 43-47%. La presencia de oxígeno en altas concentraciones indica la formación de un óxido sobre la superficie de la aleación. Por otro lado, las concentraciones atómicas de titanio en la capa de óxido nanotubular son relativamente consistentes en todos los casos, oscilando alrededor del 9-10%. De igual forma, las concentraciones de zirconio también se mantienen relativamente constantes, en torno al 5-6%. Mientras que, las concentraciones de niobio y estaño son bajas y varían alrededor del 2-3% y 0.7-0.8% respectivamente. El análisis de estos resultados sugiere que la capa de óxido nanotubular formada en la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn está compuesta principalmente por óxidos de titanio y zirconio, con bajas concentraciones de óxidos de niobio y estaño [365,366]. Estos elementos metálicos forman parte de la aleación base y se oxidan durante el proceso de anodización. La presencia de flúor está relacionada con el electrolito utilizado durante el proceso de anodización. Las concentraciones de flúor se encuentran en el rango del 5-7%. La presencia de flúor en las concentraciones mencionadas indica que el flúor desempeña un papel importante en la formación de la capa de óxido nanotubular. El flúor puede influir en las propiedades de la capa de óxido, como su espesor, estructura y estabilidad química [132,148,324]. En la sección 4.4 de este capítulo veremos la relevancia del contenido de flúor en las propiedades antibacterianas de estas aleaciones anodizadas.

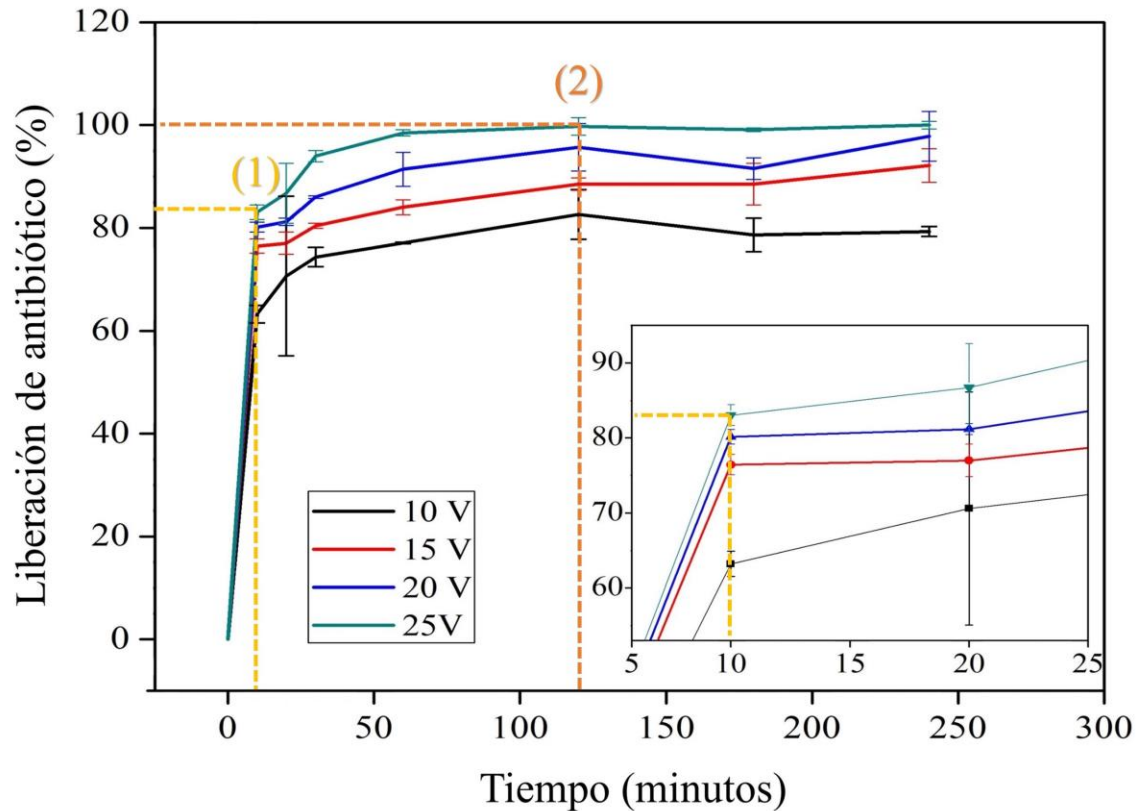
**Tabla 2.** Composición elemental relativa obtenida por XPS de la capa de óxido nanotubular formada en Ti-24Zr-10Nb-2Sn a diferentes potenciales de anodización durante 30 minutos a 25°C

Muestra	Concentraciones atómicas (at. %)						
	Ti2p	Zr3d	Nb3d	Sn3d	O1s	F1s	C1s
10 V	9.24	5.95	2.94	0.66	44.76	6.24	30.2
15 V	9.72	6.16	3.24	0.7	46.83	6.31	27.05
20 V	9.61	5.75	3.04	0.79	45.03	7.23	28.55
25 V	8.98	5.69	2.95	0.67	43.47	5.92	32.32

### **4.3. Liberación de antibióticos a partir de las aleaciones anodizadas**

Para demostrar la eficacia y el tiempo de liberación de antibiótico por la arquitectura de los nanotubos, se llevaron a cabo pruebas de liberación de antibióticos por triplicado para cada una de las muestras anodizadas. La figura 20 muestra el registro de la concentración de gentamicina liberada en PBS con un pH 7.4 a 37 °C en función del tiempo. Los espectros de absorción UV-Vis de la solución de gentamicina para todas las muestras indican que el antibiótico gentamicina tenía una absorción amplia a 225-290 nm y el máximo a 262 nm. Es importante tener en cuenta que cada una de las nanoestructuras presentó una liberación sostenida con dos etapas diferentes, marcadas en la figura 20 con una línea punteada de color amarillo para la etapa 1 y una línea punteada de color naranja para la etapa 2. En los primeros 10 minutos de inmersión, se ha registrado un efecto de liberación de ráfaga de aproximadamente el 80% del antibiótico (ver el recuadro en figura 20). Las muestras anodizadas a 10 V presentaron una cinética de menor porcentaje de liberación en comparación con las muestras anodizadas a 25 V. La diferencia en la cantidad de liberación de gentamicina puede estar relacionada con el tamaño y la estructura de los nanotubos de titanio sintetizados a diferentes voltajes de anodización. Cuando se aplicó un voltaje más alto, como en el caso de las muestras anodizadas a 25 V, se formaron nanotubos de mayor diámetro y mayor longitud (ver figura 16). Estos nanotubos más grandes presentaron una mayor capacidad de carga y, por lo tanto, liberaron una mayor cantidad de antibióticos en comparación con los nanotubos más pequeños y cortos (ver figura 16) formados a 10 V, que tuvieron una capacidad de carga más limitada, lo que resultó en una menor cantidad de antibióticos liberados. En la segunda etapa, se observó una cinética de liberación lenta, (señalada con una línea punteada de color naranja en la figura 20), que se prolongó hasta los 120 minutos donde se alcanzó el 100 % de liberación de antibiótico para todas las muestras anodizadas. La solubilidad de la gentamicina en el medio acuoso circundante (PBS) puede influir en la velocidad de liberación. Si la solubilidad del antibiótico es alta, se disolverá rápidamente en el medio acuoso, lo que facilitará su liberación desde los nanotubos. Por otro lado, si la solubilidad es baja, el proceso de disolución puede ser más lento, lo que a su vez puede afectar la velocidad de liberación. Es importante considerar tanto la difusión a través de los poros como la solubilidad del antibiótico ya que ambos factores pueden afectar la cinética de liberación de los antibióticos [367]. Por lo tanto, se espera una liberación ráfaga de la superficie en los primeros minutos de inmersión de muestras, que podría estar relacionada con un fenómeno de adsorción. Esta liberación de ráfaga es más importante a medida que disminuye la densidad de nanotubos o el tamaño en los nanotubos es mayor, contrariamente

a la zona de liberación lenta, que puede estar relacionada con la cantidad de antibióticos cargados dentro de los nanotubos.



**Figura 20.** Porcentaje de liberación de gentamicina en función del tiempo. Las curvas corresponden a las muestras de la figura 14 y 15. Recuadro: la liberación de ráfaga del antibiótico se observa en los primeros minutos de liberación.

Esto significa que, si el proceso de liberación buscado debe ser lento, entonces se debe elegir un proceso regido por la difusión de antibióticos desde el interior de los nanotubos. La difusión implica que los antibióticos se muevan gradualmente a través de la estructura de los nanotubos y se liberan en el medio circundante a una velocidad controlada. Cuando los antibióticos están cargados en los nanotubos, tienden a difundirse hacia afuera a medida que buscan un equilibrio de concentración. Si los nanotubos son más grandes y menos densos (ver figura 17 A y B), la distancia que los antibióticos deben recorrer dentro de los nanotubos para llegar al medio externo es mayor [13,368]. Esto dificulta la difusión de los antibióticos y ralentiza su liberación. Estos resultados son similares a la cinética de liberación que presentan otras matrices nanotubulares de titanio y otras nanoestructuras cargadas con gentamicina [165,166,217,367,369,370]. Como ya se mencionó, el propósito general de los antibióticos es evitar la colonización de bacterias alrededor del dispositivo

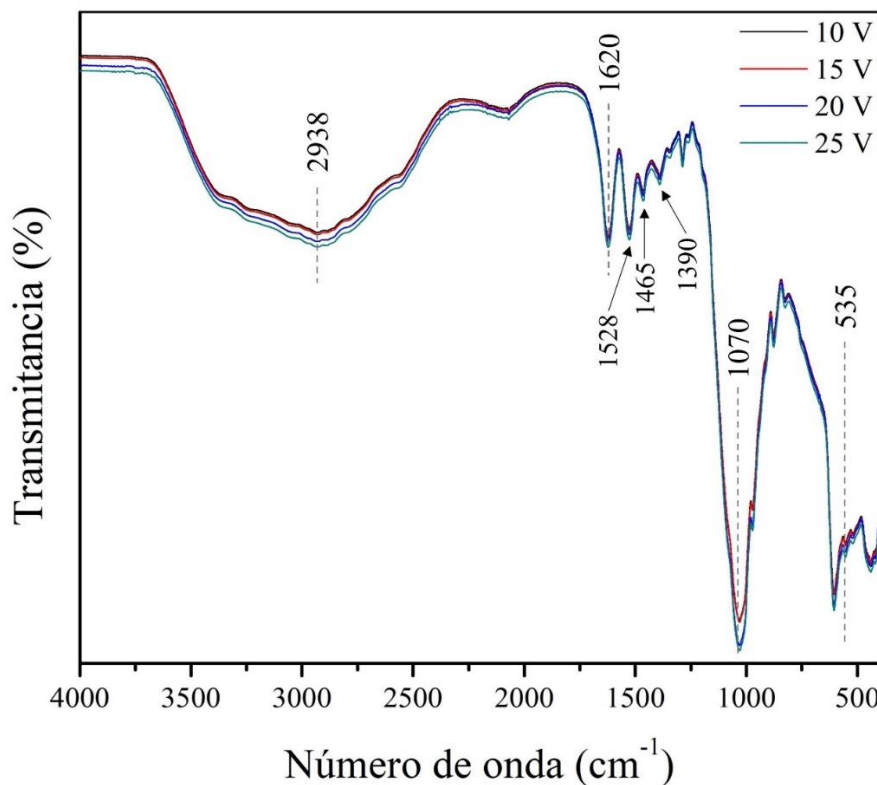
médico; ya que al liberarse una cantidad alta de antibiótico, atacará diversos sistemas vitales del metabolismo bacteriano, los cuales posiblemente no lograrán recuperarse antes de la división celular bacteriana, lo cual es indicio de inhibición bacteriana, en comparación con un panorama invertido, es decir si llegara a presentarse una liberación de antibiótico pequeña esto permitiría a las bacterias adaptarse y diseñar estrategias de resistencia, lo cual realizarían paulatinamente en función del incremento de la liberación del antibiótico. Por lo cual, estos resultados ofrecen evidencia sobre el uso potencial de estos materiales como sistema novedoso para la liberación de antibióticos en aleaciones de base titanio. Por último, en Tabla 3, se presenta un resumen de las características geométricas más importantes y su relación con una posible aplicación en la liberación de antibióticos obtenidos de esta parte de la tesis. Con esta información, es posible diseñar una matriz específica de nanotubos en función de la cantidad de administración de antibióticos, que puede corresponder a la uniformidad de entrega o al comportamiento de liberación a mayor tiempo.

**Tabla 3.** Características morfológicas (longitud, diámetro, densidad, volumen encerrado y tiempo para liberar el 50% del antibiótico) por los nanotubos generadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn

Parámetros	Muestras			
	10 V	15 V	20 V	25 V
Longitud (nm)	1000	2100	3500	4250
Diámetro (nm)	20	50	75	100
Relación de aspecto (longitud/diámetro)	50	42	46.6	42.5
Densidad de los nanotubos/ $\mu\text{m}^2$	144	80	40	25
Volumen total encerrado ( $\mu\text{m}^3$ )/ $\mu\text{m}^2$	0.045	0.32	0.61	0.83
Porcentaje de liberación de gentamicina en los primeros 10 minutos	68	76	80	83

### 4.3.1. Espectroscopía Infrarroja (FT-IR) de las aleaciones cargadas con antibióticos

Mediante espectroscopía FT-IR se confirmó la incorporación del antibiótico gentamicina en los nanotubos de titanio sintetizados a diferentes voltajes después del proceso de carga. La figura 21 muestra los espectros FT-IR de nanotubos formados en la superficie de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn cargadas con el antibiótico gentamicina en el rango de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . Las bandas anchas de 3500  $\text{cm}^{-1}$  a 1600  $\text{cm}^{-1}$  indican la presencia de moléculas de agua adsorbidas o unidas al hidrógeno en los nanotubos [343]. La banda presentada a 535  $\text{cm}^{-1}$  se atribuye al modo de estiramiento Ti-O-Ti de  $\text{TiO}_2$  [371–374]. El pico presentado en aproximadamente 1077  $\text{cm}^{-1}$  se ha reportado como la vibración de estiramiento C-O del amonio residual del electrolito utilizado en el proceso de anodización (Fluoruro de amonio) [371]. La gentamicina pura mostró sus picos vibratorios característicos a 1530  $\text{cm}^{-1}$ , 1463  $\text{cm}^{-1}$  y 1392  $\text{cm}^{-1}$  [375]. Así, estos picos en las aleaciones anodizadas cargadas con gentamicina (picos señalados por flechas de color negro) confirman la presencia de gentamicina en todas las muestras anodizadas.



**Figura 21.** Espectros FT-IR de nanotubos formados en la superficie de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn cargados con el antibiótico gentamicina.



## **4.4. Determinación de las propiedades antibacterianas de las aleaciones anodizadas y aleaciones cargadas con antibióticos**

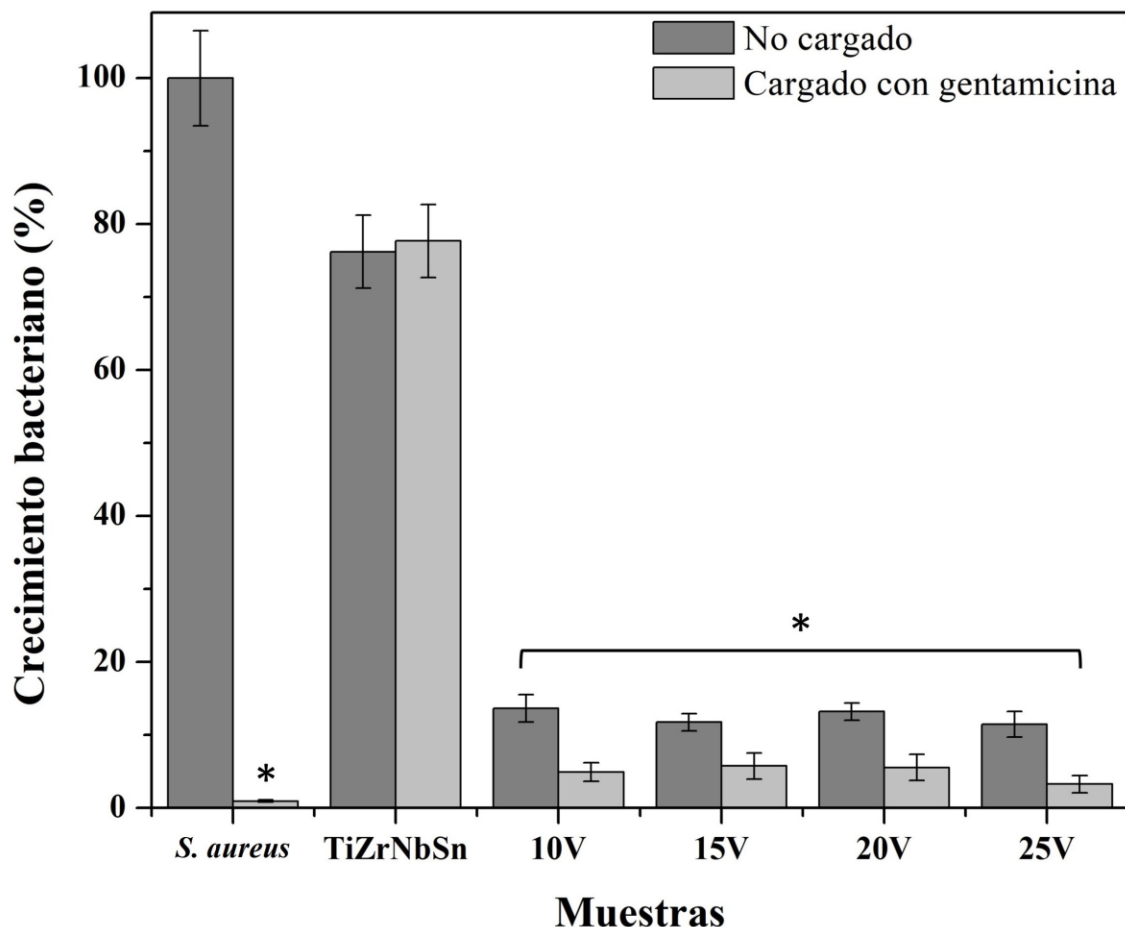
Para determinar las propiedades antibacterianas de las aleaciones anodizadas y aleaciones anodizadas cargadas con el antibiótico gentamicina, se emplearon diferentes métodos microbiológicos, como la medición de la turbidez de las muestras bacterianas por espectrofotometría, el recuento bacteriano en placa y el método de antibiograma. Estas técnicas permitieron evaluar la eficacia de los antibióticos incorporados en los nanotubos de titanio frente a una bacteria patógena causante de infecciones postoperatorias, *Staphylococcus aureus*. Los resultados obtenidos pueden ayudar a optimizar el diseño y la fabricación de las aleaciones anodizadas y aleaciones cargadas con antibióticos para mejorar la prevención y el tratamiento de las infecciones postoperatorias asociadas a prótesis o implantes biomédicos.

### **4.4.1. Medición de turbidez por espectrofotometría**

Los resultados obtenidos de la medición de turbidez por espectrofotometría se indican en la figura 22. La cepa bacteriana de *S. aureus* se utilizó como control positivo para el crecimiento bacteriano y las placas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn no anodizadas se utilizaron como control de la aleación. En la figura 22 se observa una disminución en el porcentaje de crecimiento bacteriano en presencia del control de la aleación (76%) en comparación con el control positivo (100 %), lo que indica una sensibilidad del microorganismo a este material, pero se observa una disminución más significativa para las muestras anodizadas. Los resultados revelaron que el anodizado a 25 V presentó la mayor actividad antibacteriana, con un valor de crecimiento bacteriano por absorbancia del 10%. Seguido del anodizado a 20 V con un valor del 12%, mientras que las aleaciones anodizadas a 10 V y 15 V obtuvieron valores de 14% y 11% respectivamente. Estos resultados indican que la bacteria estudiada es sensible a la presencia de flúor introducido durante el proceso de anodización, ya que las superficies de las aleaciones anodizadas que contenían flúor incorporado mostraron una disminución significativa en la viabilidad bacteriana en comparación con las aleaciones control que no contenían flúor. Estos hallazgos resaltan el potencial de las aleaciones anodizadas con flúor para inhibir el crecimiento bacteriano y sugieren su posible aplicación en entornos donde se requiera un efecto antibacteriano [376,377]. El mismo comportamiento se presentó en las aleaciones anodizadas cargadas con el antibiótico gentamicina debido a la liberación del antibiótico en el medio de cultivo. Se observó que la cepa de *S.*

*aureus* mostró sensibilidad a los cuatro anodizados cargados con gentamicina que fueron evaluados. Al igual que en el ensayo anterior, el anodizado a 25 V cargado con el antibiótico exhibió la mayor actividad antibacteriana, con un valor de crecimiento bacteriano por absorbancia del 4%. Le siguió el anodizado a 20 V con un valor del 5%, y posteriormente, las aleaciones de 15 V y 10 V mostraron valores muy similares, con absorbancias de 6% y 5%, respectivamente. Esta disminución significativa en el crecimiento *in vitro* de *S. aureus* se atribuye a la liberación del antibiótico gentamicina a través de los nanotubos de titanio hacia el medio de cultivo. La gentamicina tiene un efecto bactericida al unirse a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, lo que impide la traducción del ADN bacteriano y, por tanto, la síntesis de proteínas [368,378].

Los resultados indican que los anodizados no cargados y cargados con gentamicina inhiben el crecimiento *in vitro* de *S. aureus*. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la medición por turbidez mediante espectrofotometría presenta la limitación de no poder distinguir entre bacterias vivas y muertas. Este método nos proporciona una perspectiva del comportamiento del microorganismo frente a la presencia de los materiales, ya que solo permite monitorear el crecimiento bacteriano. No permite determinar si las aleaciones impiden la reproducción de las bacterias o provocan una reducción en la población bacteriana. Por lo tanto, este método se utiliza principalmente como un indicador aproximado del crecimiento bacteriano, pero no como un método cuantitativo exacto. En base a lo mencionado anteriormente, en la sección 4.5.2 del estudio se realizó un recuento bacteriano en placa para cuantificar el número de bacterias viables en las muestras. Este método de recuento bacteriano en placa proporciona una evaluación más precisa y cuantitativa de la actividad bactericida o bacteriostática de las aleaciones.



**Figura 22.** Propiedades antibacterianas por método de espectrofotometría de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn, no cargadas y cargadas con el antibiótico gentamicina sobre *S. aureus*. \*Representa  $P < 0.05$  en comparación con el grupo de control.

#### 4.4.2. Recuento bacteriano en placa

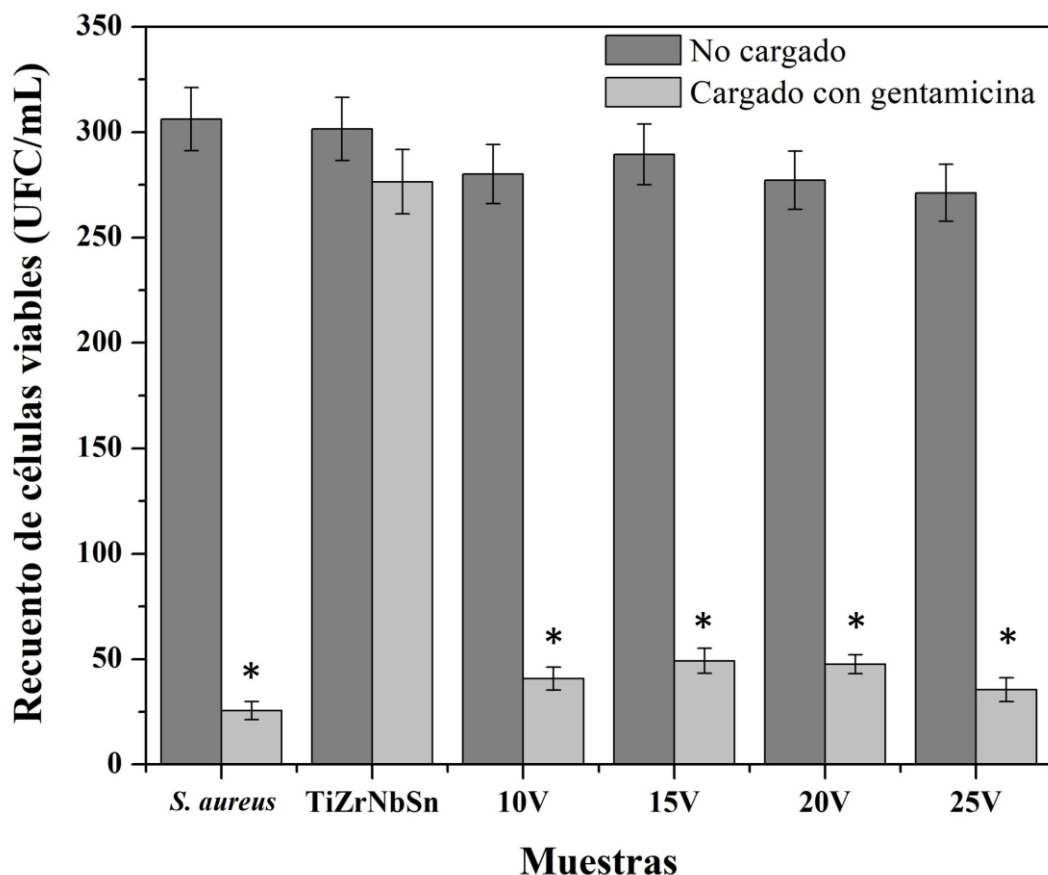
En la figura 23 se presentan los valores del recuento de células viables (UFC/mL) obtenidos a través del ensayo de recuento bacteriano en placa. Para evaluar la viabilidad bacteriana, se utilizó la cepa bacteriana de *S. aureus* como control positivo, mientras que las placas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn no anodizadas se emplearon como control de la aleación. El control positivo de *S. aureus* mostró un comportamiento esperado, para muestras sin antibiótico cargado, se observa un rendimiento celular superior a 300 UFC/mL. En condiciones normales, sin la presencia de antibióticos, las bacterias crecen y se dividen rápidamente, formando una gran cantidad de colonias, mientras que, para las muestras con antibiótico, se observa una disminución significativa en el rendimiento celular con

un promedio de 25 UFC/mL. Cuando se añade un antibiótico al medio de cultivo, las bacterias que son sensibles se ven afectadas y no pueden seguir creciendo o mueren. Por el contrario, las bacterias que son resistentes al antibiótico pueden seguir creciendo y multiplicándose, formando colonias bacterianas, esto lo podemos observar en los resultados que, a pesar de agregar antibiótico al medio de cultivo, una pequeña cantidad de bacterias logró sobrevivir al tratamiento, lo que indica que estas bacterias presentan un cierto grado de resistencia a este antibiótico [379,380].

Por otro lado, se observó que las muestras anodizadas no cargadas con antibióticos presentan actividad antibacteriana. Las muestras anodizadas presentaron una menor cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) en comparación con la aleación control (no anodizada). El valor promedio de rendimiento celular para la aleación control fue de 305 UFC/mL. Por otro lado, la muestra anodizada a 25V mostró un valor de 270 UFC/mL, seguida del anodizado a 20V con un valor de 278 UFC/mL. Las aleaciones anodizadas a 15V y 10V presentaron valores de 280 y 276 UFC/mL, respectivamente. Estos resultados sugieren que el proceso de anodizado tiene un efecto inhibitorio sobre las bacterias, impidiendo su reproducción, lo que significa que las aleaciones anodizadas tienen propiedades bacteriostáticas. Este efecto se puede atribuir a la incorporación de iones de fluoruro en la superficie del material durante el proceso de anodización [338,381].

El flúor actúa como antimicrobiano interfiriendo en diversos procesos celulares de las bacterias. Estos procesos incluyen la síntesis de la pared celular, donde altera su composición y organización, previniendo su formación o transporte a través de la membrana citoplasmática. Además, afecta la permeabilidad e integridad de la membrana, lo que puede llevar a la entrada o salida de iones, agua y otros compuestos, causando daño o muerte bacteriana. En relación con el metabolismo de los ácidos nucleicos, el flúor puede inhibir enzimas esenciales para la replicación, transcripción y reparación del ADN bacteriano. Esto evita la duplicación del ADN y su expresión. Además, el flúor influye en la síntesis de proteínas al unirse a los ribosomas bacterianos y obstaculizar su funcionamiento. Esto evita la formación de enlaces peptídicos entre los aminoácidos y la correcta interpretación de los códigos genéticos [382–384]. En el caso de las aleaciones anodizadas cargadas con el antibiótico, se observó una notable sensibilidad de la cepa *S. aureus*. El anodizado a 25 V mostró la actividad antibacteriana más alta, con un valor de 35 UFC/mL, seguido del anodizado a 10 V con un valor de 40 UFC/mL. Las aleaciones anodizadas a 15 V y 20 V presentaron valores de 47 y 49 UFC/mL, respectivamente. Estos resultados indican que la liberación de la gentamicina cargada en las aleaciones anodizadas hacia el medio de cultivo resulta en la muerte de las bacterias. Esto se debe a que la gentamicina ejerce un efecto bactericida al unirse a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, lo

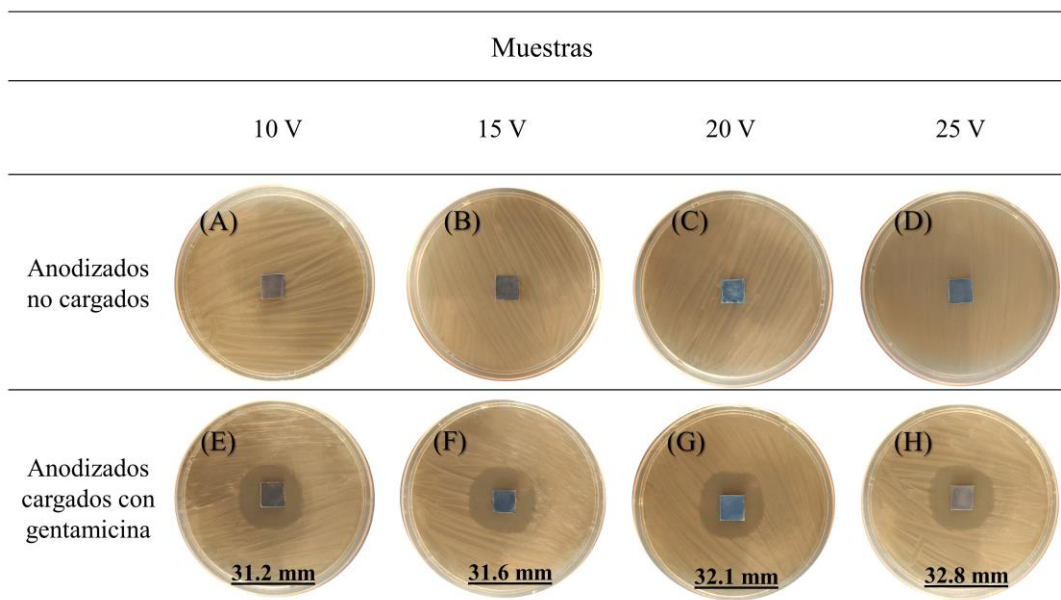
cual interfiere con la traducción del ADN bacteriano y, por consiguiente, inhibe la síntesis de proteínas [368,378,385]. Esto se deduce de los resultados obtenidos, ya que las muestras anodizadas cargadas muestran una reducción significativa en la población bacteriana debido a la presencia de gentamicina (efecto bactericida) en comparación con los resultados de las muestras anodizadas sin carga de antibiótico, donde no hay una reducción significativa en la población bacteriana (efecto bacteriostático). El efecto bacteriostático presentado por las aleaciones anodizadas es una forma de controlar el crecimiento de las bacterias sin causar su muerte. Este efecto podría ser útil en aplicaciones médicas para prevenir o tratar las infecciones postoperatorias, ya que reduce la cantidad de bacterias en el organismo o en los dispositivos implantados. Sin embargo, el efecto bacteriostático no elimina por completo las bacterias, por lo que es necesario combinarlo con sustancias bactericidas para lograr una erradicación completa de las bacterias como es el caso de los nanotubos de titanio cargados con antibióticos.



**Figura 23.** Propiedades antibacterianas por ensayo de recuento bacteriano en placa de aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn, no cargadas y cargadas con el antibiótico gentamicina sobre *S. aureus*. \*Representa  $P < 0.05$  en comparación con el grupo de control.

### 4.4.3. Prueba de antibiograma

La figura 24 muestra los resultados obtenidos por el método antibiograma. En la parte superior de la figura (A-D) se presentan las placas de aleación anodizada de 10 a 25 V sin carga de antibiótico en presencia de la cepa *S. aureus*. En la parte inferior de la figura (E-H) se muestran las placas anodizadas de 10 a 25 V cargadas con el antibiótico gentamicina. Los resultados obtenidos indican que las aleaciones anodizadas sin carga de antibiótico no tienen ningún efecto sobre la cepa *S. aureus*. Sin embargo, se observa una clara zona de inhibición en todas las muestras anodizadas cargadas con antibióticos, lo que sugiere la liberación y difusión del antibiótico desde los nanotubos al medio de cultivo. Esta zona de inhibición establece un gradiente de concentración alrededor de la placa, donde la concentración del antibiótico liberado es lo suficientemente alta como para inhibir el crecimiento bacteriano. Además, el diámetro de la zona de inhibición aumenta a medida que se incrementa el voltaje de anodizado, pasando de 31.22 mm a 32.8 mm para las muestras anodizadas de 10 V a 25 V, como se muestra en la parte inferior de la figura 24. Estos resultados respaldan lo discutido en la figura 17 (A y B), donde se menciona que un mayor voltaje de anodizado resulta en un mayor volumen de nanotubos formados en la superficie tratada. Finalmente, con base en el diámetro de la zona de inhibición, se puede afirmar que la cepa *S. aureus* es sensible al antibiótico liberado por las aleaciones cargadas [386]. Estos resultados corresponden al promedio obtenido de tres eventos independientes realizados por triplicado.



**Figura 24.** Determinación de las propiedades antibacterianas de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn cargadas y no cargadas con gentamicina sobre *S. aureus* por el método de antibiograma.

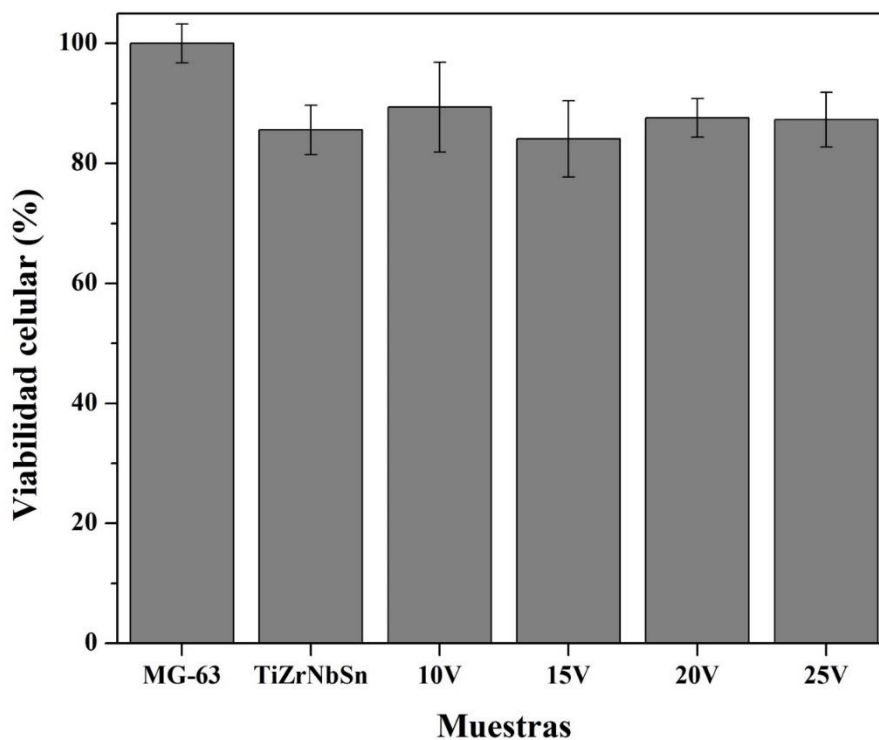
## **4.5. Pruebas de biocompatibilidad *in vitro***

Las pruebas de biocompatibilidad *in vitro* son métodos útiles para evaluar la interacción de los materiales con las células y tejidos. Entre las pruebas utilizadas en esta tesis se encuentran el ensayo de citotoxicidad celular por MTT y las pruebas de adhesión celular por Microscopía de fluorescencia. Estos ensayos nos permitieron medir la capacidad de las aleaciones de Ti-24Zr-10Nb-2Sn para favorecer o disminuir el crecimiento celular y observar la adhesión de las células a las superficies. Estas propiedades son importantes para el desarrollo de prótesis e implantes biomédicos ya que permiten una evaluación inicial de la biocompatibilidad antes de su uso en aplicaciones clínicas. Esto puede ayudar a identificar posibles problemas de biocompatibilidad y mejorar el diseño de aleaciones de titanio para que sean más compatibles con el cuerpo humano.

### **4.5.1. Actividad citotóxica de las aleaciones por el ensayo colorimétrico de MTT**

El ensayo de MTT es una técnica sencilla, rápida y sensible para evaluar la actividad citotóxica de las muestras en contacto con diferentes tipos de células, como los osteoblastos. Este ensayo nos permitió comparar el efecto de los diferentes tratamientos superficiales sobre la viabilidad celular y detectar posibles efectos adversos de las aleaciones sobre las células. En la figura 25 se muestra el gráfico que representa los porcentajes de viabilidad celular obtenidos a través del ensayo colorimétrico de MTT al evaluar las aleaciones de Ti-24Zr-10Nb-2Sn en la línea celular de osteoblastos MG-63. Los resultados obtenidos revelan que el control de la aleación de Ti-24Zr-10Nb-2Sn sin anodizar no mostró evidencia de citotoxicidad, con un porcentaje de viabilidad celular del 85%. Esto puede atribuirse a la formación natural de una capa de óxido en las superficies de las aleaciones de titanio [387]. Por otro lado, la muestra anodizada a 10 V demostró la mayor viabilidad celular, con un porcentaje del 90%, en comparación con los anodizados a 15 V, 20 V y 25 V, los cuales presentaron porcentajes de viabilidad celular de 84%, 88% y 87%, respectivamente. El porcentaje de viabilidad celular considerado seguro puede variar dependiendo del tipo de células y del propósito de la investigación o aplicación. En general, se considera que un porcentaje de viabilidad celular superior al 70% es aceptable para muchos tipos de células en estudios *in vitro* [239,388,389]. Con base en los resultados obtenidos, se puede mencionar que la formación de nanotubos en la superficie de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn mediante diferentes voltajes de anodizado no produce una

citotoxicidad significativa. La interacción de las células con superficies nanoestructuradas está determinada por diversos factores, como la topografía superficial, la energía superficial, la adsorción de proteínas, la conformación y la formación de puntos de adhesión. Se ha informado en la literatura que un aumento en el área superficial de las superficies nanoestructuradas puede aumentar la cantidad de proteínas adsorbidas en la superficie, lo que a su vez influye en la adhesión y proliferación celular [390–392]. Es importante destacar que la viabilidad celular puede verse afectada en los anodizados debido a diferencias fisicoquímicas, como la composición química o la estructura del óxido formado [102,129]. Además, diversos factores, como el tamaño, la forma, el espaciamiento y el grado de desorden de las nanoestructuras tienen una influencia significativa en el comportamiento celular [393,394]. Por lo tanto, es importante considerar estos parámetros al diseñar superficies nanoestructuradas para aplicaciones biomédicas, a fin de optimizar la interacción celular y mejorar la viabilidad celular en entornos *in vitro* e *in vivo*.



**Figura 25.** Actividad citotóxica de las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn sobre osteoblastos de la línea celular MG-63 mediante el ensayo colorimétrico de MTT.

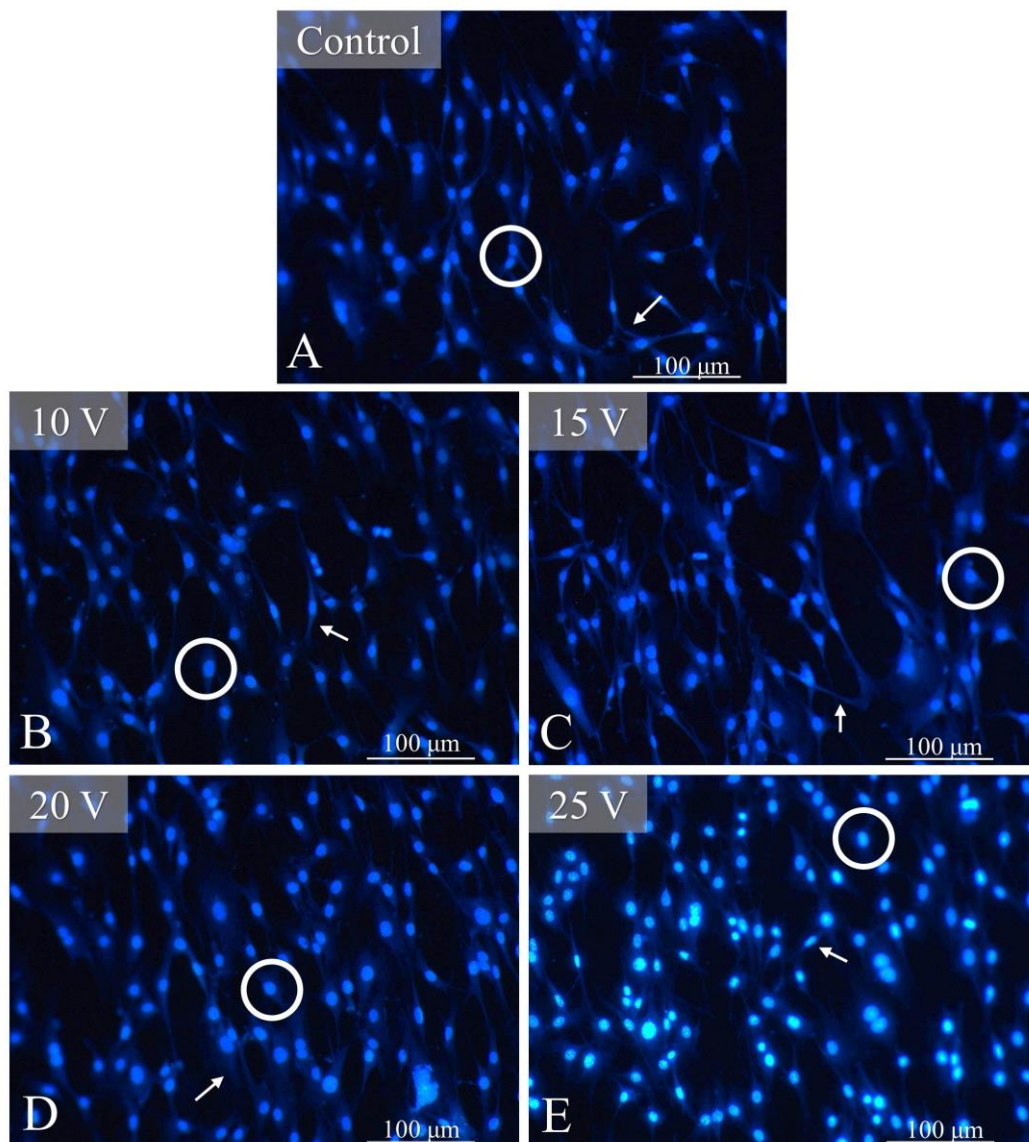


#### **4.5.2. Estudio de la adhesión de osteoblastos a las aleaciones mediante microscopía de fluorescencia**

El estudio de la adhesión de osteoblastos a las aleaciones anodizadas mediante microscopía de fluorescencia puede aportar información relevante para el diseño y la selección de aleaciones para aplicaciones biomédicas. En la figura 26 se presentan las imágenes de fluorescencia de osteoblastos MG-63 adheridos a las superficies de las aleaciones de Ti-24Zr-10Nb-2Sn. Para observar la adhesión de los osteoblastos, se utilizó el marcador fluorescente DAPI para teñir los núcleos celulares, el cual se une a la estructura del ADN de manera muy específica, por lo que su emisión de luz azul contrastante nos permitió una fácil visualización de las células presentes en las muestras [395–397]. En la figura 26 (A), se presenta una imagen en la que se observan los núcleos teñidos de las células adheridas a la superficie de la aleación control (señalados con un círculo de color blanco). Se puede apreciar que hay una gran cantidad de núcleos teñidos, cada uno correspondiente a una célula que se ha adherido a la superficie de la aleación. Es importante destacar que la adherencia celular es un fenómeno importante en diversas aplicaciones de materiales biomédicos, como implantes y prótesis. La capacidad de las células para adherirse a una superficie es crucial para la integración de los materiales en los tejidos del cuerpo y para el éxito a largo plazo de los dispositivos médicos implantados [77,241,398]. En este contexto, la observación de una gran cantidad de núcleos teñidos sobre la superficie de la aleación control es indicativo de que la aleación tiene una buena capacidad de adherencia celular. Esto sugiere que la aleación podría ser un buen material para su uso en aplicaciones biomédicas en las que se requiere una buena capacidad de integración tisular.

Esta tendencia también es observada por las aleaciones anodizadas. En la figura 26, se muestran los núcleos teñidos de células adheridas sobre la superficie de las aleaciones anodizadas a 10 V (B), 15 V (C), 20 V (D), 25 V (E) (señalados con círculos de color blanco). Se puede observar que los núcleos teñidos están distribuidos a lo largo de la superficie de los anodizados. Esta distribución sugiere que las células han logrado adherirse y extenderse de manera extensa sobre toda la superficie de las muestras anodizadas (señaladas con flechas de color blanco). Como ya lo analizamos en la sección 4.2, la superficie activa de estos anodizados tiene una estructura porosa de tamaño nanométrico, esto puede promover la unión de las células, dado que se ha documentado previamente que los elementos celulares de tamaño nanométrico pueden adherirse de manera sencilla a este tipo de superficies. La adhesión celular es un proceso importante en la regeneración y la reparación tisular. Los materiales que permiten una mejor

adhesión celular pueden mejorar la integración del material en el tejido y reducir el tiempo de regeneración ósea. En este sentido, los anodizados con superficie activa nanométrica pueden ser una opción interesante para aplicaciones biomédicas [20,242,337]. Por lo tanto, comprender y mejorar la adhesión de las células a las aleaciones de titanio es esencial para el desarrollo de materiales biomédicos más eficaces y duraderos.



**Figura 26.** Imágenes de fluorescencia de osteoblastos MG-63 adheridos a las superficies de Ti-24Zr-10Nb-2Sn. (A) Control, (B) 10 V, (C) 15 V, (D) 20 V, (E) 25 V.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### PARTE 2: Ti-407

#### 5.1. Introducción

En este capítulo, se exponen los resultados obtenidos para la aleación Ti-407, una superaleación de titanio de alta resistencia a la fatiga con posibles aplicaciones biomédicas. Se inicia el capítulo con el análisis de las curvas de corriente-tiempo, las cuales indican el crecimiento de nanotubos en la superficie de las aleaciones durante el proceso de anodización. A continuación, se presentan y discuten los resultados de la caracterización de la morfología y composición elemental de las aleaciones anodizadas de Ti-407 mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) con Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS). Esta caracterización proporcionó información sobre la forma, tamaño y distribución de los nanotubos, así como la identificación de los elementos químicos presentes en la capa de óxido. Además, se utilizó espectroscopía de fotoemisión de rayos X (XPS) para analizar el estado químico de los elementos en la superficie de los nanotubos. Posteriormente, se estudiaron los perfiles de liberación del antibiótico ceftriaxona en las aleaciones anodizadas. Para confirmar la incorporación del antibiótico en los nanotubos después del proceso de carga, se realizaron mediciones mediante espectroscopía infrarroja (FT-IR). Además, se evaluaron las propiedades antibacterianas de las muestras anodizadas mediante técnicas microbiológicas como espectrofotometría, recuento bacteriano en placa y antibiograma, utilizando las bacterias patógenas *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, que están asociadas a infecciones postoperatorias. Asimismo, se determinaron las propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas de las muestras anodizadas mediante mediciones de ángulo de contacto, con el objetivo de comprender su interacción en soluciones líquidas. A continuación, se presentan los resultados de las pruebas de biocompatibilidad *in vitro*, comenzando con la evaluación de la actividad citotóxica de las aleaciones anodizadas sobre células óseas mediante el ensayo colorimétrico de MTT. Además, se estudió la capacidad de adhesión de las células óseas a las aleaciones anodizadas utilizando microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de barrido, para analizar la interacción entre las células y las superficies nanoestructuradas. Por último, se describen y discuten los resultados obtenidos mediante la técnica de electrodeposición en las aleaciones anodizadas de Ti-407. Se caracterizaron los recubrimientos obtenidos mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y se evaluó la biocompatibilidad *in vitro* e *in vivo* de

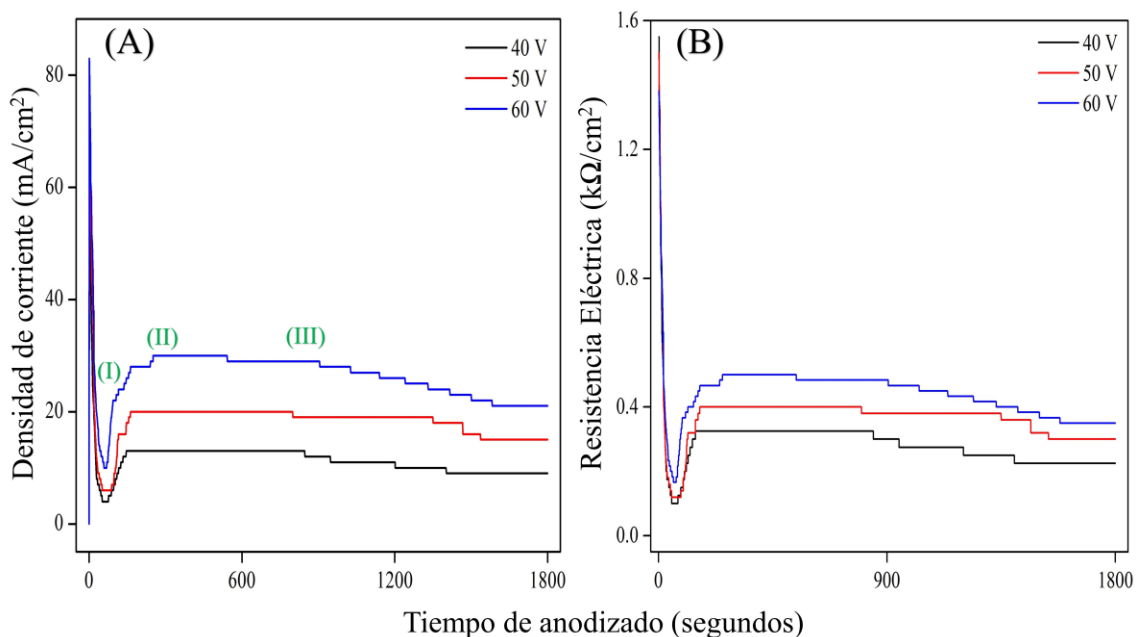
las muestras mediante el ensayo de citotoxicidad MTT y la implantación quirúrgica del material en modelos animales.

## **5.2. Síntesis y caracterización de nanotubos de titanio**

En esta tesis, la síntesis de nanotubos de titanio sobre la superficie de la aleación Ti-407 se realizó por medio de la técnica de anodizado. Durante la síntesis de nanotubos, se graficó la densidad de corriente-tiempo para monitorear la formación de los nanotubos sintetizados en la superficie de aleaciones, se estudió la morfología y las dimensiones de los nanotubos por medio de microscopia electrónica de barrido (SEM), mientras que el análisis químico elemental de la capa de óxido se realizó por Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS), además el estado químico de los elementos de la superficie de los nanotubos se caracterizó por espectroscopía de fotoemisión de rayos X (XPS). A continuación, se presentan y discuten los resultados obtenidos.

### **5.2.1. Análisis de las curvas de corriente-tiempo**

En la figura 27 (A), se presentan las curvas de densidad de corriente-tiempo registradas durante el proceso de anodización de la aleación Ti-407 a 40 V (línea de color negro), 50 V (línea de color rojo), 60 V (línea de color azul) en una solución electrolítica de glicerol +  $\text{NH}_4\text{F}$  a una concentración de 0.1 M + agua durante 30 minutos a 25°C. Los resultados obtenidos muestran que todas las aleaciones anodizadas presentaron las tres etapas que involucran la síntesis de los nanotubos (consultar sección 4.2.1). Durante la primera etapa (I) que comienza con la formación de la capa de óxido en la superficie debido al voltaje aplicado, se observa la máxima densidad de corriente alcanzada por los anodizados, a 40 V se obtuvo una densidad máxima de 62  $\text{mA}/\text{cm}^2$ , para 50 V la densidad máxima fue de 75  $\text{mA}/\text{cm}^2$ , mientras que, para 60 V la densidad máxima fue de 83  $\text{mA}/\text{cm}^2$ . Posteriormente en la figura 27 (A), se observa una caída repentina en la densidad de corriente. Los valores de la caída fueron menores a medida que disminuye el voltaje aplicado, a 40 V se observó una caída hasta aproximadamente 4  $\text{mA}/\text{cm}^2$ , a 50 V se observó una caída hasta aproximadamente 6  $\text{mA}/\text{cm}^2$ , mientras que, para 60 V la densidad de corriente cayó hasta aproximadamente 10  $\text{mA}/\text{cm}^2$ .



**Figura 27.** (A) la densidad de corriente eléctrica y (B) resistencia eléctrica durante el anodizado de la aleación Ti-407 a distintos voltajes.

Este fenómeno conocido como pasivación electroquímica se debe a que los iones de titanio presentes en la aleación reaccionan con el oxígeno que aporta el electrolito para formar un óxido denso e insoluble, la capa de óxido formada actúa como una barrera entre el material metálico y el electrolito, lo que disminuye la velocidad de reacción y reduce la corriente eléctrica que puede fluir a través del sistema [338,350,399]. Posteriormente, aproximadamente a los 140 segundos de anodizado comenzó la segunda etapa (II) donde hubo un ligero aumento en la corriente debido a una disminución en la resistencia de la capa de óxido a los defectos superficiales causados por la disolución continua de la capa óxido por la presencia y la migración del elemento flúor en la reacción gracias al campo aplicado. Esto conduce a la formación de poros que crecen principalmente debido a la acidificación causada por la disolución asistida por el campo eléctrico generado y la hidrólisis oxidativa del titanio en el fondo de los poros [132,148,400]. Los valores de la segunda etapa para cada uno de los anodizados se mantuvieron constantes a medida que avanzó el tiempo (800 segundos de anodizado), a 40 V la segunda etapa comenzó con un valor de 13 mA/cm<sup>2</sup>, por su parte, a 50 V la segunda etapa comenzó con un valor de 19 mA/cm<sup>2</sup>, mientras que, a 60 V la segunda etapa comenzó con un valor de 29 mA/cm<sup>2</sup>.

Un punto que remarcar es que los voltajes empleados para la aleación Ti-407, son más altos y el electrolito más denso en comparación a la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn, además la transición entre la etapa I y la II, es decir el paso entre la

formación de la capa de óxido primaria y densa al comienzo de la formación de los poros que dan forma a los nanotubos, es más clara, suave o lenta, tal y como se puede apreciar al comparar esta figura con la figura 12. Lo que indica que el empobrecimiento de titanio en la capa de óxido baja la resistencia a la formación de estos poros.

Finalmente, durante la tercera etapa (III) se alcanzó el estado de equilibrio entre la formación del óxido insoluble y la disolución química de la aleación que conduce a la formación de poros. Para el anodizado a 40 V el estado de equilibrio se alcanzó a una densidad de corriente de 8 mA/cm<sup>2</sup>, para 50 V fue de 15 mA/cm<sup>2</sup>, mientras que, para 60 V fue de 21 mA/cm<sup>2</sup>. En el transcurso esta etapa, los poros crecen generando estructuras nanotubulares, creando una competencia entre la formación del óxido en la interfaz titanio/capa de óxido y la disolución química en la interfaz capa de óxido/electrolito, asistido por campo eléctrico aplicado y el tiempo de reacción a 1800 segundos [320–327].

La densidad de corriente durante los procesos electroquímicos es proporcional a la movilidad iónica, lo que significa que a medida que la movilidad iónica aumenta, también lo hace la densidad de corriente. Esto implica que una mayor movilidad iónica permite un mayor flujo de corriente eléctrica. En general, en cada una de las muestras anodizadas, es evidente que la densidad de corriente se incrementa a medida que aumenta el voltaje. Tal como se mencionó previamente, este fenómeno ocurre durante el proceso de formación de la capa de óxido compacta y su posterior caída de corriente que se estabiliza entre 8 y 21 mA/cm<sup>2</sup> lo que indica la formación y el crecimiento de nanotubos [328]. Al comparar ahora las densidades de corrientes entre la aleación Ti-407, estas son más bajas en comparación con las aleaciones Ti-24Zr-10Nb-2Sn, incluso con voltajes más elevados. Lo que sugiere es que, con menores voltajes, es más fácil obtener iones de Zr, Nb o Sn que de Ti, lo que refuerza la explicación de la estabilidad de la capa del óxido de Ti. Además del cambio en la densidad de corriente, se espera que haya una modificación en la morfología como resultado del potencial aplicado. Esta cuestión será abordada y analizada en la siguiente sección, 5.2.2.

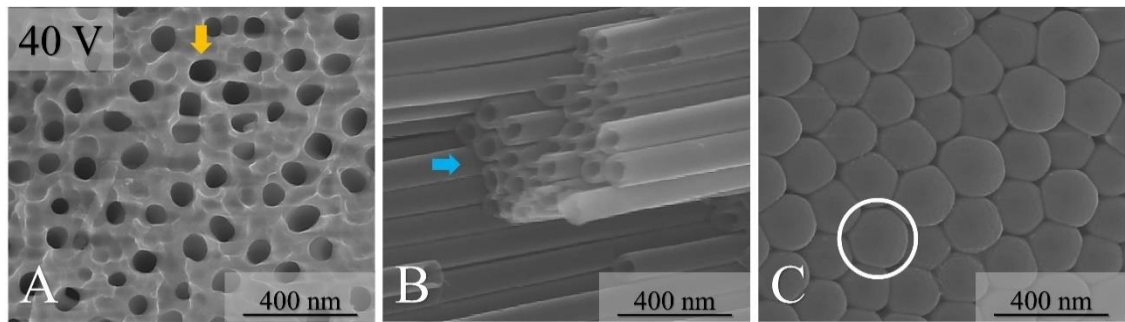
El mismo comportamiento se ha reportado previamente para nanoestructuras formadas en otras aleaciones de titanio [329–331]. Esta formación está correlacionada con una disminución de la corriente eléctrica, y se asocia con un aumento de la longitud de difusión dentro de los nanotubos en crecimiento. La figura 27 (B), muestra el comportamiento de la resistencia eléctrica en función del tiempo para cada una de las muestras anodizadas, que se calculó de acuerdo con la ley de Ohm. Si se aumenta el voltaje aplicado, la resistencia eléctrica también crece. Esto se atribuye a un aumento en el espesor de la capa de óxido cuando el voltaje aplicado aumenta [332]. Además, se necesita más tiempo para

lograr la estabilización del sistema a medida que aumenta el voltaje aplicado, lo que también sugiere que se desarrolla una capa de óxido más compleja y grande. Por lo que el control del tiempo durante la anodización es importante para controlar las dimensiones de la capa de nanotubos que se forman durante el proceso [254,333]. Además, la concentración de iones fluoruro es clave en la formación de nanotubos de dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) mediante anodización electroquímica. El fluoruro ayuda a disolver el óxido de titanio en la superficie del metal, lo que permite la formación de poros y posteriormente la síntesis de nanotubos [150,334].

### **5.2.2. Caracterización de la morfología y composición elemental por SEM-EDS**

La figura 28, 29 y 30 muestran imágenes por SEM de las estructuras sintetizadas por anodizado sobre la superficie de Ti-407 a 40, 50 y 60 V. Es importante destacar que todas las muestras anodizadas presentaron morfologías similares. A continuación, se describen las características de cada una de ellas:

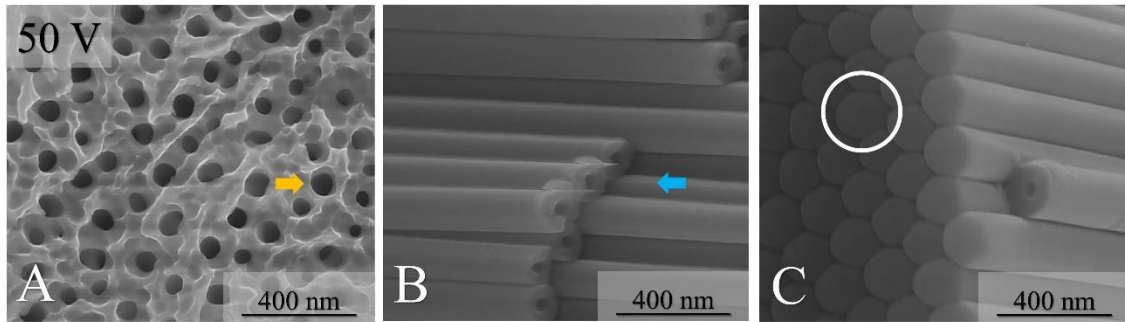
En las figuras 28 (A), 29 (A) y 30 (A) se presentan las vistas superiores de las estructuras formadas mediante el proceso de anodizado a 40, 50 y 60 V, respectivamente. Se puede observar una capa de óxido compacta con poros abiertos, que sugieren la formación de nanotubos sobre la superficie (señalados con una flecha de color amarillo). Cuando se aplicó el campo eléctrico (40, 50 y 60 V), los iones ( $\text{O}^{2-}$ ) presentes en el electrolito (glicerol +  $\text{NH}_4\text{F}$  [0.1 M] + agua) migraron hacia la superficie de la aleación Ti-407, estos iones se acumularon en la superficie y reaccionaron con el titanio, formando así una capa de óxido. Este mecanismo electroquímico conocido como oxidación asistida por campo eléctrico resulta en el crecimiento controlado de una capa de óxido en la superficie del titanio, tal como se puede apreciar en las figuras mencionadas anteriormente [132,401,402].



**Figura 28.** Vista superior (A), transversal (B) y posterior (C) de nanotubos sintetizados sobre la superficie de la aleación Ti-407 a 40 V durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Los poros observados (señalados con una flecha de color amarillo), se formaron debido a la disolución continua de la capa de óxido provocada por la presencia y migración de iones fluoruro ( $F^-$ ) en la reacción de anodizado. Los iones fluoruros presentes en el electrolito (glicerol +  $NH_4F$  [0.1 M] + agua) penetran y disuelven parte de la capa de óxido, creando defectos superficiales (huecos). A medida que se disuelve la capa de óxido, se forma una solución ácida dentro de los poros, generando una acidificación en la solución. Esta acidificación ocurre porque el óxido se disuelve en el electrolito, liberando iones ( $Ti^{+4}$ ) ( $H^+$ ) y generando un entorno ácido. El titanio en el fondo de los poros reacciona con el agua ( $H_2O$ ) presente en el electrolito, lo que se conoce como hidrólisis oxidativa. Esta reacción produce la formación de compuestos oxidativos como  $TiO_2$ ,  $Ti(OH)_4$  y  $Ti(H_2O)$  que contribuyen al proceso de agrandamiento de los poros. Estos procesos permitieron que los poros crecieran a medida que se disolvía más óxido de la capa [132,343,403]. Es importante mencionar que mientras ocurre este proceso se sigue formando más capa de óxido durante la reacción de anodizado. Adicionalmente, el campo eléctrico aplicado (40, 50 y 60 V) durante el proceso de anodizado también contribuye al crecimiento de los poros. Este campo eléctrico impulsa los iones presentes en el electrolito hacia la superficie del titanio, lo que acelera la formación y el agrandamiento de los poros. La aplicación de un voltaje más alto durante el anodizado provoca un campo eléctrico más intenso, generando poros más grandes, ya que un campo eléctrico más intenso ejercerá una fuerza mayor sobre los iones presentes en el electrolito, impulsándolos con más fuerza hacia la superficie del titanio. Esto puede facilitar la disolución del óxido existente y contribuir al proceso de crecimiento y agrandamiento de los poros [404–406].

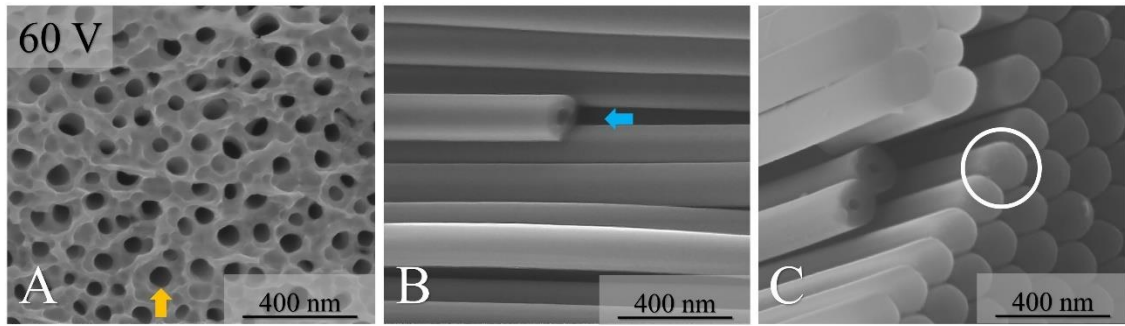




**Figura 29.** Vista superior (A), transversal (B) y posterior (C) de nanotubos sintetizados sobre la superficie de la aleación Ti-407 a 50 V durante 30 minutos a temperatura ambiente.

También es importante mencionar que no se observan óxidos residuales bajo estas condiciones de anodizado lo que significa que se realizó un proceso de anodizado completo. Se ha reportado que en un proceso de anodizado exitoso, la capa de óxido debe ser uniforme, densa y completa, sin la presencia de óxidos residuales [407,408]. En algunas aplicaciones específicas, como la liberación de fármacos, los óxidos residuales en el anodizado de titanio podrían interferir significativamente en la capacidad de carga y liberación. Los óxidos residuales podrían actuar como barreras físicas o químicas que dificultaría la carga de los fármacos en la estructura nanotubular además de que podrían quedar retenidos en la superficie y no ingresar en el interior de los nanotubos [365,409,410]. Los óxidos residuales también podrían generar capas de óxidos irregulares, que afectarían la eficacia, la difusión y uniformidad de la liberación de los fármacos. Con base en lo anterior, las capas de óxido obtenidas mediante estas condiciones de anodizado podrían garantizar una liberación de antibióticos controlada y consistente. La liberación de antibióticos a partir de estas aleaciones anodizadas de Ti-407 serán discutidas en la sección 5.4 de esta tesis.

Tradicionalmente, el titanio se anodizaba en soluciones basadas en electrolitos acuosos, sin embargo, se ha reportado que las capas de óxido obtenidas eran de bajo orden, delgadas y con defectos. En electrolitos acuosos, se pueden obtener nanotubos con paredes irregulares y rugosas (ver sección 4.2.2 de esta tesis) que podrían estar débilmente adheridos a la superficie a medida que aumenta el voltaje de anodizado, mientras que, en electrolitos más viscosos, se pueden sintetizar nanotubos de paredes lisas con longitudes de varios micrómetros fuertemente adheridos a la superficie [132,148].



**Figura 30.** Vista superior (A), transversal (B) y posterior (C) de nanotubos sintetizados sobre la superficie de la aleación Ti-407 a 60 V durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Se han reportado diversas condiciones experimentales basados en la composición del electrolito para el anodizado de titanio, una de las propiedades que marcan una diferencia significativa es la relación de aspecto, que se refiere a la relación entre la longitud y el diámetro de los nanotubos (ver figura 31). En electrolitos acuosos se han reportado síntesis de nanotubos con relaciones de aspecto de 3.5 [411], mientras que en electrolitos base etilenglicol se han fabricado nanotubos con relación de aspecto de hasta 32 [412], por su parte en electrolitos base glicerina como el utilizado en esta tesis (glicerol +  $\text{NH}_4\text{F}$  [0.1 M] + agua) se han reportado que pueden alcanzar una relación de aspecto de hasta 150 [413]. Con base en lo anterior, la viscosidad del electrolito tiene una influencia significativa en el proceso de anodización y las capas de óxidos resultantes. La glicerina tiene una alta viscosidad de 1500-2000 centipoises a 25 °C, mientras que el agua tiene alrededor de 1 centipoise a la misma temperatura [414,415]. La viscosidad del electrolito es inversamente proporcional a la movilidad iónica y la conductividad eléctrica del electrolito. Esto significa que a medida que la viscosidad del electrolito aumenta, la movilidad iónica y la conductividad eléctrica disminuye, y viceversa [413,416]. En el caso de la anodización de nuestras aleaciones de Ti-407, el cambio en la composición del electrolito tiene una influencia significativa en la morfología de los nanotubos. Gracias al cambio del electrolito fue posible fabricar estructuras de óxido nanotubulares con una gran relación de aspecto en la aleación de Ti-407 que, aumentó desde 45.2 (promedio de la relación de aspecto) obtenidos en electrolito acuoso de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn (ver figura 16) hasta una relación de aspecto promedio de 127.3 usando glicerol como solución base del electrolito (ver recuadro figura 31). La descripción de la importancia de la relación de aspecto en la aleación de Ti-407 fue descrita más adelante en esta sección de la tesis. En las figuras 28 (B), 29

(B) y 30 (B) se presentan las vistas en sección transversal de las estructuras formadas mediante el proceso de anodizado a 40, 50 y 60 V, respectivamente.

Se puede apreciar una estructura cilíndrica hueca bien definida de pared simple, (señalada con una flecha de color azul), lo que confirma la formación de nanotubos sobre la superficie de la aleación de Ti-407. Se ha reportado que, los nanotubos de titanio de pared simple son extremadamente ligeros debido a su estructura hueca. A pesar de su baja densidad, tienen una resistencia mecánica excepcionalmente alta, lo que los convierte en materiales ideales para aplicaciones en las que se requiere una alta relación resistencia-peso [417,418]. Es importante destacar que la elección de las características de los nanotubos dependerá de la aplicación específica y de los objetivos deseados. En aplicaciones como la entrega de fármacos (ver sección 5.3), se pueden requerir longitudes específicas para optimizar la carga y liberación de medicamentos [419–421], mientras que en aplicaciones como la ingeniería de tejidos (ver sección 5.6.2), la longitud de los nanotubos puede ser ajustada para proporcionar un soporte estructural adecuado y promover el crecimiento, la adhesión y migración celular [16,17,21,252]. Con base en lo anterior, la longitud de los nanotubos es una variable de diseño importante que debe ser considerada en función de los requisitos específicos de la aplicación y los objetivos deseados.

La longitud de los nanotubos formados en la aleación Ti-407 durante el proceso de anodizado está directamente relacionada con el potencial aplicado (40, 50 y 60 V). Cuando se aplica un bajo voltaje durante el anodizado, la velocidad de formación en la base de los nanotubos y la velocidad de disolución en la parte superior son más lentas. El bajo voltaje implica un campo eléctrico más débil, lo que resulta en una migración más lenta de iones hacia la superficie del titanio. Esto puede resultar en una longitud reducida de los nanotubos [335,422]. Por otro lado, cuando se aplica un alto voltaje durante el anodizado, la velocidad de formación en la base de los nanotubos y la velocidad de disolución en la parte superior pueden aumentar significativamente. El alto voltaje implica un campo eléctrico más intenso, lo que acelera la migración de iones hacia la superficie del titanio. Como resultado, la velocidad de crecimiento de los nanotubos aumenta, y esto puede llevar a una mayor longitud de estos. Además, un voltaje más alto también puede acelerar la disolución del óxido en la parte superior de los nanotubos. Esto se debe a que la concentración de iones en la solución ácida es mayor y la tasa de disolución es más rápida [336,423]. Esto concuerda con los resultados obtenidos, donde las dimensiones de los nanotubos obtenidos son dependientes del voltaje aplicado (ver figura 31). En las figuras 28 (C), 29 (C) y 30 (C) se presentan las vistas posteriores (obtenidas mediante un desbaste controlado para el desprendimiento de la capa de óxido) de las estructuras formadas mediante el proceso de anodizado a 40, 50 y 60 V, respectivamente.

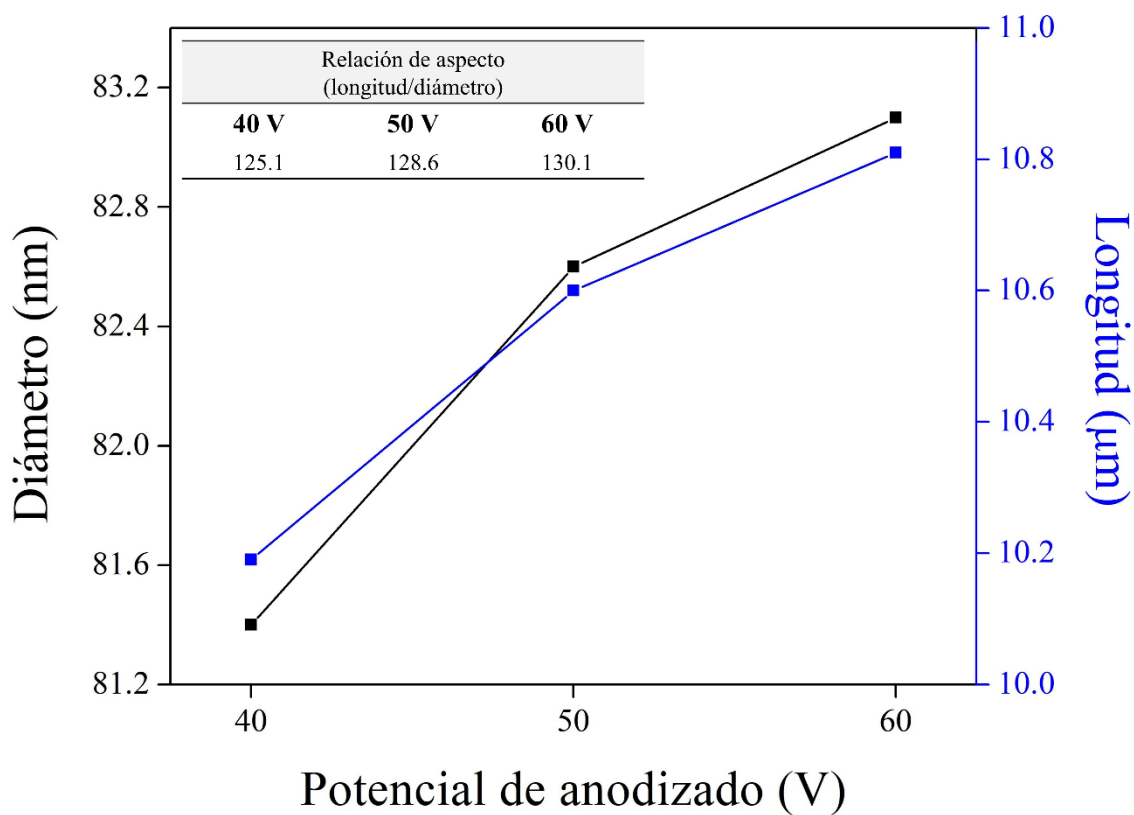
Se puede apreciar una estructura cilíndrica cerrada bien definida de pared simple, (señalada con un círculo de color blanco), lo que confirma la formación de nanotubos cerrados en la parte posterior de los nanotubos de Ti-407. El mecanismo de cierre de la parte posterior de los nanotubos en aleaciones de titanio no está completamente elucidado y puede depender de diversos factores. Sin embargo, se han propuesto diferentes modelos para explicar cómo ocurre el cierre de la parte posterior de los nanotubos. El modelo de autosellado sugiere que, durante la anodización, los iones ( $O^-$ ) presentes en la solución electrolítica se difunden hacia el interior de los nanotubos. Estos iones oxidan el titanio en la base de los nanotubos, lo que provoca la formación de una capa de óxido de titanio que cierra la parte posterior [422,424]. Por su parte el modelo de migración de iones sugiere que, durante la anodización, los iones metálicos presentes en la solución electrolítica, por ejemplo: ( $Al^{+3}$ ), ( $V^{+3}$ ) o ( $V^{+4}$ ) migran hacia la base de los nanotubos de titanio por efecto del campo eléctrico aplicado durante el proceso de anodización. Estos iones metálicos reaccionan con los átomos de titanio en la base de los nanotubos, formando así una capa de óxido de titanio que sella la parte posterior [425,426]. Se ha reportado que los nanotubos cerrados en la parte posterior pueden ser utilizados como sistemas de carga y liberación de fármacos. Debido a su estructura tubular, los nanotubos pueden ser útiles para contener fármacos en su interior. La parte posterior cerrada de los nanotubos asegura que los fármacos se mantengan dentro del nanotubo, evitando fugas o liberación anticipada [427–430]. Como podemos darnos cuenta, la estructura y morfología de las capas de nanotubos pueden ser modificadas por los parámetros electroquímicos [325,336,337]. En este caso particular, se observa que, al aumentar el voltaje de anodización de 40 a 60 V, se produce un incremento en las dimensiones y configuración de los nanotubos. Como se puede apreciar en la figura 31, un aumento en el voltaje de anodización conlleva un aumento en el tamaño del poro y la longitud de los nanotubos. Esto se debe a que la fuerza impulsora para el transporte iónico a través de la capa de óxido en el fondo del poro se incrementa, lo que resulta en una migración más rápida de los iones de oxígeno-fluoruro. En consecuencia, las dimensiones de los nanotubos aumentan [132,338,339]. Posteriormente, en este proyecto de investigación, se llevó a cabo la caracterización de la composición química de las muestras anodizadas de Ti-407 mediante el uso de la técnica de energía dispersiva de rayos X (EDS). Como se puede observar en la Tabla 4, los análisis en distintas posiciones de la capa de nanotubos, revelando que cada muestra estaba compuesta mayormente por los elementos Ti, Al, V, O y F. La anodización resultó en la adición de los elementos O y F, lo que provocó modificaciones en los porcentajes de los elementos originales. Con el aumento del porcentaje de O, el porcentaje del elemento V en todos los anodizados no fue detectado, además se presentó una disminución en la concentración de elemento aluminio.

La reducción en el porcentaje atómico de dichos elementos puede atribuirse a la resolución de la técnica EDS, lo que limita la capacidad de detectar diferencias discretas en la composición elemental, Sin embargo, para llevar a cabo una caracterización más completa de la composición elemental empleamos la espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS), lo que nos permitió la identificación precisa de los elementos presentes en la superficie de las muestras y el análisis de los estados de oxidación de los elementos (ver sección 5.2.3). La presencia de elemento flúor varía entre las capas anódicas después de 30 minutos de reacción. Los nanotubos formados a 40, 50 y 60 V contenían entre 2.34, 2.37 y 2.41 (at%) de flúor respectivamente. Podemos observar que, el contenido de flúor tiene poca variación a pesar de que las características de los nanotubos son diferentes. Se ha observado que el flúor se incorpora principalmente en la región porosa de los nanotubos, lo que implica que la variación en la concentración de flúor depende del lugar de análisis y las condiciones de anodización [136,347]. El estudio de la cantidad de flúor presente en las aleaciones anodizadas es de gran interés, dado que se ha asociado con propiedades antibacterianas. Además, se ha informado que la presencia de flúor no tiene efectos significativos en la respuesta celular en comparación con las aleaciones sin anodizar [136]. En la sección 5.5 de este capítulo veremos la relevancia del contenido de flúor en las propiedades antibacterianas de estas aleaciones.

**Tabla 4.** Análisis de la composición elemental mediante la técnica de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS) en los nanotubos generados en la superficie de la aleación Ti-407, utilizando diferentes voltajes de anodización

Muestra	Concentraciones atómicas (at. %)				
	Ti	Al	V	O	F
Control	84.1	0.80	4.2	10.5	-
40 V	70.2	0.53	-	26.3	2.34
50 V	69.6	0.40	-	27.4	2.37
60V	69.3	0.38	-	27.6	2.41

Una vez caracterizada la morfología y composición de las aleaciones anodizadas de Ti-407 se procedió a realizar el análisis de las dimensiones de los nanotubos obtenidos a diferentes voltajes. La relación entre diámetro (línea negra) y la longitud (línea azul) en función del potencial de anodización se presenta en la figura 31. Se puede observar una dependencia lineal positiva para cada una de las muestras anodizadas. Estos resultados demuestran cómo las dimensiones de los nanotubos formados pueden verse afectadas por condiciones electroquímicas [348].



**Figura 31.** Influencia del potencial anodizado en el crecimiento de estructuras nanotubulares: Relación de la longitud de los nanotubos (línea azul) y diámetros (línea negra). Recuadro: relación de aspecto de los nanotubos de Ti-407.

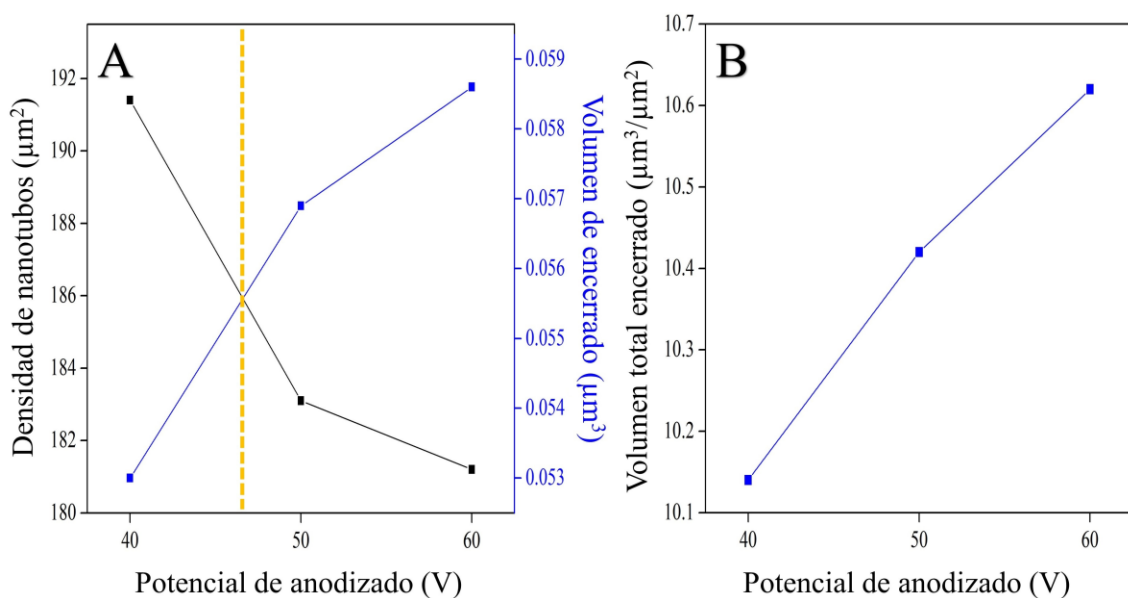
El diámetro medio de los nanotubos aumentó de 81.4 nm (40 V) a 83.1 nm (60 V) por lo que la tasa de crecimiento del diámetro fue de 0.085 nm/V, mientras que la longitud media de los nanotubos aumentó de 10,190 nm (40 V) a 10,810 nm (60 V) por lo que la velocidad de crecimiento de la longitud fue de 31 nm/V,

valores que se aproximan a los parámetros de la constante de crecimiento de óxidos de titanio reportada en la literatura para aleaciones de titanio puro [431–433]. Un factor importante por considerar es la relación de aspecto de las dimensiones de los nanotubos (ver recuadro en la figura 31), la relación de aspecto se refiere a la proporción entre la longitud y el diámetro de los nanotubos, se calcula a partir de la siguiente fórmula:  $RA = L / D$  y es importante debido a su influencia en las propiedades físicas, químicas, mecánicas y de transporte de moléculas. Una relación de aspecto alta puede resultar en una mayor área superficial, lo que se relaciona con la capacidad de adsorción y absorción de moléculas en los nanotubos, la relación de aspecto promedio obtenida para todas las muestras mediante este proceso de anodizado es de 127.9, considerada una relación de aspecto alta. Esta relación puede ser ajustada y controlada mediante la optimización de las condiciones de anodización y la composición del electrolito, lo que permite adaptar las dimensiones de los nanotubos según las necesidades específicas de las aplicaciones médicas [336,343,350,351].

Otro factor importante por determinar en este tipo de superficies debe ser la densidad de los nanotubos por unidad de área. Con los datos anteriores y las imágenes de SEM, fue posible determinar una densidad de nanotubos por unidad de área. Como podemos ver en la figura 32 (A) (puntos de color negro) existe una tendencia de disminución de la densidad a medida que aumenta el voltaje de anodizado, esta disminución se debe a que, con un mayor potencial, los nanotubos de óxido de titanio crecen en diámetro y longitud. Como resultado, la capa de óxido se vuelve más porosa y, por lo tanto, menos densa. Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, el volumen encerrado de los nanotubos se calculó utilizando el promedio del diámetro interno, de la longitud y la densidad de los nanotubos aplicando la siguiente fórmula:  $V = \pi * r^2 * alt$

En la figura 32 (A), los puntos azules representan el volumen encerrado de los nanotubos de Ti-407. Se observó una relación positiva con el potencial aplicado. Como ya se mencionó en la sección 4.2.2, estos resultados son importantes para diseñar una arquitectura deseada de nanotubos ajustando el voltaje aplicado en el proceso de anodización, ya que el volumen encerrado está relacionado con la cantidad de liberación de antibióticos, mientras que la densidad está relacionada con una liberación más uniforme [352–354]. Por lo tanto, la arquitectura óptima se puede seleccionar como una función de estos dos parámetros (la cantidad de antibiótico y la uniformidad), y el mejor compromiso tiene lugar en la intersección (línea de color amarillo) de ambas líneas en torno a 47 V, como se muestra en la figura 32 (A). Por otro lado, para las aleaciones anodizadas de Ti-407 también se

calculó el volumen total encerrado por unidad de área, este volumen fue obtenido de la multiplicación de ambos datos de la figura 32 (A), es decir de la densidad de nanotubos por el volumen encerrado promedio de un solo nanotubo. En la figura 32 (B) podemos ver que, a medida que aumenta el voltaje de anodizado durante el proceso de fabricación de los nanotubos, el volumen total encerrado también aumenta. Esto significa que las aleaciones anodizadas a 60 V podrían liberar una mayor cantidad de antibióticos en comparación con los anodizados a voltajes más bajos. Como ya se mencionó en la sección 4.2.2, este volumen total encerrado tiene una influencia directa en la velocidad y duración de la liberación de los antibióticos, ya que, si hay más espacio dentro de los nanotubos, los antibióticos tendrán más espacio para difundirse desde el interior y liberarse gradualmente con el tiempo. Por lo tanto, la geometría de los nanotubos es un factor crucial al diseñar sistemas de liberación de antibióticos. Es decir, si el interés es solo aumentar el volumen a suministrar sin tomar en cuenta la uniformidad, entonces el parámetro a seleccionar es el volumen total encerrado. En la sección 5.3 de este capítulo veremos el perfil de liberación del antibiótico ceftriaxona a partir de las aleaciones anodizadas de Ti-407.

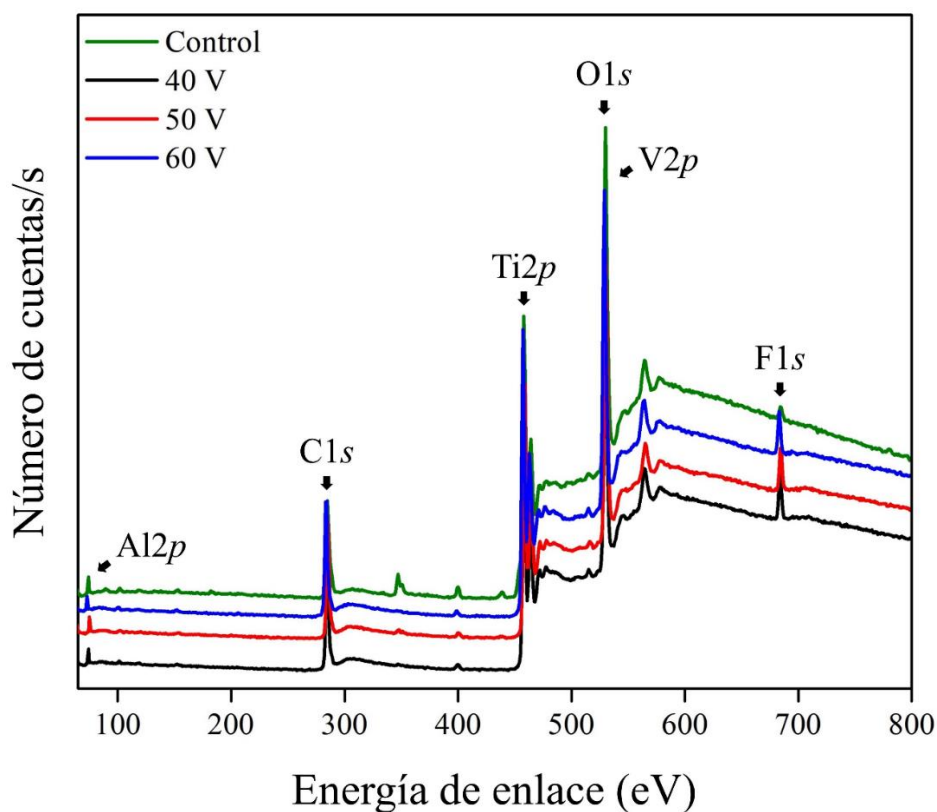


**Figura 32.** Influencia del potencial anodizado en el crecimiento de estructuras nanotubulares en Ti-407: (A) Relación de la densidad de los nanotubos (línea negra) y volumen encerrado de los nanotubos (línea azul), (B) volumen total encerrado por unidad de área.



### 5.2.3. Caracterización superficial por Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

La caracterización superficial por XPS de los nanotubos de la aleación Ti-407 permitió conocer la composición química y el estado de oxidación de los átomos presentes en la superficie de los nanotubos, así como la presencia de posibles impurezas o contaminantes. Estos datos fueron relevantes para comprender las propiedades de los nanotubos de titanio bajo diferentes condiciones de anodizado y con esta información optimizar su síntesis y funcionalización superficial. Para conocer la composición química superficial de los diferentes sustratos, se realizó la caracterización por XPS. La figura 33 muestra los espectros XPS de la aleación control de Ti-407 (línea verde) y de las aleaciones anodizadas a 40, 50 y 60 (línea negra, roja y azul respectivamente). En todos los casos, los espectros del estudio indican la presencia de elementos Ti, Al, V, O, F y C señalados con una flecha negra.



**Figura 33.** Espectros XPS para la superficie de aleación Ti-407 después de la anodización por 30 minutos a 40, 50 y 60 V.

Para una mejor distinción de los picos en el espectro, en la figura 34 se presentan los espectros XPS de alta resolución de la aleación control de Ti-407 (línea verde) y de las aleaciones anodizadas a 40, 50 y 60 (línea negra, roja y azul respectivamente), lo que nos proporcionó información más detallada sobre los elementos presentes en las muestras y sus estados de oxidación.

En la figura 34 (A), los estados de valencia del titanio en la aleación control fueron determinados por los picos  $Ti2p_{3/2}$  y  $Ti2p_{1/2}$  a 458.3 y 464.1 eV, respectivamente, con una división de 5.8 eV típica de  $Ti^{4+}$  en dióxido de titanio [330,358,359]. Los estados de valencia del titanio en las aleaciones anodizadas también fueron determinados por los picos  $Ti2p_{3/2}$  y  $Ti2p_{1/2}$ . Los anodizados a 40 y 50 V presentaron los picos a 458.6 y 464.4 eV, con una división típica de 5.8 eV de enlaces  $Ti^{4+}$ -O en  $TiO_2$  [434–436]. Mientras que, el anodizado a 60 V presentó los picos a 458.1 y 463.9 eV con una división de 5.7 eV asociado a enlaces  $Ti^{4+}$ -O en  $TiO_2$  o  $Ti^{3+}$  en una película de dióxido de titanio [437,438].

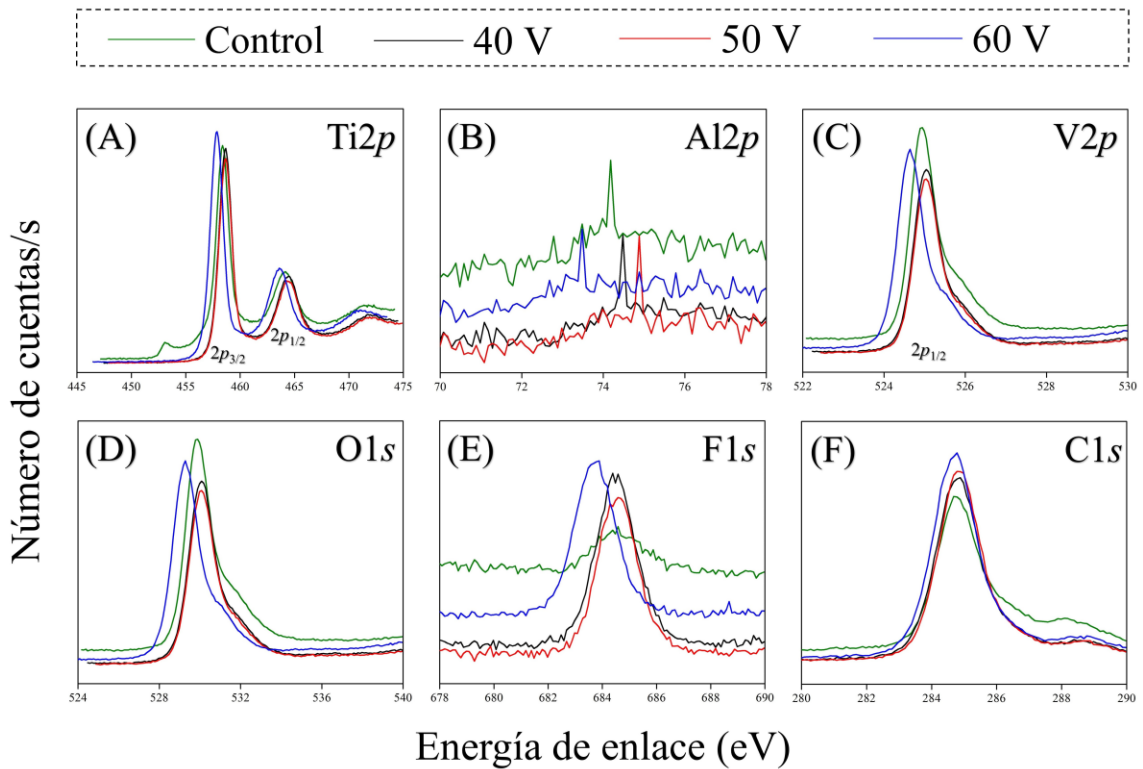
En la figura 34 (B), los espectros de fotoemisión del aluminio en las aleaciones de Ti-407 fueron determinados por los picos  $Al2p$ . La aleación control de Ti-407 muestra una energía de enlace de 74.1 eV, mientras que los anodizados a 40 y 50 presentaron energías de enlace de 74.4 y 74.8 eV estos valores son específicos de óxidos de aluminio presentes en las superficies de las muestras [439–441]. Por su parte, el anodizado a 60 V presentó una energía de enlace de 73.4 eV asociado a sub-óxidos de aluminio, compuestos que contienen aluminio y oxígeno, con una fórmula química de  $Al_2O_x$ , donde x es menor a 3 [442–445].

En la figura 34 (C), los espectros de fotoemisión del vanadio en las aleaciones de Ti-407 fueron determinados por los picos  $V2p_{1/2}$ . La aleación control de Ti-407 presentó una energía de enlace de 524.8 eV, mientras que los anodizados de 40 y 50 presentaron la misma energía de enlace de 525.04 eV. Por su parte, el anodizado a 60 V presentó una energía de enlace de 524.2 eV. En todos los casos, la energía de enlace asociada a estas muestras se relaciona con la energía de enlaces de óxidos de vanadio II (VO) y IV ( $VO_2$ ) presentes en la superficie de las muestras [446–450].

En la figura 34 (D), los espectros de fotoemisión del oxígeno en las aleaciones de Ti-407 fueron determinados por los picos  $O1s$ . La aleación control de Ti-407 muestra una energía de enlace de 529.8 eV, mientras que los anodizados de 40 y 50 presentaron la misma energía de enlace de 530.07 eV. Por su parte, el anodizado a 60 V presentó una energía de enlace de 529.2 eV. En todos los casos, la energía de enlace asociada a estas muestras se relaciona con la presencia de óxidos metálicos en la superficie de las muestras [451–453].

En la figura 34 (E), los espectros de fotoemisión del flúor en las aleaciones de Ti-407 fueron determinados por los picos F1s. La aleación control de Ti-407 y los anodizados a 40 y 50 V muestran una energía de enlace de 684.5 eV, sin embargo, la intensidad del pico en la aleación control (no anodizada) es más baja en comparación con las muestras anodizadas, lo que indica una baja concentración del elemento [454–456], la presencia del elemento flúor en esta muestra no anodizada se puede atribuir a la incorporación del elemento a la superficie como consecuencia del proceso de decapado con ácido fluorhídrico [376,457]. Por su parte la alta intensidad de los picos en las aleaciones anodizadas de 40 y 50 V sugiere que el flúor se encuentra en un estado químico en forma de fluoruros metálicos y físicamente adsorbido en la superficie como parte del proceso de anodizado [358,458–460]. Por su parte, el anodizado a 60 V presentó una energía de enlace de 683.8 eV, el desplazamiento del pico (línea azul de la figura 34 E) con una variación de 0.7 eV con respecto a las muestras anteriores puede indicar alteraciones en el entorno químico en el que se encuentra el elemento flúor. Cambios en los enlaces químicos de los fluoruros metálicos pueden alterar la distribución electrónica, lo cual modifica la energía necesaria para liberar los electrones de valencia, además la presencia de elementos vecinos en la aleación con diferentes estados de oxidación o diferentes afinidades electrónicas pueden inducir interacciones electrónicas que afectan la energía de enlace, desplazando el pico del elemento flúor en el espectro [459,461,462].

En la figura 34 (F), los espectros de fotoemisión del elemento carbono en las aleaciones de Ti-407 fueron determinados por los picos C1s. La aleación control de Ti-407 y los anodizados a 40, 50 y 60 V muestran una energía de enlace de 284.8 eV. El pico C1s se utilizó como referencia interna para realizar las correcciones de potencia tras la calibración inicial, esto debido a que la energía de enlace para el elemento carbono en su estado químico C-C es constante y está bien definida ~284.8 eV [463–465]. Con base en lo anterior, la escala de energía de los picos medidos se ajustó para una mayor precisión en la determinación de las energías de enlace de los otros elementos de interés en las muestras de Ti-407.



**Figura 34.** Espectros XPS de alta resolución para (A) Ti2p, (B) Al2p, (C) V2p, (D) O1s, (E) F1s, y (F) C1s para la superficie de aleación Ti-407 después de la anodización por 30 minutos a 40, 50 y 60 V.

En resumen, las principales diferencias entre las muestras de Ti-407 se observan en los estados de valencia y las composiciones químicas superficiales de los elementos que varían dependiendo de los diferentes voltajes aplicados durante el proceso de anodizado. El titanio es el elemento principal en la aleación Ti-407 y su estado de valencia cambió en función de las condiciones de anodizado, durante este proceso se formaron óxidos con estados de valencia +3 y +4, dependiendo del voltaje utilizado. Además del titanio, los elementos presentes en la aleación Ti-407, como el aluminio y el vanadio, también experimentaron cambios en sus estados de valencia durante el anodizado. Estos cambios podrían influir en las propiedades químicas y físicas de los óxidos de las aleaciones anodizadas. En cuanto al oxígeno y el flúor, su presencia en la superficie de las aleaciones está relacionada con la formación de óxidos y fluoruros durante el anodizado. El oxígeno puede combinarse con el titanio y los otros elementos para formar óxidos, mientras que el flúor puede formar fluoruros

metálicos, la presencia de iones fluoruro se asocia con la formación de nanotubos mediante anodización electroquímica. Con base en lo anterior, el crecimiento de nanotubos en este tipo de aleaciones puede ser influenciada por otros factores como la temperatura, el tiempo, la concentración de electrolito y la presencia de otros iones en la solución, por lo que es importante controlar estos parámetros ya que podrían afectar significativamente la calidad y las propiedades de la capa de óxido. Si alguno de estos parámetros se desvía de los valores óptimos o estandarizados, se puede formar una capa de óxido inadecuada, con poca resistencia a la corrosión, baja biocompatibilidad o incluso la formación de defectos en la superficie de la aleación [341,363,364].

Los resultados de la composición elemental relativa se resumen en la Tabla 5. Podemos observar que las concentraciones de oxígeno (O1s) en la aleación control es mayor en comparación con las muestras anodizadas. Cabe mencionar que las aleaciones de titanio forman naturalmente una capa de óxido en la superficie debido a la exposición con el ambiente o durante el procesamiento del material, sin embargo, este óxido formando no es nanoestructurado. En el caso de las muestras anodizadas, dado que los nanotubos son estructuras huecas (ver figuras 28, 29 y 30), el espacio efectivo analizado en el XPS se limita a la superficie externa de los nanotubos y al espacio que hay entre los poros. Por lo tanto, la diferencia en la concentración de oxígeno medida por XPS entre las muestras anodizadas y la aleación de control puede atribuirse principalmente a la presencia de la capa de óxido nanotubular en la superficie del material [148,466–468]. Con los resultados obtenidos para los anodizados podemos determinar que, a voltajes más altos, hay una mayor concentración de oxígeno en la superficie debido a que existe una mayor actividad electroquímica en el material, sin embargo, esta concentración de oxígeno no es proporcional o relativa a la actividad electroquímica. Por otro lado, las concentraciones de flúor (F1s) también aumentan en las muestras anodizadas, especialmente en el anodizado a 40 V con 4.47 at. % en comparación con las concentraciones de los anodizados a 50 V y 60 V con 4.25 y 3.81at. %, respectivamente. Estas concentraciones indican la presencia de flúor en la capa de óxido formada durante el proceso de anodizado. Con base en estos resultados podemos determinar que el uso de un voltaje menor puede promover una mayor incorporación de flúor en la capa de óxido. A voltajes más altos, se forma una capa de óxido más densa y gruesa en la superficie de la aleación. Esta capa de óxido densa puede actuar como una barrera que dificulta la penetración de los iones de flúor en la estructura de la capa de óxido.

Como resultado, la incorporación de flúor puede ser menor en comparación con voltajes más bajos [469–472]. Por último, se observa que las concentraciones de titanio ( $Ti2p$ ), aluminio ( $Al2p$ ), vanadio ( $V2p$ ) y ( $C1s$ ) no mostraron cambios significativos en todas las muestras analizadas.

**Tabla 5.** Composición elemental relativa obtenida por XPS de la capa de óxido nanotubular formada en la aleación Ti-407 a diferentes potenciales de anodización durante 30 minutos a 25°C

Muestra	Concentraciones atómicas (at. %)					
	$Ti2p$	$Al2p$	$V2p$	$O1s$	$F1s$	$C1s$
Control	14.38	1.05	11.98	41.67	1.15	26.89
40 V	13.88	0.66	11.14	37.09	4.47	31.18
50 V	13.65	1.49	11.2	35.69	4.25	32.02
60 V	13.91	0.97	11.16	37.59	3.81	31.02

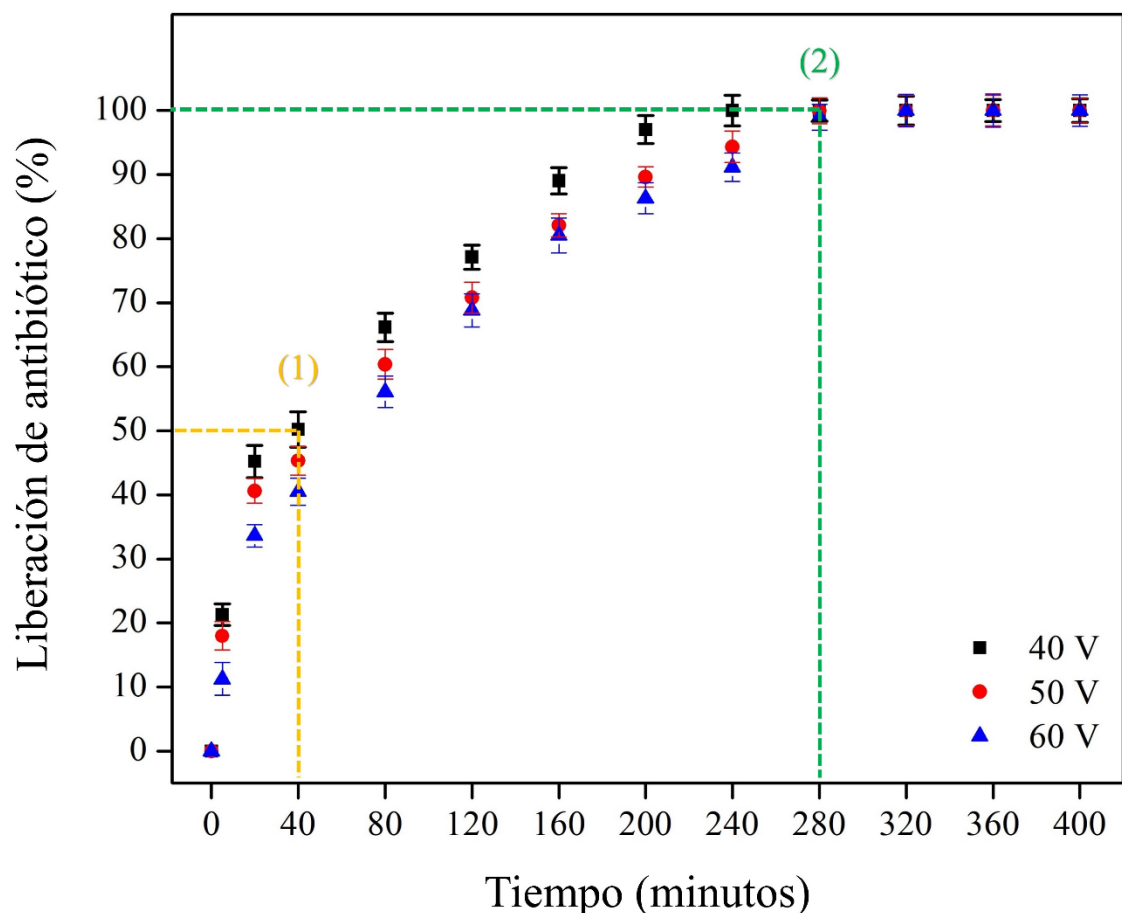
### **5.3. Liberación de antibióticos a partir de las aleaciones anodizadas**

Para demostrar la eficacia y el tiempo de liberación de la arquitectura de los nanotubos, se llevaron a cabo pruebas de liberación de antibióticos por triplicado para cada una de las muestras anodizadas. La figura 35 muestra el registro de la concentración de ceftriaxona (50 mg/mL) liberada en PBS con un pH 7.0 a 37 °C en función del tiempo. Los espectros de absorción UV-Vis de la solución de ceftriaxona para todas las muestras anodizadas mostraron que el antibiótico tenía una absorción amplia a 239-243 nm con una longitud de onda máxima a 241 nm [473,474]. Es importante resaltar que cada muestra anodizada presentó una liberación sostenida con dos etapas diferentes, marcadas en la figura 35 con una línea punteada de color amarillo y una línea punteada de color verde.

En los primeros 40 minutos de inmersión en PBS, se ha registrado un efecto de liberación de ráfaga de aproximadamente el 50% del antibiótico, señalado con una línea punteada de color amarillo. En este registro, las muestras anodizadas a 60 V presentaron una cinética de menor liberación con un porcentaje de liberación del 40.5 % a los 40 minutos de inmersión, comparados con los valores obtenidos por el anodizado a 40 V y 50 V con porcentajes de liberación de 49.8 % y 45.2 % respectivamente. El porcentaje de liberación se refiere a la proporción de la cantidad total de antibiótico contenido en los nanotubos que es liberada al medio circundante (PBS) en un determinado período de tiempo [200,475,476]. Si una muestra anodizada presenta un porcentaje bajo de liberación en comparación con otra, significa que está liberando una menor cantidad relativa de antibiótico. Esto puede deberse a varias razones, como diferencias en las propiedades físicas y químicas de los nanotubos, la cantidad de antibiótico adsorbido o atrapado dentro de los nanotubos, la eficiencia de la liberación controlada y las características morfológicas de los nanotubos que afectan su capacidad para liberar el antibiótico.

Una liberación ráfaga de antibióticos a partir de nanotubos se refiere al proceso de liberar una gran cantidad de antibióticos de manera rápida y controlada utilizando nanotubos como vehículos o portadores [134,203,204]. La liberación de ráfaga observada en los primeros minutos de inmersión podría estar relacionada con un fenómeno de adsorción de antibiótico en la superficie de los nanotubos [477,478]. En este sentido, este fenómeno puede ser utilizado para cargar los nanotubos con una alta concentración de antibióticos y utilizar esta

fase de liberación en un sitio específico del cuerpo donde se desea eliminar o prevenir una infección de manera eficiente ya que se ha reportado que una liberación de antibióticos en una ráfaga concentrada puede superar los mecanismos de resistencia bacteriana [15,203].



**Figura 35.** Porcentaje de liberación de ceftriaxona en función del tiempo. Las curvas corresponden a las muestras de la figura 28, 29 y 30. La liberación total del antibiótico se observa a los 280 minutos.

En la segunda etapa, señalada con una línea punteada de color verde en la figura 35, se observó una cinética de liberación lenta, que se prolongó hasta los 280 minutos donde se alcanzó el 100 % de liberación de antibiótico para todas las muestras anodizadas, esta liberación prolongada puede ser influenciada por la solubilidad del antibiótico en el medio [473,479,480] y por las propiedades



morfológicas o superficiales de los nanotubos, como las dimensiones, la presencia de grupos funcionales o modificaciones químicas que pueden afectar la afinidad del antibiótico hacia los nanotubos [481–483].

En nuestra investigación, con base en las diferencias morfológicas de los nanotubos obtenidos por diferentes voltajes de anodizado, si los nanotubos tienen diferentes longitudes y diámetros, estas diferencias pueden influir en el porcentaje de liberación de antibióticos. Si los nanotubos tienen un diámetro más pequeño (40 V) es posible que tenga una mayor área de superficie en comparación con los nanotubos de mayor diámetro (60 V). Esto puede resultar en una mayor capacidad de adsorción del antibiótico dentro de los nanotubos más estrechos. Como resultado, es posible que los nanotubos más estrechos liberen una menor proporción de antibióticos en comparación con el nanotubo más ancho [421]. Con base en los resultados obtenidos, el porcentaje más bajo de liberación de antibióticos en función del tiempo presentado en las muestras anodizadas a 60 V se atribuye a la longitud que tienen estos nanotubos y a la densidad de nanotubos por unidad de área en comparación con las otras muestras anodizadas de 40 V y 50 V. Es aquí donde las características morfológicas de los nanotubos toman gran relevancia ya que la elección de las dimensiones de los nanotubos es crucial para cargar y liberar eficientemente los antibióticos. Si el diámetro de los nanotubos es demasiado pequeño, los antibióticos podrían no ingresar en su interior, mientras que, si el diámetro es demasiado grande, podrían escapar fácilmente. Cuanto más largo sea el nanotubo, mayor será su capacidad para almacenar una mayor cantidad de antibióticos. Sin embargo, la longitud excesiva puede dificultar la liberación controlada y aumentar la posibilidad de obstrucción de los nanotubos. Además, las características estructurales de los nanotubos, como las rugosidades y los poros, también pueden afectar la adsorción y liberación de los antibióticos [202,206,419,421,484–488].

Es importante considerar que la relación entre la densidad de los nanotubos y sus dimensiones pueden tener implicaciones en los sistemas de liberación de antibióticos. Cuando la densidad de los nanotubos aumenta, pero su tamaño disminuye, se pueden obtener más nanotubos por unidad de área, como los obtenidos mediante el anodizado a 40 V (ver figura 31 y 32). Esto significa que hay más sitios disponibles para la adsorción y retención de los antibióticos. Sin embargo, al ser nanotubos con dimensiones bajas su capacidad de carga individual puede ser menor en comparación con los nanotubos más grandes y menos densos como los obtenidos a 60 V (ver figura 31 y 32). En este sistema

de liberación para la aleación de Ti-407, las muestras con una menor densidad de nanotubos y dimensiones más grandes (60 V) tuvieron una mayor capacidad de carga en comparación con las muestras con una mayor densidad de nanotubos y con dimensiones menores (40 V). Los nanotubos sintetizados a 60 V almacenaron una mayor cantidad de antibióticos debido a su mayor volumen total encerrado ( $10.63 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ), esto se correlaciona con una liberación más lenta y controlada (ver figura 35, triángulo de color azul), ya que su porcentaje de liberación de ceftriaxona a los 40 minutos fue de 40.5 % en comparación con lo nanotubos sintetizados a 50 y 40 V que presentaron una liberación más rápida con porcentajes de 45.2 y 49.8 % respectivamente (ver figura 35, cuadrado negro y círculo rojo respectivamente), durante este periodo de evaluación. Es importante tener en cuenta que las características específicas de los nanotubos, como la forma, el tamaño y la densidad, deben considerarse en conjunto para determinar el mejor compromiso para lograr una liberación eficaz y controlada de antibióticos. En Tabla 6, se presenta un resumen de las características morfológicas de los nanotubos más importantes de esta tesis. Con esta información, es posible diseñar una matriz específica de nanotubos en función de la cantidad de administración de antibióticos, que puede corresponder a la uniformidad de entrega o al comportamiento de liberación a mayor tiempo.

Como ya se mencionó, el propósito general de los antibióticos es evitar la colonización de bacterias alrededor del dispositivo médico; por lo cual, estos resultados ofrecen evidencia sobre el uso potencial de estos materiales como sistema novedoso para la liberación de antibióticos en aleaciones de base titanio. Con base en lo anterior, para comprobar que nuestro sistema de liberación funciona, se estudió el efecto de la liberación de ceftriaxona contra bacterias relacionadas con infecciones postoperatorias, estos resultados serán discutidos en la sección 5.4 de esta tesis.

**Tabla 6.** Características morfológicas (longitud, diámetro, densidad, volumen encerrado y tiempo para liberar el 50% del antibiótico) por los nanotubos generados de Ti-407

Parámetros	Muestras		
	40 V	50 V	60 V
Longitud (nm)	10,190	10,630	10,810
Diámetro (nm)	81.4	82.6	83.1
Relación de aspecto (longitud/diámetro)	125.1	128.6	130.0
Densidad de nanotubos/ $\mu\text{m}^2$	191.4	183.1	181.2
Volumen total encerrado ( $\mu\text{m}^3$ )/ $\mu\text{m}^2$	10.14	10.42	10.63
Porcentaje de liberación de ceftriaxona a los 40 minutos	49.8	45.2	40.5

Con el fin de demostrar que las condiciones de síntesis por anodizado juegan un papel importante en la capacidad de carga y liberación de antibióticos, se realizó una comparación entre las nanoestructuras con mejor desempeño obtenidas para la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn y la aleación Ti-407.

En la tabla 7 se muestran las condiciones a implementar según la aplicación deseada para cada aleación. Con base en los resultados obtenidos, la aleación Ti-407, presentó un mejor desempeño en todos los parámetros evaluados (marcados en la tabla en color gris).

En las muestras a 25 V (Ti-24Zr 10Nb-2Sn), la longitud y el diámetro promedio de los nanotubos es de 4250 nm y 100 nm respectivamente, mientras que, en las muestras a 60 V (Ti-407), la longitud y el diámetro promedio es de 10,810 nm y 83.1 nm. Esto indica que los nanotubos de las muestras a 60 V son significativamente más largos en comparación con los nanotubos de las muestras a 25 V, pero con un diámetro promedio ligeramente menor. Además, las muestras a 60 V presentan una relación de aspecto más alta (130), una densidad (181.2 nanotubos/ $\mu\text{m}^2$ ) y un volumen total encerrado ( $10.58 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) mayores en comparación con la relación de aspecto (42.5), la densidad (25 nanotubos/ $\mu\text{m}^2$ ) y el volumen total encerrado ( $0.83 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) de las muestras a 25 V. Como ya se mencionó en la sección 4.2.2 y 5.2.2, la geometría de los nanotubos puede afectar la cantidad de antibióticos que se pueden cargar en su interior. Para evidenciar lo anterior, si comparamos los porcentajes de liberación de antibióticos, en la muestra a 25 V, el porcentaje de liberación de gentamicina durante los primeros 10 minutos fue de 83% (ver figura 20), esto sugiere que una gran cantidad de antibióticos se liberaron rápidamente de los nanotubos en ese período de tiempo. Mientras que, en la muestra a 60 V, el porcentaje de liberación de ceftriaxona durante los primeros 10 minutos fue de 11% (ver figura 35), esto indica que una menor cantidad de antibióticos se liberaron en comparación con la muestra anodizada a 25 V. Por otro lado, el tiempo de dosificación, es decir, el período en el que se completa la liberación de los antibióticos desde los nanotubos varió significativamente entre las muestras. Para las muestras anodizadas a 25 V el tiempo de dosificación fue de 120 minutos. Mientras que, para las aleaciones anodizadas a 60 V el tiempo de dosificación fue de 280 minutos. Estos resultados sugieren que el voltaje aplicado durante la anodización puede influir en la cinética de liberación de los antibióticos desde los nanotubos. Otros factores, como el tamaño y la estructura de los nanotubos, así como las propiedades del antibiótico utilizado, también pueden influir en el tiempo de dosificación. Con base en lo anterior, se puede inferir que, los nanotubos en las muestras a 60 V tienen una mayor capacidad de carga de antibióticos y una mayor eficacia en la liberación de antibióticos en comparación con los nanotubos en las muestras a 25 V. La mayor capacidad de carga en las muestras anodizadas a 60 V se relaciona con su geometría. Estos nanotubos tienen una mayor densidad y relación de aspecto, características que les proporcionan más sitios de adsorción y retención para los antibióticos. Esto significa que hay más espacio disponible en los nanotubos para que los antibióticos sean almacenados y, por lo tanto, pueden cargar una mayor cantidad de antibióticos en su interior. Además, la mayor eficacia en la liberación de antibióticos de las muestras anodizadas a 60 V se relaciona con la capacidad de retención y liberación controlada de los nanotubos. La menor liberación de antibióticos durante los primeros 10 minutos indica que las muestras anodizadas a 60 V pueden retener

los antibióticos de manera más eficiente y liberarlos gradualmente con el tiempo, lo que puede ser beneficioso para un suministro sostenido de antibióticos. La menor densidad de nanotubos en las muestras anodizadas a 25 V resultó en una capacidad de carga de antibióticos reducida, es decir, menos sitios disponibles para la adsorción y retención de los antibióticos. Por otro lado, el menor volumen total encerrado de las muestras anodizadas a 25 V resultó en una liberación más rápida de los antibióticos, ya que, con menos espacio interno para retener los antibióticos, la liberación ocurrió de manera más rápida y menos controlada. Esto llevó a una disminución en la duración de la liberación de los antibióticos en comparación con las muestras anodizadas a 60 V.

**Tabla 7.** Comparación entre las nanoestructuras con mejor desempeño obtenidas para la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn y la aleación Ti-407.

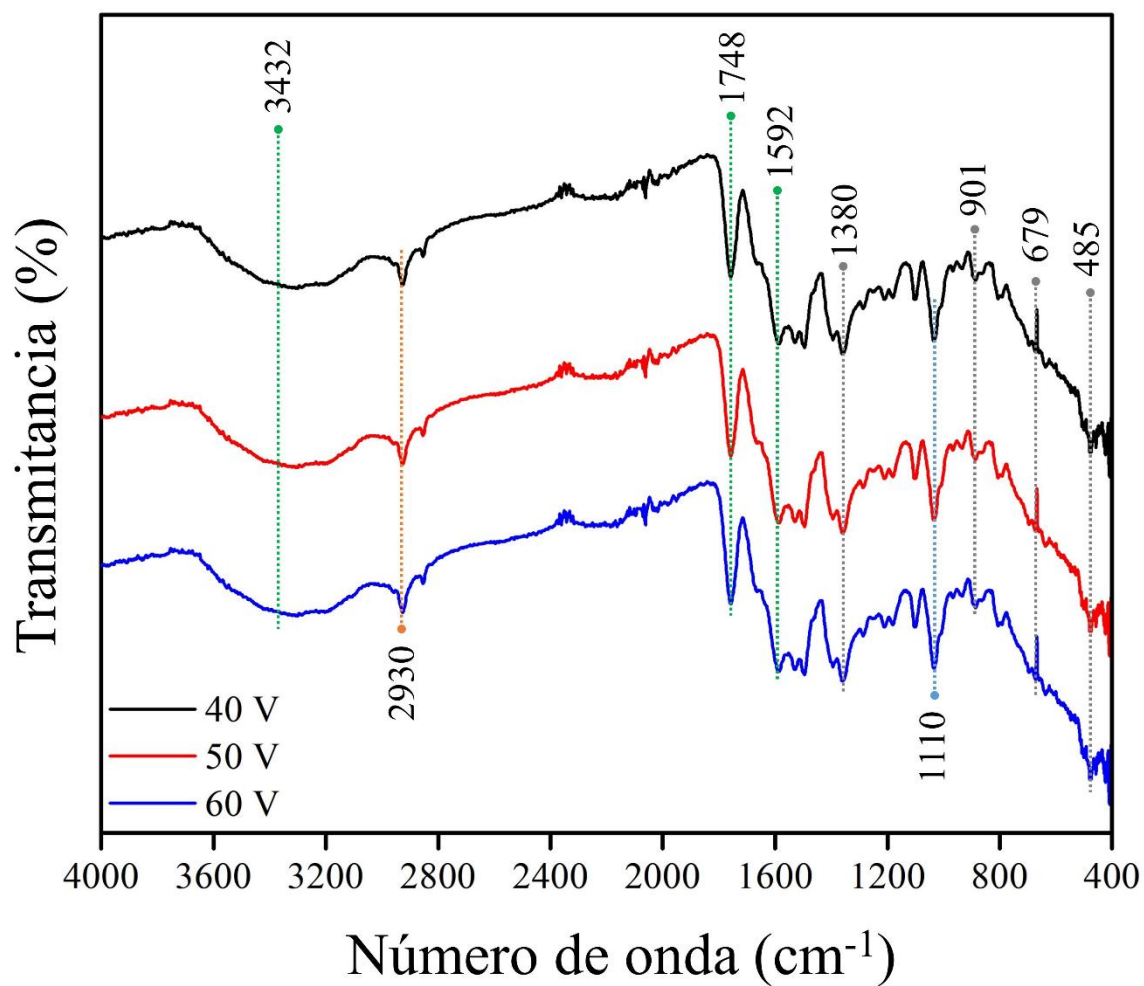
Parámetros	Aleación	
	Ti-24Zr-10Nb-2Sn	Ti-407
Densidad (Uniformidad)	10V 144 nanotubos/ $\mu\text{m}^2$	40V 191.4 nanotubos/ $\mu\text{m}^2$
Compromiso (uniformidad vs volumen)	Entre 15 y 20 V	Entre 40 y 50 V
Máximo volumen	25 V $0.83 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$	60 V $10.63 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$
Tiempo de dosificación	25 V 120 minutos	60 V 280 minutos

Es importante resaltar que las aleaciones de titanio pueden tener variaciones significativas en su comportamiento de anodizado debido a las diferencias en su composición, lo que a su vez afecta la formación de las películas de óxido y las características de los nanotubos resultantes. Por lo tanto, las condiciones específicas de síntesis por anodizado, como el voltaje aplicado, el electrolito utilizado y los parámetros de anodización, pueden ser ajustadas para cada aleación con el objetivo de obtener nanotubos con propiedades óptimas de carga y liberación de antibióticos. La información obtenida en este proyecto de tesis

puede proporcionar una base para optimizar las condiciones de síntesis por anodizado y diseñar sistemas de liberación de fármacos más efectivos.

### **5.3.1. Espectroscopía Infrarroja (FT-IR) de las aleaciones cargadas con antibióticos**

La figura 36 muestra los espectros FT-IR de nanotubos formados en la superficie de las aleaciones anodizadas de Ti-407 cargadas con el antibiótico ceftriaxona en el rango de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . Las bandas anchas de 3500  $\text{cm}^{-1}$  a 1600  $\text{cm}^{-1}$  indican la presencia de moléculas de agua adsorbidas o unidas al hidrógeno en los nanotubos [343,489]. El pico observado cercano a 918  $\text{cm}^{-1}$  se asigna al enlace O-O del óxido ( $\text{O}_2$ ) presente en la superficie de la aleación [490]. La banda presentada a 901  $\text{cm}^{-1}$  se atribuye al modo de estiramiento O-Ti-O y las vibraciones de estiramiento Ti-O y Ti-O-Ti se observaron en las bandas cercanas a 679  $\text{cm}^{-1}$  y 485  $\text{cm}^{-1}$ . Además, la banda a 1380  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a las vibraciones de flexión del enlace O-Ti-O en el dióxido de titanio [371,491–497]. Por otro lado, en relación al uso del electrolito durante el proceso de anodizado en las aleaciones de Ti-407, se observaron bandas características. Los picos presentados en aproximadamente 2930  $\text{cm}^{-1}$  y 3300  $\text{cm}^{-1}$  se han reportado como la vibración de estiramiento del enlace O-H y C-H del glicerol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ ) presente en el electrolito utilizado durante el proceso de anodización, asimismo se han reportado bandas entre 1740  $\text{cm}^{-1}$  relacionados con el estiramiento del enlace C=O de los ésteres presentes en el glicerol, así como bandas entre 1108  $\text{cm}^{-1}$  y 1045  $\text{cm}^{-1}$  [498–500]. Por su parte, los picos presentados en aproximadamente 1100  $\text{cm}^{-1}$  y 3200  $\text{cm}^{-1}$  se han reportado como la vibración de estiramiento del enlace C-O y N-H del amonio residual como parte del proceso de anodización [371,501]. Para confirmar la presencia del antibiótico en las aleaciones anodizadas, se observó que la ceftriaxona mostró sus picos vibratorios característicos a 3432  $\text{cm}^{-1}$  (modo de estiramiento N-H del grupo amida unido por H), 1748  $\text{cm}^{-1}$  (vibraciones de estiramiento  $\beta$ -lactama C=O) y 1542  $\text{cm}^{-1}$  (vibraciones de estiramiento oxima C=N) [502–504]. Así, estos picos en las aleaciones anodizadas cargadas con ceftriaxona (señalados por una línea punteada de color verde) validan la presencia de ceftriaxona en todas las muestras anodizadas.



**Figura 36.** Espectros FT-IR de nanotubos formados en la superficie de la aleación Ti-407 cargados con el antibiótico ceftriaxona.

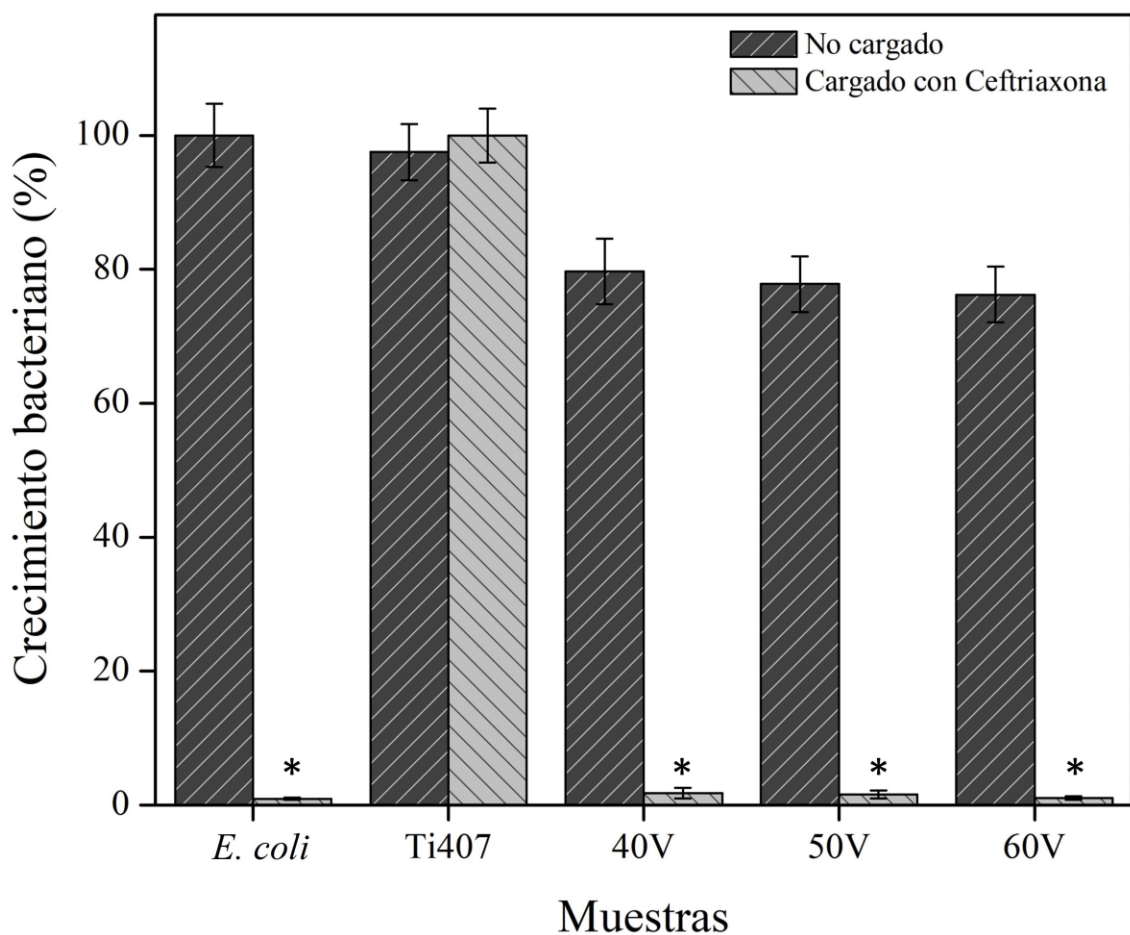
## **5.4. Determinación de las propiedades antibacterianas de las aleaciones anodizadas y aleaciones cargadas con antibióticos**

Para determinar las propiedades antibacterianas de las aleaciones anodizadas y aleaciones anodizadas cargadas con el antibiótico ceftriaxona, se emplearon diferentes métodos microbiológicos, como la medición de la turbidez de las muestras bacterianas por espectrofotometría, el recuento bacteriano en placa y el método de antibiograma. Estas técnicas permitieron evaluar la eficacia de los antibióticos incorporados en los nanotubos de las aleaciones de Ti-407 frente a bacterias patógenas relacionadas con infecciones postoperatorias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Los resultados obtenidos pueden ayudar a optimizar el diseño y la fabricación de las aleaciones anodizadas y aleaciones cargadas con antibióticos para mejorar la prevención y el tratamiento de las infecciones postoperatorias asociadas a prótesis o implantes biomédicos.

### **5.4.1. Medición de turbidez por espectrofotometría**

En las figuras 37, 38 y 39 se muestran los resultados obtenidos de la medición de turbidez por espectrofotometría. La medición del crecimiento bacteriano por turbidez nos permitió conocer la sensibilidad de las bacterias frente a las diversas aleaciones de Ti-407. Las cepas bacterianas de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* se utilizaron como controles positivos para el crecimiento bacteriano y las placas de Ti-407 no anodizadas se utilizaron como controles de la aleación. Lo primero que podemos observar en las figuras 37, 38 y 39 es que, la modificación superficial con nanotubos en las muestras anodizadas de Ti-407 a 40, 50 y 60 V, provoca una disminución en el crecimiento bacteriano debido a la adsorción de antibióticos en la superficie o a la carga y liberación de antibióticos desde el interior de los nanotubos (ver sección 5.3). Por el contrario, las muestras de Ti-407 sin modificación superficial no presentan estas propiedades antibacterianas y, por lo tanto, permiten el crecimiento bacteriano ya que no hay características que inhiban su adhesión o proliferación.



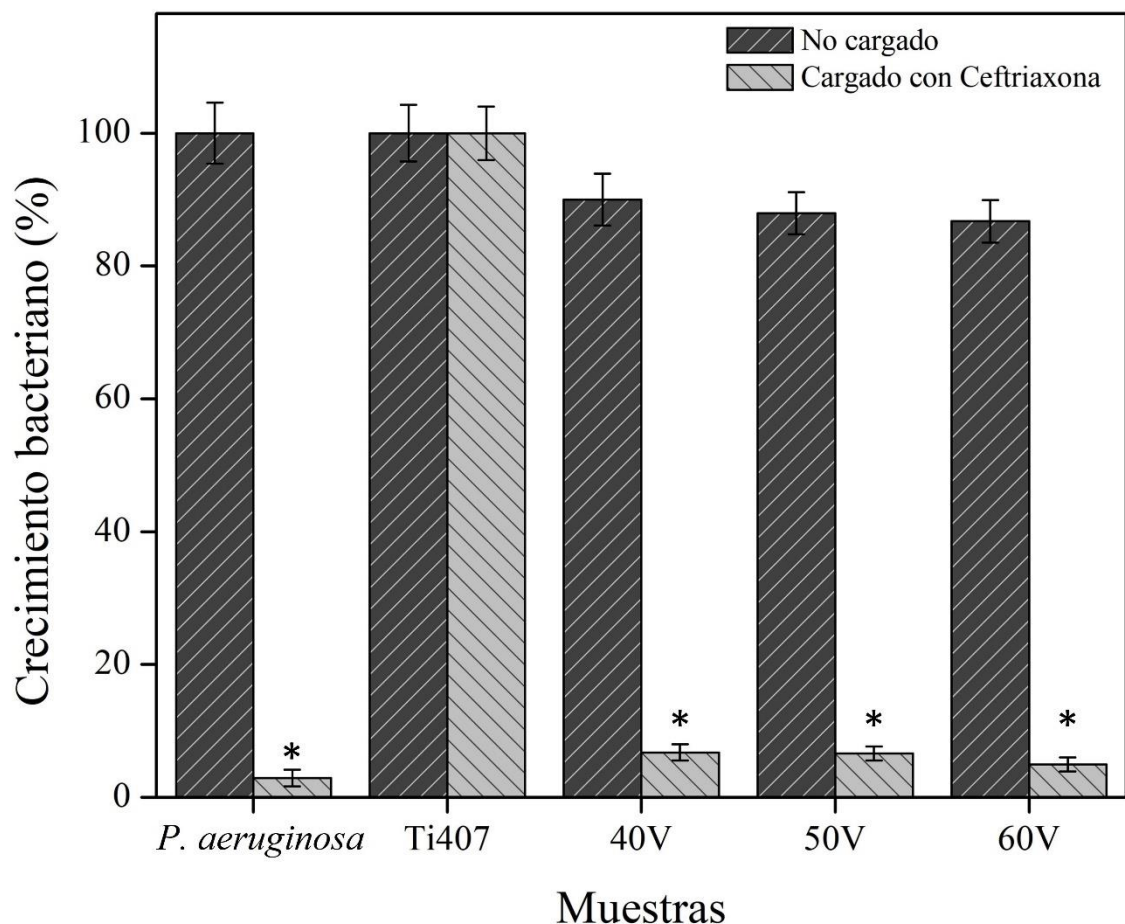


**Figura 37.** Propiedades antibacterianas por método de espectrofotometría de las aleaciones anodizadas de Ti-407, no cargadas y cargadas con el antibiótico ceftriaxona sobre *E. coli*. \*Representa  $P < 0.05$  en comparación con el grupo de control.

Los controles positivos de *E. coli* (figura 37), *P. aeruginosa* (figura 38) y *S. aureus* (figura 39), mostraron una densidad óptima de crecimiento bacteriano.

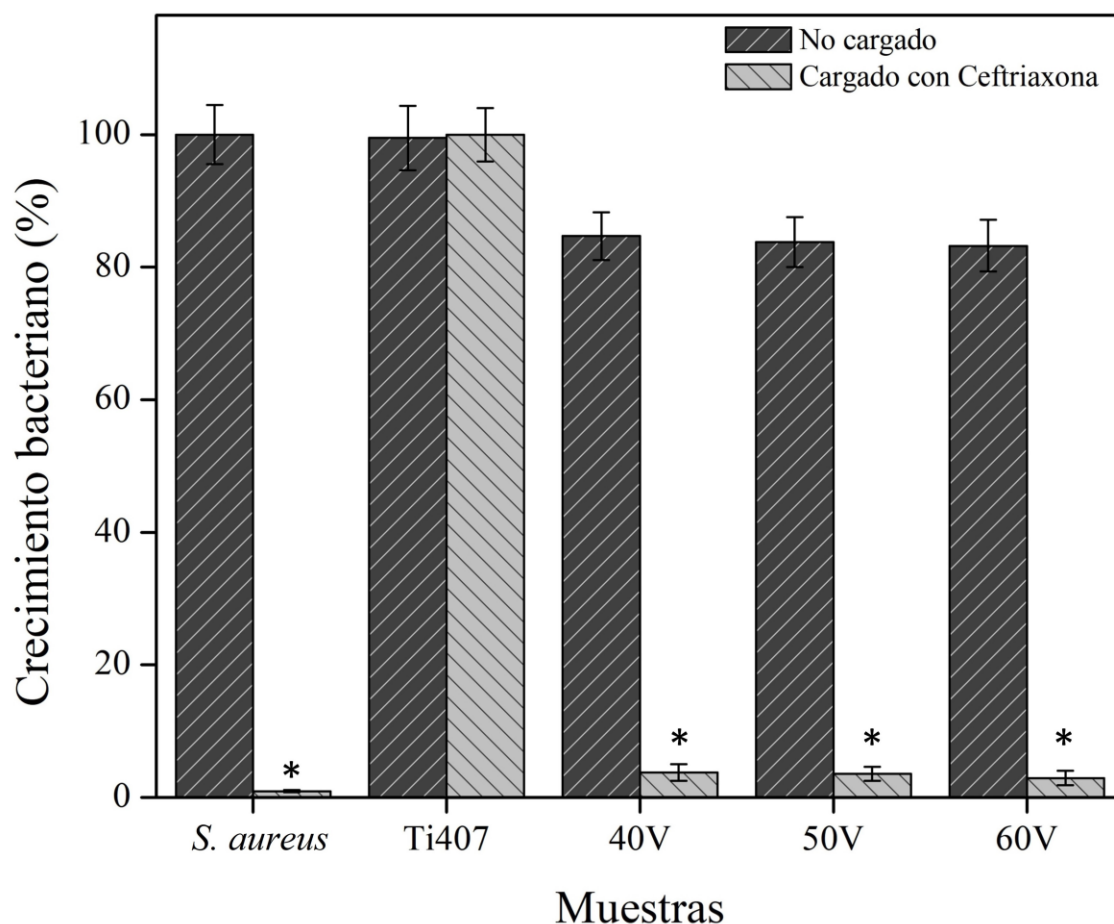
El medio de cultivo en el que se encontraban las bacterias contenía los nutrientes y las condiciones necesarias para que las bacterias crecieran y se desarrollaran con normalidad [505,506]. Mientras que, las muestras a las que se le añadió el antibiótico ceftriaxona presentaron una disminución significativa en el porcentaje de crecimiento celular con un promedio de crecimiento de:

- 2 % para *E. coli*
- 4 % para *P. aeruginosa*
- 1 % para *S. aureus*



**Figura 38.** Propiedades antibacterianas por método de espectrofotometría de las aleaciones anodizadas de Ti-407, no cargadas y cargadas con el antibiótico ceftriaxona sobre *P. aeruginosa*. \*Representa  $P < 0.05$  en comparación con el grupo de control.

Estos resultados comprueban que las bacterias son susceptibles al antibiótico evaluado, lo que implica que la concentración de ceftriaxona utilizada (50 mg/mL) es efectiva para inhibir el crecimiento de estas bacterias. Las bacterias de *E. coli* (figura 37), *P. aeruginosa* (figura 38) y *S. aureus* (figura 39) se cultivaron en presencia de los controles de la aleación Ti-407 para evaluar su capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano. En todos los casos, no se observa una disminución significativa en el porcentaje de crecimiento bacteriano en presencia de los controles de la aleación, todas las muestras tuvieron un promedio cercano al 100% de crecimiento bacteriano, lo que indica que las bacterias pueden crecer con normalidad en presencia de estos materiales.



**Figura 39.** Propiedades antibacterianas por método de espectrofotometría de las aleaciones anodizadas de Ti-407, no cargadas y cargadas con el antibiótico ceftriaxona sobre *S. aureus*. \*Representa  $P < 0.05$  en comparación con el grupo de control.

Por otro lado, las bacterias de *E. coli* (figura 37), *P. aeruginosa* (figura 38) y *S. aureus* (figura 39) se cultivaron también en presencia de las aleaciones anodizadas de Ti-407 para determinar su capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano. Se observó que las muestras anodizadas que no fueron cargadas con antibióticos presentaron una actividad antibacteriana moderada sobre las bacterias. Esto significa que la respuesta de las bacterias a estas aleaciones anodizadas está en un punto intermedio entre la sensibilidad (donde el agente antibacteriano es altamente efectivo) y la resistencia (donde el agente antibacteriano no tiene ningún efecto sobre las bacterias).

Los resultados obtenidos muestran que las aleaciones anodizadas a 60 V fueron las que presentaron los porcentajes más bajos de crecimiento bacteriano con un valor promedio de:

- 75 % para *E. coli*
- 87 % para *P. aeruginosa*
- 82 % para *S. aureus*.

Seguido de los anodizados a 50 V con promedio de:

- 78 % para *E. coli*
- 88 % para *P. aeruginosa*
- 83 % para *S. aureus*

Y posteriormente las aleaciones anodizadas de 40 V con un valor promedio de:

- 80 % para *E. coli*
- 90 % para *P. aeruginosa*
- 84 % para *S. aureus*

Con base en los resultados obtenidos, se puede observar una ligera disminución en el porcentaje de crecimiento bacteriano en las aleaciones anodizadas en comparación con el control bacteriano. Sin embargo, esta reducción no alcanza niveles significativos en contraste con las muestras a las que le añadió el antibiótico ceftriaxona. Esto sugiere que tanto las aleaciones sin anodizar como las aleaciones anodizadas de Ti-407 no presentan efectos inhibitorios significativos sobre estas bacterias en particular. Es importante resaltar que las aleaciones anodizadas presentan un porcentaje de flúor en su superficie como parte del proceso de anodización (ver sección 5.2.2). No obstante, con base en los resultados obtenidos, parece que la cantidad de flúor incorporado en las aleaciones no es suficiente para lograr la eliminación total de la carga bacteriana [507,508].

Sin embargo, para las aleaciones anodizadas cargadas con el antibiótico ceftriaxona se obtuvieron resultados muy distintos. Se observa una sensibilidad de las bacterias de *E. coli* (figura 37), *P. aeruginosa* (figura 38) y *S. aureus* (figura 39) a los tres anodizados cargados con ceftriaxona evaluados.

Los resultados indican que las aleaciones anodizadas a 60 V cargadas con ceftriaxona fueron las que presentaron los porcentajes más bajos de crecimiento bacteriano con un valor promedio de:

- 1 % para *E. coli*
- 5 % para *P. aeruginosa*
- 2 % para *S. aureus*.

Seguido de los anodizados a 50 V cargados con ceftriaxona con promedio de:

- 2 % para *E. coli*
- 8 % para *P. aeruginosa*
- 4 % para *S. aureus*

Y posteriormente las aleaciones anodizadas de 40 V cargadas con ceftriaxona con un valor promedio de:

- 3 % para *E. coli*
- 8 % para *P. aeruginosa*
- 3 % para *S. aureus*

Esta disminución significativa en el porcentaje de crecimiento bacteriano *in vitro* de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, se atribuye a la liberación del antibiótico ceftriaxona por medio de los nanotubos de titanio al medio de cultivo, la ceftriaxona tiene un efecto bactericida al unirse a las proteínas de unión a la penicilina (PBPs) en las bacterias, lo que interfiere con la formación de la pared celular bacteriana matando las bacterias al dañar su estructura celular [509–511]. Estos resultados indican que los anodizados cargados con ceftriaxona son efectivos en la reducción del crecimiento bacteriano *in vitro* de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la medición mediante turbidez por espectrofotometría tiene la limitación de no distinguir entre bacterias vivas y muertas. Proporciona una visión general del comportamiento del microorganismo ante la presencia de estos materiales, ya que este método solo permite monitorear el crecimiento bacteriano. No permite determinar si las aleaciones impiden la reproducción de las bacterias o provocan una disminución en la población bacteriana. Por lo tanto, este método se utiliza principalmente como una indicación aproximada del crecimiento bacteriano, en lugar de ser considerado un método cuantitativo preciso.

Con base en lo anterior, en la sección 5.4.2 se cuantificó por el método de recuento bacteriano en placa el número de bacterias viables en las muestras.

#### 5.4.2. Recuento bacteriano en placa

En las figuras 40, 41 y 42 se muestran los valores del recuento de células viables (UFC/mL) obtenidos por el ensayo de recuento bacteriano en placa. Las cepas bacterianas *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, se utilizaron como controles positivos de la viabilidad bacteriana y las placas de Ti-407 no anodizadas se utilizaron como controles de la aleación. De igual forma, lo primero que podemos observar en las figuras 40, 41 y 42 es que, la modificación superficial con nanotubos en las muestras anodizadas de Ti-407 a 40, 50 y 60 V, provoca una disminución en el crecimiento bacteriano debido a la adsorción de antibióticos en la superficie o a la carga y liberación de antibióticos desde el interior de los nanotubos (ver sección 5.3). Por el contrario, las muestras de Ti-407 sin modificación superficial no presentan estas propiedades antibacterianas y, por lo tanto, permiten el crecimiento bacteriano ya que no hay características que inhiban su adhesión o proliferación.

Los controles positivos de *E. coli* (figura 40), *P. aeruginosa* (figura 41) y *S. aureus* (figura 42), mostraron un comportamiento esperado, para las muestras sin antibiótico cargado se observa un rendimiento celular de:

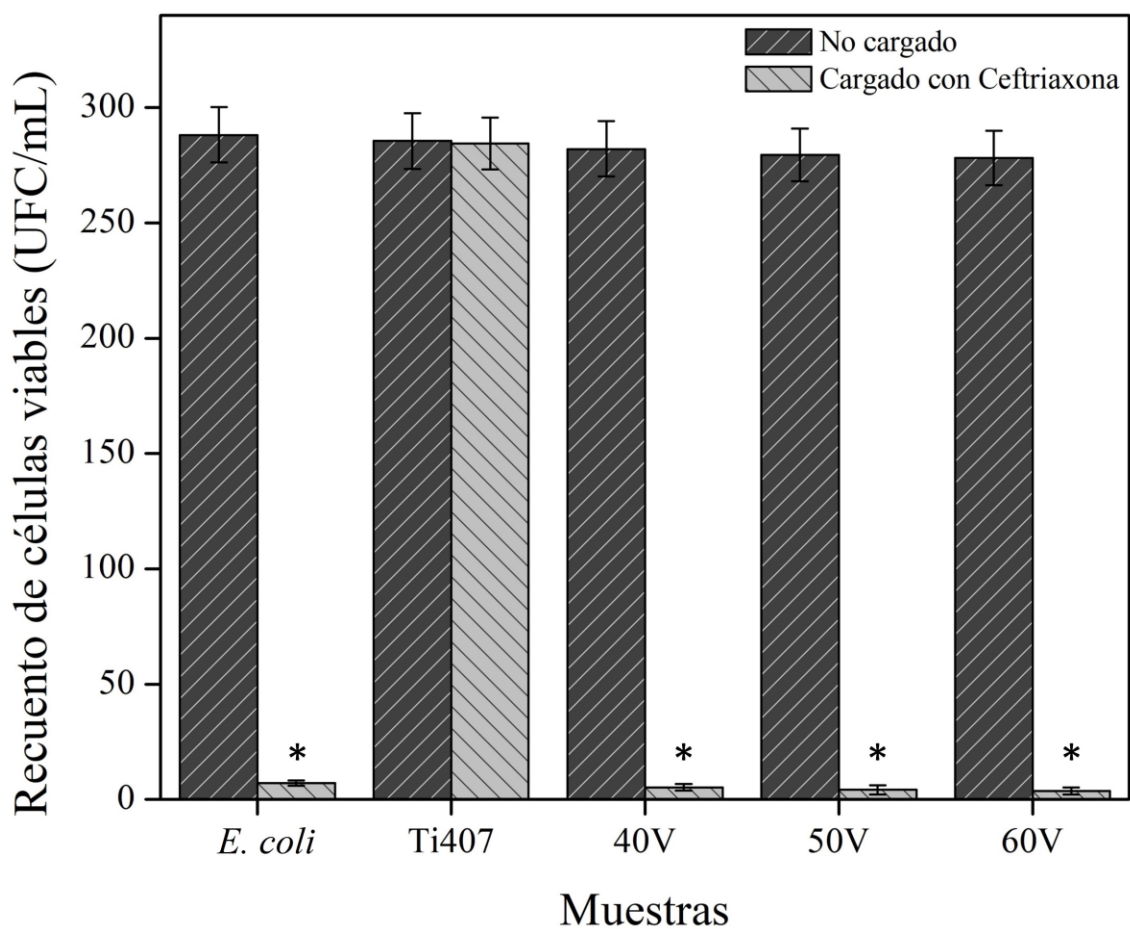
- 280 UFC/mL para *E. coli*
- 210 UFC/mL para *P. aeruginosa*
- 265 UFC/mL para *S. aureus*

En condiciones normales de cultivo, sin la presencia de antibióticos, las bacterias crecen y se dividen rápidamente, formando una gran cantidad de colonias, mientras que, para las muestras con antibiótico, se observa una disminución significativa en el rendimiento celular con un promedio de:

- 10 UFC/mL para *E. coli*
- 30 UFC/mL para *P. aeruginosa*
- 12 UFC/mL para *S. aureus*

Cuando se añadió el antibiótico al medio de cultivo, las bacterias que son sensibles se ven afectadas y no pueden seguir creciendo o mueren. Por el contrario, las bacterias que son resistentes al antibiótico pueden seguir creciendo

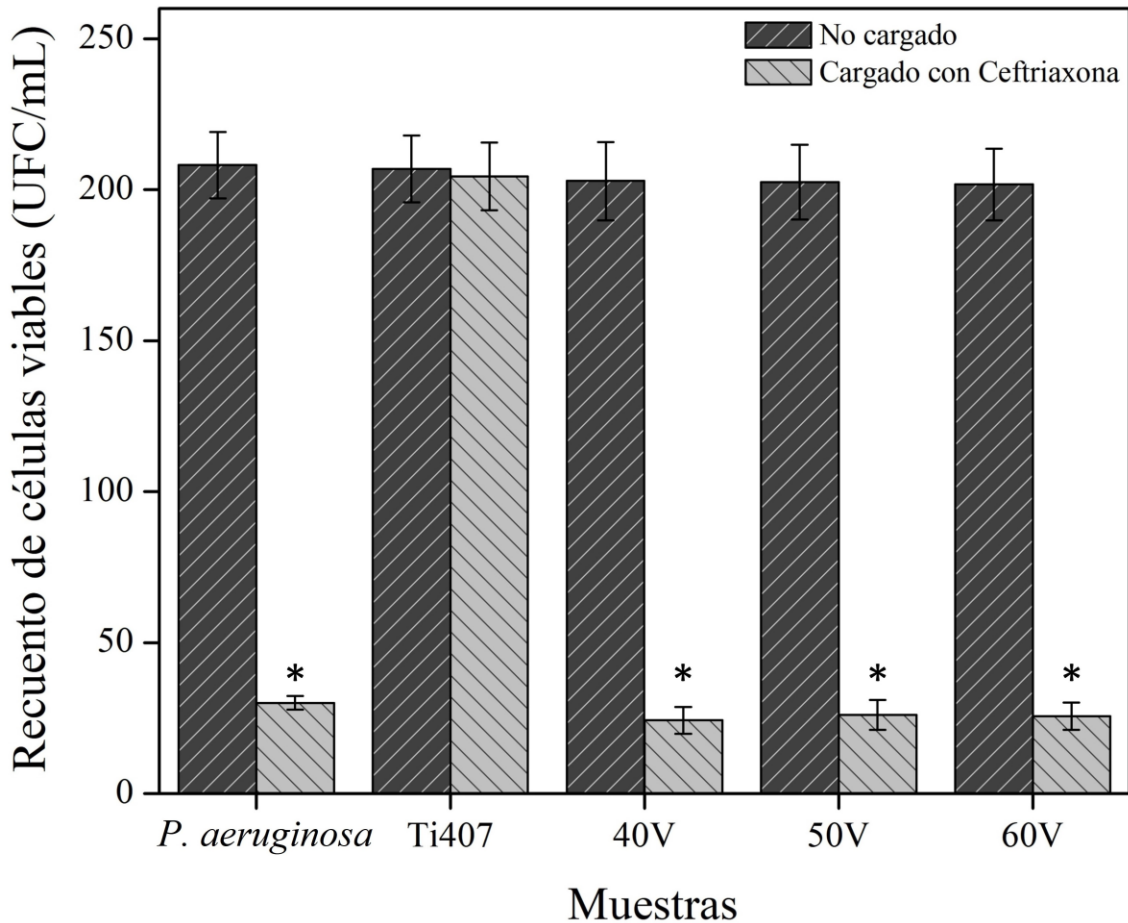
y multiplicándose, formando colonias bacterianas, esto lo podemos observar en los resultados que, a pesar de agregar antibiótico al medio de cultivo, una pequeña cantidad de bacterias logró sobrevivir al tratamiento, lo que indica que las bacterias de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* presentan un cierto grado de resistencia a este antibiótico [512–516].



**Figura 40.** Propiedades antibacterianas por el ensayo de recuento bacteriano en placa de las aleaciones anodizadas de Ti-407, no cargadas y cargadas con el antibiótico Ceftriaxona sobre *E. coli*. \*Representa  $P < 0.05$  en comparación con el grupo de control.

La resistencia de *E. coli* a la ceftriaxona puede ser causada por varios mecanismos. Uno de los mecanismos de resistencia es la producción de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE). Las BLEE son enzimas que pueden inactivar a las cefalosporinas y otros antibióticos beta-lactámicos, incluyendo la ceftriaxona. Estas enzimas hidrolizan el anillo beta-lactámico del antibiótico, lo que impide que este se una y bloquee a las proteínas de unión a penicilina (PBPs) en las bacterias, reduciendo así su eficacia. Otro mecanismo de resistencia de *E. coli* a la ceftriaxona es la disminución de la permeabilidad de la membrana externa de la bacteria. La ceftriaxona necesita atravesar la membrana externa para llegar a su sitio de acción en la pared celular. Si la bacteria presenta modificaciones en su membrana externa que limitan la entrada del antibiótico, esto puede conferir resistencia [511,517,518]. Además, algunas cepas de *E. coli* pueden tener bombas de eflujo que expulsan activamente a la ceftriaxona fuera de la célula bacteriana. Estas bombas de eflujo actúan como sistemas de transporte que bombean los antibióticos fuera de las células, reduciendo así su concentración intracelular y su eficacia. Es importante mencionar que la resistencia bacteriana puede ser adquirida a través de mutaciones genéticas o mediante la adquisición de genes de resistencia de otras bacterias [519,520].





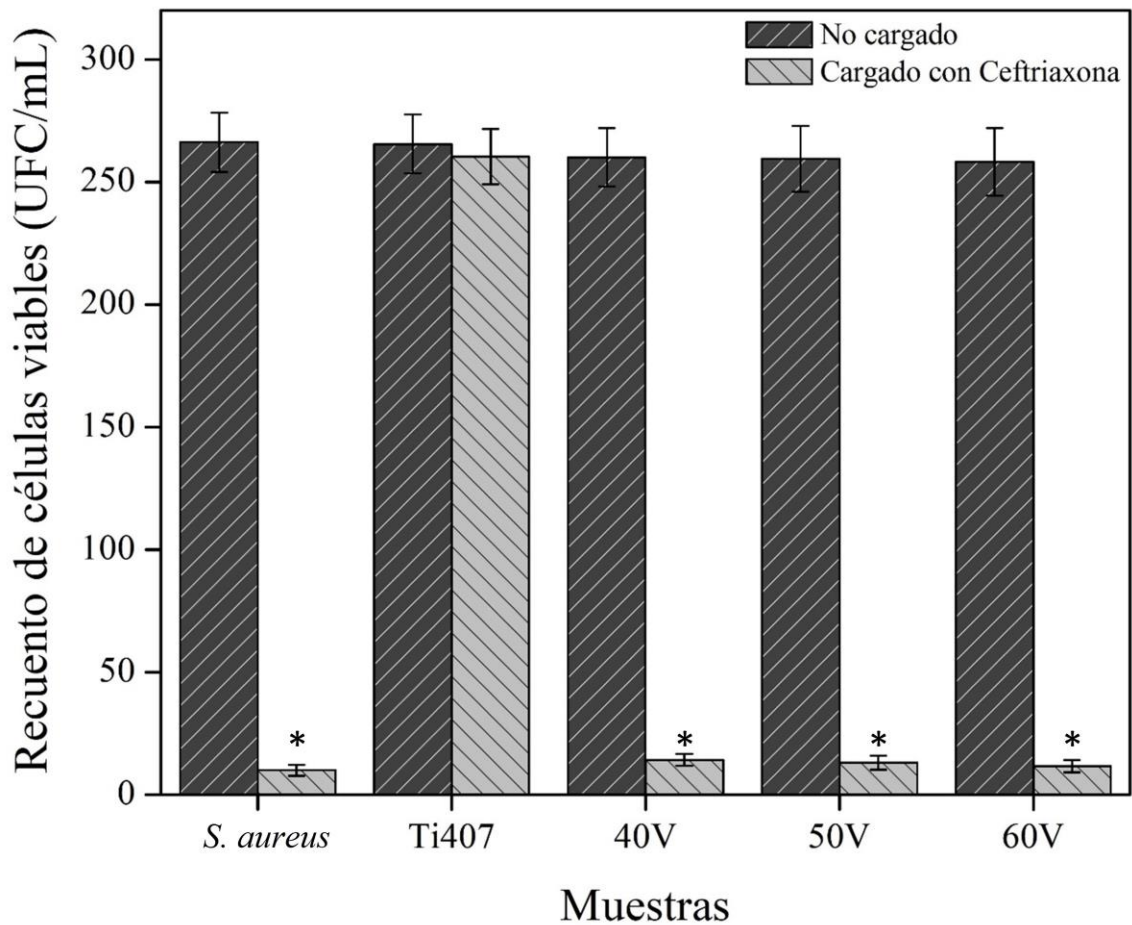
**Figura 41.** Propiedades antibacterianas por el ensayo de recuento bacteriano en placa de las aleaciones anodizadas de Ti-407, no cargadas y cargadas con el antibiótico Ceftriaxona sobre *P.aeruginosa*. \*Representa  $P < 0.05$  en comparación con el grupo de control.

Por su parte, han sido reportados diversos mecanismos de resistencia *P. aeruginosa* a la ceftriaxona. Uno de los mecanismos ya mencionados es la producción de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE): *P. aeruginosa* puede producir enzimas BLEE, como las carbapenemasas, que son capaces de inactivar a las cefalosporinas, incluyendo la ceftriaxona. Estas enzimas hidrolizan el anillo beta-lactámico del antibiótico, lo que impide su acción sobre las bacterias. También, *P. aeruginosa* también puede generar sistemas de transporte activo (bombas de eflujo), que expulsan los antibióticos fuera de la célula bacteriana. Otros mecanismos de resistencia que poseen las bacterias de *P. aeruginosa* son las alteraciones en las porinas, y la formación de biopelículas, las

porinas son proteínas presentes en la membrana externa de las bacterias gramnegativas que regulan el paso de las moléculas, incluyendo los antibióticos, hacia el interior de la célula. *P. aeruginosa* puede tener alteraciones en sus porinas, lo que podría limitar la entrada de la ceftriaxona a la célula bacteriana. Las biopelículas por su parte son comunidades de bacterias envueltas en una matriz que le proporcionan a las bacterias una protección física y química, lo que las hace más resistentes a los antibióticos [514,521,522].

También, se ha reportado que las bacterias de *S. aureus* pueden llegar a presentar resistencia a la ceftriaxona. Uno de los mecanismos de resistencia reportados en *S. aureus* es la producción de penicilinasas que son capaces de inactivar a la ceftriaxona y a otros antibióticos beta-lactámicos por medio de la hidrólisis del anillo beta-lactámico que impide su acción sobre las bacterias. Otro mecanismo de resistencia es la modificación de las proteínas de unión a penicilina (PBPs), *S. aureus* puede modificar sus PBPs, para eliminar la afinidad del antibiótico por las PBPs, disminuyendo así su efectividad. Además *S. aureus* también puede llegar a poseer bombas de eflujo, que le permitiría reducir la concentración intracelular de la ceftriaxona, disminuyendo su eficacia [515,516,523].

Por otro lado, se observó que las muestras anodizadas no cargadas con antibióticos no presentaron actividad antibacteriana sobre las bacterias de *E. coli* (figura 40), *P. aeruginosa* (figura 41) y *S. aureus* (figura 42). Todas las muestras anodizadas presentaron una cantidad similar de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) en comparación con los controles de la aleación (no anodizadas).



**Figura 42.** Propiedades antibacterianas por el ensayo de recuento bacteriano en placa de las aleaciones anodizadas de Ti-407, no cargadas y cargadas con el antibiótico Ceftriaxona sobre *S. aureus*. \*Representa  $P < 0.05$  en comparación con el grupo de control.

Los valores promedio del rendimiento celular para los controles de la aleación fueron de:

- 278 UFC/mL para *E. coli*
- 208 UFC/mL para *P. aeruginosa*
- 270 UFC/mL para *S. aureus*

Mientras que, las muestras anodizadas a 60 V presentaron un valor promedio de:

- 270 UFC/mL para *E. coli*
- 202 UFC/mL para *P. aeruginosa*
- 258 UFC/mL para *S. aureus*.

Seguido de los anodizado a 50 V con un valor promedio de:

- 275 UFC/mL para *E. coli*
- 204 UFC/mL para *P. aeruginosa*
- 259 UFC/mL para *S. aureus*

Y posteriormente las aleaciones anodizadas de 40 V con un valor promedio de:

- 276 UFC/mL para *E. coli*
- 205 UFC/mL para *P. aeruginosa*
- 260 UFC/mL para *S. aureus*

Estos resultados demuestran que el proceso de anodizado realizado sobre la aleación de Ti-407 no tiene un efecto inhibitorio sobre las bacterias de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, por lo que las bacterias pueden reproducirse con todas sus funciones metabólicas de manera normal.

Por su parte, para las aleaciones anodizadas cargadas con el antibiótico ceftriaxona, se observa una sensibilidad de las cepas de *E. coli* (figura 40), *P. aeruginosa* (figura 41) y *S. aureus* (figura 42), siendo el anodizado de 60 V el que presentó la actividad antibacteriana más alta en todos los casos, con un valor promedio de:

- 5 UFC/mL para *E. coli*
- 25 UFC/mL para *P. aeruginosa*
- 12 UFC/mL para *S. aureus*

Seguido de anodizado a 50 V con un valor promedio de:

- 7 UFC/mL para *E. coli*
- 26 UFC/mL para *P. aeruginosa*
- 14 UFC/mL para *S. aureus*

Y posteriormente el anodizado a 40 V con valor promedio de

- 9 UFC/mL para *E. coli*
- 25 UFC/mL para *P. aeruginosa*
- 17 UFC/mL para *S. aureus*

Estos resultados indican que la liberación de la ceftriaxona cargada en las aleaciones anodizadas al medio de cultivo, causan la muerte de las bacterias ya que la ceftriaxona tiene un efecto bactericida al inhibir la síntesis de la pared celular de las bacterias. El proceso de síntesis de la pared celular bacteriana es crucial para la integridad de las bacterias. Consiste en la formación de un polímero llamado peptidoglicano, que proporciona rigidez y protección a la pared celular. El peptidoglicano está compuesto por cadenas alternas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico unidos mediante enlaces  $\beta$ -1,4, interconectadas por enlaces peptídicos. La ceftriaxona se une a las proteínas de unión a penicilina (PBPs) en la membrana celular de las bacterias. Estas PBPs están involucradas en la etapa final de la síntesis de peptidoglicano, donde catalizan la formación de enlaces cruzados entre las cadenas de peptidoglicano. Al unirse a las PBPs, la ceftriaxona inhibe su actividad enzimática, lo que interfiere con la formación de los enlaces cruzados necesarios para la síntesis de la pared celular bacteriana. Esto debilita la estructura de la pared celular provocando la lisis y la muerte de las bacterias [168,509–511,515,516,524].

Esto se deduce de los resultados obtenidos, ya que las muestras anodizadas cargadas con el antibiótico muestran una reducción significativa en la población bacteriana debido a la presencia de ceftriaxona (efecto bactericida) en comparación con los resultados de las muestras anodizadas sin carga de antibiótico, donde no hay una reducción en la población bacteriana (Sin efecto antibacteriano).

Estas aleaciones anodizadas de Ti-407 no poseen un efecto antibacteriano intrínseco, lo que podría limitar su aplicación en prótesis o implantes médicos. Es aquí donde se resalta la importancia de este trabajo de tesis, ya que, para superar esta limitación, se ha desarrollado esta estrategia de modificación superficial con estructuras nanotubulares y su posterior carga con antibióticos para conferirles propiedades antibacterianas a las aleaciones, lo que amplía su potencial clínico.

### 5.4.3. Prueba de antibiograma

La figura 43 muestra los resultados obtenidos por el método antibiograma. En la parte superior de la figura (A-D) se presentan las placas anodizadas de la aleación Ti-407 en presencia de las bacterias de *E. coli*, en la parte media de la figura 43 (E-H) se presentan las placas anodizadas de la aleación Ti-407 en presencia de las bacterias de *P. aeruginosa* y en la parte inferior de la figura 43 (I-L) se presentan las placas anodizadas de la aleación Ti-407 en presencia de las bacterias de *S. aureus*. Los resultados obtenidos muestran que las aleaciones anodizadas sin carga de antibiótico no afectan a las bacterias, ya que no se observa la formación de un halo de inhibición, lo que significa que en el área donde se encuentran las placas anodizadas las bacterias no se ven afectadas por el material y pueden seguir creciendo con normalidad. En el caso de las muestras anodizadas cargadas con el antibiótico, se observa la formación de una zona de inhibición en todos los anodizados. Esto sugiere que el antibiótico cargado en los nanotubos se libera y difunde hacia el medio de cultivo, creando un gradiente de concentración alrededor de las placas. Esta zona de alta concentración del antibiótico inhibe el crecimiento bacteriano, impidiendo que las bacterias se desarrollen en esa área específica.

Para todas las muestras anodizadas, el diámetro formado por la zona de inhibición aumenta a medida que el voltaje es más alto. Para las muestras de *E. coli*, el anodizado a 40 V presentó un diámetro de 38.8 mm, el anodizado a 50 V mostró un diámetro de 40.2 mm, mientras que para el anodizado a 60 V se observó un diámetro de 43.1 mm. Para las muestras de *P. aeruginosa*, el anodizado a 40 V presentó un diámetro de 38.1 mm, el anodizado a 50 V mostró un diámetro de 41.7 mm, mientras que para el anodizado a 60 V se observó un diámetro de 46.7 mm. Por último, en las muestras de *S. aureus*, el anodizado a 40 V presentó un diámetro de 38.8 mm, en el anodizado a 50 V se obtuvo un diámetro de 41.7 mm, mientras que para el anodizado de 60 V se observó un diámetro de 43.5 mm.

Estos resultados confirman lo discutido en la sección 5.3, donde se indica que a medida que aumenta el voltaje de anodizado, se espera un mayor volumen encerrado en la superficie tratada. Con base en el diámetro de la zona de inhibición, se puede decir que las bacterias de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* son sensibles al antibiótico liberado por las aleaciones cargadas [510,512,515,524–526]. Estos resultados corresponden al promedio obtenido de tres eventos independientes realizados por triplicado.

Bacteria	Anodizados no cargados	Anodizados cargados con ceftriaxona		
		40 V	50 V	60 V
<i>E. coli</i>	(A)	(B)  38.8mm	(C)  40.2mm	(D)  43.1mm
<i>P. aeruginosa</i>	(E)	(F)  38.1mm	(G)  41.7mm	(H)  46.7mm
<i>S. aureus</i>	(I)	(J)  38.8mm	(K)  41.7mm	(L)  45.3mm

**Figura 43.** Determinación de las propiedades antibacterianas de las aleaciones anodizadas de Ti-407 cargadas y no cargadas con ceftriaxona sobre bacterias patógenos relacionadas con infecciones postoperatorias por el método de antibiograma.

## 5.5. Mediciones de ángulos de contacto

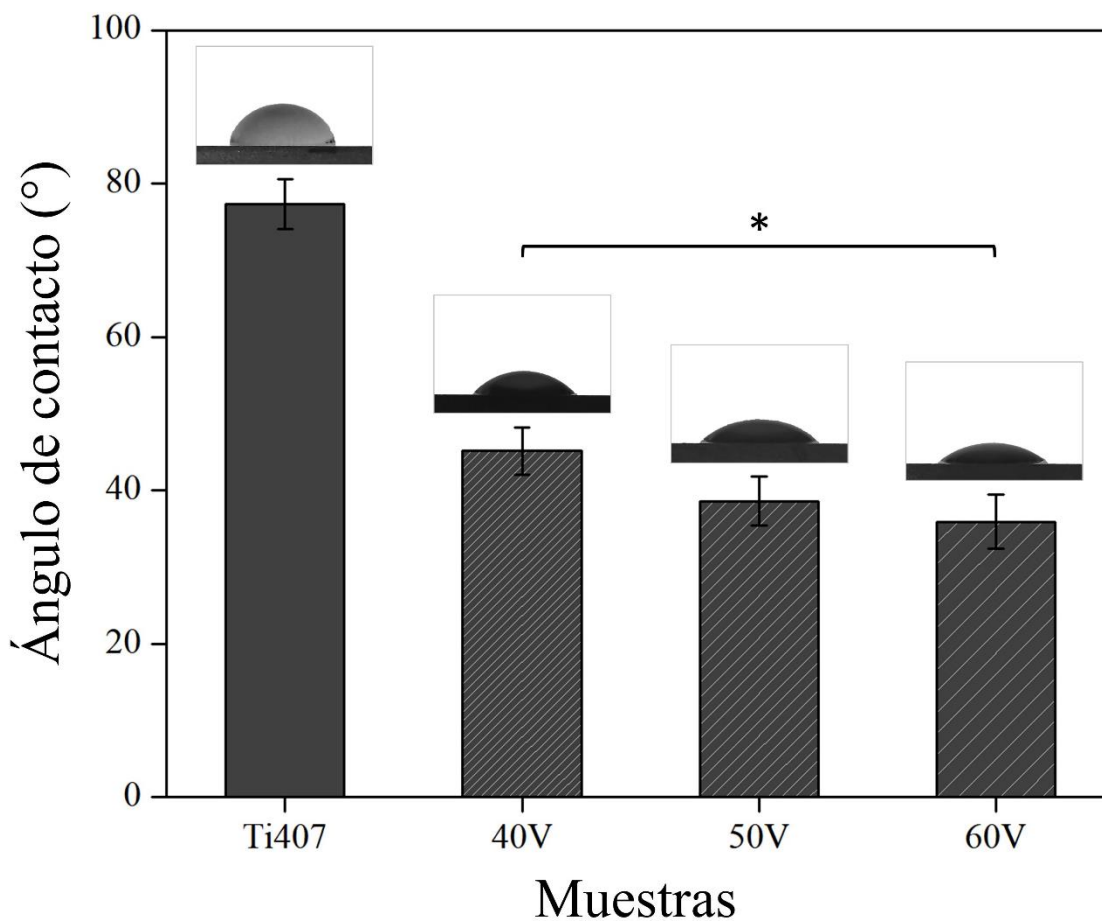
En este trabajo de tesis se realizaron mediciones por ángulo de contacto sobre las aleaciones de Ti-407 control y las aleaciones anodizadas a 40, 50 y 60 V. Estudiar el ángulo de contacto en estas aleaciones anodizadas fue importante porque estas mediciones nos proporcionaron información sobre la capacidad de estas aleaciones para repeler o absorber líquidos lo que puede ser un factor importante en la interacción con los tejidos biológicos. Los ángulos de contacto obtenidos se expresaron como una medida de la hidrofiliidad (afinidad que tiene un material en relación con el agua) de las diferentes superficies.

En la figura 44 se muestran los resultados obtenidos para las mediciones de ángulo de contacto con agua de las aleaciones de Ti-407 control y las aleaciones anodizadas a 40, 50 y 60 V. Las aleaciones control de Ti-407 mostraron ángulos de contacto promedio de  $77.33^\circ$ , similares a lo reportado en estudios previos para aleaciones de titanio [527,528]. Por lo general, se considera que los materiales con ángulos de contacto superiores a  $90^\circ$  son hidrofóbicos, lo que significa que repelen el agua, mientras que los materiales con ángulos de contacto inferiores a  $90^\circ$  se consideran hidrofílicos y tienen una mayor afinidad por el agua. En este sentido, el ángulo de contacto promedio obtenido para la aleación control sugiere propiedades hidrofílicas [529–531]. Por otro lado, las aleaciones anodizadas mostraron ángulos de contacto significativamente menores comparadas con la aleación control (sin anodizar). Las aleaciones anodizadas a 40, 50 y 60 V mostraron ángulos de contacto promedio de  $44.87^\circ$ ,  $38.6^\circ$  y  $36.03^\circ$ . La reducción de los ángulos de contacto en las aleaciones anodizadas es atribuida a la alta porosidad de la nanoestructura [18,532–534]. Los nanotubos pueden atrapar y retener agua en sus poros, lo que facilita un mayor contacto entre el agua y la superficie. Se ha reportado que la formación de nanotubos conduce a un aumento en la rugosidad de la superficie, lo que proporciona más sitios de anclaje para las moléculas de agua [535–537]. Además, la presencia de grupos funcionales en la superficie de la capa de óxido poroso puede aumentar la afinidad química con el agua, lo que resulta en una menor resistencia al mojado y una reducción en el ángulo de contacto. Es importante resaltar que a medida que se incrementó el voltaje de anodizado, el ángulo de contacto disminuyó, por lo tanto, aumentaba la mojabilidad de las muestras. Esto sugiere una relación inversa entre el voltaje de anodizado y la mojabilidad de las aleaciones anodizadas de Ti-407.

Este aumento en la hidrofiliidad puede ser útil en aplicaciones biomédicas en la que se requiera promover la adhesión celular y la interacción con fluidos biológicos. En implantes biomédicos, una superficie hidrofílica puede facilitar la



adhesión de las células (ver sección 5.6.2), lo que promueve la integración y la formación de tejido alrededor del implante. Por otro lado, una mayor interacción con fluidos biológicos puede mejorar la eficiencia de los materiales biomédicos al permitir un intercambio más efectivo de moléculas con el entorno biológico circundante (ver sección 5.3).



**Figura 44.** Los ángulos de contacto en la superficie de Ti-407 y en las aleaciones anodizadas a 40, 50 y 60 V. \*Representa  $P < 0.05$  en comparación con el grupo de control.

## **5.6. Pruebas de biocompatibilidad *in vitro***

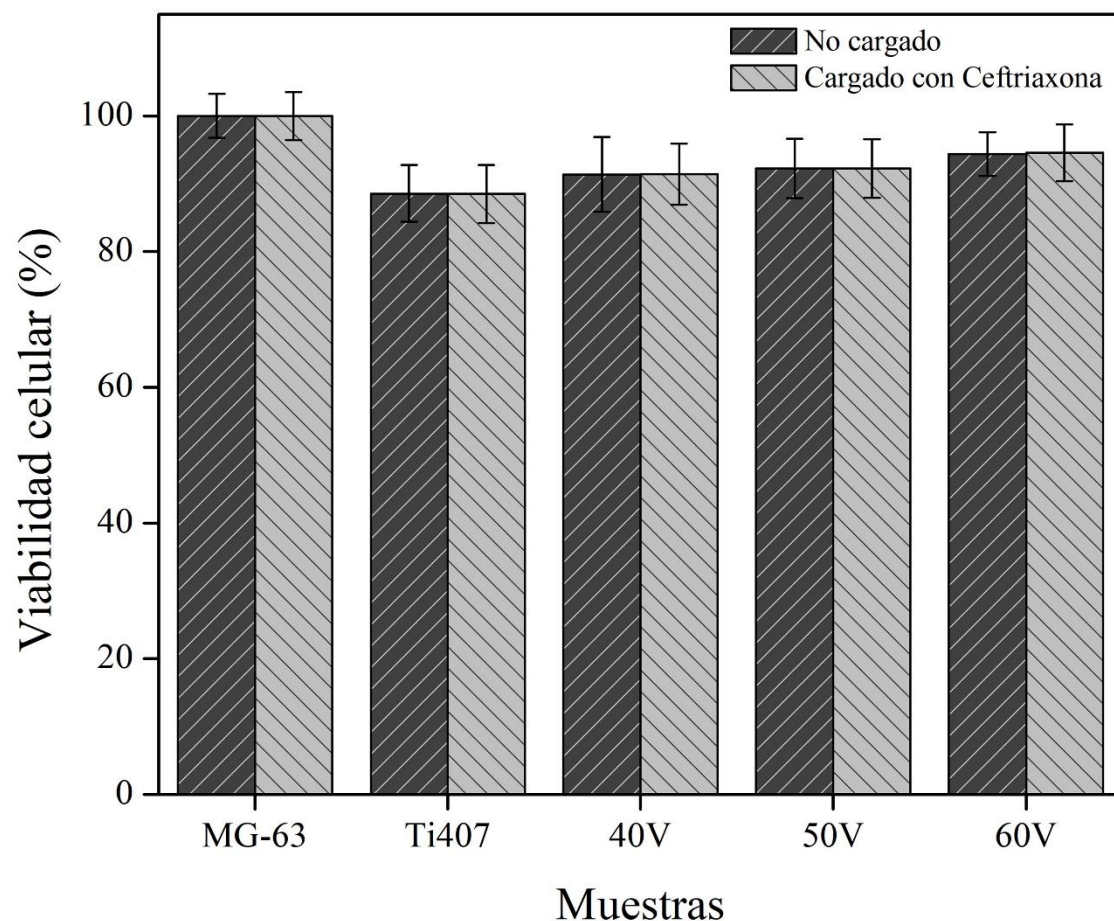
Las pruebas de biocompatibilidad *in vitro* son métodos útiles para evaluar la interacción de los materiales con las células y tejidos. Entre las pruebas utilizadas en esta tesis se encuentran el ensayo de citotoxicidad celular por MTT y las pruebas de adhesión celular por Microscopía de fluorescencia y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Estos ensayos nos permitieron medir la capacidad de las aleaciones de Ti-407 para favorecer o disminuir el crecimiento celular y observar la adhesión de las células a las superficies. Estas propiedades son importantes para el desarrollo de prótesis e implantes biomédicos ya que permiten una evaluación inicial de la biocompatibilidad antes de su uso en aplicaciones clínicas. Esto puede ayudar a identificar posibles problemas de biocompatibilidad y mejorar el diseño de aleaciones de titanio para que sean más compatibles con el cuerpo humano.

### **5.6.1. Actividad citotóxica de las aleaciones por el ensayo colorimétrico de MTT**

Esta prueba de biocompatibilidad *in vitro* nos permitió comparar el efecto de los diferentes tratamientos superficiales sobre la viabilidad celular y detectar posibles efectos adversos de las aleaciones sobre las células.

En la figura 45 se presentan los resultados de viabilidad celular expresados en porcentajes obtenidos mediante el ensayo colorimétrico de MTT al evaluar varias aleaciones de Ti-407 sobre la línea celular de osteoblastos MG-63. Los ensayos de biocompatibilidad *in vitro* incluyeron tanto las aleaciones cargadas con antibióticos como las aleaciones sin carga de antibióticos.

Como se mencionó en las secciones anteriores 5.3 y 5.4, las aleaciones de Ti-407 cargadas con antibióticos se utilizaron para inhibir el crecimiento de bacterias relacionadas con infecciones postoperatorias. Es importante evaluar la viabilidad celular de estas aleaciones para asegurarse de que los antibióticos sean efectivos contra los microorganismos, al tiempo que no sean tóxicos para las células óseas. Con estos ensayos, se busca garantizar que la carga de antibióticos no tenga efectos adversos a largo plazo en las células y los tejidos circundantes, lo que podría comprometer la funcionalidad del material o provocar complicaciones a largo plazo.



**Figura 45.** Actividad citotóxica de las aleaciones anodizadas de Ti-407 sobre osteoblastos de la línea celular MG-63 mediante el ensayo colorimétrico de MTT.

En la primera columna del lado izquierdo se presentan los resultados del control de viabilidad celular (MG-63), estas muestras libres de aleación y antibiótico se utilizaron como punto de referencia (100 %) para evaluar la viabilidad de las otras muestras experimentales.

El control de la aleación de Ti-407 (no anodizada), no presentó citotoxicidad significativa, con un porcentaje de viabilidad celular del 88 %, la elevada viabilidad celular observada en estas muestras puede atribuirse a la presencia de la capa de óxido que se forma de manera natural en las superficies de estas aleaciones de titanio [242,387]. En contraste, la muestra anodizada a 60 V exhibió la mayor viabilidad celular, alcanzando un porcentaje del 94%. En comparación, los

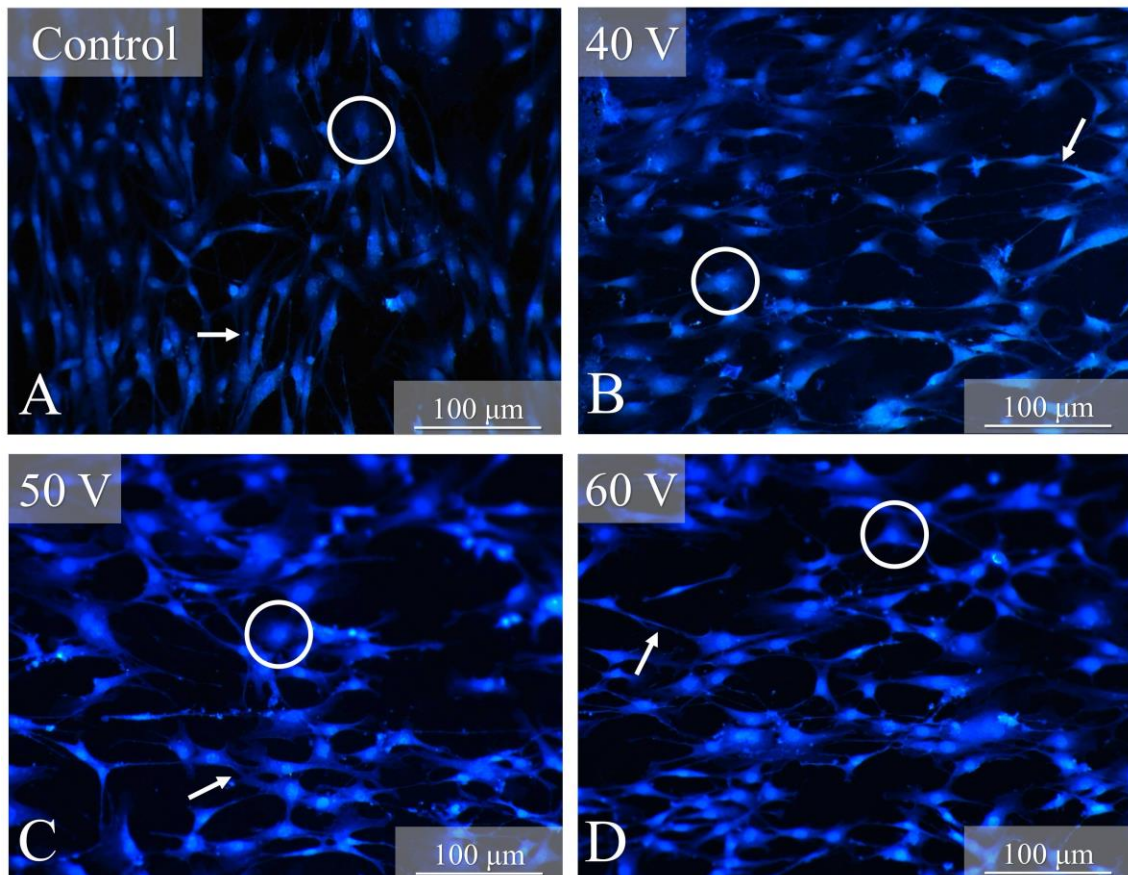
anodizados a 40 V y 50 V mostraron porcentajes de viabilidad celular del 91% y 93%, respectivamente. El porcentaje de viabilidad celular considerado seguro puede variar dependiendo del tipo de células y del propósito de la investigación o aplicación. En general, se considera que un porcentaje de viabilidad celular superior al 70% es aceptable para muchos tipos de células en estudios *in vitro* [239,388,389]. Con base en los resultados obtenidos, la formación de nanotubos sobre la superficie de la aleación Ti-407 a diferentes voltajes de anodizado no generan una citotoxicidad significativa. Además, cabe resaltar que todas las muestras a las que se les añadió antibiótico no presentaron diferencia significativa en el porcentaje de viabilidad celular, por lo que la concentración utilizada de 50 mg/mL se considera óptima para su evaluación [538–540].

La interacción entre las células y las superficies nanoestructuradas puede ser afectada por diversos factores, que incluyen la topografía de la superficie, la energía superficial, la adsorción de proteínas, la conformación y la formación de puntos de adhesión. Se ha reportado que un aumento en el área superficial de las aleaciones puede incrementar la cantidad de proteínas que se adhieren a la superficie, lo cual, a su vez, tiene un impacto en la adhesión y proliferación celular [390–392]. Es importante destacar que la viabilidad celular puede reducirse en los anodizados debido a diferencias fisicoquímicas, como la composición química o la estructura del óxido [102,129]. Además, factores como el tamaño, la forma, el espaciamiento y el desorden de los nanotubos ejercen una influencia significativa en el comportamiento celular [393,394]. Por lo tanto, resulta crucial tener en cuenta estos parámetros al diseñar superficies nanoestructuradas para aplicaciones biomédicas, con el fin de optimizar la interacción celular y mejorar la viabilidad celular tanto en entornos *in vitro* como *in vivo*.

### **5.6.2. Estudio de la adhesión de osteoblastos a las aleaciones mediante técnicas de microscopía**

El estudio de la adhesión de osteoblastos a las aleaciones anodizadas mediante microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de barrido pueden aportar información relevante para el diseño y la selección de aleaciones para aplicaciones biomédicas. En la figura 46 se presentan las imágenes de fluorescencia de osteoblastos MG-63 adheridos a las superficies de las aleaciones de Ti-407. Para observar la adhesión de los osteoblastos, se utilizó el marcador fluorescente DAPI para teñir los núcleos celulares, el cual se une a la estructura del ADN de manera muy específica, por lo que su emisión de luz azul contrastante nos permitió una fácil visualización de las células presentes en las muestras [395–397].

En la figura 46 (A) se muestran los núcleos teñidos de células adheridas sobre la superficie de la aleación control de Ti-407 (señalados con un círculo de color blanco), en esta imagen, se observa una abundancia de núcleos teñidos, cada uno representando una célula adherida a la superficie de la aleación. Es necesario enfatizar que la adhesión celular es una propiedad muy importante que deben tener los biomateriales que son utilizados como implantes y prótesis médicas. La capacidad de las células para adherirse a las superficies es fundamental para el éxito a largo plazo de la integración de los biomateriales en los tejidos corporales y la implantación de dispositivos médicos [77,241,398]. En este contexto, la observación de un gran número de núcleos teñidos en la superficie de la aleación de control Ti-407 indica que la aleación tiene una buena capacidad de adhesión celular. Esto sugiere que la aleación Ti-407 puede ser un material seguro para aplicaciones biomédicas que requieren una buena integración tisular. Esta tendencia también se observó para las aleaciones anodizadas. En la figura 46, se muestran los núcleos teñidos adheridos a la superficie de las aleaciones anodizadas (señalados con un círculo de color blanco) a 40 V (B), 50 V (C), 60 V (D). La distribución de los núcleos teñidos se aprecia a lo largo de la superficie de los anodizados, y también se puede observar la morfología celular con extensiones del citoesqueleto celular que las células han desarrollado en toda la superficie (señaladas con una flecha de color blanco). Como ya hemos discutido en la sección 5.2.2, las superficies activas de estas aleaciones anodizadas tienen estructuras porosas de tamaño nanométrico, esto puede ser beneficioso para la adhesión celular, ya que se ha reportado que los componentes celulares en el rango nanométrico tienen una mayor facilidad para adherirse a este tipo de superficies nanoestructuradas.



**Figura 46.** Imágenes de fluorescencia (DAPI) de osteoblastos MG-63 adheridos a las superficies de Ti-407. (A) Control, (B) 40 V, (C) 50 V, (D) 60 V.

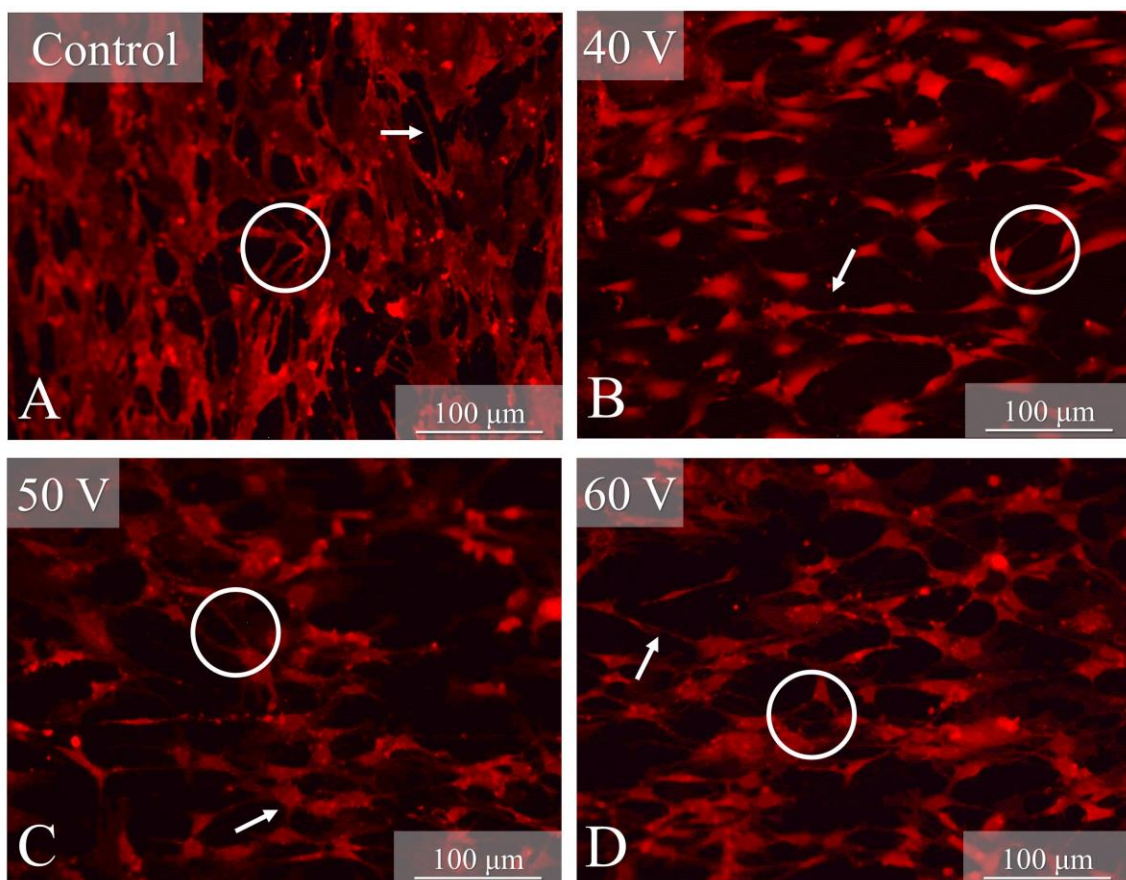
La adhesión celular es un proceso importante en la regeneración y la reparación tisular, por lo que, los materiales que permitan una mejor adhesión celular podrían promover la integración del material en el tejido y reducir el tiempo de regeneración ósea. En este sentido, los anodizados con superficie activa nanométrica pueden ser una opción interesante para aplicaciones biomédicas [20,242,337]. Para complementar la observación de los osteoblastos adheridos a las superficies de las aleaciones de Ti-407, se añadió otro marcador fluorescente a las muestras, como ya se mencionó en el capítulo de metodología 3.4.3, este procedimiento de fluorescencia implicó el uso de un anticuerpo primario anti- $\beta$ -actina de ratón y un anticuerpo secundario conjugado anti-ratón con PE (ficoeritrina) para la observación del citoesqueleto de los osteoblastos por medio de la fluorescencia de la proteína actina. La emisión de actina por fluorescencia (color rojo) permite visualizar la interacción y la organización de la actina en los osteoblastos con alta resolución espacial. Estos resultados proporcionaron

información importante sobre el andamiaje celular, la adhesión celular, procesos relacionados con la migración celular, la división celular y otros eventos que involucran cambios en el citoesqueleto de actina [17,241,395].

En la figura 47 (A) se visualiza la disposición y la estructura de los filamentos de actina de células adheridas sobre la superficie de la aleación control de Ti-407 (señalados con un círculo de color blanco). Se puede apreciar la estructura del citoesqueleto de forma aplanada y extendida, lo cual indica una buena adhesión y propagación celular. Además, podemos observar una distribución uniforme y bien extendida de las estructuras celulares que indican una muy buena adhesión y proliferación celular. Esta capacidad de adhesión y proliferación celular también se observó para las aleaciones anodizadas. En la figura 47, se muestran la disposición y la estructura de los filamentos de actina de células adheridas sobre la superficie de las aleaciones anodizadas de Ti-407 (señalados con un círculo de color blanco) a 40 V (B), 50 V (C), 60 V (D). En la imagen se puede apreciar la distribución y estructura de los filamentos de actina a lo largo de la superficie de los anodizados. Además, se observan las extensiones del citoplasma que las células han desarrollado, abarcando toda la superficie (señaladas con flechas de color blanco). Durante la adhesión y extensión celular, las células pueden generar estructuras especializadas, como filopodios y lamelipodios [541–544]. Estas proyecciones celulares son importantes para la migración y la exploración del entorno celular. La presencia de filopodios y lamelipodios en las células adheridas a las aleaciones anodizadas de Ti-407 indican una buena interacción y capacidad de las células para extenderse y explorar la superficie del material [306,545]. Al analizar las imágenes de la figura 47, podemos observar que las superficies de los anodizados de Ti-407 están densamente pobladas por células lo que indica una muy buena proliferación y adhesión celular en estos materiales.

Es necesario enfatizar que la adhesión celular es un fenómeno importante en diversas aplicaciones de los biomateriales como implantes y prótesis. La capacidad de las células para adherirse a las superficies es fundamental para el éxito a largo plazo de la integración de los biomateriales en los tejidos corporales y la implantación de dispositivos médicos [77,241,398].





**Figura 47.** Imágenes de fluorescencia (Actina) de osteoblastos MG-63 adheridos a las superficies de Ti-407. (A) Control, (B) 40 V, (C) 50 V, (D) 60 V.

Sí las células presentaran una baja adhesión, no se observarían células o se observarían estructuras pequeñas y redondas que sugieren una menor afinidad hacia el material con el que interactúan, además se presentaría una distribución desigual o agrupada de las estructuras celulares que indican áreas de baja adhesión o incluso nula adhesión celular como consecuencia de áreas menos favorables para la adhesión y el crecimiento celular. En este contexto, la presencia de estructuras como los filamentos de actina en la superficie de las aleaciones anodizadas de Ti-407 indican que los nanotubos tienen una buena capacidad de adhesión celular [17,241]. La actina es una proteína clave en la organización del citoesqueleto celular y desempeña un papel fundamental en el andamiaje, la adhesión y propagación celular por lo que la observación de la fluorescencia de actina en las muestras de Ti-407 es un indicativo de la excelente biocompatibilidad y de la posible capacidad de integración de estas aleaciones



de titanio con los tejidos [546,547]. Sin embargo, en el control se observan las células de mayor tamaño en comparación con las células observadas en los tres tratamientos, observándose mejor morfología en el tratamiento de superficies de Ti-407 a 60V. Existen diversos factores que pueden influir en el tamaño y la morfología de las células observadas, una posible explicación podrían ser la interacción con la superficie, por lo que la muestra control y el anodizado a 60V podrían haber proporcionado un entorno más favorable para el crecimiento celular en comparación con las otras muestras anodizadas, lo que resultó en un aumento en el tamaño y una mejor morfología celular.

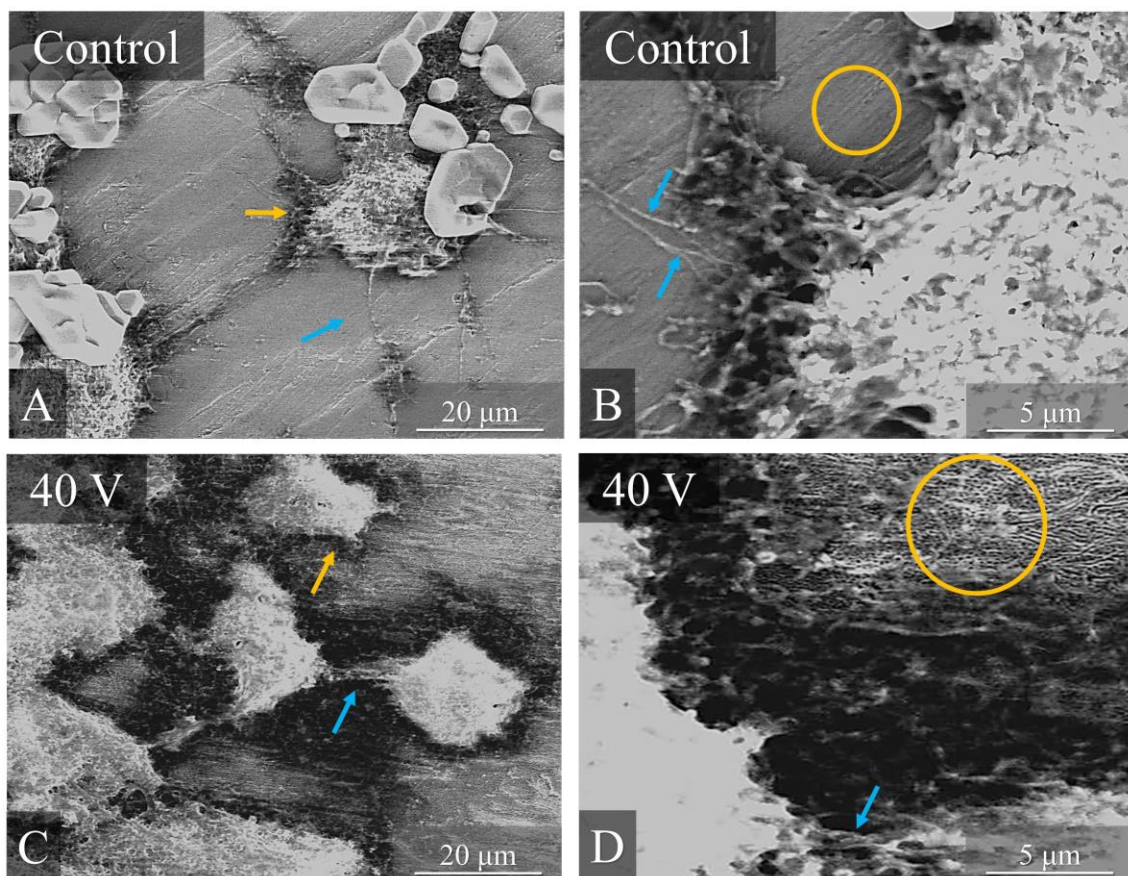
Por otro lado, los resultados obtenidos a través de la observación de osteoblastos MG-63 adheridos a superficies de las aleaciones Ti-407 mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) se presentan en las figuras 48 y 49. En las imágenes obtenidas por SEM, los osteoblastos se pueden observar cómo células alargadas y estrelladas con numerosas prolongaciones citoplasmáticas que se extienden en diferentes direcciones. Estas células y prolongaciones pueden verse claramente, mostrando un contraste claro con respecto a la superficie de la muestra. En la figura 48 (A) se puede apreciar los osteoblastos adheridos a la superficie de la aleación control de Ti-407, las células señaladas con una flecha de color amarillo presentan una morfología extendida, con prolongaciones celulares (filopodios o lamelipodios) que se extienden en la superficie del material (señaladas con flechas de color azul). Estas prolongaciones celulares indican una interacción celular favorable con la aleación y una adherencia sólida [548]. También es posible observar en la figura 48 (B) osteoblastos firmemente adheridos a la superficie de la aleación, mostrando un anclaje estable. Esto se puede identificar por una clara conexión entre las prolongaciones celulares (señaladas con flechas de color azul) y la superficie del material (señalada con un círculo de color amarillo), indicando una unión sólida entre las células y la aleación control de Ti-407. Es posible apreciar algunos cristales de sal, como resultado de los lavados con PBS, es posible que los lavados requieran el uso de otras soluciones como agua desionizada para evitar la presencia de estos cristales en las muestras [119].

La capacidad de adhesión celular también se observó en las aleaciones anodizadas. En la figura 48 (C), se pueden apreciar los osteoblastos adheridos a la superficie de la aleación anodizada a 40 V, se observa que las células (señaladas con una flecha de color amarillo) también presentan una morfología extendida con prolongaciones celulares que se extienden de manera prominente en la superficie nanoestructurada del material (señaladas con flechas de color azul). Estas prolongaciones celulares indican una interacción celular altamente favorable y una adherencia sólida a la superficie de la aleación. Mientras que, en

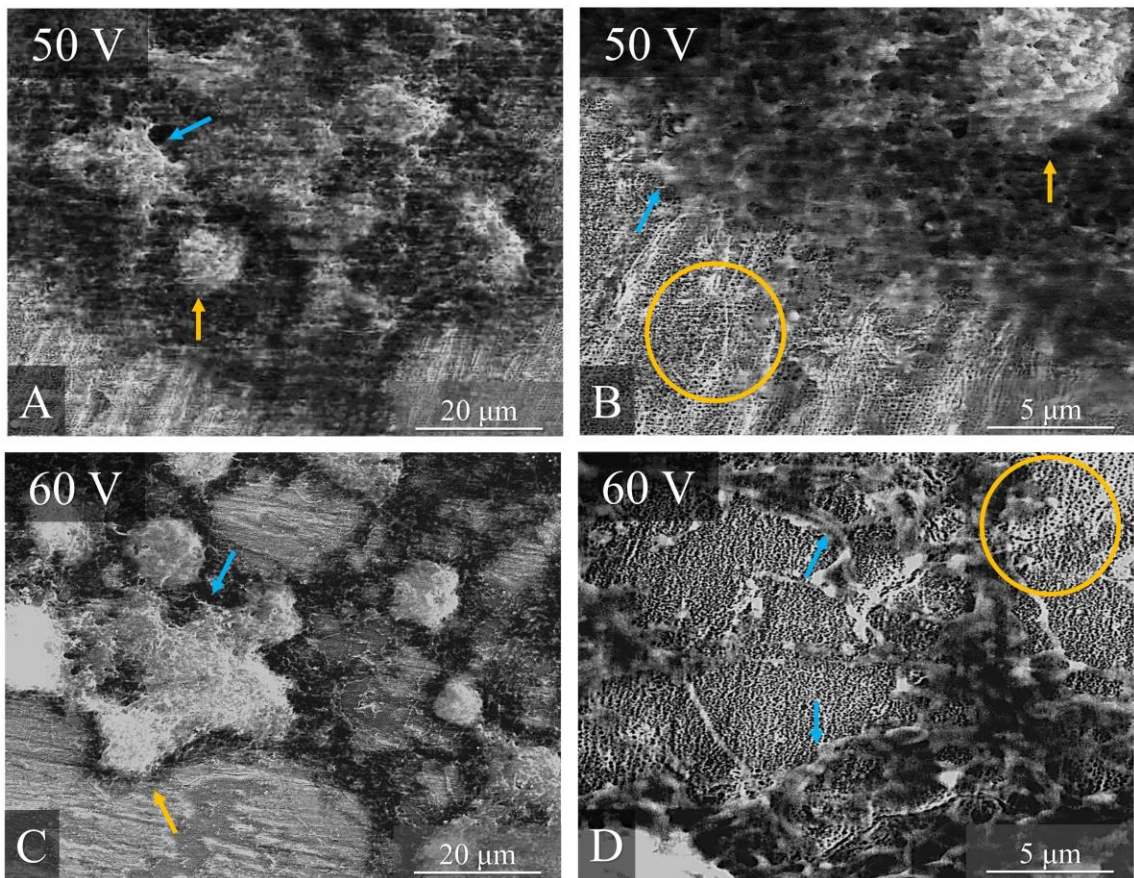
la muestra anodizada a 50 V (figura 49 A), los osteoblastos exhiben una morfología similar (señalados con una flecha de color amarillo), con prolongaciones celulares bien desarrolladas y claramente visibles que se extienden en la superficie del material, demostrando una interacción celular positiva y una adhesión estable (señaladas con flechas de color azul). Por último, en la muestra anodizada a 60 V (figura 49 C), se observa nuevamente una morfología extendida de los osteoblastos (señaladas con flechas de color amarillo) con prolongaciones celulares notorias (señaladas con una flecha de color azul), lo que indica una interacción celular favorable y una unión sólida con la superficie.

Además, en las figuras 48 (D), 49 (B) y 40 (D) es posible observar los nanotubos presentes en las aleaciones (señalados con un círculo de color amarillo). En todas las aleaciones anodizadas se puede apreciar una conexión clara y directa entre las prolongaciones celulares y los nanotubos, que indican una adhesión fuerte y estable entre las células y los nanotubos sintetizados a diferentes voltajes [253]. También es posible observar cómo los osteoblastos se extienden y ramifican en diferentes direcciones (señaladas con flechas de color azul). Este comportamiento indica una respuesta activa de los osteoblastos a los nanotubos, por su capacidad para extenderse y explorar el entorno nanoestructurado. La presencia de nanotubos en la superficie de las aleaciones puede influir en la adhesión y el comportamiento de las células, ya que se ha reportado que las superficies nanoestructuradas ofrecen una mayor área de interacción, lo que podría promover la osteointegración y la biocompatibilidad en comparación con superficies lisas o microestructuradas [549–551].

La capacidad de las células para adherirse a la superficie de las aleaciones anodizadas de Ti-407 es crucial para lograr una unión óptima entre el material del implante y el tejido circundante. Una buena adhesión celular puede promover la formación de tejido óseo y reducir la tasa de fracaso del implante debido a la falta de integración con el hueso. En general, la observación de imágenes de fluorescencia con marcadores como DAPI o actina en aleaciones de titanio, así como la observación de las células por SEM proporciona una valiosa información sobre la adhesión celular, la propagación, la migración y las interacciones entre las células y los materiales. Esto es esencial para comprender la biocompatibilidad de las aleaciones de titanio y para el desarrollo de dispositivos médicos más efectivos y seguros.



**Figura 48.** Imágenes obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido de los osteoblastos MG-63 adheridos a las superficies de Ti-407. Control (A-B), vista superficial a 20 y 5 μm respectivamente y 40 V (C-D), vista superficial a 20 y 5 μm respectivamente.



**Figura 49.** Imágenes obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido de los osteoblastos MG-63 adheridos a las superficies de Ti-407. 50 V (A-B), vista superficial a 20 y 5  $\mu\text{m}$  respectivamente y 60 V (C-D), vista superficial a 20 y 5  $\mu\text{m}$  respectivamente.

## **5.7. Electrodeposición de iones bioactivos sobre aleaciones de Ti-407**

La electrodeposición de iones bioactivos sobre aleaciones de Ti-407 es una técnica que podría mejorar las propiedades superficiales de estos materiales para su uso en aplicaciones biomédicas [307,308,552]. Los iones bioactivos, como el calcio, el fósforo, el potasio, el magnesio y el zinc se depositaron sobre la superficie de la aleación Ti-407 mediante un proceso electroquímico controlado por una fuente de corriente. El objetivo de estos experimentos fue formar un recubrimiento bioactivo que pudiera favorecer la adhesión y el crecimiento de células óseas y dilucidar las propiedades biocompatibles, así como los mecanismos de deposición de minerales bioactivos sobre aleaciones de titanio.

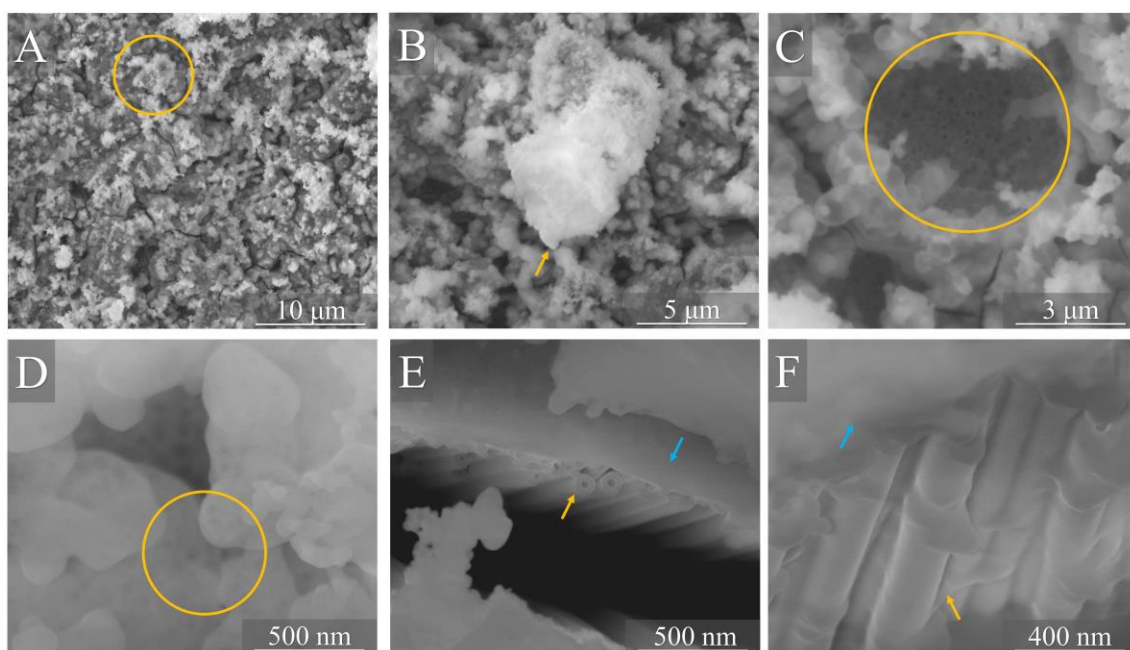
### **5.7.1. Caracterización de la morfología y composición elemental de los recubrimientos bioactivos por SEM-EDS**

La caracterización de la morfología y la composición elemental de estos recubrimientos bioactivos fue fundamental para evaluar su calidad y su desempeño biológico. La figura 50, muestra imágenes por SEM de los recubrimientos sintetizados por electrodeposición sobre la superficie de la aleación control de Ti-407 y la aleación anodizada a 50 V. El anodizado a 50 V fue seleccionado como resultado de los hallazgos obtenidos en las pruebas de biocompatibilidad *in vitro*.

En la figura 50 A, se puede observar el recubrimiento sintetizado sobre la superficie de la aleación control, este recubrimiento posee una estructura granular, lo que significa que se pueden observar partículas o gránulos (ver figura 50 B) que componen la capa del recubrimiento [553,554]. Estos gránulos (señalados con una flecha de color amarillo) poseen tamaños y formas variables, además de encontrarse distribuidos por toda la superficie de la aleación. En la figura 50 C, se puede apreciar el recubrimiento sintetizado sobre la superficie nanoestructurada de la aleación anodizada a 50 V. De igual manera, se logra observar un recubrimiento granular sobre la superficie de los nanotubos (ver figura 50 C). Es importante resaltar que a medida que nos acercamos a la escala nanométrica podemos observar el fondo de la capa nanotubular (ver figura 50 D), esto nos da una idea de las características del espesor del recubrimiento. El bajo espesor del recubrimiento permite que la señal de los electrones secundarios de los nanotubos pueda ser detectada para formar imágenes de alta resolución de



la muestra [555–557]. También fue posible observar áreas donde el recubrimiento se desprendió (ver figura 50 C) que indicaría una falta de unión adecuada entre el recubrimiento y la aleación [558–560]. Por último, en las figuras 50 E y F, mediante un corte transversal fue posible observar como el recubrimiento (señalado con flechas de color azul) se encontraba depositado sobre las estructuras cilíndricas o tubulares típicas de los nanotubos de titanio (señalados con flechas de color amarillo).



**Figura 50.** Vista superior (A, B, C y D) y sección transversal (E y F) de la electrodeposición de iones bioactivos sobre la superficie nanoestructurada de la aleación Ti-407.

Durante la electrodeposición, se generó un campo eléctrico en la solución electrolítica que indujo una serie de reacciones de óxido-reducción en la superficie de la aleación Ti-407 a electrodepositar con el fin de obtener un recubrimiento bioactivo. Los iones metálicos presentes en la solución electrolítica se desplazan hacia la superficie del sustrato cargado negativamente (cátodo) debido al campo eléctrico aplicado (5 V). Estos iones se reducen, lo que significa que ganan electrones para formar átomos neutros en la superficie de la aleación. Los iones reducidos se adhieren a la superficie del cátodo y forman un recubrimiento. A medida que se continúa aplicando el voltaje, los iones

adicionales se adhieren y se depositan sobre la capa inicial, lo que resulta en un crecimiento gradual del recubrimiento bioactivo [561–564].

Una vez observada la morfología de los recubrimientos sintetizados sobre las muestras de Ti-407, se procedió a caracterizar su composición química por medio de energía dispersiva de Rayos X (EDS). Como se puede observar en la Tabla 8, los análisis realizados en diferentes posiciones de los recubrimientos mostraron que cada muestra anodizada y electrodepositada estaba compuesta principalmente por los elementos O, P, K, Mg, Cl, Ca y Zn.

**Tabla 8.** Análisis de la composición elemental (EDS) de la electrodeposición de iones bioactivos sobre la superficie nanoestructurada de la aleación Ti-407

Muestra	Composición elemental (wt. %)										
	Ti	V	Al	O	F	P	K	Mg	Cl	Ca	Zn
Control	67.7	4.2	0.80	10.5	-	-	-	-	-	-	-
Anodizada	49.2	-	0.53	26.3	2.34	-	-	-	-	-	-
Anodizada y Electrodepositada	-	-	-	40.7	-	20.7	9.96	4.04	0.57	17.6	0.66

En el caso de la muestra de interés en esta sección: anodizada y electrodepositada, se observa un aumento significativo en los contenidos de fósforo (20.7%), potasio (9.96%), magnesio (4.04%), cloro (0.57%), calcio (17.6%), y zinc (0.66%). La presencia de estos elementos confirma la incorporación a la superficie de todos los iones presentes en la solución electrolítica utilizada durante el proceso de electrodeposición. A medida que los iones se redujeron y se depositaron en la superficie anodizada, estos elementos se incorporaron creando un recubrimiento, lo que resultó en un aumento de su presencia en la composición elemental de esta muestra. Por otro lado, el recubrimiento modificó o enmascaró parcialmente la composición elemental de la superficie original, ya que no se detectó la presencia de los elementos de la aleación base como titanio, vanadio y aluminio en la muestra anodizada y electrodepositada mediante el análisis de composición elemental por EDS. Para una evaluación más precisa de la composición elemental y la distribución de elementos en la muestra anodizada y electrodepositada, es recomendable utilizar

técnicas analíticas complementarias como la espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS).

### **5.7.2. Actividad citotóxica de los recubrimientos bioactivos por el ensayo colorimétrico de MTT**

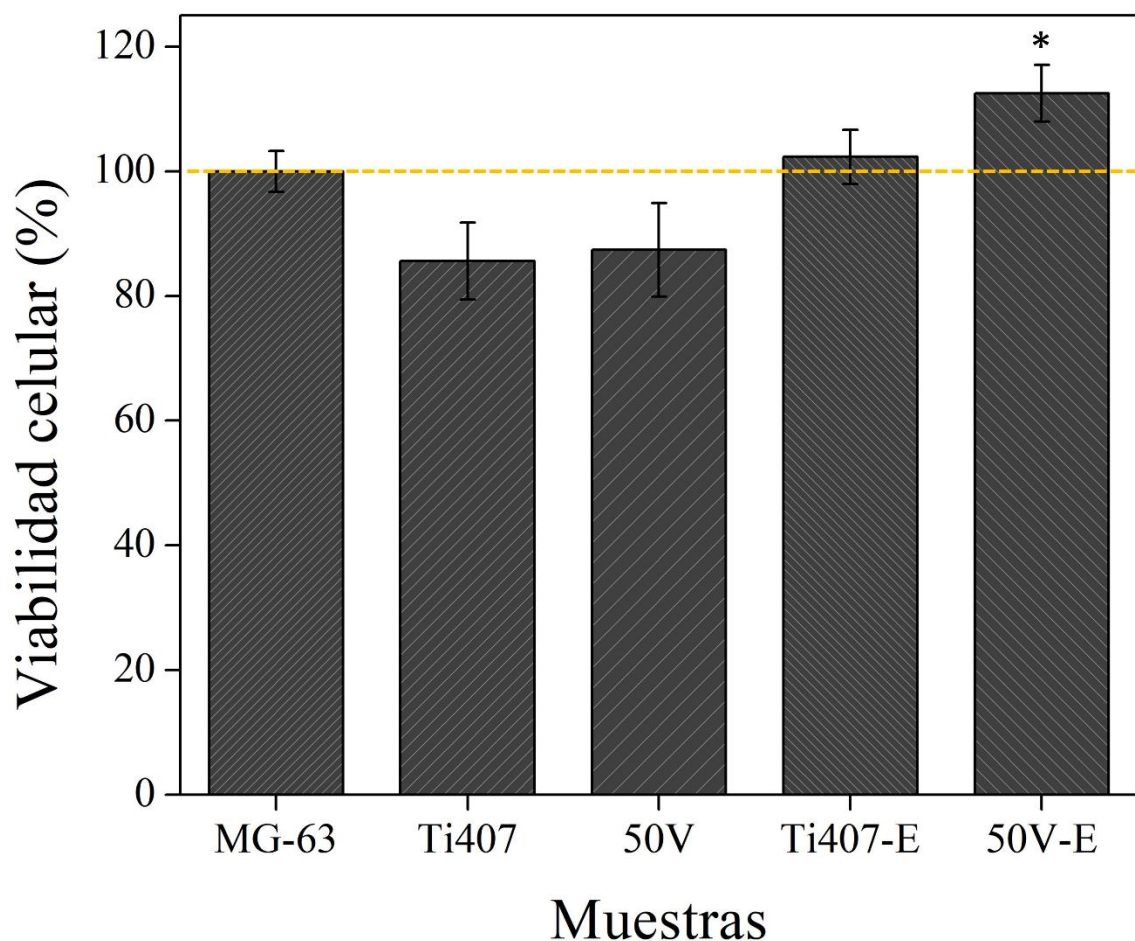
En la figura 51 se muestran los resultados de viabilidad celular expresados en porcentajes, obtenidos mediante el ensayo colorimétrico de MTT al evaluar las aleaciones de Ti-407 con los recubrimientos bioactivos sintetizados por electrodeposición sobre la línea celular de osteoblastos MG-63.

En la primera columna del lado izquierdo se presentan los resultados del control de viabilidad celular (MG-63), estas muestras libres de aleación y recubrimientos se utilizaron como punto de referencia (100 %) para evaluar la viabilidad de las otras muestras experimentales. El control de la aleación de Ti-407 sin anodizar, y la aleación anodizada a 50 V no presentaron citotoxicidad aparente, con un porcentaje de viabilidad celular del 85 y 87% respectivamente. Esta viabilidad celular puede atribuirse tanto a la formación natural de una capa de óxido en las superficies de las aleaciones de Ti-407 sin anodizar, como a la formación de nanotubos en la superficie anodizada (ver figura 29) [102,129,387].

Por otra parte, las aleaciones control de Ti-407 y las anodizadas a 50 V que tenían los recubrimientos bioactivos fueron las muestras que presentaron la mayor viabilidad celular, con un porcentaje del 102.3 y 112.5 % en comparación con la muestra control (100 %). Este aumento significativo en el porcentaje de viabilidad celular puede ser atribuido a diversos factores:

- Los iones bioactivos presentes en el recubrimiento podrían estar imitando los iones que se encuentran en la matriz extracelular, proporcionando un entorno más favorable para el crecimiento y la función celular en comparación con las condiciones de cultivo convencionales [565–567].
- El recubrimiento con iones bioactivos podría estar promoviendo una mejor adhesión de las células a la superficie de las muestras. Esto significa que las células tienen una mayor capacidad para unirse y extenderse sobre toda la superficie, lo que mejora la interacción entre las células y el material [568–570].





**Figura 51.** Actividad citotóxica de las aleaciones anodizadas y electrodepositadas de Ti-407 sobre osteoblastos de la línea celular MG-63 mediante el ensayo colorimétrico de MTT.

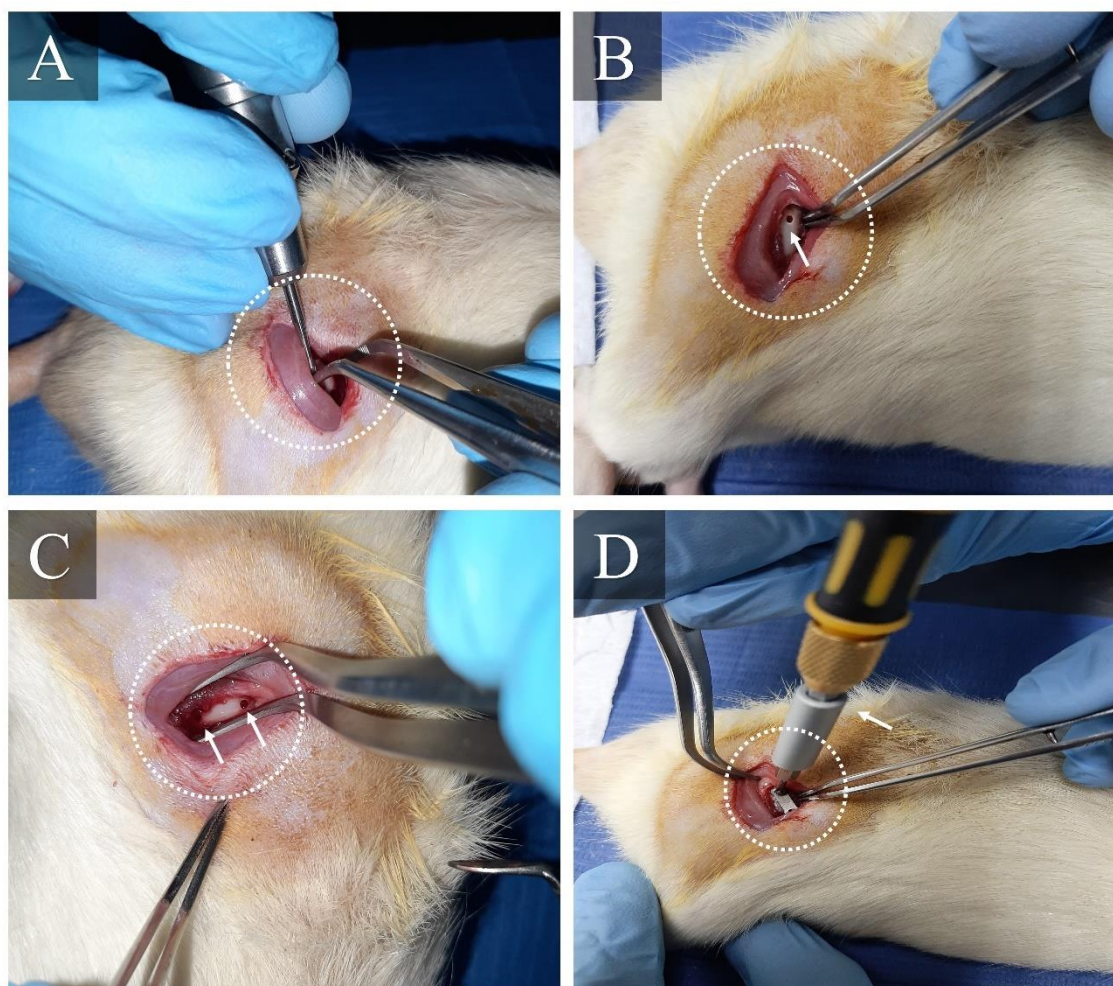
- Los iones bioactivos pueden estar influyendo en la proliferación celular, estimulando la división y reproducción de las células MG-63. Esto puede llevar a un aumento en el número de células viables y, por lo tanto, a un mayor porcentaje de viabilidad en la prueba de MTT [571,572].
- Los iones bioactivos liberados por el recubrimiento pueden tener efectos beneficiosos en las células circundantes. Estos iones pueden actuar como factores de crecimiento, estimulando la supervivencia y el crecimiento celular [565,573,574].

- Los iones bioactivos pueden facilitar la comunicación intercelular. Lo que significa que las células pueden enviar señales más efectivas entre sí, lo que promueve la supervivencia y la función celular [572,575,576].

Con base en los resultados obtenidos, la combinación de las aleaciones de Ti-407 con recubrimiento de iones bioactivos por electrodeposición pueden estar proporcionando un entorno más favorable para el crecimiento y la función celular de los osteoblastos MG-63 en comparación con las aleaciones sin recubrimiento. Sin embargo, es importante realizar más estudios para comprender los mecanismos detrás de estos resultados.

## **5.8. Estudio de la biocompatibilidad *in vivo* mediante la implantación quirúrgica de la aleación Ti-407**

En este estudio se realizó la implantación quirúrgica de la aleación Ti-407 en el fémur de ratas Wistar para analizar su comportamiento biológico post-implantación durante 30 días. La aleación de control Ti-407 fue seleccionada en base a los resultados obtenidos en las pruebas de biocompatibilidad *in vitro*. Se llevaron a cabo cirugías en el fémur de 6 ratas Wistar. Las ratas fueron anestesiadas intraperitonealmente con una solución de ketamina (100 mg/mL) y xilacina (100 mg/mL). Se preparó la pata posterior derecha de cada rata para la operación aséptica mediante una incisión de 2 cm, como se muestra en la figura 52 (A). El músculo fue dividido en la dirección de sus fibras para exponer el fémur. Se utilizó una pieza de mano de alta velocidad con una fresa de acero de 1.5 mm de diámetro para crear dos surcos de fijación de las mismas dimensiones, señalados con flechas blancas en las figuras 52 (B, C). Se realizó una fractura vertical en el fémur utilizando un contraángulo dental. Las superficies de la fractura se colocaron en contacto sin compresión y se implantó la aleación Ti-407 para su fijación interna. Se estabilizó con dos tornillos de acero inoxidable de 1 mm de longitud para restablecer la alineación anatómica del fémur, como se muestra en las figuras 52 (D) y 53 (A). Después de la operación, se procedió a suturar los tejidos (ver figura 53 B) y se administró una solución inyectable de ketorolaco (10 mg/kg/día) para el tratamiento del dolor, así como gentamicina (1 mg/kg) para prevenir infecciones.



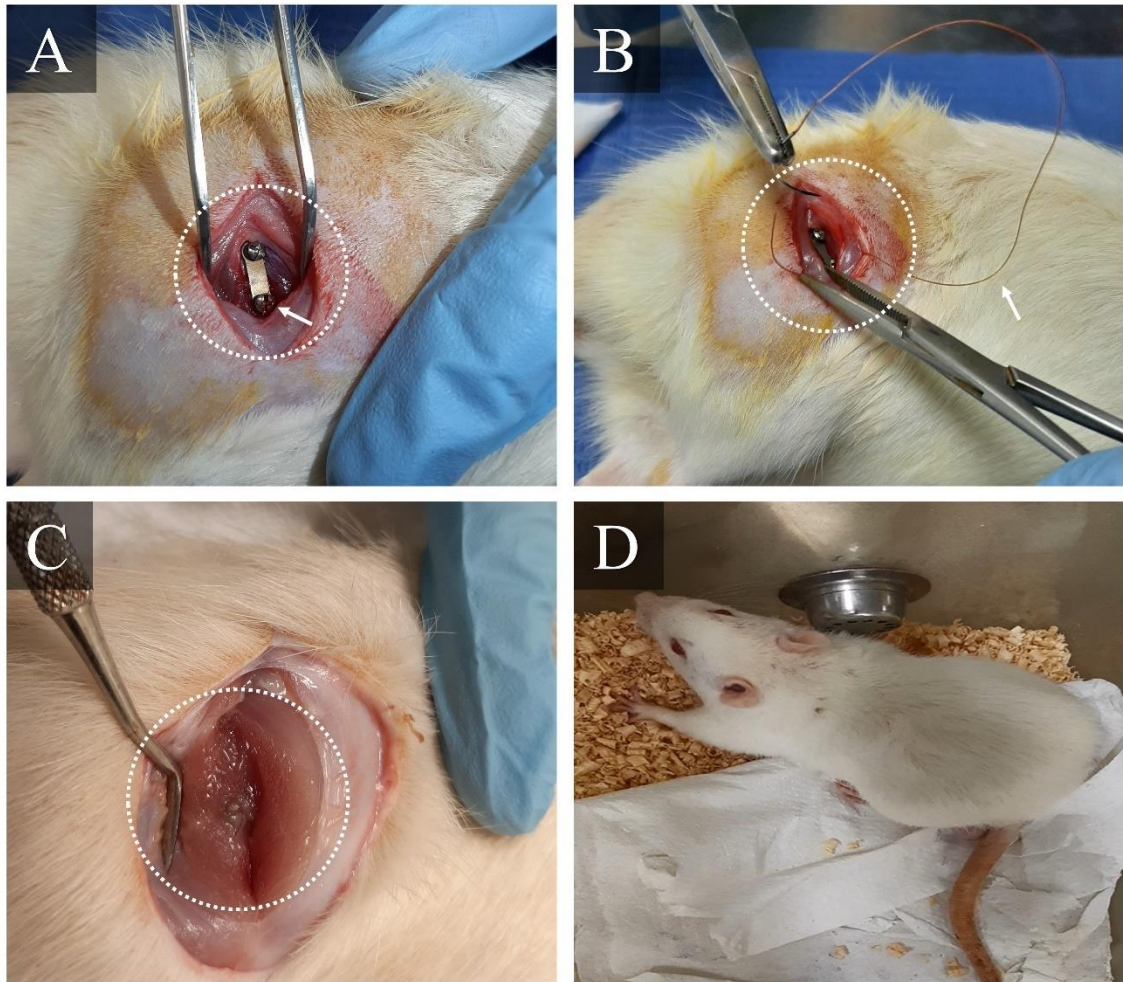
**Figura 52.** Procedimiento quirúrgico realizado sobre el fémur de ratas Wistar como modelo de experimentación *in vivo*. (A) incisión y empleo de la pieza de mano de alta velocidad, (B, C) obtención de los surcos de fijación, (D) fijación del implante óseo de Ti-407.

Una vez concluidos los procedimientos quirúrgicos, se recopilaron datos relevantes que nos permitieron determinar la biocompatibilidad *in vivo* de la aleación Ti-407 durante un periodo de 30 días. Se evaluó la integración de la aleación Ti-407 con los tejidos circundantes (ver figura 53 C). Se observó una buena adhesión y crecimiento de tejido alrededor del material, lo que indica una buena biocompatibilidad y una cicatrización adecuada. Después de la implantación, es común que se produzca una respuesta inflamatoria localizada en el sitio de implante [577–579]. Esta respuesta puede incluir enrojecimiento, hinchazón y aumento de la temperatura en la zona. El monitoreo realizado a los

modelos animales durante su periodo de recuperación fue positivo ya que la respuesta inflamatoria fue mínima, lo que indica una baja irritación del tejido en el sitio de implantación. Además, no se detectaron signos de infección. Es importante tener en cuenta que el riesgo de infección puede presentarse por diversos factores, como las técnicas quirúrgicas utilizadas, las condiciones de esterilidad durante el procedimiento y la respuesta inmunológica de los modelos animales [580–582]. Por lo tanto, la ausencia de infección nos indica que se llevaron a cabo buenas prácticas de asepsia y esterilización durante el procedimiento quirúrgico que minimizaron el riesgo de infección. También se evaluó el comportamiento de los modelos animales después del procedimiento quirúrgico [583–585]. Cabe mencionar que, aunque los implantes de Ti-407 se implantaron en el fémur de los modelos animales y no tienen un impacto directo en el comportamiento del animal, es importante observar cualquier cambio o alteración en su comportamiento general que pudiera estar relacionado con la biocompatibilidad del material (ver figura 53 D). Los modelos animales mostraron una actividad normal, sin signos de malestar o dolor excesivo, lo cual indica una respuesta favorable al implante, también mantuvieron su apetito normal después del procedimiento. Se observó que los modelos animales no experimentaron alteraciones en su patrón de sueño o dificultades para descansar, además interactuaron de manera normal con otros modelos animales en su entorno. Si se hubieran observado cambios significativos en el comportamiento de los modelos animales, como pérdida de apetito, alteraciones en el sueño o descanso y aislamiento o agresión inusual, estas condiciones podrían indicar malestar, incomodidad y una respuesta negativa al implante.

Es importante mencionar que se observó una buena osteointegración, es decir, se observó un crecimiento óseo alrededor del implante. La observación de una buena osteointegración podría indicar que la aleación Ti-407 es capaz de promover la formación de tejido óseo alrededor del implante, lo que es un resultado altamente deseable. Sin embargo, para confirmar la biocompatibilidad de la aleación Ti-407 y obtener una evaluación completa, es necesario realizar pruebas adicionales, como el análisis histológico y otras técnicas de evaluación que nos proporcionarán información más detallada sobre la respuesta de los tejidos y la interacción con el material implantado.





**Figura 53.** Procedimiento quirúrgico realizado sobre el fémur de ratas Wistar como modelo de experimentación *in vivo*, (A) posición final de la placa sobre el fémur (B) procedimiento de sutura para unir los tejidos, (C) formación de tejido nuevo en el área donde se realizó la fractura sin signos de inflamación (D) modelo animal evaluado, el animal sobrevivió al proceso quirúrgico, conservó el implante durante el periodo de evaluación y su comportamiento biológico no se vio alterado.

## 6. CONCLUSIONES

- Fue posible la funcionalización de la superficie de la aleación de Ti-24Zr-10Nb-2Sn mediante la formación de estructuras nanotubulares utilizando la técnica de anodización empleando una solución electrolítica de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{NH}_4\text{F}$ , aplicando voltajes constantes de 10, 15, 20 y 25 V durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se logró controlar las dimensiones de los nanotubos de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn variando el voltaje de anodización, obteniendo una relación lineal positiva entre el diámetro, la longitud y el potencial aplicado. Las muestras anodizadas a 20 y 25 V presentaron una morfología autoorganizada de nanotubos con dos diámetros diferentes y la corriente en estado estable se mantuvo en promedio a 19 mA para todas las muestras anodizadas.
- Las capas de óxido nanotubular formadas sobre las superficies de las aleaciones Ti-24Zr-10Nb-2Sn consisten en una mezcla de óxidos de  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ,  $\text{SnO}_2$  y la composición de los óxidos superficiales presentó una dependencia débil al potencial aplicado. La caracterización de la composición elemental reveló la presencia del elemento flúor en las muestras anodizadas.
- Las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn tienen la capacidad de carga/liberación del antibiótico gentamicina, todas las muestras presentaron dos fases de liberación de antibiótico en PBS con un crecimiento logístico durante los primeros 10 minutos. Se observó que el anodizado a 25 V mostró una mayor tasa de liberación en comparación con el anodizado a 10 V. Este hallazgo se relaciona con las características morfológicas y dimensionales obtenidas debido a la influencia de los parámetros del anodizado, particularmente el voltaje aplicado. Se evidenció la relación entre la densidad y el volumen encerrado de los nanotubos, entre mayor era la longitud y el diámetro de los nanotubos más grande fue la capacidad de carga de antibiótico, por lo que el porcentaje de liberación de antibiótico fue mayor.
- Las pruebas antibacterianas revelaron que las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn tienen un efecto bacteriostático sobre el crecimiento *in vitro* de *S. aureus*. Por otro lado, las aleaciones anodizadas cargadas con el antibiótico gentamicina mostraron un efecto bactericida sobre el crecimiento *in vitro* de esta bacteria. El efecto bacteriostático se atribuyó a la presencia del elemento flúor en los nanotubos como resultado del proceso de anodización. Por su parte, el efecto bactericida se atribuyó a

la liberación del antibiótico gentamicina que se encuentra cargado en los nanotubos hacia el medio de cultivo bacteriano.

- Los nanotubos formados en la superficie de la aleación Ti-24Zr-10Nb-2Sn demostraron una buena biocompatibilidad *in vitro*. La evaluación de la actividad citotóxica de las aleaciones anodizadas utilizando el ensayo colorimétrico de MTT reveló que la aleación anodizada a 10 V presentó la mayor viabilidad celular, con un porcentaje del 90%. En contraste, se observó una disminución en la viabilidad celular a medida que se modificaba la superficie en los anodizados de 15, 20 y 25 V. Estas variaciones se atribuyen a diferencias fisicoquímicas, como la composición química y la estructura del óxido. El estudio realizado mediante microscopía de fluorescencia indicó que las células (MG-63) pudieron adherirse y crecer en la superficie de los nanotubos de esta aleación.
- Fue posible la funcionalización de la superficie de la aleación de Ti-407 con estructuras nanotubulares utilizando la técnica de anodización empleando una solución electrolítica compuesta por  $\text{NH}_4\text{F}$ , glicerol y agua, aplicando voltajes constantes de 40, 50 y 60 V durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se logró controlar las dimensiones de los nanotubos variando el voltaje de anodización, obteniendo una relación no lineal positiva entre el diámetro, la longitud y el potencial aplicado. Las muestras anodizadas presentaron una estructura cilíndrica bien definida de pared simple y con una alta relación de aspecto para todas las muestras.
- Las capas de óxido nanotubular formadas sobre las superficies de las aleaciones de Ti-407 consisten en una mezcla de óxidos de  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{VO}$  y  $\text{VO}_2$ . La caracterización de la composición elemental reveló la presencia de fluoruro metálico, indicando la incorporación del elemento flúor en las muestras anodizadas.
- En el caso específico de las pruebas de anodizado de las aleaciones de titanio (Ti-24Zr-10Nb-2Sn y Ti-407), el cambio en la viscosidad del electrolito, al utilizar glicerina en lugar de agua, permitió obtener nanotubos de con una relación de aspecto considerablemente mayor. En general, se ha observado que el anodizado de las aleaciones de titanio mejora su mojabilidad al aumentar la hidrofiliidad de la superficie. Esto significa que la superficie anodizada tiende a atraer y extender líquidos sobre sí misma, lo que puede ser beneficioso en aplicaciones biomédicas donde es necesario promover la adhesión celular y la interacción con fluidos biológicos.

- Las aleaciones anodizadas de Ti-407 tienen la capacidad de carga/liberación del antibiótico ceftriaxona, todas las muestras presentaron dos fases de liberación de antibiótico en PBS, la primera fase (ráfaga) con un 50% de liberación de antibiótico en los primeros 40 minutos y la segunda fase (prolongada) con un 100 % de liberación de antibiótico hasta 280 minutos. Se observó que el anodizado a 60 V mostró un mayor porcentaje de liberación en comparación con el anodizado a 40 V. Esta diferencia se relaciona con las características morfológicas y dimensionales obtenidas debido a la influencia de los parámetros del anodizado, específicamente el voltaje aplicado. Se evidenció la relación entre la densidad y el volumen encerrado de los nanotubos, entre mayor fue la longitud y el diámetro de los nanotubos más grande fue la capacidad de carga de antibiótico por lo que, el porcentaje de liberación de antibiótico fue mayor.
- Las pruebas antibacterianas realizadas en este estudio demostraron que las aleaciones anodizadas de Ti-407 no presentaron actividad antibacteriana contra el crecimiento *in vitro* de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Sin embargo, las aleaciones anodizadas y cargadas con el antibiótico ceftriaxona mostraron un efecto bactericida sobre el crecimiento *in vitro* de estas bacterias. La falta de actividad antibacteriana en las aleaciones anodizadas se atribuye a la ausencia de óxidos residuales en la superficie de los anodizados. Además, el efecto bactericida se atribuye a la liberación del antibiótico ceftriaxona, contenido en los nanotubos al medio de cultivo bacteriano.
- Los nanotubos formados en la superficie de la aleación Ti-407 mostraron una excelente biocompatibilidad *in vitro*. El estudio realizado mediante microscopía de fluorescencia demostró que las células (MG-63) pudieron adherirse y crecer exitosamente sobre la superficie de los nanotubos, la capacidad de adhesión de las células fue confirmada por Microscopía Electrónica de Barrido, donde se observó que los osteoblastos pueden generar estructuras especializadas, como filopodios y lamelipodios que nos indican una buena interacción y capacidad para extenderse y explorar la superficie de las aleaciones anodizadas.
- La evaluación de la actividad citotóxica de las aleaciones anodizadas de Ti-407, realizada mediante el ensayo colorimétrico de MTT, reveló que la formación de nanotubos en la superficie de la aleación a diferentes voltajes de anodizado no generó una citotoxicidad significativa. Además, todas las muestras a las que se les añadió antibiótico no presentaron diferencia significativa en el porcentaje de viabilidad celular. La viabilidad celular también se evaluó para las muestras con recubrimientos bioactivos por electrodeposición, los resultados mostraron que la aleación anodizada control con recubrimiento bioactivo así como la aleación anodizada (50 V)



y electrodepositada (5 V) de Ti-407, presentaron una mayor viabilidad celular en comparación con el control de los osteoblastos, lo que indica que la liberación de iones bioactivos al medio de cultivo celular acelera la reproducción de los osteoblastos, promoviendo su crecimiento y desarrollo sobre la superficie de las aleaciones.

- Los resultados de las pruebas de biocompatibilidad *in vivo* de la aleación Ti-407 fueron satisfactorios. El modelo animal utilizado en el experimento no presentó complicaciones posteriores a la implantación y mostró un comportamiento biológico favorable durante todo el período de evaluación. La observación macroscópica de la interacción entre el tejido y el implante reveló una buena adhesión e integración del implante en la superficie del hueso femoral. Se observó la formación de nuevo tejido en la zona de intervención quirúrgica después de un período de 30 días.
- Las aleaciones anodizadas de Ti-407, presentaron un mejor desempeño en cuanto a la carga y liberación de antibióticos en comparación con las aleaciones anodizadas de Ti-24Zr-10Nb-2Sn.
- Esta investigación doctoral ha demostrado que la modificación superficial de las aleaciones Ti-24Zr-10Nb-2Sn y Ti-407 con nanotubos sintetizados por anodizado es una estrategia prometedora para prevenir complicaciones asociadas con los biomateriales de titanio.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] T. Hanawa, Titanium-tissue interface reaction and its control with surface treatment, *Front Bioeng Biotechnol.* 7 (2019). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00170>.
- [2] Y.T. Konttinen, I. Milošev, R. Trebše, R. van der Linden, J. Pieper, T. Sillat, S. Virtanen, V.M. Tiainen, Metals for joint replacement, *Joint Replacement Technology.* (2014) 81–151. <https://doi.org/10.1533/9780857098474.2.81>.
- [3] Y. Luo, L. Yang, M. Tian, Application of biomedical-grade titanium alloys in trabecular bone and artificial joints, *Biomaterials and Medical Tribology: Research and Development.* (2013) 181–216. <https://doi.org/10.1533/9780857092205.181>.
- [4] N.J. Hallab, J.J. Jacobs, Orthopedic Applications, *Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition.* (2013) 841–882. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00073-5>.
- [5] R. Petersen, Titanium Implant Osseointegration Problems with Alternate Solutions Using Epoxy/Carbon-Fiber-Reinforced Composite, *Metals (Basel).* 4 (2014) 549–569. <https://doi.org/10.3390/met4040549>.
- [6] K.T. Kim, M.Y. Eo, T.T.H. Nguyen, S.M. Kim, General review of titanium toxicity, *Int J Implant Dent.* 5 (2019). <https://doi.org/10.1186/s40729-019-0162-x>.
- [7] L.L. Pavón, H.Y. Kim, H. Hosoda, S. Miyazaki, Effect of Nb content and heat treatment temperature on superelastic properties of Ti-24Zr-(8-12)Nb-2Sn alloys, *Scr Mater.* 95 (2015) 46–49. <https://doi.org/10.1016/j.scriptamat.2014.09.029>.
- [8] W. Davey, M. Bache, H. Davies, M. Thomas, Fatigue Performance of the Novel Titanium Alloy Timetal 407, in: 2018: pp. 1–7.
- [9] S. James, Y. Kosaka, R. Thomas, P. Garratt, Timetal® 407: A Titanium Alloy to Enable Cost Reduction, *Proceedings of the 13th World Conference on Titanium.* (2016) 721–725. <https://doi.org/10.1002/9781119296126.ch121>.
- [10] X. Liu, P.K. Chu, C. Ding, Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications, *Materials Science and Engineering: R: Reports.* 47 (2004) 49–121. <https://doi.org/10.1016/J.MSER.2004.11.001>.
- [11] T. Xue, S. Attarilar, S. Liu, J. Liu, X. Song, L. Li, B. Zhao, Y. Tang, Surface modification techniques of titanium and its alloys to functionally optimize their biomedical properties: Thematic review, *Front Bioeng Biotechnol.* 8 (2020) 1–19. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.603072>.

- [12] M. V. Diamanti, M.P. Pedefferri, The Anodic Oxidation of Titanium and Its Alloys, Encyclopedia of Interfacial Chemistry: Surface Science and Electrochemistry. (2018) 41–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.11717-2>.
- [13] M.F. Kunrath, B.F. Leal, R. Hubler, S.D. de Oliveira, E.R. Teixeira, Antibacterial potential associated with drug-delivery built TiO<sub>2</sub> nanotubes in biomedical implants, AMB Express. 9 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0777-6>.
- [14] K. Gulati, M.S. Aw, D. Losic, Drug-eluting Ti wires with titania nanotube arrays for bone fixation and reduced bone infection, Nanoscale Res Lett. 6 (2011) 571. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-6-571>.
- [15] L. López-Pavón, D. Dagnino-Acosta, E. López-Cuéllar, F. Meléndez-Anzures, D. Zárate-Triviño, M. Barrón-González, I. Moreno-Cortez, H.Y. Kim, S. Miyazaki, Synthesis of nanotubular oxide on Ti–24Zr–10Nb–2Sn as a drug-releasing system to prevent the growth of Staphylococcus aureus, Chemical Papers. 75 (2021) 2441–2450. <https://doi.org/10.1007/s11696-020-01495-6>.
- [16] L. Petecchia, C. Usai, M. Vassalli, P. Gavazzo, Biophysical characterization of nanostructured TiO<sub>2</sub> as a good substrate for hBM-MSC adhesion, growth and differentiation, Exp Cell Res. 358 (2017) 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.06.008>.
- [17] J. Luo, S. Zhao, X. Gao, S.N. Varma, W. Xu, M. Tamaddon, R. Thorogate, H. Yu, X. Lu, M. Salmeron-Sanchez, C. Liu, TiO<sub>2</sub> Nanotopography-Driven Osteoblast Adhesion through Coulomb's Force Evolution, ACS Appl Mater Interfaces. 14 (2022) 34400–34414. <https://doi.org/10.1021/acscami.2c07652>.
- [18] Z. Peng, J. Ni, K. Zheng, Y. Shen, X. Wang, G. He, S. Jin, T. Tang, Dual effects and mechanism of TiO<sub>2</sub> nanotube arrays in reducing bacterial colonization and enhancing C3H10T1/2 cell adhesion, Int J Nanomedicine. 8 (2013) 3093–3105. <https://doi.org/10.2147/IJN.S48084>.
- [19] B. De Foer, A. Bali, A. Bernaerts, J. van Dinther, E. Offeciers, J.W. Casselman, Temporal Bone Trauma, Skull Base Imaging. (2018) 145–167. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48563-0.00007-6>.
- [20] K.S. Brammer, C.J. Frandsen, S. Jin, TiO<sub>2</sub> nanotubes for bone regeneration, Trends Biotechnol. 30 (2012) 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.02.005>.
- [21] I. Braceras, J.I. Onate, L. Goikoetxea, J.L. Viviente, J.I. Alava, M.A. de Maeztu, Bone cell adhesion on ion implanted titanium alloys, Surf Coat Technol. 196 (2005) 321–326. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2004.08.201>.

- [22] A.T. Sidambe, Biocompatibility of advanced manufactured titanium implants-A review, *Materials*. 7 (2014) 8168–8188. <https://doi.org/10.3390/ma7128168>.
- [23] M. Niinomi, Biologically and mechanically biocompatible titanium alloys, *Mater Trans*. 49 (2008) 2170–2178. <https://doi.org/10.2320/matertrans.L-MRA2008828>.
- [24] F.J. Gil, J.A. Planell Estany, Aplicaciones biomédicas del titanio v sus aleaciones, *Biomecánica*. 1 (1993). <https://doi.org/10.5821/sibb.v1i1.1543>.
- [25] Q. Chen, G.A. Thouas, Metallic implant biomaterials, *Materials Science and Engineering R: Reports*. 87 (2015) 1–57. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2014.10.001>.
- [26] S. Barriuso Gómez, Modificación superficial de biomateriales metálicos (316 LVM y Ti6Al4V) mediante granallado, agua alta presión y laser peening: efecto en la microestructura, las propiedades mecánicas y la liberación de iones, (2014). <https://digital.csic.es/handle/10261/99206>.
- [27] E.S. Kim, Y.H. Jeong, H.C. Choe, W.A. Brantley, Formation of titanium dioxide nanotubes on Ti-30Nb-xTa alloys by anodizing, *Thin Solid Films*. 549 (2013) 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2013.08.058>.
- [28] M. Morinaga, Titanium Alloys, in: *A Quantum Approach to Alloy Design*, Elsevier, 2019: pp. 77–94. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814706-1.00005-4>.
- [29] A.V. Escuder, V.A. Borrás, Análisis del efecto de los aleantes en titanio pulvimetalúrgico, (2014) 1–117.
- [30] E. Marchetti, O. May, J. Girard, H.-F. Hildebrand, H. Migaud, G. Pasquier, Biomateriales en cirugía ortopédica, *EMC - Técnicas Quirúrgicas - Ortopedia y Traumatología*. 2 (2010) 1–24. [https://doi.org/10.1016/s2211-033x\(10\)70083-9](https://doi.org/10.1016/s2211-033x(10)70083-9).
- [31] F. Montoliu Climent, Biomateriales I - Clasificaciones de los materiales, *Revista de La Real Academia de Medicina de Catalunya*. 8 (1993) 139–151. <http://www.raco.cat/index.php/RevistaRAMC/article/viewArticle/87469/0>.
- [32] R. Garcia Das Neves, Procesamiento de polvos de Ti mediante asociación de técnicas coloidales y pulvimetalúrgicas, (2014) 227. <https://core.ac.uk/download/pdf/29406345.pdf>.
- [33] F. Diaz del Castillo Rodríguez, J. Cárdenas Fernández, Superaleaciones, *Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan*. (2015) 194.
- [34] Y.A. Giraldo, Estudio de la Velocidad de Corrosión y de la liberación de Iones de la aleación TiNbZr (Tiadyne®) En Fluidos Corporales Simulados, Sangre y Saliva, 2009.

- [35] E. Takahashi, T. Sakurai, S. Watanabe, N. Masahashi, S. Hanada, Effect of heat treatment and Sn content on superelasticity in biocompatible TiNbSn alloys, *Mater Trans.* 43 (2002) 2978–2983. <https://doi.org/10.2320/matertrans.43.2978>.
- [36] A. Kumawat, S. Kumawat, M. Aarif, Medical applications of shape memory alloys, 3 (2016) 270–270. <https://doi.org/10.3850/978-981-09-7519-7nbl16-rps-270>.
- [37] D.A. Armitage, T.L. Parker, D.M. Grant, Biocompatibility and hemocompatibility of surface-modified NiTi alloys, *J Biomed Mater Res A.* 66 (2003) 129–137. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10549>.
- [38] C.C. Bortolan, L.C. Campanelli, C. Bolfarini, N.T.C. Oliveira, Fatigue strength of Ti-6Al-4V alloy with surface modified by TiO<sub>2</sub> nanotubes formation, *Mater Lett.* 177 (2016) 46–49. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2016.04.188>.
- [39] W. Wang, C. Khoo, Titanium Alloys in Orthopaedics, *Titanium Alloys - Advances in Properties Control.* (2013) 1–20. <https://doi.org/10.5772/55353>.
- [40] T. Wilberforce, A. Alaswad, A. Baroutaji, M.A. Abdelkareem, M. Ramadan, A.G. Olabi, E.T. Sayed, K. Elsaid, H.M. Maghrabie, Future Directions for Shape Memory Alloy Development, *Encyclopedia of Smart Materials.* (2022) 231–242. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815732-9.00136-4>.
- [41] I. Stachiv, E. Alarcon, M. Lamac, Shape memory alloys and polymers for mems/nems applications: Review on recent findings and challenges in design, preparation, and characterization, *Metals (Basel).* 11 (2021) 1–28. <https://doi.org/10.3390/met11030415>.
- [42] M.H. Elahinia, M. Hashemi, M. Tabesh, S.B. Bhaduri, Manufacturing and processing of NiTi implants: A review, *Prog Mater Sci.* 57 (2012) 911–946. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2011.11.001>.
- [43] A. Biesiekierski, J. Wang, M. Abdel-Hady Gepreel, C. Wen, A new look at biomedical Ti-based shape memory alloys, *Acta Biomater.* 8 (2012) 1661–1669. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.01.018>.
- [44] B. O'Brien, F.M. Weafer, M.S. Bruzzi, Shape Memory Alloys for Use in Medicine, *Comprehensive Biomaterials II.* 1 (2017) 50–78. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.10084-0>.
- [45] P. Castany, D.M. Gordin, S.I. Drob, C. Vasilescu, V. Mitran, A. Cimpean, T. Gloriant, Deformation Mechanisms and Biocompatibility of the Superelastic Ti–23Nb–0.7Ta–2Zr–0.5N Alloy, *Shape Memory and Superelasticity.* 2 (2016) 18–28. <https://doi.org/10.1007/s40830-016-0057-0>.

- [46] H. Sehitoglu, G. Anlas, A.S.K. Mohammed, Shape Memory Alloys – Frontier Developments, Reference Module in Materials Science and Materials Engineering. (2023). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822944-6.00058-X>.
- [47] M.R. Ricciardi, V. Antonucci, Experimental characterization of shape memory alloys, Shape Memory Alloy Engineering: For Aerospace, Structural, and Biomedical Applications. (2021) 141–164. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819264-1.00005-4>.
- [48] M.M.A. Bepari, 2.3 Carburizing: A Method of Case Hardening of Steel, Comprehensive Materials Finishing. 2–3 (2017) 71–106. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.09187-6>.
- [49] M. Motyka, K. Kubiak, J. Sieniawski, W. Ziaja, Phase Transformations and Characterization of  $\alpha + \beta$  Titanium Alloys, Elsevier, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-096532-1.00202-8>.
- [50] W. Bai, R. Sun, J. Xu, V. V. Silberschmidt, Microstructural changes in machining, Mechanics of Materials in Modern Manufacturing Methods and Processing Techniques. (2020) 269–296. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818232-1.00010-2>.
- [51] H. Bhadeshia, R. Honeycombe, Formation of Martensite, Steels: Microstructure and Properties. (2017) 135–177. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100270-4.00005-6>.
- [52] G. Faiella, V. Antonucci, Experimental Characterization of Shape Memory Alloys, Shape Memory Alloy Engineering: For Aerospace, Structural and Biomedical Applications. (2015) 57–77. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099920-3.00003-6>.
- [53] H. Bhadeshia, R. Honeycombe, Tempering of Martensite, Steels: Microstructure and Properties. (2017) 237–270. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100270-4.00009-3>.
- [54] H.Y. Kim, Y. Ikehara, J.I. Kim, H. Hosoda, S. Miyazaki, Martensitic transformation, shape memory effect and superelasticity of Ti-Nb binary alloys, Acta Mater. 54 (2006) 2419–2429. <https://doi.org/10.1016/j.actamat.2006.01.019>.
- [55] S.W. Robertson, R.O. Ritchie, A fracture-mechanics-based approach to fracture control in biomedical devices manufactured from superelastic nitinol tube, J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 84 (2008) 26–33. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30840>.

- [56] G. Jangali Satish, V.N. Gaitonde, V.N. Kulkarni, Traditional and non-traditional machining of nickel-based superalloys: A brief review, *Mater Today Proc.* 44 (2021) 1448–1454. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.11.632>.
- [57] K.K. Alaneme, J.U. Anaele, M.O. Bodunrin, Hot deformation processing of shape memory alloys: A review of effects on plastic flow behaviour, deformation mechanisms, and functional characteristics, *Alexandria Engineering Journal.* 61 (2022) 12759–12783. <https://doi.org/10.1016/J.AEJ.2022.06.055>.
- [58] E. López Cuéllar, Una introducción a las aleaciones con memoria de forma: parte I, *Ingenierías.* 5 (2002) 5–11.
- [59] R. Pfeifer, C.W. Müller, C. Hurschler, S. Kaielerle, V. Wesling, H. Haferkamp, Adaptable orthopedic shape memory implants, *Procedia CIRP.* 5 (2013) 253–258. <https://doi.org/10.1016/j.procir.2013.01.050>.
- [60] K.K. Alaneme, E.A. Okotete, A. Oluwafemi, U. Inyang, Assessment of the mechanical behaviour of thermally aged B and Fe modified CuZnAl shape memory alloys, *Revista de Metalurgia.* 55 (2019). <https://doi.org/10.3989/REVMETALM.151>.
- [61] N. Nayan, G. Singh, S.V.S.N. Murty, P.R. Narayan, M. Mohan, P. V. Venkitakrishnan, U. Ramamurty, Effect of ternary additions of Cu and Fe on the hot deformation behavior of NiTi shape memory alloy - A study using processing maps, *Intermetallics (Barking).* 131 (2021). <https://doi.org/10.1016/J.INTERMET.2021.107084>.
- [62] K.K. Alaneme, S. Umar, Mechanical behaviour and damping properties of Ni modified Cu–Zn–Al shape memory alloys, *Journal of Science: Advanced Materials and Devices.* 3 (2018) 371–379. <https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2018.05.002>.
- [63] M.C. Tanzi, S. Farè, G. Candiani, *Biomaterials and Applications, Foundations of Biomaterials Engineering.* (2019) 199–287. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101034-1.00004-9>.
- [64] R.C.L. Sachdeva, S. Miyazaki, Z.H. Dughaish, Nitinol as a Biomedical Material, *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering.* (2016) 1–13. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.02246-3>.
- [65] J.A. Solomon, S.W. Stavropolous, *Equipment, Terms, and Techniques in Interventional Radiology, Radiology Secrets Plus: Third Edition.* (2011) 217–222. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-06794-2.00029-8>.



- [66] C. Benedetti, C. García, P. Silva, Patrón de cambio de las propiedades mecánicas de rigidez y superelasticidad de alambres de Nitinol® superelásticos expuestos a reciclado, 25 (2005) 19–30.
- [67] T.M. Mereau, T.C. Ford, Nitinol compression staples for bone fixation in foot surgery, J Am Podiatr Med Assoc. 96 (2006) 102–106. <https://doi.org/10.7547/0960102>.
- [68] G. Conterno, E. Furman, M.A. Borda, R. Filipetto, J. Giovanardi, C. Nacional, E. Atomica, C.A. Ezeiza, B. Aires, T. Technology, S.A.V. Martelli, B. Aires, B. Aires, Caracterización y Evaluación de Nitinol para Desarrollo de Productos Médicos, (2006).
- [69] P. Dickison, V. Harris, S.D. Smith, Nickel hypersensitivity following closure of atrial septal defect: A case report and review of the literature, Australasian Journal of Dermatology. 59 (2018) 220–222. <https://doi.org/10.1111/ajd.12787>.
- [70] F. Prestipino, C. Pragliola, M. Lusini, M. Chello, Nickel allergy induced systemic reaction to an intracardiac amplatzer device, J Card Surg. 29 (2014) 349–350. <https://doi.org/10.1111/jocs.12331>.
- [71] A. Apostolos, M. Drakopoulou, S. Gregoriou, A. Synetos, G. Trantalis, G. Tsvigoulis, S. Deftereos, K. Tsioufis, K. Toutouzas, Nickel Hypersensitivity to Atrial Septal Occluders: Smoke Without Fire, Clin Rev Allergy Immunol. 62 (2022) 476–483. <https://doi.org/10.1007/s12016-021-08867-0>.
- [72] J.C. Wataha, N.L. O'Dell, B.B. Singh, M. Ghazi, G.M. Whitford, P.E. Lockwood, Relating nickel-induced tissue inflammation to nickel release *in vivo*, J Biomed Mater Res. 58 (2001) 537–544. <https://doi.org/10.1002/jbm.1052>.
- [73] M.W. Ries, C. Kampmann, H.J. Rupprecht, G. Hintereder, G. Hafner, J. Meyer, Nickel release after implantation of the Amplatzer occluder, Am Heart J. 145 (2003) 737–741. <https://doi.org/10.1067/MHJ.2003.7>.
- [74] S.S. Kirana, E.I. Auerkari, Genotoxicity of NiTi orthodontic wires induced by the release of metal ions, AIP Conf Proc. 2344 (2021). <https://doi.org/10.1063/5.0047255>.
- [75] E. McLucas, Y. Rochev, W.M. Carroll, T.J. Smith, Analysis of the effects of surface treatments on nickel release from nitinol wires and their impact on candidate gene expression in endothelial cells, J Mater Sci Mater Med. 19 (2008) 975–980. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0087-9>.
- [76] A. Yamamoto, R. Honma, M. Sumita, Cytotoxicity evaluation of 43 metal salts using murine fibroblasts and osteoblastic cells, J Biomed Mater Res. 39 (1998)



- 331–340. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199802\)39:2<331::AID-JBM22>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199802)39:2<331::AID-JBM22>3.0.CO;2-E).
- [77] Y. Li, C. Wong, J. Xiong, P. Hodgson, C. Wen, Cytotoxicity of titanium and titanium alloying elements, *J Dent Res.* 89 (2010) 493–497. <https://doi.org/10.1177/0022034510363675>.
- [78] H. Matsuno, A. Yokoyama, F. Watari, M. Uo, T. Kawasaki, Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium, *Biomaterials.* 22 (2001) 1253–1262. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00275-1](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00275-1).
- [79] K.L. Ou, C.C. Weng, Y.H. Lin, M.S. Huang, A promising of alloying modified beta-type Titanium-Niobium implant for biomedical applications: Microstructural characteristics, *in vitro* biocompatibility and antibacterial performance, *J Alloys Compd.* 697 (2017) 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2016.12.120>.
- [80] Y. Li, C. Yang, H. Zhao, S. Qu, X. Li, Y. Li, New developments of Ti-based alloys for biomedical applications, *Materials.* 7 (2014) 1709–1800. <https://doi.org/10.3390/ma7031709>.
- [81] H.Y. Kim, Y. Ikehara, J.I. Kim, H. Hosoda, S. Miyazaki, Martensitic transformation, shape memory effect and superelasticity of Ti-Nb binary alloys, *Acta Mater.* 54 (2006) 2419–2429. <https://doi.org/10.1016/j.actamat.2006.01.019>.
- [82] L.L. Chang, Y.D. Wang, Y. Ren, In-situ investigation of stress-induced martensitic transformation in Ti-Nb binary alloys with low Young's modulus, *Materials Science and Engineering A.* 651 (2016) 442–448. <https://doi.org/10.1016/j.msea.2015.11.005>.
- [83] D.N. Travessa, G.V.B. Guedes, A.C. de Oliveira, A.S. da Silva Sobrinho, V. Roche, A.M. Jorge, Corrosion performance of the biocompatible  $\beta$ -Ti<sub>12</sub>Mo<sub>6</sub>Zr<sub>2</sub>Fe alloy submitted to laser and plasma-nitriding surface modifications, *Corros Sci.* 209 (2022) 110740. <https://doi.org/10.1016/J.CORSCI.2022.110740>.
- [84] T. Xu, S. Zhang, S. Liang, N. Cui, L. Cao, Y. Wan, Precipitation behaviour during the  $\beta \rightarrow \alpha/\omega$  phase transformation and its effect on the mechanical performance of a Ti-15Mo-2.7Nb-3Al-0.2Si alloy, *Sci Rep.* 9 (2019) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54114-0>.
- [85] S.-H. Lee, M. Todai, M. Tane, K. Hagihara, H. Nakajima, T. Nakano, Biocompatible low Young's modulus achieved by strong crystallographic elastic anisotropy in Ti-15Mo-5Zr-3Al alloy single crystal, *J Mech Behav Biomed Mater.* 14 (2012) 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2012.05.005>.

- [86] A. Najdahmadi, A. Zarei-Hanzaki, E. Farghadani, Mechanical properties enhancement in Ti–29Nb–13Ta–4.6Zr alloy via heat treatment with no detrimental effect on its biocompatibility, *Materials & Design* (1980-2015). 54 (2014) 786–791. <https://doi.org/10.1016/J.MATDES.2013.09.007>.
- [87] I. Kopova, J. Stráský, P. Harcuba, M. Landa, M. Janeček, L. Bačáková, Newly developed Ti-Nb-Zr-Ta-Si-Fe biomedical beta titanium alloys with increased strength and enhanced biocompatibility, *Materials Science and Engineering C*. 60 (2016) 230–238. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.11.043>.
- [88] T.A. Goto Donato, L.H. de Almeida, V.E. Arana-Chavez, C.R. Grandini, *In vitro* cytotoxicity of a Ti-35Nb-7Zr-5Ta alloy doped with different oxygen contents, *Materials*. 7 (2014) 2183–2193. <https://doi.org/10.3390/ma7032183>.
- [89] K.M. Golasinski, R. Detsch, M. Szklarska, B. Łosiewicz, M. Zubko, S. Mackiewicz, E.A. Pieczyska, A.R. Boccaccini, Evaluation of mechanical properties, *in vitro* corrosion resistance and biocompatibility of Gum Metal in the context of implant applications, *J Mech Behav Biomed Mater*. 115 (2021) 104289. <https://doi.org/10.1016/J.JMBBM.2020.104289>.
- [90] D. Preisler, M. Janovská, H. Seiner, L. Bodnárová, J. Nejezchlebová, M. Koller, P. Sedlák, P. Harcuba, J. Veselý, J. Kozlík, T. Chráska, J. Stráský, M. Janeček, High-throughput characterization of elastic moduli of Ti-Nb-Zr-O biomedical alloys fabricated by field-assisted sintering technique, *J Alloys Compd*. 932 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2022.167656>.
- [91] S.S. Sidhu, H. Singh, M.A.H. Gepreel, A review on alloy design, biological response, and strengthening of  $\beta$ -titanium alloys as biomaterials, *Materials Science and Engineering: C*. 121 (2021) 111661. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2020.111661>.
- [92] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castaño, J.A. Planell, Biomaterials in orthopaedics, *J R Soc Interface*. 5 (2008) 1137–1158. <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0151>.
- [93] D.L. Millis, *Responses of Musculoskeletal Tissues to Disuse and Remobilization, Canine Rehabilitation and Physical Therapy: Second Edition*. (2014) 92–153. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0309-2.00007-7>.
- [94] M. Niinomi, Y. Liu, M. Nakai, H. Liu, H. Li, Biomedical titanium alloys with Young's moduli close to that of cortical bone, *Regen Biomater*. 3 (2016) 173–185. <https://doi.org/10.1093/RB/RBW016>.
- [95] M. Niinomi, M. Nakai, Titanium-based biomaterials for preventing stress shielding between implant devices and bone, *Int J Biomater*. 2011 (2011). <https://doi.org/10.1155/2011/836587>.

- [96] L. Wei, X. Zhang, L. Geng, Microstructure and properties of NiTi foams with 69% porosity, *Vacuum*. 162 (2019) 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2019.01.021>.
- [97] F. Forriol, Bone response to mechanical demand under physiological conditions | Respuesta ósea a las solicitaciones mecánicas en condiciones fisiológicas, *Revista de Ortopedia y Traumatologia*. 45 (2001) 258–265.
- [98] Introduction to aerospace materials, *Introduction to Aerospace Materials*. (2012) 1–14. <https://doi.org/10.1533/9780857095152.1>.
- [99] R.D. Jones, A.J. Knowles, W.J. Clegg, A binary beta titanium superalloy containing ordered-beta TiFe, alpha and omega, *Scr Mater*. 200 (2021) 113905. <https://doi.org/10.1016/J.SCRIPTAMAT.2021.113905>.
- [100] E. Alabort, Y.T. Tang, D. Barba, R.C. Reed, Alloys-by-design: A low-modulus titanium alloy for additively manufactured biomedical implants, *Acta Mater*. 229 (2022) 117749. <https://doi.org/10.1016/J.ACTAMAT.2022.117749>.
- [101] S.G. Racz, R.E. Breaz, M. Tera, C. Gîrjob, C. Biriş, A.L. Chicea, O. Bologa, Incremental forming of titanium Ti6Al4V alloy for cranioplasty plates—decision-making process and technological approaches, *Metals (Basel)*. 8 (2018). <https://doi.org/10.3390/met8080626>.
- [102] M. Sarraf, E. Rezvani Ghomi, S. Alipour, S. Ramakrishna, N. Liana Sukiman, A state-of-the-art review of the fabrication and characteristics of titanium and its alloys for biomedical applications, *Biodes Manuf*. 5 (2022) 371–395. <https://doi.org/10.1007/s42242-021-00170-3>.
- [103] B. Kasemo, Biocompatibility of titanium implants: Surface science aspects, *J Prosthet Dent*. 49 (1983) 832–837. [https://doi.org/10.1016/0022-3913\(83\)90359-1](https://doi.org/10.1016/0022-3913(83)90359-1).
- [104] G. Ambrogio, E. Sgambitterra, L. De Napoli, F. Gagliardi, G. Fragomeni, A. Piccininni, P. Guglielmi, G. Palumbo, D. Sorgente, L. La Barbera, T.M. Villa, Performances Analysis of Titanium Prostheses Manufactured by Superplastic Forming and Incremental Forming, *Procedia Eng*. 183 (2017) 168–173. <https://doi.org/10.1016/J.PROENG.2017.04.057>.
- [105] C. Dredge, I. Berment-Parr, R. M'Saoubi, M. Jackson, Machinability maps – Towards a mechanistic understanding of the machining of TI-6AL-4V and TIMETAL 407, *Advances in Industrial and Manufacturing Engineering*. 1 (2020) 100003. <https://doi.org/10.1016/j.aime.2020.100003>.

- [106] X. Liu, P.K. Chu, C. Ding, Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications, *Materials Science and Engineering R: Reports*. 47 (2004) 49–121. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2004.11.001>.
- [107] U. Kumar, P. Senthil, A comparative machinability study on titanium alloy Ti-6Al-4V during dry turning by cryogenic treated and untreated condition of uncoated WC inserts, *Mater Today Proc.* 27 (2020) 2324–2328. <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2019.09.121>.
- [108] A. Falkowska, A. Seweryn, M. Skrodzki, Strength properties of a porous titanium alloy Ti6Al4V with diamond structure obtained by laser power bed fusion (Lpbf), *Materials*. 13 (2020) 1–21. <https://doi.org/10.3390/ma13225138>.
- [109] L.E. Murr, S.A. Quinones, S.M. Gaytan, M.I. Lopez, A. Rodela, E.Y. Martinez, D.H. Hernandez, E. Martinez, F. Medina, R.B. Wicker, Microstructure and mechanical behavior of Ti-6Al-4V produced by rapid-layer manufacturing, for biomedical applications, *J Mech Behav Biomed Mater.* 2 (2009) 20–32. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2008.05.004>.
- [110] K. Mohan Agarwal, A. Singhal, A. Kapoor, D. Bhatia, Simulated analysis of Ti-6Al-4V processed through equal channel angular pressing for biomedical applications, *Mater Sci Energy Technol.* 4 (2021) 290–295. <https://doi.org/10.1016/J.MSET.2021.08.005>.
- [111] C. Jimenez-Marcos, J.C. Mirza-Rosca, M.S. Baltatu, P. Vizureanu, Experimental Research on New Developed Titanium Alloys for Biomedical Applications, *Bioengineering*. 9 (2022) 686. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9110686>.
- [112] E. Lukina, A. Laka, M. Kollerov, M. Sampiev, P. Mason, P. Wagstaff, H. Noordeen, W.W. Yoon, G. Blunn, Metal concentrations in the blood and tissues after implantation of titanium growth guidance sliding instrumentation, *Spine Journal*. 16 (2016) 380–388. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2015.11.040>.
- [113] J. Toledano-Serrabona, F.J. Gil, O. Camps-Font, E. Valmaseda-Castellón, C. Gay-Escoda, M.Á. Sánchez-Garcés, Physicochemical and biological characterization of Ti6Al4V particles obtained by implantoplasty: An *in vitro* study. part i, *Materials*. 14 (2021) 1–13. <https://doi.org/10.3390/ma14216507>.
- [114] D.J. Breen, D.J. Stoker, Titanium lines: A manifestation of metallosis and tissue response to titanium alloy megaprotheses at the knee, *Clin Radiol.* 47 (1993) 274–277. [https://doi.org/10.1016/S0009-9260\(05\)81138-9](https://doi.org/10.1016/S0009-9260(05)81138-9).
- [115] X. Li, T. Chen, J. Hu, S. Li, Q. Zou, Y. Li, N. Jiang, H. Li, J. Li, Modified surface morphology of a novel Ti-24Nb-4Zr-7.9Sn titanium alloy via anodic oxidation for

- enhanced interfacial biocompatibility and osseointegration, *Colloids Surf B Biointerfaces*. 144 (2016) 265–275. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.04.020>.
- [116] J. Havlikova, J. Strasky, M. Vandrovцова, P. Hrcuba, M. Mhaede, M. Janecek, L. Bacakova, Innovative surface modification of Ti-6Al-4V alloy with a positive effect on osteoblast proliferation and fatigue performance, *Materials Science and Engineering C*. 39 (2014) 371–379. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.03.024>.
- [117] A. Mühl, P. Szabó, O. Krafcsik, Z. Aigner, J. Kopniczky, Ákos Nagy, G. Marada, K. Turzó, Comparison of surface aspects of turned and anodized titanium dental implant, or abutment material for an optimal soft tissue integration, *Heliyon*. 8 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10263>.
- [118] S. Mei, H. Wang, W. Wang, L. Tong, H. Pan, C. Ruan, Q. Ma, M. Liu, H. Yang, L. Zhang, Y. Cheng, Y. Zhang, L. Zhao, P.K. Chu, Antibacterial effects and biocompatibility of titanium surfaces with graded silver incorporation in titania nanotubes, *Biomaterials*. 35 (2014) 4255–4265. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.02.005>.
- [119] S. Grigorescu, C. Ungureanu, R. Kirchgeorg, P. Schmuki, I. Demetrescu, Various sized nanotubes on TiZr for antibacterial surfaces, *Appl Surf Sci*. 270 (2013) 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.12.165>.
- [120] M.J. Jackson, W. and Ahmed, Chapter 2 Anodization: A Promising Nano-Modification Technique of Titanium-based Implants for Orthopedic Applications, *Surface Engineered Surgical Tools and Medical Devices*. (2007) 21–47. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-27028-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-0-387-27028-9_2).
- [121] C.H. Lohmann, G. Singh, H.G. Willert, G.H. Buchhorn, Metallic debris from metal-on-metal total hip arthroplasty regulates periprosthetic tissues, *World J Orthop*. 5 (2014) 660–666. <https://doi.org/10.5312/wjo.v5.i5.660>.
- [122] D. Bitar, J. Parvizi, Biological response to prosthetic debris, *World J Orthop*. 6 (2015) 172–189. <https://doi.org/10.5312/wjo.v6.i2.172>.
- [123] A. Bordbar-Khiabani, M. Gasik, Electrochemical and biological characterization of Ti-Nb-Zr-Si alloy for orthopedic applications, *Sci Rep*. 13 (2023) 2312. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29553-5>.
- [124] Y.H. Jeong, W.G. Kim, H.C. Choe, W.A. Brantley, Control of nanotube shape and morphology on Ti-Nb (Ta)-Zr alloys by varying anodizing potential, *Thin Solid Films*. 572 (2014) 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2014.09.057>.
- [125] L. López Pavón, D. Dagnino-Acosta, I.E. Moreno-Cortez, E. Lopez Cuéllar, D. Zarate-Trivino, H.Y. Kim, S. Miyazaki, A novel method for fabrication of

Ti<sub>24</sub>Zr<sub>10</sub>Nb<sub>2</sub>Sn alloy oxide nanotubes-chitosan nanocomposite films, *Mater Lett.* 205 (2017) 134–137. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2017.06.078>.

- [126] K. Indira, U.K. Mudali, T. Nishimura, N. Rajendran, A Review on TiO<sub>2</sub> Nanotubes: Influence of Anodization Parameters, Formation Mechanism, Properties, Corrosion Behavior, and Biomedical Applications, *J Bio Tribocorros.* 1 (2015) 28. <https://doi.org/10.1007/s40735-015-0024-x>.
- [127] N.K. Awad, S.L. Edwards, Y.S. Morsi, A review of TiO<sub>2</sub> NTs on Ti metal: Electrochemical synthesis, functionalization and potential use as bone implants, *Materials Science and Engineering C.* 76 (2017) 1401–1412. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.150>.
- [128] S. Goodarzi, F. Moztarzadeh, N. Nezafati, H. Omidvar, Titanium dioxide nanotube arrays: A novel approach into periodontal tissue regeneration on the surface of titanium implants, *Adv Mater Lett.* 7 (2016) 209–215. <https://doi.org/10.5185/amlett.2016.6014>.
- [129] M. Qadir, J. Lin, A. Biesiekierski, Y. Li, C. Wen, Effect of Anodized TiO<sub>2</sub>-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-ZrO<sub>2</sub> Nanotubes with Different Nanoscale Dimensions on the Biocompatibility of a Ti<sub>35</sub>Zr<sub>28</sub>Nb Alloy, *ACS Appl Mater Interfaces.* 12 (2020) 6776–6787. <https://doi.org/10.1021/acscami.9b21878>.
- [130] C.L. Chok, B.L. Ng, F.K. Yam, The effects of fluoride-based electrolyte concentrations on the morphology of self-organized titania nanotubes, *Optoelectronics and Advanced Materials, Rapid Communications.* 4 (2010) 148–150.
- [131] J. Wang, Z. Lin, Anodic Formation of Ordered TiO<sub>2</sub> Nanotube Arrays: Effects of Electrolyte Temperature and Anodization Potential, *The Journal of Physical Chemistry C.* 113 (2009) 4026–4030. <https://doi.org/10.1021/jp811201x>.
- [132] D. Regonini, C.R. Bowen, A. Jaroenworarluck, R. Stevens, A review of growth mechanism, structure and crystallinity of anodized TiO<sub>2</sub> nanotubes, *Materials Science and Engineering R: Reports.* 74 (2013) 377–406. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2013.10.001>.
- [133] N. Lu, J. Zhang, Y. Dan, M. Sun, T. Gong, X. Li, X. Zhu, Growth of porous anodic TiO<sub>2</sub> in silver nitrate solution without fluoride: Evidence against the field-assisted dissolution reactions of fluoride ions, *Electrochem Commun.* 126 (2021) 107022. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2021.107022>.
- [134] C.A. Grimes, G.K. Mor, TiO<sub>2</sub> nanotube arrays: Synthesis, properties, and applications, 2009. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0068-5>.



- [135] P. Roy, S. Berger, P. Schmuki, TiO<sub>2</sub> nanotubes: Synthesis and applications, *Angewandte Chemie - International Edition*. 50 (2011) 2904–2939. <https://doi.org/10.1002/anie.201001374>.
- [136] J.M. Hernández López, Funcionalización superficial de aleaciones de titanio mediante anodizado para aplicaciones biomédicas, 2015. <http://digital.csic.es/handle/10261/117384>.
- [137] P. Raghavendra, T. Pullaiah, Biomedical Imaging Role in Cellular and Molecular Diagnostics, *Advances in Cell and Molecular Diagnostics*. (2018) 85–111. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813679-9.00004-X>.
- [138] J. Zhao, X. Liu, Electron microscopic methods (TEM, SEM and energy dispersal spectroscopy), *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. (2022). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822974-3.00013-6>.
- [139] W.J. Wolfgang, Chemical analysis techniques for failure analysis: Part 1, common instrumental methods, *Handbook of Materials Failure Analysis with Case Studies from the Aerospace and Automotive Industries*. (2016) 279–307. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800950-5.00014-4>.
- [140] S. Nasrazadani, S. Hassani, Modern analytical techniques in failure analysis of aerospace, chemical, and oil and gas industries, *Handbook of Materials Failure Analysis with Case Studies from the Oil and Gas Industry*. (2016) 39–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100117-2.00010-8>.
- [141] D.R. Baer, S. Thevuthasan, Characterization of Thin Films and Coatings, *Handbook of Deposition Technologies for Films and Coatings: Science, Applications and Technology*. (2010) 749–864. <https://doi.org/10.1016/B978-0-8155-2031-3.00016-8>.
- [142] S. Daniel, Characterization of carbon dots, *Carbon Dots in Analytical Chemistry: Detection and Imaging*. (2023) 43–58. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-98350-1.00015-3>.
- [143] J. Telegdi, A. Shaban, G. Vastag, Biocorrosion—Steel, *Encyclopedia of Interfacial Chemistry: Surface Science and Electrochemistry*. (2018) 28–42. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.13591-7>.
- [144] L. Coucoulas, AGGLOMERATION, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. (2003) 73–80. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00018-3>.
- [145] T.F. Moriarty, A.H.C. Poulsson, E.T.J. Rochford, R.G. Richards, 4.8 Bacterial Adhesion and Biomaterial Surfaces, *Comprehensive Biomaterials II*. (2017) 101–129. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100691-7.00106-3>.

- [146] T.A. Sonia, C.P. Sharma, Experimental techniques involved in the development of oral insulin carriers, *Oral Delivery of Insulin*. (2014) 169–217. <https://doi.org/10.1533/9781908818683.169>.
- [147] C. Dwivedi, I. Pandey, H. Pandey, P.W. Ramteke, A.C. Pandey, S.B. Mishra, S. Patil, Electrospun Nanofibrous Scaffold as a Potential Carrier of Antimicrobial Therapeutics for Diabetic Wound Healing and Tissue Regeneration, *Nano- and Microscale Drug Delivery Systems: Design and Fabrication*. (2017) 147–164. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52727-9.00009-1>.
- [148] D. Regonini, A. Satka, A. Jaroenworoluck, D.W.E. Allsopp, C.R. Bowen, R. Stevens, Factors influencing surface morphology of anodized TiO<sub>2</sub> nanotubes, *Electrochim Acta*. 74 (2012) 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.04.076>.
- [149] A. Robin, M. Bernardes de Almeida Ribeiro, J. Luiz Rosa, R. Zenhei Nakazato, M. Borges Silva, Formation of TiO<sub>2</sub> Nanotube Layer by Anodization of Titanium in Ethylene Glycol-H<sub>2</sub>O Electrolyte, *J Surf Eng Mater Adv Technol*. 04 (2014) 123–130. <https://doi.org/10.4236/jsemat.2014.43016>.
- [150] T. Li, K. Gulati, N. Wang, Z. Zhang, S. Ivanovski, Understanding and augmenting the stability of therapeutic nanotubes on anodized titanium implants, *Materials Science and Engineering: C*. (2018). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.03.007>.
- [151] J. Ruiz Tovar, J.M. Badia, Prevention of Surgical Site Infection in Abdominal Surgery. A Critical Review of the Evidence, *Cirugía Española (English Edition)*. 92 (2014) 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.cireng.2013.08.003>.
- [152] A. Nanda, D.P. Patra, Surgical Complications in Neurosurgery, *Complications in Neurosurgery*. (2019) 17–22. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-50961-9.00005-0>.
- [153] D.S. Allende, L.M. Yerian, D.T. Patil, Pathology of Liver, Small Bowel, and Pancreas Transplantation, *Gastrointestinal and Liver Pathology*. (2024) 657–689. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52794-1.00020-1>.
- [154] G.D. Overturf, ANTIMICROBIAL PROPHYLAXIS, Feigin and Cherry's Textbook of Pediatric Infectious Diseases. (2009) 3227–3238. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-4044-6.50254-5>.
- [155] M. Saco, N. Howe, R. Nathoo, B. Cherpelis, Topical antibiotic prophylaxis for prevention of surgical wound infections from dermatologic procedures: A systematic review and meta-analysis, *Journal of Dermatological Treatment*. 26 (2015) 151–158. <https://doi.org/10.3109/09546634.2014.906547>.



- [156] M.K. Lee, C.M. Vollmer, Postcholecystectomy problems, Blumgart's Surgery of the Liver, Biliary Tract and Pancreas: Sixth Edition. 1–2 (2017) 633–641.e4. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-34062-5.00038-8>.
- [157] D.M. Saito, A.H. Murr, Complications of Maxillofacial Trauma Surgery, Complications in Head and Neck Surgery with CD Image Bank. (2009) 595–613. <https://doi.org/10.1016/B978-141604220-4.50050-X>.
- [158] K.J. Drummond, R.G. Ojemann, Surgical principles in the management of brain tumors, Brain Tumors: An Encyclopedic Approach, Expert Consult - Online and Print. (2012) 282–295. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-06967-3.00014-4>.
- [159] C. Suárez, F. Gudiol, Beta-lactam antibiotics, Enferm Infecc Microbiol Clin. 27 (2009) 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>.
- [160] E.H. Serspersu, A.L. Norris, Effect of Protein Dynamics and Solvent in Ligand Recognition by Promiscuous Aminoglycoside-Modifying Enzymes, Adv Carbohydr Chem Biochem. 67 (2012) 221–248. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396527-1.00005-X>.
- [161] A.R. Bechard, L.A. Knackstedt, Glutamatergic Neuroplasticity in Addiction, Neural Mechanisms of Addiction. (2019) 61–74. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812202-0.00005-1>.
- [162] L. V. Stottlemyer, Drugs Used in Ocular Treatment, Side Effects of Drugs Annual. 39 (2017) 491–501. <https://doi.org/10.1016/BS.SEDA.2017.06.018>.
- [163] M.-E. Rochon, A. Moussa, J. Autmizguine, Antibiotic Considerations for Necrotizing Enterocolitis, Infectious Disease and Pharmacology. (2019) 155–166. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-54391-0.00013-8>.
- [164] K.C. Wade, D.K. Benjamin, Clinical Pharmacology of Anti-Infective Drugs, Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant. (2011) 1160–1211. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-6400-8.00037-7>.
- [165] M.B. Formanek, L.A. Herwaldt, E.N. Perencevich, M.L. Schweizer, Gentamicin/collagen sponge use may reduce the risk of surgical site infections for patients undergoing cardiac operations: A meta-analysis, Surg Infect (Larchmt). 15 (2014) 244–255. <https://doi.org/10.1089/sur.2012.209>.
- [166] S.T. Hussain, Local application of gentamicin-containing collagen implant in the prophylaxis and treatment of surgical site infection following vascular surgery, International Journal of Surgery. 10 (2012) S5. <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2012.05.015>.

- [167] B. Decker, B.A. Molitoris, Aminoglycoside-Induced Nephrotoxicity, *Comprehensive Toxicology*, Second Edition. 7 (2010) 329–346. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00817-4>.
- [168] E. Scholar, Ceftriaxone, XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. (2007) 1–7. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61412-6>.
- [169] S.M. Rawls, Antibiotics,  $\beta$ -Lactam, *Encyclopedia of the Neurological Sciences*. (2014) 207–209. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385157-4.00250-5>.
- [170] S.R. Phillips, R.A. Buckler, S. Groome, Beta-lactams and tetracyclines, *Side Effects of Drugs Annual*. 43 (2021) 285–298. <https://doi.org/10.1016/BS.SEDA.2021.08.016>.
- [171] B. Almirante, J.M. Miró, Infecciones asociadas a las válvulas protésicas cardíacas, las prótesis vasculares y los dispositivos de electroestimulación cardíacos, *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 26 (2008) 647–664. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(08\)75281-9](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(08)75281-9).
- [172] J. Benedí, S. Martín-Aragón, Tratamiento de las infecciones ginecológicas. Revisión, *Farmacia Profesional*. 23 (2009) 52–57. <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-tratamiento-infecciones-ginecologicas-revision-13132076>.
- [173] D. Palma Sánchez, c. Marras Fernández-Cid, Tratamiento de la artritis bacteriana, *Seminarios de La Fundación Española de Reumatología*. 7 (2006) 183–190. [https://doi.org/10.1016/S1577-3566\(06\)75098-9](https://doi.org/10.1016/S1577-3566(06)75098-9).
- [174] J.A. Trubiano, A.A. Padiglione, Nosocomial infections in the intensive care unit, *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. 16 (2015) 598–602. <https://doi.org/10.1016/J.MPAIC.2015.09.010>.
- [175] H.A. Khan, F.K. Baig, R. Mehboob, Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance, *Asian Pac J Trop Biomed*. 7 (2017) 478–482. <https://doi.org/10.1016/J.APJTB.2017.01.019>.
- [176] S.L. Percival, D.W. Williams, *Escherichia coli*, *Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks: Second Edition*. (2014) 89–117. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00006-8>.
- [177] J.T. Poolman, *Escherichia coli*, *International Encyclopedia of Public Health*. (2017) 585–593. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00504-X>.
- [178] C. Wanke, C.L. Sears, *Escherichia coli*, *International Encyclopedia of Public Health*. (2008) 452–459. <https://doi.org/10.1016/B978-012373960-5.00601-8>.

- [179] M. Schaechter, *Escherichia coli*, Encyclopedia of Microbiology. (2009) 125–132. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00059-6>.
- [180] C.A. Batt, *Escherichia coli* | *Escherichia coli*, Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition. (2014) 688–694. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00100-2>.
- [181] M. Wu, X. Li, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*, Molecular Medical Microbiology. (2015) 1547–1564. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00087-1>.
- [182] P.R. Neves, J.A. McCulloch, E.M. Mamizuka, N. Lincopan, *Pseudomonas* | *Pseudomonas aeruginosa*, Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition. (2014) 253–260. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00283-4>.
- [183] W. Wu, Y. Jin, F. Bai, S. Jin, *Pseudomonas aeruginosa*, Molecular Medical Microbiology. (2015) 753–767. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00041-X>.
- [184] V.N. Krylov, Bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*: Long-Term Prospects for Use in Phage Therapy, *Adv Virus Res.* 88 (2014) 227–278. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800098-4.00005-2>.
- [185] E.J. Giamarellos-Bourboulis, T. Geladopoulos, Use of Oleuropein in Experimental Sepsis by *Pseudomonas Aeruginosa*, *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention.* (2010) 1321–1325. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374420-3.00147-9>.
- [186] E. Martin, G. Lina, O. Dumitrescu, *Staphylococcus* | *Staphylococcus aureus*, Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition. (2014) 501–507. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00317-7>.
- [187] E.C.D. Todd, Bacteria: *Staphylococcus aureus*, Reference Module in Food Science. (2023). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822521-9.00048-4>.
- [188] O. Erkmen, Isolation and counting of *Staphylococcus aureus*, *Microbiological Analysis of Foods and Food Processing Environments.* (2022) 229–241. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91651-6.00044-6>.
- [189] A.C. Stephens, A.R. Richardson, Recent developments in our understanding of the physiology and nitric oxide-resistance of *Staphylococcus aureus*, *Adv Microb Physiol.* 81 (2022) 111–135. <https://doi.org/10.1016/BS.AMPBS.2022.06.003>.

- [190] H. Yamada, Tea Catechins and *Staphylococcus aureus*, Tea in Health and Disease Prevention. (2013) 1207–1213. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384937-3.00101-4>.
- [191] M.M.H. Abdelbary, P. Basset, D.S. Blanc, E.J. Feil, The Evolution and Dynamics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Genetics and Evolution of Infectious Diseases: Second Edition. (2017) 553–572. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799942-5.00024-X>.
- [192] R.A. Garibaldi, D. Cushing, T. Lerer, Risk factors for postoperative infection, Am J Med. 91 (1991). [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)90362-2](https://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90362-2).
- [193] E. Korol, K. Johnston, N. Waser, F. Sifakis, H.S. Jafri, M. Lo, M.H. Kyaw, A systematic review of risk factors associated with surgical site infections among surgical patients, PLoS One. 8 (2013) 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083743>.
- [194] R.A. Garibaldi, D. Cushing, T. Lerer, Risk factors for postoperative infection, Am J Med. 91 (1991) S158–S163. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)90362-2](https://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90362-2).
- [195] T.W. Hakkarainen, N.M. Kopari, T.N. Pham, H.L. Evans, Necrotizing soft tissue infections: Review and current concepts in treatment, systems of care, and outcomes, Curr Probl Surg. 51 (2014) 344–362. <https://doi.org/10.1067/j.cpsurg.2014.06.001>.
- [196] T. Urbina, K. Razazi, C. Ourghanlian, P.L. Woerther, O. Chosidow, R. Lepeule, N. de Prost, Antibiotics in necrotizing soft tissue infections, Antibiotics. 10 (2021). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091104>.
- [197] A.D. Hanssen, Local antibiotic delivery vehicles in the treatment of musculoskeletal infection, Clin Orthop Relat Res. 437 (2005) 91–96. <https://doi.org/10.1097/01.BLO.0000175713.30506.77>.
- [198] P.A.W. Ostermann, D. Seligson, S.L. Henry, Local antibiotic therapy for severe open fractures. A review of 1085 consecutive cases, Journal of Bone and Joint Surgery - Series B. 77 (1995) 93–97. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.77B1.7822405>.
- [199] C.G. Zalavras, M.J. Patzakis, P. Holtom, Local Antibiotic Therapy in the Treatment of Open Fractures and Osteomyelitis, Clin Orthop Relat Res. 427 (2004) 86–93. <https://doi.org/10.1097/01.blo.0000143571.18892.8d>.
- [200] D. Losic, M.S. Aw, A. Santos, K. Gulati, M. Bariana, Titania nanotube arrays for local drug delivery: Recent advances and perspectives, Expert Opin Drug Deliv. 12 (2015) 103–127. <https://doi.org/10.1517/17425247.2014.945418>.

- [201] D. Ionita, D. Bajenaru-Georgescu, G. Totea, A. Mazare, P. Schmuki, I. Demetrescu, Activity of vancomycin release from bioinspired coatings of hydroxyapatite or TiO<sub>2</sub> nanotubes, *Int J Pharm.* 517 (2017) 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.11.062>.
- [202] M.S. Aw, K.A. Khalid, K. Gulati, G.J. Atkins, P. Pivonka, D.M. Findlay, D. Losic, Characterization of drug-release kinetics in trabecular bone from titania nanotube implants, *Int J Nanomedicine.* 7 (2012) 4883–4892. <https://doi.org/10.2147/IJN.S33655>.
- [203] C. Moseke, F. Hage, E. Vorndran, U. Gbureck, TiO<sub>2</sub> nanotube arrays deposited on Ti substrate by anodic oxidation and their potential as a long-term drug delivery system for antimicrobial agents, *Appl Surf Sci.* 258 (2012) 5399–5404. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.02.022>.
- [204] J. Park, A. Cimpean, A.B. Tesler, A. Mazare, Anodic TiO<sub>2</sub> nanotubes: Tailoring osteoinduction via drug delivery, *Nanomaterials.* 11 (2021). <https://doi.org/10.3390/nano11092359>.
- [205] A. Kamyar, M. Khakbiz, A. Zamanian, M. Yasaei, B. Yarmand, Synthesis of a novel dexamethasone intercalated layered double hydroxide nanohybrids and their deposition on anodized titanium nanotubes for drug delivery purposes, *J Solid State Chem.* 271 (2019) 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2018.12.043>.
- [206] K. Gulati, M. Kogawa, M. Prideaux, D.M. Findlay, G.J. Atkins, D. Losic, Drug-releasing nano-engineered titanium implants: therapeutic efficacy in 3D cell culture model, controlled release and stability, *Materials Science and Engineering C.* 69 (2016) 831–840. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.047>.
- [207] A. Roguska, M. Pisarek, A. Belcarz, L. Marcon, M. Holdynski, M. Andrzejczuk, M. Janik-Czachor, Improvement of the bio-functional properties of TiO<sub>2</sub> nanotubes, *Appl Surf Sci.* 388 (2016) 775–785. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.03.128>.
- [208] S. Petit, J. Madejova, Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Dev Clay Sci.* 5 (2013) 213–231. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-098259-5.00009-3>.
- [209] N.N. Daéid, Forensic Sciences | Systematic Drug Identification, *Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition.* (2005) 471–480. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00197-7>.
- [210] S. Wen, J. Liu, J. Deng, Methods for the detection and composition study of fluid inclusions, *Fluid Inclusion Effect in Flotation of Sulfide Minerals.* (2021) 27–68. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819845-2.00003-X>.

- [211] D. Ionita, D. Bajenaru-Georgescu, G. Totea, A. Mazare, P. Schmuki, I. Demetrescu, Activity of vancomycin release from bioinspired coatings of hydroxyapatite or TiO<sub>2</sub> nanotubes, *Int J Pharm.* 517 (2017) 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.11.062>.
- [212] K. Gulati, M.S. Aw, D. Losic, Drug-eluting Ti wires with titania nanotube arrays for bone fixation and reduced bone infection, *Nanoscale Res Lett.* 6 (2011) 1–6. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-6-571>.
- [213] C. Hong, S. An, M. Son, S.S. Hong, D.H. Lee, C. Lee, In-vitro cell tests using doxorubicin-loaded polymeric TiO<sub>2</sub> nanotubes used for cancer photothermotherapy, *Anticancer Drugs.* 23 (2012) 553–560. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e328350446b>.
- [214] M.S. Aw, K. Gulati, D. Losic, Controlling Drug Release from Titania Nanotube Arrays Using Polymer Nanocarriers and Biopolymer Coating, *J Biomater Nanobiotechnol.* 02 (2011) 477–484. <https://doi.org/10.4236/jbnb.2011.225058>.
- [215] T. Shokuhfar, S. Sinha-Ray, C. Sukotjo, A.L. Yarin, Intercalation of anti-inflammatory drug molecules within TiO<sub>2</sub> nanotubes, *RSC Adv.* 3 (2013) 17380–17386. <https://doi.org/10.1039/c3ra42173b>.
- [216] H. Jia, L.L. Kerr, Sustained Ibuprofen Release Using Composite Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)/Titanium Dioxide Nanotubes from Ti Implant Surface, *J Pharm Sci.* 102 (2013) 2341–2348. <https://doi.org/10.1002/jps.23580>.
- [217] A. Pawlik, M. Jarosz, K. Syrek, G.D. Sulka, Co-delivery of ibuprofen and gentamicin from nanoporous anodic titanium dioxide layers, *Colloids Surf B Biointerfaces.* 152 (2017) 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.01.011>.
- [218] A. Dasgupta, A. Wahed, Instrumentation and Analytical Methods, *Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control.* (2014) 1–18. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407821-5.00001-2>.
- [219] A.C. Ogado, D.I. Agwaranze, M. Daji, R.E. Aso, Microbial techniques and methods: basic techniques and microscopy, *Analytical Techniques in Biosciences: From Basics to Applications.* (2022) 201–220. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822654-4.00003-8>.
- [220] K.K. Nakashima, A.A.M. André, E. Spruijt, Enzymatic control over coacervation, *Methods Enzymol.* 646 (2021) 353–389. <https://doi.org/10.1016/BS.MIE.2020.06.007>.
- [221] J.L. Allen, S.J. Kennedy, L.N. Shaw, Colorimetric assays for the rapid and high-throughput screening of antimicrobial peptide activity against diverse bacterial



- pathogens, *Methods Enzymol.* 663 (2022) 131–156.  
<https://doi.org/10.1016/BS.MIE.2021.10.008>.
- [222] K. Sankaranarayanan, R.P. Ramachandran, R. Sundararajan, Electrically-enhanced proliferation control of cancer-stem-cells-like adult human mesenchymal stem cells – a novel modality of treatment, *Electroporation-Based Therapies for Cancer.* (2014) 127–159.  
<https://doi.org/10.1533/9781908818294.127>.
- [223] S. Joshi, Hospital antibiogram: A necessity, *Indian J Med Microbiol.* 28 (2010) 277–280. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.71802>.
- [224] M. Geetha, A.K. Singh, R. Asokamani, A.K. Gogia, Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review, *Prog Mater Sci.* 54 (2009) 397–425. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2008.06.004>.
- [225] P. Ducheyne, Biomaterials, *Comprehensive Biomaterials.* (2011) 1–4.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-055294-1.00275-0>.
- [226] Q. Chen, G.A. Thouas, Metallic implant biomaterials, *Materials Science and Engineering R: Reports.* 87 (2015) 1–57.  
<https://doi.org/10.1016/j.mser.2014.10.001>.
- [227] N.O. Aguirre, J.J. Olaya, Estado del arte en biocompatibilidad de recubrimientos, *Vision Electronica.* Vol 7 (2013) 160–177.
- [228] P. Castany, D.M. Gordin, S.I. Drob, C. Vasilescu, V. Mitran, A. Cimpean, T. Gloriant, Deformation Mechanisms and Biocompatibility of the Superelastic Ti–23Nb–0.7Ta–2Zr–0.5N Alloy, *Shape Memory and Superelasticity.* 2 (2016) 18–28.  
<https://doi.org/10.1007/s40830-016-0057-0>.
- [229] V. V. Divya Rani, L. Vinoth-Kumar, V.C. Anitha, K. Manzoor, M. Deepthy, V.N. Shantikumar, Osteointegration of titanium implant is sensitive to specific nanostructure morphology, *Acta Biomater.* 8 (2012) 1976–1989.  
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.01.021>.
- [230] D. V. Portan, A.A. Kroustalli, D.D. Deligianni, G.C. Papanicolaou, On the biocompatibility between TiO<sub>2</sub> nanotubes layer and human osteoblasts, *J Biomed Mater Res A.* 100 A (2012) 2546–2553. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34188>.
- [231] W. LI, J. ZHOU, Y. XU, Study of the *in vitro* cytotoxicity testing of medical devices, *Biomed Rep.* 3 (2015) 617–620. <https://doi.org/10.3892/br.2015.481>.
- [232] R. Komeri, N. Kasoju, P.R. Anil Kumar, *In vitro* cytotoxicity and cytocompatibility assays for biomaterial testing under regulatory platform, *Biomedical Product and*

- Materials Evaluation: Standards and Ethics. (2022) 329–353. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823966-7.00009-8>.
- [233] Biocompatibility and Tissue Reaction to Biomaterials, Craig's Restorative Dental Materials. (2012) 109–133. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-08108-5.10006-4>.
- [234] B. Drasler, P. Sayre, K.G. Steinhäuser, A. Petri-Fink, B. Rothen-Rutishauser, *In vitro* approaches to assess the hazard of nanomaterials, *NanoImpact*. 8 (2017) 99–116. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.08.002>.
- [235] S. Arora, J.M. Rajwade, K.M. Paknikar, Nanotoxicology and *in vitro* studies: The need of the hour, *Toxicol Appl Pharmacol*. 258 (2012) 151–165. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.11.010>.
- [236] M. Benedetti, E. Torresani, M. Leoni, V. Fontanari, M. Bandini, C. Pederzoli, C. Potrich, The effect of post-sintering treatments on the fatigue and biological behavior of Ti-6Al-4V ELI parts made by selective laser melting, Elsevier Ltd, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.03.024>.
- [237] S.D. Mahajan, W.C. Law, R. Aalinkeel, J. Reynolds, B.B. Nair, K.T. Yong, I. Roy, P.N. Prasad, S.A. Schwartz, Nanoparticle-Mediated Targeted Delivery of Antiretrovirals to the Brain, *Methods Enzymol*. 509 (2012) 41–60. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391858-1.00003-4>.
- [238] E. CHACON, D. ACOSTA, J.J. LEMASTERS, Primary Cultures of Cardiac Myocytes as *In Vitro* Models for Pharmacological and Toxicological Assessments, *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*. (1997) 209–223. <https://doi.org/10.1016/B978-012163390-5.50010-7>.
- [239] M. Ghasemi, T. Turnbull, S. Sebastian, I. Kempson, The MTT assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis, *Int J Mol Sci*. 22 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>.
- [240] X. Zhou, D. Xu, S. Geng, Y. Fan, M. Liu, Q. Wang, F. Wang, Mechanical properties, corrosion behavior and cytotoxicity of Ti-6Al-4V alloy fabricated by laser metal deposition, *Mater Charact*. 179 (2021) 111302. <https://doi.org/10.1016/J.MATCHAR.2021.111302>.
- [241] V.S.A. Challa, S. Mali, R.D.K. Misra, Reduced toxicity and superior cellular response of preosteoblasts to Ti-6Al-7Nb alloy and comparison with Ti-6Al-4V, *J Biomed Mater Res A*. 101 A (2013) 2083–2089. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34492>.



- [242] A.C. Bărbîntă, K. Earar, C.I. Crimu, L.A. Drăgan, C. Munteanu, *In vitro* evaluation of the cytotoxicity of some new titanium alloys, *Key Eng Mater.* 587 (2014) 303–308. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.587.303>.
- [243] I. Braceras, J.I. Onate, L. Goikoetxea, J.L. Viviente, J.I. Alava, M.A. de Maeztu, Bone cell adhesion on ion implanted titanium alloys, *Surf Coat Technol.* 196 (2005) 321–326. <https://doi.org/10.1016/J.SURFCOAT.2004.08.201>.
- [244] P.A. Janmey, C.A. McCulloch, R.T. Miller, Extracellular Regulation of Cell-to-Matrix Adhesion, *Encyclopedia of Cell Biology.* 3 (2016) 192–198. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.30026-8>.
- [245] R.P. McEver, F.W. Luscinskas, Cell Adhesion, *Hematology: Basic Principles and Practice.* (2018) 127–134. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35762-3.00012-3>.
- [246] C. Nakamura, H. Kim, New Sensing Technologies: Atomic Force Microscopy, *Encyclopedia of Sensors and Biosensors.* (2023) 556–571. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822548-6.00043-1>.
- [247] M.A. De Maeztu, I. Braceras, J.I. Álava, C. Recio, M. Piñera, C. Gay-Escoda, Human study of ion implantation as a surface treatment for dental implants, *Int J Oral Maxillofac Surg.* 42 (2013) 891–896. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2013.02.020>.
- [248] K. Anselme, Osteoblast adhesion on biomaterials, *Biomaterials.* 21 (2000) 667–681. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00242-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00242-2).
- [249] B. Vanslebrouck, J.H. Chen, C. Larabell, J. van Hengel, Microscopic Visualization of Cell-Cell Adhesion Complexes at Micro and Nanoscale, *Front Cell Dev Biol.* 10 (2022) 1–27. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.819534>.
- [250] J. Nakanishi, Y. Kikuchi, T. Takarada, H. Nakayama, K. Yamaguchi, M. Maeda, Photoactivation of a Substrate for Cell Adhesion under Standard Fluorescence Microscopes, *J Am Chem Soc.* 126 (2004) 16314–16315. <https://doi.org/10.1021/ja044684c>.
- [251] J.S. Burmeister, L.A. Olivier, W.M. Reichert, G.A. Truskey, Application of total internal reflection fluorescence microscopy to study cell adhesion to biomaterials, *Biomaterials.* 19 (1998) 307–325. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(97\)00109-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(97)00109-9).
- [252] S. Minagar, Y. Li, C.C. Berndt, C. Wen, The influence of titania-zirconia-zirconium titanate nanotube characteristics on osteoblast cell adhesion, *Acta Biomater.* 12 (2015) 281–289. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.10.037>.

- [253] S. Saha, R. Kumar, K. Pramanik, A. Biswas, Interaction of osteoblast-TiO<sub>2</sub> nanotubes *in vitro*: The combinatorial effect of surface topography and other physico-chemical factors governs the cell fate, *Appl Surf Sci.* (2018) 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.01.160>.
- [254] T. Guo, S. Ivanovski, K. Gulati, Optimizing titanium implant nano-engineering via anodization, *Mater Des.* 223 (2022) 111110. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2022.111110>.
- [255] M.P. Neupane, I.S. Park, T.S. Bae, H.K. Yi, F. Watari, M.H. Lee, Biocompatibility of TiO<sub>2</sub> nanotubes fabricated on Ti using different surfactant additives in electrolyte, *Mater Chem Phys.* 134 (2012) 536–541. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2012.03.029>.
- [256] Z. Yang, X. Wei, W. Gao, P. Cao, Anodization of NiTi alloy in an ethylene glycol electrolyte, *Surf Coat Technol.* 252 (2014) 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2014.04.060>.
- [257] A. Hudecki, G. Kiryczyński, M.J. Łos, Biomaterials, Definition, Overview, Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine. (2019) 85–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812258-7.00007-1>.
- [258] W. Jin, P.K. Chu, Orthopedic Implants, *Encyclopedia of Biomedical Engineering.* 1–3 (2019) 425–439. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.10999-7>.
- [259] Dental and Orofacial Implants, *Craig's Restorative Dental Materials.* (2012) 355–367. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-08108-5.10015-5>.
- [260] A. Bassi, J. Gough, M. Zakikhani, S. Downes, Bone tissue regeneration, *Electrospinning for Tissue Regeneration.* (2011) 93–110. <https://doi.org/10.1533/9780857092915.2.93>.
- [261] W.J. Li, K. Gollapudi, D.P. Patterson, G.T.J. Huang, R.S. Tuan, Cell-Based Therapies for Musculoskeletal Repair, *Principles of Regenerative Medicine.* (2008) 888–911. <https://doi.org/10.1016/B978-012369410-2.50053-X>.
- [262] L.M. Martinez, V. Labovsky, V.B. Fernández-Vallone, C.H. Choi, M.A. Amorós, C. Phillips, N.A. Chasseing, Mesenchymal Stem Cells as Regulators of the Bone Marrow and Bone Components, *Mesenchymal Stromal Cells as Tumor Stromal Modulators.* (2017) 369–400. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803102-5.00015-X>.
- [263] A.K. Dillow, M. Tirrell, Targeted cellular adhesion at biomaterial interfaces, *Curr Opin Solid State Mater Sci.* 3 (1998) 252–259. [https://doi.org/10.1016/S1359-0286\(98\)80099-5](https://doi.org/10.1016/S1359-0286(98)80099-5).

- [264] D.S. Hwang, S.B. Sim, H.J. Cha, Cell adhesion biomaterial based on mussel adhesive protein fused with RGD peptide, *Biomaterials*. 28 (2007) 4039–4046. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2007.05.028>.
- [265] S. Akbari-Alavijeh, R. Shaddel, S.M. Jafari, *In vivo* assays for evaluating the release of nanoencapsulated food ingredients, *Release and Bioavailability of Nanoencapsulated Food Ingredients*. (2020) 179–207. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815665-0.00005-9>.
- [266] E.C. Roti Roti, S.M. Salih, M.B. Zelinski, *In Vivo* Models of Ovarian Toxicity, Cancer Treatment and the Ovary: Clinical and Laboratory Analysis of Ovarian Toxicity. (2015) 65–78. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801591-9.00005-9>.
- [267] J.B. Raftis, N.L. Mills, R. Duffin, Cardiovascular System, Adverse Effects of Engineered Nanomaterials: Exposure, Toxicology, and Impact on Human Health. (2012) 139–156. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386940-1.00008-8>.
- [268] A.A. Tayel, N.M. Sorour, A.F. El-Baz, W.F. El-Tras, Nanometals appraisal in food preservation and food-related activities, *Food Preservation*. (2017) 487–526. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804303-5.00014-6>.
- [269] J.M. Anderson, F.J. Schoen, *In Vivo* Assessment of Tissue Compatibility, *Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition*. (2013) 609–617. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00054-1>.
- [270] D. Tosi, M. Sypabekova, A. Bekmurzayeva, C. Molardi, K. Dukenbayev, Medical devices and standards, *Optical Fiber Biosensors*. (2022) 293–298. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819467-6.00012-3>.
- [271] K.P. Coleman, W. V. Christian, W. Zhang, Accelerating medical device biocompatibility evaluation: An industry perspective, *Biocompatibility and Performance of Medical Devices*. (2020) 223–262. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102643-4.00010-0>.
- [272] S. Bell, E. Ajami, J.E. Davies, An improved mechanical testing method to assess bone-implant anchorage, *Journal of Visualized Experiments*. (2014) 1–10. <https://doi.org/10.3791/51221>.
- [273] O. Hakimi, F. Vollrath, A.J. Carr, Evaluation of Silk as a Scaffold for Musculoskeletal Regeneration – the Path from the Laboratory to Clinical Trials, *Comprehensive Biotechnology*, Second Edition. 5 (2011) 341–351. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00435-9>.
- [274] G.M. Raghavendra, K. Varaprasad, T. Jayaramudu, *Biomaterials: Design, Development and Biomedical Applications*, *Nanotechnology Applications for*

- Tissue Engineering. (2015) 21–44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-32889-0.00002-9>.
- [275] S. Ramakrishna, L. Tian, C. Wang, S. Liao, W.E. Teo, Safety testing of a new medical device, *Medical Devices*. (2015) 137–153. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100289-6.00006-5>.
- [276] T. Futami, N. Fujii, H. Ohnishi, N. Taguchi, H. Kusakari, H. Ohshima, T. Maeda, Tissue Response to Titanium Implants in the Rat Maxilla: Ultrastructural and Histochemical Observations of the Bone-Titanium Interface, *J Periodontol*. 71 (2000) 287–298. <https://doi.org/10.1902/jop.2000.71.2.287>.
- [277] X. Zhang, H. Liu, L. Li, C. Huang, X. Meng, J. Liu, X. Bai, L. Ren, X. Wang, K. Yang, L. Qin, Promoting osteointegration effect of Cu-Alloyed titanium in ovariectomized rats, *Regen Biomater*. 9 (2022). <https://doi.org/10.1093/rb/rbac011>.
- [278] A.A. Pelegrine, P.K. Moy, A. Moshaverinia, A.L.D.A. Escada, J. Calvo-Guirado, A.P.R.A. Claro, Development of a novel nanotextured titanium implant. An experimental study in rats, *J Clin Med*. 8 (2019). <https://doi.org/10.3390/jcm8070954>.
- [279] J. Dudeck, S. Rehberg, R. Bernhardt, W. Schneiders, O. Zierau, M. Inderchand, J. Goebbels, G. Vollmer, P. Fratzl, D. Scharnweber, S. Rammelt, Increased bone remodelling around titanium implants coated with chondroitin sulfate in ovariectomized rats, *Acta Biomater*. 10 (2014) 2855–2865. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2014.01.034>.
- [280] A.R. Martins, G.S.S. Matias, V.F. Batista, M.A. Miglino, P. Fratini, Wistar rat dermis recellularization, *Res Vet Sci*. 131 (2020) 222–231. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2020.05.005>.
- [281] P. González Ramos, N. Nassar Melic, N. Herráiz Esteban, M.J. Boillos Calvo, P. Pérez Hiraldo, P. Ibáñez Burillo, La rata Wistar como modelo animal experimental, para el adiestramiento laparoscópico de residentes con entrenadores pélvicos, *Progresos de Obstetricia y Ginecología*. 54 (2011) 325–329. <https://doi.org/10.1016/j.pog.2010.11.003>.
- [282] J.G. Arcila, Evaluación Histologica del Proceso de Cicatrización de Implantes Ortodonticos de Titanio. Modelo Animal En Ratas Wistar SPF, Universidad nacional de Colombia, 2016.
- [283] R. Piozzi, D.A. Ribeiro, L.E.M. Padovan, H. Nary Filho, M.A. Matsumoto, Genotoxicity and cytotoxicity in multiple organs induced by titanium miniplates in

- Wistar rats, *J Biomed Mater Res A*. 88 (2009) 342–347. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31876>.
- [284] M.P. Chávez Díaz, S.A. Henche, M.R. Yanchuck, C.C. de Arriba, R.C. Sierra, M.L.E. Rincón, J.M. Hallen, Implantation of heat treatment Ti6Al4v alloys in femoral bone of Wistar rats, *J Mater Sci Mater Med*. 33 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10856-022-06691-2>.
- [285] A. Sarmiento-González, J.R. Encinar, J.M. Marchante-Gayón, A. Sanz-Medel, Titanium levels in the organs and blood of rats with a titanium implant, in the absence of wear, as determined by double-focusing ICP-MS, *Anal Bioanal Chem*. 393 (2009) 335–343. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2449-2>.
- [286] P. SPARC (Organization), L. Monsalve Guil, N. Matos Garrido, J. Moreno Muñoz, E. Nuñez Márquez, E. Velasco Ortega, P. Blanco López, L. Monsalve Guil, N. Matos Garrido, J. Moreno Muñoz, E. Nuñez Márquez, E. Velasco Ortega, *Avances en odontoestomatología. Sc*], (2018).
- [287] A.M.B. Moscony, T. Shank, *Wrist Fractures, Fundamentals of Hand Therapy: Clinical Reasoning and Treatment Guidelines for Common Diagnoses of the Upper Extremity: Second Edition*. (2014) 312–335. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-09104-6.00025-0>.
- [288] J. Li, D.L. Stocum, *Fracture Healing, Basic and Applied Bone Biology*. (2014) 205–223. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416015-6.00010-1>.
- [289] *Sports Injuries, Traditional Chinese Medicine Cupping Therapy: Third Edition*. (2014) 211–230. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4352-9.00014-X>.
- [290] S.W. Moore, B, *Griffith's Instructions for Patients*. (2011) 29–49. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0909-4.50004-X>.
- [291] C.M. Weaver, K.M.H. Gallant, *Osteoporosis: The Early Years, Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease*. (2017) 969–989. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802928-2.00044-8>.
- [292] E.G. Meinberg, J. Agel, C.S. Roberts, M.D. Karam, J.F. Kellam, *Fracture and Dislocation Classification Compendium-2018*, *J Orthop Trauma*. 32 (2018) S1–S170. <https://doi.org/10.1097/BOT.0000000000001063>.
- [293] *OTA Open Fracture Classification (OTA-OFC)*, *J Orthop Trauma*. 32 (2018) S106. <https://doi.org/10.1097/BOT.0000000000001064>.
- [294] S.F. Kane, *Ankle Fractures, The Sports Medicine Resource Manual*. (2008) 354–368. <https://doi.org/10.1016/B978-141603197-0.10028-X>.

- [295] V. Kumar, A.K. Abbas, Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional, Elsevier Health Sciences, 2021.
- [296] M. Marenzana, T.R. Arnett, The Key Role of the Blood Supply to Bone, *Bone Res.* 1 (2013) 203–215. <https://doi.org/10.4248/BR201303001>.
- [297] R.E. Tomlinson, M.J. Silva, Skeletal Blood Flow in Bone Repair and Maintenance, *Bone Res.* 1 (2013) 311–322. <https://doi.org/10.4248/BR201304002>.
- [298] C.G. Kang, Y.B. Park, H. Choi, S. Oh, K.W. Lee, S.H. Choi, J.S. Shim, Osseointegration of Implants Surface-Treated with Various Diameters of TiO<sub>2</sub> Nanotubes in Rabbit, *J Nanomater.* 2015 (2015). <https://doi.org/10.1155/2015/634650>.
- [299] N. Wang, H. Li, W. Lü, J. Li, J. Wang, Z. Zhang, Y. Liu, Effects of TiO<sub>2</sub> nanotubes with different diameters on gene expression and osseointegration of implants in minipigs, *Biomaterials.* 32 (2011) 6900–6911. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.06.023>.
- [300] N.A. Al-Mobarak, A.A. Al-Swayih, Development of titanium surgery implants for improving osseointegration through formation of a titanium nanotube layer, *Int J Electrochem Sci.* 9 (2014) 32–45.
- [301] X. Lu, Z. Wu, K. Xu, X. Wang, S. Wang, H. Qiu, X. Li, J. Chen, Multifunctional Coatings of Titanium Implants Toward Promoting Osseointegration and Preventing Infection: Recent Developments, *Front Bioeng Biotechnol.* 9 (2021) 1–19. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.783816>.
- [302] J. Wang, P. Layrolle, M. Stigter, K. De Groot, Biomimetic and electrolytic calcium phosphate coatings on titanium alloy: physicochemical characteristics and cell attachment, *Biomaterials.* 25 (2004) 583–592. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00559-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00559-3).
- [303] X. Lu, Z. Zhao, Y. Leng, Calcium phosphate crystal growth under controlled atmosphere in electrochemical deposition, *J Cryst Growth.* 284 (2005) 506–516. <https://doi.org/10.1016/J.JCRYSGRO.2005.07.032>.
- [304] J.H. Park, D.Y. Lee, K.T. Oh, Y.K. Lee, K.M. Kim, K.N. Kim, Bioactivity of calcium phosphate coatings prepared by electrodeposition in a modified simulated body fluid, *Mater Lett.* 60 (2006) 2573–2577. <https://doi.org/10.1016/J.MATLET.2005.07.091>.
- [305] Y. Parcharoen, P. Kajitvichyanukul, S. Sirivisoot, P. Termsuksawad, Hydroxyapatite electrodeposition on anodized titanium nanotubes for orthopedic

- applications, Appl Surf Sci. 311 (2014) 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.04.207>.
- [306] X. Zhang, D. Zhang, Q. Peng, J. Lin, C. Wen, Biocompatibility of nanoscale hydroxyapatite coating on TiO<sub>2</sub> nanotubes, Materials. 12 (2019) 2–13. <https://doi.org/10.3390/ma12121979>.
- [307] C.E. Wen, W. Xu, W.Y. Hu, P.D. Hodgson, Hydroxyapatite/titania sol-gel coatings on titanium-zirconium alloy for biomedical applications, Acta Biomater. 3 (2007) 403–410. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2006.10.004>.
- [308] N. Murugan, C. Murugan, A.K. Sundramoorthy, *In vitro* and *in vivo* characterization of mineralized hydroxyapatite/polycaprolactone-graphene oxide based bioactive multifunctional coating on Ti alloy for bone implant applications, Arabian Journal of Chemistry. 11 (2018) 959–969. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.03.020>.
- [309] T. Hanawa, Transition of surface modification of titanium for medical and dental use, Titanium in Medical and Dental Applications. (2018) 95–113. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812456-7.00005-6>.
- [310] M. Jing, T. Wu, G. Zou, H. Hou, X. Ji, Nanomaterials for electrochemical energy storage, Frontiers of Nanoscience. 18 (2021) 421–484. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820055-1.00012-5>.
- [311] H.M. Yadav, S.K. Shinde, D.Y. Kim, T.P. Chavan, N.D. Thorat, S. Ramesh, C.D. Bathula, Metal oxide-based composites: synthesis and characterization, Advances in Metal Oxides and Their Composites for Emerging Applications. (2022) 57–96. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85705-5.00010-5>.
- [312] M. Hong, J. Zou, Z.G. Chen, Synthesis of thermoelectric materials, Thermoelectricity and Advanced Thermoelectric Materials. (2021) 73–103. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819984-8.00010-2>.
- [313] F. Basile, P. Benito, G. Fornasari, M. Monti, E. Scavetta, D. Tonelli, A. Vaccari, A novel electrochemical route for the catalytic coating of metallic supports, Stud Surf Sci Catal. 175 (2010) 51–58. [https://doi.org/10.1016/S0167-2991\(10\)75007-2](https://doi.org/10.1016/S0167-2991(10)75007-2).
- [314] S.S. Abd El Rehim, M.E. El Ayashy, Effect of some plating variables on the electrodeposition of Cu-Zn alloys from alkaline tartrate baths, J Appl Electrochem. 8 (1978) 33–39. <https://doi.org/10.1007/BF00615391>.
- [315] A.E.H.M. Abd El-Halim, R.M. Khalil, Effects of Some Plating Variables on the Electrodeposition of Catalytically Active Nickel-Thallium Alloy Powders., Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Chemical Technology. 35 (1985) 407–414. <https://doi.org/10.1002/jctb.5040350805>.



- [316] A.M.A. El-Halim, M.I. Sobahi, Effect of bath constituents and some plating variables on the electrodeposition of cadmium from acidic chloride baths, *Surface Technology*. 19 (1983) 45–57. [https://doi.org/10.1016/0376-4583\(83\)90018-3](https://doi.org/10.1016/0376-4583(83)90018-3).
- [317] D.O. de la Federación, Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio Humanitario de Los Animales Domésticos y Silvestres. 7 (1995).
- [318] K. Indira, U.K. Mudali, T. Nishimura, N. Rajendran, A Review on TiO<sub>2</sub> Nanotubes: Influence of Anodization Parameters, Formation Mechanism, Properties, Corrosion Behavior, and Biomedical Applications, *J Bio Tribocorros*. 1 (2015) 28. <https://doi.org/10.1007/s40735-015-0024-x>.
- [319] I. Iewkitthayakorn, S. Janudom, N. Mahathaninwong, S. Karrila, J. Wannasin, Anodizing parameters for superheated slurry cast 7075 aluminum alloys, *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*. 29 (2019) 1200–1210. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(19\)65027-2](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(19)65027-2).
- [320] D. Regonini, C.R. Bowen, A. Jaroenworarluck, R. Stevens, A review of growth mechanism, structure and crystallinity of anodized TiO<sub>2</sub> nanotubes, *Materials Science and Engineering R: Reports*. 74 (2013) 377–406. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2013.10.001>.
- [321] D. Regonini, A. Satka, A. Jaroenworarluck, D.W.E. Allsopp, C.R. Bowen, R. Stevens, Factors influencing surface morphology of anodized TiO<sub>2</sub> nanotubes, *Electrochim Acta*. 74 (2012) 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.04.076>.
- [322] G. Liu, K. Wang, N. Hoivik, H. Jakobsen, Progress on free-standing and flow-through TiO<sub>2</sub> nanotube membranes, *Solar Energy Materials and Solar Cells*. 98 (2012) 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.solmat.2011.11.004>.
- [323] S.P. Albu, P. Schmuki, Influence of anodization parameters on the expansion factor of TiO<sub>2</sub> nanotubes, *Electrochim Acta*. 91 (2013) 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.12.094>.
- [324] A.F. Cipriano, C. Miller, H. Liu, Anodic growth and biomedical applications of TiO<sub>2</sub> nanotubes, *J Biomed Nanotechnol*. 10 (2014) 2977–3003. <https://doi.org/10.1166/jbn.2014.1927>.
- [325] D. Kowalski, D. Kim, P. Schmuki, TiO<sub>2</sub> nanotubes, nanochannels and mesosponge: Self-organized formation and applications, *Nano Today*. 8 (2013) 235–264. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2013.04.010>.



- [326] A. Ghicov, P. Schmuki, Self-ordering electrochemistry: a review on growth and functionality of TiO<sub>2</sub> nanotubes and other self-aligned MO<sub>x</sub> structures, *Chemical Communications*. (2009) 2791. <https://doi.org/10.1039/b822726h>.
- [327] R. Hang, Y. Liu, L. Zhao, A. Gao, L. Bai, X. Huang, X. Zhang, B. Tang, P.K. Chu, Fabrication of Ni-Ti-O nanotube arrays by anodization of NiTi alloy and their potential applications, *Sci Rep.* 4 (2014) 21–24. <https://doi.org/10.1038/srep07547>.
- [328] Y. Ruiquan, J. Longfei, Z. Xufei, S. Ye, Y. Dongliang, H. Aijun, Theoretical derivation of ionic current and electronic current and comparison between fitting curves and measured curves, *RSC Adv.* 2 (2012) 12474. <https://doi.org/10.1039/c2ra22124a>.
- [329] A. Ghicov, P. Schmuki, Self-ordering electrochemistry: a review on growth and functionality of TiO<sub>2</sub> nanotubes and other self-aligned MO<sub>x</sub> structures, *Chemical Communications*. (2009) 2791. <https://doi.org/10.1039/b822726h>.
- [330] E. Filova, J. Fojt, M. Kryslova, H. Moravec, L. Joska, L. Bacakova, The diameter of nanotubes formed on Ti-6Al-4V alloy controls the adhesion and differentiation of Saos-2 cells, *Int J Nanomedicine*. 10 (2015) 7145–7163. <https://doi.org/10.2147/IJN.S87474>.
- [331] R. Hang, Y. Liu, L. Zhao, A. Gao, L. Bai, X. Huang, X. Zhang, B. Tang, P.K. Chu, Fabrication of Ni-Ti-O nanotube arrays by anodization of NiTi alloy and their potential applications, *Sci Rep.* 4 (2014) 21–24. <https://doi.org/10.1038/srep07547>.
- [332] J. Fornell, N.T.C. Oliveira, E. Pellicer, N. Van Steenberge, M.D. Baró, C. Bolfarini, J. Sort, Anodic formation of self-organized Ti(Nb,Sn) oxide nanotube arrays with tuneable aspect ratio and size distribution, *Electrochem Commun.* 33 (2013) 84–87. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2013.04.023>.
- [333] L. Fanton, A. Cremasco, M.G. Mello, R. Caram, Anodization growth of TiO<sub>2</sub> nanotubes on Ti-35Nb-7Zr-5Ta alloy: effects of anodization time, strain hardening, and crystallographic texture, *J Mater Sci.* 54 (2019) 13724–13739. <https://doi.org/10.1007/s10853-019-03870-5>.
- [334] K. Gulati, R.D.O. Martinez, M. Czerwiński, M. Michalska-Domańska, Understanding the influence of electrolyte aging in electrochemical anodization of titanium, *Adv Colloid Interface Sci.* 302 (2022) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102615>.
- [335] J.L. Femenia, A. Vicente-Escuder, A. Amigó, J.L. Femenía, A. Vicente Escuder, A.A. Mata, E.F. Segovia López, V.A. Borrás, Influencia del voltaje en la formación

de nanotubos en aleaciones  $\alpha$ ,  $\alpha+\beta$  y  $\beta$  de titanio, XXXIV Congreso Anual de La Sociedad Española de Ingeniería Biomédica. (2017) 4–8.

- [336] H. Tsuchiya, J.M. MacAk, A. Ghicov, L. Taveira, P. Schmuki, Self-organized porous TiO<sub>2</sub> and ZrO<sub>2</sub> produced by anodization, *Corros Sci.* 47 (2005) 3324–3335. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2005.05.041>.
- [337] A.Z. Fatichi, M.G. Mello, R. Caram, A. Cremasco, Self-organized TiO<sub>2</sub> nanotube layer on Ti–Nb–Zr alloys: growth, characterization, and effect on corrosion behavior, *J Appl Electrochem.* 49 (2019) 1079–1089. <https://doi.org/10.1007/s10800-019-01345-8>.
- [338] K. Peng, L. Liu, J. Zhang, J. Ma, Y. Liu, The relationship between the growth rate of anodic TiO<sub>2</sub> nanotubes, the fluoride concentration and the electronic current, *Electrochem Commun.* 148 (2023) 107457. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2023.107457>.
- [339] X. Li, Y. Zhang, L. Gao, J. Ma, Y. Qiu, X. Xu, J. Ou, W. Ma, The growth rate of nanotubes and the quantity of charge during anodization, *Electrochem Commun.* 135 (2022) 107184. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2021.107184>.
- [340] X.J. Feng, J.M. Macak, S.P. Albu, P. Schmuki, Electrochemical formation of self-organized anodic nanotube coating on Ti-28Zr-8Nb biomedical alloy surface, *Acta Biomater.* 4 (2008) 318–323. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.08.005>.
- [341] Q. Liu, D. Ding, C. Ning, Anodic fabrication of Ti-Nb-Zr-O nanotube arrays, *J Nanomater.* 2014 (2014). <https://doi.org/10.1155/2014/240346>.
- [342] Y.H. Jeong, E.J. Kim, W.A. Brantley, H.C. Choe, Morphology of hydroxyapatite nanoparticles in coatings on nanotube-formed Ti-Nb-Zr alloys for dental implants, *Vacuum.* 107 (2014) 297–303. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2014.03.004>.
- [343] J.M. Macák, H. Tsuchiya, P. Schmuki, High-aspect-ratio TiO<sub>2</sub> nanotubes by anodization of titanium, *Angewandte Chemie - International Edition.* 44 (2005) 2100–2102. <https://doi.org/10.1002/anie.200462459>.
- [344] S.A. Batool, M. Salman Maqbool, M.A. Javed, A. Niaz, M.A.U. Rehman, A Review on the Fabrication and Characterization of Titania Nanotubes Obtained via Electrochemical Anodization, *Surfaces.* 5 (2022) 456–480. <https://doi.org/10.3390/surfaces5040033>.
- [345] P.D. Resende, R.M.R. Junqueira, J.D. Silva, N.I.A. Lopes, L.A. Santos, V.T.L. Bueno, Comparative study of nanostructured titania grown by electrochemical anodization of  $\alpha$ -Ti and  $\beta$ -TiNi substrates in organic electrolytes, *Journal of*

Materials Research and Technology. 9 (2020) 10121–10129.  
<https://doi.org/10.1016/J.JMRT.2020.07.009>.

- [346] X.J. Feng, J.M. Macak, S.P. Albu, P. Schmuki, Electrochemical formation of self-organized anodic nanotube coating on Ti-28Zr-8Nb biomedical alloy surface, *Acta Biomater.* 4 (2008) 318–323. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.08.005>.
- [347] A. Valota, D.J. LeClere, T. Hashimoto, P. Skeldon, G.E. Thompson, S. Berger, J. Kunze, P. Schmuki, The efficiency of nanotube formation on titanium anodized under voltage and current control in fluoride/glycerol electrolyte, *Nanotechnology.* 19 (2008). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/35/355701>.
- [348] M. Manjaiah, R.F. Laubscher, Effect of anodizing on surface integrity of Grade 4 titanium for biomedical applications, *Surf Coat Technol.* 310 (2017) 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2016.12.038>.
- [349] S. Berger, H. Tsuchiya, P. Schmuki, D.-Erlangen, Transition from Nanopores to Nanotubes: Self-Ordered Anodic Oxide Structures on Titanium-Aluminides, *Chem. Mater.* 20 (2008) 3245–3247. [https://doi.org/10.1016/j.cossms.2007.08.004.\(22\)](https://doi.org/10.1016/j.cossms.2007.08.004.(22)).
- [350] J. Fornell, N.T.C. Oliveira, E. Pellicer, N. Van Steenberge, M.D. Baró, C. Bolfarini, J. Sort, Anodic formation of self-organized Ti(Nb,Sn) oxide nanotube arrays with tuneable aspect ratio and size distribution, *Electrochem Commun.* 33 (2013) 84–87. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2013.04.023>.
- [351] E. Matykina, A. Conde, J. De Damborenea, D.M.Y. Marero, M.A. Arenas, Growth of TiO<sub>2</sub>-based nanotubes on Ti-6Al-4V alloy, *Electrochim Acta.* 56 (2011) 9209–9218. <https://doi.org/10.1016/J.ELECTACTA.2011.07.131>.
- [352] Y. Li, Y. Yang, R. Li, X. Tang, D. Guo, Y. Qing, Y. Qin, Enhanced antibacterial properties of orthopedic implants by titanium nanotube surface modification: A review of current techniques, *Int J Nanomedicine.* 14 (2019) 7217–7236. <https://doi.org/10.2147/IJN.S216175>.
- [353] S. Asadi, B. Mortezaigholi, A. Hadizadeh, V. Borisov, M.J. Ansari, H. Shaker Majdi, A. Nishonova, H. Adelnia, B. Farasati Far, C. Chaiyasut, Ciprofloxacin-Loaded Titanium Nanotubes Coated with Chitosan: A Promising Formulation with Sustained Release and Enhanced Antibacterial Properties, *Pharmaceutics.* 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14071359>.
- [354] T. Wang, Z. Weng, X. Liu, K.W.K. Yeung, H. Pan, S. Wu, Controlled release and biocompatibility of polymer/titania nanotube array system on titanium implants, *Bioact Mater.* 2 (2017) 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.02.001>.

- [355] G. Mohammadi Ziarani, S. Tahmasebi Ashtiani, F. Mohajer, A. Badii, The role of carbon nanotubes in antibiotics drug delivery, *Frontiers in Drug, Chemistry and Clinical Research*. 4 (2021) 1–12. <https://doi.org/10.15761/fdccr.1000151>.
- [356] H. Zare, S. Ahmadi, A. Ghasemi, M. Ghanbari, N. Rabiee, M. Bagherzadeh, M. Karimi, T.J. Webster, M.R. Hamblin, E. Mostafavi, Carbon nanotubes: Smart drug/gene delivery carriers, *Int J Nanomedicine*. 16 (2021) 1681–1706. <https://doi.org/10.2147/IJN.S299448>.
- [357] A. Khazi-Syed, M.T. Hasan, E. Campbell, R. Gonzalez-Rodriguez, A. V. Naumov, Single-walled carbon nanotube-assisted antibiotic delivery and imaging in *S. Epidermidis* strains addressing antibiotic resistance, *Nanomaterials*. 9 (2019) 1–16. <https://doi.org/10.3390/nano9121685>.
- [358] N.K. Allam, F. Alamgir, M. a El-sayed, Enhanced Photo Assisted Water Electrolysis Using Vertically Oriented Anodically Fabricated Ti Nb Zr O, *ACS Nano*. 4 (2010) 5819–5826.
- [359] Y. Sul, Electrochemical growth behavior, surface properties, and enhanced *in vivo* bone response of TiO<sub>2</sub> nanotubes on microstructured surfaces of blasted, screw-shaped titanium implants, (2010).
- [360] X. Zhao, M. Dai, S. Li, Y. Hao, R. Yang, L. Wang, Y. Liu, Mixture of Oxides with Different Valence States in Nanotubes, *J Mater Sci Technol*. 32 (2016) 142–146. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2015.10.017>.
- [361] N.C. Verissimo, A. Cremasco, C.A. Rodrigues, R. Bertazzoli, R. Caram, In situ characterization of the effects of Nb and Sn on the anatase–rutile transition in TiO<sub>2</sub> nanotubes using high-temperature X-ray diffraction, *Appl Surf Sci*. 307 (2014) 372–381. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.04.040>.
- [362] J. Luo, X. Luo, J. Crittenden, J. Qu, Y. Bai, Y. Peng, J. Li, Removal of Antimonite (Sb(III)) and Antimonate (Sb(V)) from Aqueous Solution Using Carbon Nanofibers That Are Decorated with Zirconium Oxide (ZrO<sub>2</sub>), *Environ Sci Technol*. 49 (2015) 11115–11124. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02903>.
- [363] K. Yasuda, P. Schmuki, Control of morphology and composition of self-organized zirconium titanate nanotubes formed in (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/NH<sub>4</sub>F electrolytes, *Electrochim Acta*. 52 (2007) 4053–4061. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2006.11.023>.
- [364] G. Li, H. Tang, W. Zhang, Fabrication of multilayer Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> nanoporous film by anodization of niobium foils, *Rare Metals*. (2013) 13–16. <https://doi.org/10.1007/s12598-013-0140-z>.

- [365] M. Supernak-Marczewska, A. Ossowska, P. Strąkowska, A. Zieliński, Nanotubular Oxide Layers and Hydroxyapatite Coatings on Porous Titanium Alloy Ti13Nb13Zr, *Advances in Materials Science*. 18 (2018) 17–23. <https://doi.org/10.1515/adms-2017-0046>.
- [366] G. Strnad, L. Jakab-farkas, F.S. Gobber, Synthesis and Characterization of Nanostructured Oxide Layers on Ti-Nb-Zr-Ta and Ti-Nb-Zr-Fe Biomedical Alloys, (2023).
- [367] R. E. Buntrock, *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, Fourteenth Edition Edited by Maryadele J. O'Neil, Patricia E. Heckelman, Cherie B. Koch, and Kristin J. Roman. Merck & Co., Inc.: Whitehouse Station, New Jersey, 2006. xiv + 1756 pp. + tables and indexes; includes CD and Internet access. ISBN 978-0-911910-00-1. Hardcover. U.S. \$125.00., *J Chem Inf Model*. 47 (2007) 703–704. <https://doi.org/10.1021/ci700022n>.
- [368] L. Draghi, V. Preda, M. Moscatelli, M. Santin, R. Chiesa, Gentamicin-Loaded TiO<sub>2</sub> Nanotubes as Improved Antimicrobial Surfaces for Orthopedic Implants, *Front Mater*. 7 (2020). <https://doi.org/10.3389/fmats.2020.00233>.
- [369] M. Ng, V. Guarino, W. Abdul Khodir, D. Susanti, A. Abdul Razak, Encapsulation and Characterization of Gentamicin Sulfate in the Collagen Added Electrospun Nanofibers for Skin Regeneration, *J Funct Biomater*. 9 (2018) 36. <https://doi.org/10.3390/jfb9020036>.
- [370] M. Diefenbeck, C. Schrader, F. Gras, T. Mückley, J. Schmidt, S. Zankovych, J. Bossert, K.D. Jandt, A. Völpel, B.W. Sigusch, H. Schubert, S. Bischoff, W. Pfister, B. Edel, M. Faucon, U. Finger, Gentamicin coating of plasma chemical oxidized titanium alloy prevents implant-related osteomyelitis in rats, *Biomaterials*. 101 (2016) 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.05.039>.
- [371] Y.Q. Liang, Z.D. Cui, S.L. Zhu, X.J. Yang, Characterization of self-organized TiO<sub>2</sub> nanotubes on Ti–4Zr–22Nb–2Sn alloys and the application in drug delivery system, *J Mater Sci Mater Med*. 22 (2011) 461–467. <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4234-6>.
- [372] S.B. Patel, N. Baker, I. Marques, A. Hamlekhan, M.T. Mathew, C. Takoudis, C. Friedrich, C. Sukotjo, T. Shokuhfar, Transparent TiO<sub>2</sub> nanotubes on zirconia for biomedical applications, *RSC Adv*. 7 (2017) 30397–30410. <https://doi.org/10.1039/c7ra03940a>.
- [373] L.R. Rodrigues, C.G.B.T. Dias, H.J. Ceragioli, A.C.D. Rodas, F.J.M. Monteiro, C.A.C. Zavaglia, FTIR analysis and cytotoxicity test of titanium dioxide nanoparticles, *Key Eng Mater*. 493–494 (2012) 768–774. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.493-494.768>.

- [374] M. Madani, K. Omri, N. Fattah, A. Ghorbal, X. Portier, Influence of silica ratio on structural and optical properties of SiO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> nanocomposites prepared by simple solid-phase reaction, *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*. 28 (2017) 12977–12983. <https://doi.org/10.1007/s10854-017-7129-6>.
- [375] P.P. Nampi, V.S. Mohan, A.K. Sinha, H. Varma, High surface area sol-gel nano silica as a novel drug carrier substrate for sustained drug release, *Mater Res Bull*. 47 (2012) 1379–1384. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2012.03.003>.
- [376] C. Pérez-Jorge, A. Conde, M.A. Arenas, R. Pérez-Tanoira, E. Matykina, J.J. De Damborenea, E. Gómez-Barrena, J. Esteban, *In vitro* assessment of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* adhesion on TiO<sub>2</sub> nanotubes on Ti-6Al-4V alloy, *J Biomed Mater Res A*. 100 A (2012) 1696–1705. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34118>.
- [377] M. Yoshinari, Y. Oda, T. Inoue, M. Shimono, Dry-process surface modification for titanium dental implants, *Metallurgical and Materials Transactions A*. 33 (2002) 511–519. <https://doi.org/10.1007/s11661-002-0113-6>.
- [378] Y. Yang, T. Tang, *In vivo* evaluation of the anti-infection potential of gentamicin-loaded nanotubes on titania implants, *J Orthop Translat*. 7 (2016) 79. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2016.06.039>.
- [379] J.-I. Alós, Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global, *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 33 (2015) 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>.
- [380] N. Pérez, N. Pavas, E. Isabel Rodríguez, Resistencia de *Staphylococcus aureus* a los antibióticos en un hospital de la orinoquia colombiana, *Infectio*. 14 (2010) 167–173. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(10\)70108-9](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(10)70108-9).
- [381] S. Yenyol, Z. He, B. Yüksel, R.J. Boylan, M. Ürgen, T. Özdemir, J.L. Ricci, Antibacterial activity of As-annealed TiO<sub>2</sub> nanotubes doped with Ag nanoparticles against periodontal pathogens, *Bioinorg Chem Appl*. 2014 (2014). <https://doi.org/10.1155/2014/829496>.
- [382] P. Gupta, Nonmetals and micronutrients, *Illustrated Toxicology*. (2018) 225–245. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813213-5.00007-9>.
- [383] S. Swaminathan, M. Singh, Trace elements, toxic metals, and metalloids in kidney disease, *Nutritional Management of Renal Disease*, Fourth Edition. (2022) 467–488. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818540-7.00019-7>.
- [384] K.-H.W. LAU, D.J. BAYLINK, Fluoride Therapy of Established Osteoporosis, *The Aging Skeleton*. (1999) 587–612. <https://doi.org/10.1016/B978-012098655-2/50050-8>.



- [385] S.H. Nemati, A. Hadjizadeh, Gentamicin-Eluting Titanium Dioxide Nanotubes Grown on the Ultrafine-Grained Titanium, AAPS PharmSciTech. (2017). <https://doi.org/10.1208/s12249-016-0679-8>.
- [386] A.J. Bint, R.H. George, D.E. Healing, R. Wise, M. Davies, An outbreak of infection caused by a gentamicin- resistant *Staphylococcus aureus*, (1977) 165–167.
- [387] M. Kulkarni, A. Mazare, E. Gongadze, Perutkova, V. Kralj-Iglic, I. Milošev, P. Schmuki, A. Iglíč, M. Mozetič, Titanium nanostructures for biomedical applications, Nanotechnology. 26 (2015). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/26/6/062002>.
- [388] M. Mansoorianfar, M. Tavoosi, R. Mozafarinia, A. Ghasemi, A. Doostmohammadi, Preparation and characterization of TiO<sub>2</sub> nanotube arrays on Ti6Al4V surface for enhancement of cell treatment, Surf Coat Technol. 321 (2017) 409–415. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2017.05.016>.
- [389] K.P. Steckiewicz, E. Barcinska, A. Malankowska, A. Zauszkiewicz–Pawlak, G. Nowaczyk, A. Zaleska-Medynska, I. Inkielewicz-Stepniak, Impact of gold nanoparticles shape on their cytotoxicity against human osteoblast and osteosarcoma in *in vitro* model. Evaluation of the safety of use and anti-cancer potential, J Mater Sci Mater Med. 30 (2019) 1–15. <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6221-2>.
- [390] R. Sharma, D. Sharma, L.D. Hazlett, N.K. Singh, Nano-Biomaterials for Retinal Regeneration, Nanomaterials. 11 (2021) 1–25. <https://doi.org/10.3390/nano11081880>.
- [391] E.N. Taylor, T.J. Webster, The use of superparamagnetic nanoparticles for prosthetic biofilm prevention., Int J Nanomedicine. 4 (2009) 145–152. <https://doi.org/10.2147/ijn.s5976>.
- [392] S.D. Puckett, E. Taylor, T. Raimondo, T.J. Webster, The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment, Biomaterials. 31 (2010) 706–713. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2009.09.081>.
- [393] M.J. Dalby, N. Gadegaard, R. Tare, A. Andar, M.O. Riehle, P. Herzyk, C.D.W. Wilkinson, R.O.C. Oreffo, The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder, Nat Mater. 6 (2007) 997–1003. <https://doi.org/10.1038/nmat2013>.
- [394] T.P. Kunzler, C. Huwiler, T. Drobek, J. Vörös, N.D. Spencer, Systematic study of osteoblast response to nanotopography by means of nanoparticle-density gradients, Biomaterials. 28 (2007) 5000–5006. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2007.08.009>.

- [395] U. Engel, Structured illumination superresolution imaging of the cytoskeleton, *Methods Cell Biol.* 123 (2014) 315–333. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420138-5.00017-3>.
- [396] R.K. Delong, Q. Zhou, Studying Cell-like Structures with Liposome, DNA, and Protein, *Introductory Experiments on Biomolecules and Their Interactions.* (2015) 87–92. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800969-7.00010-4>.
- [397] F. Traganos, Mechanism of Antitumor Drug Action Assessed by Cytometry, *Methods Cell Biol.* 75 (2004) 257–305. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(04\)75011-6](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(04)75011-6).
- [398] P.E. Mikael, J.A. Wallace, S.P. Nukavarapu, Nanotubes for tissue engineering, *Nanomedicine: Technologies and Applications.* (2012) 460–489. <https://doi.org/10.1533/9780857096449.3.460>.
- [399] B. Marquardt, L. Eude, M. Gowtham, G. Cho, H.J. Jeong, M. Châtelet, C.S. Cojocar, B.S. Kim, D. Pribat, Density control of electrodeposited Ni nanoparticles/nanowires inside porous anodic alumina templates by an exponential anodization voltage decrease, *Nanotechnology.* 19 (2008). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/40/405607>.
- [400] H. Habazaki, K. Fushimi, K. Shimizu, P. Skeldon, G.E. Thompson, Fast migration of fluoride ions in growing anodic titanium oxide, *Electrochem Commun.* 9 (2007) 1222–1227. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2006.12.023>.
- [401] B. Ribeiro, R. Offoiach, S. Rossetti, E. Salatin, M. Lekka, L. Fedrizzi, On Growth and Morphology of TiO<sub>2</sub> Nanotubes on CP-Ti by Anodic Oxidation in Ethylene Glycol Electrolyte: Influence of Electrolyte Aging and Anodization Parameters, *Materials.* 15 (2022). <https://doi.org/10.3390/ma15093338>.
- [402] B. Ribeiro, R. Offoiach, S. Rossetti, E. Salatin, M. Lekka, L. Fedrizzi, On Growth and Morphology of TiO<sub>2</sub> Nanotubes on CP-Ti by Anodic Oxidation in Ethylene Glycol Electrolyte: Influence of Electrolyte Aging and Anodization Parameters, *Materials.* 15 (2022). <https://doi.org/10.3390/ma15093338>.
- [403] J. Zhao, X. Wang, R. Chen, L. Li, Fabrication of titanium oxide nanotube arrays by anodic oxidation, *Solid State Commun.* 134 (2005) 705–710. <https://doi.org/10.1016/J.SSC.2005.02.028>.
- [404] W.L. Baun, Formation of porous films on titanium alloys by anodization, *Surface Technology.* 11 (1980) 421–430. [https://doi.org/10.1016/0376-4583\(80\)90104-1](https://doi.org/10.1016/0376-4583(80)90104-1).
- [405] M.V. Diamanti, M. Ormellese, M.P. Pedferri, Alternating current anodizing of titanium in halogen acids combined with Anodic Spark Deposition: Morphological



- and structural variations, *Corros Sci.* 52 (2010) 1824–1829. <https://doi.org/10.1016/J.CORSCI.2010.01.036>.
- [406] V. Zwillig, M. Aucouturier, E. Darque-Ceretti, Anodic oxidation of titanium and TA6V alloy in chromic media. An electrochemical approach, *Electrochim Acta.* 45 (1999) 921–929. [https://doi.org/10.1016/S0013-4686\(99\)00283-2](https://doi.org/10.1016/S0013-4686(99)00283-2).
- [407] M. V. Diamanti, M.P. Pedferri, *The anodic oxidation of titanium and its alloys*, Elsevier, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.11717-2>.
- [408] M. Manjaiah, R.F. Laubscher, Effect of anodizing on surface integrity of Grade 4 titanium for biomedical applications, *Surf Coat Technol.* 310 (2017) 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2016.12.038>.
- [409] A.A. Skandani, M. Al-Haik, Reciprocal effects of the chirality and the surface functionalization on the drug delivery permissibility of carbon nanotubes, *Soft Matter.* 9 (2013) 11645–11649. <https://doi.org/10.1039/c3sm52126e>.
- [410] Y.Q. Liang, Z.D. Cui, S.L. Zhu, X.J. Yang, Characterization of self-organized TiO<sub>2</sub> nanotubes on Ti-4Zr-22Nb-2Sn alloys and the application in drug delivery system, *J Mater Sci Mater Med.* 22 (2011) 461–467. <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4234-6>.
- [411] R. Beranek, H. Hildebrand, P. Schmuki, Self-organized porous titanium oxide prepared in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/HF electrolytes, *Electrochemical and Solid-State Letters.* 6 (2003) 23–25. <https://doi.org/10.1149/1.1545192>.
- [412] M. Michalska-Domańska, W.J. Stępniewski, L.R. Jaroszewicz, Characterization of nanopores arrangement of anodic alumina layers synthesized on low-(AA1050) and high-purity aluminum by two-step anodizing in sulfuric acid with addition of ethylene glycol at low temperature, *Journal of Porous Materials.* 24 (2017) 779–786. <https://doi.org/10.1007/s10934-016-0316-7>.
- [413] J.M. Macak, P. Schmuki, Anodic growth of self-organized anodic TiO<sub>2</sub> nanotubes in viscous electrolytes, *Electrochim Acta.* 52 (2006) 1258–1264. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2006.07.021>.
- [414] N.-S. Cheng, Formula for the Viscosity of a Glycerol–Water Mixture, *Ind Eng Chem Res.* 47 (2008) 3285–3288. <https://doi.org/10.1021/ie071349z>.
- [415] C. Medina, P. Alastuey, A.C. Gómez Marigliano, Aplicabilidad del método de Stokes para medir la viscosidad de mezclas con gradiente de concentración, *Caderno Brasileiro de Ensino de Física.* 34 (2017) 912–927. <https://doi.org/10.5007/2175-7941.2017v34n3p912>.

- [416] W.J. Stępniewski, D. Forbot, M. Norek, M. Michalska-Domańska, A. Król, The impact of viscosity of the electrolyte on the formation of nanoporous anodic aluminum oxide, *Electrochim Acta.* 133 (2014) 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.04.039>.
- [417] L.B. Sukhodub, L.F. Sukhodub, M.O. Kumeda, Y.I. Prylutsky, M. V. Pogorielov, M.P. Evstigneev, V. V. Kostjukov, N.Y. Strutynska, L.L. Vovchenko, S. V. Khrapaty, U. Ritter, Single-walled carbon nanotubes loaded hydroxyapatite–alginate beads with enhanced mechanical properties and sustained drug release ability, *Prog Biomater.* 9 (2020) 1–14. <https://doi.org/10.1007/s40204-020-00127-2>.
- [418] L. Zhao, K. Huo, P.K. Chu, Titania Nanotube Coatings on Dental Implants with Enhanced Osteogenic Activity and Anti-Infection Properties, *Nanobiomaterials in Clinical Dentistry.* (2013) 337–357. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-3127-5.00017-9>.
- [419] S. Lai, W. Zhang, F. Liu, C. Wu, D. Zeng, Y. Sun, Y. Xu, Y. Fang, W. Zhou, TiO<sub>2</sub> nanotubes as animal drug delivery system and *in vitro* controlled release, *J Nanosci Nanotechnol.* 13 (2013). <https://doi.org/10.1166/jnn.2013.7086>.
- [420] W. Feng, Z. Geng, Z. Li, Z. Cui, S. Zhu, Y. Liang, Y. Liu, R. Wang, X. Yang, Controlled release behaviour and antibacterial effects of antibiotic-loaded titania nanotubes, *Materials Science and Engineering C.* 62 (2016) 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.01.046>.
- [421] M. Fathi, B. Akbari, A. Taheriazam, Antibiotics drug release controlling and osteoblast adhesion from Titania nanotubes arrays using silk fibroin coating, *Materials Science and Engineering C.* 103 (2019) 109743. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109743>.
- [422] V. Vega, M.A. Cerdeira, V.M. Prida, D. Alberts, N. Bordel, R. Pereiro, F. Mera, S. García, M. Hernández-Vélez, M. Vázquez, Electrolyte influence on the anodic synthesis of TiO<sub>2</sub> nanotube arrays, *J Non Cryst Solids.* 354 (2008) 5233–5235. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2008.05.073>.
- [423] J.M. Macak, H. Tsuchiya, L. Taveira, A. Ghicov, P. Schmuki, Self-organized nanotubular oxide layers on Ti-6Al-7Nb and Ti-6Al-4V formed by anodization in NH<sub>4</sub>F solutions, *J Biomed Mater Res A.* 75 (2005) 928–933. <https://doi.org/10.1002/JBM.A.30501>.
- [424] W. Wei, S. Berger, C. Hauser, K. Meyer, M. Yang, P. Schmuki, Transition of TiO<sub>2</sub> nanotubes to nanopores for electrolytes with very low water contents, *Electrochem Commun.* 12 (2010) 1184–1186. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2010.06.014>.

- [425] B. Li, X. Gao, H.C. Zhang, C. Yuan, Energy modeling of electrochemical anodization process of titanium dioxide nanotubes, *ACS Sustain Chem Eng.* 2 (2014) 404–410. <https://doi.org/10.1021/sc400304h>.
- [426] D. Yu, S. Zhang, X. Zhu, H. Ma, H. Han, Y. Song, Simulation of anodizing current-time curves and morphology evolution of TiO<sub>2</sub> nanotube arrays, *Journal of Solid State Electrochemistry.* 18 (2014) 2609–2617. <https://doi.org/10.1007/s10008-014-2513-0>.
- [427] M.R. Hamblin, *Carbon Nanotubes: Smart Drug / Gene Delivery Carriers*, (2021) 1681–1706.
- [428] A. Jagusiak, K. Chlopa, G. Zemanek, P. Wolski, T. Panczyk, Controlled release of doxorubicin from the drug delivery formulation composed of single-walled carbon nanotubes and congo red: A molecular dynamics study and dynamic light scattering analysis, *Pharmaceutics.* 12 (2020) 1–21. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070622>.
- [429] S.K. Debnath, R. Srivastava, Drug Delivery With Carbon-Based Nanomaterials as Versatile Nanocarriers: Progress and Prospects, *Frontiers in Nanotechnology.* 3 (2021) 1–22. <https://doi.org/10.3389/fnano.2021.644564>.
- [430] B.O. Murjani, P.S. Kadu, M. Bansod, S.S. Vaidya, M.D. Yadav, Carbon nanotubes in biomedical applications: current status, promises, and challenges, *Carbon Letters.* 32 (2022) 1207–1226. <https://doi.org/10.1007/s42823-022-00364-4>.
- [431] Y.T. Sul, C.B. Johansson, Y. Jeong, T. Albrektsson, The electrochemical oxide growth behaviour on titanium in acid and alkaline electrolytes, *Med Eng Phys.* 23 (2001) 329–346. [https://doi.org/10.1016/S1350-4533\(01\)00050-9](https://doi.org/10.1016/S1350-4533(01)00050-9).
- [432] D. Capek, M.P. Gigandet, M. Masmoudi, M. Wery, O. Banakh, Long-time anodisation of titanium in sulphuric acid, *Surf Coat Technol.* 202 (2008) 1379–1384. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2007.06.027>.
- [433] Y. Sul, Electrochemical growth behavior, surface properties, and enhanced *in vivo* bone response of TiO<sub>2</sub> nanotubes on microstructured surfaces of blasted, screw-shaped titanium implants, (2010).
- [434] M.G. Kim, J.M. Kang, J.E. Lee, K.S. Kim, K.H. Kim, M. Cho, S.G. Lee, Effects of Calcination Temperature on the Phase Composition, Photocatalytic Degradation, and Virucidal Activities of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles, *ACS Omega.* 6 (2021) 10668–10678. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00043>.
- [435] R. Nawaz, C.F. Kait, H.Y. Chia, M.H. Isa, L.W. Huei, Glycerol-mediated facile synthesis of colored titania nanoparticles for visible light photodegradation of

- phenolic compounds, *Nanomaterials*. 9 (2019).  
<https://doi.org/10.3390/nano9111586>.
- [436] H. Shi, R. Magaye, V. Castranova, J. Zhao, Titanium dioxide nanoparticles: A review of current toxicological data, *Part Fibre Toxicol*. 10 (2013).  
<https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-15>.
- [437] T. Cottre, M. Fingerle, M. Kranz, T. Mayer, B. Kaiser, W. Jaegermann, Interaction of Water with Atomic Layer Deposited Titanium Dioxide on p-Si Photocathode: Modeling of Photoelectrochemical Interfaces in Ultrahigh Vacuum with Cryo-Photoelectron Spectroscopy, *Adv Mater Interfaces*. 8 (2021) 2002257.  
<https://doi.org/10.1002/admi.202002257>.
- [438] D.P. Sahu, S.N. Jammalamadaka, Detection of bovine serum albumin using hybrid TiO<sub>2</sub> + graphene oxide based Bio – resistive random access memory device, *Sci Rep*. 9 (2019) 16141. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52522-w>.
- [439] P. Klomjit, R. Buchheit, Localized Corrosion Inhibition of 7075-T6 by Calcium Sulfate, *Corrosion*. 72 (2015) 1892. <https://doi.org/10.5006/1892>.
- [440] A. Barrera, F. Tzompantzi, J. Campa-Molina, J.E. Casillas, R. Pérez-Hernández, S. Ulloa-Godinez, C. Velásquez, J. Arenas-Alatorre, Photocatalytic activity of Ag/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>–Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> photocatalysts prepared by the sol–gel method in the degradation of 4-chlorophenol, *RSC Adv*. 8 (2018) 3108–3119.  
<https://doi.org/10.1039/C7RA12665D>.
- [441] S. Zhang, B. Wu, Y. Ren, Z. Wu, Q. Li, K. Li, M. Zhang, J. Yu, J. Liu, W. Ni, The Preparation Process and Hydration Mechanism of Steel Slag-Based Ultra-Fine Tailing Cementitious Filler, *Gels*. 9 (2023) 82.  
<https://doi.org/10.3390/gels9020082>.
- [442] M. Popinciuc, H.T. Jonkman, B.J. Van Wees, Energy level alignment at Co/AlOx/pentacene interfaces, *J Appl Phys*. 101 (2007) 4–9.  
<https://doi.org/10.1063/1.2721885>.
- [443] A. Kumar, P.C. Srivastava, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) study of Heusler alloy (Co<sub>2</sub>FeAl) interfaced with semiconductor (n-Si) structure, *Materials Science- Poland*. 37 (2019) 116–121. <https://doi.org/10.2478/msp-2019-0001>.
- [444] L. Rosenberger, R. Baird, E. McCullen, G. Auner, G. Shreve, XPS analysis of aluminum nitride films deposited by plasma source molecular beam epitaxy, *Surface and Interface Analysis*. 40 (2008) 1254–1261.  
<https://doi.org/10.1002/sia.2874>.

- [445] A. Obrosov, R. Gulyaev, A. Zak, M. Ratzke, M. Naveed, W. Dudzinski, S. Weiß, Chemical and morphological characterization of magnetron sputtered at different bias voltages Cr-Al-C coatings, *Materials*. 10 (2017) 1–16. <https://doi.org/10.3390/ma10020156>.
- [446] M. Wagner, J. Planer, B.S.J. Heller, J. Langer, A. Limbeck, L.A. Boatner, H.P. Steinrück, J. Redinger, F. Maier, F. Mittendorfer, M. Schmid, U. Diebold, Oxygen-rich tetrahedral surface phase on high-temperature rutile  $\nu$  O<sub>2</sub>(110) T single crystals, *Phys Rev Mater*. 5 (2021) 1–15. <https://doi.org/10.1103/PhysRevMaterials.5.125001>.
- [447] A. Osonkie, V. Lee, P. Chukwunenye, T. Cundari, J. Kelber, Plasma modification of vanadium oxynitride surfaces: Characterization by in situ XPS experiments and DFT calculations, *Journal of Chemical Physics*. 153 (2020). <https://doi.org/10.1063/5.0027996>.
- [448] G. Silversmit, D. Depla, H. Poelman, G.B. Marin, R. De Gryse, Determination of the V2p XPS binding energies for different vanadium oxidation states (V<sup>5+</sup> to V<sup>0+</sup>), *J Electron Spectros Relat Phenomena*. 135 (2004) 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.elspec.2004.03.004>.
- [449] Y. Li, J. Liu, D. Wang, G. Pan, Y. Dang, Effects of the annealing process on the structure and valence state of vanadium oxide thin films, *Mater Res Bull*. 100 (2018) 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2017.12.028>.
- [450] R. Muruganatham, V. Buiser, M.Z. De Juan, Electronic Supplementary Information (ESI) Electrochemical Exploration of Calcination Temperature Effects of Mesoporous Zinc Vanadate Anode Material for Na-Ion Battery, (2019) 1–14.
- [451] L. Hou, Q. Liang, F. Wang, Mechanisms that control the adsorption-desorption behavior of phosphate on magnetite nanoparticles: The role of particle size and surface chemistry characteristics, *RSC Adv*. 10 (2020) 2378–2388. <https://doi.org/10.1039/c9ra08517c>.
- [452] A. Posada-Borbón, N. Bosio, H. Grönbeck, On the signatures of oxygen vacancies in O1s core level shifts, *Surf Sci*. 705 (2021) 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.susc.2020.121761>.
- [453] J.C. Dupin, D. Gonbeau, P. Vinatier, A. Levasseur, Systematic XPS studies of metal oxides, hydroxides and peroxides, *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2 (2000) 1319–1324. <https://doi.org/10.1039/a908800h>.
- [454] D.E. Newbury, Mistakes encountered during automatic peak identification in low beam energy X-ray microanalysis, *Scanning*. 29 (2007) 137–151. <https://doi.org/10.1002/sca.20009>.

- [455] G. Greczynski, L. Hultman, X-ray photoelectron spectroscopy: Towards reliable binding energy referencing, *Prog Mater Sci.* 107 (2020) 100591. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2019.100591>.
- [456] B.V. Crist, XPS in industry—Problems with binding energies in journals and binding energy databases, *J Electron Spectros Relat Phenomena.* 231 (2019) 75–87. <https://doi.org/10.1016/J.ELSPEC.2018.02.005>.
- [457] G.F. Vander Voort, Microstructure of titanium and its alloys, *Industrial Heating.* 73 (2006) 77–84.
- [458] A. Deshkovskaya, A. Shchukarev, Xps Study of Fluorine Implantation Unduced Centres in Fused Silica, *Interaction of Radiation with Solids.* (2013) 24–27.
- [459] J.C. Moreno-López, G. Ruano, J. Ferrón, P. Ayala, M.C.G. Passeggi, Thermally Annealed Sub-Monolayers of AlF<sub>3</sub> on Cu(100): An STM and XPS Study, *Physica Status Solidi (b).* 255 (2018) 1800389. <https://doi.org/10.1002/pssb.201800389>.
- [460] R. Tatara, P. Karayaylali, Y. Yu, Y. Zhang, L. Giordano, F. Maglia, R. Jung, J.P. Schmidt, I. Lund, Y. Shao-Horn, The Effect of Electrode-Electrolyte Interface on the Electrochemical Impedance Spectra for Positive Electrode in Li-Ion Battery, *J Electrochem Soc.* 166 (2019) A5090–A5098. <https://doi.org/10.1149/2.0121903jes>.
- [461] S.K. Ghosh, V.K. Perla, K. Mallick, Enhancement of dielectric and electric-field-induced polarization of bismuth fluoride nanoparticles within the layered structure of carbon nitride, *Sci Rep.* 10 (2020) 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71953-4>.
- [462] A. Ziatdinov, Yu.M. Nikolenko, XPS Studies of Graphite Compounds with Fluorine and Pentafluorides, *Chemistry Preprint Archive.* 2002 (2002) 145–149.
- [463] G. Greczynski, L. Hultman, C1s Peak of Adventitious Carbon Aligns to the Vacuum Level: Dire Consequences for Material's Bonding Assignment by Photoelectron Spectroscopy, *ChemPhysChem.* 18 (2017) 1507–1512. <https://doi.org/10.1002/cphc.201700126>.
- [464] P. Swift, Adventitious carbon—the panacea for energy referencing, *Surface and Interface Analysis.* 4 (1982) 47–51. <https://doi.org/10.1002/sia.740040204>.
- [465] G. Johansson, J. Hedman, A. Berndtsson, M. Klasson, R. Nilsson, Calibration of electron spectra, *J Electron Spectros Relat Phenomena.* 2 (1973) 295–317. [https://doi.org/10.1016/0368-2048\(73\)80022-2](https://doi.org/10.1016/0368-2048(73)80022-2).

- [466] Z. Matouk, M. Islam, M. Gutiérrez, J.J. Pireaux, A. Achour, X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) Analysis of Ultrafine Au Nanoparticles Supported over Reactively Sputtered TiO<sub>2</sub> Films, *Nanomaterials*. 12 (2022). <https://doi.org/10.3390/nano12203692>.
- [467] E. Rach, J. Heitbaum, XPS analysis of the oxide layer formed on Pt by anodization in sulfuric acid, *Electrochim Acta*. 31 (1986) 477–479. [https://doi.org/10.1016/0013-4686\(86\)80112-8](https://doi.org/10.1016/0013-4686(86)80112-8).
- [468] L. Sun, J. Xu, Z. Sun, F. Zheng, C. Liu, C. Wang, X. Hu, L. Xia, Z. Liu, R. Xia, Decreased *Porphyromonas gingivalis* adhesion and improved biocompatibility on tetracycline-loaded TiO<sub>2</sub> nanotubes: an *in vitro* study, *Int J Nanomedicine*. Volume 13 (2018) 6769–6777. <https://doi.org/10.2147/IJN.S175865>.
- [469] A.M. Brudzisz, D. Giziński, W.J. Stępniewski, Incorporation of ions into nanostructured anodic oxides—mechanism and functionalities, *Molecules*. 26 (2021). <https://doi.org/10.3390/molecules26216378>.
- [470] H. Gerischer, M. Luebke, Electrolytic Growth and Dissolution of Oxide Layers on Silicon in Aqueous Solutions of Fluorides., *Berichte Der Bunsengesellschaft/Physical Chemistry Chemical Physics*. 92 (1988) 573–577. <https://doi.org/10.1002/bbpc.198800138>.
- [471] R. Elaish, M. Curioni, K. Gowers, A. Kasuga, H. Habazaki, T. Hashimoto, P. Skeldon, Effects of fluoride ions in the growth of barrier-type films on aluminium, *Electrochim Acta*. 245 (2017) 854–862. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.06.034>.
- [472] M. Hashemzadeh, K. Raeissi, F. Ashrafizadeh, A. Hakimizad, M. Santamaria, Incorporation mechanism of colloidal TiO<sub>2</sub> nanoparticles and their effect on properties of coatings grown on 7075 Al alloy from silicate-based solution using plasma electrolytic oxidation, *Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition)*. 31 (2021) 3659–3676. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(21\)65755-2](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(21)65755-2).
- [473] R. Ethiraj, E. Thiruvengadam, V.S. Sampath, A. Vahid, J. Raj, Development and Validation of Stability Indicating Spectroscopic Method for Content Analysis of Ceftriaxone Sodium in Pharmaceuticals, *Int Sch Res Notices*. 2014 (2014) 1–5. <https://doi.org/10.1155/2014/278173>.
- [474] P.V. De Aléssio, A.C. Kogawa, H.R.N. Salgado, Quality of Ceftriaxone Sodium in Lyophilized Powder for Injection Evaluated by Clean, Fast, and Efficient Spectrophotometric Method, *J Anal Methods Chem*. 2017 (2017). <https://doi.org/10.1155/2017/7530242>.



- [475] Q. Wang, J.Y. Huang, H.Q. Li, Z. Chen, A.Z.J. Zhao, Y. Wang, K.Q. Zhang, H.T. Sun, S.S. Al-Deyab, Y.K. Lai, Tio<sub>2</sub> nanotube platforms for smart drug delivery: A review, *Int J Nanomedicine*. 11 (2016) 4819–4834. <https://doi.org/10.2147/IJN.S108847>.
- [476] M. Jarosz, J. Kapusta-Kołodziej, A. Pawlik, K. Syrek, G.D. Sulka, Drug delivery systems based on titania nanostructures, *Nanostructures for Drug Delivery*. (2017) 299–326. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46143-6.00009-9>.
- [477] W. Yang, X. Xi, X. Shen, P. Liu, Y. Hu, K. Cai, Titania nanotubes dimensions-dependent protein adsorption and its effect on the growth of osteoblasts, *J Biomed Mater Res A*. 102 (2014) 3598–3608. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35021>.
- [478] W. Yang, C. Deng, P. Liu, Y. Hu, Z. Luo, K. Cai, Sustained release of aspirin and Vitamin C from titanium nanotubes: An experimental and stimulation study, *Materials Science and Engineering C*. 64 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.055>.
- [479] A.B. Susanto, W. Ari Setyati, R. Pramesti, D. Pringgenies, M. Zainuddin, Multidrug-resistant antibacterial activity and active compound analysis several types of seaweed from Karimunjawa, Jepara, *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*. 530 (2020). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/530/1/012029>.
- [480] E. De Salud, *Manipulación de especialidades farmacéuticas*, (2007) 44–48.
- [481] Y. Maksimova, Y. Bykova, A. Maksimov, Functionalization of Multi-Walled Carbon Nanotubes Changes Their Antibiofilm and Probiofilm Effects on Environmental Bacteria, *Microorganisms*. 10 (2022). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081627>.
- [482] M.M. Gui, Y.X. Yap, S.P. Chai, A.R. Mohamed, Multi-walled carbon nanotubes modified with (3-aminopropyl) triethoxysilane for effective carbon dioxide adsorption, *International Journal of Greenhouse Gas Control*. 14 (2013) 65–73. <https://doi.org/10.1016/J.IJGGC.2013.01.004>.
- [483] D. Zhang, B. Pan, M. Wu, B. Wang, H. Zhang, H. Peng, D. Wu, P. Ning, Adsorption of sulfamethoxazole on functionalized carbon nanotubes as affected by cations and anions, *Environmental Pollution*. 159 (2011) 2616–2621. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2011.05.036>.
- [484] P.P. Nampi, V.S. Mohan, A.K. Sinha, H. Varma, High surface area sol-gel nano silica as a novel drug carrier substrate for sustained drug release, *Mater Res Bull*. 47 (2012) 1379–1384. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2012.03.003>.



- [485] L. Huang, J. Chen, X. Li, H. Liu, J. Li, T. Ren, Y. Yang, S. Zhong, Polymethacrylic acid encapsulated TiO<sub>2</sub> nanotubes for sustained drug release and enhanced antibacterial activities, *New Journal of Chemistry*. 43 (2019). <https://doi.org/10.1039/c8nj04568b>.
- [486] M.S. Aw, K. Gulati, D. Losic, M.S. Aw, K. Gulati, D. Losic, Controlling Drug Release from Titania Nanotube Arrays Using Polymer Nanocarriers and Biopolymer Coating, *J Biomater Nanobiotechnol*. 02 (2011) 477–484. <https://doi.org/10.4236/jbnb.2011.225058>.
- [487] S. Bose, A.A. Vu, K. Emsadi, A. Bandyopadhyay, Effects of polycaprolactone on alendronate drug release from Mg-doped hydroxyapatite coating on titanium, *Materials Science and Engineering C*. 88 (2018) 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.02.019>.
- [488] X. Niu, L. Sun, X. Zhang, Y. Sun, J. Wang, Fabrication and antibacterial properties of cefuroxime-loaded TiO<sub>2</sub> nanotubes, *Appl Microbiol Biotechnol*. 104 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10446-w>.
- [489] R. Meng, H. Hou, X. Liu, J. Duan, S. Liu, Binder-free combination of graphene nanosheets with TiO<sub>2</sub> nanotube arrays for lithium ion battery anode, *Journal of Porous Materials*. 23 (2016) 569–575. <https://doi.org/10.1007/s10934-015-0111-x>.
- [490] V.S. Simi, N. Rajendran, Influence of tunable diameter on the electrochemical behavior and antibacterial activity of titania nanotube arrays for biomedical applications, *Mater Charact*. 129 (2017) 67–79. <https://doi.org/10.1016/j.matchar.2017.04.019>.
- [491] T. Mahalingam, C. Selvakumar, E. Ranjith Kumar, T. Venkatachalam, Structural, optical, morphological and thermal properties of TiO<sub>2</sub>–Al and TiO<sub>2</sub>–Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> composite powders by ball milling, *Phys Lett A*. 381 (2017) 1815–1819. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSLETA.2017.02.053>.
- [492] T. Bezrodna, G. Puchkovska, V. Shymanovska, J. Baran, H. Ratajczak, IR-analysis of H-bonded H<sub>2</sub>O on the pure TiO<sub>2</sub> surface, *J Mol Struct*. 700 (2004) 175–181. <https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2003.12.057>.
- [493] M. Rashid Al-Mamun, K.T. Hossain, S. Mondal, M. Afroza Khatun, M. Shahinoor Islam, D.M. Zaved Hossain Khan, Synthesis, characterization, and photocatalytic performance of methyl orange in aqueous TiO<sub>2</sub> suspension under UV and solar light irradiation, *S Afr J Chem Eng*. 40 (2022) 113–125. <https://doi.org/10.1016/J.SAJCE.2022.02.002>.

- [494] P. Svora, P. Ecorchard, E. Pližingrová, B. Komárková, S. Svorová Pawełkowitz, N. Murafa, M. Maříková, D. Smržová, B. Wagner, A. MacHálková, P. Bezdička, Influence of inorganic bases on the structure of titanium dioxide-based microsheets, *ACS Omega*. 5 (2020) 23703–23717. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02570>.
- [495] M. Selvamurugan, G. Hirankumar, S. Karuppuchamy, Synthesis and characterization of nanostructured lithium titanate by simple peroxo route, *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*. 27 (2016) 9699–9703. <https://doi.org/10.1007/s10854-016-5031-2>.
- [496] D. Pradhan, D. Jain, A. Gulati, S.J. Kolhe, R. Baad, B.S. Rao, Effect of the presence of dental plaque on oral sugar clearance and salivary pH: An *in vivo* study, *Journal of Contemporary Dental Practice*. 13 (2012) 753–755. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1223>.
- [497] B. Komárková, P. Ecorchard, M. Motlochová, V. Slovák, X. Vislocká, D. Smržová, M. Kormunda, P. Bezdička, K. Lušpai, M. Šimunková, D. Dvoranová, M. Šrámová Slušná, L. Belháčová, J. Šubrť, Effect of amines on the peroxo-titanates and photoactivity of annealed TiO<sub>2</sub>, *Arabian Journal of Chemistry*. 15 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.arabic.2022.103808>.
- [498] J.L. Guimarães, A.C.T. Cursino, C.K. Saul, M.R. Sierrakowski, L.P. Ramos, K.G. Satyanarayana, Evaluation of castor oil cake starch and recovered glycerol and development of “green” composites based on those with plant fibers, *Materials*. 9 (2016). <https://doi.org/10.3390/ma9020076>.
- [499] M. Danish, M.W. Mumtaz, M. Fakhar, U. Rashid, Response surface methodology based optimized purification of the residual glycerol from biodiesel production process, *Chiang Mai Journal of Science*. 44 (2017) 1570–1582.
- [500] W. Terakosolphan, A. Altharawi, A. Poonprasartporn, R.D. Harvey, B. Forbes, K.L.A. Chan, *In vitro* Fourier transform infrared spectroscopic study of the effect of glycerol on the uptake of beclomethasone dipropionate in living respiratory cells, *Int J Pharm*. 609 (2021) 121118. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121118>.
- [501] N. Khoshnood, A. Zamanian, A. Massoudi, Mussel-inspired surface modification of titania nanotubes as a novel drug delivery system, *Materials Science and Engineering C*. 77 (2017) 748–754. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.293>.
- [502] P. Manimekalai, R. Dhanalakshmi, R. Manavalan, Preparation and characterization of ceftriaxone sodium encapsulated chitosan nanoparticles, *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 9 (2017) 10–15. <https://doi.org/10.22159/ijap.2017v9i6.16317>.

- [503] F. Alshammari, B. Alshammari, A. Moin, A. Alamri, T. Al Hagbani, A. Alobaida, A. Baker, S. Khan, S.M.D. Rizvi, Ceftriaxone mediated synthesized gold nanoparticles: A nano-therapeutic tool to target bacterial resistance, *Pharmaceutics*. 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111896>.
- [504] M. Kawish, A. Elhissi, T. Jabri, K.M. Iqbal, H. Zahid, M.R. Shah, Enhancement in oral absorption of ceftriaxone by highly functionalized magnetic iron oxide nanoparticles, *Pharmaceutics*. 12 (2020) 1–17. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12060492>.
- [505] Techniques for Oral Microbiology, *Atlas of Oral Microbiology*. (2015) 15–40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802234-4.00002-1>.
- [506] K.M. Bundayna, J. Al-Salman, Infections of the urogenital tract, in: *Problem-Based Learning Approach in Microbiology*, Elsevier, 2023: pp. 327–392. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95092-3.00004-4>.
- [507] K.M. Kummer, E.N. Taylor, N.G. Durmas, K.M. Tarquinio, B. Ercan, T.J. Webster, Effects of different sterilization techniques and varying anodized TiO<sub>2</sub> nanotube dimensions on bacteria growth, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 101 B (2013) 677–688. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32870>.
- [508] C.-C. Chen, S.-J. Hsieh, Evaluation of Fluorine Ion Concentration in TiO<sub>2</sub> NT Anodization Process, *J Electrochem Soc*. 157 (2010) K125. <https://doi.org/10.1149/1.3374640>.
- [509] M.C. Sahu, R. Patnaik, R.N. Padhy, *In vitro* combinational efficacy of ceftriaxone and leaf extract of *Combretum albidum* G. Don against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and host-toxicity testing with lymphocytes from human cord blood, *J Acute Med*. 4 (2014) 26–37. <https://doi.org/10.1016/j.jacme.2014.01.004>.
- [510] G. Satta, G. Cornaglia, G. Foddìs, R. Pompei, Evaluation of ceftriaxone and other antibiotics against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Streptococcus pneumoniae* under *in vitro* conditions simulating those of serious infections, *Antimicrob Agents Chemother*. 32 (1988) 552–560. <https://doi.org/10.1128/AAC.32.4.552>.
- [511] P.D. Tamma, L. Komarow, L. Ge, J. Garcia-Diaz, E.S. Herc, Y. Doi, C.A. Arias, O. Albin, E. Saade, L.G. Miller, J.T. Jacob, M.J. Satlin, M. Krsak, W.C. Huskins, S. Dhar, S.A. Shelburne, C. Hill, K.R. Baum, M. Bhojani, K.E. Greenwood-Quaintance, S.M. Schmidt-Malan, R. Patel, S.R. Evans, H.F. Chambers, V.G. Fowler, D. Van Duin, Clinical Impact of Ceftriaxone Resistance in *Escherichia coli* Bloodstream Infections: A Multicenter Prospective Cohort Study, *Open Forum Infect Dis*. 9 (2022) 1–9. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofac572>.

- [512] M. Bassler, H. Blaschke, M. Just, F.D. Daschner, Effect of Ceftriaxone on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in Broth, Serum, and in Combination with Human Polymorphonuclear Leukocytes, *Chemotherapy*. 28 (1982) 390–396. <https://doi.org/10.1159/000238127>.
- [513] V. Niranjana, A. Malini, Antimicrobial resistance pattern in *Escherichia coli* causing urinary tract infection among inpatients, *Indian Journal of Medical Research*. 139 (2014) 945–948.
- [514] A. Paull, J.R. Morgan, Emergence of ceftriaxone-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients The development of antibiotic resistance among *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacilli during treatment with extended spectrum cephalosporins, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 18 (1986) 635–639.
- [515] R. Lowe, K. Barber, J. Wagner, A. Bell-Harlan, K. Stover, Ceftriaxone for the treatment of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A case series, *J Pharmacol Pharmacother*. 8 (2017) 140–144. [https://doi.org/10.4103/jpp.JPP\\_5\\_17](https://doi.org/10.4103/jpp.JPP_5_17).
- [516] A.J. Heffernan, F.B. Sime, S.M.S. Lim, S. Adiraju, S.C. Wallis, J. Lipman, G.D. Grant, J.A. Roberts, Pharmacodynamics of ceftriaxone for the treatment of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: is it a viable treatment option?, *Int J Antimicrob Agents*. 59 (2022) 106537. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2022.106537>.
- [517] H.H. Mostafa, A. Cameron, S.M. Taffner, J. Wang, A. Malek, G. Dumyati, D.J. Hardy, N.D. Pecora, Genomic Surveillance of Ceftriaxone-Resistant *Escherichia coli* in Western New York Suggests the Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase blaCTX-M-27 Is Emerging on Distinct Plasmids in ST38, *Front Microbiol*. 11 (2020). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01747>.
- [518] Y.S. Park, J.M. Adams-Haduch, K.A. Shutt, D.M. Yarabinec, L.E. Johnson, A. Hingwe, J.S. Lewis, J.H. Jorgensen, Y. Doi, Clinical and microbiologic characteristics of cephalosporin-resistant *Escherichia coli* at three centers in the United States, *Antimicrob Agents Chemother*. 56 (2012) 1870–1876. <https://doi.org/10.1128/AAC.05650-11>.
- [519] A. Davin-Regli, J.M. Pages, A. Ferrand, Clinical status of efflux resistance mechanisms in gram-negative bacteria, *Antibiotics*. 10 (2021). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091117>.
- [520] L. Huang, C. Wu, H. Gao, C. Xu, M. Dai, L. Huang, H. Hao, X. Wang, G. Cheng, Bacterial Multidrug Efflux Pumps at the Frontline of Antimicrobial Resistance: An Overview, *Antibiotics*. 11 (2022). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040520>.

- [521] K. Poole, *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to the max, *Front Microbiol.* 2 (2011) 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00065>.
- [522] S. Shiralizadeh, F. Keramat, S.H. Hashemi, M.M. Majzoobi, M. Azimzadeh, M.S. Alikhani, P. Karami, Z. Rahimi, M.Y. Alikhani, Investigation of antimicrobial resistance patterns and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates among Coronavirus disease-19 patients, *BMC Microbiol.* 23 (2023) 84. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02825-w>.
- [523] C.K. Ezeh, C.N. Eze, M.E.U. Dibua, S.C. Emencheta, A meta-analysis on the prevalence of resistance of *Staphylococcus aureus* to different antibiotics in Nigeria, *Antimicrob Resist Infect Control.* 12 (2023) 40. <https://doi.org/10.1186/s13756-023-01243-x>.
- [524] Z.A. Yetmar, R.B. Khodadadi, J.R. Go, S. Chesdachai, O.M. Abu Saleh, Post-treatment outcomes of ceftriaxone versus antistaphylococcal penicillins or cefazolin for definitive therapy of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia, *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 42 (2023) 423–430. <https://doi.org/10.1007/S10096-023-04575-Z>.
- [525] K.Y.L. Chua, A.J. Stewardson, Individual and community predictors of urinary ceftriaxone-resistant *Escherichia coli* isolates, Victoria, Australia, *Antimicrob Resist Infect Control.* 8 (2019) 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0492-8>.
- [526] Z.A. Yetmar, S. Razi, T. Nayfeh, D.J. Gerberi, M. Mahmood, O.M. Abu Saleh, Ceftriaxone versus antistaphylococcal antibiotics for definitive treatment of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review and meta-analysis, *Int J Antimicrob Agents.* 59 (2022) 106486. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2021.106486>.
- [527] D. Xu, W. Yang, Y. Hu, Z. Luo, J. Li, Y. Hou, Y. Liu, K. Cai, Surface functionalization of titanium substrates with cecropin B to improve their cytocompatibility and reduce inflammation responses, *Colloids Surf B Biointerfaces.* 110 (2013) 225–235. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.04.050>.
- [528] Y. Hu, K. Cai, Z. Luo, K.D. Jandt, Layer-by-layer assembly of  $\beta$ -estradiol loaded mesoporous silica nanoparticles on titanium substrates and its implication for bone homeostasis, *Advanced Materials.* 22 (2010) 4146–4150. <https://doi.org/10.1002/adma.201000854>.
- [529] H.N.S. Almassri, Y. Ma, Z. Dan, Z. Ting, Y. Cheng, X. Wu, Implant stability and survival rates of a hydrophilic versus a conventional sandblasted, acid-etched implant surface: Systematic review and meta-analysis, *Journal of the American Dental Association.* 151 (2020) 444–453. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2020.03.002>.

- [530] Y. Zhang, O. Andrukhov, S. Berner, M. Matejka, M. Wieland, X. Rausch-Fan, A. Schedle, Osteogenic properties of hydrophilic and hydrophobic titanium surfaces evaluated with osteoblast-like cells (MG63) in coculture with human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), *Dental Materials*. 26 (2010) 1043–1051. <https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2010.07.003>.
- [531] S. Khan, S. Chen, Y. Ma, M. ul Haq, Y. Li, M. Nisar, R. Khan, Y. Liu, J. Wang, G. Han, Structural and hydrophilic properties of TiN films prepared by ultrasonic atomization assisted spray method under low temperature, *Surf Coat Technol.* 393 (2020) 125824. <https://doi.org/10.1016/J.SURFCOAT.2020.125824>.
- [532] Y. Jiang, H. Liu, K. Shi, C. Tang, J. Song, Effect of annealing temperature on wettability of TiO<sub>2</sub>/PDA thin films, *Surf Coat Technol.* 411 (2021) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2021.126994>.
- [533] K. Cai, M. Lai, W. Yang, R. Hu, R. Xin, Q. Liu, K.L.P. Sung, Surface engineering of titanium with potassium hydroxide and its effects on the growth behavior of mesenchymal stem cells, *Acta Biomater.* 6 (2010) 2314–2321. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2009.11.034>.
- [534] P. Whangdee, W. Saenrang, D. Pongkao Kashima, Effect of surface fluorination on the hydrophilicity of the anodised films for dental implant applications, *Materials Research Innovations*. 24 (2020) 321–325. <https://doi.org/10.1080/14328917.2019.1677077>.
- [535] J. Hassan, G. Diamantopoulos, D. Homouz, G. Papavassiliou, Water inside carbon nanotubes: Structure and dynamics, *Nanotechnol Rev.* 5 (2016) 341–354. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2015-0048>.
- [536] A. Chatzichristos, J. Hassan, Current Understanding of Water Properties inside Carbon Nanotubes, *Nanomaterials*. 12 (2022). <https://doi.org/10.3390/nano12010174>.
- [537] H. Yaghoubi, M. Foroutan, Molecular investigation of the wettability of rough surfaces using molecular dynamics simulation, *Physical Chemistry Chemical Physics*. 20 (2018) 22308–22319. <https://doi.org/10.1039/c8cp03762k>.
- [538] Cephalosporins, *Meyler's Side Effects of Drugs*. (2016) 197–215. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53717-1.00465-0>.
- [539] C.L.M. Appelman, P.C. Bossen, J.H.M. Dunk, E.H. Van de Lisdonk, R.A. De Melker, H.C.P.M. Van Weert, Otitis Media, *Acute, Huisarts Wet.* 33 (2007) 146–150. <https://doi.org/10.1016/B978-032304026-6.50040-5>.



- [540] Ceftriaxone, Meyler's Side Effects of Drugs. (2016) 180–183. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53717-1.01673-5>.
- [541] S.T. Hou, Neuronal Guidance, Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition. (2013) 52–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01034-2>.
- [542] G. Gallo, Mechanisms Underlying the Initiation and Dynamics of Neuronal Filopodia: From Neurite Formation to Synaptogenesis, *Int Rev Cell Mol Biol.* 301 (2013) 95–156. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407704-1.00003-8>.
- [543] J. Fauser, M. Brennan, D. Tsygankov, A. V. Karginov, Methods for assessment of membrane protrusion dynamics, *Curr Top Membr.* 88 (2021) 205–234. <https://doi.org/10.1016/BS.CTM.2021.09.005>.
- [544] T.M. Svitkina, Filopodia and Lamellipodia, *Encyclopedia of Cell Biology.* 2 (2016) 683–693. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.20066-7>.
- [545] E. Beltrán-Partida, B. Valdez-Salas, M. Curiel-Álvarez, S. Castillo-Urbe, A. Escamilla, N. Nedev, Enhanced antifungal activity by disinfected titanium dioxide nanotubes via reduced nano-adhesion bonds, *Materials Science and Engineering C.* 76 (2017) 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.153>.
- [546] Y. Liu, Z. Tong, C. Wang, R. Xia, H. Li, H. Yu, J. Jing, W. Cheng, TiO<sub>2</sub> nanotubes regulate histone acetylation through F-actin to induce the osteogenic differentiation of BMSCs, *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 49 (2021) 398–406. <https://doi.org/10.1080/21691401.2021.1910282>.
- [547] Y. Li, S. Wang, Y. Dong, P. Mu, Y. Yang, X. Liu, C. Lin, Q. Huang, Effect of size and crystalline phase of TiO<sub>2</sub> nanotubes on cell behaviors: A high throughput study using gradient TiO<sub>2</sub> nanotubes, *Bioact Mater.* 5 (2020) 1062–1070. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.07.005>.
- [548] Y. Bai, Y. Deng, Y. Zheng, Y. Li, R. Zhang, Y. Lv, Q. Zhao, S. Wei, Characterization, corrosion behavior, cellular response and *in vivo* bone tissue compatibility of titanium-niobium alloy with low Young's modulus, *Materials Science and Engineering C.* 59 (2016) 565–576. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.10.062>.
- [549] M. Li, M.J. Mondrinos, X. Chen, M.R. Gandhi, F.K. Ko, P.I. Lelkes, Elastin Blends for Tissue Engineering Scaffolds, *J Biomed Mater Res A.* 79 (2006) 963–73. <https://doi.org/10.1002/jbm.a>.
- [550] Y. Li, Y. Song, A. Ma, C. Li, Surface immobilization of TiO<sub>2</sub> nanotubes with bone morphogenetic protein-2 synergistically enhances initial preosteoblast adhesion

- and osseointegration, *Biomed Res Int.* 2019 (2019).  
<https://doi.org/10.1155/2019/5697250>.
- [551] Y.Y. Khrunyk, S. V Belikov, M. V Tsurkan, I. V Vyalykh, Surface-Dependent Osteoblasts Response to TiO<sub>2</sub> Nanotubes of Different Crystallinity, 4 (n.d.) 1–17.
- [552] J.D. Afroze, M.J. Abden, M.A. Islam, An efficient method to prepare magnetic hydroxyapatite–functionalized multi-walled carbon nanotubes nanocomposite for bone defects, *Materials Science and Engineering C.* 86 (2018) 95–102.  
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.02.002>.
- [553] M.P. Nikolova, M.D. Apostolova, Advances in Multifunctional Bioactive Coatings for Metallic Bone Implants, *Materials.* 16 (2023).  
<https://doi.org/10.3390/ma16010183>.
- [554] B. Garrido, S. Dosta, I.G. Cano, Bioactive glass coatings obtained by thermal spray: Current status and future challenges, *Boletín de La Sociedad Española de Cerámica y Vidrio.* 61 (2022) 516–530.  
<https://doi.org/10.1016/J.BSECV.2021.04.001>.
- [555] A.K. Singh, Experimental Methodologies for the Characterization of Nanoparticles, Engineered Nanoparticles. (2016) 125–170. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801406-6.00004-2>.
- [556] O.C. Wells, Scanning Electron Microscopy, *Encyclopedia of Materials: Science and Technology.* (2001) 8265–8269. <https://doi.org/10.1016/B0-08-043152-6/01479-0>.
- [557] D.R. Pendse, A.K. Chin, Cathodoluminescence and Transmission Cathodoluminescence, *Encyclopedia of Materials: Science and Technology.* (2001) 1–7. <https://doi.org/10.1016/B0-08-043152-6/00190-X>.
- [558] Y. Wang, B. Wu, S. Ai, D. Wan, Electroplating of HAp-brushite coating on metallic bioimplants with advanced hemocompatibility and osteocompatibility properties, *J Appl Biomater Funct Mater.* 20 (2022).  
<https://doi.org/10.1177/22808000221103970>.
- [559] I. Das, G. De, L. Hupa, P.K. Vallittu, Porous SiO<sub>2</sub> nanofiber grafted novel bioactive glass–ceramic coating: A structural scaffold for uniform apatite precipitation and oriented cell proliferation on inert implant, *Materials Science and Engineering: C.* 62 (2016) 206–214. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2016.01.053>.
- [560] K.A. Kravanja, M. Finšgar, A review of techniques for the application of bioactive coatings on metal-based implants to achieve controlled release of active



- ingredients, Mater Des. 217 (2022) 110653. <https://doi.org/10.1016/J.MATDES.2022.110653>.
- [561] Z. Lu, D. Chang, J. Ma, G. Huang, L. Cai, L. Zhang, Behavior of metal ions in bioelectrochemical systems: A review, J Power Sources. 275 (2015) 243–260. <https://doi.org/10.1016/J.JPOWSOUR.2014.10.168>.
- [562] M.A. Schneeweiss, H. Hagenström, M.J. Esplandiu, D.M. Kolb, Electrolytic metal deposition onto chemically modified electrodes, Applied Physics A. 69 (1999) 537–551. <https://doi.org/10.1007/s003390051465>.
- [563] W. Li, Review—An Unpredictable Hazard in Lithium-ion Batteries from Transition Metal Ions: Dissolution from Cathodes, Deposition on Anodes and Elimination Strategies, J Electrochem Soc. 167 (2020) 090514. <https://doi.org/10.1149/1945-7111/ab847f>.
- [564] B. Ramasubramanian, M. V. Reddy, K. Zaghib, M. Armand, S. Ramakrishna, Growth mechanism of micro/nano metal dendrites and cumulative strategies for countering its impacts in metal ion batteries: A review, Nanomaterials. 11 (2021). <https://doi.org/10.3390/nano11102476>.
- [565] M. Romanello, P. D'Andrea, Dual mechanism of intercellular communication in HOBIT osteoblastic cells: A role for gap-junctional hemichannels, Journal of Bone and Mineral Research. 16 (2001) 1465–1476. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.8.1465>.
- [566] S. Li, Y. Cui, H. Liu, Y. Tian, G. Wang, Y. Fan, J. Wang, D. Wu, Y. Wang, Application of bioactive metal ions in the treatment of bone defects, J Mater Chem B. 10 (2022) 9369–9388. <https://doi.org/10.1039/D2TB01684B>.
- [567] P.S. Lee, C. Heinemann, K. Zheng, R. Appali, F. Alt, J. Krieghoff, A. Bernhardt, A.R. Boccaccini, U. van Rienen, V. Hintze, The interplay of collagen/bioactive glass nanoparticle coatings and electrical stimulation regimes distinctly enhanced osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, Acta Biomater. 149 (2022) 373–386. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.06.045>.
- [568] J. Schrooten, J.A. Helsen, Adhesion of bioactive glass coating to Ti6Al4V oral implant, Biomaterials. 21 (2000) 1461–1469. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00027-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00027-2).
- [569] B. Garrido, I.G. Cano, S. Dosta, Adhesion improvement and *in vitro* characterization of 45S5 bioactive glass coatings obtained by atmospheric plasma spraying, Surf Coat Technol. 405 (2021) 126560. <https://doi.org/10.1016/J.SURFCOAT.2020.126560>.

- [570] J. Schrooten, H. Van Oosterwyck, J. Vander Sloten, J.A. Helsen, Adhesion of new bioactive glass coating, *J Biomed Mater Res.* 44 (1999) 243–252. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19990305\)44:3<243::AID-JBM2>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19990305)44:3<243::AID-JBM2>3.0.CO;2-O).
- [571] K.A. Kravanja, M. Finšgar, Analytical techniques for the characterization of bioactive coatings for orthopaedic implants, *Biomedicines.* 9 (2021). <https://doi.org/10.3390/biomedicines9121936>.
- [572] L.M. Kroschwald, F. Allerdt, A. Bernhardt, S. Rother, K. Zheng, I. Maqsood, N. Halfter, C. Heinemann, S. Möller, M. Schnabelrauch, M.C. Hacker, S. Rammelt, A.R. Boccaccini, V. Hintze, Artificial extracellular matrices containing bioactive glass nanoparticles promote osteogenic differentiation in human mesenchymal stem cells, *Int J Mol Sci.* 22 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms222312819>.
- [573] G. Fang, H. Chen, X. Shao, H. Wang, D. Zhan, R. Wang, P. Meng, H. Fang, F. Liu, P. Ling, Z. Wu, J. Diao, Q. Yao, Q. Chen, Single Image Capture of Bioactive Ion Crosstalk within Inter-Organellar Membrane Contacts at Nanometer Resolution, *Small Methods.* 6 (2022) 2200321. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/smt.202200321>.
- [574] R.A. Rossello, D.H. Kohn, Gap junction intercellular communication: A review of a potential platform to modulate craniofacial tissue engineering, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 88B (2009) 509–518. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31127>.
- [575] S. Yao, J. Cui, S. Chen, X. Zhou, J. Li, K. Zhang, Extracellular Matrix Coatings on Cardiovascular Materials—A Review, *Coatings.* 12 (2022). <https://doi.org/10.3390/coatings12081039>.
- [576] D. Bjelić, M. Finšgar, The role of growth factors in bioactive coatings, *Pharmaceutics.* 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13071083>.
- [577] S. Ramakrishna, L. Tian, C. Wang, S. Liao, W.E. Teo, Safety testing of a new medical device, *Medical Devices.* (2015) 137–153. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100289-6.00006-5>.
- [578] Z. Yao, T.H. Lin, J. Pajarinen, T. Sato, S. Goodman, Host Response to Orthopedic Implants (Metals and Plastics), *Host Response to Biomaterials: The Impact of Host Response on Biomaterial Selection.* (2015) 315–373. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800196-7.00012-8>.
- [579] K. Jones, Fibrotic Response to Biomaterials and all Associated Sequence of Fibrosis, *Host Response to Biomaterials: The Impact of Host Response on Biomaterial Selection.* (2015) 189–237. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800196-7.00009-8>.

- [580] F. Qi, C. Qin, Characteristics of animal models for COVID-19, *Animal Model Exp Med.* 5 (2022) 401–409. <https://doi.org/10.1002/ame2.12278>.
- [581] M.S. Park, J. Il Kim, J.-Y. Bae, M.-S. Park, Animal models for the risk assessment of viral pandemic potential, *Lab Anim Res.* 36 (2020) 1–15. <https://doi.org/10.1186/s42826-020-00040-6>.
- [582] F. Lantier, Animal models of emerging diseases: An essential prerequisite for research and development of control measures, *Animal Frontiers.* 4 (2014) 7–12. <https://doi.org/10.2527/af.2014-0002>.
- [583] N.S. Gregory, A.L. Harris, C.R. Robinson, P.M. Dougherty, P.N. Fuchs, K.A. Sluka, An Overview of Animal Models of Pain: Disease Models and Outcome Measures, *J Pain.* 14 (2013) 1255–1269. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2013.06.008>.
- [584] J. Xu, T.J. Brennan, The pathophysiology of acute pain: Animal models, *Curr Opin Anaesthesiol.* 24 (2011) 508–514. <https://doi.org/10.1097/ACO.0b013e32834a50d8>.
- [585] A.S. Jaggi, V. Jain, N. Singh, Animal models of neuropathic pain, *Fundam Clin Pharmacol.* 25 (2011) 1–28. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2009.00801.x>.

# 8. ANEXOS

Chemical Papers  
https://doi.org/10.1007/s11696-020-01495-6

ORIGINAL PAPER



## Synthesis of nanotubular oxide on Ti–24Zr–10Nb–2Sn as a drug-releasing system to prevent the growth of *Staphylococcus aureus*

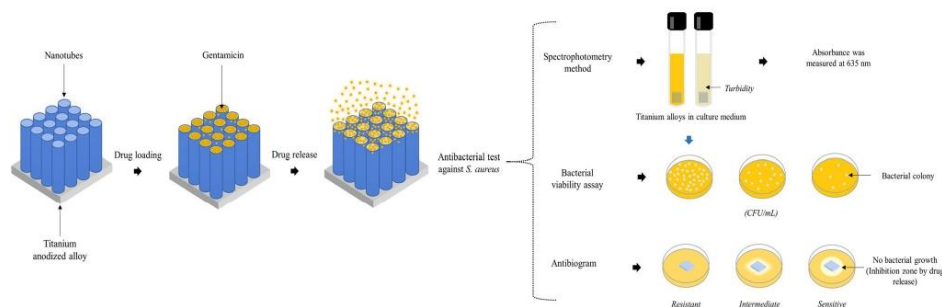
Luis López-Pavón<sup>1</sup> · Daniel Dagnino-Acosta<sup>1</sup> · Enrique López-Cuéllar<sup>1</sup> · Frank Meléndez-Anzures<sup>1</sup> · Diana Zárate-Triviño<sup>2</sup> · María Barrón-González<sup>2</sup> · Iván Moreno-Cortez<sup>1</sup> · Hee Young Kim<sup>3</sup> · Shuichi Miyazaki<sup>3</sup>

Received: 27 August 2020 / Accepted: 26 December 2020  
© Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences 2021

### Abstract

The aim in the present study was to explore the potential application of titanium nanotubes developed in the Ti–24Zr–10Nb–2Sn alloy, as drug delivery systems to prevent bacterial infections in medical devices. A nanotubular oxide layer was synthesized by electrochemical anodizing on the Ti–24Zr–10Nb–2Sn superelastic alloy and the electrical variables that control the growth at constant potential were determined. Scanning electron microscopy (SEM) showed that the nanostructures show a positive linear growth as a function of the applied potential, the superficial analysis carried out by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) showed different states of valence evidencing the presence of TiO<sub>2</sub>, Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, SnO<sub>2</sub>, and ZrO<sub>2</sub>. FTIR spectra confirm the presence of the antibiotic gentamicin in the Ti–24Zr–10Nb–2Sn nanotubes. The developed nanostructures were evaluated in a phosphate buffer solution (PBS) as a controlled release system of antibiotics. It was observed by bacteriological tests that the nanostructured morphology in combination with the chemical composition has bacteriostatic properties; while the release of the antibiotic-loaded inside the nanotubes had a bactericidal effect. The results showed that it is possible to grow and control the morphology of the developed nanostructures on Ti–24Zr–10Nb–2Sn, which can be used for orthopedic purposes to transport and control the local release of molecules like antibiotics at the site of interest and thus prevent postoperative infections.

### Graphic abstract



**Keywords** Anodization · Titanium nanotubes · Antibacterial

✉ Enrique López-Cuéllar  
enrique.lopezel@uanl.edu.mx

Extended author information available on the last page of the article

Published online: 10 January 2021

Springer

## Introduction

The newly developed metallic biomaterials require a precise balance between mechanical and chemical properties (Wong et al. 2004). They could have unique properties that could be exploited in medicine to develop novel bio-devices, besides, nanostructured platforms for local drug release could be developed to inhibiting bacterial growth or presenting a bactericidal effect around the implant (Raphel et al. 2016). Recently a Ti–24Zr–10Nb–2Sn superelastic alloy was developed and their mechanical properties have been characterized, showing an outstanding superelastic recovery (Pavón et al. 2015, 2019). The electrochemical anodizing technique has been used on titanium and some of its alloys such as Ti–35Nb (Liu et al. 2012), Ti–35Zr (Yasuda and Schmuki 2007a, b), Ti–28Zr–8Nb (Feng et al. 2008), Ti–21Nb–11Sn (Fornell et al. 2013), Ti–24Nb–4Zr–8Sn (Zhao et al. 2016), and Ti–4Zr–22Nb–2Sn (Liang et al. 2011) to form nanotubular oxide structures vertically aligned on its surface. These structures have received special attention in nanomedicine, since these structures can be loaded and carry therapeutic components to the human, releasing them at the implant site, thus avoiding poor drug distribution and the lack of selectivity of conventional drug therapies (Losic et al. 2015; Gulati et al. 2011, 2012). Some antibiotics, such as gentamicin, are commonly used to prevent bacterial infections around the implant, particularly from *Staphylococcus aureus*, microorganisms related to postoperative infections (Barth et al. 1989; Bint et al. 1977). In this sense, some studies have been focused on understanding how the load capacity of titanium oxide nanostructures affects the release profile of the drug when they are exposed to physiological solutions (Popat et al. 2007). The objective of this work is to study the electrochemical parameters that allow the growth and control of the nanostructured oxide layer on Ti–24Zr–10Nb–2Sn superelastic alloy and to investigate the ability of these nanostructures to be used for orthopedic purposes as a drug release system and subsequent controlled release kinetic and to evaluate the bacteriological properties that the developed nanostructures could present.

## Materials and methods

### Electrochemical anodizing

Ti–24Zr–10Nb–2Sn alloy (sheets of 5 mm wide, 5 mm long, and 0.11 mm thick) samples previously polished with a mirror finish were anodized at a constant potential

of 10, 15, 20, and 25 V for 30 min at room temperature in 60 mL of an electrolyte of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  [1 M] +  $\text{NH}_4\text{F}$  [0.25 M] +  $\text{H}_2\text{O}$ . A platinum electrode was used as a cathode (Pavón et al. 2017). To remove the excess of the electrolytic solution on the surface, the anodized samples were washed with water for 5 s. During the process, the changes in the electric current were recorded. The morphology and composition of the oxides formed in each test were analyzed.

### Characterization techniques

The surface morphology was analyzed by scanning electron microscopy (SEM) FEI model Nova NanoSEM™ 200. The elemental composition of the oxides formed in each of the samples was analyzed by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) Thermo Scientific Model K-Alpha. To analyze the presence of the antibiotic in the loaded samples, an FTIR spectrophotometer (Perkin-Elmer Frontier FTIR) was used. The fraction of antibiotic released from the nanotubes was measured with a Thermo Scientific NanoDrop 2000 spectrophotometer.

### Loading and release of the drug

The drug loading procedure was as follows: 0.2 mL of gentamicin sulfate with a concentration of  $0.06\text{ g mL}^{-1}$  was added, drop by drop, in each of the anodized samples, and kept at room temperature until the solution dried. After that, the samples were carefully cleaned with a soft cloth to remove excess of the drug accumulated on the surface. Once the samples were loaded, they were immersed separately in 5 mL of PBS release medium for 250 min and maintained at  $37\text{ }^\circ\text{C}$  with a pH of 7.4. To quantify the release of each sample, 1  $\mu\text{L}$  of the PBS was taken with a micropipette to subsequently measure the absorbance presented by the solution in the following time intervals: 5, 10, 30, 60, 120, 180, and 240 min (Gulati et al. 2016).

### Antibacterial tests against *S. aureus*

#### Activation of the microorganism

For 5 days, the *S. aureus* strain (ATCC®-25923™) was activated by successive reseeded, adding 5 mL of sterile broth ICC as a culture medium and an inoculum of 100  $\mu\text{L}$  of bacteria to three tubes of  $13 \times 100\text{ mm}$  in sterile conditions. Subsequently, they were incubated at  $37\text{ }^\circ\text{C}$  for 24 h. The procedure was performed again during the remaining days.



### Spectrophotometry method to measure bacterial growth by absorbance

The anodized alloys (10, 15, 20, and 25 V) and control samples (Unanodized Ti–24Zr–10Nb–2Sn) were introduced into the ICC culture medium and incubated at 37 °C for 24 h. Finally, the absorbances of the tubes were measured at a wavelength of 635 nm on a GENESYS™ model 5 spectrophotometer.

### Bacterial viability assay

For this, 1 mL of the culture medium exposed to the alloys was added to a volume of 9 mL of sterile 0.85% physiological saline solution making serial dilutions  $10^{-1}$  to  $10^{-12}$ . Subsequently, the bacterial viability assay was performed by adding 1 mL of the dilutions of  $10^{-8}$  to  $10^{-12}$  in Petri dishes. Then 15 mL of ICC agar was poured under sterile conditions into the Petri dishes. The samples were gently shaken to promote uniformity of the distribution of bacterial colonies, allowing the solidification of the agar at room temperature. Once the agar solidified, the Petri dishes were incubated at 37 °C for 24 h, and the antibacterial activity of the samples was determined by the plate counting method, calculating the number of colonies obtained.

### Antibiogram method

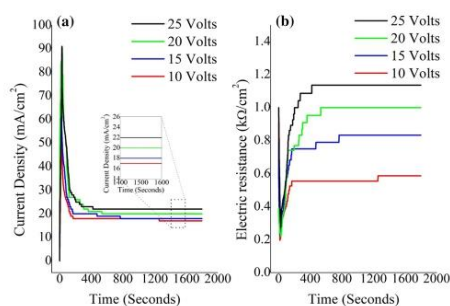
The test of the sensitivity of *S. aureus* to the antibiotic gentamicin consisted of depositing in sterile conditions, plates of the anodized alloys loaded and not loaded with the antibiotic gentamicin on the surface of ICC agar contained in a Petri dish previously inoculated with *S. aureus*. As soon as the plates of the alloys loaded with the antibiotic got in contact with the surface of the agar, the antibiotic spread radially, forming a concentration gradient. After 24 h of incubation at 37 °C, plaques may appear surrounded by an inhibition zone. The formation of this zone around the specimen served as an indication of antibacterial activity.

## Results and discussion

### Electrochemical anodizing and characterization of the nanotubular structure

The curves of current density vs time during the anodization process at 10, 15, 20, and 25 V are presented in Fig. 1a. As can be seen, in all the treatments, the current density first increased rapidly and then dropped exponentially to a steady state of around  $19 \text{ mA cm}^{-2}$ .

The same behavior has been previously reported for nanostructures formed on other Titanium alloys (Hang

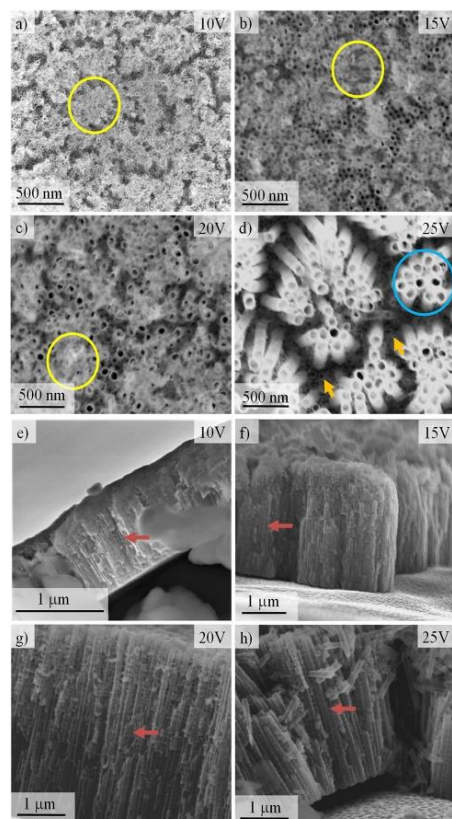


**Fig. 1** Temporal characteristics of the electrical variables were recorded during the experiment for each of the potentials applied in **a** density of electric current and **b** electrical resistance

et al. 2014; Ghicov and Schmuki 2009; Filova et al. 2015). This formation is correlated to a decrease in the electrical current, and it is associated with an increase in diffusion length within the growing nanotubes. Finally, a constant current is observed, corresponding to a steady-state of the nanotubes layer (see the inset in Fig. 1a) (Ruiquan et al. 2012). Figure 1b shows the behavior of the electrical resistance as a function of time for each of the anodized samples, which were calculated according to Ohm's law. If the applied voltage is increased, the electrical resistance also grows. This is attributed to an increase in the thickness of the oxide layer when the applied voltage increases (Fornell et al. 2013). Moreover, it takes more time to attain the stabilization of the system as the applied voltage increases, which also suggests that a more complex and big oxide layer is developed.

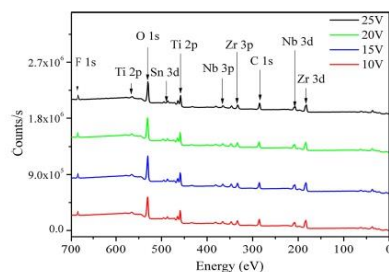
Figure 2 shows SEM images of the structures formed by anodizing of Ti–24Zr–10Nb–2Sn at 10, 15, 20, and 25 V. The top view (Fig. 2a–d) shows open surface nanopores with a diameter from 20 to 100 nm.

Remaining oxide areas can be observed in Fig. 2a–c, for the samples anodized at 10, 15, and 20 V, due to the anodizing process was uncompleted, these areas of oxide nanotubes are marked with yellow circles, and they were more evident at 10 V. This behavior could be explained as a result of the applied electric field, the  $\text{H}_2\text{O}$  is deprotonated forming  $\text{H}^+$ ,  $\text{O}^-$  or/and  $\text{OH}^-$  ions, the anions migrate to the metal/oxide interface and with the increase of the applied potential, the oxide growth rate is expected to increase in the same way that the chemical attack rate of the  $\text{F}^-$  on the surface of the nanotubes increases (Hang et al. 2014). This suggests that the formation of nanostructures with low voltages could require more anodizing time. The samples anodized at 25 V self-organized nanotube layers were formed with two different tube diameters, as described below.



**Fig. 2** **a–d** Top views SEM images of Ti–24Zr–10Nb–2Sn anodized at 10, 15, 20 and 25 V, **e–h** shows the cross-sectional views

Similar to other Ti–Zr–Nb alloys (Feng et al. 2008; Liu et al. 2014; Jeong et al. 2014), these structures formed a group of nanotubular clusters of about ten nanotubes, marked with blue circles and surrounded by small nanotubes of smaller length and diameter, marked with orange arrows in Fig. 2d, this bimodal size distribution can be attributed to the composition of the alloy and geometric effects of stabilization under certain anodization potentials (Fornell et al. 2013). Vertically aligned straight nanostructures with a length of around 1 to 4.2 μm was observed from the cross-sectional views in Fig. 2e–h. The anodized samples at 20 and 25 V in Fig. 2g–h presented a bamboo-like morphology marked with red arrows which can improve the efficiency of energy conversion (Ji et al. 2012)



**Fig. 3** XPS survey spectra for Ti–24Zr–10Nb–2Sn alloy surface after anodization by 30 min at 10, 15, 20, and 25 V

and this phenomenon was less appreciable in the anodized sample at 10 and 15 V (see Fig. 2e–f).

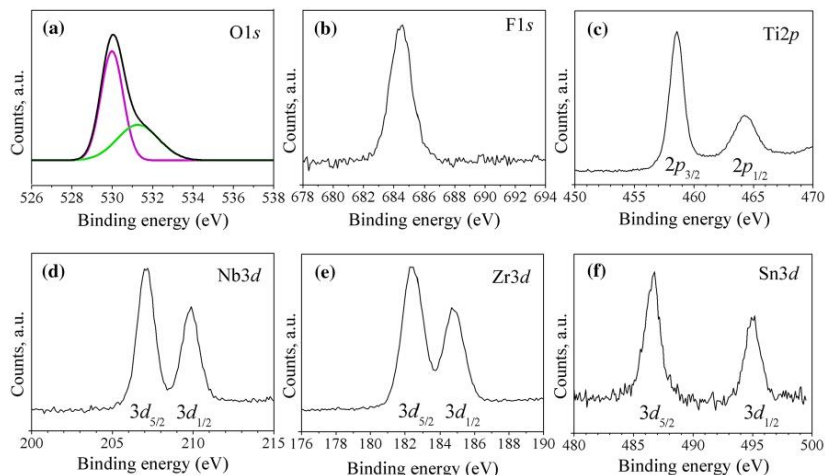
To investigate the surface chemistry of different substrates, XPS characterization was performed. Figure 3 displays the XPS survey spectra of the anodized samples at 10, 15, 20, and 25 V, marked with red, blue, green, and blackline, respectively. In all cases, the survey spectra indicate the presence of Ti, Zr, Nb, Sn, O, and F elements, which were marked with a black arrow, the presence of carbon was attributed to the environmental contamination.

As the survey spectra of each anodized sample are similar, in Fig. 4 only the high-resolution XPS spectrum of the anodized sample at 25 V is presented. The deconvolution of the O1s photoemission spectra shows one signal at 530.08 eV, which can be related to the existence of metal oxides, and the other signal at 531.08 eV is attributed to hydroxyl groups that are present at the nanotube surface (see Fig. 4a) (Allam et al. 2010; Sul 2010). The F1s spectrum shown in Fig. 4b, this contribution near to 684.3 eV, indicates that the fluorine is presented in the sample mainly as metal fluorides and to physically adsorbed F<sup>−</sup> on the surface (Allam et al. 2010). In Fig. 4c, the valence states of titanium were determined by the peaks Ti2p<sub>3/2</sub> and Ti2p<sub>1/2</sub> at 458.5 and 464.3 eV, respectively, with a splitting of 5.8 eV typical of Ti<sup>4+</sup> in titanium dioxide (Filova et al. 2015; Allam et al. 2010; Sul 2010). The formation of Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> was confirmed by the peaks Nb3d<sub>3/2</sub> at 209.88 eV and Nb3d<sub>5/2</sub> at 206.98 eV with a split spin-orbit of 2.9 eV (Fig. 4d) and agree with the values reported for Nb<sup>5+</sup> in Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (Zhao et al. 2016; Allam et al. 2010; Verissimo et al. 2014). The Zr<sub>3d</sub> spectra are shown in Fig. 4e at binding energies of 182.48 and 184.64 eV, which corresponds to Zr3d<sub>5/2</sub> and Zr3d<sub>3/2</sub> with a split spin-orbit of 2.16 eV confirming that zirconium is in the form of Zr<sup>4+</sup> (Zhang et al. 2003). Finally, the formation of SnO<sub>2</sub> was confirmed by the peaks Sn3d<sub>5/2</sub> and Sn3d<sub>3/2</sub> at 486.58 and

494.88 eV, respectively (Fig. 4f) with a split spin-orbit of 8.3 eV (Zhao et al. 2016; Verissimo et al. 2014).

Then, according to these results, the formation of a nanotubular oxide layer on the surface of the alloy Ti-24Zr-10Nb-2Sn could follow the route proposed by Liu et al. (2014), Yasuda and Schmuki (2007a, b), and Li et al. (2013). The results of relative elementary

composition are summarized in Table 1. For Ti2p as TiO<sub>2</sub> an average around 9.38%, was detected, the Nb3d around 3.04%, the Zr3d around 5.88%, and the Sn3d around 0.705%. The Ti:Zr:Nb:Sn ratio of the nanotubular oxide layer formed was 49:31:16:4. The relative concentration in each anodized samples varied very weakly.

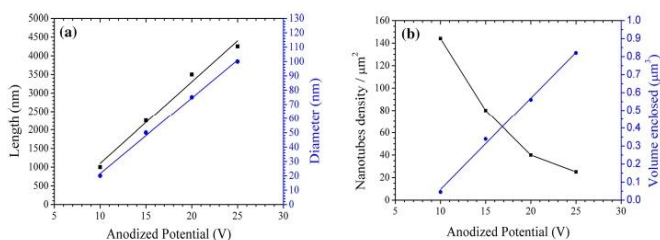


**Fig. 4** High-resolution XPS spectra for **a** O1s, **b** F1s, **c** Ti2p, **d** Nb3d, **e** Zr3d, and **f** Sn3d obtained for the native passive film on Ti-24Zr-10Nb-2Sn alloy surface anodized at 25 V

**Table 1** The relative elemental composition obtained by XPS of the nanotubular oxide layer formed on Ti-24Zr-10Nb-2Sn at different potentials for 30 min at room temperature

Sample	Atomic concentrations (at. %)						
	Ti2p	Zr3d	Nb3d	Sn3d	O1s	F1s	C1s
10 V	9.24	5.95	2.94	0.66	44.76	6.24	30.2
15 V	9.72	6.16	3.24	0.7	46.83	6.31	27.05
20 V	9.61	5.75	3.04	0.79	45.03	7.23	28.55
25 V	8.98	5.69	2.95	0.67	43.47	5.92	32.32

**Fig. 5** Influence of anodized potential on the growth of nanotubular structures: **a** relationship of nanotube length (black line) and diameter (blue line), **b** relationship of density (black line) and the volume enclosed (blue line)





The relationship between the length and diameter as a function of the anodization potential is presented in Fig. 5a in black and blue lines, respectively. A positive linear dependence can be observed for each of the parameters in the range of 10–25 V. These results demonstrate how the morphology of the formed oxide can be affected by electrochemical conditions.

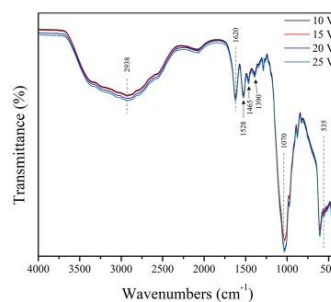
The average diameter of the nanotubes increased from around 20 nm at 10 V to 115 nm at 25 V, the growth rate of the diameter was of  $5.3 \text{ nm V}^{-1}$  very close to the growth rate of pure titanium of  $5 \text{ nm V}^{-1}$  reported in the literature (Berger et al. 2008). The length of the nanotubes increased from around  $1 \mu\text{m}$  at 10 V to  $4.2 \mu\text{m}$  at 25 V, the growth length rate of nanostructured oxide was  $216 \text{ nm V}^{-1}$ . An important factor in determining this type of surface must be the density of nanotubes per unit area. This allows us to quantify the total enclosed volume. With the above data and the SEM images, it was possible to determine a density of tubes per unit area, as shown in Fig. 5b. The decrease in density is because when the potential increases, the diameter, and length of some of the nanotubes grow to the detriment of other nanotubes that become smaller, forming the cluster species that was shown in Fig. 1b at 25 V.

These created clusters decrease the density considerably. Based on the results obtained in this work, the total enclosed volume was calculated using the average in diameter, length, and nanotubes density. In Fig. 5b, the blue points represent the volume enclosed by the nanostructures per unit area, and a positive linear relationship with the applied potential was observed. Between the ranges of 10–25 V, the increase in the size of the nanotube plays a more important role in the total enclosed volume than the density of nanotubes.

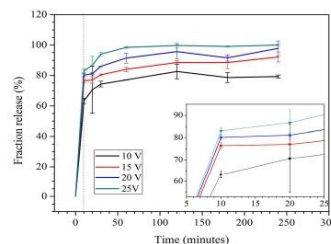
In this sense, these results are important to design a desired architecture of nanotubes by adjusting the applied voltage in the anodization process, because the total enclosed volume is related to the amount of drug release and more density is related to the more homogenous release. Then, the desired architecture can be selected as a function of these two parameters (the amount of drug and the homogeneity), and the best compromise takes place at the intersection of both lines at around 17 V, as seen in Fig. 5b.

It is important to note that from Fig. 5b, two considerable parameters to regulate the release of drugs can be obtained, but another essential parameter is the time of release, which is the dosage rate of the drug as a function of time. In such a way, another compromise must be established between these two points, that is, between the amount of load and the release time, or between the length, density, and the diameter of the nanotubes.

To confirm the incorporation of the antibiotic gentamicin into the nanotubes, after the loading process, FT-IR measurements were performed.



**Fig. 6** FT-IR spectra of nanotubes formed on the surface of the Ti-24Zr-10Nb-2Sn alloy loaded with the antibiotic gentamicin



**Fig. 7** The fraction of the drug released in PBS (pH 7.4,  $37^\circ\text{C}$ ) as a function of the time. The curves correspond to the samples in Fig. 2. Inset: the burst release of the antibiotic is observed in the first minutes of release

Figure 6 shows the FT-IR spectra of nanotubes formed on the surface of the anodized alloys loaded with the antibiotic gentamicin in the range of  $4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$ . Broadbands from  $3500$  to  $1600 \text{ cm}^{-1}$  indicate the presence of adsorbed or hydrogen-bonded water molecule on the nanotubes (Macak et al. 2005). The band presented at  $535 \text{ cm}^{-1}$  is attributed to the Ti–O–Ti stretch mode of  $\text{TiO}_2$  (Liang et al. 2011). The peak presented at approximately  $1077 \text{ cm}^{-1}$  has been reported as the C–O stretching vibration and the residual ammonium of the electrolyte used in the anodization process (Ammonium Fluoride) (Zhang et al. 2003). Pure gentamicin showed its characteristic vibrational peaks at 1530, 1463, and  $1392 \text{ cm}^{-1}$  (Nampi et al. 2012). Thus, these peaks in the anodized alloys loaded with gentamicin (peaks marked by arrows), confirm the presence of gentamicin in all the samples.

### Loading and release of the drug

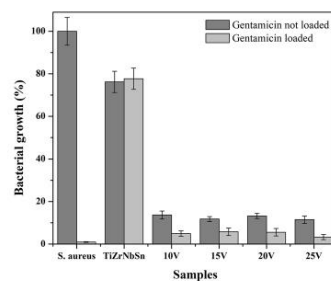
To prove the efficacy and release time of the architecture of nanotubes for the release of molecules, drug release tests were carried out in triplicate with each anodized sample. Figure 7 shows the record of the gentamicin concentration released in PBS as a function of time. The UV–Vis absorption spectra of the gentamicin solution for all samples showed that the drug had a broad absorption at 225–290 nm and the maximum at 262 nm.

It is important to note that each of the nanostructures presented a sustained release with two different stages, marked in Fig. 7 with a dotted line. In the first 10 min of immersion, a burst release effect of about 80% of the drug has been recorded (see the inset in Fig. 7). The samples anodized at 10 V presented lower release kinetics. And, in the second stage, it was observed a slow-release kinetic. Because gentamicin is highly soluble in polar solvents such as water and shows low solubility in the non-polar solvent (O'Neil et al. 2006), therefore a burst release of the surface in the first minutes of immersion of samples is expected which could be related to an adsorption phenomenon. And this burst release is more important as the density of nanotubes decreases or the size in the nanotubes is higher, contrary to the slow-release zone, which can be related to the amount of drug-loaded inside the nanotubes. This means that if the release process searched must be slow, then a process governed by the release of drug-loaded inside the nanotubes must be chosen, i.e., nanostructures with smaller diameters. This is similar to the release kinetics that present other nanotubular arrays in titanium, Ti–6Al–4V, and other nanostructures loaded with gentamicin (Pawlik et al. 2017; Aguilera-Correa et al. 2018; Abdul-Khodir et al. 2018).

The general purpose of antimicrobial drugs is to avoid the population growth of bacteria around the bio device; then, these results offer evidence about the potential use of these materials as a novel vehicle for drug release in Ti-based alloy implants and stents. Finally, a summary

**Table 2** Morphological characteristics (length, diameter, density, the volume enclosed, and time to release 50% of the drug) by the generated nanostructures

Parameters	Anodized potential (V)			
	10	15	20	25
Length (nm)	1000	2100	3500	4250
Diameter (nm)	20	50	75	100
Nanotubes density/ $\mu\text{m}^2$	144	80	40	25
Volume enclosed ( $\mu\text{m}^3$ )/ $\mu\text{m}^2$	0.045	0.34	0.58	0.83
The fraction of gentamicin released in the first 10 min (%)	68	76	80	83



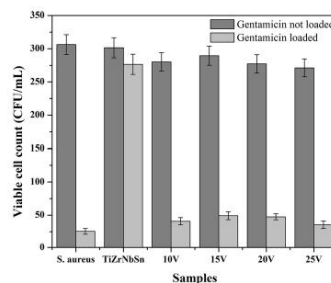
**Fig. 8** Antibacterial properties by spectrophotometry method of Ti–24Zr–10Nb–2Sn anodized alloys, no-loaded and loaded, with gentamicin antibiotics on *S. aureus*

of the important characteristics of this work is presented in Table 2. With this information, it is possible to design a specific nanotube array as a function of the amount of drug delivery, the delivery uniformity, or the time-release behavior.

### Biote tests with loaded and unloaded samples (spectrophotometry method)

The results obtained from the spectrophotometry method are indicated in Fig. 8. The bacterial strain of *S. aureus* was used as a positive control for bacterial growth, and unanodized Ti–24Zr–10Nb–2Sn alloy sheets were used as a control alloy.

A decrease in the percentage of bacterial growth is observed in the presence of the control alloy compared to the positive control, which indicates a sensitivity of the microorganism to this material, but a more significant decrease is observed for anodized samples, which suggests that this



**Fig. 9** Antibacterial properties by bacterial viability assay of Ti–24Zr–10Nb–2Sn anodized alloys, no-loaded and loaded, with gentamicin antibiotics on *S. aureus*

microorganism is sensitive to the presence of fluoride introduced during the anodization process. The same behavior was presented in the anodized alloys loaded with the antibiotic due to the release of the antibiotic in the culture medium.

### Bacterial viability assays

In Fig. 9, the CFU mL<sup>-1</sup> values obtained by the bacterial viability assay are shown. The bacterial strain of *S. aureus* was used as a positive control of bacterial viability, and unanodized Ti–24Zr–10Nb–2Sn alloy sheets were used as a control alloy.

The positive control showed an expected behavior; for samples without loaded drug, a cellular yield is observed above 300 CFU mL<sup>-1</sup>, while for samples with drug, a significant decrease in cell yield is observed with an average of 25 CFU mL<sup>-1</sup>. On other hand, the anodized samples showed antibacterial activity, going from an average cell yield value of 305 CFU mL<sup>-1</sup> for the control alloy to a value of 271 CFU mL<sup>-1</sup> for the 25 V anodized sample which presented the highest antibacterial activity without being loaded with the drug. These results indicate that the anodizing process promotes an inhibitory effect on bacteria, preventing its reproduction, therefore, anodized alloys have bacteriostatic properties. Moreover, for alloys anodized and loaded with the antibiotic, a sensitivity of the *S. aureus* strain is observed, with the 25 V anodizing being the one that presented the highest antibacterial activity, with a value of 35 CFU mL<sup>-1</sup>, followed by anodized at 10 V with a value of 40 CFU mL<sup>-1</sup> and subsequently alloys of 15 and 20 V with values obtained from 47 and 49 CFU mL<sup>-1</sup>, respectively.

These results indicate that the release of the gentamicin loaded in the anodized alloys to the culture medium, cause the death of bacteria because the gentamicin has a bactericidal effect by binding to the 30S subunit of the bacterial ribosome, preventing DNA transcription bacterial and, therefore, inhibiting protein synthesis (Nemati and

Hadjizadeh 2017). This is deduced from the results obtained since the anodized samples loaded show a significant reduction in the bacterial population due to the presence of gentamicin, compared to the results of the anodized samples without antibiotic load, where there is no significant reduction in the bacterial population.

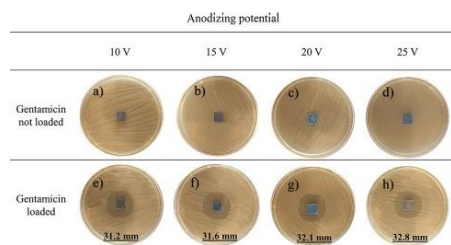
### Method of the antibiogram

Figure 10 shows the results obtained by the antibiogram method. In the upper part of the figure (from a–d), as a control test, the 10–25 V anodized alloy plates were placed without drug loading in the presence of the *S. aureus* strain. In the lower part of the figure (from e–h), the 10–25 V anodized plates loaded with the antibiotic gentamicin are shown.

Control tests show that the anodized alloy without antibiotic loading does not affect the *S. aureus* strain, unlike in all anodized samples loaded with antibiotics, an inhibition zone can be observed, indicating the release and diffusion of the antibiotic-loaded on the nanotubes to the culture medium, establishing a concentration gradient around the plate so that bacteria cannot grow in this area where the concentration of the released drug is high enough to inhibit their growth. On the other hand, the diameter formed by the zone of inhibition increases with increasing voltage, from 31.22 to 32.8 mm, for samples anodized from 10 to 25 V, as can be seen in the lower part of Fig. 10. These results confirm the results discussed in Fig. 6, where it is indicated that as the voltage increases, more enclosed volume is expected in the treated surface. Finally, based on the size of the zone of inhibition, it can be said that the *S. aureus* strain is sensitive to the drug released from the alloy loaded with the antibiotic (Bint et al. 1977).

### Conclusions

In summary, anodized Ti–24Zr–10Nb–2Sn alloys can load and release the antibiotic gentamicin. The structure of the nanotubes can be controlled by varying the anodization voltage and a relationship between the density and the volume of the nanotubes was evidenced, the greater the length and diameter of the nanotubes, the greater the antibiotic loading capacity; the percentage of antibiotic released will be higher. On other hand, the obtained results demonstrated that nanotubes synthesized on the surface of Ti–24Zr–10Nb–2Sn alloys can be used to release antibiotics and inhibit the growth of bacteria that could cause infections related to the rejection of medical implants. Then, by controlling the dimensions of the nanotubes, it could be possible to improve the efficiency of an implant with local capacity antibiotic release at the surgical implantation sites.



**Fig. 10** Determination of the antibacterial properties of the anodized alloys of Ti–24Zr–10Nb–2Sn loaded and not loaded with gentamicin on *S. aureus* by the antibiogram method



**Acknowledgements** The authors thank Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the support of the project 219535.

### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

### References

- Abdul-Khodir KW, Abdul-Razak AH, Ng MH, Guarino V, Susanti D (2018) Encapsulation and characterization of gentamicin sulfate in the collagen added electrospun nanofibers for skin regeneration. *J Funct Biomater* 9:36. <https://doi.org/10.3390/jfb9020036>
- Aguilera-Correa JJ, Doadrio AL, Conde A, Arenas MA, de-Damborenea JJ, Vallet-Regi M, Esteban J (2018) Antibiotic release from F-doped nanotubular oxide layer on Ti6Al4V alloy to decrease bacterial viability. *J Mater Sci Mater Med* 29:118. <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6119-4>
- Allam NK, Alamgir F, El-Sayed MA (2010) Enhanced photoassisted water electrolysis using vertically oriented anodically fabricated Ti-Nb-Zr-O mixed oxide nanotube arrays. *ACS Nano* 4:5819–5826. <https://doi.org/10.1021/nn101678n>
- Barth E, Myrvik QM, Wagner W, Gristina AG (1989) *in vitro* and *in vivo* comparative colonization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* on orthopaedic implant materials. *Biomaterials* 10:325–328. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(89\)90073-2](https://doi.org/10.1016/0142-9612(89)90073-2)
- Berger S, Tsuchiya H, Schmuki P (2008) Transition from nanopores to nanotubes: self-ordered anodic oxide structures on titanium–aluminides. *Chem Mater* 20:3245–3247. <https://doi.org/10.1021/cm8004024>
- Bint AJ, George RH, Healing DE, Wise R, Davies M (1977) An outbreak of infection caused by a gentamicin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Pathol* 30:165–167. <https://doi.org/10.1136/jcp.30.2.165>
- Feng XJ, Macak JM, Albu SP, Schmuki P (2008) Electrochemical formation of self-organized anodic nanotube coating on Ti–28Zr–8Nb biomedical alloy surface. *Acta Biomater* 4:318–323. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.08.005>
- Filova E, Fojt J, Kryšlova M, Moravec H, Joska L, Bacakova L (2015) The diameter of nanotubes formed on Ti–6Al–4V alloy controls the adhesion and differentiation of Saos-2 cells. *Int J Nanomed* 10:7145–7163. <https://doi.org/10.2147/IJN.S87474>
- Fornell J, Oliveira NTC, Pellicer E, Van Steenberghe N, Baró MD, Bolfarini C, Sort J (2013) Anodic formation of self-organized Ti(Nb, Sn) oxide nanotube arrays with tuneable aspect ratio and size distribution. *Electrochem Commun* 33:84–87. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2013.04.023>
- Ghico A, Schmuki P (2009) Self-ordering electrochemistry: a review on growth and functionality of TiO<sub>2</sub> nanotubes and other self-aligned MO(x) structures. *Chem Commun (Camb)*. <https://doi.org/10.1039/b822726h>
- Gulati K, Aw MS, Losic D (2011) Drug-eluting Ti wires with titania nanotube arrays for bone fixation and reduced bone infection. *Nanoscale Res Lett* 6:571. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-6-571>
- Gulati K, Ramakrishnan S, Aw MS, Atkins GJ, Findlay DM, Losic D (2012) Biocompatible polymer coating of titania nanotube arrays for improved drug elution and osteoblast adhesion. *Acta Biomater* 8:449–456. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.09.004>
- Gulati K, Kogawa M, Pridaux M, Findlay DM, Atkins GJ, Losic D (2016) Drug-releasing nano-engineered titanium implants: therapeutic efficacy in 3D cell culture model, controlled release and stability. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 69:831–840. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.047>
- Hang R, Liu Y, Zhao L, Gao A, Bai L, Huang X, Zhang B, Tang B, Chu PK (2014) Fabrication of Ni–Ti–O nanotube arrays by anodization of NiTi alloy and their potential applications. *Sci Rep* 4:7547. <https://doi.org/10.1038/srep07547>
- Jeong Y-H, Kim E-J, Brantley WA, Choe H-C (2014) Morphology of hydroxyapatite nanoparticles in coatings on nanotube-formed Ti–Nb–Zr alloys for dental implants. *Vacuum* 107:297–303. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2014.03.004>
- Ji Y, Zhang M, Cui J, Lin K-C, Zheng H, Zhu J-J, Samia ACS (2012) Highly-ordered TiO<sub>2</sub> nanotube arrays with double-walled and bamboo-type structures in dye-sensitized solar cells. *Nano Energy* 1:796–804. <https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2012.08.006>
- Li G-Z, Tang H-P, Zhang W-Y, Li G, Yu L-L, Li Y-N (2013) Fabrication of multilayer Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> nanoporous film by anodization of niobium foils. *Rare Met* 34:77–80. <https://doi.org/10.1007/s12598-013-0140-z>
- Liang YQ, Cui ZD, Zhu SL, Yang XJ (2011) Characterization of self-organized TiO<sub>2</sub> nanotubes on Ti–4Zr–22Nb–2Sn alloys and the application in drug delivery system. *J Mater Sci Mater Med* 22:461–467. <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4234-6>
- Liu H, Ding D, Ning C, Li Z (2012) Wide-range hydrogen sensing with Nb-doped TiO<sub>2</sub> nanotubes. *Nanotechnology* 23:015502. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/23/1/015502>
- Liu Q, Ding D, Ning C (2014) Anodic fabrication of Ti–Nb–Zr–O nanotube arrays. *J Nanomater* 2014:1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/240346>
- Losic D, Aw MS, Santos A, Gulati K, Bariana M (2015) Titania nanotube arrays for local drug delivery: recent advances and perspectives. *Expert Opin Drug Deliv* 12:103–127. <https://doi.org/10.1517/17425247.2014.945418>
- Macak JM, Tsuchiya H, Schmuki P (2005) High-aspect-ratio TiO<sub>2</sub> nanotubes by anodization of titanium. *Angew Chem Int Ed Engl* 44:2100–2102. <https://doi.org/10.1002/anie.200462459>
- Nampi PP, Mohan VS, Sinha AK, Varma H (2012) High surface area sol–gel nano silica as a novel drug carrier substrate for sustained drug release. *Mater Res Bull* 47:1379–1384. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2012.03.003>
- Nemati SH, Hadjizadeh A (2017) Gentamicin-eluting titanium dioxide nanotubes grown on the ultrafine-grained titanium. *AAPS PharmSciTech* 18:2180–2187. <https://doi.org/10.1208/s12249-016-0679-8>
- O’Neil MJ, Smith A, Heckelman PE (2006) The merck index: an encyclopedia of chemicals drugs, and biologicals. Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, NJ
- Pavón LL, Kim HY, Hosoda H, Miyazaki S (2015) Effect of Nb content and heat treatment temperature on superelastic properties of Ti–24Zr–(8–12)Nb–2Sn alloys. *Scripta Mater* 95:46–49. <https://doi.org/10.1016/j.scriptamat.2014.09.029>
- Pavón LL, Dagnino D, Moreno IE, Lopez E, Zarate D, Kim HY, Miyazaki S (2017) A novel method for fabrication of Ti24Zr10Nb2Sn alloy oxide nanotubes-chitosan nanocomposite films. *Mater Lett* 205:134–137. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2017.06.078>
- Pavón LL, Cuellar EL, Hernandez SV, Moreno-Cortez IE, Kim HY, Miyazaki S (2019) Effect of heat treatment condition on microstructure and superelastic properties of Ti24Zr10Nb2Sn. *J Alloys Compd* 782:893–898. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2018.12.266>
- Pawlik A, Jarosz M, Syrek K, Sulka GD (2017) Co-delivery of ibuprofen and gentamicin from nanoporous anodic titanium dioxide layers. *Colloids Surf B Biointerfaces* 152:95–102. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.01.011>
- Popat KC, Eltgroth M, Latempa TJ, Grimes CA, Desai TA (2007) Decreased *Staphylococcus epidermidis* adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes.

- Biomaterials 28:4880–4888. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.037>
- Raphel J, Holodniy M, Goodman SB, Heilshorn SC (2016) Multifunctional coatings to simultaneously promote osseointegration and prevent infection of orthopaedic implants. *Biomaterials* 84:301–314. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.016>
- Ruiquan Y, Longfei J, Xufei Z, Ye S, Dongliang Y, Aijun H (2012) Theoretical derivation of ionic current and electronic current and comparison between fitting curves and measured curves. *RSC Adv* 2:12474–12481. <https://doi.org/10.1039/C2RA22124A>
- Sul YT (2010) Electrochemical growth behavior, surface properties, and enhanced in vivo bone response of TiO<sub>2</sub> nanotubes on micro-structured surfaces of blasted, screw-shaped titanium implants. *Int J Nanomed* 5:87–100. <https://doi.org/10.2147/ijn.s8012>
- Verissimo NC, Cremasco A, Rodrigues CA, Bertazzoli R, Caram R (2014) In situ characterization of the effects of Nb and Sn on the anatase–rutile transition in TiO<sub>2</sub> nanotubes using high-temperature X-ray diffraction. *Appl Surf Sci* 307:372–381. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.04.040>
- Wong JY, Leach JB, Brown XQ (2004) Balance of chemistry, topography, and mechanics at the cell–biomaterial interface: issues and challenges for assessing the role of substrate mechanics on cell response. *Surf Sci* 570:119–133. <https://doi.org/10.1016/j.susc.2004.06.186>
- Yasuda K, Schmuki P (2007a) Control of morphology and composition of self-organized zirconium titanate nanotubes formed in (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/NH<sub>4</sub>F electrolytes. *Electrochim Acta* 52:4053–4061. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2006.11.023>
- Yasuda K, Schmuki P (2007b) Electrochemical formation of self-organized zirconium titanate nanotube multilayers. *Electrochem Commun* 9:615–619. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2006.10.043>
- Zhang Y, Ni M, Zhang M, Ratner B (2003) Calcium phosphate-chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering. *Tissue Eng* 9:337–345. <https://doi.org/10.1089/107632703764664800>
- Zhao X, Dai M, Li S, Hao Y, Yang R, Wang L, Liu Y (2016) Mixture of oxides with different valence states in nanotubes. *J Mater Sci Technol* 32:142–146. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2015.10.017>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Affiliations

Luis López-Pavón<sup>1</sup> · Daniel Dagnino-Acosta<sup>1</sup> · Enrique López-Cuellar<sup>1</sup>  · Frank Meléndez-Anzures<sup>1</sup> · Diana Zárate-Triviño<sup>2</sup> · María Barrón-González<sup>2</sup> · Iván Moreno-Cortez<sup>1</sup> · Hee Young Kim<sup>3</sup> · Shuichi Miyazaki<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, Universidad Autónoma de Nuevo León, Avenida Universidad s/n, Ciudad Universitaria, C.P. 66451 San Nicolás de los Garza, NL, México

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Universidad s/n, Ciudad Universitaria, C.P. 66451 San Nicolás de los Garza, NL, México

<sup>3</sup> Division of Materials Science, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8573, Japan