

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



**“DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE RECUBRIMIENTOS
BIOACTIVOS BASE ZINC SOBRE LA SUPERFICIE QUÍMICAMENTE
MODIFICADA DE LA ALEACIÓN Ti6Al4V”**

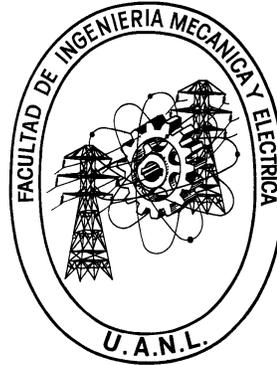
Por:
MC. ALEJANDRO LÓPEZ CRUZ

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

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN

JUNIO 2024

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



**“DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE RECUBRIMIENTOS
BIOACTIVOS BASE ZINC SOBRE LA SUPERFICIE QUÍMICAMENTE
MODIFICADA DE LA ALEACIÓN Ti6Al4V”**

Por:
MC. ALEJANDRO LÓPEZ CRUZ

EN OPCIÓN AL GRADO DE:
DOCTOR EN INGENIERÍA DE MATERIALES

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN JUNIO 2024

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

Los miembros del Comité de Evaluación de Tesis recomendamos que la Tesis “Desarrollo y caracterización de recubrimientos bioactivos base zinc sobre la superficie químicamente modificada de la aleación Ti6Al4V”, realizada por el estudiante Alejandro López Cruz, con número de matrícula 1940818, 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. Marco Antonio Ludovic Hernández Rodríguez
Director

Dr. Edgar Omar García Sánchez Co-director

Dr. Arturo Juárez Hernández
Revisor

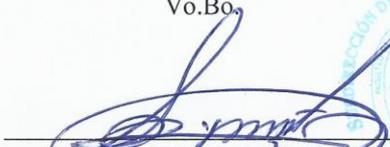
Dr. Alberto Javier Pérez Unzueta
Revisor

Dra. Myriam Angélica de la Garza Ramos
Revisor

Dr. José Roberto Benavides Treviño
Revisor

Dra. Flor Araceli García Castillo
Revisor

Vo.Bo.


Dr. Simón Martínez Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado



Institución 190001

Programa 122608

Acta Núm. 345

Ciudad Universitaria, a 10 de junio de 2024.

*A mi amada esposa,
mis padres y mis hermanos*

AGRADECIMIENTOS

A mi esposa Carolina, por su amor infinito y ser motor impulsor de esta aventura.

Al Dr. Marco Hernández por sus valiosos conocimientos y su guía en el desarrollo de este proyecto.

A mi amiga y colega Yaimí, por su apoyo incondicional y sus consejos en todas las etapas de este trabajo.

Al Dr. Edgar O. García, por todo su aporte a este proyecto, por su ayuda en las caracterizaciones de FESEM.

A la Dra. Myriam A. de la Garza por sus conocimientos y por facilitar las instalaciones para la realización de las pruebas biológicas.

Al MC. Arturo Cienfuegos por su ayuda en la realización de los ensayos celulares y microbiológicos.

Al núcleo de profesores del DIMAT de la FIME y al CONAHCYT.

Gracias a todos por ayudar a hacer de esta, una meta cumplida.

CONTENIDOS

Capítulo	Página
Capítulo 1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Hipótesis.....	3
1.2. Objetivos.....	3
1.2.1. Objetivo General.....	3
1.2.2. Objetivos Específicos	3
Capítulo 2 MARCO TEÓRICO	5
2.1. La aleación Ti6Al4V	5
2.2. La osteointegración	9
2.3. Modificación superficial de la aleación Ti6Al4V	11
2.4. Recubrimientos bioactivos	15
2.5. Contaminación bacteriana de implantes y prótesis.....	17
2.6. El zinc como agente antibacteriano y su empleo como biomaterial.....	20
Capítulo 3 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE RECUBRIMIENTOS	25
3.1. Metodología experimental.....	25
3.2. Reactivos empleados.....	26
3.3. Preparación inicial de muestras.....	26
3.4. Recubrimiento por inmersión en solución a base de ZnO	27
3.5. Caracterización de los recubrimientos obtenidos	29
3.5.1. Morfología y topografía.....	30
3.5.2. Composición elemental	30

3.5.3.	Mojabilidad	30
3.5.4.	Cantidad de Zn ²⁺ liberado al medio fisiológico	31
3.5.5.	Bioactividad	31
3.5.6.	Viabilidad celular	32
3.5.7.	Actividad antibacteriana	34
3.5.8.	Análisis estadístico	34
Capítulo 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN		36
4.1.	Caracterización del sustrato	36
4.2.	Caracterización de la superficie de control (Z0).....	37
4.3.	Caracterización de los recubrimientos obtenidos	39
4.3.1.	Morfología y topografía.....	40
4.3.2.	Composición elemental	44
4.3.3.	Mojabilidad	49
4.3.4.	Cantidad de Zn ²⁺ liberado al medio fisiológico.....	50
4.3.5.	Bioactividad	51
4.3.6.	Viabilidad celular	53
4.3.7.	Actividad antibacteriana	54
Capítulo 5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		58
5.1.	Conclusiones	58
5.2.	Recomendaciones	59
BIBLIOGRAFÍA		60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Estructuras cristalinas del titanio: HCP, fase α (izquierda) y BCC, fase β (derecha) ^[29]	6
Figura 2. Elementos químicos que pueden estabilizar las fases α , β y α/β en las aleaciones de titanio.	7
Figura 3. Estructura cristalina del TiO_2 a) rutilo, b) anatasa c) brookita ^[29]	9
Figura 4. Representación esquemática de la formación del biofilm ^[2]	18
Figura 5. Diagrama esquemático de recubrimientos antimicrobianos. a) pasivos y b) activos ^[4]	19
Figura 6. Morfología de <i>E. coli</i> (i-1) y <i>S. aureus</i> (i-2) sobre recubrimientos con ZnO incorporado ^[16]	23
Figura 7. Formación de tejido óseo nuevo después de 4 y 12 semanas de implantación en conejos de implantes de titanio con zinc incorporado en su recubrimiento ^[17]	23
Figura 8. Metodología experimental para modificar la superficie de la aleación y obtener recubrimientos base zinc.	25
Figura 9. Etapas obtener la superficie libre de zinc Z0.	27
Figura 10. Metodología para sintetizar los recubrimientos sobre la superficie libre de zinc.	28

Figura 11. Características y propiedades evaluadas a los recubrimientos obtenidos.	30
Figura 12. Superficie de la aleación Ti6Al4V cortada en torno de micromecanizado.....	36
Figura 13. Composición elemental de la superficie de la aleación Ti6Al4V después del corte. A-Microscopía Electrónica de Barrido obtenida por electrones retrodispersados, B- Espectro EDS y C- Composición elemental obtenida por EDS.	37
Figura 14. Morfología de la superficie de la aleación Ti6Al4V sometida a grabado ácido.	38
Figura 15. Composición elemental de la superficie de la aleación Ti6Al4V sometida a grabado ácido. A-Microscopía Electrónica de Barrido obtenida por electrones retrodispersados, B- Espectro EDS y C- Composición elemental obtenida por EDS.....	38
Figura 16. Micrografías obtenidas por FESEM de la superficie Z0 a diferentes magnificaciones (x5k a la izquierda y x50k a la derecha).	39
Figura 17. Composición elemental de la superficie Z0. A-Microscopía Electrónica de Barrido obtenida por electrones retrodispersados, B- Espectro EDS y C- Composición elemental obtenida por EDS.	40
Figura 18. Mapeo químico de la superficie Z0.	40
Figura 19. Micrografías obtenidas por FESEM de las superficies Z1, Z2, Z3 y Z4, de arriba hacia abajo, a diferentes magnificaciones (x5k a la izquierda y x25k a la derecha).....	42
Figura 20. Rugosidad superficial media (Ra) de cada una de las superficies recubiertas. **** diferencia estadísticamente significativa.....	43

Figura 21. Composición elemental de la superficie Z1. A- Composición elemental obtenida por EDS, B- Microscopía Electrónica de Barrido obtenida por electrones retrodispersados y C- Espectro EDS.	44
Figura 22. Mapeo químico de la superficie Z1.	45
Figura 23. Composición elemental de la superficie Z2. A- Composición elemental obtenida por EDS, B- Microscopía Electrónica de Barrido obtenida por electrones retrodispersados y C- Espectro EDS.	45
Figura 24. Mapeo químico de la superficie Z2.	46
Figura 25. Composición elemental de la superficie Z3. A- Composición elemental obtenida por EDS, B- Microscopía Electrónica de Barrido obtenida por electrones retrodispersados y C- Espectro EDS.	46
Figura 26. Mapeo químico de la superficie Z3.	47
Figura 27. Composición elemental de la superficie Z4. A- Composición elemental obtenida por EDS, B- Microscopía Electrónica de Barrido obtenida por electrones retrodispersados y C- Espectro EDS.	47
Figura 28. Mapeo químico de la superficie Z4.	48
Figura 29. Composición elemental de placa con morfología hexagonal formada en la superficie Z3. A- Composición elemental puntual obtenida por EDS, B- Microscopía Electrónica de Barrido obtenida por electrones retrodispersados y C- Espectro EDS puntual.	48
Figura 30. Ángulo de contacto de las superficies recubiertas.	49
Figura 31. Perfil de liberación de Zn ²⁺ en 50mL de PBS1x.	51
Figura 32. Morfología y composición química obtenida por EDS de las superficies recubiertas después de la inmersión en SBF por 28 días.	52

Figura 33. Viabilidad celular de fibroblastos gingivales evaluada por el método de reducción del MTT (CP-Control Positivo, CN-Control Negativo)..... 54

Figura 34. Zona de Inhibición inducida por cada superficie. 55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Lista de reactivos empleados.	26
Tabla 2. Cantidad de ZnO y HCl empleada para preparar cada variante de solución (para 100 mL de solución).	28
Tabla 3. Tamaño de la zona de inhibición (mm) inducida por cada superficie.	56
Tabla 4. Cantidad de Zn ²⁺ liberado, viabilidad celular y tamaño de la zona de inhibición para cada superficie evaluada.	56

RESUMEN

El biomaterial ideal para la fabricación de implantes y prótesis debe promover la adhesión celular y a su vez, reducir el riesgo de contaminación bacteriana del dispositivo luego de ser colocado. La aleación Ti6Al4V ha sido empleada ampliamente en la fabricación de este tipo de dispositivos médicos. Además, los iones Zn^{2+} y el ZnO son candidatos potenciales para desarrollar superficies bioactivas y que, a su vez, promuevan el crecimiento celular. El objetivo de este trabajo fue obtener recubrimientos bioactivos base zinc para la aleación Ti6Al4V, que prevengan la contaminación bacteriana sin causar toxicidad celular significativa. Se cortaron muestras en forma de discos de la aleación Ti6Al4V y se sometieron a tratamientos químicos sucesivos de grabado ácido y oxidación superficial empleando solución de peróxido de hidrógeno para obtener la superficie de control (Z0). Posteriormente, la superficie libre de zinc se empleó como sustrato para sintetizar recubrimientos mediante inmersión en soluciones con diferentes concentraciones de Zn^{2+} (Z1, Z2, Z3 y Z4). Los resultados de este trabajo muestran que por medio de tratamientos químicos sucesivos es posible obtener recubrimientos bioactivos base zinc para la aleación Ti6Al4V. Por otro lado, la morfología de la superficie de control cambia significativamente con la inmersión en la solución base zinc y la concentración de Zn^{2+} influye significativamente en la morfología de los recubrimientos obtenidos. Así mismo, los recubrimientos sintetizados presentan tendencia a la hidrofobicidad y capacidad de liberar iones Zn^{2+} al medio fisiológico, mostrando actividad antibacteriana al evaluarse en presencia de E. Coli y S. Aureus. Además, la citotoxicidad de los recubrimientos obtenidos aumenta con el incremento de la cantidad de zinc liberada al medio fisiológico, obteniéndose valores de viabilidad celular superiores al 79%.

Palabras Clave: actividad antibacteriana, recubrimientos bioactivos, Ti6Al4V, viabilidad celular, zinc.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

Los biomateriales empleados para fabricar prótesis e implantes deben sustituir al hueso dañado y facilitar el desempeño de este de la forma más adecuada posible. Con este propósito, los materiales artificiales deben interactuar de forma apropiada con el ambiente fisiológico y desarrollar conexiones adecuadas con los tejidos que rodean la implantación. El biomaterial ideal para la fabricación de implantes y prótesis debe promover la adhesión celular y a su vez, reducir el riesgo de contaminación bacteriana del dispositivo luego de ser colocado^[1-3].

En este contexto, las aleaciones de titanio se ubican en el grupo de los biomateriales más usados para fabricar implantes y prótesis para sustitución ósea, así como para otras aplicaciones médicas^[4-9]. Esto se debe a las propiedades que presenta este material, entre las que destacan su biocompatibilidad y resistencia a la corrosión en ambiente fisiológico^[3, 10].

Varios grupos de investigación enfocan sus trabajos en desarrollar metodologías que permitan disminuir el tiempo de oseointegración de los implantes y prótesis fabricados de Ti6Al4V. Así mismo, se busca mejorar la adherencia hueso-implante y disminuir el índice de fracaso de estos dispositivos como consecuencia de la contaminación bacteriana^[2, 6, 7, 11].

Con esta finalidad, se ha demostrado que introducir modificaciones en la morfología y topografía de la superficie de las aleaciones de titanio, y crear patrones a escalas macro, micro y nanométricas, puede favorecer la oseointegración de este material. Esto se debe a que la energía y la rugosidad superficial, así como la composición en la superficie, son factores determinantes

en la bioactividad del material y en el anclaje de la prótesis al hueso e influyen en gran medida en la oseointegración de estos dispositivos^[6, 12-15].

Por otra parte, son múltiples los factores que pueden conducir al fracaso de los dispositivos médicos fabricados de Ti6Al4V. Una de las causas que con mayor frecuencia se presenta es la contaminación del dispositivo, una vez implantado, como consecuencia de la acción de bacterias que se encuentran en el lugar de la implantación y que colonizan la superficie del implante, formando el *biofilm*^[3]. Se ha demostrado que el zinc es uno de los elementos metálicos que presenta actividad antimicrobiana y además, es un elemento traza que participa en la formación y mineralización del tejido óseo y que, a su vez, se ha identificado como un nutriente requerido en diferentes procesos metabólicos en los seres humanos^[7, 8, 16-18].

Inducir propiedades antibacterianas en la superficie de implantes y prótesis para sustitución ósea permite aumentar eficientemente el éxito de este tipo de tratamientos^[3, 7, 8]. Sin embargo, la superficie modificada debe ser bioactiva y presentar las propiedades adecuadas para mantener su estabilidad una vez implantado el dispositivo^[2].

Los iones Zn^{2+} y el ZnO constituyen candidatos potenciales para desarrollar superficies bioactivas y que a su vez promuevan el crecimiento celular debido a que poseen excelente durabilidad, baja toxicidad, alta resistencia a la corrosión, alta estabilidad y elevado poder antibacteriano^[7, 8, 17, 19]. El ZnO favorece la viabilidad celular y la habilidad osteogénica por lo que es investigado como un agente antibacteriano potencial^[8, 18, 20, 21].

Además, los recubrimientos delgados de ZnO presentan su superficie terminada con grupos hidroxilos que pueden ser funcionalizados con diferentes moléculas, originando un control efectivo de las propiedades superficiales, lo que resulta en una superficie más bioactiva y con mayor resistencia a la corrosión^[20]. Algunos métodos empleados para obtener recubrimientos de ZnO son: deposición electroforética, sol-gel, oxidación electrolítica por plasma, deposición física de vapor, recubrimiento por inmersión, entre otros^[8, 19, 20, 22].

Por lo anterior, en esta investigación se plantea como problemática a resolver la siguiente: el éxito clínico de los dispositivos fabricados de Ti6Al4V, para sustitución ósea, se ve afectado en gran medida por la contaminación microbiana, siendo esta una de las principales causas de fracaso de este tipo de dispositivos. Por lo tanto, se hace necesario obtener superficies que presenten topografías, así como composiciones elementales y de fases que inhiban el crecimiento de microorganismos y que a su vez sean bioactivas.

1.1. Hipótesis

Por medio de tratamientos químicos sucesivos es posible obtener recubrimientos bioactivos base zinc para la aleación Ti6Al4V, caracterizados por su capacidad de liberar iones zinc y promover una adecuada actividad antibacteriana, con una viabilidad celular mayor al 75%.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Obtener, en la superficie de la aleación Ti6Al4V, recubrimientos bioactivos base zinc que prevengan la contaminación bacteriana y permitan una viabilidad celular mayor al 75%.

1.2.2. Objetivos Específicos

1. Modificar la superficie de la aleación Ti6Al4V mediante una combinación de ataque químico y tratamiento con peróxido de hidrógeno.
2. Sintetizar recubrimientos sobre la superficie previamente modificada de la aleación Ti6Al4V mediante inmersión en soluciones preparadas a base de ZnO con concentraciones de Zn^{2+} de 0.1M, 0.3M, 0.5M y 1.0M.
3. Caracterizar la morfología y topografía de los recubrimientos obtenidos mediante microscopía electrónica de barrido y medición de rugosidad.
4. Caracterizar la composición elemental de los recubrimientos obtenidos mediante Energía Dispersiva de Rayos X.

-
5. Caracterizar la mojabilidad de los recubrimientos obtenidos mediante ensayo de la gota en reposo.
 6. Cuantificar la liberación de iones Zn^{2+} al medio fisiológico mediante Espectrometría de Absorción Atómica.
 7. Evaluar la bioactividad de los recubrimientos obtenidos según la norma *ISO 23 317*.
 8. Evaluar la actividad antibacteriana, mediante el método de difusión en agar, y la citotoxicidad, según la técnica de reducción del MTT, de los recubrimientos obtenidos.

El alcance de esta investigación incluye la síntesis de recubrimientos base zinc sobre la superficie de la aleación Ti6Al4V, modificada previamente mediante tratamientos químicos, así como su caracterización morfológica y composición. Además, se realiza una evaluación de la bioactividad, la actividad antibacteriana y citotoxicidad celular inducida por estos recubrimientos. Sin embargo, no se incluyen aspectos relacionados con el espesor, las propiedades mecánicas, adherencia al sustrato ni corrosión de los recubrimientos obtenidos.

Capítulo 2

MARCO TEÓRICO

Cuando el hueso presenta algún daño o rotura irreversible es necesario el uso de biomateriales para reconstruir el tejido afectado y que vuelva a ser funcional. En diferentes aplicaciones, los metales son la opción más viable para sustituir el tejido óseo. Por lo anterior, se requiere que los biomateriales empleados en estas aplicaciones interactúen de forma adecuada con el medio biológico donde se coloque el implante o prótesis. Entre los metales biocompatibles, las aleaciones de titanio son los materiales más usados para la fabricación de sustitutos del tejido óseo.

En este capítulo se aborda el uso de la aleación Ti6Al4V en la fabricación de dispositivos médicos para sustitución ósea, sus propiedades, oseointegración y métodos de modificación superficial para aumentar su bioactividad. Además, se describe el uso de recubrimientos base zinc como alternativa para minimizar la contaminación microbiana que puede afectar el éxito del dispositivo implantado.

2.1. La aleación Ti6Al4V

Son varias las causas que conllevan al reemplazo del tejido óseo en el organismo humano. Las aleaciones de titanio, los aceros inoxidable y las aleaciones cromo cobalto son los materiales metálicos más empleados en la sustitución de tejido óseo, principalmente en aquellas aplicaciones donde se requiere que los dispositivos implantados resistan la acción de las cargas propias de la función de soporte del hueso^[1, 23-25].

Ante el incremento en el uso de biomateriales sintéticos, ha sido necesario evaluar detenidamente la interacción de estos con el organismo humano, siendo

la biocompatibilidad, la principal propiedad que deben cumplir estos materiales. Entre los materiales metálicos empleados para sustitución ósea, las aleaciones de titanio constituyen una de las opciones más viables para su uso en este tipo de aplicaciones. Algunas de las propiedades que hacen de las aleaciones de titanio el material a seleccionar son la resistencia a la corrosión, la bioactividad que se puede inducir a la superficie de este material y la estabilidad mecánica durante la cicatrización de la implantación [10, 26-28].

A temperatura ambiente, la estructura cristalina del titanio es hexagonal compacta (HCP), conocida también como fase α . Sin embargo, cuando este material pasa los 883°C, cambia a una estructura cúbica centrada en el cuerpo (BCC), llamada fase β (véase Figura 1).

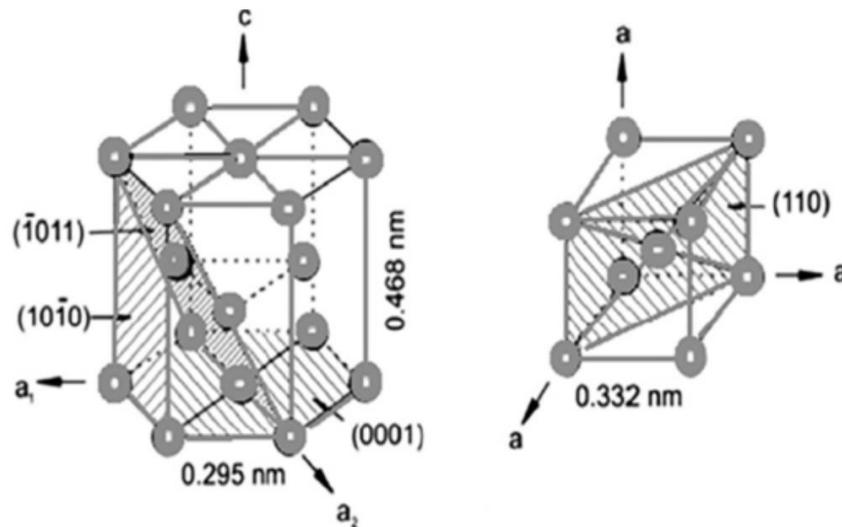


Figura 1. Estructuras cristalinas del titanio: HCP, fase α (izquierda) y BCC, fase β (derecha)^[29].

Por otro lado, el titanio tiene la capacidad de formar soluciones sólidas con varios elementos químicos, dando lugar a diferentes aleaciones (véase Figura 2) que presentan una amplia gama de propiedades. Lo anterior permite el uso de las aleaciones de titanio en múltiples aplicaciones, dentro de las cuales destacan las industrias aeroespacial y médica.^[10, 26, 29]

Como consecuencia de lo anterior, es posible diferenciar cuatro grupos de aleaciones de titanio, tomando en consideración la microestructura de estas a

La aleación Ti6Al4V, es del tipo α/β y se conoce como titanio grado 5, de acuerdo con la norma *ASTM B367-13*. Por otra parte, en la norma *ASTM F136-13*, se indica la composición química de esta aleación, para su uso en la fabricación de implantes quirúrgicos.

La aleación Ti6Al4V, a consecuencia de su pasivación, tiene la capacidad de desarrollar una capa de óxido en su superficie. Esta capa se forma instantáneamente, al encontrarse el titanio en presencia de oxígeno, alcanzando un espesor aproximado entre 3 y 7 nm en menos de un segundo^[7, 10].

Esta capa de óxido es muy estable químicamente y presenta muy alta adherencia, siendo la causante del buen comportamiento frente a la corrosión de esta aleación. Algunas características como la composición y espesor de esta película de óxido de titanio dependen directamente de las condiciones ambientales en la cual se desarrolle la misma, viéndose favorecida su formación en ambientes oxidantes^[7, 10].

Algunos estudios describen la capacidad de esta película pasivante de disolverse y generarse de forma continua en soluciones acuosas. Esto da la posibilidad de incorporar una variedad de iones de diferente naturaleza en la composición química del óxido de titanio, al incorporar diferentes elementos en la solución donde se forma la película^[26].

Los óxidos que se forman en la superficie de la aleación Ti6Al4V son el TiO, el Ti₂O₃ y, con mayor frecuencia, el TiO₂^[29]. El TiO₂ puede encontrarse en tres fases cristalinas diferentes: la brookita, con una estructura cristalina romboédrica, la anatasa, con estructura tetragonal y el rutilo con estructura tetragonal también, como puede observarse en la Figura 3^[29].

Por las propiedades que presenta, la anatasa constituye la fase más estudiada y de mayor interés en la fabricación de dispositivos médicos para sustitución ósea. Esta fase permite el intercambio de diferentes iones, dentro de los cuales, los iones calcio (Ca²⁺) y fosfato (PO₄³⁻) son de especial interés, al formar parte de la composición química del hueso. Lo anterior permite que esta fase del TiO₂ sea

bioactiva y, por tanto, facilita el proceso de oseointegración que debe desarrollarse al colocar el implante o prótesis en el organismo humano.

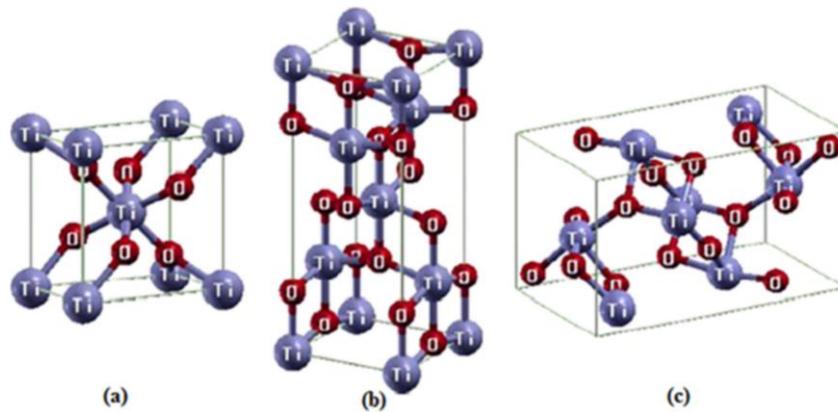


Figura 3. Estructura cristalina del TiO_2 a) rutilo, b) anatasa c) brookita^[29].

2.2. La osteointegración

Al colocarse un material extraño en el cuerpo humano, la superficie de este entra en contacto con los tejidos presentes en el lugar donde se realiza la intervención. En el caso en el que se diseña una prótesis o implante para estar en contacto con el hueso, deben considerarse minuciosamente la bioactividad y la capacidad del material seleccionado de enlazarse adecuadamente con el tejido óseo que rodeará el dispositivo una vez colocado^[12].

El tejido óseo tiene la capacidad de regenerarse en nuevo hueso al ser dañado o herido, a diferencia de otros tejidos que, ante un daño, responden con la formación de tejido fibroso. Esta respuesta única del tejido óseo puede considerarse como una acción encaminada a proteger la integridad del esqueleto y todas las funciones que este desempeña en el organismo^[31, 32].

La formación de hueso nuevo y su remodelación permiten que, en muchos casos, el tejido óseo reestablezca los defectos por sí solo. Sin embargo, cuando el defecto generado por la rotura del hueso es muy grande, la única alternativa viable para restablecer la función del hueso radica en el uso de dispositivos médicos implantables diseñados para estas aplicaciones.

El proceso de osteointegración puede definirse como la conexión que se establece entre el implante o prótesis y el hueso que lo rodea. Por lo anterior, el implante debe ser aceptado adecuadamente por los tejidos, formando nuevo hueso en lugar de tejido fibroso en la interfaz hueso-implante y sin que existan síntomas de inflamación en el sitio de implantación^[12, 33, 34].

Algunos factores que garantizan una adecuada osteointegración, influyendo en el éxito clínico de la implantación y que deben ser considerados, tanto durante el diseño del dispositivo, como durante su colocación y cuidados posteriores son los siguientes:

- ✓ El estado del hueso receptor.
- ✓ La técnica quirúrgica empleada para colocar el dispositivo.
- ✓ Las condiciones de carga a la que se somete el dispositivo una vez implantado.
- ✓ El diseño macroscópico y dimensional del dispositivo.
- ✓ El material de fabricación.
- ✓ La calidad superficial del implante.

En la superficie del dispositivo tiene lugar la adhesión, diferenciación y proliferación celular. Además, las características topográficas, morfológicas y químicas de la superficie se encuentran entre los factores de mayor influencia en el contacto hueso-implante. Por lo anterior, dentro de los factores antes mencionados, la calidad de la superficie del dispositivo desempeña un rol fundamental^[10, 12, 14, 34].

Por otro lado, varios autores han demostrado la influencia de las superficies rugosas en los procesos de migración y proliferación celular, evidenciándose que la morfología de la superficie, así como la microestructura del material desempeñan un rol fundamental en la forma en que interactúa este con los tejidos, y, por tanto, en la osteointegración del dispositivo.

Teniendo en cuenta lo anterior, y considerando que la adherencia del hueso al material ocurre solamente en la superficie de este, es necesario que se

desarrollen técnicas o tratamientos que permitan aumentar la bioactividad de los materiales que se emplean en la fabricación de sustitutos óseos. Varios métodos han sido estudiados para introducir cambios en la superficie de la aleación Ti6Al4V y mejorar, con esto, la interfaz hueso-implante, promoviendo una osteointegración más rápida y eficaz^[6, 12, 33-38].

2.3. Modificación superficial de la aleación Ti6Al4V

La ingeniería de superficies en el campo de los biomateriales se basa en modificar la superficie original del material o incluir recubrimientos como capas adicionales sobre esta. Esto se realiza con la finalidad de alterar la composición, topografía o química de la superficie siguiendo como objetivo^[2]:

- ✓ Reducir la adsorción de proteínas específicas.
- ✓ Mejorar la hemocompatibilidad.
- ✓ Reducir la adhesión de bacterias.
- ✓ Mejorar la integración con los tejidos.
- ✓ Regular el comportamiento de células madre.
- ✓ Promover la adhesión de células específicas.
- ✓ Liberar agentes bioactivos/antibacterianos.

Tomando en consideración el objetivo de acelerar el proceso de formación de tejido óseo alrededor del implante y disminuir los periodos de osteointegración, se han investigado diferentes métodos de modificación superficial para a aleación Ti6Al4V. Estas técnicas pueden separarse en dos grades grupos, según el enfoque empleado para modificar la superficie.

El primer grupo consiste en modificar la superficie mediante la incorporación de fases inorgánicas. Esto se hace con la finalidad de mejorar la conexión química entre el material y el hueso, al estimular la regeneración ósea. Siguiendo este enfoque, se han agregado a la superficie de la aleación Ti6Al4V diferentes fases, principalmente los fosfatos de calcio, componente principal del hueso. Sin embargo, se puede incorporar otras moléculas, como es el caso de las proteínas que tienen la capacidad de inducir varios tipos de respuestas celulares^[26, 33, 39].

El otro grupo de técnicas consiste en modificar la morfología y topografía superficial, tomando en consideración el efecto producido por la rugosidad de la superficie en la respuesta celular y por consiguiente en la osteointegración de dispositivo^[33, 37, 40].

Con este propósito, la superficie de la aleación Ti6Al4V ha sido sometida a múltiples tratamientos (mecánicos, físicos y químicos/electroquímicos) que crean una arquitectura con patrones macro, micro y nanométricos^[9]. Esto produce un aumento en la adsorción de moléculas y células formadoras del tejido óseo que se encuentran en la interfaz hueso-implante y que facilitan la creación de nuevo hueso alrededor del implante^[7, 38, 41].

Dentro de los diferentes métodos empleados con el fin de modificar la estructura, composición y morfología superficial de la aleación Ti6Al4V destacan los tratamientos químicos. Estos tratamientos se han empleado, también, para disminuir la presencia de contaminantes superficiales en los implantes y prótesis fabricados de esta aleación^[9, 39].

Estos tratamientos consisten en exponer el material a soluciones que permitan la ocurrencia de reacciones químicas en la superficie del sustrato. Una gran variedad de métodos se incluye en este grupo: inmersión en soluciones ácidas o alcalinas, tratamientos con peróxido de hidrógeno, el método sol-gel y las técnicas de anodización, son algunos de estos. El empleo de métodos químicos, además de modificar la superficie desde el punto de vista de su arquitectura, permite introducir cambios en la composición química y la mojabilidad^[9, 15].

Dos de los tratamientos químicos más empleados son el grabado ácido y los tratamientos con soluciones a base de peróxido de hidrógeno. El grabado ácido, también conocido como ataque químico, se basa en introducir el material en diferentes soluciones de ácidos fuertes. Algunos de los ácidos que se emplean en este tipo de tratamiento son el ácido clorhídrico, el sulfúrico, el nítrico y el fluorhídrico. Estos se han usado de forma individual o en mezclas de dos o más ácidos. Los materiales se someten a estas soluciones, con diferentes concentraciones, por varios periodos de tiempo y a diferentes temperaturas, que

varían desde temperatura ambiente hasta los 100°C. Las mezclas ácidas más usadas son la de HNO₃ y HF y la de HCl y H₂SO₄^[10, 23, 42-44].

Empleando el grabado ácido, se genera en la superficie de la aleación Ti6Al4V rugosidades medias que oscilan entre 0.5 y 3 µm. Estas superficies se caracterizan por la presencia de poros con dimensiones irregulares y diferentes profundidades. Además, con el ataque químico se eliminan de la superficie diferentes contaminantes y óxidos nativos que se hayan formado en etapas anteriores, constituyendo un método efectivo de limpieza superficial^[13, 42].

Al estar sometida la superficie de la aleación a un ambiente oxidante, se crea en esta una capa de óxido, principalmente de TiO₂, que puede presentar un espesor aproximado de 10 nm, dependiendo de los parámetros de proceso que se empleen durante el tratamiento (concentración de la solución, temperatura, tiempo, etc.)^[13, 23, 34].

Algunas impurezas o trazas provenientes de reactivos empleados en la solución ácida pueden aparecer en la superficie después de sometida a este tipo de tratamientos y pueden permanecer en la superficie, aunque se realice un tratamiento térmico posterior, siendo este una de las principales desventajas de esta técnica^[13, 23, 34].

Además, al realizar grabado ácido, es importante controlar rigurosamente los parámetros del proceso para prevenir la formación de microgrietas en la superficie del material. Las mencionadas microgrietas pudieran comprometer algunas propiedades del implante, como su resistencia a la fatiga, y que se vea afectado el éxito clínico del tratamiento^[42].

Por otro lado, los tratamientos químicos con peróxido de hidrógeno consisten en sumergir el material en una solución de peróxido de hidrógeno, y en muchos casos se hacen en combinación con el grabado ácido. El objetivo de este tipo de tratamientos es favorecer la oxidación superficial del titanio, facilitando la formación de la capa pasivante característica de estos materiales.

La capa de óxido formada en la superficie se caracteriza por ser amorfa y se compone principalmente de una mezcla de peroxo-complejos de titanio. Cuando la superficie de la aleación se somete a tratamientos térmicos, a temperaturas mayores a 300°C, posterior a su exposición a estas soluciones, se obtiene una superficie que se caracteriza por su elevada bioactividad^[45-47].

Generalmente, en los tratamientos con peróxido de hidrógeno, se emplean soluciones con concentraciones que varían de 0.3 al 30%, temperaturas inferiores 80°C y tiempos entre 15 min y 6 h. Además, se ha estudiado el aumento del poder oxidante de la solución al agregar pequeñas cantidades de ácidos sulfúrico y clorhídrico^[15, 43-46, 48].

Se ha demostrado que mediante inmersión en solución formada a base de H₂O₂ y H₂SO₄ es posible crear una red reproducible de nanopozos similar a una esponja, en la superficie del titanio. El empleo de mezclas de H₂O₂/H₂SO₄ es un método efectivo para obtener nanotopografías en la superficie del titanio. El espesor de esta capa de óxido y sus características pueden ser contraladas variando la concentración de los reactivos, el tiempo de exposición a la mezcla oxidante y la temperatura a la que se desarrolla el tratamiento^[9].

Estas superficies tienen efectos beneficiosos *in vitro* sobre eventos osteogénicos (formación de hueso) tanto iniciales como posteriores^[9]. La formación de la capa de óxido de titanio en la superficie de este material permite minimizar los efectos de la corrosión y la liberación de iones del sustrato al medio fisiológico, además de inducir la bioactividad del material^[20].

Una característica de las superficies obtenidas por esta combinación de tratamientos químicos es la presencia de grupos hidroxilo, según reporta Trino, L.D. y colaboradores^[20]. La presencia de grupos hidroxilo en la superficie facilita la formación de recubrimientos obtenidos por métodos químicos en una etapa posterior del proceso. Esto se debe a que la formación de estos grupos hace que la superficie sea extremadamente hidrofílica al enlace con ZnO, mejorando la adhesión de capas delgadas de este óxido.

El desarrollo de recubrimientos constituye otra alternativa para modificar la superficie del titanio con el propósito de incrementar su bioactividad y disminuir los tiempos de osteointegración. Varios métodos y materiales han sido estudiados para obtener recubrimientos bioactivos.

2.4. Recubrimientos bioactivos

El desarrollo de recubrimientos superficiales constituye uno de los métodos más empleados para mejorar la biocompatibilidad y bioactividad de los biomateriales. Para mejorar el proceso de osteointegración de dispositivos fabricados de Ti6Al4V se han explorado una amplia variedad de recubrimientos superficiales.

Materiales cerámicos, biovidrios, polímeros/biomoléculas, híbridos orgánicos/inorgánicos y compuestos se han usado en la síntesis de recubrimientos para mejorar la bioactividad de las superficies de titanio. De forma general, los materiales bioactivos estimulan formación de hueso y la liberación de moléculas o iones para eliminar complicaciones posteriores a la colocación de los dispositivos médicos^[39].

Las cerámicas bioactivas y los biovidrios son capaces de enlazarse directamente con el tejido óseo y promover su formación, mientras mantienen las propiedades mecánicas requeridas por los implantes. Además, favorecen la adsorción y proliferación celular. Algunos ejemplos de cerámicas bioactivas empleadas son los fosfatos de calcio, los cuales son particularmente atractivos para aplicaciones ortopédicas^[39]. No obstante, estos materiales presentan bajas propiedades mecánicas, por lo que se han usado para recubrir metales y con esto, mejorar el comportamiento de los dispositivos que se fabriquen^[39, 45, 49-51].

Varias técnicas han sido desarrolladas para fabricar o sintetizar recubrimientos bioactivos para la aleación Ti6Al4V. La impresión 3D, la deposición electroforética, el *drop casting*, el sol-gel, el *plasma spray*, la deposición capa por capa, la deposición química y física de vapor, los métodos biomiméticos y el método de inmersión son algunas de ellas^[39, 52].

El *dip coating* o recubrimiento por inmersión es una de las técnicas más empleadas para la síntesis de recubrimientos, tanto en laboratorios de investigación como a escala industrial. Lo anterior se debe a la simplicidad de la técnica, así como a la facilidad de aplicarse en sustratos con diferentes formas. Además, este método permite ajustar el espesor de los recubrimientos obtenidos, así como bajos costos^[39].

El recubrimiento por inmersión puede desarrollarse tanto de forma manual como automatizada y consiste en cinco pasos generales:

1. El sustrato metálico pretratado se sumerge en la mezcla del recubrimiento preparada con una formulación química previamente definida.
2. El sustrato permanece sumergido en la mezcla para la aplicación del recubrimiento por un período de tiempo específico.
3. Luego, el sustrato es extraído de la solución, resultando en la formación de una capa húmeda de recubrimiento en su superficie.
4. Posteriormente, el exceso de líquido es removido de la capa de recubrimiento.
5. Finalmente, el recubrimiento es secado mediante evaporación bajo condiciones ambientales específicas, formándose una capa delgada en la superficie del sustrato. Eventualmente, la capa obtenida en la superficie puede ser sometida a tratamiento térmico o sinterización láser.

El espesor del recubrimiento obtenido por inmersión puede ajustarse variando el ángulo en el que el sustrato es extraído de la solución, así como modificando los parámetros de la mezcla precursora: concentración, viscosidad, evaporación del solvente, etc. Varios estudios muestran que se puede obtener capas delgadas y con alta adherencia al sustrato empleando soluciones con bajas concentraciones^[39].

Algunos factores que pueden afectar el recubrimiento por inmersión son: el tiempo, la velocidad con que se extrae el sustrato recubierto de la solución, el número de ciclos de inmersión, la temperatura, la viscosidad de la solución y la tensión superficial del sustrato^[39].

Este método de recubrimiento es empleado frecuentemente en la obtención de recubrimientos bioactivos debido a su simplicidad y, además, a que permite incorporar ingredientes activos en el recubrimiento, como son los factores decrecimiento óseo, así como especies químicas que presentan diferentes propiedades que pueden resultar de interés para aplicaciones biomédicas^[39].

Por otro lado, aunque la aleación Ti6Al4V presenta excelente biocompatibilidad y su superficie sea modificada para mejorar su bioactividad y oseointegración, esta carece de propiedades antibacterianas.

2.5. Contaminación bacteriana de implantes y prótesis

Una de las principales causas del fracaso de los dispositivos médicos implantables es la contaminación causada por la presencia de bacterias en el lugar de la implantación. Lo cual representa un riesgo considerable a la seguridad de los pacientes y puede llegar a ocasionar la falla total el dispositivo implantado^[27, 43].

La infección asociada a los implantes es una de las complicaciones posoperatorias más comunes. Esta complicación, frecuentemente, inicia cuando las bacterias se adhieren a la superficie de los biomateriales, seguido del incremento en extensión de la colonización y la formación del *biofilm* (véase Figura 4). Una vez formado el *biofilm*, este se vuelve notablemente impermeable a los antibióticos. El *biofilm* impide que las células osteoprogenitoras se adhieran a la superficie del biomaterial, lo que provoca un retraso en la osteointegración de los dispositivos implantados, que puede provocar la falla final de este^[2, 27].

Las infecciones microbianas, generalmente se desarrollan en los primeros dos meses de la implantación y pueden persistir durante meses e incluso años. A continuación, se mencionan los factores que más influencia tienen sobre la contaminación bacteriana de dispositivos médicos implantados^[2, 4, 10, 53-56]:

- ✓ El diseño del dispositivo.
- ✓ La composición química del material.
- ✓ Las propiedades físicas de la superficie.

- ✓ El sitio anatómico implantado.
- ✓ La extensión de la invasión quirúrgica.
- ✓ El tiempo de permanencia del dispositivo.

Aunado a lo anterior, se ha detectado en los últimos años, un incremento significativo en la resistencia de bacterias patogénicas a drogas antimicrobianas, como consecuencia del aumento en el número de cirugías, complicaciones y tiempos de estancia en los hospitales. Esta situación mundial demanda acciones urgentes contra la amenaza de bacterias resistentes a los antibióticos^[1].

Ante esta situación, se han investigado diferentes métodos para mitigar el efecto de la contaminación bacteriana de los biomateriales^[1, 4, 27, 56]. Una de las alternativas estudiadas se basa en desarrollar cambios en la superficie de los biomateriales para disminuir la colonización de esta por agentes bacterianos. Con este objetivo, se han desarrollado diferentes técnicas, entre las que se puede mencionar la implantación de iones y los recubrimientos superficiales que presenten carácter antibacteriano e inhiban la contaminación de los dispositivos médicos^[4, 43, 55].

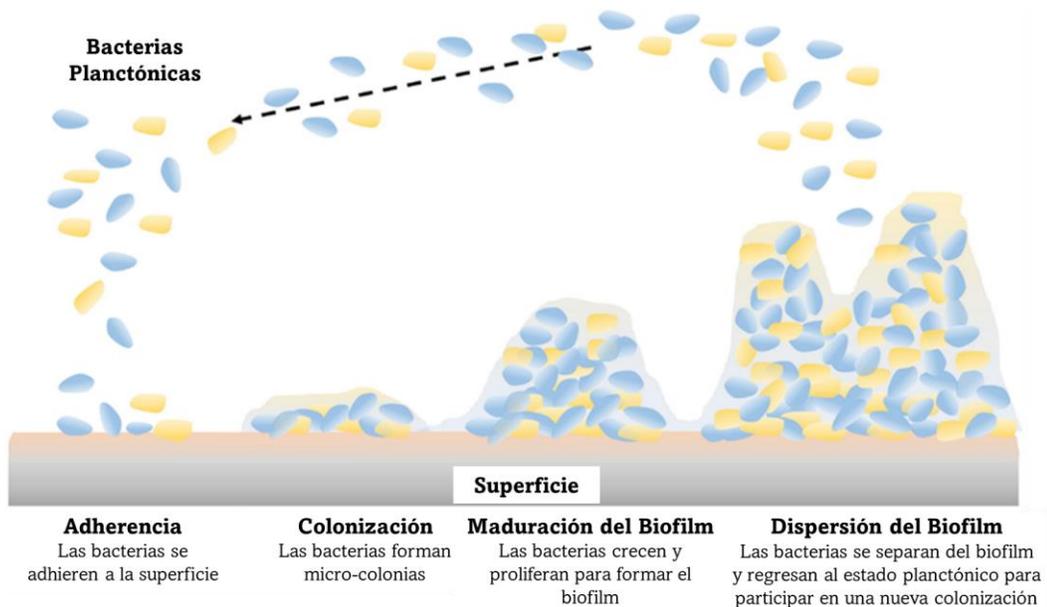


Figura 4. Representación esquemática de la formación del biofilm^[2].

Los recubrimientos empleados para prevenir la contaminación microbiana en implantes y prótesis pueden dividirse en activos o pasivos (Figura 5). Los recubrimientos pasivos evitan que las bacterias se adhieran a la superficie o causan su muerte al entrar en contacto con la superficie. En este tipo de recubrimientos, la adhesión de las bacterias es controlada por la rugosidad, la topografía, la mojabilidad, la energía superficial y la estructura cristalina de la superficie, pero no se liberan sustancias bactericidas al ambiente fisiológico^[4].

Por su parte, los recubrimientos activos reducen la infección mediante la liberación de sustancias bactericidas, como antibióticos, antisépticos, iones metálicos y péptidos funcionales. En este tipo de recubrimientos, los agentes antibacterianos son incorporados previamente, durante la síntesis de los recubrimientos^[4].

El empleo de materiales que contienen agentes antibacterianos es una de las estrategias más empleadas para prevenir la contaminación microbiana de implantes y prótesis. Diferentes materiales base zinc se han empleado ampliamente en múltiples aplicaciones en el área de la medicina. Esto se debe a la capacidad antimicrobiana que presentan.

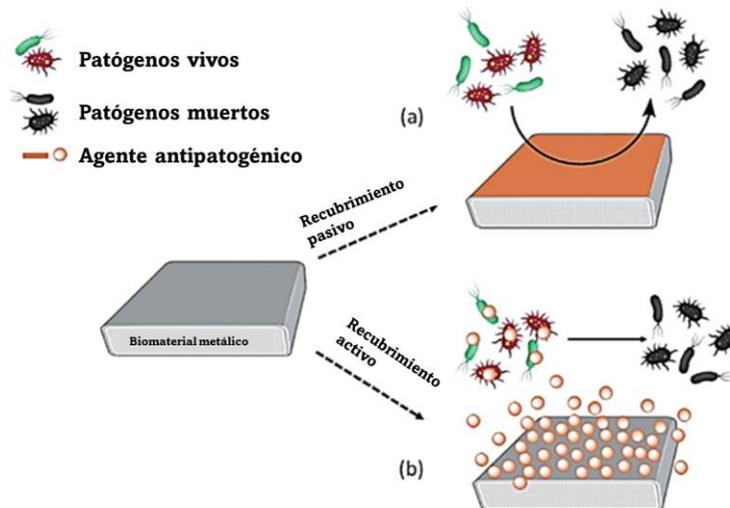


Figura 5. Diagrama esquemático de recubrimientos antimicrobianos. a) pasivos y b) activos^[4].

2.6. El zinc como agente antibacteriano y su empleo como biomaterial

Al instante en que se coloca un dispositivo implantable, junto a las células osteoprogenitoras y proteínas, arriban al sitio de implantación las bacterias. Las bacterias colonizan la superficie del material formando un *biofilm* y produciendo la infección en el sitio de implantación. Es posible combatir la infección, destruyendo esta capa polimérica hidratada empleando diferentes compuestos que presenten carácter antimicrobiano y que, generalmente, provienen del exterior^[16].

Tomando en consideración este riesgo potencial para el éxito del dispositivo, los implantes y prótesis de Ti6Al4V han sido modificados para incluir recubrimientos con capacidad antibacteriana. Estos recubrimientos, generalmente impiden o minimizan la adherencia de las bacterias y por tanto, disminuyen el riesgo de fracaso por contaminación microbiana de forma efectiva^[8, 43, 57-61].

Las ventajas que puede ofrecer el uso de agentes inorgánicos antibacterianos, introducidos en forma de recubrimientos, o presentes en el material estructural, se basa en el amplio espectro de actividad que ofrecen y el bajo desarrollo de resistencia^[1]. Los compuestos inorgánicos que con mayor frecuencia se han empleado en la fabricación de este tipo de recubrimiento son a base de plata debido a su probada capacidad antibacteriana. No obstante, el uso de la plata presenta como principal limitación la toxicidad celular, provocando daños en varias funciones celulares^[62-67]. En consecuencia, se ha planteado la necesidad de sintetizar recubrimientos inorgánicos que presenten propiedades antibacterianas y que tengan la capacidad de favorecer la osteosíntesis sin causar toxicidad a las células^[16, 68].

El zinc ha sido empleado ampliamente en la formulación de diferentes materiales usados en múltiples aplicaciones médicas por su alto poder antibacteriano^[20, 21, 38, 69-75]. Además, este elemento se encuentra formado parte de diferentes estructuras en el organismo humano, tal es el caso del hueso, donde se

encuentra en una proporción aproximada de 110–300 µg/kg y participa en diferentes procesos metabólicos como la mineralización del tejido óseo. Por otro lado, el zinc participa en la síntesis de ADN y ha demostrado presentar excelente actividad antimicrobiana frente a diferentes tipos de bacterias^[8, 16, 18, 68, 76-78].

Las nanopartículas de ZnO poseen actividad antibacteriana contra un gran número de bacterias, tanto gram positivas como gram negativas. Lo anterior se debe principalmente a que el ZnO genera especies de oxígeno reactivas, particularmente H₂O₂, que causan oxidación y que acompañado a la acumulación de nanopartículas en la matriz extracelular de la membrana bacteriana, provocando la muerte de estos microorganismos^[1].

Por otro lado, recientemente, se ha estudiado la síntesis de biovidrios y biocerámicas incorporando zinc en su composición. Lo anterior se ha investigado con el propósito de incrementar las propiedades mecánicas de este tipo de biomateriales y facilitar la forma en que interactúan las células con el material. Sin embargo, la relación entre la capacidad antimicrobiana del zinc y la manera en que este elemento incide en el proceso de remodelado óseo no se ha investigado a profundidad^[16, 69, 79, 80]. Además, la incorporación de ZnO a la composición del biovidrio estimula la bioactividad del material^[76, 81, 82].

Una alternativa poco explorada, y que pudiera tener muy buenos resultados, consiste en agregar zinc en recubrimientos de óxido de titanio. Con esto, se podrían balancear las propiedades del recubrimiento de TiO₂, como son su biocompatibilidad y su estabilidad, con la capacidad antibacteriana del zinc^[16]. No obstante, algunas alternativas se han estudiado con el propósito de agregar Zn en la superficie de la aleación Ti6Al4V^[22, 77, 83, 84]. La técnica de *Plasma Electrolytic Oxidation* (PEO), es uno de los métodos usados en la obtención de superficies de titanio con TiO₂ - ZnO^[16, 85].

Otra técnica empleada para obtener depósitos de ZnO en sustratos de titanio es el *electroplating*^[71]. Con este método se ha obtenido en la superficie del titanio nanotubos fabricados a base de diferentes compuestos de zinc^[19, 86]. Además, mediante *spin-coated*, ha sido posible obtener recubrimientos en placas de titanio

empleando disoluciones de ZnCl_2 con diferentes concentraciones. En este caso, antes de obtener el recubrimiento, las muestras pulidas y sumergidas en solución de HF ^[17].

Los tratamientos hidrotérmicos, sobre la aleación Ti6Al4V, empleando soluciones que contienen el $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$ constituyen otra alternativa estudiada^[87, 88]. En trabajos previos, se estudió este método como una opción para agregar Zn^{2+} en la superficie de esta aleación^[88]. Por otro lado, otras técnicas y precursores se han empleado para obtener recubrimientos delgados de ZnO sobre diferentes sustratos^[77, 89-92].

Un parámetro que debe ser controlado en recubrimientos basados en zinc es la liberación de iones Zn^{2+} al ambiente fisiológico. No existe un consenso en la comunidad científica respecto a la cantidad de zinc ideal a liberarse al medio fisiológico. Song y colaboradores informaron un valor de 10 ppm de concentración inhibitoria media máxima de iones Zn^{2+} ^[61]. En otra investigación, Ito y colaboradores realizaron un estudio donde evidencian que 3 ppm de Zn^{2+} no causa toxicidad celular^[93]. Sin embargo, en otras investigaciones se plantea que concentraciones superiores a 2ppm pueden afectar la viabilidad celular ^[94].

Por otro lado, el ZnO genera especies de oxígeno reactivas, particularmente H_2O_2 , que causan oxidación en la matriz extracelular de la membrana bacteriana, provocando la muerte de estos microorganismos^[1, 27], lo que a su vez, inicia la toxicidad celular y la interrupción del metabolismo celular^[27].

En el trabajo reportado por Hu y colaboradores en el 2012, se evidencia el carácter antibacteriano de recubrimientos de ZnO al estar en contacto con bacterias *E. coli* y *S. aureus*, lo que indica la habilidad de los recubrimientos con ZnO incorporado de inhibir el crecimiento bacteriano (véase Figura 6). En este trabajo, se muestra un aumento en el porcentaje de reducción de unidades formadoras de colonias de bacterias, relacionado al aumento de la concentración de zinc en el recubrimiento, obteniéndose 100% de reducción para las superficies con mayores concentraciones de zinc^[16].

Adicionalmente, la incorporación de zinc en recubrimientos sobre la superficie del titanio ha demostrado su capacidad de formar nuevo hueso al ser evaluado en un estudio *in vivo* en 2014 por Xinkun y colaboradores. En el mencionado estudio, como puede apreciarse en la Figura 7, se realiza una prueba de implantación en conejos, donde se evaluó la capacidad de formar hueso alrededor del implante después de la implantación a 4 semanas (a- implante de titanio maquinado, b- implante de titanio microrugoso y c- implante recubierto con zinc incorporado) y 12 semanas (d- implante de titanio maquinado, e- implante de titanio microrugoso y f- implante recubierto con zinc incorporado). En esta investigación se muestra la aplicación potencial en el campo de la ortopedia de este tipo de recubrimientos^[17].

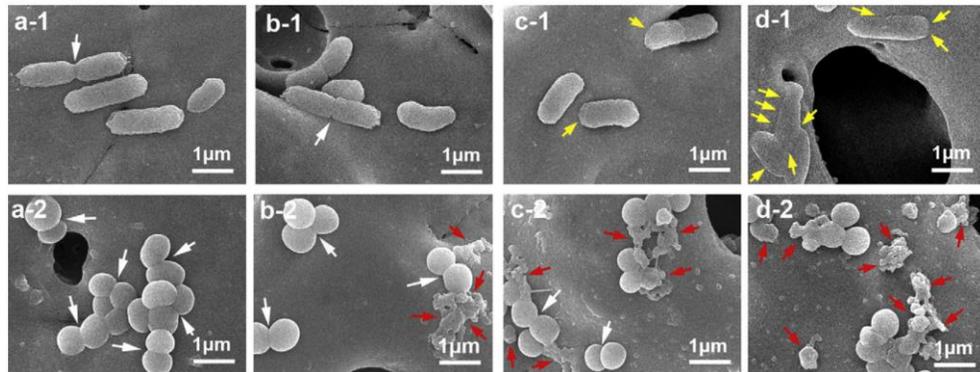


Figura 6. Morfología de *E. coli* (i-1) y *S. aureus* (i-2) sobre recubrimientos con ZnO incorporado^[16].

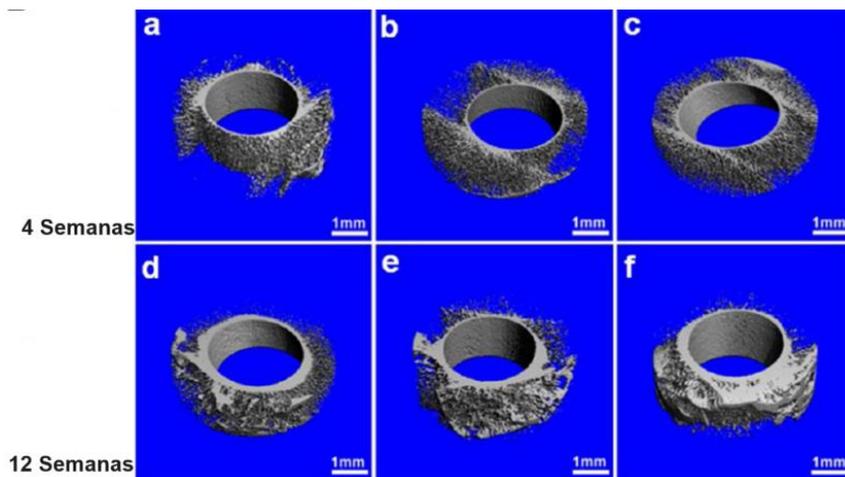


Figura 7. Formación de tejido óseo nuevo después de 4 y 12 semanas de implantación en conejos de implantes de titanio con zinc incorporado en su recubrimiento^[17].

Tomando en consideración la necesidad de desarrollar nuevas superficies para la aleación Ti6Al4V que combinen las propiedades de bioactividad y actividad antibacteriana sin causar elevada citotoxicidad, se plantea en el siguiente capítulo la metodología experimental para sintetizar recubrimientos bioactivos base zinc, así como su caracterización morfológica, composición y evaluación *in vitro*.

Capítulo 3

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE RECUBRIMIENTOS

En el presente capítulo se describe la metodología usada para modificar y sintetizar recubrimientos base zinc sobre la superficie de la aleación Ti6Al4V. Además, se incluyen los parámetros de operación empleados y la descripción de cada uno de los métodos de caracterización y evaluaciones *in vitro* empleados para describir los recubrimientos obtenidos, así como evaluar las propiedades de estos.

3.1. Metodología experimental

La metodología seguida para modificar la superficie y obtener los recubrimientos base zinc se presenta en la Figura 8, indicándose, además, la forma que se empleará en los siguientes epígrafes y capítulos para identificar cada grupo experimental.

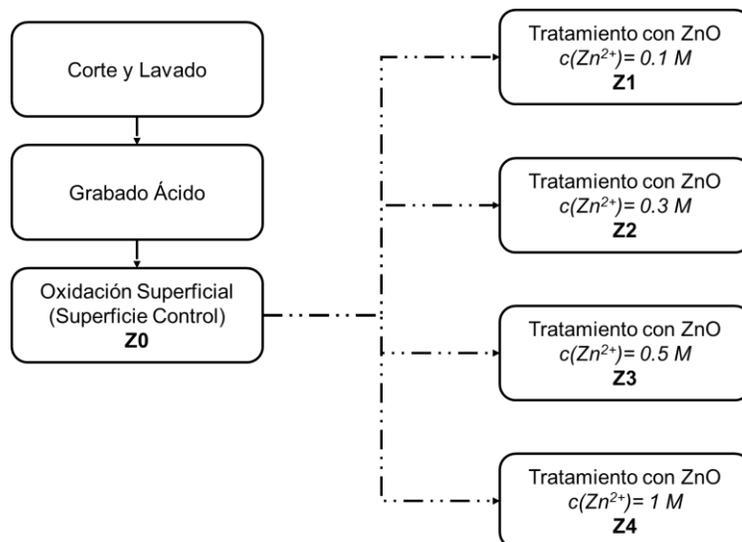


Figura 8. Metodología experimental para modificar la superficie de la aleación y obtener recubrimientos base zinc.

3.2. Reactivos empleados

En la Tabla 1 se listan los reactivos empleados para obtener cada una de las superficies indicadas en la Figura 8.

Tabla 1. Lista de reactivos empleados.

Fórmula Química	Nomenclatura	Descripción	Etapas del Proceso donde se emplea
H ₂ O	Agua Destilada	Grado reactivo, CTR Scientific	Grabado ácido / Oxidación superficial / Síntesis de recubrimientos
HCl	Ácido clorhídrico	37.4%, ACS, CAS No. 7647-01-0	Grabado ácido / Síntesis de recubrimientos
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico	96.3%, 37 N, ACS, CAS No. 7664-93-9	Grabado ácido / Oxidación superficial
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno	30%, ACS, CAS No. 7722-84-1	Oxidación superficial
ZnO	Óxido de Zinc	ACS, CAS No. 1314-13-2, Peso Molecular: 81.38 g/mol	Síntesis de recubrimientos
NaOH	Hidróxido de Sodio	10 M, ACS, CAS No. 1310-73-2	Síntesis de recubrimientos

3.3. Preparación inicial de muestras

En este trabajo se usaron muestras cilíndricas de la aleación Ti6Al4V ELI con un diámetro de 6.0 mm y un espesor de 3.0 mm. Las muestras fueron cortadas en un torno de micromecanizado con el propósito de que la superficie obtenida presente un acabado lo más similar posible a la de los implantes y prótesis maquinados en este tipo de equipos (véase Figura 9).

Luego de maquinadas, las muestras fueron sometidas a un proceso de lavado ultrasónico, con el fin de eliminar los residuos de lubricantes y aceites empleados durante el corte. Para este lavado, se empleó una solución de detergente Alconox (*Alconox Inc.*) al 2% (20 g de detergente por litro de agua) por 15 min en lavado ultrasónico a temperatura ambiente. Los residuos del detergente se eliminaron empleando chorro de agua, para finalmente enjuagar las muestras con agua destilada (grado reactivo, CTR Scientific) durante 5 min en lavado ultrasónico

(véase Figura 9). Una vez concluido el lavado, las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente.



Figura 9. Etapas obtener la superficie libre de zinc Z0.

Para eliminar los posibles contaminantes que quedaran en la superficie y obtener en ella una red de poros micrométricos, las muestras lavadas se fueron sumergidas en una solución ácida de HCl y H₂SO₄ al 67% con relación v/v 1:1. Para esta variante de grabado ácido, se expusieron las muestras a esta solución durante 15 min a 80°C (véase Figura 9). Posteriormente, se eliminó la solución y se enjuagaron las muestras^[88].

Luego del ataque químico, todas las muestras fueron sometidas a un proceso de oxidación superficial. Con este tratamiento, se activa la superficie de la aleación Ti6Al4V al crearse una capa de TiO₂. Para esto, las muestras se remojaron en una mezcla de H₂O₂ y H₂SO₄ en una relación v/v 1:1 a temperatura ambiente (~25°C) durante 2 h. Luego, se retiraron de la mezcla oxidante y se enjuagaron^[88]. Con este proceso de activación superficial se obtuvo la superficie de control denominada Z0 (véase Figura 8 y Figura 9).

3.4. Recubrimiento por inmersión en solución a base de ZnO

Para la obtención de los recubrimientos se empleó como sustrato muestras con la superficie libre de zinc. En la Tabla 2 se indican las proporciones de ZnO y HCl que se usaron para preparar las soluciones con las diferentes concentraciones de iones Zn²⁺, así como el nombre usado para identificar cada tipo de recubrimiento obtenido.

Tabla 2. Cantidad de ZnO y HCl empleada para preparar cada variante de solución (para 100 mL de solución).

Muestra de Superficie Activa	c(Zn ²⁺) (M)	ZnO (g)	HCl (mL)
Z1	0.1	0.8	1.6
Z2	0.3	2.4	5.0
Z3	0.5	4.0	8.3
Z4	1.0	8.0	16.6

Para preparar la solución que contiene zinc, se agregó en un vaso de precipitado la cantidad correspondiente de ZnO (véase Tabla 2 y Figura 10). Luego se añadió la cantidad indicada en la Tabla 2 de HCl y se mezclaron estos reactivos para obtener una solución acuosa de cloruro de zinc (ZnCl₂), de acuerdo con la siguiente reacción química $ZnO + HCl = ZnCl_2 + H_2O$.



Figura 10. Metodología para sintetizar los recubrimientos sobre la superficie libre de zinc.

Posteriormente, la solución fue colocada en un agitador magnético y se agregó el volumen de agua destilada requerido para completar 100 mL de solución bajo agitación fuerte (~600 rpm). Al completar la adición de agua y observarse que la solución es transparente y sin la presencia de ningún reactivo sólido, se redujo la agitación hasta aproximadamente 120 rpm. En este punto del proceso, el pH de la solución es aproximadamente 1 (Figura 10).

Luego las muestras con superficie Z0 se suspendieron en la solución y se comenzó a agregar NaOH_(ac) para aumentar el pH de la solución, hasta alcanzar el valor de aproximadamente 7 (Figura 10). Al comenzar a adicionar gotas de

NaOH, la solución se torna turbia y viscosa al formarse $Zn(OH)_2$ según la reacción química $ZnCl_2 + 2NaOH = Zn(OH)_2 + 2NaCl$.

Para la síntesis de los recubrimientos las muestras se dejaron suspendidas en esta mezcla durante 2 h. La agitación se mantuvo en ~ 120 rpm y el proceso se realizó a temperatura ambiente. Al transcurrir este tiempo, se extrajeron las muestras y se enjuagaron mediante inmersión en agua destilada para dejarse escurrir y secar suspendidas a temperatura ambiente.

Con el propósito de aumentar la adherencia del recubrimiento obtenido, y cristalizar las posibles fases amorfas, se realizó un tratamiento térmico. Para esto, las muestras se colocaron sobre su parte cilíndrica, dejando expuestas ambas caras y la mayor parte posible de la superficie.

Este proceso se hizo en una mufla sin control de atmósfera. Las muestras se colocaron mientras la mufla se encontraba a temperatura ambiente y posteriormente se aumentó la temperatura hasta alcanzar 125°C y se mantuvo esta temperatura durante 1 h. Luego, se aumentó la temperatura hasta 350°C y se mantuvo por 2 h. Subsecuentemente, la temperatura se incrementó a 500°C y se mantuvo por otros 30 min. Finalmente, las muestras se dejaron enfriar dentro de la mufla (Figura 10).

Luego de sintetizados los recubrimientos, estos fueron caracterizados como se describe en el siguiente epígrafe.

3.5. Caracterización de los recubrimientos obtenidos

Las características y propiedades evaluadas a los recubrimientos sintetizados se resumen en Figura 11. A continuación, se describe el procedimiento empleado, así como los parámetros de operación y consideraciones hechas en cada equipo o técnica de caracterización.

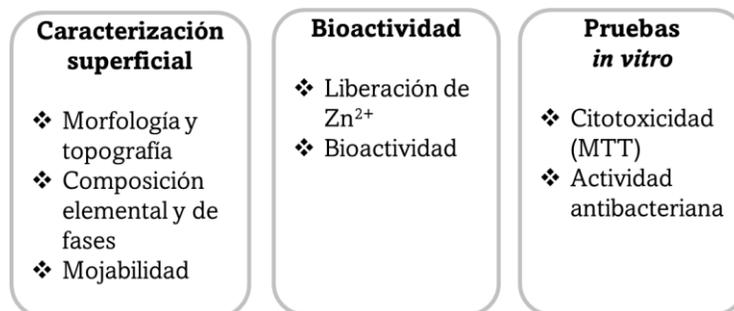


Figura 11. Características y propiedades evaluadas a los recubrimientos obtenidos.

3.5.1. Morfología y topografía

La caracterización morfológica de los recubrimientos obtenidos, así como de la superficie de control se realizó mediante el análisis de micrografías obtenidas en un Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo (*FESEM HITACHI SU8000*). Los parámetros de operación empleados fueron: voltaje de aceleración de 2.0 kV y 10 μ A de corriente

Por otra parte, para caracterizar la topografía de los recubrimientos obtenidos, se determinó la rugosidad media empleando un Rugosímetro de Contacto (*Mitutoyo 178-563-01A SJ-210, Portable Surface Roughness Tester, Retractable Type. Model: 178-563-01^a*).

3.5.2. Composición elemental

Para hacer un análisis de los elementos químicos presentes en las superficies se utilizó un detector de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS) acoplado a un Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo (*FESEM-Zeiss Sigma 300VP*). Para este estudio se usó un voltaje de aceleración de 20 kV y una corriente de 10 μ A. Además, se realizó un mapeo químico para determinar la distribución de los elementos presentes en las superficies caracterizadas.

3.5.3. Mojabilidad

La mojabilidad de los recubrimientos obtenidos se determinó mediante la técnica de la Gota en Reposo. Para esto, se utilizaron gotas de solución buffer fosfato salino (PBS1x, pH=7.4) y utilizó una cámara digital para tomar las imágenes de

las gotas sobre las superficies de las muestras. Las imágenes tomadas, fueron analizadas empleando el software de procesamiento de imágenes *ImageJ* para medir el ángulo de contacto entre la tangente dibujada en la gota y la superficie de la muestra.

Se utilizaron cinco muestras por cada superficie evaluada y gotas de aproximadamente 15 μl de PBS. El ángulo de contacto reportado fue el valor medio de un total de 10 mediciones por muestra. Las pruebas fueron realizadas a temperatura y humedad ambiente ($\sim 50\%$ de humedad relativa, $\sim 25^\circ\text{C}$).

3.5.4. Cantidad de Zn^{2+} liberado al medio fisiológico

Para medir la cantidad de iones Zn^{2+} que se libera de cada uno de los recubrimientos obtenidos, las muestras fueron sumergidas en 50 mL de solución buffer fosfato salino (PBS1x, $\text{pH}=7.4$) colocados en tubos de polipropileno estériles y se incubaron a 37°C .

A los 1, 3 y 7 días desde el inicio de la prueba, la solución de PBS fue reemplazada por solución fresca y en esos intervalos de tiempo se midió la concentración de iones Zn^{2+} empleando la técnica de Espectrometría de Absorción Atómica (AAS, *Thermo Scientific™ iCETM 3000*) controlada por software SOLAAR.

Para realizar las mediciones por absorción atómica, se empleó una línea de emisión de 213.9 nm y un límite de detección de 0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.001 ppm). Con los valores obtenidos en cada medición se hizo una curva acumulativa para cada uno de los recubrimientos evaluados. Los resultados mostrados corresponden al promedio de 5 muestras por cada recubrimiento estudiado, para cada uno de los intervalos de tiempo medidos (1, 3 y 7 días).

3.5.5. Bioactividad

La bioactividad puede explicarse como la capacidad de los materiales de estimular la formación de hueso^[95]. Para evaluar la bioactividad de los recubrimientos obtenidos se realizó un estudio siguiendo las indicaciones de la

norma *ISO 23317 Implants for surgery — In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials*.

Para realizar el ensayo de bioactividad se empleó un Fluido Biológico Simulado (SBF). El orden y la cantidad de reactivos empleados para preparar el SBF se indican la norma *ISO 23317*.

Las muestras fueron sumergidas en 12 mL de SBF en reposo y se incubaron por 4 semanas a 36.5°C. Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se retiraron del SBF y fueron enjuagadas con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la observación y análisis químico mediante Microscopía Electrónica de Barrido y Espectroscopía de Energía Dispersiva de Rayos X, respectivamente, para comprobar la formación de la capa de apatita sobre las superficies evaluadas.

3.5.6. Viabilidad celular

La viabilidad celular, cuando las células se encuentran expuestas a agentes externos, puede interpretarse mediante un estudio de la citotoxicidad que causa el material extraño a las células. La citotoxicidad del material provoca modificaciones en las funciones básicas de las células que pueden ser identificadas.

El Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil) - 2,5 difeniltetrazólico (MTT) es un compuesto químico que, cuando se pone en contacto con las células, es absorbido por estas. Posteriormente, la enzima succínico-deshidrogenasa presente en las mitocondrias celulares reducen este compuesto a su forma insoluble denominada formazán. Esta actividad mitocondrial representa un indicador del adecuado funcionamiento de las mitocondrias celulares y puede ser interpretado como una medida de la viabilidad celular.

La norma *ISO 10993-5 Biological Evaluation of Medical Devices, Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity*, en su Anexo C, describe una metodología para evaluar la citotoxicidad celular de los biomateriales, empleando el método de reducción del MTT. Esta metodología se empleó para evaluar la toxicidad celular inducida por

los iones Zn^{2+} liberados al medio fisiológico, desde cada uno de los recubrimientos obtenidos.

La citotoxicidad de los recubrimientos obtenidos se evaluó en presencia de Fibroblastos Gingivales Primarios (*HGF- Primary Gingival Fibroblast, ATCC® PCS-201-108 TM*). Para esto, se preparó una suspensión de aproximadamente 40000 células/mL de *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)*.

Se empleó una placa Petri de 24 pozos, en la cual se colocó 1 mL de la suspensión celular y se incubó por 24 h a 37°C y 5% de CO_2 en una incubadora (*Thermo Scientific Series 8000WJ Incubator*). Posteriormente, una vez que las células se encontraban adheridas al fondo de la placa, se colocaron las muestras recubiertas. Para este estudio se utilizó como control positivo 100µL de FBS y como control negativo 300 µL de Tritón al 5 %. Luego, las muestras y los controles se dejaron incubar durante 48 horas en las mismas condiciones indicadas previamente.

Al transcurrir las 48 horas de incubación se realizó la colorimétrica. Para esto, se retiraron el medio y el material estudiado de los pozos de la placa Petri y se agregó 200 µL de medio de cultivo fresco y 60 µL de MTT por pozo.

Se incubaron las placas por 4 h, protegiéndolas de la luz, para facilitar la formación de los cristales de formazán. Luego, se retiró la solución de MTT y se solubilizaron los cristales de formazán en una incubadora orbital (*Orbital Incubator Prendo INO-650M*) durante 15 min a temperatura ambiente.

Para realizar la prueba colorimétrica se empleó un lector de microplacas (*IMark™ Microplate Absorbance Reader - Bio-RAD*) con 595 nm de longitud de onda para medir los cambios de absorbancia.

Los valores de absorbancia medidos se emplearon para determinar el porcentaje (%) de células viables o vivas según la Ec. 1:

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{(D.O \text{ de células tratadas})}{(D.O \text{ de células control negativo})} \times 100 \% \quad \text{Ec. 1}$$

Donde: D.O = Densidad Óptica

3.5.7. Actividad antibacteriana

El método de difusión en agar es una prueba relativamente rápida y fácil de realizar para determinar la actividad antibacteriana. Para este estudio, se usaron *Escherichia Coli* (ATCC® 43895) y *Estafilococos Aureus* (ATCC® 33592). Las suspensiones de cada una de las bacterias fueron cultivadas en medio BHI y posteriormente se dispersaron sobre la superficie de placas de agar.

Las muestras fueron colocadas en las placas de agar nutritivo previamente inoculadas permitiendo el contacto de las superficies estudiadas con las células bacterianas. Posteriormente, las placas se incubaron por 24 h a 37°C para analizar la zona de inhibición.

La zona de inhibición es el área en la que se detiene o previene el crecimiento bacteriano debido al efecto bacteriostático del material, midiendo poder inhibidor de este hacia un microorganismo en particular. El tamaño de la zona o halo de inhibición bacteriana para cada superficie se determinó empleando la Ec. 2:

$$\text{Zona de inhibición} = \left[\frac{(DZI) - (DM)}{2} \right] \quad \text{Ec. 2}$$

Donde:

- DZI: diámetro exterior de la zona de inhibición
- DM: diámetro del disco

Este ensayo se realizó por triplicado y los resultados reportados corresponden al promedio de 5 mediciones realizadas para cada muestra, empleando el software de procesamiento de imágenes *ImageJ*.

3.5.8. Análisis estadístico

La influencia de la concentración de iones Zn^{2+} empleada para preparar la solución precursora de los recubrimientos sobre las diferentes propiedades de los recubrimientos obtenidos fue analizada mediante una prueba estadística de Análisis de Varianza en Minitab® versión 19.2.

Se empleó un $p < 0.05$ para determinar las diferencias estadísticamente significativas. Se realizó ANOVA de un solo factor y pruebas de comparación de Tukey. Todos los experimentos se realizaron, como mínimo, por triplicado y los datos se expresan como media \pm desviación estándar.

Capítulo 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se realiza una descripción y discusión de la morfología, topografía, composición, mojabilidad, cantidad de zinc liberada al medio fisiológico, bioactividad, citotoxicidad y actividad antibacteriana de cada una de las superficies y recubrimientos obtenidas durante el desarrollo experimental de esta investigación.

4.1. Caracterización del sustrato

Para la realización de este trabajo se emplearon muestras de Ti6Al4V cortadas en torno de micromecanizado. En la Figura 12 se presenta una micrografía de *FESEM*, donde se puede observar en esta superficie la presencia de líneas correspondientes a la interacción de las herramientas de corte con el material. En esta superficie se obtuvo valores de rugosidad superficial media (R_a) de $0.57 \pm 0.17 \mu\text{m}$.

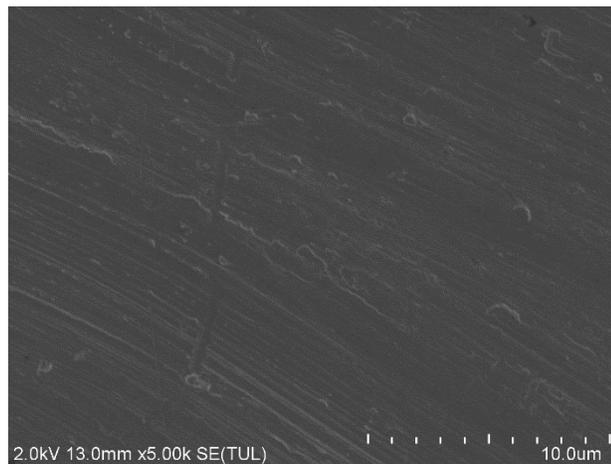


Figura 12. Superficie de la aleación Ti6Al4V cortada en torno de micromecanizado.

Para comprobar los elementos químicos constituyentes del material base, se realizó un análisis por *EDS* de las muestras cortadas, el cual se presenta en la Figura 13. Se puede observar la presencia de los picos correspondientes al Titanio, Aluminio y Vanadio, propios de la aleación base.

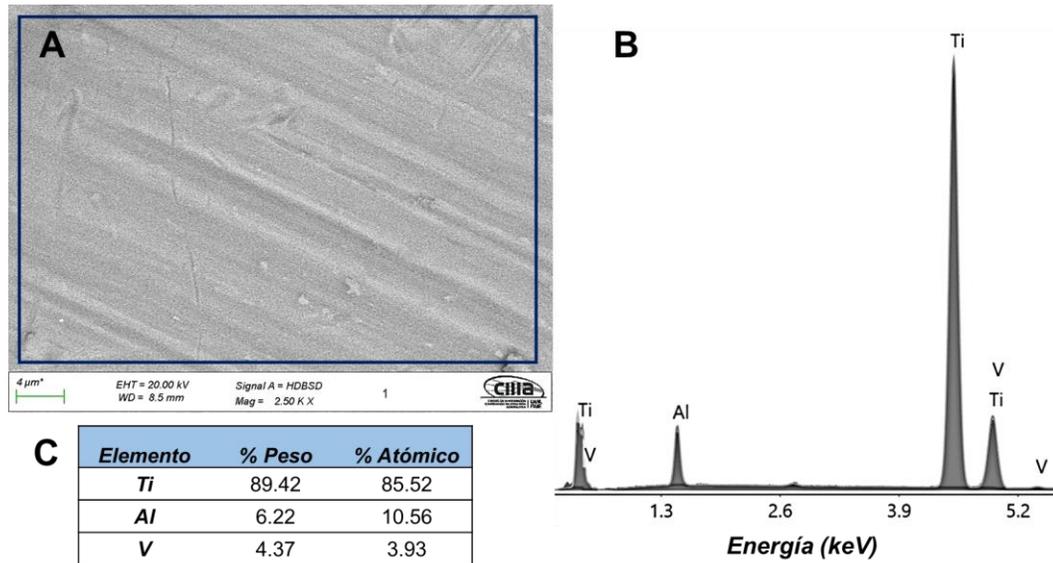


Figura 13. Composición elemental de la superficie de la aleación Ti6Al4V después del corte. A-Microscopía Electrónica de Barrido obtenida por electrones retrodispersados, B- Espectro EDS y C- Composición elemental obtenida por EDS.

4.2. Caracterización de la superficie de control (Z0)

El proceso de grabado ácido elimina de la superficie del material los óxidos nativos e impurezas que pudieran haberse generado durante las etapas previas. En esta superficie (véase Figura 14) no se observaron las rayas generadas presentes en las muestras cortadas. La superficie obtenida posterior al grabado ácido se caracteriza por la presencia de pozos o cavidades micrométricas con bordes muy agudos. Esta superficie tiene una rugosidad media de $0.99 \pm 0.21 \mu\text{m}$; y en su espectro de *EDS* se pueden observar los picos correspondientes a la aleación base (véase Figura 15). Esta morfología ha sido reportada por varios autores, al emplearse tratamientos de grabado ácido similares sobre esta aleación, de acuerdo con la revisión bibliográfica publicada por Souza, J.C.M. y colaboradores en el año 2019^[7].

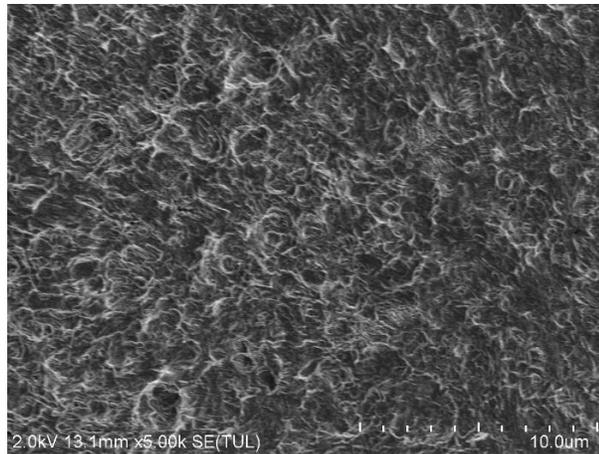


Figura 14. Morfología de la superficie de la aleación Ti6Al4V sometida a grabado ácido.

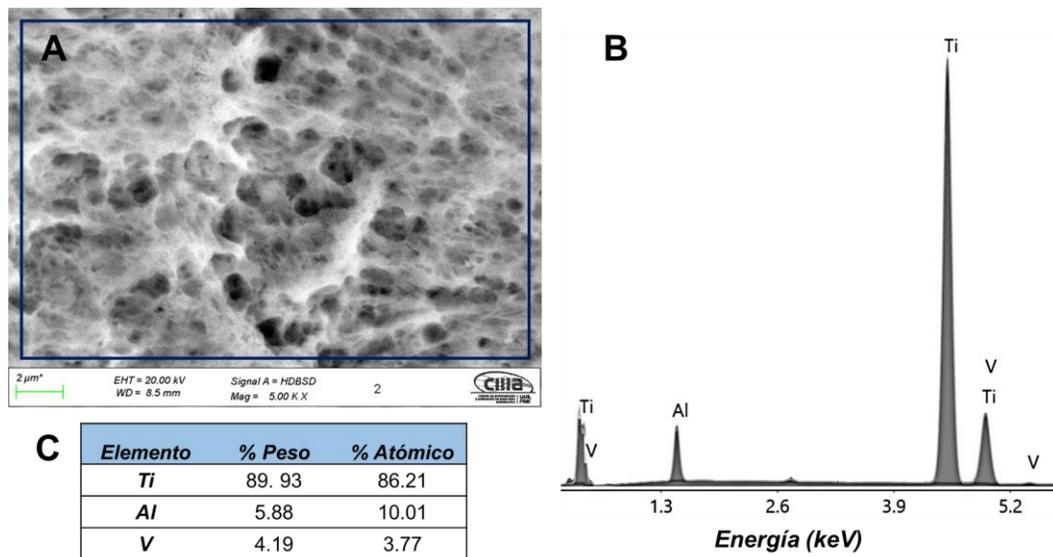


Figura 15. Composición elemental de la superficie de la aleación Ti6Al4V sometida a grabado ácido. A- Microscopía Electrónica de Barrido obtenida por electrones retrodispersados, B- Espectro EDS y C- Composición elemental obtenida por EDS.

Posterior al tratamiento de grabado ácido, las muestras se sumergieron en solución de peróxido de hidrógeno y ácido sulfúrico para obtener la superficie de control, libre de zinc (Superficie Z0). Con este tratamiento se obtiene una capa de óxido con una morfología caracterizada por la presencia de cavidades micrométricas irregulares provenientes del grabado ácido con bordes suavizados (véase Figura 16). Además, esta se caracteriza por la ausencia de microgrietas,

lo cual es común en superficies sometidas a otras variantes de tratamiento con peróxido de hidrógeno.

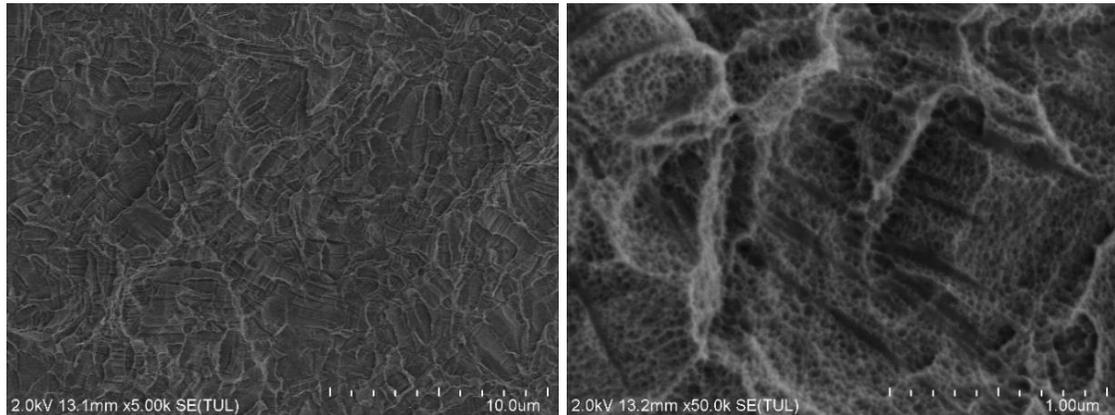


Figura 16. Micrografías obtenidas por FESEM de la superficie Z0 a diferentes magnificaciones (x5k a la izquierda y x50k a la derecha).

Por otro lado, en el interior de las cavidades micrométricas, puede observarse la formación de poros nanométricos señalados en la Figura 16. Esta superficie tiene una rugosidad media de $0.93 \pm 0.12 \mu\text{m}$ y en su composición elemental están presentes los elementos constituyentes de la aleación Ti6Al4V, además, puede observarse la presencia de oxígeno (véase Figura 17 y Figura 18) debido a la formación de la capa de óxido de titanio que caracteriza las superficies obtenidas por tratamientos que contienen peróxido de hidrógeno.

La presencia de estos grupos hidroxilo que se forman con este tratamiento en la superficie facilita la formación del recubrimiento en una etapa posterior del proceso según reporta Trino, L.D. y colaboradores^[20].

4.3. Caracterización de los recubrimientos obtenidos

La superficie libre de zinc (Z0) se empleó como sustrato para la obtención de recubrimientos base zinc; para lo cual, las muestras fueron sumergidas en soluciones con diferentes concentraciones de Zn^{2+} , obteniéndose las superficies recubiertas Z1, Z2, Z3 y Z4 para 0.1 M, 0.3 M, 0.5 M y 1 M de Zn^{2+} respectivamente. La caracterización de estos recubrimientos se describe a continuación.

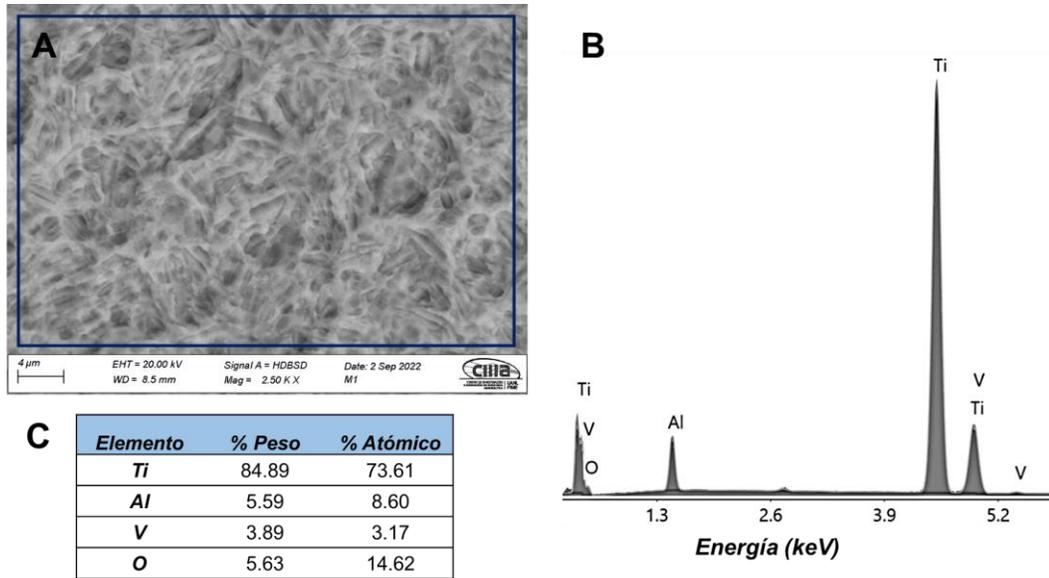


Figura 17. Composición elemental de la superficie Z0. A-Microscopía Electrónica de Barrido obtenida por electrones retrodispersados, B- Espectro EDS y C- Composición elemental obtenida por EDS.

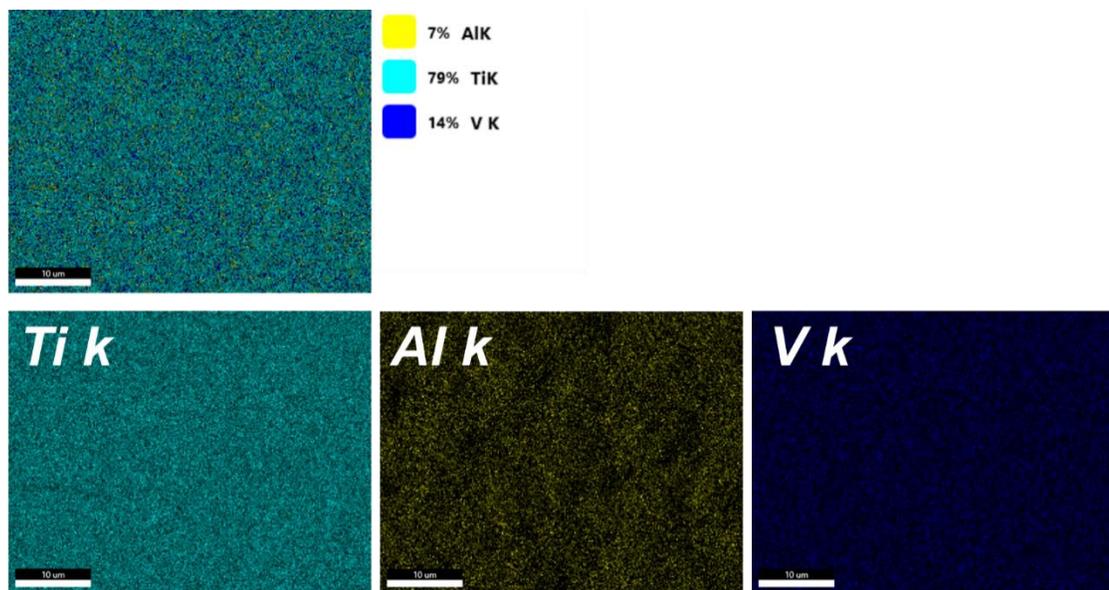


Figura 18. Mapeo químico de la superficie Z0.

4.3.1. Morfología y topografía

En la Figura 19 se muestran las micrografías de FESEM a diferentes magnificaciones para cada uno de los recubrimientos obtenidos. Como se observa, el método de inmersión permite la obtención de recubrimientos que se distribuyen sobre toda la superficie de las muestras, mostrándose un cambio

significativo en la morfología de estas al compararlas con la superficie Z0 (véase Figura 16).

Como puede apreciarse en la Figura 19, la concentración de iones Zn^{2+} en la solución para la síntesis de los recubrimientos provoca variaciones en la morfología de las superficies obtenidas. Para las superficies obtenidas por inmersión en soluciones con bajos contenidos de zinc (Z1 y Z2), los recubrimientos obtenidos forman ramificaciones abultadas. Esta morfología cambia a estructuras en forma de placas o rosetas hexagonales que se apilan unas sobre otras, para los recubrimientos sintetizados a partir de soluciones con mayores contenidos de zinc (Z3 y Z4). Para todos los casos, la superficie se caracteriza por la formación de estructuras muy porosas, con diferentes morfologías y que presentan diferentes tamaños y distribución a lo largo de la superficie recubierta.

La porosidad de estas superficies podría beneficiar la adhesión de las células debido a que, como se reporta en la literatura, las células tienden a adherirse y proliferar de forma más fácil sobre superficies porosas que funcionen como andamios que dan forma a la matriz extracelular^[2]. Lo anterior significa que la rugosidad superficial presenta gran influencia en la oseointegración de los implantes y prótesis fabricados de Ti6Al4V para aplicaciones en contacto con el tejido óseo. Por esto, la rugosidad superficial ha sido motivo de estudio para múltiples investigadores, los cuales intentan mejorar el éxito clínico de este tipo de dispositivos a largo plazo. Varias de estas investigaciones evidencian que cuando se obtienen superficies moderadamente rugosas, se produce una mejor oseointegración, al compararse con otras superficies lisas o incluso con superficies de muy alta rugosidad^[2, 9, 14, 37, 40].

Al medir la rugosidad de las superficies recubiertas, puede observarse una disminución en el valor de Ra con respecto a la superficie sin zinc Z0 (véase Figura 20), excepto para la superficie Z3, para la que se obtuvo un valor de rugosidad media de $1.04 \pm 0.12 \mu m$, presentando un ligero aumento de este parámetro.

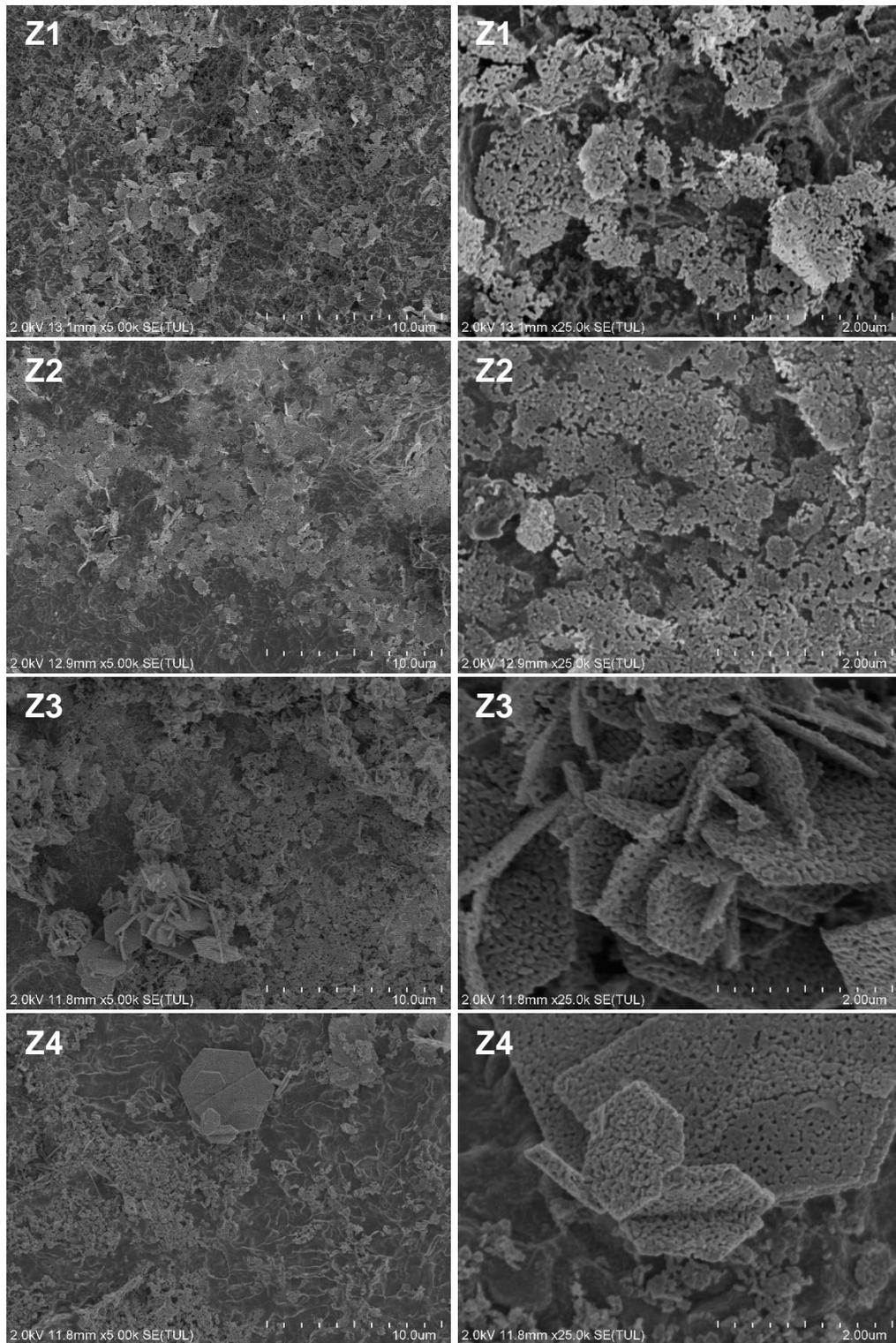


Figura 19. Micrografías obtenidas por FESEM de las superficies Z1, Z2, Z3 y Z4, de arriba hacia abajo, a diferentes magnificaciones (x5k a la izquierda y x25k a la derecha).

La menor rugosidad media se obtuvo para la superficie Z2 con un valor de Ra de $0.69 \pm 0.09 \mu\text{m}$. Como puede apreciarse en la Figura 20, al comparar la rugosidad de las superficies recubiertas con la superficie de control Z0, solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la superficie Z2. La mencionada superficie Z2, a su vez, presenta diferencias estadísticamente significativas con las superficies Z3 y Z4. Puede observarse, además, que no hay una relación directa entre la cantidad de zinc presentes en los recubrimientos y la rugosidad de los mismos.

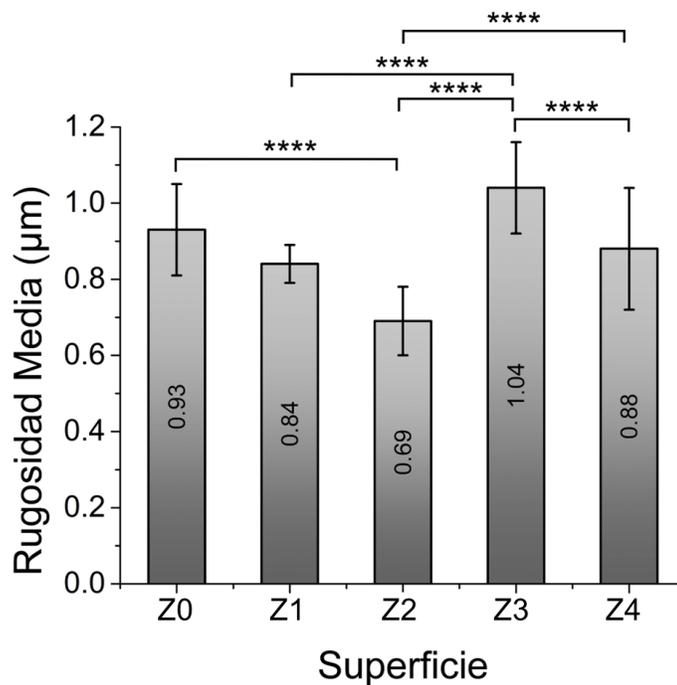


Figura 20. Rugosidad superficial media (Ra) de cada una de las superficies recubiertas. **** diferencia estadísticamente significativa.

La rugosidad en la escala micrométrica es uno de los parámetros que mayor influencia presenta sobre la oseointegración de implantes y prótesis de titanio. Algunos estudios demuestran que los valores de rugosidad moderados ($1.0 \pm 0.2 \mu\text{m}$) son los óptimos para que se desarrollen adecuadamente los procesos de adhesión y proliferación celular. Tomando en consideración esto, los valores de rugosidad obtenidos en las superficies recubiertas analizadas no deben afectar la migración celular, de acuerdo con lo planteado por Andrukhov, O. y colaboradores en el 2016^[40].

4.3.2. Composición elemental

Las Figuras 21 a la 28 muestran la composición química obtenida mediante *EDS* para cada superficie recubierta, así como el mapeo químico correspondiente a estas. El análisis semicuantitativo obtenido por *EDS* muestra los picos fundamentales correspondientes a la aleación Ti6Al4V y la presencia de oxígeno y zinc como se puede apreciarse en Figura 21, Figura 23, Figura 25 y Figura 27, donde se muestra la composición química elemental de cada superficie recubierta y en la Figura 22, Figura 24, Figura 26 y Figura 28, donde se muestra el mapeo químico de estas superficies, evidenciándose que en ninguna de las superficies recubiertas se observó presencia de sodio. Además, se realizó un microanálisis elemental puntual sobre las estructuras ramificadas descritas anteriormente, observándose un elevado contenido de zinc y oxígeno (Figura 29).

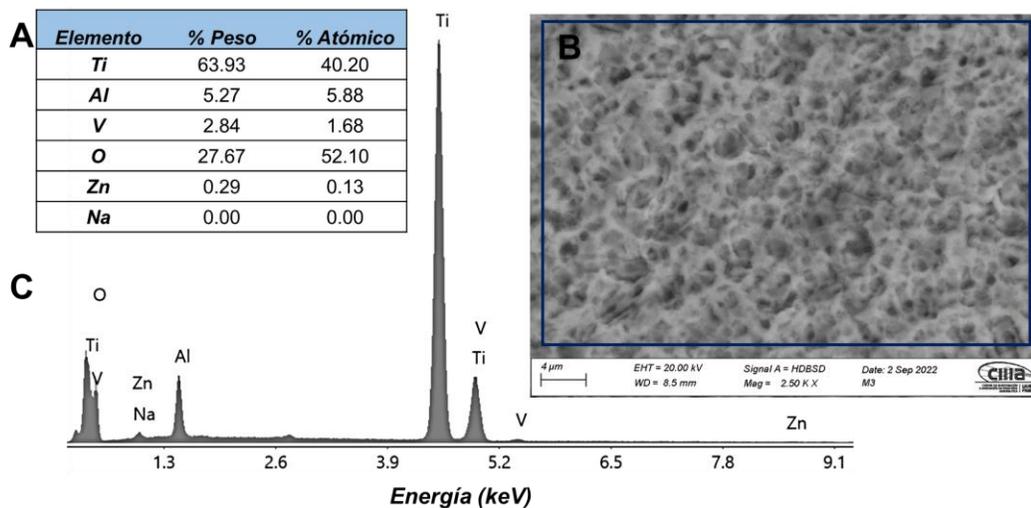


Figura 21. Composición elemental de la superficie Z1. A- Composición elemental obtenida por *EDS*, B- Microscopía Electrónica de Barrido obtenida por electrones retrodispersados y C- Espectro *EDS*.

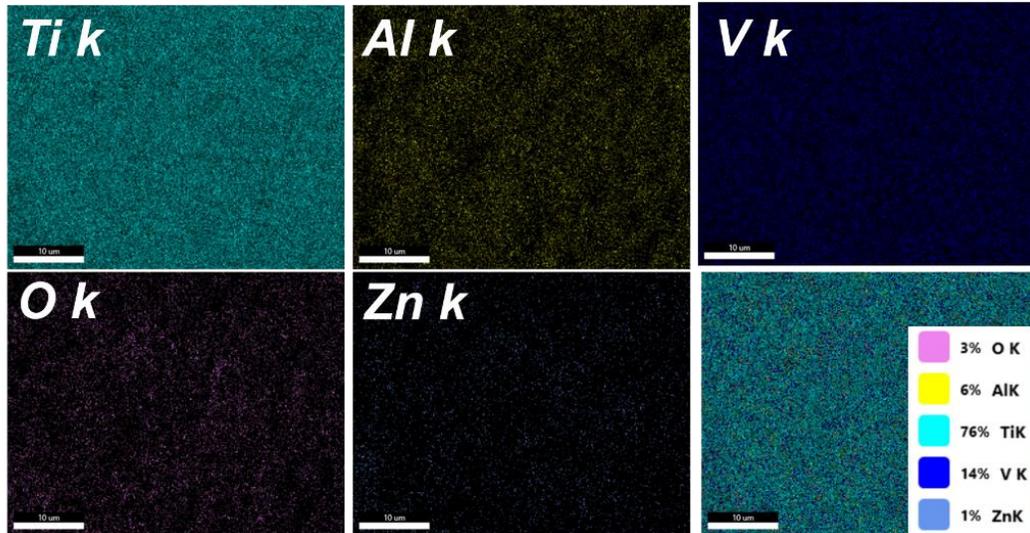


Figura 22. Mapeo químico de la superficie Z1.

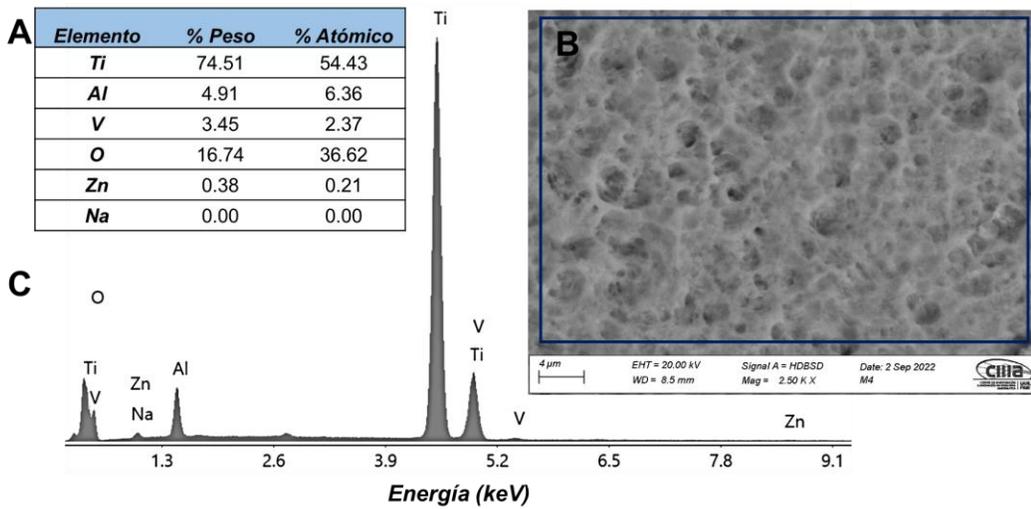


Figura 23. Composición elemental de la superficie Z2. A- Composición elemental obtenida por EDS, B- Microscopía Electrónica de Barrido obtenida por electrones retrodispersados y C- Espectro EDS.

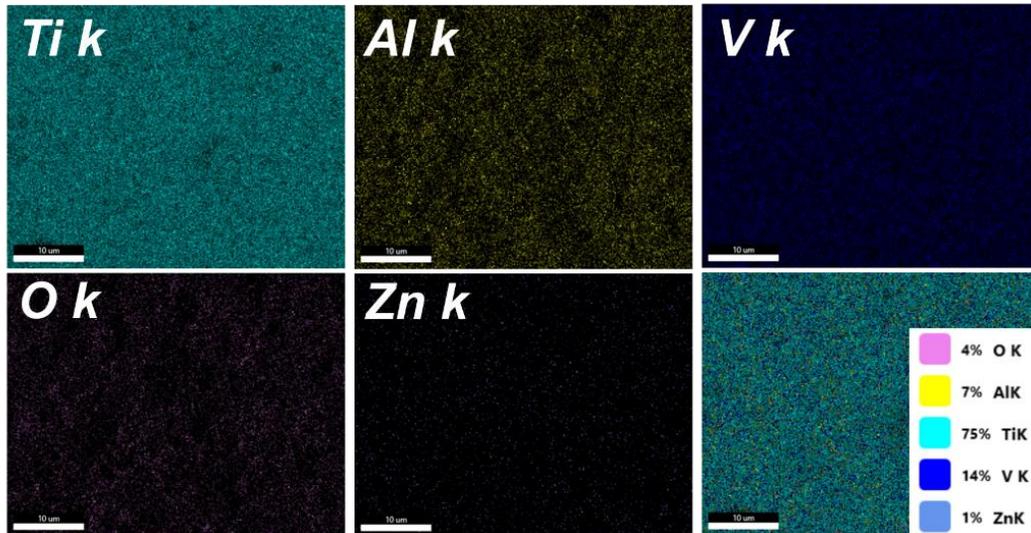


Figura 24. Mapeo químico de la superficie Z2.

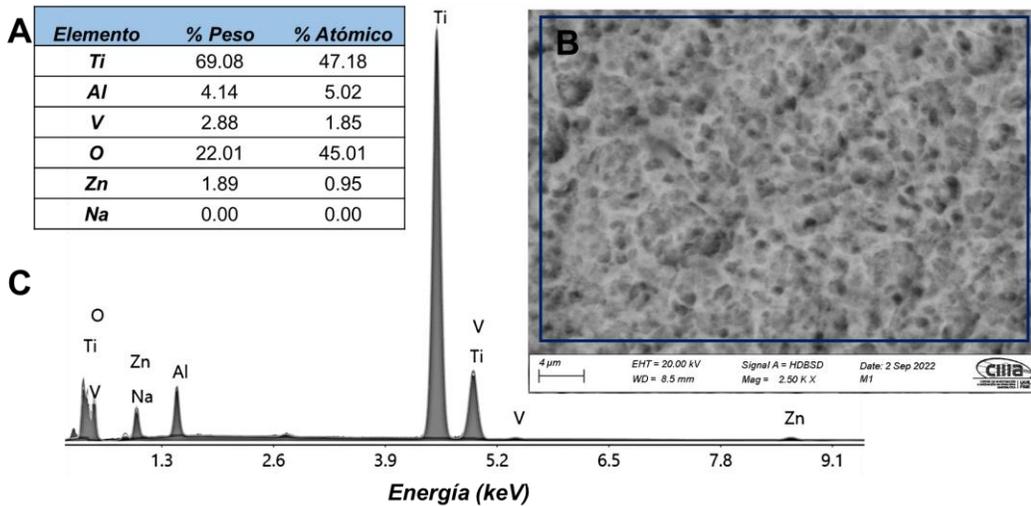


Figura 25. Composición elemental de la superficie Z3. A- Composición elemental obtenida por EDS, B- Microscopía Electrónica de Barrido obtenida por electrones retrodispersados y C- Espectro EDS.

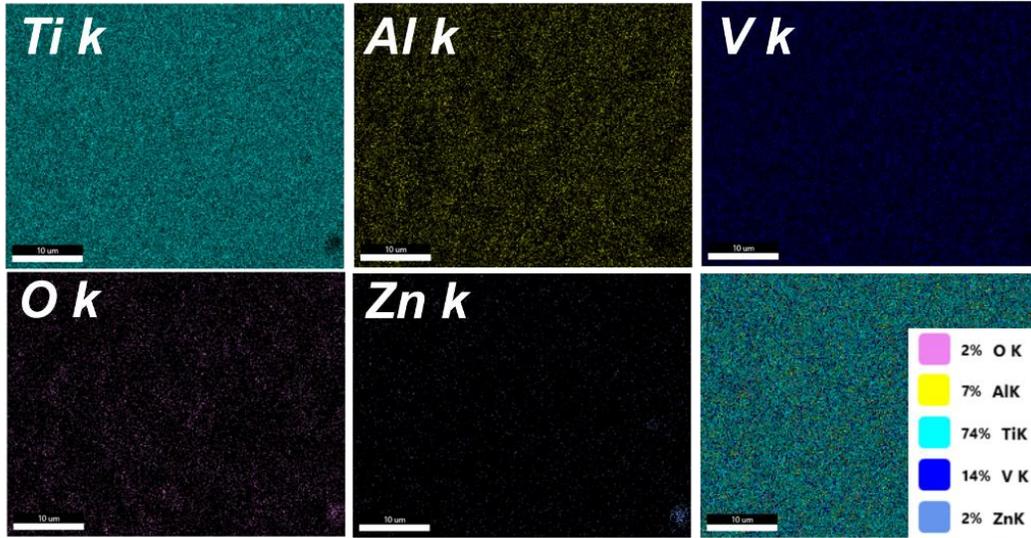


Figura 26. Mapeo químico de la superficie Z3.

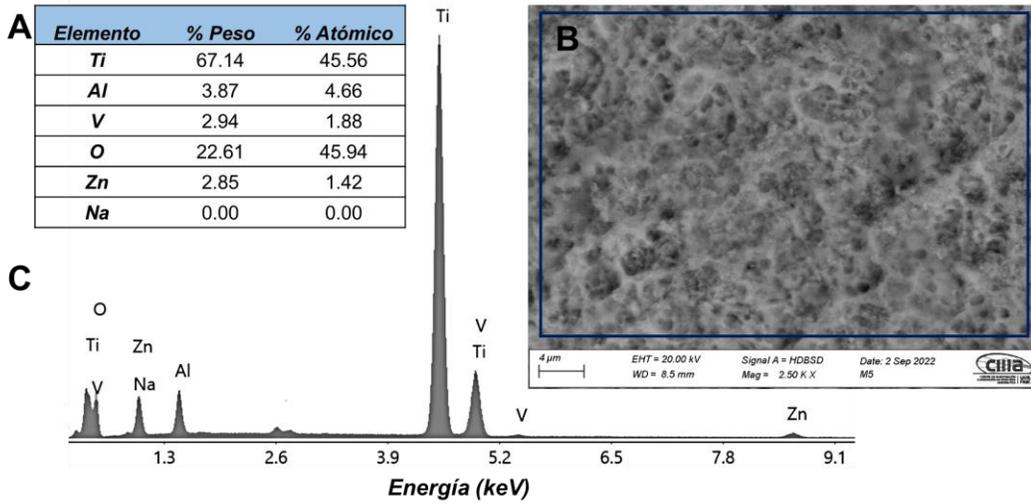


Figura 27. Composición elemental de la superficie Z4. A- Composición elemental obtenida por EDS, B- Microscopía Electrónica de Barrido obtenida por electrones retrodispersados y C- Espectro EDS.

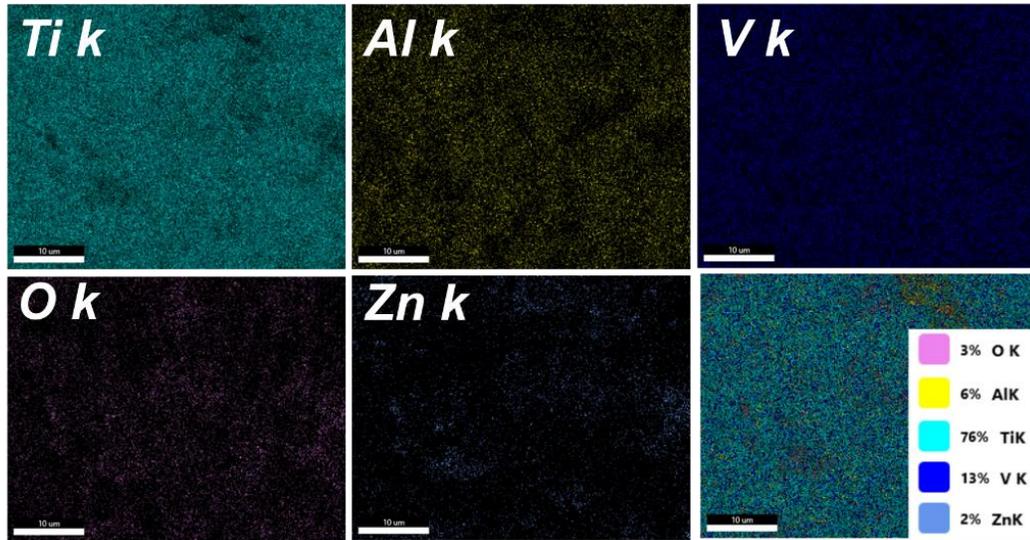


Figura 28. Mapeo químico de la superficie Z4.

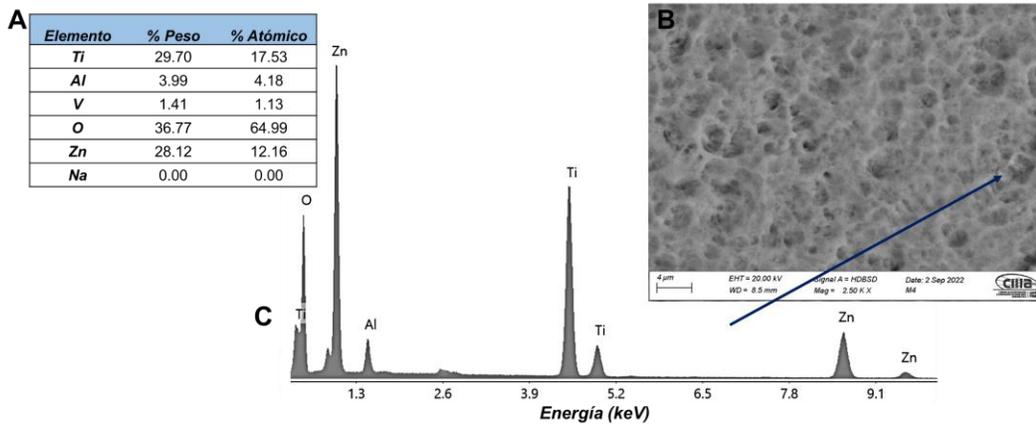


Figura 29. Composición elemental de placa con morfología hexagonal formada en la superficie Z3. A- Composición elemental puntual obtenida por EDS, B- Microscopía Electrónica de Barrido obtenida por electrones retrodispersados y C- Espectro EDS puntual.

El elevado contenido de zinc y oxígeno de las estructuras formadas en las superficies recubiertas podría indicar que el recubrimiento obtenido está formado por ZnO, el cual es un candidato prometedor como agente antibactericida. Además, el ZnO presenta alta durabilidad, baja toxicidad y alta estabilidad, a la vez que mejora la viabilidad celular y facilita la diferenciación en una línea osteoblástica^[8].

4.3.3. Mojabilidad

La caracterización del ángulo de contacto con PBS ha sido empleado como un método simple para analizar la hidrofobicidad de las superficies. Los resultados de las mediciones de los ángulos de contacto de las superficies recubiertas y la superficie de control (Figura 30). En todos los casos las superficies pueden ser incluidas en la categoría de superficies hidrofílicas, al presentar ángulos de contacto inferiores a los 90°. Sin embargo, todas exhibieron un comportamiento con tendencia hidrofóbica (ángulos menores a 90° pero mayores a 60°) como es característico de las superficies de óxido de zinc.

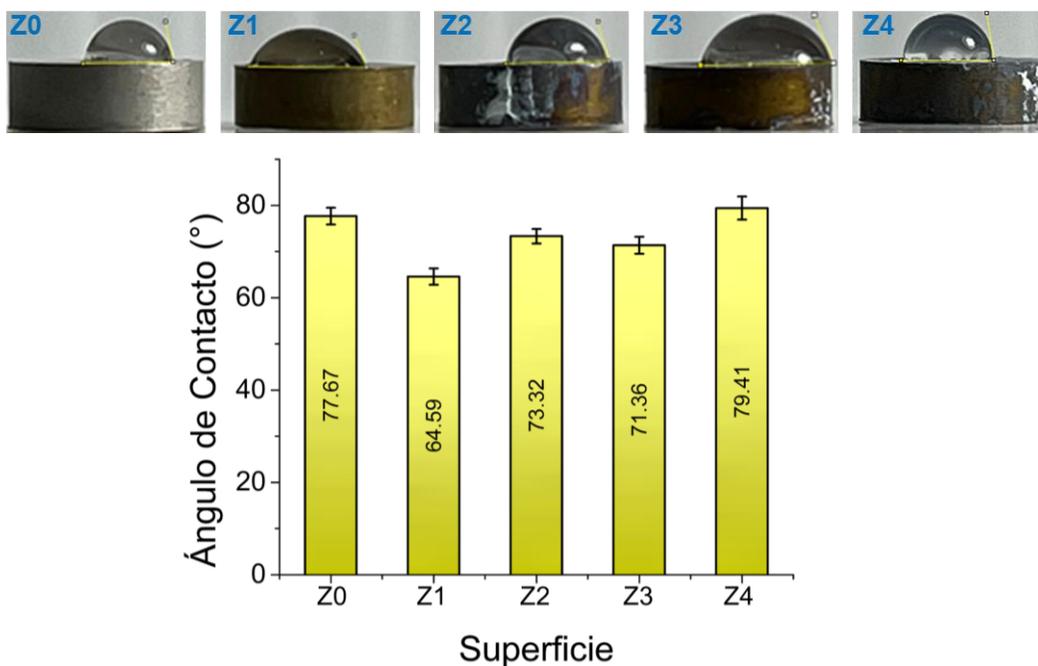


Figura 30. Ángulo de contacto de las superficies recubiertas.

El menor valor de ángulo de contacto se presentó para la superficie Z1 y el mayor para la superficie Z4 con valores de 64.59 ° y 79.41 ° respectivamente. Estos resultados son similares a los obtenidos por Trino, L.D. y colaboradores para superficies recubiertas con capas delgadas de ZnO donde se obtuvo ángulos de contacto de 81 °^[20].

Se ha reportado la marcada influencia de la hidrofiliicidad en la interacción de la superficie con las células^[4]. Las superficies hidrofílicas facilitan la interacción con

los fluidos biológicos por lo que las proteínas y células pueden adherirse con mayor facilidad a la superficie de los dispositivos una vez implantados. Por otro lado, las superficies hidrofóbicas pueden mejorar la eficiencia bactericida de las superficies^[20].

Teniendo en cuenta el planteamiento anterior, los valores de mojabilidad obtenidos podrían considerarse adecuados, tomando en consideración la doble funcionalidad esperada de los recubrimientos obtenidos, los cuales deben facilitar los procesos de adhesión y proliferación celular y a su vez, prevenir la contaminación bacteriana de la superficie.

4.3.4. Cantidad de Zn²⁺ liberado al medio fisiológico

La cantidad de iones Zn²⁺ que se liberen del recubrimiento al medio fisiológico, una vez que se coloque el dispositivo influye significativamente en la mineralización de tejido óseo que se forme como consecuencia del proceso de oseointegración. Por otro lado, el Zn²⁺ liberado garantiza las propiedades antibacterianas y con este, minimiza las causas de fracaso de la implantación.

Por lo anterior, este parámetro debe monitorearse cuidadosamente cuando se desarrollan técnicas de fabricación de recubrimientos para este tipo de dispositivos. En diferentes estudios se reportan las cantidades de este ion que se liberan al medio fisiológico, sin embargo, no existe un consenso en la comunidad científica alrededor de la cantidad óptima permisible a liberarse para evitar la toxicidad celular^[22].

En la Figura 31 se muestran las curvas de liberación de Zn²⁺, generadas por cada una de las superficies recubiertas a 7 días de observación. Como puede observarse, todos los perfiles acumulativos exhiben un comportamiento similar en cuanto a la tendencia de liberación. Al aumentar el tiempo de exposición a la solución PBS, se observa un incremento en la cantidad de Zn²⁺ liberado y este parámetro muestra una relación directa con la concentración de zinc de la solución empleada para la obtención de los recubrimientos.

Al transcurrir los 7 días de exposición se alcanzaron acumulados de iones Zn^{2+} en el medio fisiológico inferiores a los $0.4 \mu\text{g/mL}$ (0.4 ppm). Estos valores no deberían provocar toxicidad celular, aunque no existe un consenso en la comunidad científica respecto a la cantidad de zinc ideal a liberarse al medio fisiológico. Song y colaboradores informaron un valor de 10 ppm de concentración inhibitoria media máxima de iones Zn^{2+} [61]. Por otra parte, Ito y colaboradores demostraron que 3 ppm de Zn^{2+} no era citotóxico en un estudio *in vitro* realizado [93]. Sin embargo, otros estudios confirmaron que la concentración más alta de iones Zn^{2+} sin toxicidad celular fue de 2 ppm [94].

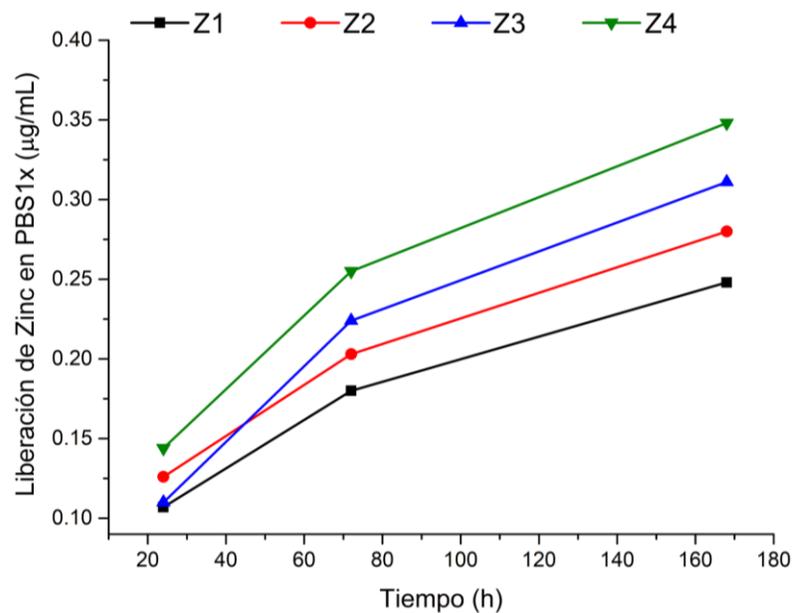


Figura 31. Perfil de liberación de Zn^{2+} en 50mL de PBS1x .

4.3.5. Bioactividad

La bioactividad de los recubrimientos obtenidos se determinó evaluando su habilidad para inducir la precipitación de hidroxiapatita al sumergir el material en un *SBF* por 28 días. Las superficies recubiertas se compararon con la superficie $Z0$. Posterior al tiempo de inmersión de las muestras en el *SBF*, estas fueron extraídas y observadas por *FESEM* y su composición química fue evaluada por *EDS* (Figura 32).

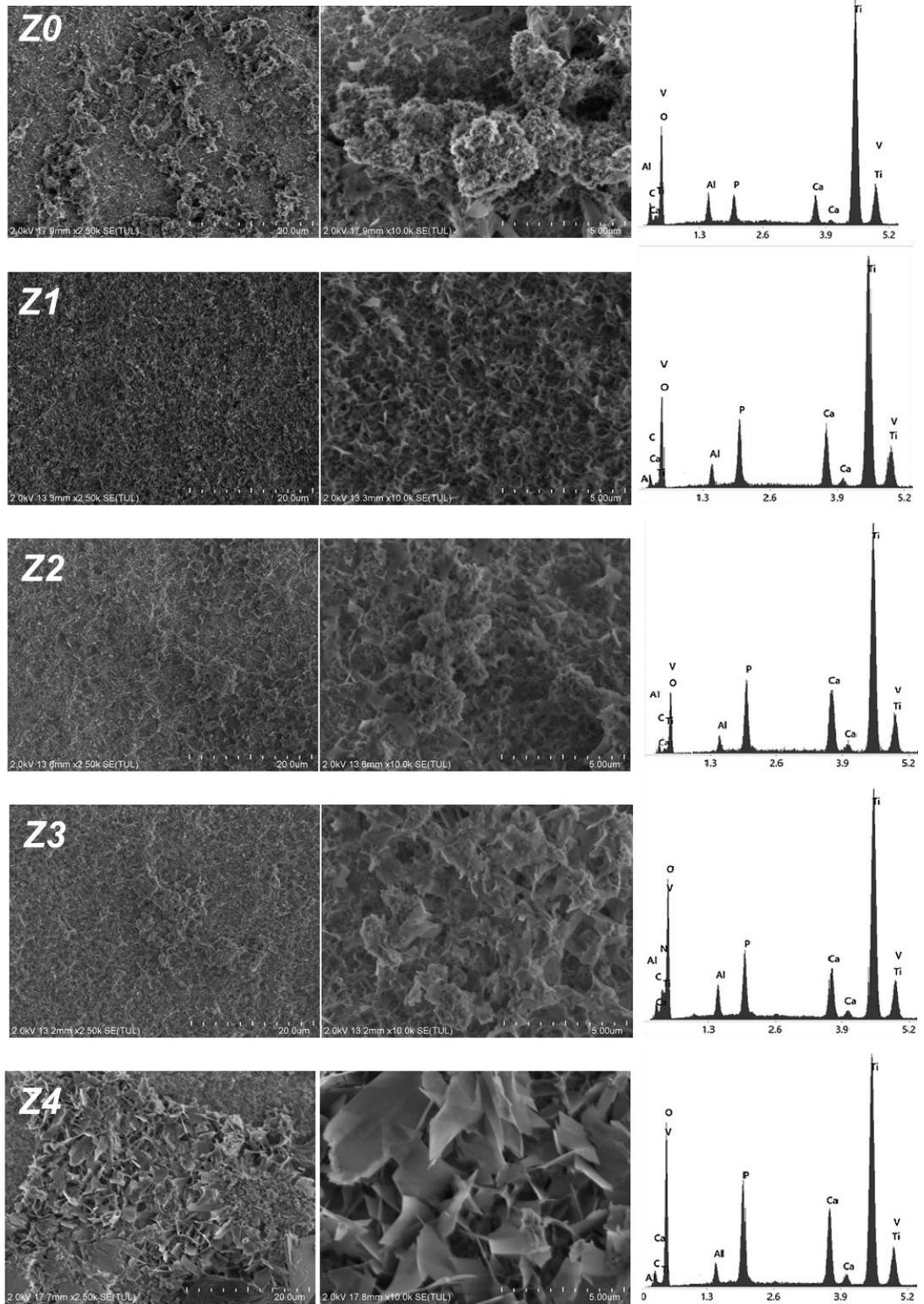


Figura 32. Morfología y composición química obtenida por EDS de las superficies recubiertas después de la inmersión en SBF por 28 días.

Estudiar la capacidad de precipitación de apatitas óseas en *SBF* es una forma eficiente para determinar la bioactividad *in vitro* de los biomateriales. En general, se acepta que los ensayos en *SBF* pueden ser útiles para evaluar la capacidad que tiene el material que se estudia de facilitar la composición mineral del hueso humano.

Como puede observarse en la Figura 32, se formó en todas las superficies una capa donde se evidencia la precipitación de estructuras con morfologías típicas de la hidroxiapatita, principalmente en las superficies recubiertas con las mayores concentraciones de zinc (Z3 y Z4)^[95]. La presencia de compuestos de Ca-P se comprobó mediante *EDS*. En la Figura 32, en todos los casos, se evidencia la presencia de Ca y P, lo que constituye un indicio de la bioactividad de los recubrimientos obtenidos, como lo indica la norma *ISO 23317*. Estos resultados indican la capacidad de los recubrimientos obtenidos para inducir la nucleación y crecimiento de HA en la superficie de la aleación Ti6Al4V, y por consiguiente, de facilitar la formación de hueso nuevo.

4.3.6. Viabilidad celular

La viabilidad celular, cuando las células se encuentran expuestas a agentes externos, puede interpretarse mediante un estudio de la citotoxicidad que causa el material extraño a las células.

Para la realización del estudio de viabilidad celular se emplearon células del tipo Fibroblastos Gingivales Primarios (*Primary Gingival Fibroblast, HGF-ATCC® PCS-201-018™*). Los fibroblastos produjeron altas cantidades de formazán violeta luego de la incubación en contacto directo con las superficies estudiadas durante 48 h.

Como se observa en la Figura 33, las superficies recubiertas mostraron porcentajes de viabilidad celular superiores al 75% en todos los casos. Puede observarse como al aumentar la concentración de zinc en la solución precursora de cada recubrimiento, disminuye la viabilidad celular, obteniéndose el menor valor (79.44%) para la superficie Z4.

Por otro lado, al analizar los resultados de la liberación de iones Zn^{2+} al medio fisiológico (Figura 31) y compararla con los resultados de la viabilidad celular (Figura 33), se puede observar una relación inversa entre la cantidad de zinc liberado al medio y el porcentaje de viabilidad celular. Lo anterior es un indicio de la toxicidad celular que puede causar los iones Zn^{2+} liberados al medio fisiológico.

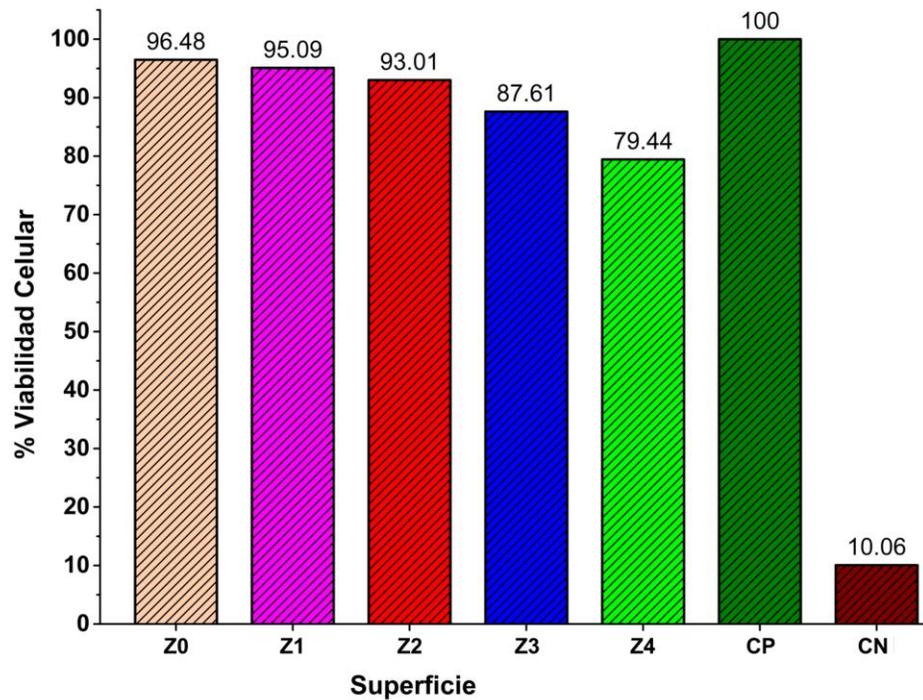


Figura 33. Viabilidad celular de fibroblastos gingivales evaluada por el método de reducción del MTT (CP-Control Positivo, CN-Control Negativo).

4.3.7. Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana de los recubrimientos obtenidos se evaluó mediante difusión en agar para determinar su habilidad de inhibir el crecimiento bacteriano. Luego de 24 h de incubación de las muestras en las placas con agar y las bacterias *E. coli* y *S. aureus*, se determinó la zona de inhibición inducida por cada superficie, señalada en la Figura 34.

Los recubrimientos sintetizados muestran actividad antibacteriana en presencia de las dos bacterias estudiadas. El tamaño de las zonas de inhibición generadas por cada recubrimiento se muestra en la Tabla 3. Como puede observarse, existe

una relación directa entre la concentración de zinc empleada para la síntesis de los recubrimientos base zinc y el tamaño de la zona de inhibición. Las superficies recubiertas obtenidas a partir de una solución con mayor concentración de zinc muestran un halo de inhibición de mayor diámetro, lo cual está relacionado con la cantidad de iones Zn^{2+} liberados al medio fisiológico por cada uno de los recubrimientos estudiados (véase Figura 31).

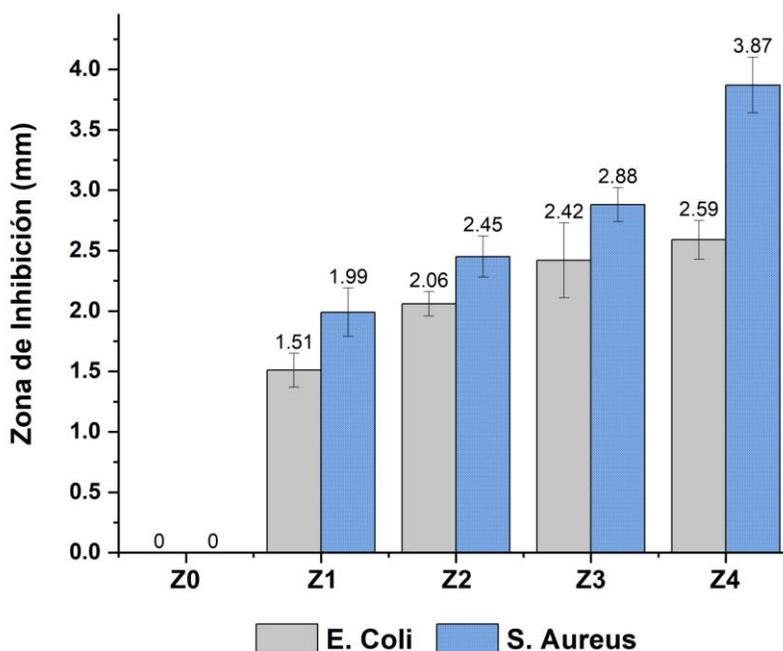


Figura 34. Zona de Inhibición inducida por cada superficie.

Además, puede observarse, en todos los casos que el tamaño de la zona de inhibición es mayor cuando las superficies se encuentran en contacto con bacterias *S. aureus*. Lo anterior indica una mayor sensibilidad de este tipo de microorganismos, al compararlos con bacterias *E. coli*, ante la presencia de los iones zinc liberados por los recubrimientos obtenidos.

Tabla 3. Tamaño de la zona de inhibición (mm) inducida por cada superficie.

Superficie	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Z0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Z1	1.51 ± 0.14	1.99 ± 0.20
Z2	2.05 ± 0.10	2.45 ± 0.17
Z3	2.42 ± 0.31	2.88 ± 0.14
Z4	2.59 ± 0.16	3.87 ± 0.23

La acción bactericida de los iones zinc liberados al medio fisiológico, podría relacionarse con la interacción de estos iones con la membrana celular de los microorganismos y su posterior penetración en las células bacterianas. Además, la desorganización de la membrana por sustancias extrañas o no deseadas puede provocar la pérdida de la integridad de la membrana, lo que conduce al mal funcionamiento de la barrera de permeabilidad y provocar la muerte de la célula^[96]. Por otra lado, el ZnO genera especies de oxígeno reactivas, particularmente H₂O₂, que causan oxidación en la matriz extracelular de la membrana bacteriana, provocando la muerte de estos microorganismos^[1, 27].

Al comparar los resultados de liberación de zinc al medio (Figura 31), viabilidad celular (Figura 33) y actividad antibacteriana (Figura 34), se observa que un mayor porcentaje de liberación de zinc al medio fisiológico, induce una mayor respuesta antibacteriana, pero a su vez disminuye la viabilidad celular (Tabla 4). Lo anterior evidencia la necesidad de enfatizar en la cantidad de zinc que debe incluirse en un biomaterial para garantizar su actividad antibacteriana y reducir en medida de lo posible la citotoxicidad.

Tabla 4. Cantidad de Zn²⁺ liberado, viabilidad celular y tamaño de la zona de inhibición para cada superficie evaluada.

Superficie	Zn ²⁺ liberado en 24h [µg/mL]	Viabilidad celular a 48h [%]	Zona de Inhibición a 24h [mm]	
			<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Z0	0.000	96.48	0.00	0.00
Z1	0.107	95.09	1.51	1.99
Z2	0.126	93.01	2.05	2.45
Z3	0.110	87.61	2.42	2.88
Z4	0.144	79.44	2.59	3.87

Se ha demostrado que el zinc, en concentraciones muy altas, inicia la toxicidad celular mediante la creación de especies de oxígeno reactivas y la interrupción del metabolismo celular^[27]. Los resultados anteriores demuestran que mediante tratamientos químicos sucesivos es posible obtener recubrimientos bioactivos base zinc para la aleación Ti6Al4V, capaces de liberar iones zinc al medio fisiológico, que inhiben el crecimiento bacteriano y, dependiendo de la cantidad de zinc liberada, no causan toxicidad celular significativa.

Capítulo 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

De los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

1. La combinación de grabado ácido y oxidación en una mezcla de peróxido de hidrógeno y ácido sulfúrico genera en la superficie de la aleación Ti6Al4V una capa de TiO₂ porosa, caracterizada por la formación de cavidades micrométricas irregulares.
2. Mediante inmersión en soluciones preparadas con diferentes concentraciones de zinc, se pueden obtener recubrimientos capaces de liberar iones Zn²⁺ al medio fisiológico.
3. La morfología de la superficie modificada libre de zinc (Z0) cambia significativamente con la formación del recubrimiento (superficies Z1, Z2, Z3 y Z4), obteniéndose estructuras porosas que aumentan su tamaño con el incremento de la concentración de Zn²⁺ empleada para preparar la solución precursora.
4. Las estructuras porosas formadas en los recubrimientos presentan altos contenidos de zinc y oxígeno.
5. Los recubrimientos obtenidos no presentan cambios significativos en su rugosidad media al compararse con la superficie Z0, sin embargo, sí presentan cambios significativos de este parámetro al compararlos entre ellos.

-
6. Las superficies recubiertas presentan tendencias a la hidrofobicidad, con ángulos de contacto superiores a los 60° en todos los casos.
 7. La cantidad de zinc liberada al medio fisiológico se relaciona directamente con la concentración de zinc empleada en las soluciones precursoras, con una liberación máxima de 0.35 µg/mL en los primeros 7 días para la superficie Z4.
 8. Los recubrimientos obtenidos por el método de inmersión tienen la habilidad de inducir la nucleación y crecimiento de hidroxiapatita en la superficie de la aleación Ti6Al4V.
 9. La citotoxicidad de los recubrimientos obtenidos aumenta con el incremento de la cantidad de zinc liberada al medio fisiológico.
 10. Las cantidades de zinc liberadas al medio por los recubrimientos obtenidos exhiben actividad antibacteriana en presencia de *E. coli* y *S. aureus*.

Por medio de tratamientos químicos sucesivos es posible obtener recubrimientos bioactivos base zinc para la aleación Ti6Al4V, capaces de liberar iones zinc, inhibir el crecimiento bacteriano y permitir valores de viabilidad celular superiores al 79%.

5.2. Recomendaciones

1. Evaluar las propiedades mecánicas de los recubrimientos obtenidos para determinar una posible aplicación para estos.
2. Evaluar la adherencia al sustrato de los recubrimientos obtenidos mediante pruebas de rayado.
3. Estudiar la citotoxicidad celular causada por los recubrimientos sintetizados empleando una línea celular que diferencie en osteoblastos.
4. Realizar estudios de implantación *in vivo* para evaluar la oseointegración de los recubrimientos obtenidos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Allizond, V., et al., *Current Knowledge on Biomaterials for Orthopedic Applications Modified to Reduce Bacterial Adhesive Ability*. Antibiotics, 2022. 11(4): p. 529.
2. Liu, Z., X. Liu, and S. Ramakrishna, *Surface engineering of biomaterials in orthopedic and dental implants: Strategies to improve osteointegration, bacteriostatic and bactericidal activities*. Biotechnology journal, 2021. 16(7): p. 2000116.
3. Ferraris, S., et al., *Antibacterial and bioactive nanostructured titanium surfaces for bone integration*. Appl Surf Sci, 2014. 311: p. 279-291.
4. Nouri, A., et al., *Surface modification of additively manufactured metallic biomaterials with active antipathogenic properties*. Smart Materials in Manufacturing, 2022: p. 100001.
5. Przekora, A., et al., *Mesh Ti6Al4V Material Manufactured by Selective Laser Melting (SLM) as a Promising Intervertebral Fusion Cage*. International Journal of Molecular Sciences, 2022. 23(7): p. 3985.
6. Kazimierczak, P. and A. Przekora, *Osteoconductive and osteoinductive surface modifications of biomaterials for bone regeneration: A concise review*. Coatings, 2020. 10(10): p. 971.
7. Souza, J.C.M., et al., *Nano-scale modification of titanium implant surfaces to enhance osseointegration*. Acta Biomater, 2019. 94: p. 112-131.
8. Sukhodub, L., et al., *ZnO coatings on Ti6Al4V substrate: Structural and antibacterial properties in literature review and research*. Management systems in production engineering, 2020.
9. Vetrone, F., et al., *Nanoscale Oxidative Patterning of Metallic Surfaces to Modulate Cell Activity and Fate*. Nano Lett, 2009. 9(2): p. 659-665.
10. W Nicholson, J., *Titanium alloys for dental implants: A review*. Prosthesis, 2020. 2(2): p. 100-116.
11. Bosch-Rué, E., et al., *Biological roles and delivery strategies for ions to promote osteogenic induction*. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2021: p. 1809.

-
12. Khan, S.N., et al., *Osseointegration and more—A review of literature*. Indian J Dent, 2012. 3(2): p. 72-76.
 13. Chrcanovic, B.R. and M.D. Martins, *Study of the influence of acid etching treatments on the superficial characteristics of Ti*. Mater Res, 2014. 17: p. 373-380.
 14. Lai, H.-C., et al., *The influence of surface energy on early adherent events of osteoblast on titanium substrates*. J Biomed Mater Res, 2010. 93A: p. 289-296.
 15. Kokubo, T. and S. Yamaguchi, *Bioactive titanate layers formed on titanium and its alloys by simple chemical and heat treatments*. Open Biomed Eng J, 2015. 9: p. 29-41.
 16. Hu, H., et al., *Antibacterial activity and increased bone marrow stem cell functions of Zn-incorporated TiO₂ coatings on titanium*. Acta Biomater, 2012. 8(2): p. 904-915.
 17. Shen, X., et al., *Regulation of the Biological Functions of Osteoblasts and Bone Formation by Zn-Incorporated Coating on Microrough Titanium*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2014. 6(18): p. 16426-16440.
 18. Qiao, Y., et al., *Stimulation of bone growth following zinc incorporation into biomaterials*. Biomater, 2014. 35(25): p. 6882-6897.
 19. Jansson, T., et al., *Antibacterial Effects of Zinc Oxide Nanorod Surfaces*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2012. 12(9): p. 7132-7138.
 20. Trino, L.D., et al., *Zinc oxide surface functionalization and related effects on corrosion resistance of titanium implants*. Ceram Int, 2018. 44(4): p. 4000-4008.
 21. Park, J.K., et al., *The Topographic Effect of Zinc Oxide Nanoflowers on Osteoblast Growth and Osseointegration*. Advanced Materials, 2010. 22(43): p. 4857-4861.
 22. Gao, C., et al., *Advances in the induction of osteogenesis by zinc surface modification based on titanium alloy substrates for medical implants*. Journal of Alloys and Compounds, 2017. 726: p. 1072-1084.
 23. Bauer, S., et al., *Engineering biocompatible implant surfaces Part I: Materials and surfaces*. Prog Mater Sci, 2013. 58: p. 261–326.
 24. Variola, F., et al., *Nanoscale surface modifications of medically-relevant metals: state-of-the art and perspectives*. Nanoscale, 2011. 3(2): p. 335–353.

-
25. Todros, S., M. Todesco, and A. Bagno, *Biomaterials and Their Biomedical Applications: From Replacement to Regeneration*. Processes, 2021. 9(11): p. 1949.
 26. Zhang, L.-C., L.-Y. Chen, and L. Wang, *Surface modification of titanium and titanium alloys: technologies, developments, and future interests*. Adv. Eng. Mater., 2020. 22(5): p. 1901258.
 27. Pesode, P.A. and S.B. Barve, *Recent advances on the antibacterial coating on titanium implant by micro-Arc oxidation process*. Materials Today: Proceedings, 2021. 47: p. 5652-5662.
 28. Davis, R., et al., *Enhanced Micro-Electric Discharge Machining-Induced Surface Modification on Biomedical Ti-6Al-4V Alloy*. Journal of Manufacturing Science and Engineering, 2022. 144(7).
 29. Kaur, M. and K. Singh, *Review on titanium and titanium based alloys as biomaterials for orthopaedic applications*. Materials Science and Engineering: C, 2019. 102: p. 844-862.
 30. Li, Y., et al., *Cytotoxicity of Titanium and Titanium Alloying Elements*. J Dent Res, 2010. 89(5): p. 493-497.
 31. Burczyński, T., *Multiscale Modeling of Osseous Tissues*. J Theor Appl Mech, 2010. 48(4): p. 855-870.
 32. Sadat-Shojai, M., et al., *Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures*. Acta Biomater, 2013. 9(8): p. 7591-7621.
 33. Lin, D., et al., *Mandibular bone remodeling induced by dental implant*. J Biomech, 2010. 43: p. 287-293.
 34. Elias, C.N., *Titanium dental implant surfaces*. Métrica, 2010. 15(2): p. 138-142.
 35. Dohan Ehrenfest, D.M., et al., *Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography*. Trends Biotechnol, 2010. 28(4): p. 198-206.
 36. Liu, W., S. Liu, and L. Wang, *Surface modification of biomedical titanium alloy: micromorphology, microstructure evolution and biomedical applications*. Coatings, 2019. 9(4): p. 249.
 37. Rupp, F., et al., *Surface characteristics of dental implants: A review*. Dental Materials, 2018. 34(1): p. 40-57.

-
38. Spriano, S., et al., *A critical review of multifunctional titanium surfaces: New frontiers for improving osseointegration and host response, avoiding bacteria contamination*. Acta biomaterialia, 2018. 79: p. 1-22.
 39. Kravanja, K.A. and M. Finšgar, *A review of techniques for the application of bioactive coatings on metal-based implants to achieve controlled release of active ingredients*. Materials & Design, 2022: p. 110653.
 40. Andrukhov, O., et al., *Proliferation, behavior, and differentiation of osteoblasts on surfaces of different microroughness*. Dental Materials, 2016. 32(11): p. 1374-1384.
 41. Shivakoti, I., et al., *Laser Surface Texturing for Biomedical Applications: A Review*. Coatings, 2021. 11(2): p. 124.
 42. Guo, C.Y., A.T.H. Tang, and J.P. Matinlinna, *Insights into Surface Treatment Methods of Titanium Dental Implants*. J Adhes Sci Technol, 2012. 26(1-3): p. 189-205.
 43. Kurup, A., P. Dhattrak, and N. Khasnis, *Surface modification techniques of titanium and titanium alloys for biomedical dental applications: A review*. Materials Today: Proceedings, 2021. 39: p. 84-90.
 44. Cruz, A.L., et al., *Effect of chemical and thermochemical treatments on the surface properties of commercially pure titanium*. Matéria (Rio de Janeiro), 2020. 25.
 45. Chen, Y., et al., *Effect of Ti–OH formation on bioactivity of vacuum plasma sprayed titanium coating after chemical treatment*. Surface & Coatings Technology, 2007: p. 494 - 498.
 46. Wu, J.-m., et al., *Porous titania films prepared from interactions of titanium with hydrogen peroxide solution*. Scripta Materialia, 2002. 46: p. 101-106.
 47. Wang, X.-X., et al., *Bioactive titania gel layers formed by chemical treatment of Ti substrate with a H₂O₂/HCl solution*. Biomaterials, 2002. 23(5): p. 1353-1357.
 48. Zhang, E.W., et al., *In vitro and in vivo evaluation of SLA titanium surfaces with further alkali or hydrogen peroxide and heat treatment*. Biomed.Mater., 2011. 6(1-7).
 49. Kodama, A., et al., *Bioactivation of titanium surfaces using coatings of TiO₂ nanotubes rapidly pre-loaded with synthetic hydroxyapatite*. Acta Biomater, 2009. 5(6): p. 2322-2330.
 50. Zakaria, A., et al., *Bio-Functional Coating on Ti6Al4V Surface Produced by Using Plasma Electrolytic Oxidation*. Metals, 2020. 10(9): p. 1124.

-
51. Damiati, L., et al., *Impact of surface topography and coating on osteogenesis and bacterial attachment on titanium implants*. Journal of Tissue Engineering, 2018. 9: p. 2041731418790694.
 52. Roy, S., *Functionally graded coatings on biomaterials: a critical review*. Mater Today Chem, 2020. 18: p. 100375.
 53. Veerachamy, S., et al., *Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: A review*. Proc Inst Mech Eng H, 2014. 228(10): p. 1083-1099.
 54. Norowski Jr., P.A. and J.D. Bumgardner, *Biomaterial and antibiotic strategies for peri-implantitis: A review*. J Biomed Mater Res B, 2009. 88B(2): p. 530-543.
 55. Rimondini, L., M. Fini, and R. Giardino, *The microbial infection of biomaterials: A challenge for clinicians and researchers. A short review*. J Appl Biomater Biomech, 2005. 3(1): p. 1-10.
 56. Campoccia, D., L. Montanaro, and C.R. Arciola, *A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces*. Biomater, 2013. 34(34): p. 8533-8554.
 57. Chouirfa, H., et al., *Review of titanium surface modification techniques and coatings for antibacterial applications*. Acta Biomater, 2019. 83: p. 37-54.
 58. Yusa, K., et al., *Zinc-modified titanium surface enhances osteoblast differentiation of dental pulp stem cells in vitro*. Sci Rep, 2016. 6: p. 29462.
 59. Hu, D., et al., *Different response of osteoblastic cells to Mg²⁺, Zn²⁺ and Sr²⁺ doped calcium silicate coatings*. J Mater Sci - Mater Med, 2016. 27(3): p. 56.
 60. Li, H.C., D.G. Wang, and C.Z. Chen, *Effect of zinc oxide and zirconia on structure, degradability and in vitro bioactivity of wollastonite*. Ceram Int, 2015. 41(8): p. 10160-10169.
 61. Song, W., et al., *Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles*. Toxicology Letters, 2010. 199(3): p. 389-397.
 62. Zhang, Y., et al., *Nano Ag/ZnO-Incorporated Hydroxyapatite Composite Coatings: Highly Effective Infection Prevention and Excellent Osteointegration*. ACS Appl. Mater. Interfaces, 2018. 10(1): p. 1266-1277.
 63. Hadrup, N., A.K. Sharma, and K. Loeschner, *Toxicity of silver ions, metallic silver, and silver nanoparticle materials after in vivo dermal and mucosal surface exposure: A review*. Regul Toxicol Pharm, 2018. 98: p. 257-267.

-
64. Vrček, I.V., et al., *Comparison of in vitro toxicity of silver ions and silver nanoparticles on human hepatoma cells*. Environ Toxicol, 2016. 31(6): p. 679-692.
 65. Gunsolus, I.L., et al., *Effects of humic and fulvic acids on silver nanoparticle stability, dissolution, and toxicity*. Environ Sci Technol, 2015. 49(13): p. 8078-8086.
 66. Patil, D., et al., *Antibacterial and cytocompatibility study of modified Ti6Al4V surfaces through thermal annealing*. Materials Science and Engineering: C, 2019. 99: p. 1007-1020.
 67. Madla-Cruz, E., et al., *Antimicrobial activity and inhibition of biofilm formation in vitro and on human dentine by silver nanoparticles/carboxymethyl-cellulose composites*. Archives of Oral Biology, 2020. 120: p. 104943.
 68. Huang, X., et al., *Sustained zinc release in cooperation with CaP scaffold promoted bone regeneration via directing stem cell fate and triggering a pro-healing immune stimuli*. Journal of nanobiotechnology, 2021. 19(1): p. 1-20.
 69. Yu, J., et al., *Optimal Zn-Modified Ca–Si-Based Ceramic Nanocoating with Zn Ion Release for Osteoblast Promotion and Osteoclast Inhibition in Bone Tissue Engineering*. J Nanomater, 2017. 2017.
 70. Zhang, X., et al., *Corrosion behavior of Zn-incorporated antibacterial TiO₂ porous coating on titanium*. Ceramics International, 2016. 42(15): p. 17095-17100.
 71. Chang, Y.-Y., et al., *Antibacterial properties and human gingival fibroblast cell compatibility of TiO₂/Ag compound coatings and ZnO films on titanium-based material*. Clin Oral Invest, 2012. 16(1): p. 95-100.
 72. Arya, S.K., et al., *Recent advances in ZnO nanostructures and thin films for biosensor applications*. Analytica chimica acta, 2012. 737: p. 1-21.
 73. Liu, W., et al., *Zinc-Modified Sulfonated Polyetheretherketone Surface with Immunomodulatory Function for Guiding Cell Fate and Bone Regeneration*. Advanced Science, 2018. 5(10): p. 1800749.
 74. Sukhodub, L., et al., *Hydroxyapatite and zinc oxide based two-layer coating, deposited on ti6al4v substrate*. MM Science Journal, 2019. 2019(December): p. 3494-3499.
 75. Jin, G., et al., *Osteogenic activity and antibacterial effect of zinc ion implanted titanium*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014. 117: p. 158-165.

-
76. Sergi, R., et al., *Zinc containing bioactive glasses with ultra-high crystallization temperature, good biological performance and antibacterial effects*. Mater Sci Eng, C, 2019. 104: p. 109910.
 77. Kellesarian, S.V., et al., *Does incorporating zinc in titanium implant surfaces influence osseointegration? A systematic review*. J Prosthet Dent, 2017. 117(1): p. 41-47.
 78. Sundrarajan, M., S. Ambika, and K. Bharathi, *Plant-extract mediated synthesis of ZnO nanoparticles using Pongamia pinnata and their activity against pathogenic bacteria*. Advanced Powder Technology, 2015. 26(5): p. 1294-1299.
 79. Hou, B., et al., *In vitro bioactivity, bio-corrosion resistance and antibacterial property of laser cladded HA coatings with different content of ZnO on Ti-6Al-4V substrate*. Materials Research, 2019. 22.
 80. Chozhanathmisra, M., et al., *Development of zinc-halloysite nanotube/minerals substituted hydroxyapatite bilayer coatings on titanium alloy for orthopedic applications*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2016. 511: p. 357-365.
 81. Miao, S., et al., *Fabrication and evaluation of Zn containing fluoridated hydroxyapatite layer with Zn release ability*. Acta biomaterialia, 2008. 4(2): p. 441-446.
 82. Heras, C., et al., *Multifunctional antibiotic-and zinc-containing mesoporous bioactive glass scaffolds to fight bone infection*. Acta Biomaterialia, 2020. 114: p. 395-406.
 83. Karbowniczek, J., et al., *Electrophoretic deposition of organic/inorganic composite coatings containing ZnO nanoparticles exhibiting antibacterial properties*. Materials Science and Engineering: C, 2017. 77: p. 780-789.
 84. Rasmi, K., et al., *Active nano metal oxide coating for bio-fouling resistance*. Transactions of the Indian Institute of Metals, 2018. 71(6): p. 1323-1329.
 85. Roknian, M., et al., *Study of the effect of ZnO nanoparticles addition to PEO coatings on pure titanium substrate: microstructural analysis, antibacterial effect and corrosion behavior of coatings in Ringer's physiological solution*. Journal of Alloys and Compounds, 2018. 740: p. 330-345.
 86. Huo, K., et al., *Osteogenic activity and antibacterial effects on titanium surfaces modified with Zn-incorporated nanotube arrays*. Biomaterials, 2013. 34(13): p. 3467-3478.

-
87. Alvarez, K., M. Fukuda, and O. Yamamoto, *Titanium Implants after Alkali Heating Treatment with a $[Zn(OH)_4]^{2-}$ Complex: Analysis of Interfacial Bond Strength Using Push-Out Tests*. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 2010. 12(1): p. e114-e125.
 88. Cruz, A.L., *Tratamiento y caracterización de la superficie químicamente modificada e la aleación Ti6Al4V por inmersión en solución alcalina caliente que contiene el ion $[Zn(OH)_4]^{2-}$* , in *Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica*. 2020, Universidad Autónoma de Nuevo León.
 89. Frígols, B., et al., *Graphene oxide in zinc alginate films: Antibacterial activity, cytotoxicity, zinc release, water sorption/diffusion, wettability and opacity*. *PLOS ONE*, 2019. 14(3): p. e0212819.
 90. Nath, M.R., et al., *ZnO nanoparticles preparation from spent zinc-carbon dry cell batteries: studies on structural, morphological and optical properties*. *Journal of Asian Ceramic Societies*, 2018. 6(3): p. 262-270.
 91. Peterson, R.B., C.L. Fields, and B.A. Gregg, *Epitaxial chemical deposition of ZnO nanocolumns from NaOH solutions*. *Langmuir*, 2004. 20(12): p. 5114-5118.
 92. Yamabi, S. and H. Imai, *Growth conditions for wurtzite zinc oxide films in aqueous solutions*. *Journal of materials chemistry*, 2002. 12(12): p. 3773-3778.
 93. Ito, A., et al., *Zinc-releasing calcium phosphate for stimulating bone formation*. *Materials Science and Engineering: C*, 2002. 22(1): p. 21-25.
 94. Wätjen, W., et al., *Induction of apoptosis in mammalian cells by cadmium and zinc*. *Environmental Health Perspectives*, 2002. 110(suppl 5): p. 865-867.
 95. Kokubo, T. and H. Takadama, *How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?* *Biomaterials*, 2006. 27(15): p. 2907-2915.
 96. Applerot, G., et al., *Enhanced antibacterial activity of nanocrystalline ZnO due to increased ROS-mediated cell injury*. *Advanced Functional Materials*, 2009. 19(6): p. 842-852.