

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA



**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE RECUBRIMIENTOS BIOACTIVOS DE Zn-CaP
OBTENIDOS SOBRE SUPERFICIES MODIFICADAS DE TITANIO EMPLEANDO
UNA NUEVA VARIANTE DEL MÉTODO BIOMIMÉTICO**

**POR:
MC. YAIMÍ MARTÍN SANTANA**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORADO EN
INGENIERÍA DE MATERIALES**

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN JUNIO, 2026

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



**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE RECUBRIMIENTOS BIOACTIVOS DE Zn-CaP
OBTENIDOS SOBRE SUPERFICIES MODIFICADAS DE TITANIO EMPLEANDO
UNA NUEVA VARIANTE DEL MÉTODO BIOMIMÉTICO**

**POR
MC. YAIMÍ MARTÍN SANTANA**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORADO EN
INGENIERÍA DE MATERIALES.**

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN JUNIO, 2026

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 evaluación de recubrimientos bioactivos de Zn-CaP obtenidos sobre superficies modificadas de titanio empleando una nueva variante del método biomimético”, realizada por la estudiante Yaimí Martín Santana, con número de matrícula 1983182, sea aceptada para su defensa como requisito parcial para obtener el grado de Doctorado en Ingeniería de Materiales.

El Comité de Evaluación de Tesis

Dr. Edén Amaral Rodríguez Castellanos
Director

Dr. Marco Antonio Ludovic Hernández Rodríguez
Codirector

Dr. Arturo Juárez Hernández
Revisor

Dra. Ana María Guzmán Hernández
Revisora

Dra. Myriam Angélica de la Garza Ramos
Revisora

Dra. Flor Aracelí García Castillo
Revisora

Dr. José Eulalio Contreras de León
Revisor

V.º B.º



Dr. Azael Martínez de la Cruz
Secretario de Estudios de Posgrado



SUBDIRECCIÓN
ACADÉMICA

Institución	190001
Programa	122608
Acta núm.	381

Ciudad Universitaria, 11 de junio de 2026.

DEDICATORIA

*A mi familia,
por su amor incondicional, su paciencia y su apoyo
constante en cada etapa de este camino.
Este logro también es suyo.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mi director de tesis, el Dr. Edén Amaral Rodríguez Castellanos, por su orientación, apoyo y acompañamiento a lo largo del desarrollo de este doctorado.

Al Dr. Marco A. L. Hernández Rodríguez, codirector de esta investigación, por la oportunidad de integrarme a su grupo de trabajo, así como por sus valiosas recomendaciones, confianza y respaldo durante cada etapa del proyecto.

Al grupo de investigación de Biomateriales del Posgrado en Ingeniería de Materiales de la FIME, por su colaboración, apoyo y contribuciones al desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Myriam A. de la Garza, por su colaboración y aportaciones durante la realización de esta investigación.

A los profesores del Posgrado en Ingeniería de Materiales de la FIME, por los conocimientos compartidos y la formación académica brindada durante mi estancia doctoral.

A la SECIHTI, por el apoyo económico otorgado mediante la beca de doctorado.

Finalmente, a mis amigos, por su apoyo incondicional, motivación y acompañamiento a lo largo de este proceso.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE TABLAS	v
RESUMEN.....	vi
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Justificación.....	4
1.2. Hipótesis.....	4
1.3. Objetivo General	4
1.4. Objetivos Específicos	5
CAPÍTULO 2.....	6
BASES CIENTÍFICAS DEL ESTUDIO	6
2.1. Materiales implantables y respuesta biológica	6
2.2. Tejido óseo.....	7
2.3. El titanio y sus aleaciones	9
2.4. Oseointegración	10
2.5. Superficies bioactivas para el incremento de la integración ósea	11
2.5.1 Biocerámicas basadas en fosfatos de calcio	12
2.5.2 Propiedades y características de la hidroxiapatita	13
2.6. Contaminación bacteriana de dispositivos médicos implantables	15
2.6.1 <i>Biofilms</i> y su papel en el desarrollo de infecciones postoperatorias.....	17
2.6.2 Microorganismos asociados a infecciones.....	19

2.6.3	Métodos para prevenir o reducir la ocurrencia de infecciones postoperatorias.....	20
2.7.	Papel del zinc en la regeneración ósea.....	22
2.8.	Hidroxiapatita dopada con Zn^{2+}	22
2.9.	Procesamiento biomimético de recubrimientos de fosfatos de calcio26	
CAPÍTULO 3.....		30
DISEÑO Y DESARROLLO DE EXPERIMENTOS.....		30
3.1	Metodología general de procesamiento y experimentación	30
3.2	Preparación inicial del material.....	30
3.3	Ataque químico	31
3.4	Activación superficial	31
3.5	Deposición biomimética.....	32
3.6	Estrategia de caracterización de superficies y recubrimientos	35
3.6.1	Análisis morfológico y topográfico.....	35
3.6.2	Análisis semicuantitativo de composición elemental.....	35
3.6.3	Análisis químico superficial	36
3.6.4	Identificación de fases cristalinas.....	36
3.6.5	Análisis de rugosidad mediante perfilometría de contacto	36
3.7	Evaluación biológica <i>in vitro</i> de las superficies desarrolladas	37
3.7.1	Viabilidad celular mediante ensayo de citotoxicidad	37
3.7.2	Actividad antibacteriana frente a <i>Streptococcus mutans</i>	39
3.8	Determinación de Zn^{2+} liberado desde los recubrimientos	40
3.9	Repetibilidad y tratamiento estadístico de los datos.....	41
3.10	Consideraciones éticas y de bioseguridad	41
CAPÍTULO 4.....		42

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1 Caracterización posterior a la preparación inicial	42
4.2 Evaluación morfológica, composicional y estructural de la superficie modificada de Ti6Al4V	44
4.2.1 Cambios superficiales inducidos por el ataque químico	45
4.2.2 Evolución superficial durante la activación del Ti6Al4V	47
4.3 Evaluación fisicoquímica de los recubrimientos de fosfatos de calcio	54
4.3.1 Recubrimientos desarrollados bajo la condición VD1 (SBFX7-4h)	54
4.3.2 Recubrimientos desarrollados bajo la condición VD2 (SBFX7-6h)	58
4.3.3 Recubrimientos desarrollados bajo la condición VD3 (SBFX10-4h)	61
4.3.4 Recubrimientos desarrollados bajo la condición VD4 (SBFX10-6h)	65
4.4 Evaluación de los recubrimientos de fosfatos de calcio modificados con zinc.....	69
4.4.1 Morfología de los recubrimientos biomiméticos Zn-CaP.....	70
4.4.2 Composición elemental de los recubrimientos biomiméticos Zn-CaP	75
4.4.3 Espesor de los recubrimientos biomiméticos Zn-CaP.....	83
4.4.4 Adhesión de los recubrimientos biomiméticos Zn-CaP.....	87
4.5 Caracterización biológica de recubrimientos Zn-CaP.....	88
4.5.1 Ensayo de citotoxicidad	88
4.5.2 Actividad antibacteriana.....	93
4.6 Liberación de iones Zn^{2+} al medio	98

4.6.1	Fundamentos fisicoquímicos de la liberación iónica en recubrimientos de CaP	98
4.6.2	Cinética de liberación y acoplamiento con bioactividad biomimética	98
4.6.3	Implicaciones biológicas de la liberación de Zn^{2+}	101
4.7	Evolución de la rugosidad superficial y sus implicaciones.....	103
4.7.1	Rugosidad superficial posterior a los tratamientos previos	103
4.7.2	Rugosidad superficial de los recubrimientos biomiméticos Zn-CaP	106
4.7.3	Relación estructura–propiedad asociada con la rugosidad superficial	109
4.8	Discusión final	110
CAPÍTULO 5.....		114
CONCLUSIONES		114
CAPÍTULO 6.....		116
RECOMENDACIONES		116
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		117

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Espectroscopía de Absorción Atómica
ANOVA	Análisis de Varianza
ASTM	ASTM International (anteriormente American Society for Testing and Materials)
CaP	Fosfato de calcio
CDHA	Hidroxiapatita carbonatada deficiente en calcio
DCPA	Fosfato dicálcico anhidro
DCPD	Fosfato dicálcico dihidratado
EDS	Espectroscopía de Energía Dispersiva de Rayos X
FE-SEM	Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo
FBS	Suero fetal bovino
FTIR	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier
HA	Hidroxiapatita
HDF	Fibroblastos Dérmicos Humanos
HGF	Fibroblastos Gingivales Humanos
ISO	Organización Internacional de Normalización
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio
OCP	Fosfato octocálcico
PBS	Solución tampón fosfato salino
SBF	Fluido biológico simulado
SBFX7	Fluido biológico simulado concentrado 7 veces.
SBFX10	Fluido biológico simulado concentrado 10 veces.
TH₂O	Tratamiento hidrotérmico
TT	Tratamiento térmico
VDZn0	Recubrimiento de CaP sin incorporación de Zn
VDZn1	Recubrimiento de CaP con baja concentración de Zn
VDZn2	Recubrimiento de CaP con concentración intermedia de Zn
VDZn3	Recubrimiento de CaP con alta concentración de Zn
XPS	Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X
XRD	Difracción de Rayos X
Zn-CaP	Fosfato de calcio con inclusión de zinc
Zn-HA	Hidroxiapatita sustituida con zinc

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) Diferentes líneas celulares especializadas derivadas del proceso de diferenciación de células madre mesenquimales indiferenciadas. [20].	9
Figura 2. (A) Distribución cristalográfica de los sitios ocupados por los iones Ca^{2+} en la hidroxiapatita, correspondientes a las posiciones 6Ca(II) y 4Ca(I) . (B) Esquema estructural de la celda unitaria de la HA, donde las líneas punteadas indican el plano inferior de referencia estructural [12].	14
Figura 3. Esquema que representa ejemplos de dispositivos médicos y su ubicación y nivel de invasividad dentro del organismo [8].	16
Figura 4. Proceso de colonización de una superficie partiendo de la adhesión bacteriana individual. Etapas en el desarrollo y dispersión de la biopelícula se muestran de derecha a izquierda. El panel inferior muestra microfotografías de bacterias en cada una de las cinco etapas que se muestran en el esquema [35].	18
Figura 5. Estrategias para impartir propiedades bioactivas y antibacterianas a las superficies de Ti a través de diferentes tipos de revestimientos o modificaciones superficiales [17].	21
Figura 6. Procedimiento experimental.	30
Figura 7. Superficie desbastada. A: Micrografías FE-SEM obtenidas a 5 k y 10 k. B: Composición elemental mediante EDS. C: Difractograma XRD.	43
Figura 8. Superficie del Ti6Al4V posterior al tratamiento de ataque químico. A: Micrografías FE-SEM a 1500x y 5000x. B: Espectro EDS. C: Patrón de difracción.	46
Figura 9. Evaluación morfológica durante la secuencia de activación. A, B: NaOH. C, D: CaCl_2 . E, F: Tratamiento térmico. Micrografías FE-SEM en dos niveles de aumento.	48
Figura 10. Composición elemental determinada mediante EDS en las diferentes etapas de activación superficial. A: NaOH. B: CaCl_2 . C: TH_2O .	50
Figura 11. Análisis XPS de la superficie de Ti6Al4V después de la secuencia NaOH- CaCl_2 -TT- TH_2O : (A) espectro general; (B) región de alta resolución Ca 2p.	51
Figura 12. Difractogramas XRD de las superficies del Ti6Al4V después de la secuencia NaOH- CaCl_2 -TT- TH_2O .	53
Figura 13. Micrografías FE-SEM de la superficie recubierta. A, B y C: SBFX7 - 4 horas. D, E y F: Tratamiento térmico. Magnificaciones 500x, 5000x y 10000x.	55

Figura 14. Espectros EDS de las superficies recubiertas con la VD1.	57
Figura 15. Distribución elemental obtenida por EDS para la superficie de Ti6Al4V recubierta con VD1.	58
Figura 16. Micrografías FE-SEM de la superficie recubierta. A, B y C: SBFX7 - 6 horas. D, E y F: Tratamiento térmico. Magnificaciones 500x, 5000x y 10000x.	59
Figura 17. Espectros EDS de las superficies recubiertas con la VD2.	60
Figura 18. Distribución elemental obtenida por EDS para la superficie de Ti6Al4V recubierta con VD2.	61
Figura 19. Micrografías FE-SEM de la superficie recubierta. A, B y C: SBFX10 - 4 horas. D, E y F: Tratamiento térmico. Magnificaciones 500x, 5000x y 10000x.	62
Figura 20. Distribución elemental obtenida por EDS para la superficie de Ti6Al4V recubierta con VD3.	63
Figura 21. Espectros EDS de las superficies recubiertas con la VD3.	64
Figura 22. Micrografías FE-SEM de la superficie recubierta. A, B y C: SBFX10 - 6 horas. D, E y F: Tratamiento térmico. Magnificaciones 250x, 5000x y 10000x.	65
Figura 23. Espectros EDS de las superficies recubiertas con la VD4.	67
Figura 24. Distribución elemental obtenida por EDS para la superficie de Ti6Al4V recubierta con VD4.	68
Figura 25. Micrografías FE-SEM de la superficie VDZn1 (menor concentración). Magnificaciones 500x, 1000x, 2500x y 10000x.	71
Figura 26. Micrografías FE-SEM de la superficie VDZn2 (concentración intermedia). Magnificaciones 500x, 1000x, 2500x y 10000x.	72
Figura 27. Micrografías FE-SEM de la superficie VDZn3 (mayor concentración). Magnificaciones 500x, 1000x, 2500x y 10000x.	74
Figura 28. Espectros EDS de las superficies recubiertas con: A, VDZn1; B, VDZn2; y C, VDZn3.	76
Figura 29. Análisis EDS puntuales de las superficies de Ti6Al4V recubiertas con la VDZn1 (A), VDZn2 (B) y VDZn3 (C).	77
Figura 30. Caracterización química superficial por XPS de los recubrimientos Zn-CaP depositados sobre Ti6Al4V.	79
Figura 31. Micrografías FE-SEM del espesor de los recubrimientos Zn-CaP: (A) VDZn1, 1000x; (B) VDZn2, 1000x; y (C) VDZn3, 1000x.	83
Figura 32. Mapeo elemental de las variantes Zn-CaP mediante FE-SEM-EDS: (A) VDZn1, (B) VDZn2 y (C) VDZn3.	85

Figura 33. Micrográficas FE-SEM de la capa de recubrimiento Zn-CaP después de la manipulación mecánica y limpieza ultrasónica: (A) VDZn1, 1000×; (B) VDZn2, 1000×; y (C) VDZn3, 1000×.....	87
Figura 34. Cambio en la coloración del cultivo celular que estuvo en contacto directo con las muestras de las variantes de tratamiento VDZn0, VDZn1, VDZn2 y VDZn3. Lector de microplacas.....	89
Figura 35. Respuesta celular de HGF y HDF frente a las superficies estudiadas, expresada como porcentaje de viabilidad. CN: control negativo; CP: control positivo.	90
Figura 36. Crecimiento bacteriano de colonias de S. mutans en contacto con las variantes de tratamiento VDZn1, VDZn2 y VDZn3 transcurrido un día de siembra en agar. Crecimiento en VDZn2 y VDZn3 transcurrido 7 días de incubación.	94
Figura 37. Porcentaje de reducción de UFC transcurridas 24 horas de sembradas en agar nutritivo. La VDZn0 se tomó como superficie control.	96
Figura 38. Perfil de liberación de Zn^{2+} en 50ml de PBS.	100

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Masas de los precursores químicos empleados en la preparación de las soluciones.....	32
Tabla 2. Concentración de los precursores químicos empleados en la preparación de las soluciones.....	33
Tabla 3. Variantes de depósitos empleadas en el estudio.	33
Tabla 4. Composición de las soluciones empleadas para obtener recubrimientos con Zn ²⁺	34
Tabla 5. Análisis semicuantitativo mediante EDS de las variantes de depósito con inclusión de Zn.....	77
Tabla 6. Energías de enlace determinadas por XPS para los recubrimientos Zn-CaP depositados sobre Ti6Al4V.	78
Tabla 7. Análisis semicuantitativo por mapeo elemental EDS de las variantes de recubrimiento con incorporación de Zn (% atómico).	84
Tabla 8. Porcentaje de viabilidad celular determinado mediante el ensayo MTT para las superficies evaluadas.	91
Tabla 9. Unidades formadoras de colonias por variante de tratamiento.....	95
Tabla 10. Concentración (ppm) acumulada de Zn ²⁺ liberado a medio fisiológico.	100
Tabla 11. Valores de rugosidad superficial obtenidos después de los tratamientos superficiales secuenciales. Los valores se reportan como media ± desviación estándar (n = 3). Ra: rugosidad media aritmética; Rz: altura máxima promedio del perfil; Rq: rugosidad cuadrática media.....	104
Tabla 12. Parámetros de rugosidad superficial (Ra, Rz y Rq) de los recubrimientos biomiméticos Zn-CaP depositados sobre sustratos de Ti6Al4V a diferentes concentraciones de Zn. Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n = 3). Ra: rugosidad media aritmética; Rz: altura máxima promedio del perfil; Rq: rugosidad cuadrática media.....	107

RESUMEN

El titanio y sus aleaciones, particularmente Ti6Al4V, presentan excelentes propiedades mecánicas, resistencia a la corrosión y biocompatibilidad; sin embargo, su carácter bioinerte limita su interacción directa con el tejido óseo. En este contexto, los recubrimientos bioactivos basados en fosfatos de calcio (CaP) representan una estrategia eficaz para favorecer la oseointegración, aunque pueden promover la adhesión y formación de biopelículas bacterianas o *biofilms* (por sus siglas en inglés), una de las principales causas de fracaso de los implantes biomédicos.

En este trabajo se desarrollaron recubrimientos de fosfatos de calcio con inclusión de zinc (Zn-CaP) sobre superficies de Ti6Al4V mediante deposición biomimética, empleando soluciones con diferentes concentraciones de zinc para obtener las variantes VDZn0, VDZn1, VDZn2 y VDZn3.

La caracterización fisicoquímica a través de SEM, EDS, XPS y XRD confirmó la obtención de recubrimientos de Zn-CaP. Los ensayos biológicos *in vitro* revelaron que la adición de Zn provoca un comportamiento que depende de la concentración. Se observó una ligera disminución en la viabilidad celular de los fibroblastos a medida que aumentaba el contenido de Zn, aunque los valores se mantuvieron en niveles aceptables (>70%). Al mismo tiempo, las pruebas antibacterianas contra *Streptococcus mutans* mostraron una reducción notable en la formación de colonias bacterianas, lo que respalda la efectividad del Zn como agente antimicrobiano. El estudio sobre la liberación iónica indicó que hay una liberación controlada de Zn^{2+} , con una fase inicial durante las primeras 24 horas, seguida de un período de estabilización, que se atribuye a una combinación de disolución y difusión. En resumen, los resultados sugieren que los recubrimientos de Zn-CaP desarrollados tienen un gran potencial como superficies implantables multifuncionales, capaces de fomentar la bioactividad y, al mismo tiempo, disminuir la colonización bacteriana.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

La demanda de dispositivos biomédicos implantables para aplicaciones de soporte de carga ha aumentado considerablemente [1] a través de los años. Los dispositivos protésicos una vez implantados son responsables de devolver el movimiento y la funcionalidad al tejido u órgano del cuerpo donde son colocados, por lo cual deben ser biocompatibles y propiciar la interacción con el medio biológico.

Para aplicaciones de soporte de carga comúnmente se utilizan materiales metálicos como el titanio y sus aleaciones, debido a su alta resistencia a la fatiga [1] biocompatibilidad, elevada resistencia a la corrosión en fluidos biológicos, baja densidad [2] y bajo módulo elástico. Sin embargo, la capacidad de los implantes de titanio para soportar la osteoconductividad y la oseointegración es limitada, ya que su superficie bioinerte no puede unirse químicamente con el hueso natural imposibilitando la formación de nuevo hueso.

En aras de generar integración hueso-implante, los esfuerzos en investigación científica-tecnológica se han concentrado en mejorar las propiedades de la superficie. El empleo de recubrimientos bioactivos sobre superficies de titanio ha demostrado generar una respuesta ósea más rápida en comparación con las prótesis metálicas convencionales, ya que logran estimular la respuesta biológica celular. Dentro de las biocerámicas más utilizadas como material para reparación ósea, se encuentran los fosfatos cálcicos, específicamente la hidroxiapatita (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) debido a su similitud en composición y estructura cristalina con el mineral óseo [3].

Hasta la fecha se utilizan diversas técnicas de deposición de recubrimientos [4-6]. El proceso biomimético es una de las técnicas más versátiles desarrolladas para recubrir diversas superficies de implantes ortopédicos [7]. La principal ventaja del método se debe a su naturaleza benigna, al simular condiciones fisiológicas del

cuerpo humano. Además, brinda la posibilidad de recubrir geometrías complejas y permite la inclusión de diversos agentes bioactivos durante el proceso.

A pesar de los beneficios descritos anteriormente, los recubrimientos de CaP estimulan la colonización bacteriana en su superficie, y la aparición de infecciones postoperatorias es considerada una de las complicaciones más comunes y graves, provocando el fracaso del dispositivo [8]. En el campo de la odontología, la ortopedia y el campo cardiovascular, la colonización bacteriana en las superficies implantadas puede ocurrir minutos después de la colocación del implante [9].

La adhesión bacteriana es un proceso que tiende a describirse en varias etapas que dan como resultado la formación de *biofilms*. En la primera etapa ocurre la interacción inicial, la cual es rápida y reversible entre las superficies de las células bacterianas y la superficie del material. La segunda etapa implica interacciones entre proteínas específicas y tiene como característica ser irreversible.

Los *biofilms* son colonias estructuradas de células bacterianas incrustadas en una matriz polimérica fabricada por ellas mismas y adheridas a la superficie. Estas colonias ocasionan reacciones inflamatorias que afectan la integración de los tejidos circundantes y colocan al paciente en grave riesgo de contraer infecciones sistémicas [8, 10] que han demostrado ser resistente a los antibióticos convencionales.

Para mejorar la respuesta biológica y la estabilidad de los recubrimientos, se investiga la incorporación de dopantes iónicos inorgánicos en el sistema del recubrimiento. Varios autores han estudiado la inclusión de materiales metálicos como Ag, Cu y Zn de los cuales se conoce su actividad antimicrobiana [11]. Estas sustituciones iónicas pueden causar cambios en la microestructura, estabilidad térmica, composición de fases, tamaño de grano, parámetros de red, morfología, cristalinidad y solubilidad de las apatitas dependiendo del tamaño y la cantidad del sustituyente [12].

El zinc es un elemento importante para los tejidos óseos y es un componente metálico traza abundante del hueso. Se ha demostrado que promueve la formación de hueso y suprime su resorción; además, promueve la diferenciación celular y la proliferación de osteoblastos [9, 13] y reduce la respuesta inflamatoria. A su vez, varios autores han reportado su actividad antimicrobiana [14].

Las características mencionadas han generado gran interés, por lo que se ha realizado un esfuerzo considerable en la síntesis de HA sustituido con Zn (Zn-HA). Dichas sustituciones han dado lugar a resultados controversiales sobre la cantidad máxima de Zn a incorporar y el efecto sobre la estructura cristalina y la composición de fases. A pesar de que el mecanismo de sustitución iónica ha sido extensamente estudiado, a la fecha no ha sido completamente descifrado.

En los últimos años, grandes esfuerzos han sido encaminados al diseño de materiales innovadores que reproduzcan tanto la composición como la organización estructural del tejido óseo y cuyas superficies presenten propiedades favorables de biocompatibilidad. En el campo de las modificaciones superficiales, el enfoque moderno considera ambas funciones para los recubrimientos: propiedades de osteoconducción y efecto antibacteriano.

Evitar o inhibir el crecimiento de microorganismos mediante el empleo de superficies con actividad antimicrobiana es la vía más factible de evitar la propagación de patógenos y a su vez el deterioro del material. Desde esa perspectiva, las apatitas sustituidas son uno de los materiales más prometedores en esta área de investigación.

En este sentido, la literatura proporciona evidencia inconsistente con respecto a la concentración de zinc que se debe tener en HA. Además, aunado a lo anterior, la elección de un método de fabricación idóneo tampoco ha sido definido. Actualmente, la correcta concentración de iones Zn^{2+} para obtener una combinación de propiedades biológicas, antibacterianas y mecánicas que permitan el correcto funcionamiento *in vivo* de los dispositivos biomédicos, continúa siendo un tema de investigación de interés y en curso.

1.1. Justificación

Los recubrimientos de cerámicas bioactivas depositados sobre dispositivos médicos implantables promueven la oseointegración, disminuyendo los tiempos de curación; sin embargo, estimulan la colonización bacteriana de la superficie. La aparición de infecciones postoperatorias debido a la formación de *biofilms* bacterianos ponen en riesgo la estabilidad primaria de los implantes, comprometiendo su funcionalidad y rendimiento, lo cual puede desencadenar a la falla del dispositivo. Un desafío actual en el campo de las modificaciones avanzadas de superficie es lo que hoy en día se conoce como “carrera por la superficie”, refiriéndose a la competencia entre la colonización bacteriana y la integración de la superficie al tejido peri-implantario, que tiene lugar durante las etapas tempranas post-implantación.

Aunque están siendo desarrolladas varias teorías para combatir la incidencia de infecciones asociadas a biomateriales, no existe hasta la fecha una estrategia definida que pueda eliminar totalmente su aparición. Hasta el día de hoy, ningún tratamiento puede garantizar la destrucción rápida y completa de los *biofilms* o prevenir la recurrencia de la infección, ya que en muchas ocasiones desarrollan resistencia a los antibióticos convencionales. Por tal motivo, se plantea desarrollar recubrimientos de Zn-CaP que sean capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos en la interfaz hueso-implante.

1.2. Hipótesis

La inclusión de iones Zn^{2+} en recubrimientos base fosfatos de calcio obtenidos biomiméticamente sobre superficies de Ti6Al4V bioactivas inhibirá el crecimiento de microorganismos infecciosos en su superficie.

1.3. Objetivo General

Inhibir el crecimiento de microorganismos infecciosos mediante el empleo de recubrimientos Zn-CaP obtenidos biomiméticamente sobre superficies de Ti6Al4V bioactivas.

1.4. Objetivos Específicos

- ✓ Modificar la superficie bioinerte del Ti6Al4V mediante la aplicación de tratamientos químicos y tratamientos de activación superficial que favorezcan la deposición biomimética de recubrimientos.
- ✓ Establecer parámetros de deposición biomimética para la obtención de recubrimientos base fosfato de calcio con la inclusión de diferentes concentraciones de zinc en las superficies modificadas de Ti6Al4V.
- ✓ Analizar la morfología y la composición elemental y de fases de las superficies de Ti6Al4V modificadas.
- ✓ Determinar la capacidad antibacteriana, citotoxicidad y la cinética de liberación de iones zinc al medio de los recubrimientos de Zn-CaP obtenidos mediante la realización de ensayos *in vitro*.
- ✓ Evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de Zn empleadas en los recubrimientos sobre la capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos infecciosos y la citotoxicidad hacia las células.

CAPÍTULO 2

BASES CIENTÍFICAS DEL ESTUDIO

2.1. Materiales implantables y respuesta biológica

Se denominan biomateriales a los materiales o sustancias empleadas para ser implantadas dentro de un sistema vivo sirviendo para el soporte o sustitución de tejidos y órganos que hayan sufrido traumas por accidentes o enfermedades. Estos se pueden dividir en cuatro clases principales: metales, polímeros, cerámicos y compuestos [15] y se emplean actualmente para fabricar dispositivos biomédicos entre otras aplicaciones.

En el área médica raramente se utilizan materiales simples sino integrados en dispositivos, tales como en: ortopedia (implantes de cadera, rodilla, placas óseas, tendones y ligamentos artificiales), odontología (amalgamas, resinas acrílicas o cerámicas, implantes dentales, dientes), sistema cardiovascular (válvulas cardíacas, implantes vasculares, catéter).

Los materiales metálicos como el titanio y sus aleaciones, aceros inoxidables y aleaciones base cromo-cobalto han sido ampliamente utilizados para aplicaciones biomédicas, específicamente en implantología [16] y se han convertido en parte fundamental en cirugías ortopédicas.

Los materiales cerámicos como los fosfatos de calcio, zirconia y alúmina se utilizan ampliamente para el reemplazo de tejidos duros y blandos, reparación de huesos, administración dirigida de fármacos, bioimagen y diagnóstico, gracias a su excelente biocompatibilidad, bioactividad y osteoconductividad en el entorno corporal [16]. Según el tipo de respuesta del tejido durante su interacción, se clasifican en i) bioinerte, cuando no sufren ningún cambio químico medible luego de un tiempo en contacto prolongado con el medio biológico y en ii) bioactivas, cuando son capaces de interactuar directamente con el medio biológico.

Los biomateriales deben ser estables químicamente y no tóxicos ni carcinógenos para el organismo. Las propiedades mecánicas como resistencia mecánica y fatiga se evalúan también dependiendo de la aplicación. La selección del biomaterial se realiza dependiendo de una serie de factores en los que se toma en cuenta además de los anteriormente expuesto, el costo, el proceso de fabricación y la reproducibilidad.

Durante las etapas iniciales del desarrollo de biomateriales, disciplinas como la odontología y la ortopedia centraron su interés en materiales con propiedades mecánicas apropiadas, elevada resistencia al desgaste y capacidad de integrarse funcionalmente con los tejidos biológicos. Asimismo, se procuraba que dichos materiales no generaran respuestas adversas del sistema inmunológico, característica definida como biocompatibilidad.

Posteriormente, las propiedades químicas de la superficie del biomaterial y la interfaz entre la superficie y el hueso se convirtieron en los temas principales con una demanda clínica de una oseointegración más rápida y un enfoque en la respuesta de los tejidos a la superficie del implante. Actualmente, el enfoque está basado en la obtención de biomateriales que puedan brindar una respuesta específica a la colonización por diferentes tipos de células y agentes infecciosos [17]. En este sentido diferentes estrategias son investigadas en orden de obtener superficies bioactivas y antibacterianas.

2.2. Tejido óseo

El tejido óseo es el componente principal del hueso y es de tipo conectivo. Su función principal es brindar soporte a las partes blandas y a órganos vitales, proporcionando además, puntos de sujeción de los músculos, responsables de la locomoción y el movimiento corporal [18].

Se compone principalmente de dos tipos de tejidos estructurales, el hueso esponjoso (trabecular) y cortical. El tejido esponjoso constituye el núcleo interno, siendo el más blando, de densidad ligera y muy vascularizado; mientras que, el

tejido cortical es el límite más externo y denso. El hueso esponjoso, con resistencia a la compresión en el rango de 7-10 MPa, se caracteriza por un módulo elástico más bajo. Es muy poroso, y es donde tienen lugar la mayoría de las actividades metabólicas [19].

El tejido cortical, debido a su mayor contenido de mineralización y ausencia de materia orgánica, posee mayor módulo de elasticidad, alta rigidez y baja tenacidad. Su estructura más dura y densa sirve de protección para el tejido esponjoso. Se caracteriza por su rigidez y su gran resistencia tanto a la tracción como a la compresión, para un rango de resistencia a la compresión de 130 a 225 MPa.

El tejido óseo está constituido por componentes orgánicos e inorgánicos. Aproximadamente, un 98 % está conformado por la matriz extracelular o matriz ósea, mientras que el restante 2 % corresponde a células. Esta matriz incluye una fase mineral compuesta principalmente por fosfatos de calcio, los cuales representan entre el 65 y el 70 % de su composición total. Además, el contenido de agua oscila entre el 5 y el 8 %, mientras que la fracción orgánica, integrada mayoritariamente por colágeno, constituye el porcentaje restante.

Este tejido se origina a partir de células madre mesenquimales que se diferencian en las células con funciones específicas que se encargan de la regeneración y remodelación ósea (ver Figura 1). Las células osteoblásticas son responsables de la construcción de tejido óseo nuevo, mientras que la reabsorción de la matriz ósea vieja es realizada por células multinucleadas osteoclasticas.

Con el establecimiento del tejido óseo maduro, la integridad del tejido se mantiene mediante el proceso dinámico de remodelación ósea que cubre los ciclos de vida de las células óseas. Incluye tanto la etapa de osteogénesis como la eliminación de tejido mineralizado viejo al final de su vida útil (reabsorción). La función principal de los osteoclastos es descomponer el tejido viejo y la matriz de colágeno, y liberar los minerales e iones esenciales en la fabricación del nuevo tejido óseo. Los osteoblastos y los osteoclastos pueden comunicarse de forma

cruzada para mantener la homeostasis ósea. La remodelación continua ayuda a mantener las propiedades mecánicas adecuadas del tejido.

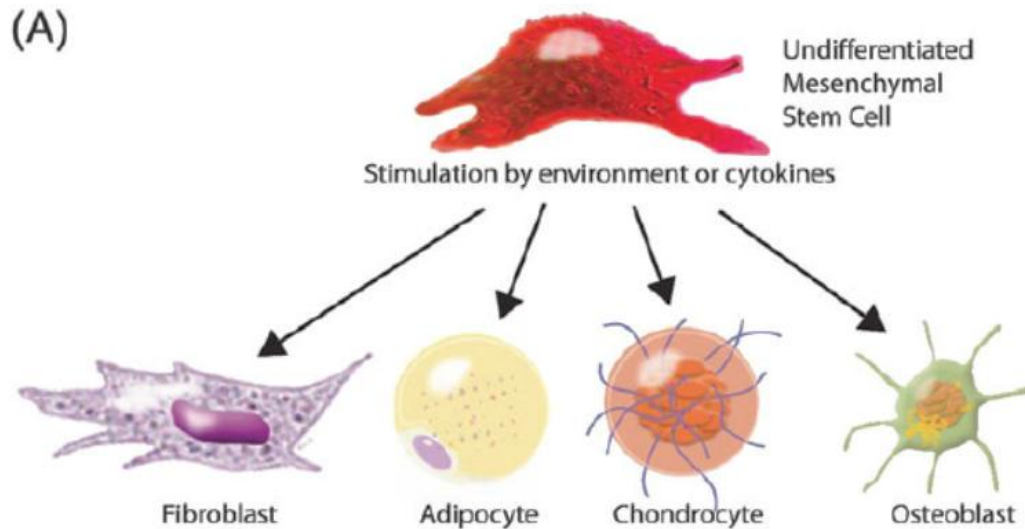


Figura 1. (A) Diferentes líneas celulares especializadas derivadas del proceso de diferenciación de células madre mesenquimales indiferenciadas. [20].

Cuando el tejido óseo sufre daños severos como consecuencia de traumatismos o enfermedades degenerativas, el mecanismo natural de remodelación puede resultar insuficiente para recuperar completamente la integridad estructural del hueso. En estas situaciones, se consideran alternativas terapéuticas como los injertos óseos autólogos, los aloinjertos y el uso de dispositivos médicos implantables.

2.3. El titanio y sus aleaciones

El titanio posee una elevada versatilidad metalúrgica, ya que puede combinarse con distintos elementos para producir diversas aleaciones con propiedades mecánicas de gran interés en sectores como el aeroespacial, aeronáutico, automotriz, químico, militar y biomédico.

Para aplicaciones biomédicas en el campo de la implantología y ortopedia, tanto el titanio como sus aleaciones, han sido ampliamente utilizados debido a su

destacada biocompatibilidad exhibiendo mejores resultados que las aleaciones basadas en Cr-Co. Además, presentan elevada resistencia mecánica, prolongada vida a fatiga, bajo módulo elástico —cercano al del hueso cortical— y alta resistencia a la corrosión en medios fisiológicos.

Los implantes de titanio y sus aleaciones son bioinerte; por lo cual, para obtener respuestas biológicas naturales adecuadas, se han desarrollado estrategias de modificación superficial destinadas a incrementar su bioactividad [16] y conducir a una oseointegración superior. Incluso a pesar de que la oseointegración del Ti y sus aleaciones tiene éxito en muchos casos clínicos de implantes no cementados, se exige un comportamiento osteoinductor de la superficie principalmente cuando se requiere una curación rápida o la calidad y/o cantidad de hueso es deficiente.

2.4. Oseointegración

En los implantes dentales y demás dispositivos endoóseos, la oseointegración y las características de la interfaz hueso-implante constituyen factores fundamentales, ya que influyen directamente tanto en el tiempo de recuperación como en la estabilidad y el desempeño del implante a largo plazo [21, 22].

La oseointegración se definió originalmente como una conexión estructural y funcional directa entre el hueso vivo ordenado y la superficie de un implante portador de carga. Se dice que un implante se considera oseointegrado cuando no hay un movimiento relativo progresivo entre el implante y el hueso con el que está en contacto directo [15].

La adhesión celular sobre la superficie metálica y la posterior formación de tejido óseo alrededor del implante están condicionadas por diversos factores, entre ellos el procedimiento quirúrgico empleado, el estado de salud del paciente, la calidad del hueso, las cargas aplicadas después de la implantación, el diseño del implante y, de manera particular, las propiedades de su superficie [22]. Durante las etapas iniciales de cicatrización y en el proceso de integración ósea del implante,

parámetros superficiales como la composición química y de fases, la morfología, la topografía, la rugosidad, la energía superficial y la humectabilidad desempeñan un papel determinante [23, 24].

Numerosos estudios identifican las propiedades de la superficie del implante como cruciales para obtener una interacción y una oseointegración entre el implante y el tejido eficaz. Las características a micro y nanoescala y la composición química de las superficies de los implantes determinan la formación temprana de hueso alrededor de los implantes. Sin embargo, los biomateriales que promueven la regeneración de tejidos a menudo atraen la adhesión de microorganismos.

2.5. Superficies bioactivas para el incremento de la integración ósea

Debido a que los implantes metálicos son esencialmente materiales bioinerte, su interacción biológica con el tejido circundante es limitada, además de presentar escasa oseoconductividad y ausencia de propiedades osteoinductoras. Por esta razón, una estrategia ampliamente utilizada consiste en modificar la superficie del implante mediante recubrimientos bioactivos capaces de favorecer la interacción entre el hueso y el material implantado, proporcionando condiciones adecuadas para la fijación y regeneración ósea [25].

Se han investigado diversos tipos de recubrimientos superficiales basados en materiales bioactivos cuya composición es semejante a la del tejido óseo y pueden establecer enlaces químicos estables con el hueso gracias a sus similitudes estructurales y químicas [6, 26].

Los biovidrios y distintas biocerámicas, particularmente los fosfatos de calcio han demostrado capacidad para unirse al tejido óseo y estimular la proliferación celular. En general, los materiales bioactivos pueden clasificarse como bioestables o bioreabsorbibles y, debido a sus limitadas propiedades mecánicas, suelen emplearse como recubrimientos sobre sustratos metálicos con el fin de mejorar la resistencia química, la durabilidad y la biocompatibilidad del implante.

2.5.1 Biocerámicas basadas en fosfatos de calcio

Los materiales cerámicos derivados de CaP han despertado un amplio interés en el campo biomédico debido a su semejanza química con la fase mineral del tejido óseo y dental [22]. Su presencia natural en el organismo humano representa una ventaja significativa frente a muchos polímeros utilizados en medicina regenerativa [27] ya que favorece una mejor interacción biológica con los tejidos.

Los fosfatos de calcio comprenden un conjunto de compuestos formados principalmente por iones calcio (Ca^{2+}) y diferentes grupos fosfato, incluyendo ortofosfatos, metafosfatos y pirofosfatos. Dependiendo de su composición química y estructura cristalina, estos materiales pueden presentarse en distintas fases, las cuales exhiben comportamientos particulares en términos de estabilidad, solubilidad y respuesta biológica.

Entre las fases más estudiadas se encuentra la brushita, también conocida como fosfato dicálcico dihidratado (DCPD). Este compuesto tiene una estructura cristalina monoclinica y se destaca por su mayor solubilidad en comparación con otras fases de fosfato de calcio. Sin embargo, se ha observado que su estabilidad disminuye en medios con un pH superior a 6–7, lo que facilita su transformación hacia otras fases más estables, como la hidroxiapatita. Esta última es considerada la fase más estable de los fosfatos de calcio y ha sido objeto de numerosas investigaciones como recubrimiento precursor para aplicaciones biomédicas.

Otra fase importante es la monetita, o fosfato dicálcico anhidro (DCPA). A diferencia de la brushita, esta fase tiene una estructura triclinica y muestra una mayor estabilidad en ambientes ácidos ($\text{pH} = 5$) y a temperaturas relativamente altas. Sin embargo, su solubilidad es un poco menor. Estudios clínicos han reportado que la implantación de gránulos de monetita favorece la regeneración del tejido óseo, mejorando las propiedades de biocompatibilidad y osteoconducción.

El fosfato octocálcico (OCP) constituye otra fase de interés debido a su papel durante la formación de apatitas biológicas. Esta fase se compone de capas alternadas de apatita y regiones hidratadas, las cuales se organizan en una red cristalina triclinica. Se considera una fase transitoria en los procesos de precipitación de hidroxiapatita y apatitas semejantes al hueso. Diversas investigaciones han señalado que la formación de HA a partir de soluciones acuosas ocurre mediante etapas intermedias, siendo el OCP una de las más importantes. Adicionalmente, estudios *in vitro* han demostrado que este material presenta una elevada compatibilidad biológica [28].

2.5.2 Propiedades y características de la hidroxiapatita

La HA es considerada uno de los biomateriales cerámicos de mayor importancia en aplicaciones médicas debido a su estrecha semejanza con la fase mineral del hueso. Dentro de la familia de los fosfatos de calcio, esta fase presenta la mayor estabilidad termodinámica en fluidos biológicos. En el tejido óseo natural, la apatita generalmente no es estequiométrica, sino una hidroxiapatita carbonatada deficiente en calcio (CDHA), cuya composición química puede describirse mediante la fórmula $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$, con relaciones molares Ca/P comprendidas entre 1.50 y 1.67[29].

La HA sintética ha sido ampliamente investigada en el ámbito biomédico gracias a sus propiedades bioactivas, su elevada compatibilidad con tejidos vivos y su capacidad para interactuar favorablemente con biopolímeros y células óseas. Además, se ha demostrado que este material favorece los procesos de regeneración ósea mediante mecanismos osteoconductores. Sin embargo, aunque las apatitas sintéticas comparten similitudes con las apatitas biológicas, existen diferencias relevantes asociadas a la composición química, el contenido de carbonato y el nivel de cristalinidad.

Desde el punto de vista biológico, la hidroxiapatita destaca por promover la formación de tejido óseo sin provocar respuestas inflamatorias severas, toxicidad ni rechazo significativo por parte del organismo. Estructuralmente, la HA cristaliza

en el sistema hexagonal y pertenece al grupo espacial $P6_3/m$. Sus parámetros de red son aproximadamente $a = 9.418 \text{ \AA}$ y $c = 6.881 \text{ \AA}$ (JCPDS No. 9-432) [30, 31]. La estructura cristalina está formada por la disposición ordenada de iones calcio, grupos fosfato e iones hidroxilo dentro de una celda unitaria con simetría característica (ver Figura 2).

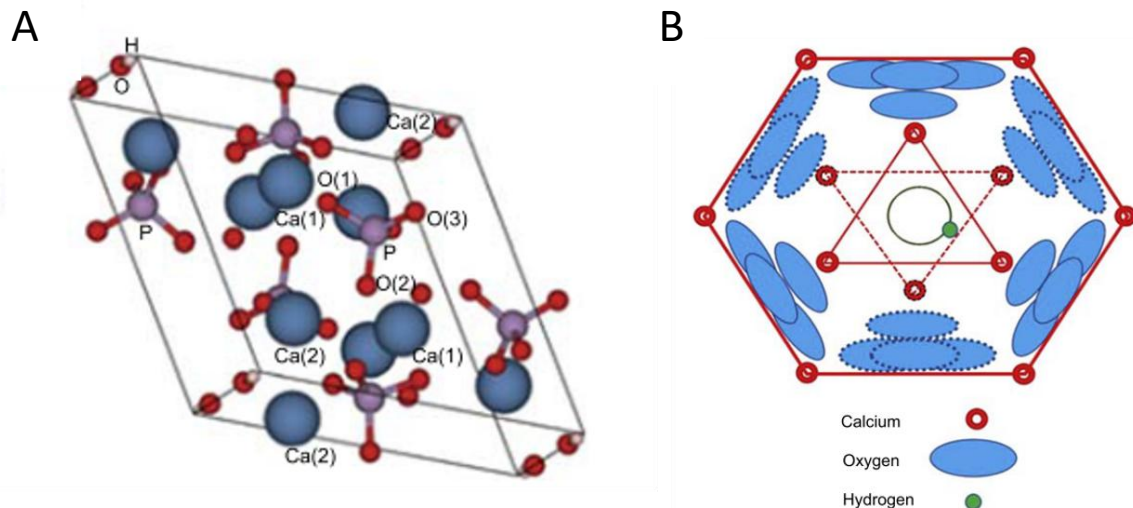


Figura 2. (A) Distribución cristalográfica de los sitios ocupados por los iones Ca^{2+} en la hidroxiapatita, correspondientes a las posiciones 6Ca(II) y 4Ca(I) . (B) Esquema estructural de la celda unitaria de la HA, donde las líneas punteadas indican el plano inferior de referencia estructural [12].

Una característica fundamental de la hidroxiapatita es su elevada capacidad para incorporar diferentes especies iónicas sin alterar significativamente su estructura cristalina. Esta propiedad le permite formar soluciones sólidas mediante procesos de sustitución tanto catiónica como aniónica. Las modificaciones pueden producirse en los sitios ocupados por los iones calcio (Ca^{2+}), los grupos fosfato (PO_4^{3-}) o los grupos hidroxilo (OH^-).

Diversos estudios han reportado que en las posiciones cristalográficas Ca(I) y Ca(II) se reemplazan parcialmente cationes como zinc, hierro, potasio, estroncio, lantano, cadmio, plomo y cobre. De manera similar, aniones como F^- , Cl^- , SiO_4^{4-} y CO_3^{2-} pueden incorporarse en los sitios correspondientes a grupos hidroxilo o

fosfato dentro de la red cristalina (ver Figura 2). La distribución de estos cationes sustituyentes depende principalmente de su radio iónico, ya que el sitio Ca(I) presenta un menor volumen en comparación con el sitio Ca(II).

La incorporación de estos elementos modifica diferentes características estructurales de la HA, afectando parámetros como la estabilidad, el grado de cristalinidad, el tamaño de cristal, la morfología y la solubilidad, así como la liberación iónica en medios biológicos [25]. La estabilidad estructural de la hidroxiapatita sintética está estrechamente relacionada con su alto grado de cristalinidad. Las sustituciones iónicas dentro de su red cristalina producen variaciones en los parámetros estructurales, las cuales dependen principalmente del tamaño del ion incorporado. Los cationes con radios iónicos inferiores al del calcio generan una contracción del volumen cristalino, mientras que aquellos con radios mayores provocan su expansión. Además, se ha reportado que la incorporación de Mg^{2+} y Zn^{2+} favorece la formación de partículas con tamaños de grano más grandes y distribuciones granulométricas menos uniformes.

La respuesta biológica del biomaterial también se puede alterar con la incorporación de estos elementos, ya que intervienen en procesos celulares asociados a la regeneración ósea y al comportamiento del tejido circundante. En muchos casos, sus efectos biológicos y terapéuticos dependen de la concentración liberada en el entorno periimplantario, por lo que el control de su contenido resulta fundamental para el desempeño del implante [32].

2.6. Contaminación bacteriana de dispositivos médicos implantables

Recientemente, se ha prestado una atención cada vez mayor a las infecciones asociadas a los dispositivos implantables. Una de las principales causas de fracaso de los implantes está asociada a la formación de *biofilms* bacterianos sobre la superficie del dispositivo y en los tejidos circundantes. La infección se atribuye a las adherencias bacterianas en la superficie del implante después de la cirugía.

La aparición de infecciones posterior a la colocación de los biomateriales en el cuerpo humano es causada por microorganismos que habitan en o sobre la piel y en las membranas mucosas [4, 33] y, pueden afectar fácilmente el dispositivo o el lugar de instalación durante la intervención quirúrgica.

Por otra parte, la elección de un biomaterial antiinfeccioso apropiado está fuertemente condicionada a diferentes factores, influyendo la ubicación que puede ser externa, parcial o totalmente interna (ver Figura 3), el tiempo de uso, el nivel de contaminación, la probabilidad de infección y la gravedad del daño [8].

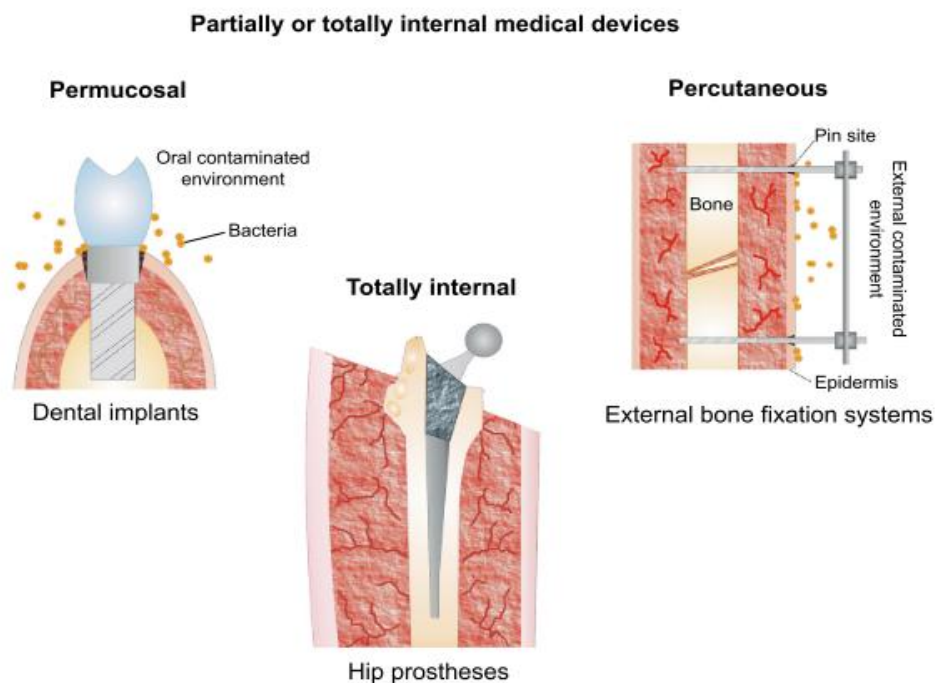


Figura 3. Esquema que representa ejemplos de dispositivos médicos y su ubicación y nivel de invasividad dentro del organismo [8].

En la mayoría de los pacientes, los daños ocasionados por infecciones asociadas a dispositivos requieren la extracción del biomaterial mediante costosas cirugías de reemplazo; además, pueden provocar morbilidad e infecciones sistémicas. A pesar de los avances en la calidad de la atención médica, la probabilidad de infección durante un procedimiento quirúrgico sigue siendo alta.

En este sentido, las infecciones relacionadas con dispositivos biomédicos implantados constituyen un desafío importante en el ámbito quirúrgico y clínico. El desarrollo de contaminación microbiana puede verse influenciado por diversos aspectos, tales como la naturaleza química del biomaterial, las propiedades superficiales del implante, su geometría y diseño, la zona anatómica donde es colocado, la magnitud del procedimiento quirúrgico y la duración de permanencia del dispositivo dentro del cuerpo.

2.6.1 *Biofilms* y su papel en el desarrollo de infecciones postoperatorias

Las infecciones asociadas a los dispositivos pueden progresar rápidamente a medida que las bacterias planctónicas (flotantes) se adhieren a la interfaz del implante evolucionando en el tiempo a arquitecturas tridimensionales específicas denominadas *biofilms*.

Los *biofilms* son aglomerados organizados de múltiples especies de células microbianas que se encuentran incrustadas en una matriz polimérica extracelular. La matriz permite el intercambio genético, la comunicación y proporciona un suministro de nutrientes para las bacterias. Además, actúa como una barrera biológica que protege a las bacterias de los antibióticos y las respuestas inmunitarias del huésped.

Los microorganismos tienen una carga negativa en su superficie y diferentes grados de hidrofobicidad [34]. Basado en esas características, generalmente se describe la adhesión bacteriana en varias etapas que dan como resultado la formación de *biofilms* como se muestra en la Figura 4.

En primer lugar, ocurre la interacción inicial entre las superficies que puede ser un proceso rápido y reversible (etapa 1). Posteriormente, las bacterias comienzan la producción y excreción de polímeros de matriz, que permiten a las células cementarse a la superficie (etapa 2). En esta etapa tienen lugar interacciones entre proteínas de la superficie bacteriana y moléculas de unión en el material.

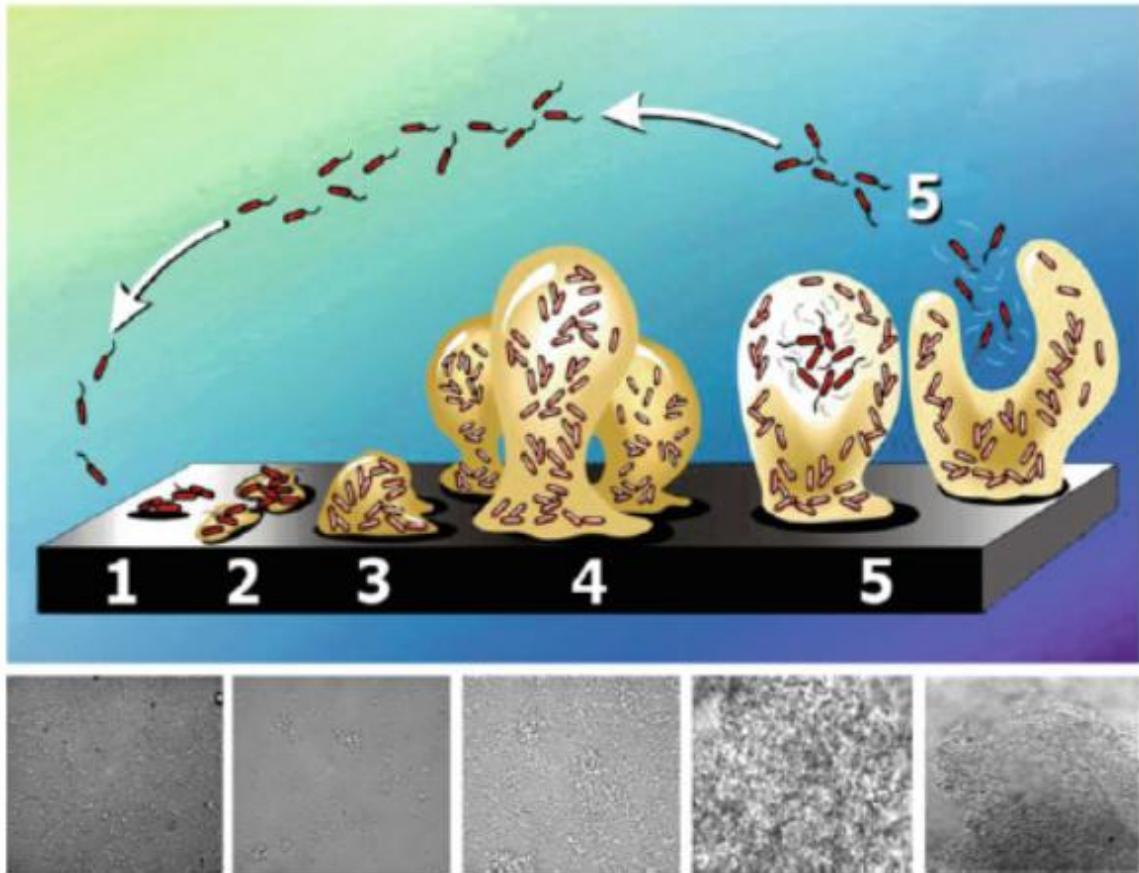


Figura 4. Proceso de colonización de una superficie partiendo de la adhesión bacteriana individual. Etapas en el desarrollo y dispersión de la biopelícula se muestran de derecha a izquierda. El panel inferior muestra microfotografías de bacterias en cada una de las cinco etapas que se muestran en el esquema [35].

El crecimiento prolongado da como resultado el desarrollo de microcolonias, compuestas por células enredadas en una matriz similar a un gel (etapa 3 y 4). A medida que las microcolonias continúan aumentando de tamaño, las células en el interior experimentarán hacinamiento, menor disponibilidad de nutrientes y mayor concentración de productos de desecho, toxinas y metabolitos excretados, junto con cambios en su entorno fisicoquímico (pH, fuerza iónica, capacidad amortiguadora, etc.). Las células reconocen estos cambios y tiene lugar la dispersión (etapa 5). Es probable que la respuesta de dispersión del *biofilms* sea un mecanismo para escapar de estas condiciones, otorgándole la posibilidad de migrar a un entorno más favorable [35].

2.6.2 Microorganismos asociados a infecciones

Las infecciones postoperatorias generalmente son de naturaleza monomicrobiana y son causadas en aproximadamente un 75 % por microorganismos aerobios Gram positivos. Las bacterias Gram negativas están presentes de un 30 a 43 % de los casos, mientras que las infecciones por *Staphylococcus aureus* se atribuyen entre un 12 a 23 % [36]. Las incidencias de infección por *S. aureus* son cada vez más preocupantes con la aparición de cepas resistentes a múltiples antibióticos.

Los organismos responsables de las infecciones asociadas con los implantes ortopédicos suelen ser infecciones oportunistas y el 16 % de estas infecciones son polimicrobianas. *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* son los principales agentes, seguidos de *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis*.

En el entorno oral, la caries dental constituye una de las patologías más prevalentes a nivel mundial, siendo *Streptococcus mutans* uno de sus principales agentes etiológicos [37]. Este patógeno cariogénico posee una notable capacidad de adhesión a superficies ricas en HA, lo que favorece la formación y estabilidad de *biofilms* bacteriano [38]. Además, presenta un metabolismo altamente acidogénico y acidúrico que promueve la desmineralización del tejido dental y puede comprometer la estabilidad superficial de biomateriales basados en fosfatos de calcio. Su capacidad para sobrevivir en ambientes ácidos y establecer interacciones con otros microorganismos del ecosistema oral favorece la expresión de factores de virulencia y su persistencia en el *biofilms* [39]. Especies del género *Streptococcus*, como *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis* y *S. oralis*, actúan como colonizadores primarios de superficies biomiméticas, incluida la HA sintética, facilitando la posterior adhesión de patógenos periodontales y contribuyendo al desarrollo de infecciones periimplantarias [40]. Debido a estas características, *S. mutans* se emplea ampliamente como microorganismo modelo

para evaluar la adhesión bacteriana y la formación de *biofilms* en materiales dentales e implantables.

2.6.3 Métodos para prevenir o reducir la ocurrencia de infecciones postoperatorias

Cuando se produce la colonización por microorganismos infecciosos, la administración sistémica de antibióticos no siempre alcanza concentraciones eficientes en el sitio de la infección, principalmente debido al flujo sanguíneo deficiente en el tejido óseo [21]. Si se aumentan las dosis, las moléculas de antibióticos pueden inactivarse por la variación química y del pH del torrente sanguíneo del huésped y pueden causar efectos secundarios acumulativos en el organismo conllevando a inconvenientes posteriores para el resto del cuerpo.

Por otro lado, las bacterias podrían desarrollar una resistencia a los antibióticos, lo que en última instancia conduce al fracaso de los implantes o incluso a la mortalidad de los pacientes [34]. Además, la administración sistémica o local de antibióticos puede causar efectos secundarios graves como dolor abdominal, diarrea, erupciones cutáneas, ototoxicidad y toxicidad renal.

Con el propósito de minimizar o evitar la contaminación microbiana en biomateriales, se han propuesto diversas estrategias [8], algunas de las cuales se ilustran en la Figura 5. Las mismas incluyen modificaciones morfológicas o en las propiedades físicas y química de la superficie de los dispositivos implantados. No obstante, hasta el momento no existe un tratamiento capaz de eliminar de manera rápida y total los *biofilms* ni de impedir completamente la reaparición de infecciones. En consecuencia, el desempeño clínico a largo plazo de los implantes depende en gran medida de las propiedades antimicrobianas que presenten los materiales utilizados.

Estos desafíos, junto con la complejidad y diversidad de los nuevos dispositivos médicos implantables, están impulsando la evolución de nuevos biomateriales y superficies que superan las infecciones bacterianas. Sin embargo, a pesar de la

creciente importancia de los biomateriales antimicrobianos, los materiales y métodos no están ampliamente disponibles en el campo de los dispositivos médicos.

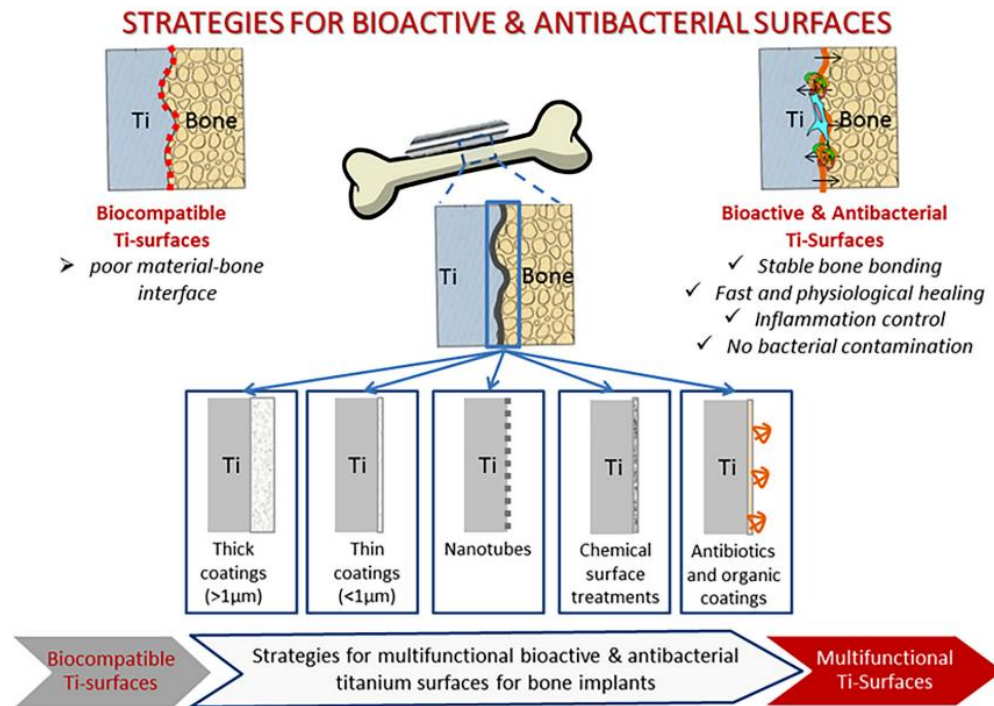


Figura 5. Estrategias para impartir propiedades bioactivas y antibacterianas a las superficies de Ti a través de diferentes tipos de revestimientos o modificaciones superficiales [17].

El uso de películas delgadas bioactivas antimicrobianas se ha convertido en uno de los procesos preferidos para prevenir la adhesión microbiana inicial, la colonización y para conferir resistencia microbiana a biomateriales y dispositivos médicos [33]. En los últimos años, el empleo de agentes antimicrobianos inorgánicos principalmente iones metálicos y nanopartículas, así como sus óxidos han sido considerados. Varios estudios *in vitro* informaron que el uso de iones de plata, cobre y zinc en los recubrimientos juegan un papel importante en la prevención o minimización de la adhesión bacteriana inicial.

2.7. Papel del zinc en la regeneración ósea

En el organismo humano, una cantidad significativa de zinc (0-39 ppm) se localiza en tejidos mineralizados, principalmente en huesos y dientes, donde forma parte de la composición de apatitas biológicas [12]. Se considera un elemento traza indispensable para múltiples funciones biológicas, especialmente aquellas relacionadas con el crecimiento, desarrollo y mantenimiento del tejido óseo.

A nivel fisiológico, el zinc interviene en una gran variedad de procesos celulares y metabólicos, debido a su participación en funciones esenciales, tales como la síntesis proteica y los mecanismos de replicación genética de ADN y ARN [16]. Además, se reconoce como uno de los metales de transición más abundantes en los sistemas biológicos, solo superado por el hierro [33].

En el ámbito de la regeneración ósea, se ha demostrado que el Zn^{2+} favorece la actividad osteoblástica estimulando los procesos de mineralización mediante el incremento de calcio sobre las células madre mesenquimales. Paralelamente, puede disminuir la actividad de los osteoclastos, contribuyendo así al equilibrio del remodelado óseo. También se han reportado propiedades antiinflamatorias, antibacterianas y antifúngicas asociadas a este ion, lo que incrementa su interés en el diseño de biomateriales para aplicaciones [16].

2.8. Hidroxiapatita dopada con Zn^{2+}

Diversas investigaciones han demostrado que las propiedades fisicoquímicas y biológicas de la HA pueden modificarse y optimizarse mediante la incorporación de distintos elementos dopantes, entre ellos Na, Sr, Mg, K, Mn, Ag, Ce, Eu, Cu y Zn. Particularmente, la incorporación de zinc en materiales basados en hidroxiapatita ha despertado gran interés debido a su potencial para mejorar la bioactividad y conferir propiedades antibacterianas.

En el año 2010 Stanic y colaboradores [41] reportaron la obtención de nano cristales de HA dopados con Zn^{2+} y demostraron su actividad antimicrobiana utilizando dos de las cepas bacterianas más comunes y una cepa fúngica. Por

otra parte, Thian y colaboradores [42] en 2013 prepararon polvos de HA sustituidos con Zn que contenían 1.6 % en peso de Zn y confirmaron su eficacia antibacteriana, al reportar una disminución significativa en el número de bacterias *S.aureus* viables después de entrar en contacto con Zn-HA. Sin embargo, aunque se ha informado que los polvos de Zn-HA exhiben propiedades antimicrobianas, estas propiedades no se presentan eficazmente cuando se encuentran en forma de recubrimientos. Esta disminución en la actividad antibacteriana pudiera estar ocasionada por una menor liberación de los iones Zn del sistema del recubrimiento o por la cinética de la liberación.

Las propiedades estructurales, antimicrobianas, hemolíticas y la bioactividad de nanopartículas de HA y Zn-HA para su aplicación médica fueron estudiadas por Tank y colaboradores [43] en el año 2014. Las muestras dopadas con zinc se prepararon con adiciones en porcentaje en peso de zinc de: 2 %, 5 % y 10 %. A mayores porcentajes de zinc se evidenció un mejor potencial inhibidor contra *Micrococcus luteus* y *S. aureus* (gram positivas) y actividad moderada contra *Shigella flexneri* (gram negativa).

Para obtener recubrimientos de Zn-HA, han sido mayormente utilizados métodos electrolíticos, electroforéticos, sol-gel y plasma-spray [12, 44]; sin embargo, como desventaja de su empleo, se reporta mala adhesión al sustrato y composición no homogénea [14].

Adicionalmente, Iconaru y colaboradores en 2017 realizaron la síntesis, caracterización y evaluación antifúngica de recubrimientos de Zn-HA obtenidos por el método sol-gel y depositados sobre sustratos de Si y Ti mediante el método de recubrimiento por inmersión [45]. La evaluación se realizó contra una cepa microbiana de *Candida albicans* bajo exposición a la luz del día, luz ultravioleta y en la oscuridad para comprender mejor la influencia de los iones de Zn^{2+} y la iluminación en la erradicación de las células bacterianas. Como resultado, se observó una ligera disminución en la tasa de supervivencia de las células bacterianas en sustratos recubiertos con Zn-HA, fenómeno atribuido a los iones

de zinc de las capas. El análisis de los resultados los llevó a concluir que el sustrato de Ti recubierto de Zn-HA fue el más eficaz contra *C. albicans* independientemente de la iluminación utilizada.

En otro estudio realizado ese mismo año, *Porphyromonas gingivalis* se utilizó para probar la propiedad antibacteriana de recubrimientos Zn-CaP y recubrimientos dopados con flúor y zinc (FZn-CaP), ya que, es el organismo más común en infecciones subgingivales y periodontales, incluida la periimplantitis. Los resultados de esta investigación desarrollada por Kulkarni y colaboradores [14] arrojaron que el recubrimiento de FZn-CaP fue el más efectivo para inhibir la adhesión bacteriana, pero no hubo diferencias significativas entre los grupos de Zn-CaP y FZn-CaP. También, se estudió la formación de *biofilms* o colonización de *P. gingivalis* en discos de Ti, no recubiertos y recubiertos. A los 3 días, Zn-CaP presentó una reducción del 89 % y a los 7 días, se encontró que el recubrimiento de Zn-CaP era más efectivo. En este estudio fue utilizada una concentración de 5 M de iones Zn^{2+} , mas no fue evaluada la citotoxicidad ni la adherencia de los recubrimientos, propiedades que se consideran sumamente importantes, teniendo en cuenta que se ha reportado que la cristalinidad disminuye con el aumento de zinc.

En 2017 Predoi y colaboradores [46] reportaron la obtención de hidroxiapatita modificada con bajas concentraciones de Zn mediante un procedimiento de coprecipitación. La caracterización estructural realizada por Difracción de rayos X (XRD) y Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) confirmó la preservación de la estructura hexagonal característica de la hidroxiapatita tras la incorporación del ion Zn^{2+} . Los resultados indicaron además que la sustitución parcial de Ca^{2+} por Zn^{2+} genera variaciones tanto en los parámetros de red como en el tamaño de cristalito de la fase apatítica. Asimismo, se observó un ensanchamiento progresivo de los picos de difracción a medida que aumentaba la concentración de zinc en las muestras sintetizadas, comportamiento asociado a una disminución del grado de cristalinidad del material.

Posteriormente, en 2019, [9] desarrollaron recubrimientos de Zn-HA utilizando la técnica sol-gel. Las capas obtenidas fueron depositadas sobre sustratos de titanio mediante recubrimiento por centrifugación y posteriormente sometidas a tratamientos térmicos a 500 °C y 700 °C. Los análisis por XRD evidenciaron la presencia de la fase hexagonal correspondiente a la hidroxiapatita en todas las muestras estudiadas, observándose además una influencia significativa de la temperatura de recocido sobre las características estructurales del recubrimiento. Adicionalmente, los patrones de difracción no mostraron señales atribuibles a impurezas o fases secundarias de zinc metálico.

De los ensayos de biocompatibilidad que realizaron se obtuvo como resultado que Zn-HA no presentaban ninguna toxicidad hacia células *HeLa*. La citotoxicidad de las capas de Zn-HA contra microorganismos enfatizó que los recubrimientos exhibieron un efecto inhibitor hacia las células bacterianas de *S. aureus* y también hacia las células fúngicas de *C. albicans*.

Por otra parte, Anwar y colaboradores [47] mostraron que hidroxiapatitas sustituidas con zinc obtenidas por síntesis de flujo continuo revelaron un nivel significativo de actividad antibacteriana contra cepas bacterianas de *S.aureus* ATCC 43300 y *E. coli* ATCC 12435.

Una pequeña cantidad de zinc (< 1 % en peso) en la HA no tiene efecto citotóxico y muestra una excelente opción para implantes de aloinjerto óseo y un autoinjerto es una idea emocionante en el campo de la investigación biomédica [16]. La reducción de la eficacia antibacteriana descrita por algunos autores para el caso de los recubrimientos se debe probablemente a que se liberan de la superficie menores cantidades de Zn. Por otra parte, una mayor liberación de Zn también se asocia a un mayor riesgo de citotoxicidad. Ha sido reportado que una concentración elevada de zinc pudiera ocasionar un efecto neurotóxico, lo que conlleve a la inhibición de las actividades enzimáticas.

A menudo se informa de una actividad antibacteriana dependiente de la dosis para los agentes antibacterianos inorgánicos, pero simultáneamente casi siempre está presente un efecto citotóxico.

2.9. Procesamiento biomimético de recubrimientos de fosfatos de calcio

En las últimas décadas se han desarrollado múltiples técnicas para la producción de recubrimientos biocerámicos basados en hidroxiapatita y otros fosfatos de calcio. El interés por estas metodologías ha estado orientado a la obtención de capas homogéneas, reproducibles y con adecuada adherencia sobre diferentes sustratos metálicos. Entre las técnicas más utilizadas se encuentran la deposición electroquímica, la oxidación por microarco, el método sol-gel y la proyección por plasma. Sin embargo, muchos de estos procedimientos presentan limitaciones asociadas al empleo de altas temperaturas, la aparición de microestructuras heterogéneas, pérdida de cristalinidad o baja resistencia mecánica del recubrimiento [33].

Dentro de las alternativas propuestas, el procesamiento biomimético ha adquirido gran relevancia debido a su simplicidad, bajo costo y capacidad para reproducir condiciones semejantes a las del entorno fisiológico. Este método, introducido por Kokubo y colaboradores en la década de 1990 [48], permite recubrir materiales con geometrías complejas, superficies porosas y sustratos sensibles a la temperatura, incluyendo materiales no conductores. Además, favorece la obtención de depósitos más homogéneos y posibilita la incorporación de moléculas bioactivas, proteínas y otros agentes funcionales [33] [49]. Mediante esta técnica se han reportado recubrimientos densos de apatita con espesores inferiores a 30 μm y estructuras cristalinas similares a las del tejido óseo.

El procedimiento biomimético se basa en la inmersión del sustrato en soluciones que simulan la composición iónica del plasma sanguíneo humano, conocidas como fluidos biológicos simulados (SBF). Durante el proceso se reproducen

condiciones fisiológicas de temperatura y pH, generalmente alrededor de 37 °C y pH 7.4, favoreciendo así la nucleación y crecimiento de fosfatos de calcio sobre la superficie del material [23].

Las primeras variantes de esta metodología requerían tiempos de inmersión prolongados, comprendidos entre 7 y 21 días, lo cual representaba una limitación importante para su implementación a escala industrial [50]. Inicialmente, las soluciones SBF contenían concentraciones de calcio y fosfato diseñadas para mantener relaciones $\text{Ca}^{2+}/\text{HPO}_4^{2-}$ cercanas a 2.5, reproduciendo de manera aproximada la composición iónica del plasma humano. Posteriormente, diferentes investigaciones propusieron modificaciones en la composición del SBF con el propósito de acelerar la cinética de deposición [51].

Entre las principales modificaciones realizadas se encuentra el incremento de la concentración de iones calcio y fosfato en la solución [28]. Mientras que el SBF convencional presenta concentraciones de Ca^{2+} cercanas a 2.5 mmol/l, estudios posteriores emplearon soluciones más concentradas, como SBFX5 y SBFX10, con valores de hasta 25 mmol/l [52, 53]. Este aumento favorece la sobresaturación de la disolución y acelera la precipitación de las fases apatíticas. De manera simultánea, suele mantenerse constante la relación entre calcio y fosfato para controlar la composición del depósito obtenido (manteniendo la relación $\text{Ca}^{2+}/\text{HPO}_4^{2-} = 2.5/1$).

Asimismo, el contenido de bicarbonato en la solución influye significativamente sobre la velocidad de crecimiento, la composición de fases y el grado de cristalinidad de los recubrimientos formados. Concentraciones reducidas de HCO_3^- favorecen la formación de estructuras cristalinas, mientras que incrementos en este ion pueden inducir depósitos amorfos. La presencia de bicarbonato también puede promover la incorporación de carbonato en la estructura apatítica, conduciendo a la formación de hidroxiapatita carbonatada [54].

Los mecanismos involucrados en la precipitación de fosfatos de calcio a partir de soluciones acuosas son complejos y pueden involucrar diversas fases intermedias. La formación de apatitas biológicamente relevantes, como OCP, CDHA y HA, suele ocurrir mediante etapas transitorias donde participan compuestos precursores tales como DCPA, DCPD y OCP.

Para lograr la deposición biomimética sobre titanio es necesario realizar previamente tratamientos de activación superficial, debido a que este material no posee por sí mismo una bioactividad suficiente para inducir espontáneamente la nucleación de apatita [55]. Estos tratamientos favorecen la formación de capas superficiales de óxidos, hidróxidos o titanatos capaces de actuar como sitios activos para el crecimiento del recubrimiento. Se ha reportado que grupos funcionales como Ti-OH promueven la nucleación heterogénea de apatita en soluciones SBF [56], particularmente cuando el TiO_2 se encuentra en fase anatasa, ya que esta estructura presenta mayor capacidad inductora que las fases amorfas o tipo rutilo [57].

Entre las estrategias utilizadas para incrementar la densidad de grupos hidroxilo superficiales se encuentran el grabado ácido, los tratamientos alcalinos con hidróxido de sodio y la oxidación con peróxido de hidrógeno [58, 59]. Una vez activada, la superficie del titanio interactúa con los fluidos biológicos adsorbiendo grupos OH^- y generando sitios cargados negativamente (Ti-O^-). Estos sitios atraen iones Ca^{2+} presentes en el medio, favoreciendo la formación de una capa rica en calcio sobre la superficie. Posteriormente, los grupos fosfato se incorporan al depósito, originando una fase amorfa de fosfato de calcio que, con el tiempo, evoluciona hacia una estructura apatítica cristalina termodinámicamente más estable [60].

Después de la deposición, los recubrimientos pueden someterse a tratamientos posteriores con el propósito de mejorar sus propiedades estructurales y funcionales. Entre ellos, los tratamientos térmicos o recocidos favorecen la cristalización de las fases obtenidas, incrementan la estabilidad del recubrimiento,

mejoran la resistencia a la corrosión y disminuyen las tensiones residuales presentes en la capa depositada [55].

CAPÍTULO 3

DISEÑO Y DESARROLLO DE EXPERIMENTOS

3.1 Metodología general de procesamiento y experimentación

La Figura 6 muestra el esquema general de la metodología desarrollada para el cumplimiento de los objetivos planteados. La ruta experimental se compone de varias etapas de procesamiento que se describen de forma específica en los siguientes apartados.



Figura 6. Procedimiento experimental.

3.2 Preparación inicial del material

Barras cilíndricas de la aleación Ti6Al4V ELI adquiridas en la empresa *United Performance Metals Inc.* constituye la materia prima utilizada como sustrato en esta investigación. Las mismas fueron cortadas empleando un Torno de Micromecanizado tipo CNC para obtener discos de 6.35 mm de diámetro y 3.50 mm de espesor.

Para eliminar contaminantes superficiales provenientes del proceso de maquinado, tales como aceites y lubricantes de corte, las probetas de Ti6Al4V fueron sometidas a un procedimiento de limpieza previo. Inicialmente, las muestras se lavaron durante 15 min en una solución acuosa de detergente Alconox (*Alconox Inc.*) al 2 % (20 g de detergente/l de agua) empleando agitación rotatoria. Posteriormente, se realizó el enjuague con agua a chorro para retirar los residuos del detergente. Como etapa final de limpieza, las probetas fueron

tratadas en baño ultrasónico con agua destilada grado reactivo (*CTR Scientific*) durante 5 min y posteriormente secadas con aire caliente.

3.3 Ataque químico

Con el fin de modificar la superficie de las probetas de Ti6Al4V, se aplicó un tratamiento de grabado ácido (GA) basado en el procedimiento descrito por Wang y colaboradores [5]. Las muestras fueron inmersas durante 20 min a 80 °C en una solución compuesta por ácido clorhídrico (HCl) y ácido sulfúrico (H₂SO₄) con relación volumétrica 1:1, durante 20 min a una temperatura de 80 °C. Al finalizar el proceso, las probetas se extrajeron cuidadosamente de la solución mediante pinzas y se enjuagaron con abundante agua destilada para remover restos de ácido. Posteriormente, el secado de las muestras se realizó a temperatura ambiente. Este tratamiento genera una superficie con mayor rugosidad y presencia de poros que favorece la posterior deposición de recubrimientos.

3.4 Activación superficial

Posterior al tratamiento en solución ácida, se llevó a cabo la activación superficial de las probetas empleando tratamientos sucesivos en disoluciones de hidróxido de sodio (NaOH) y cloruro de calcio (CaCl₂). La solución alcalina utilizada en el tratamiento superficial se preparó empleando 40 g de NaOH disueltos en 100 ml de agua destilada, obteniéndose una concentración de 10 M. El procedimiento se realizó a 60 °C utilizando una plancha calefactora para el control de temperatura. Una vez estabilizada la temperatura, cada probeta fue colocada individualmente en tubos de ensayo que contenían 5 ml de la solución alcalina, manteniéndose en inmersión durante 24 h. Finalizado el tratamiento, las muestras fueron retiradas y lavadas con abundante agua destilada para eliminar residuos del reactivo.

Para obtener la solución de CaCl₂ (1 M) se disolvieron 11.1 g de CaCl₂ en 100 ml de agua destilada. Posteriormente, las probetas previamente tratadas con NaOH fueron colocadas individualmente en tubos de ensayo que contenían dicha solución y mantenidas a una temperatura de 40 °C durante 24 h. Concluido el

tratamiento, las muestras se retiraron de la solución, se lavaron con agua destilada para eliminar residuos superficiales y finalmente se secaron a temperatura ambiente.

A continuación, las probetas fueron introducidas en un horno mufla y sometidas a un tratamiento térmico a 600 °C durante 1 h. Tras completar el tiempo establecido, las muestras permanecieron dentro del horno para permitir un enfriamiento lento y controlado hasta temperatura ambiente. Como etapa final, se realizó un tratamiento hidrotérmico (TH₂O) mediante la inmersión en agua desionizada a 80 °C durante 24 h. Posteriormente, las muestras se enjuagaron y se dejaron secar al ambiente.

3.5 Deposición biomimética.

3.5.1. Obtención de los recubrimientos CaP

Para la preparación de las soluciones empleadas en la deposición de recubrimientos apatíticos se evaluaron dos variantes experimentales. Como referencia se utilizó la metodología propuesta por Li y colaboradores [61], sin embargo, en este trabajo se incrementó la concentración de iones calcio a valores equivalentes a 7 y 10 veces respecto al contenido presente en el SBF descrito por dichos autores. Las soluciones se prepararon utilizando cloruro de calcio (CaCl₂), fosfato monosódico (NaH₂PO₄) y bicarbonato de sodio (NaHCO₃) [62]. Las cantidades de las sales empleadas y las concentraciones correspondientes para preparar 500 ml de solución se presentan en la Tabla 1 y Tabla 2 respectivamente.

Tabla 1. Masas de los precursores químicos empleados en la preparación de las soluciones.

COMPOSICIÓN SOLUCIÓN	MASA DE LAS SALES (g)		
	CaCl ₂	NaH ₂ PO ₄	NaHCO ₃
SBFX7	0.9711	0.2625	0.1278
SBFX10	1.3873	0.3749	0.1890

Tabla 2. Concentración de los precursores químicos empleados en la preparación de las soluciones.

COMPOSICIÓN SOLUCIÓN	CONCENTRACIÓN DE SALES (mmol/l)		
	CaCl ₂	NaH ₂ PO ₄	NaHCO ₃
SBFX7	17.50	4.4	3.04
SBFX10	25	6.25	4.50

Inicialmente, se colocó el agua destilada en un vaso de precipitados, manteniendo el sistema bajo agitación constante de 100 rpm y a una temperatura de 36.5 °C mediante una plancha calefactora. Posteriormente, se incorporaron de manera secuencial las sales de CaCl₂ y NaH₂PO₄, dejando un intervalo de 5 min entre cada adición para favorecer su disolución y homogenización en el medio.

Cinco minutos después de añadir la última sal, las probetas fueron introducidas en la solución de deposición. Transcurridos 30 min adicionales, se agregó NaHCO₃ al sistema. Durante todo el proceso se conservaron constantes tanto la temperatura como la velocidad de agitación. Al concluir el tiempo de tratamiento, las muestras se retiraron de la solución, se lavaron con agua desionizada y finalmente se dejaron secar a temperatura ambiente.

Con el fin de evaluar la influencia de la concentración de la solución y el tiempo de deposición sobre los recubrimientos obtenidos se realizaron cuatro experimentos como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Variantes de depósitos empleadas en el estudio.

VARIANTE DEPOSICIÓN	COMPOSICIÓN SOLUCIÓN	TIEMPO DE DEPOSICIÓN (h)
VD1	SBFX7	4
VD2	SBFX7	6
VD3	SBFX10	4
VD4	SBFX10	6

De los resultados obtenidos se seleccionó la variante con mejores resultados para someterse al proceso de inclusión de zinc.

3.5.2. Obtención de recubrimientos de apatitas con inclusión de iones Zn^{2+}

Para incorporar iones Zn^{2+} en los recubrimientos, se empleó el mismo procedimiento de preparación de solución descrito en el apartado anterior. Como precursor de zinc se utilizó cloruro de zinc ($ZnCl_2$), el cual fue incorporado al medio de reacción 3 min después de la adición de la última sal. Se evaluaron tres concentraciones de Zn, indicadas en la Tabla 4 con el propósito de analizar su influencia sobre las siguientes características de los recubrimientos obtenidos:

- ✓ Contenido de zinc en la capa.
- ✓ Viabilidad celular.
- ✓ Actividad antibacteriana.
- ✓ Liberación de iones Zn^{2+} al medio.

Tabla 4. Composición de las soluciones empleadas para obtener recubrimientos con Zn^{2+} .

VARIANTE DEPOSICIÓN	MASA (mg)	CONCENTRACIÓN (mmol/l)
VDZn1	22	0.3
VDZn2	82	1.2
VDZn3	136	2.0

3.5.3. Estabilización térmica de los recubrimientos

Una vez obtenidas las capas apatíticas, las probetas fueron sometidas a un tratamiento térmico en horno mufla con el propósito de favorecer la estabilización y cristalización de las fases depositadas. El proceso inició con el calentamiento hasta 500 °C, temperatura que se mantuvo durante 30 min. Posteriormente, se elevó la temperatura hasta 800 °C, conservándose bajo esta condición durante 1

h. Finalizado el ciclo térmico, las muestras permanecieron dentro del horno hasta su enfriamiento completo a temperatura ambiente.

3.6 Estrategia de caracterización de superficies y recubrimientos

La evaluación de las superficies modificadas y de los recubrimientos obtenidos se realizó mediante un conjunto de técnicas complementarias orientadas a analizar su morfología, composición química, química superficial y estructura cristalina. Esta estrategia permitió estudiar tanto los cambios inducidos por los tratamientos previos aplicados sobre las probetas de Ti6Al4V como las características fisicoquímicas de las capas apatíticas formadas posteriormente.

3.6.1 Análisis morfológico y topográfico

La morfología y topografía de las superficies obtenidas fueron evaluadas mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM del inglés *Field Emission Scanning Electron Microscopy*) utilizando un equipo HITACHI SU8000. Las observaciones se realizaron utilizando un voltaje de aceleración de 2 kV y un detector de electrones secundarios en la lente, con el fin de obtener imágenes de alta resolución de las modificaciones superficiales y de los recubrimientos depositados.

3.6.2 Análisis semicuantitativo de composición elemental

La composición elemental de las superficies fue analizada de manera semicuantitativa mediante espectroscopía de energía dispersiva de rayos x (EDS del inglés *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*). El detector se encontraba acoplado a un microscopio electrónico de barrido (SEM, JEOL JSM-6510LV). Para este análisis se utilizó un voltaje de aceleración de 20 kV, lo que permitió identificar los elementos presentes en las superficies tratadas y en los recubrimientos obtenidos.

3.6.3 Análisis químico superficial

La composición elemental superficial y los estados químicos de los elementos presentes fueron determinados mediante espectroscopía de fotoelectrones inducidos por rayos x (XPS, del inglés *X-ray Photoelectron Spectroscopy*) empleando un equipo K-alpha™ Thermo Scientific™ con radiación Al K α con energía de fotón de 1486.68 eV. Las energías de enlace fueron calibradas tomando como referencia la señal C 1s a 284.6 eV.

Se realizaron espectros generales y análisis de alta resolución para los elementos P, Zn, Na, Ca, O y C en cada una de las superficies evaluadas. Posteriormente, el análisis se repitió después de aplicar un decapado con iones Ar⁺ durante 30 s, a una velocidad de 1.19 nm/s, con el propósito de obtener información química a mayor profundidad respecto a la superficie externa. El procesamiento de los espectros se llevó a cabo utilizando el software Thermo Scientific™ Advantage™.

3.6.4 Identificación de fases cristalinas

Las fases presentes en las superficies procesadas fueron analizadas mediante difracción de rayos x (XRD, del inglés *X-ray Diffraction*) utilizando un equipo PANalytical Empyrean. Los difractogramas se registraron en un intervalo de 10 a 90° en 2 θ , utilizando radiación Cu K α . El equipo operó a 45 kV y 40 mA, con una velocidad de adquisición de 0.013 °/10 s. Esta técnica permitió identificar la presencia de fases apatíticas y evaluar los cambios estructurales asociados a los tratamientos aplicados.

3.6.5 Análisis de rugosidad mediante perfilometría de contacto

Los cambios en la textura superficial fueron evaluados a partir de mediciones perfilométricas realizadas con un perfilómetro de contacto (SJ-210, modelo 178-563-01A, Mitutoyo Corporation, Kawasaki, Japón). Las mediciones se realizaron tanto en las superficies tratadas como en las superficies recubiertas, con el propósito de evaluar el efecto de los tratamientos de modificación superficial y de la deposición de los recubrimientos.

Se evaluaron los parámetros de rugosidad Ra, Rz y Rq. El parámetro Ra representa la desviación media aritmética del perfil superficial respecto a la línea media, por lo que proporciona una estimación general de la textura superficial. Por su parte, Rq corresponde a la raíz cuadrada del promedio de las desviaciones cuadráticas del perfil, otorgando mayor peso a las irregularidades superficiales de mayor amplitud, por lo que resulta más sensible a valores extremos que Ra. Finalmente, Rz, definido como la altura máxima del perfil, describe la distancia vertical entre el pico más alto y el valle más profundo dentro de la longitud de evaluación, aportando información sobre las variaciones máximas pico-valle de la superficie.

En conjunto, estos parámetros permiten una caracterización más completa de los cambios topográficos inducidos por los tratamientos aplicados sobre las superficies evaluadas.

3.7 Evaluación biológica *in vitro* de las superficies desarrolladas

3.7.1 Viabilidad celular mediante ensayo de citotoxicidad

La respuesta celular frente a las superficies obtenidas se analizó mediante el ensayo colorimétrico de reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), de acuerdo con los lineamientos establecidos en la norma ISO 10993-5:2009, *Biological Evaluation of Medical Devices, Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity*, Anexo C. Esta prueba permite estimar la viabilidad celular a partir de la actividad metabólica mitocondrial de las células expuestas a los materiales evaluados.

El principio del ensayo se basa en la capacidad de las células viables para reducir el MTT a cristales insolubles de formazán, mediante la acción de enzimas mitocondriales, principalmente la succinato deshidrogenasa. Por tanto, la cantidad de formazán producido se relaciona directamente con la actividad metabólica celular y se emplea como indicador indirecto de viabilidad.

Para este estudio se utilizaron dos líneas celulares humanas: fibroblastos gingivales primarios (HGF, *Primary Gingival Fibroblast*, ATCC® PCS-201-108™) y fibroblastos dérmicos humanos (HDF, *Human Dermal Fibroblast*, ATCC® PCS-201-012). Las células fueron cultivadas en *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Se prepararon suspensiones celulares con concentraciones aproximadas de 4×10^4 células/ml para HGF y 5×10^4 células/ml para HDF.

Posteriormente, se adicionó 1 ml de suspensión celular en cada pozo y las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C en atmósfera humidificada con 5 % de CO₂, utilizando una incubadora Thermo Scientific Series 8000 WJ. Este periodo permitió la adhesión inicial de las células sobre la superficie del pozo.

Transcurrida la incubación inicial, las muestras de los materiales a evaluar fueron colocadas en los pozos correspondientes. De manera paralela, se incluyeron controles negativos empleando medio suplementado con 100 µl de FBS y controles positivos con 300 µl de Tritón al 5 %. Las placas fueron nuevamente incubadas durante 24 h bajo las mismas condiciones de temperatura y atmósfera.

Finalizado el tiempo de exposición, se retiraron las muestras y el medio de cultivo. A continuación, se adicionaron 200 µl de medio fresco y 60 µl de solución de MTT en cada pozo. Las placas se mantuvieron en incubación durante 4 h, protegidas de la luz, para favorecer la formación de cristales de formazán como resultado de la reducción metabólica del MTT.

Posteriormente, la solución de MTT fue retirada y los cristales formados se solubilizaron mediante la adición de 200 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) por pozo. La absorbancia se cuantificó a 570 nm utilizando un lector de microplacas Thermo Scientific MultiSkan GO. Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad celular, calculado mediante la Ecuación (1):

$$\% Viabilidad Celular = \frac{D.O \text{ Células Tratadas}}{D.O \text{ Células Control}} \times 100\% \quad (1)$$

Donde D.O. corresponde a la densidad óptica registrada.

3.7.2 Actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*

La capacidad antibacteriana de las superficies obtenidas se evaluó mediante un ensayo *in vitro* empleando la bacteria grampositiva *S. mutans*. Esta especie fue seleccionada debido a su relevancia en el entorno oral, ya que forma parte de la microbiota de la cavidad bucal y participa activamente en la formación de *biofilms* dentales, además de estar asociada con el desarrollo y progresión de la caries dental.

Para la realización del experimento, se sembró un inóculo de la cepa bacteriana en medio *Brain Heart Infusion* (BHI) y se incubó durante 24 h a 37 °C para su crecimiento. A partir del preinóculo incubado, se determinó el crecimiento bacteriano mediante conteo en cámara de Neubauer con microscopio óptico, ajustándose la concentración de la suspensión a 10⁶ UFC/ml.

Las muestras correspondientes a las diferentes superficies evaluadas fueron colocadas en tubos de cultivo que contenían 200 µl de la suspensión bacteriana previamente ajustada. Posteriormente, los tubos se incubaron durante 24 h para permitir la interacción entre las bacterias y las superficies de los materiales.

Una vez concluido el periodo de incubación, los cilindros de Ti6Al4V fueron retirados y lavados con solución tampón fosfato salino (PBS) con el fin de remover las bacterias no adheridas. A partir de la suspensión resultante, se tomaron 100 µl y se realizaron cinco diluciones seriadas en agua estéril, empleando un factor de dilución 1:10. De la última dilución se sembraron 100 µl en placas Petri con agar nutritivo. Para cada condición experimental se prepararon cinco placas, las cuales fueron incubadas durante 24 h.

Finalizado el período de incubación, se realizó el conteo de las colonias visibles y se determinó el número de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) según la Ecuación (2).

$$UFC/ml = \frac{No. Colonias * Inverso del factor de dilución}{Cantidad de muestra (ml)} \quad (2)$$

El porcentaje de reducción bacteriana se determinó después de 24 h de recultivo en agar, utilizando como referencia la superficie con recubrimiento de apatita sin inclusión de Zn, de acuerdo con la Ecuación (3):

$$\begin{aligned} \% Reducción de Colonias \\ = 100\% - \left[\frac{(UFC de la superficie evaluada) \times 100 \% }{(UFC de la superficie control)} \right] \end{aligned} \quad (3)$$

3.8 Determinación de Zn²⁺ liberado desde los recubrimientos

El comportamiento de liberación de zinc desde las superficies modificadas fue analizado mediante inmersión en PBS 1X, pH 7.4. Cada probeta se colocó individualmente en 50 ml de PBS y se mantuvo a temperatura ambiente durante el tiempo correspondiente al ensayo.

La cuantificación de los iones Zn²⁺ liberados se realizó después de 1, 3 y 7 días de inmersión. A los tiempos evaluados, se retiró la solución y se reemplazó por PBS fresco lo que permitió evaluar la liberación acumulada. La concentración de zinc presente en la solución evaluada fue determinada mediante espectrometría de absorción atómica (AAS, Thermo Scientific™ iCE™ 3000).

Para el análisis instrumental se utilizó la línea de absorción de 213.9 nm y un límite de detección de 0.002 µg/ml.

3.9 Repetibilidad y tratamiento estadístico de los datos

Para la evaluación estadística de los resultados los experimentos se realizaron por triplicado ($n = 3$). Para cada condición se emplearon muestras independientes con el fin de considerar la variabilidad entre probetas y evaluar la reproducibilidad del proceso de deposición biomimética.

Los resultados se reportaron como media $\pm$ desviación estándar (DE). Las comparaciones estadísticas entre grupos se realizaron mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba post hoc de Tukey cuando se detectaron diferencias significativas. Se consideró significancia estadística para valores de $p < 0.05$.

3.10 Consideraciones éticas y de bioseguridad

Los ensayos biológicos realizados en este estudio utilizaron fibroblastos humanos obtenidos de proveedores autorizados y manejados conforme a los protocolos institucionales de bioseguridad. Las pruebas microbiológicas se llevaron a cabo utilizando la cepa *Streptococcus mutans* bajo condiciones controladas de laboratorio y siguiendo las prácticas establecidas para el manejo de microorganismos. Todos los residuos biológicos generados durante los experimentos fueron segregados, tratados y dispuestos de acuerdo con los procedimientos institucionales y la normativa aplicable en materia de bioseguridad.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización posterior a la preparación inicial

El material base Ti6Al4V ELI, fue caracterizado antes de la aplicación de los tratamientos de modificación y activación superficial, con el objetivo de establecer una línea base microestructural, topográfica y de fases cristalinas que permitiera evaluar posteriormente el impacto de los tratamientos químicos y térmicos aplicados.

Las micrografías FE-SEM obtenidas (Figura 7A) muestran claramente la morfología característica de una superficie mecanizada, donde predominan marcas lineales asociadas al proceso de corte y desbaste. Estas rayas son consecuencia directa de la interacción herramienta-material y reflejan una topografía anisotrópica, con surcos y crestas orientados preferencialmente en la dirección de mecanizado. Este tipo de superficie es típico en implantes metálicos en estado maquinado y ha sido ampliamente reportado para aleaciones de titanio utilizadas en aplicaciones biomédicas.

Desde el punto de vista biológico, este tipo de topografía presenta varias limitaciones, entre las que destacan:

- ✓ baja energía superficial efectiva,
- ✓ limitada densidad de sitios activos para nucleación de apatita, y
- ✓ menor capacidad de anclaje mecánico para recubrimientos bioactivos.

Diversos estudios han demostrado que superficies únicamente mecanizadas presentan una bioactividad limitada en medios simulados y una menor capacidad para inducir la formación de capas de fosfato de calcio, en comparación con superficies químicamente activadas o texturizadas [63, 64].

El análisis EDS (Figura 7B) confirmó la composición química característica de la aleación Ti6Al4V, evidenciando la presencia predominante de titanio, así como señales correspondientes a los elementos aluminio y vanadio. Los resultados validan el empleo del sustrato adecuado y descartan la contaminación superficial ocasionada durante el proceso de mecanizado y posterior manipulación. La ausencia de elementos contaminantes en la superficie del sustrato influye directamente en los procesos subsecuentes de activación superficial, así como, en su interacción con soluciones biomiméticas y en los mecanismos de nucleación heterogénea de fases tipo apatita.

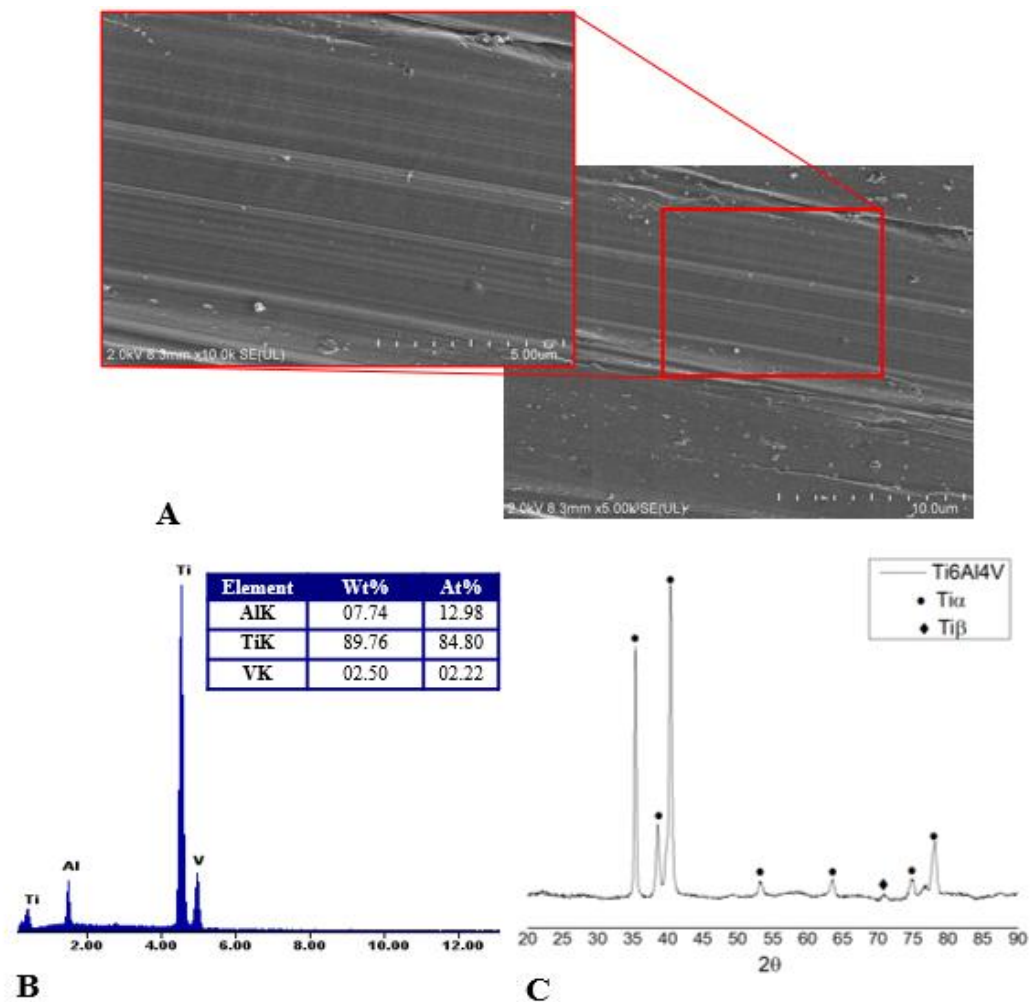


Figura 7. Superficie desbastada. A: Micrografías FE-SEM obtenidas a 5 k y 10 k. B: Composición elemental mediante EDS. C: Difractograma XRD.

En el difractograma presentado en la Figura 7C se evidencia que coexisten las fases α -Ti (estructura hexagonal compacta) y β -Ti (estructura cúbica centrada en el cuerpo) que son características de la microestructura de la aleación Ti6Al4V. Para el caso de aplicaciones biomédicas, la presencia de ambas fases confirma que el material presenta propiedades mecánicas adecuadas tales como alta resistencia específica, módulo elástico relativamente bajo y buena resistencia a la corrosión.

La caracterización inicial llevada a cabo confirma que el sustrato presenta una superficie esencialmente bioinerte, con topografía y química superficial poco favorables para la deposición directa de capas biomiméticas de CaP. En consecuencia, los tratamientos posteriores de grabado ácido y activación alcalina/cálcica resultan necesarios para:

- ✓ incrementar la rugosidad y el área superficial,
- ✓ modificar la química superficial, y
- ✓ generar grupos funcionales y fases intermedias que actúen como sitios de nucleación para la formación de apatita.

Este comportamiento es consistente con lo reportado en la literatura, donde se indica que el Ti6Al4V sin tratamiento presenta una limitada capacidad para inducir espontáneamente la formación de apatita en soluciones tipo SBF o biomiméticas [65-67].

4.2 Evaluación morfológica, composicional y estructural de la superficie modificada de Ti6Al4V

La activación de las superficies de las probetas se realizó a través de una secuencia de tratamientos químicos y térmicos diseñada para transformar la superficie bioinerte del sustrato en una superficie bioactiva, capaz de inducir la nucleación heterogénea de fosfatos de calcio bajo condiciones biomiméticas.

El procedimiento incluyó: (i) grabado ácido, con el fin de generar micro-porosidad y eliminar capas pasivas superficiales, (ii) tratamiento alcalino en NaOH para formación de capas ricas en titanatos, (iii) tratamiento en CaCl_2 para la incorporación de iones calcio mediante mecanismos de intercambio iónico, (iv) TT orientado a estabilizar estructuralmente la capa formada, y (v) TH_2O para promover la hidratación y reactividad superficial.

Este enfoque secuencial está ampliamente respaldado por la literatura como una de las estrategias más efectivas para inducir bioactividad en superficies de titanio, ya que permite la formación de capas ricas en titanato cálcico con elevada afinidad por iones fosfato y elevada capacidad para la nucleación de apatita tipo hidroxiapatita carbonatada [65, 68-70].

Desde una perspectiva funcional, esta etapa de activación superficial es crítica para el cumplimiento de los objetivos específicos del presente trabajo, dado que la eficiencia de la deposición biomimética de CaP y la incorporación homogénea de Zn^{2+} dependen directamente de la química superficial, la densidad de grupos funcionales (OH^-) y la energía superficial generadas durante esta etapa.

4.2.1 Cambios superficiales inducidos por el ataque químico

Después del grabado ácido en $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ se produjo una modificación significativa de la topografía superficial del Ti6Al4V, eliminando eficazmente las marcas de mecanizado y generando una superficie con una red homogénea de microporos (Figura 8A). Esta morfología es característica de procesos de ataque químico controlado en aleaciones de titanio y se asocia con mecanismos de disolución preferencial en regiones de mayor energía superficial, tales como defectos cristalinos, límites de grano y regiones enriquecidas en fases α y β .

La formación de microporosidad incrementa de manera significativa el área superficial específica y la densidad de sitios activos, lo cual favorece tanto el anclaje mecánico de recubrimientos como la nucleación heterogénea de fosfatos de calcio durante la deposición biomimética. En estudios previos se ha

demostrado que en superficies microtexturizadas la cinética de nucleación de apatita es considerablemente mayor en comparación con superficies lisas o que han sido únicamente mecanizadas [71].

Desde la perspectiva de la integridad mecánica y la resistencia a la fatiga de dispositivos implantables, es importante destacar que las condiciones elegidas para el tratamiento de grabado ácido lograron una superficie sin microgrietas. Esto sugiere que se llevó a cabo un proceso de modificación topográfica eficaz sin causar un daño estructural significativo.

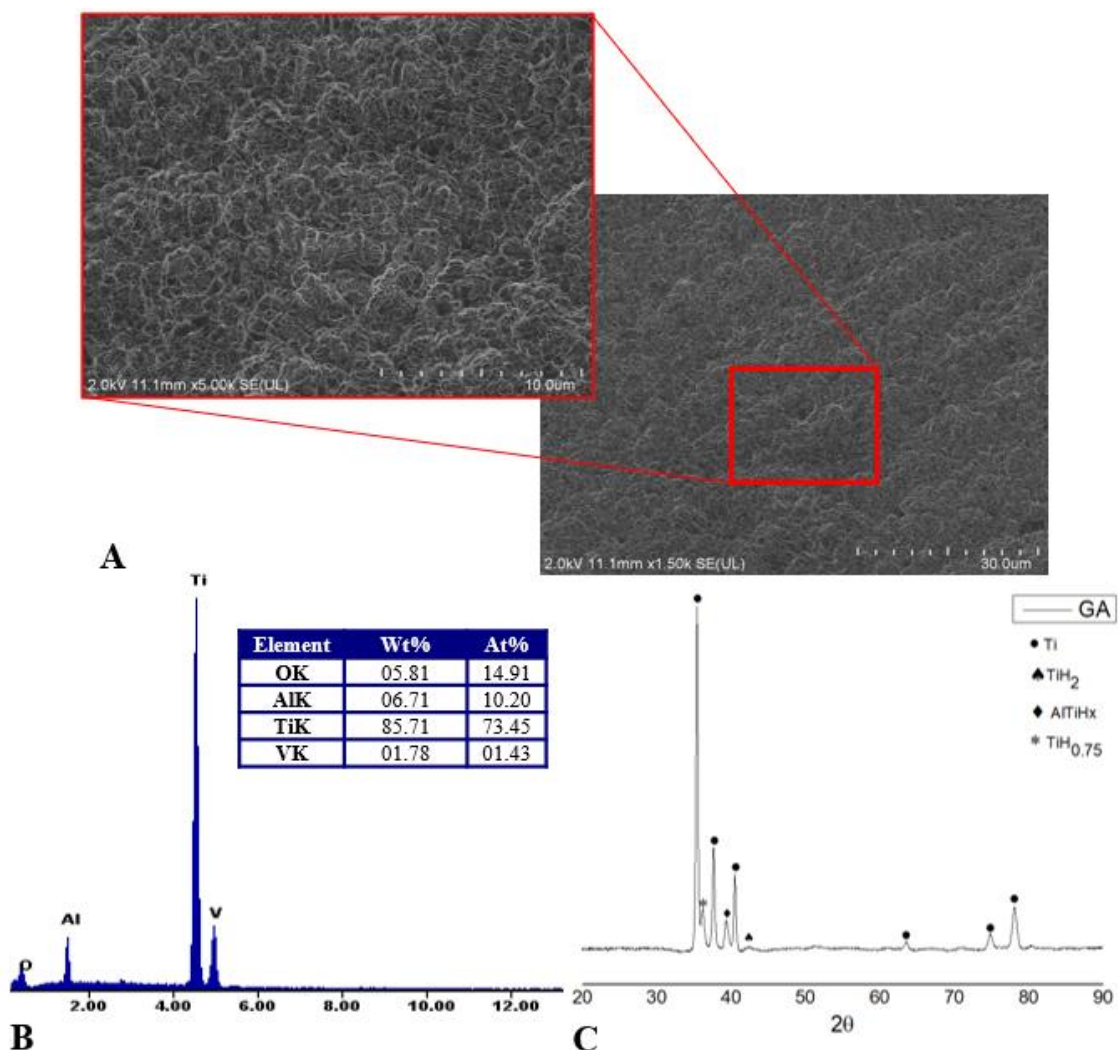


Figura 8. Superficie del Ti6Al4V posterior al tratamiento de ataque químico. A: Micrografías FE-SEM a 1500x y 5000x. B: Espectro EDS. C: Patrón de difracción.

El análisis EDS (Figura 8B) en la superficie confirmó que estaban presentes los elementos fundamentales de la aleación: Ti, Al y V. También se detectó oxígeno, lo cual se debe a la formación espontánea de una delgada capa de óxido de titanio después de que la superficie activada estuvo en contacto con el aire. Esta capa de óxido, aunque no es detectable por XRD debido a su bajo espesor y posible carácter amorfo, desempeña un papel relevante como precursor químico para los tratamientos alcalinos posteriores.

El patrón XRD (Figura 8C) evidenció la presencia de hidruros de titanio (TiH_2), cuya formación ha sido reportada durante tratamientos en medios fuertemente ácidos, particularmente en presencia de H_2SO_4 , como resultado de la absorción de hidrógeno generado durante la reacción metal-ácido. La formación de TiH_2 puede modificar la energía superficial y favorecer transformaciones químicas posteriores durante el tratamiento alcalino, contribuyendo indirectamente a la formación de capas de titanato más reactivas [71, 72].

4.2.2 Evolución superficial durante la activación del Ti6Al4V

Las micrográficas presentadas en la Figura 9 permiten observar las modificaciones morfológicas generadas en la superficie del Ti6Al4V después de aplicar la secuencia de tratamientos de activación superficial. Las imágenes A y B, muestran que el tratamiento alcalino en NaOH favoreció la generación de una estructura altamente porosa con morfología tipo pluma o red fibrilar, característica de la formación de capas de titanato sódico hidratado sobre superficies de titanio.

Esta morfología ha sido ampliamente reportada en la literatura y se atribuye a la disolución parcial del TiO_2 superficial seguida de la reprecipitación de especies de titanato sódico en forma de una red tipo gel. Rastegari y colaboradores [73], entre otros autores, han descrito estructuras similares, incluso a concentraciones más bajas de NaOH, confirmando que este tipo de tratamiento genera capas con elevada área superficial y alta densidad de grupos hidroxilo (OH^-), los cuales son esenciales para la posterior adsorción de Ca^{2+} y PO_4^{3-} .

Tras el tratamiento en CaCl_2 (Figura 9C y D), la morfología general de la red se conserva, lo cual indica que el proceso de intercambio iónico no destruye la estructura porosa previamente formada. No obstante, se observa la presencia de precipitados globulares y aglomerados, los cuales pueden asociarse a la formación local de fases ricas en calcio o a la reprecipitación de especies de titanato cálcico.

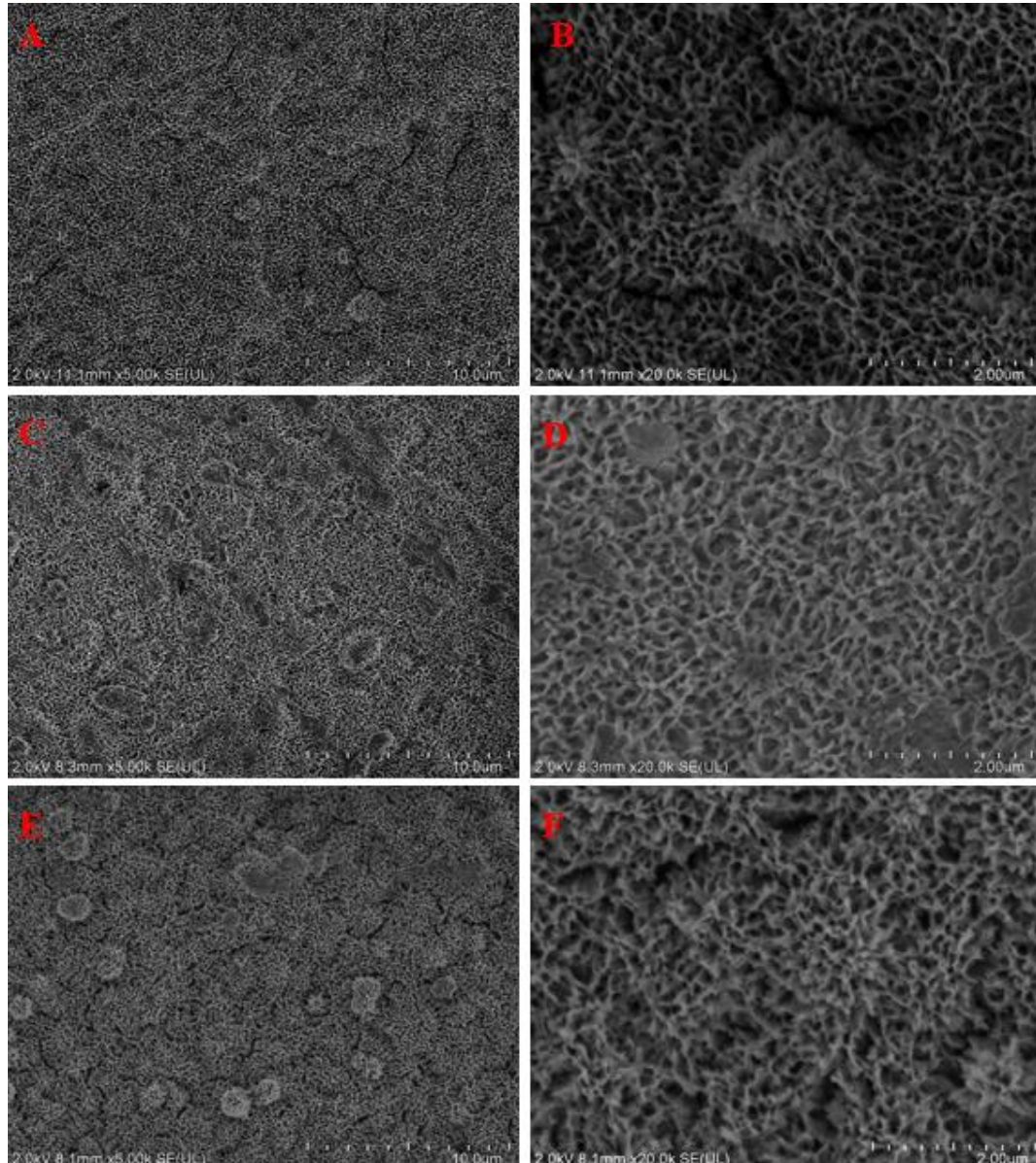


Figura 9. Evaluación morfológica durante la secuencia de activación. A, B: NaOH. C, D: CaCl_2 . E, F: Tratamiento térmico. Micrografías FE-SEM en dos niveles de aumento.

La aparición de microgrietas, que se intensifican tras el tratamiento térmico (Figura 9E y F), es un fenómeno reportado comúnmente y se atribuye a tensiones residuales generadas durante la deshidratación y densificación parcial de la capa tipo gel durante el calentamiento. Aunque estas grietas podrían considerarse desfavorables desde un punto de vista estrictamente mecánico, diversos estudios han señalado que pueden incrementar la permeabilidad superficial y facilitar el intercambio iónico con el medio, favoreciendo así la bioactividad del sistema [65, 74].

Por su parte, el tratamiento en agua desionizada no produjo cambios morfológicos significativos, lo cual es consistente con su función principal de hidratación y estabilización química de la capa superficial, más que de modificación topográfica.

El análisis EDS posterior al tratamiento en NaOH (Figura 10A) evidenció la incorporación de sodio y oxígeno, además de los elementos base Ti, Al y V. La presencia de Na y O se asocia a la formación de fases superficiales de titanato sódico (Na_2TiO_3 o especies relacionadas), la cual se reconoce como responsable de inducir bioactividad en superficies de titanio.

La incorporación del 6 % atómico de Na confirma la formación de una capa enriquecida con titanato sódico hidratado. La función de esta capa es favorecer el intercambio de iones y grupos OH^- que son fundamentales para la atracción electrostática de Ca^{2+} desde el medio durante procesos biomiméticos de deposición.

Posteriormente, tras al tratamiento en CaCl_2 , el espectro EDS (Figura 10B) evidenció la presencia de Ca y la desaparición de la señal de Na, confirmando la ocurrencia de un mecanismo de intercambio iónico $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Este proceso conduce a la formación de una capa rica en titanato cálcico, considerada uno de los precursores más efectivos para la nucleación de apatita en medios simulados y biomiméticos [64].

El tratamiento térmico posterior no produjo cambios significativos en la composición elemental detectada por EDS, lo que indica que el Ca permanece incorporado en la capa superficial. Por su parte, la ligera disminución en el contenido de Ca tras el tratamiento en agua desionizada (Figura 10C) puede atribuirse a la disolución parcial de especies débilmente ligadas, sin comprometer la presencia global de este elemento en la superficie.

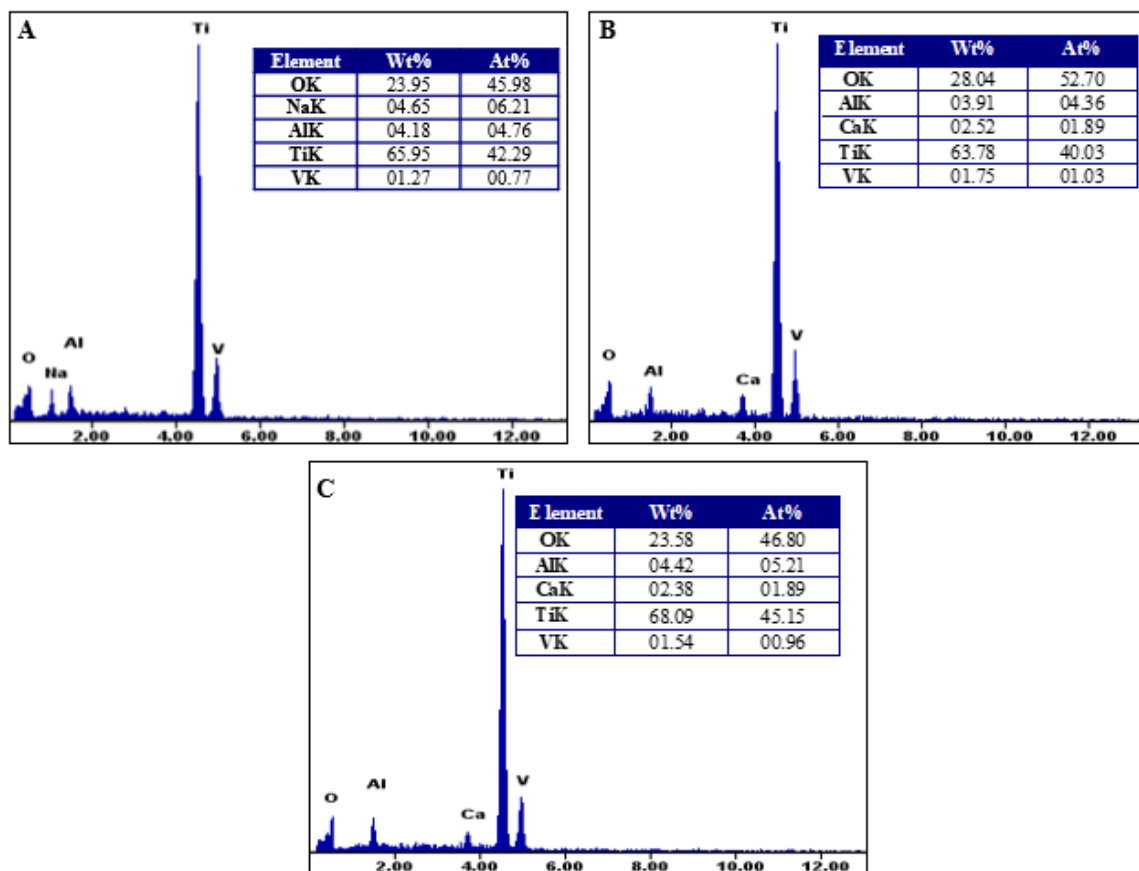


Figura 10. Composición elemental determinada mediante EDS en las diferentes etapas de activación superficial. A: NaOH. B: CaCl₂. C: TH₂O.

La caracterización por XPS de la superficie de Ti6Al4V ELI después de completar la secuencia de tratamientos de activación superficial (NaOH-CaCl₂-TT-TH₂O) se muestra en la Figura 11. El espectro general presentado evidencia señales definidas correspondientes a Ti, O y Ca. La baja contribución de señales asociadas al Ti metálico, junto con el predominio de especies oxidadas, sugiere que el sustrato quedó cubierto por una capa de reacción generada durante los

tratamientos alcalino y cálcico. Por su parte, el análisis de alta resolución de la región Ca 2p muestra el doblete característico Ca 2p_{3/2} y Ca 2p_{1/2}, compatible con estados químicos de calcio presentes en la superficie tratada.

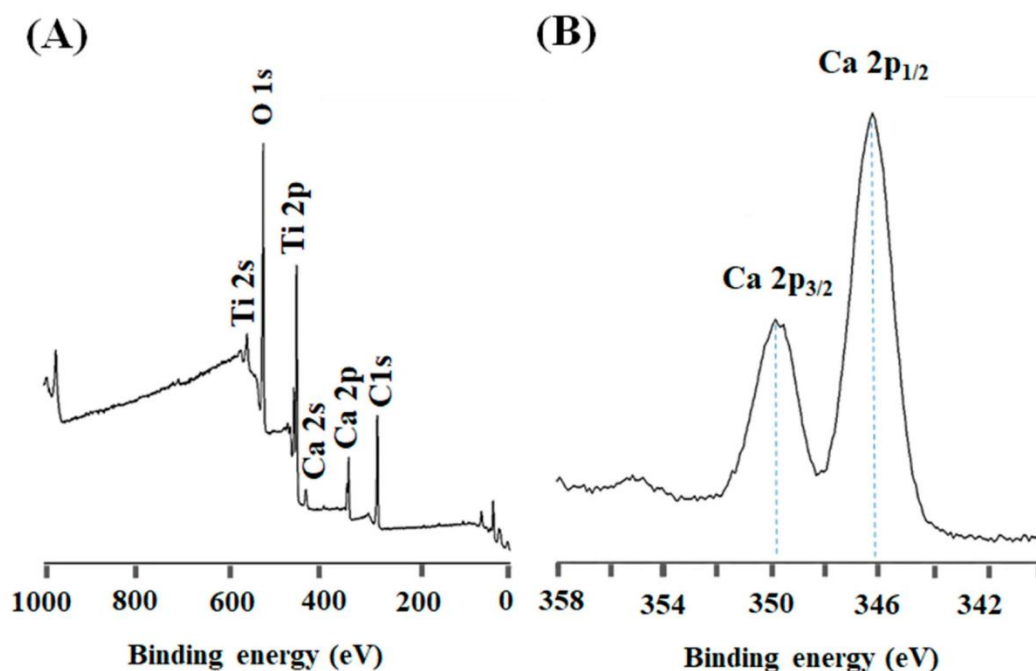


Figura 11. Análisis XPS de la superficie de Ti6Al4V después de la secuencia NaOH-CaCl₂-TT-TH₂O: (A) espectro general; (B) región de alta resolución Ca 2p.

En la región Ca 2p se identificaron dos contribuciones con energías de enlace de 346.8 eV y 350.3 eV, correspondientes a las señales Ca 2p_{3/2} y Ca 2p_{1/2}, respectivamente. La posición y simetría de estas señales, sugiere que el calcio se encuentra vinculado químicamente a especies oxigenadas dentro de la matriz de titanato, y no como un precipitado superficial. Esta asociación podría estar relacionada con enlaces Ca-O-Ti o con ambientes químicos similares a titanatos cálcicos.

Los resultados obtenidos respaldan la información obtenida mediante EDS demostrando que el Ca se encuentra incorporado de forma estable en la capa, en lugar de estar débilmente adsorbido sobre la superficie. Debido a la alta sensibilidad superficial de la técnica XPS se puede confirmar que el enriquecimiento con Ca²⁺ posterior al tratamiento en cloruro de calcio, ocurre en

la zona externa del material, precisamente donde se inician las reacciones de nucleación biomimética [75].

Los patrones de difracción de rayos X (Figura 12) obtenidos tras el tratamiento alcalino, evidencian las reflexiones correspondientes a Ti y AlTiH_x . Por otra parte, se identificaron fases de titanato hidrogenado de sodio. La aparición de titanato sódico confirma el mecanismo de disolución–reprecipitación inferido previamente a partir de los análisis FE-SEM, EDS y XPS. En condiciones alcalinas tiene lugar una disolución parcial de la capa nativa de TiO_2 , seguida de la reprecipitación de un hidrogel de titanato sódico de baja cristalinidad. Por la característica débil y ensanchada de las reflexiones se sugiere la obtención de una estructura no ordenada y con un tamaño pequeño de cristalito, consistente con una capa superficial derivada de gel.

Posterior al tratamiento en CaCl_2 , se identificaron reflexiones de titanato hidrogenado de calcio junto con TiH , Ti, AlTiH_x y TiH_2 . La presencia de estas fases demuestra un intercambio parcial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ dentro de la red de titanatos, dando lugar a la formación de especies de titanato que contienen calcio. Los hidruros presentes en la capa sugieren que el tratamiento con calcio aplicado modifica principalmente la estructura externa del titanato, sin eliminar por completo los dominios enriquecidos en hidrógeno.

Kokubo y colaboradores han reportado que el tratamiento térmico favorece la transformación de especies de titanato de hidrógeno y calcio en fases de titanato cálcico con bajo grado de cristalinidad y rutilo. Sin embargo, en este estudio, no se lograron identificar claramente estas fases a través de XRD. Esta aparente discrepancia en los resultados se explica al considerar que la capa formada es delgada, tiene baja cristalinidad o un carácter parcialmente amorfo, lo que hace que su señal se vea enmascarada por la fuerte contribución del sustrato metálico.

Este comportamiento ha sido ampliamente documentado en la literatura, donde se menciona que técnicas superficiales como XPS y EDS son más adecuadas que XRD para detectar capas delgadas de titanato cálcico [76, 77].

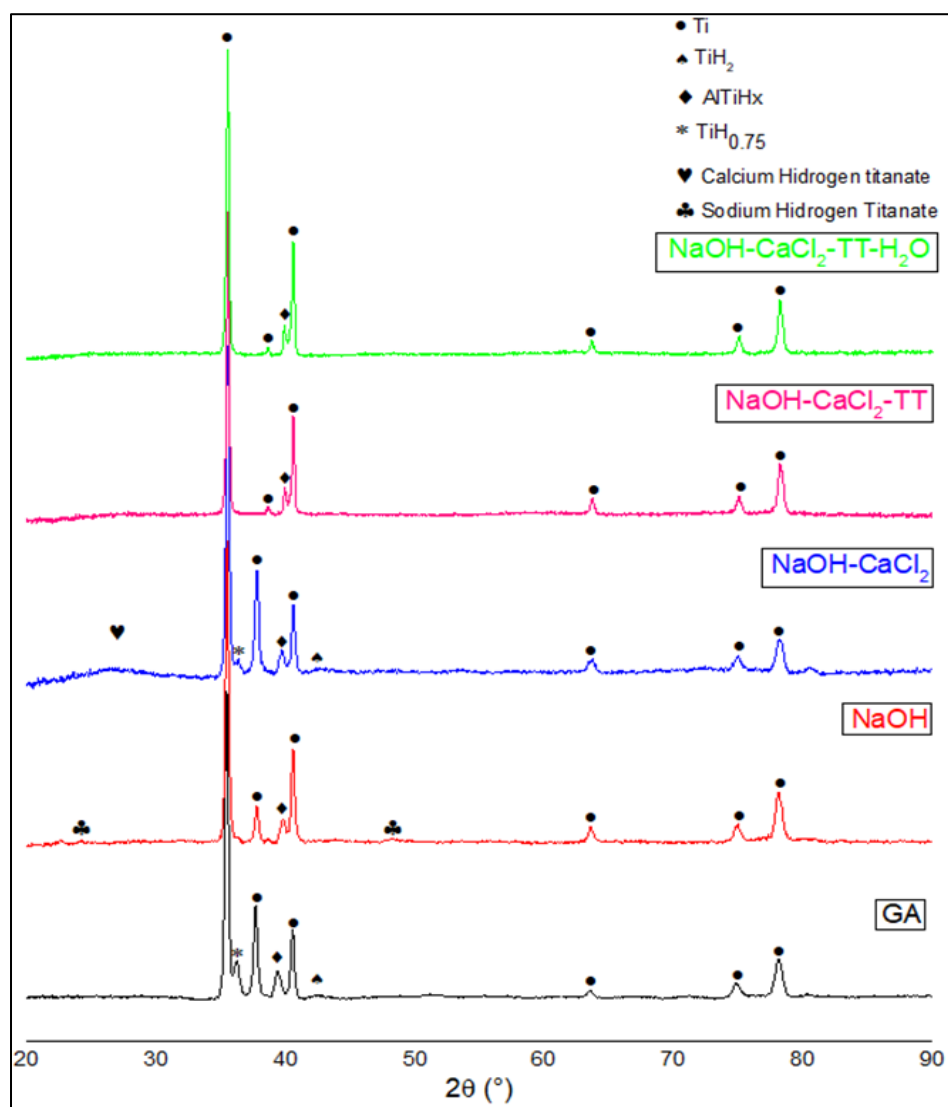


Figura 12. Difractogramas XRD de las superficies del Ti6Al4V después de la secuencia NaOH-CaCl₂-TT-TH₂O.

Al final de la secuencia de activación NaOH-CaCl₂-TT-TH₂O, se observó un patrón de difracción que se mantuvo sin cambios significativos después de los últimos tratamientos. Esto respalda la idea de que la capa externa formada es nanométrica y presenta un desorden estructural. Además, al analizar el comportamiento de atenuación progresiva de los picos relacionados con titanatos, se confirma que se ha creado una superficie delgada, enriquecida con calcio, que es altamente hidroxilada y químicamente reactiva. Esta superficie constituye una

plataforma idónea para la posterior deposición biomimética de fosfatos de calcio y para la incorporación controlada de iones Zn^{2+} , favoreciendo la nucleación, adhesión y estabilidad de los recubrimientos Zn-CaP [78].

4.3 Evaluación fisicoquímica de los recubrimientos de fosfatos de calcio

Una vez finalizada la etapa de activación superficial, las muestras fueron inmersas en medios sobresaturados en calcio y fosfato, diseñados para promover la nucleación y crecimiento de recubrimientos biomiméticos de fosfatos de calcio sobre el material base.

El empleo de soluciones tipo SBF modificadas con concentraciones elevadas de Ca^{2+} y PO_4^{3-} permite acelerar la cinética de nucleación heterogénea y el crecimiento de fases tipo apatita sobre superficies bioactivas, favoreciendo la formación de capas continuas en tiempos reducidos, tal como ha sido ampliamente reportado en la literatura [63, 64, 79-81].

En esta etapa inicial se evaluaron cuatro variantes de deposición (VD1–VD4), combinando dos concentraciones iónicas y dos tiempos de inmersión, con el propósito de analizar de manera sistemática el efecto de estos parámetros sobre la morfología, homogeneidad, composición y estabilidad del recubrimiento. Estos factores son críticos, ya que condicionan tanto la adhesión del recubrimiento como su capacidad posterior para incorporar iones Zn^{2+} y modular la cinética de liberación iónica y la actividad antibacteriana.

4.3.1 Recubrimientos desarrollados bajo la condición VD1 (SBFX7-4h)

Las micrografías FE-SEM correspondientes a la variante VD1 (Figura 13A–C) muestran la formación de partículas esféricas organizadas en estructuras tipo racimos o ramilletes, distribuidas de manera heterogénea sobre la superficie del sustrato.

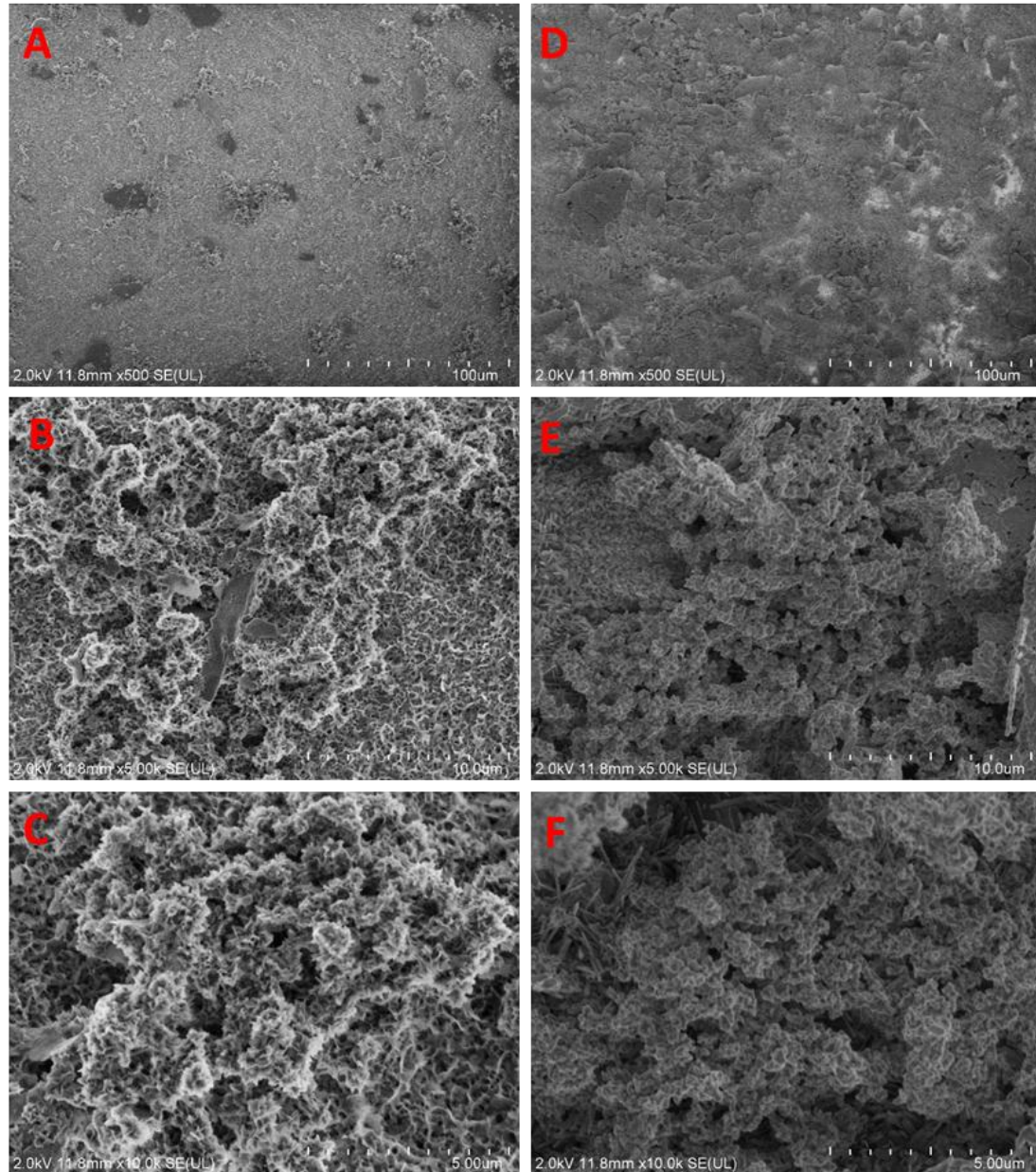


Figura 13. Micrografías FE-SEM de la superficie recubierta. A, B y C: SBFX7 - 4 horas. D, E y F: Tratamiento térmico. Magnificaciones 500x, 5000x y 10000x.

Esta morfología es característica de estadios iniciales de nucleación y crecimiento de apatitas biomiméticas, donde se forman agregados de nanocristales que posteriormente coalescen para generar capas continuas [82]. La aparición de dominios laminares de mayor dimensión, que actúan como zonas de soporte para el desarrollo de los ramilletes, evidencia una posible heterogeneidad en los

procesos de nucleación y crecimiento cristalino. Esta respuesta podría estar asociada con variaciones locales en la concentración de grupos OH^- o en la reactividad química superficial. En superficies en las que se ha reportado la formación de titanatos cálcicos se ha descrito que la nucleación ocurre preferentemente en sitios enriquecidos con Ca [82, 83].

Después de aplicado el tratamiento térmico (Figura 13D–F), se observa una ligera densificación de la capa sin que aparezcan grietas evidentes. Este hallazgo sugiere que, debido al espesor relativamente bajo del recubrimiento, las tensiones térmicas generadas durante el calentamiento se distribuyen adecuadamente. El recubrimiento obtenido tras 4 horas de inmersión y con una concentración iónica SBFX7 no logró una cobertura completamente uniforme, lo que indica que las condiciones utilizadas no son suficientes para asegurar una formación continua de la capa en toda la superficie.

Al considerar estos resultados desde un punto de vista funcional, la falta de homogeneidad en el recubrimiento podría afectar la adhesión y la reproducibilidad de la bioactividad, así como la incorporación uniforme de Zn^{2+} en el futuro.

El análisis composicional de las capas depositadas mediante VD1 se realizó utilizando EDS. Los resultados se expresaron como el porcentaje atómico promedio de los elementos identificados y se muestran en la Figura 14. El análisis EDS global (Figura 14A) confirmó la presencia de Ca, P y O, en concentraciones atómicas de 4.44 %, 2.55 % y 48.66 %, respectivamente, lo que evidencia la formación de una capa delgada de CaP sobre el sustrato.

Los análisis puntuales realizados sobre las estructuras laminares (Figura 14B) mostraron mayores concentraciones locales de los elementos Ca y P (11.25 % y 8.87 % atómico, respectivamente), resultado que confirma que estas estructuras corresponden a fases ricas en fosfatos de calcio.

El incremento de Ca y P tras el tratamiento térmico sugiere un proceso de densificación y posible recristalización parcial de la capa, sin alterar de manera

significativa la naturaleza del recubrimiento. De manera general, la presencia de estos elementos sugiere la formación de una capa delgada de apatita sobre la superficie del Ti6Al4V empleado como sustrato.

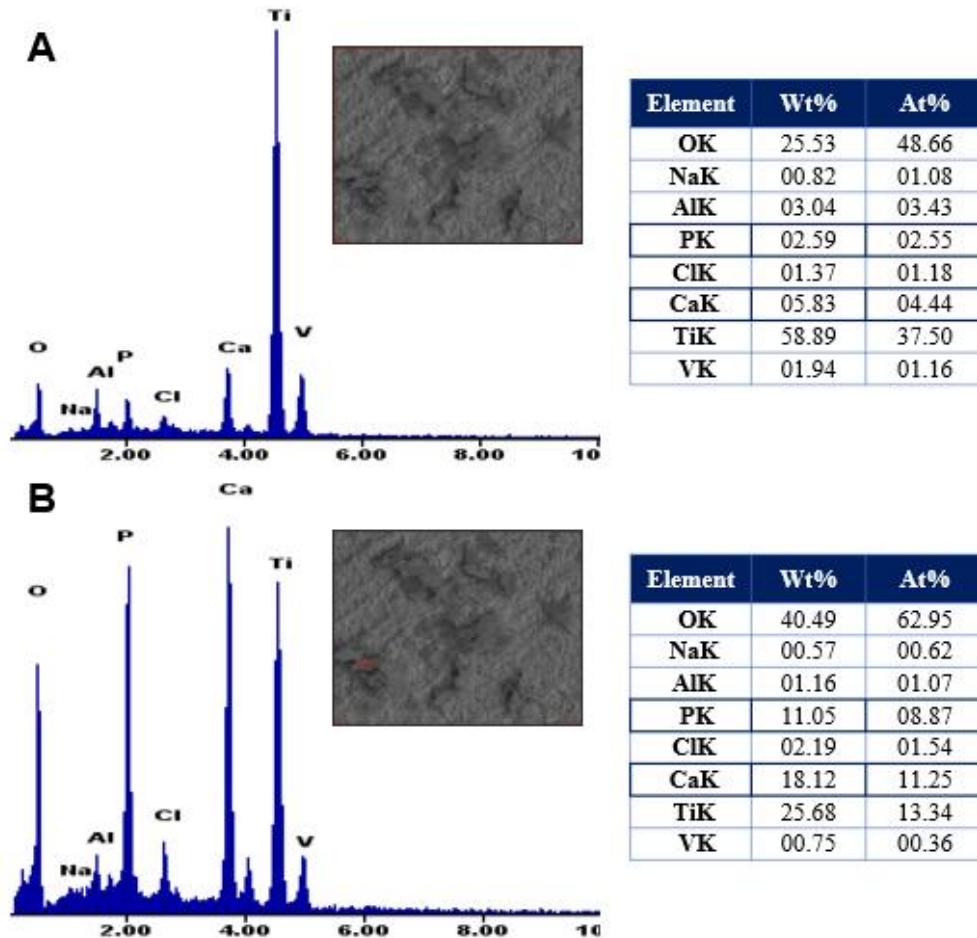


Figura 14. Espectros EDS de las superficies recubiertas con la VD1.

El mapeo elemental (Figura 15) evidencia una distribución no completamente uniforme de Ca y P, en concordancia con la heterogeneidad morfológica observada por FE-SEM.

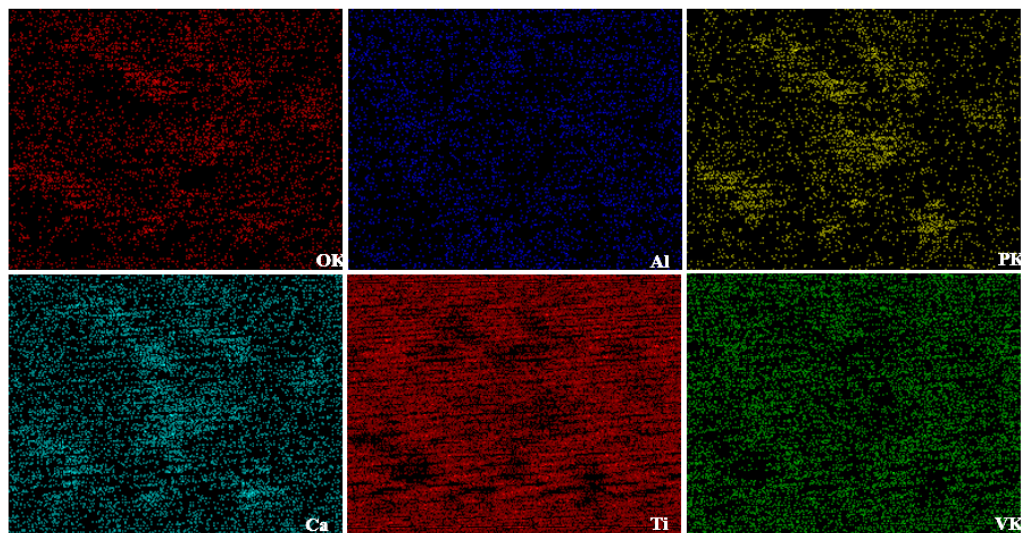


Figura 15. Distribución elemental obtenida por EDS para la superficie de Ti6Al4V recubierta con VD1.

4.3.2 Recubrimientos desarrollados bajo la condición VD2 (SBFX7-6h)

En la variante VD2 (Figura 16A–C), el incremento del tiempo de inmersión a 6 h manteniendo la misma concentración iónica condujo a una mayor densidad de ramilletes y a la formación de aglomerados más compactos, y mejor distribuidos sobre toda la superficie, en comparación con la VD1.

Este comportamiento es consistente con una mayor extensión del proceso de nucleación secundaria y crecimiento cristalino, lo que se traduce en un incremento de la fracción de superficie cubierta. No obstante, al igual que en VD1, se observan estructuras laminares y regiones con menor cobertura, lo que indica que, aunque el tiempo de inmersión favorece el crecimiento del recubrimiento, la concentración iónica continúa siendo un factor limitante para alcanzar una capa completamente continua.

Posterior al tratamiento térmico (Figura 16D–F), se observa una densificación de la capa sin evidencia de agrietamiento, lo que sugiere que el espesor del recubrimiento permanece dentro de un rango que permite la adecuada relajación de tensiones térmicas, en concordancia con lo observado para VD1.

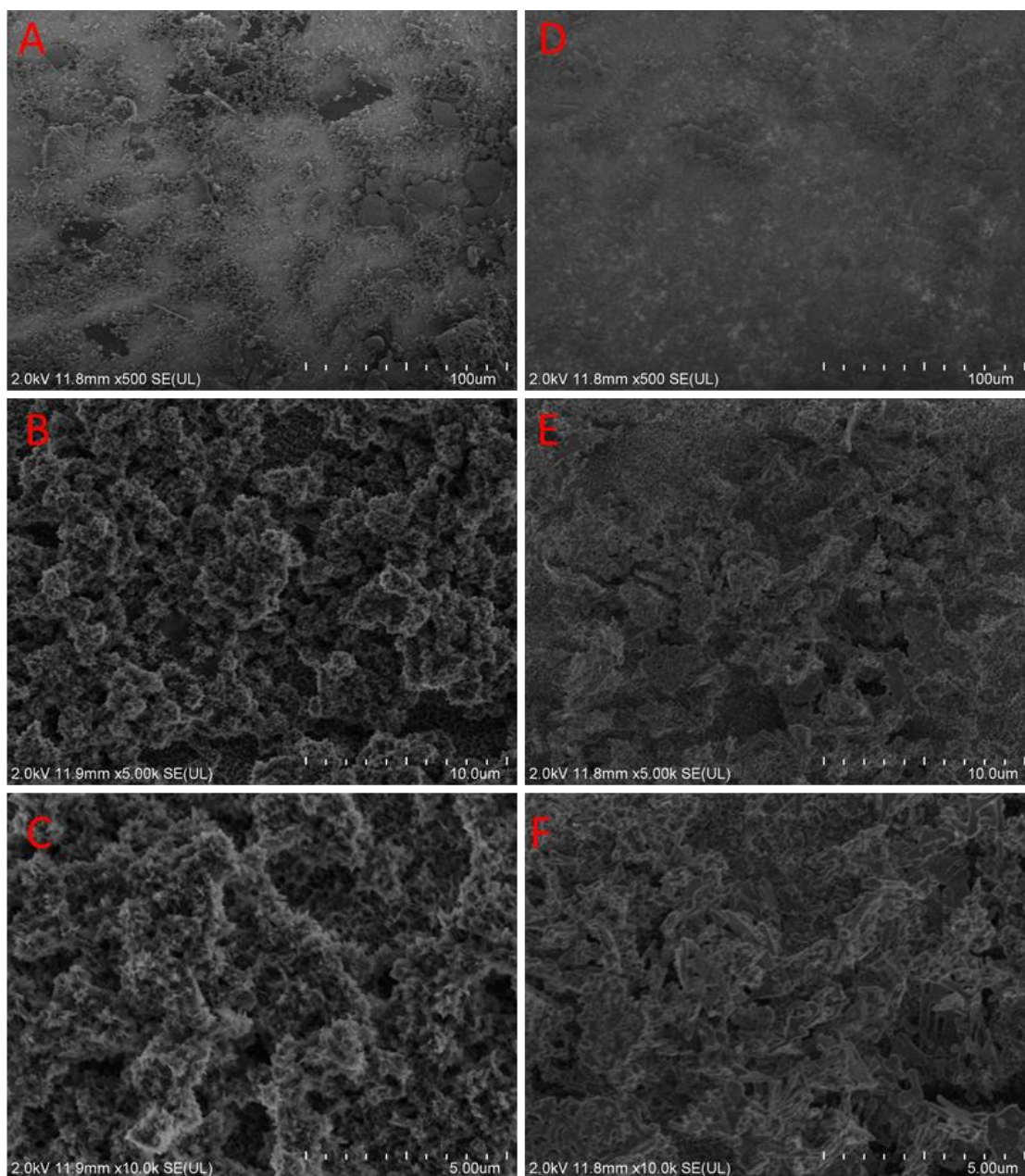


Figura 16. Micrografías FE-SEM de la superficie recubierta. A, B y C: SBFX7 - 6 horas. D, E y F: Tratamiento térmico. Magnificaciones 500x, 5000x y 10000x.

El análisis composicional de las capas depositadas mediante VD2 fue evaluada mediante espectroscopia EDS. Los resultados (Figura 17A) muestran un incremento en las concentraciones atómicas de Ca (6.26 %) y P (3.30 %) en comparación con VD1, lo que confirma que el aumento en el tiempo de inmersión favorece la acumulación de material CaP sobre la superficie. Este resultado es consistente con la evolución de la morfología observada (Figura 17B y C). Sin

embargo, el mapeo elemental (Figura 18) continúa evidenciando una distribución no completamente homogénea de Ca y P, lo cual refuerza la idea de que, bajo estas condiciones, el sistema aún no alcanza una cobertura superficial continua.

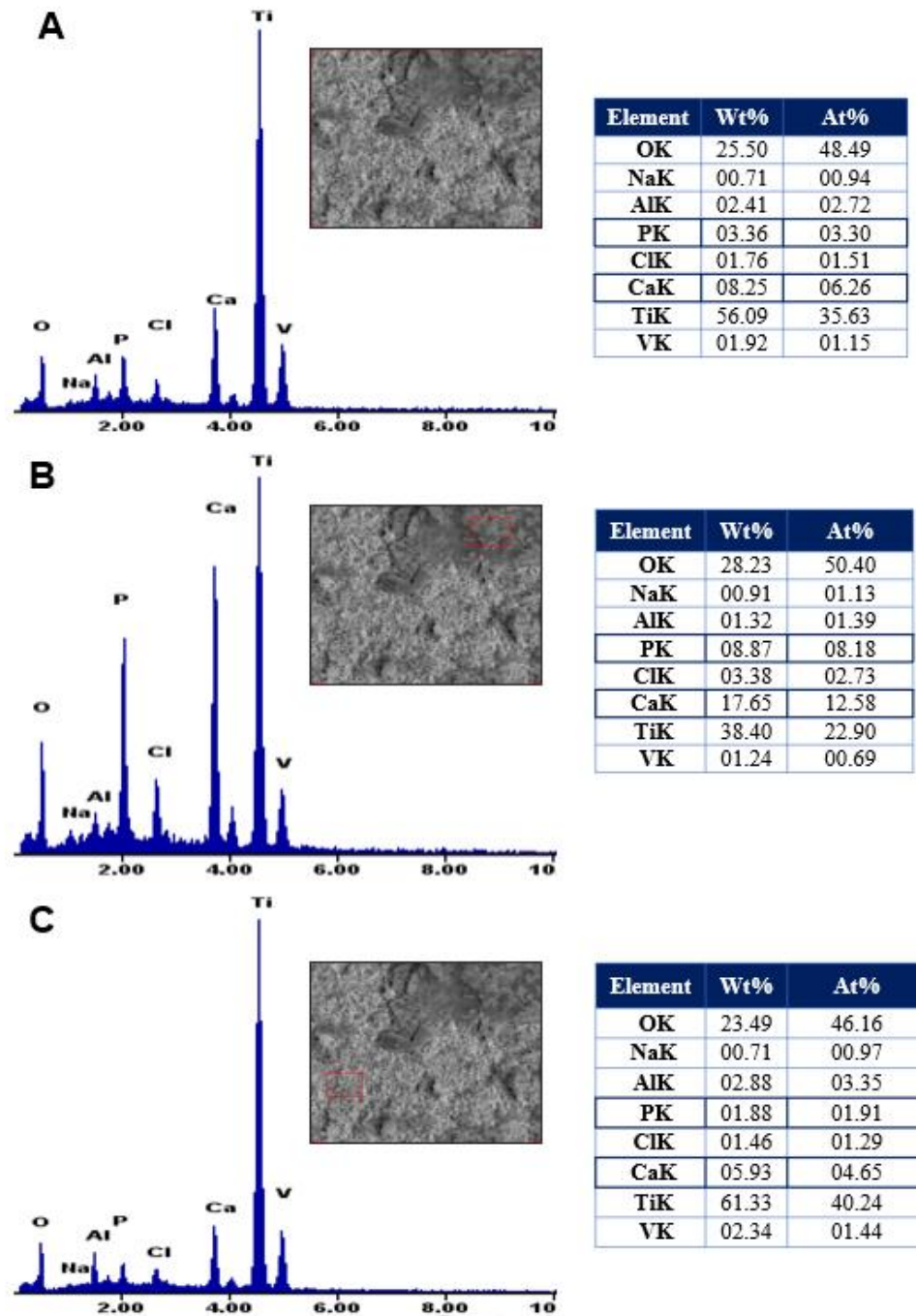


Figura 17. Espectros EDS de las superficies recubiertas con la VD2.

Desde una perspectiva funcional y de optimización del proceso, la variante VD2 representa una mejora respecto a VD1 en términos de cantidad de recubrimiento formado, sin embargo, la persistencia de heterogeneidades indica que el aumento del tiempo de deposición, sin un incremento en la sobresaturación iónica, solo permite mejorar parcialmente la cobertura superficial. En este sentido, aunque se favorece el crecimiento del CaP, estas condiciones no son suficientes para garantizar la formación de una capa continua y uniforme, requisito fundamental para aplicaciones biomédicas y para la posterior incorporación homogénea de Zn^{2+} .

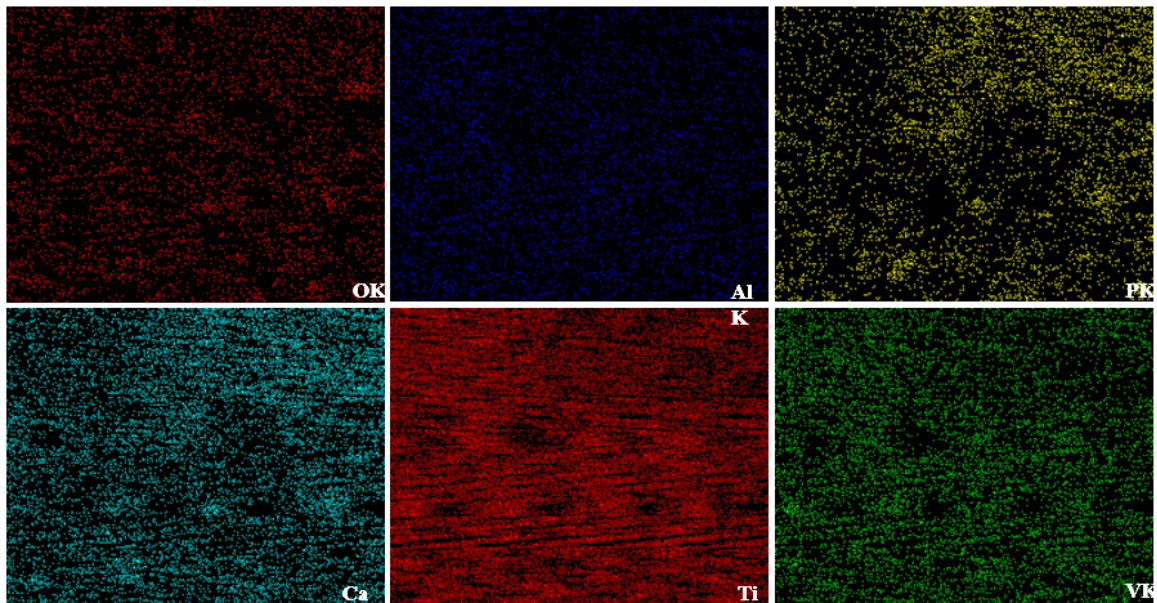


Figura 18. Distribución elemental obtenida por EDS para la superficie de Ti6Al4V recubierta con VD2.

4.3.3 Recubrimientos desarrollados bajo la condición VD3 (SBFX10-4h)

Las micrografías correspondientes a la variante VD3 (Figura 19A–C) muestran una mejora notable en la uniformidad y continuidad del recubrimiento en comparación con las variantes VD1 y VD2. A diferencia de estas, el incremento en la concentración de Ca^{2+} y PO_4^{3-} en la solución SBFX10 genera un mayor grado de sobresaturación, lo que incrementa la tasa de nucleación heterogénea y favorece la formación de una capa más gruesa y homogénea incluso a tiempos relativamente cortos (4 h).

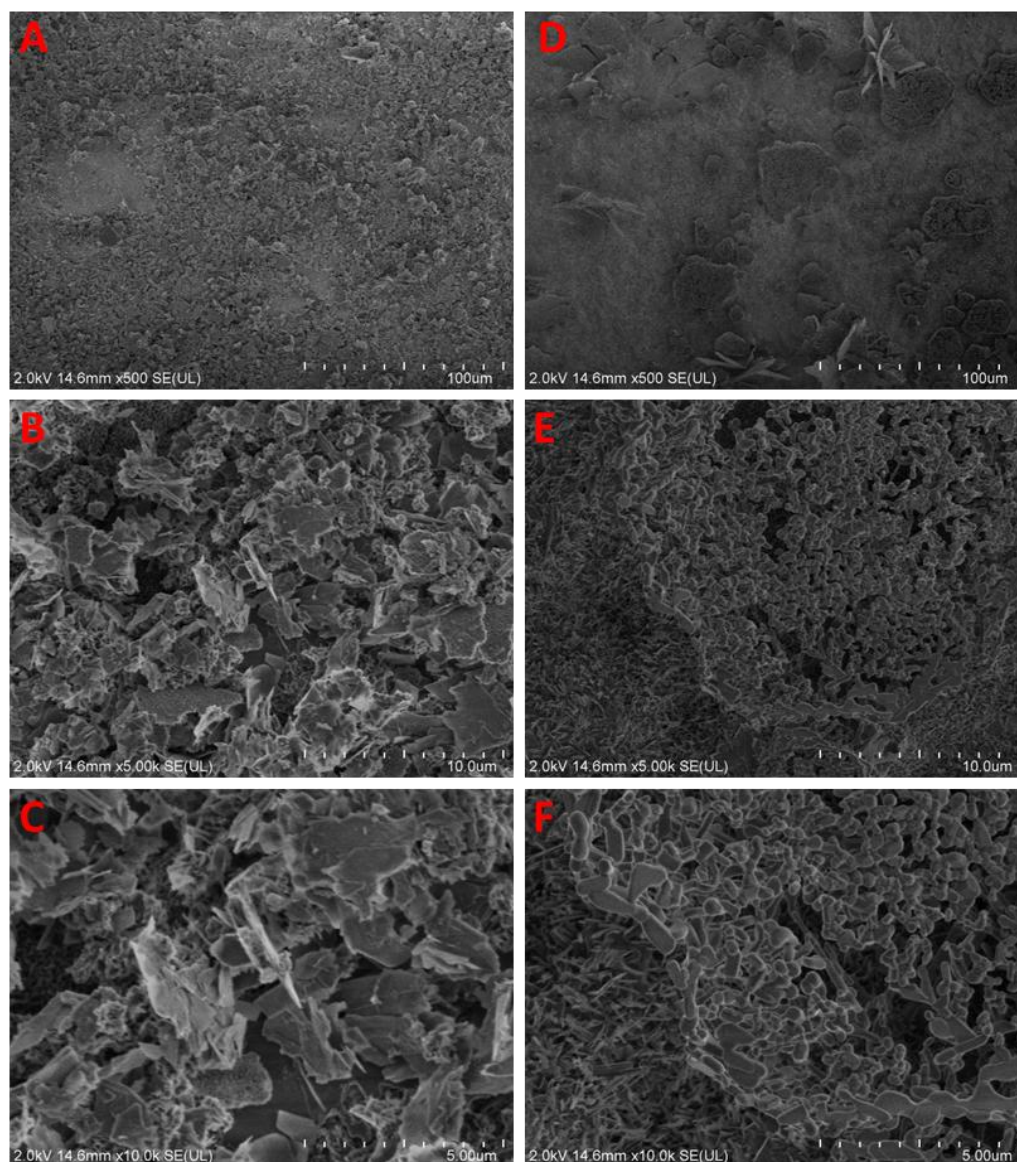


Figura 19. Micrografías FE-SEM de la superficie recubierta. A, B y C: SBFX10 - 4 horas. D, E y F: Tratamiento térmico. Magnificaciones 500x, 5000x y 10000x.

Este comportamiento es consistente con modelos clásicos de deposición biomimética, en los cuales el grado de sobresaturación controla tanto la densidad de núcleos formados sobre la superficie del sustrato como la cinética de crecimiento cristalino [63, 81]. Tras el tratamiento térmico (Figura 19D–F), se observa una densificación más pronunciada de la capa, con la formación de “cuellos” entre partículas, lo cual es indicativo de sinterización en estado sólido o coalescencia parcial de cristales. Este fenómeno puede mejorar la cohesión

interna del recubrimiento y su adhesión al sustrato, aspectos críticos para la estabilidad mecánica en condiciones fisiológicas durante su uso *in vivo* [84].

El análisis EDS (Figura 21A) evidenció concentraciones de Ca (7.11 %) y P (3.71 %) superiores a las observadas en las variantes VD1 y VD2, confirmando una mayor cantidad de material CaP depositado. De manera consistente, los análisis puntuales y el mapeo elemental (Figura 21B–D y Figura 20) muestran una distribución más homogénea de Ca y P, lo cual respalda la formación de una capa más continua y uniforme.

Desde una perspectiva de diseño de recubrimientos funcionales, la variante VD3 representa un punto de inflexión en el proceso, donde el incremento en la sobresaturación iónica permite superar las limitaciones observadas en VD1 y VD2. En este sentido, VD3 presenta características altamente deseables para la posterior incorporación de Zn^{2+} y para garantizar una liberación iónica controlada y reproducible al ofrecer un balance favorable entre el espesor y homogeneidad del recubrimiento sin presencia de agrietamiento.

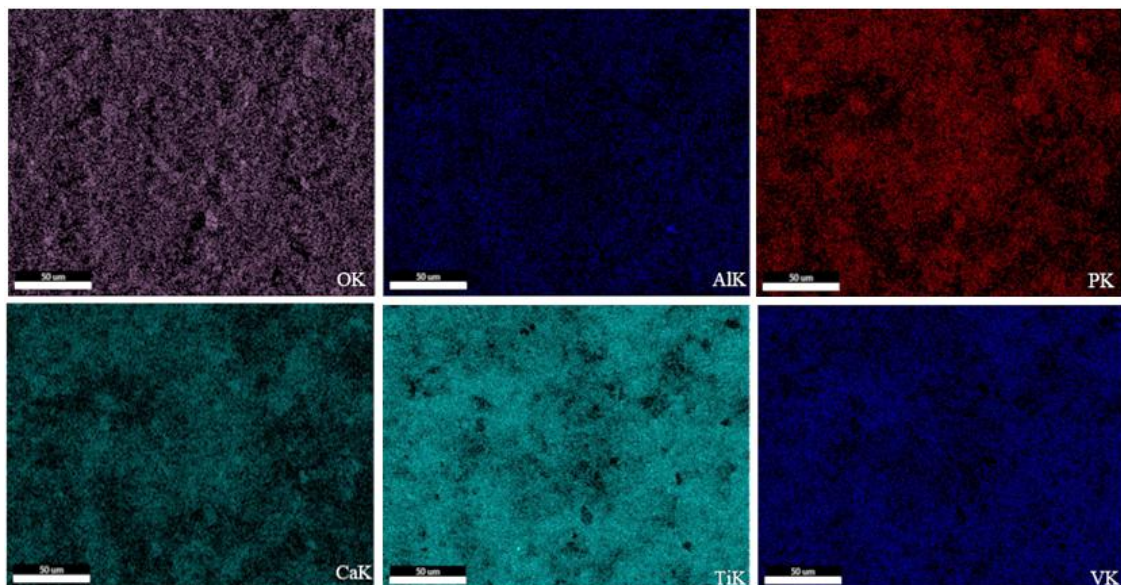


Figura 20 Distribución elemental obtenida por EDS para la superficie de Ti6Al4V recubierta con VD3.

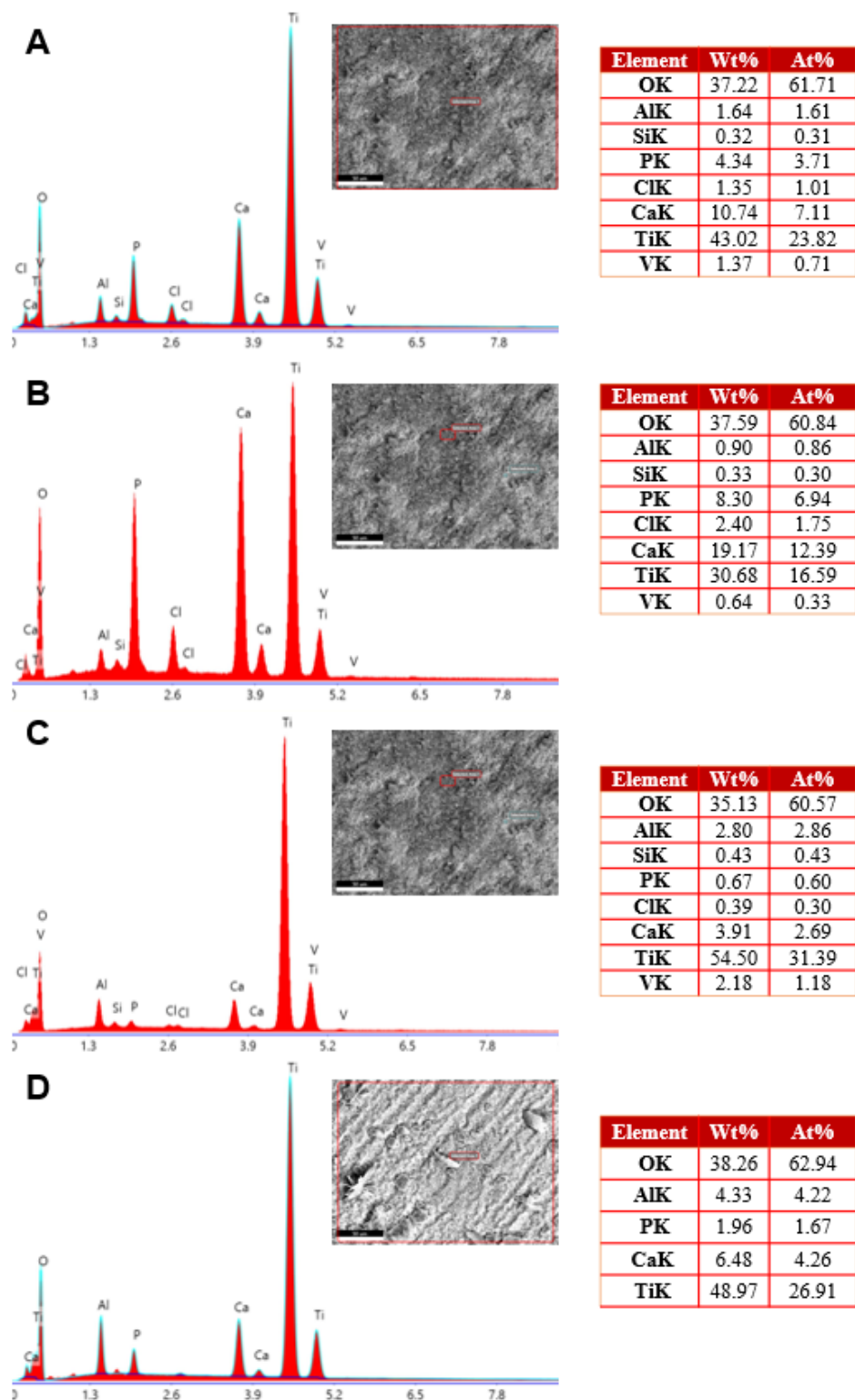


Figura 21. Espectros EDS de las superficies recubiertas con la VD3.

4.3.4 Recubrimientos desarrollados bajo la condición VD4 (SBFX10-6h)

La variante VD4 (Figura 22A–C), que combina alta concentración iónica (SBFX10) y mayor tiempo de inmersión (6 h), produjo la capa más gruesa y densa entre todas las variantes evaluadas.

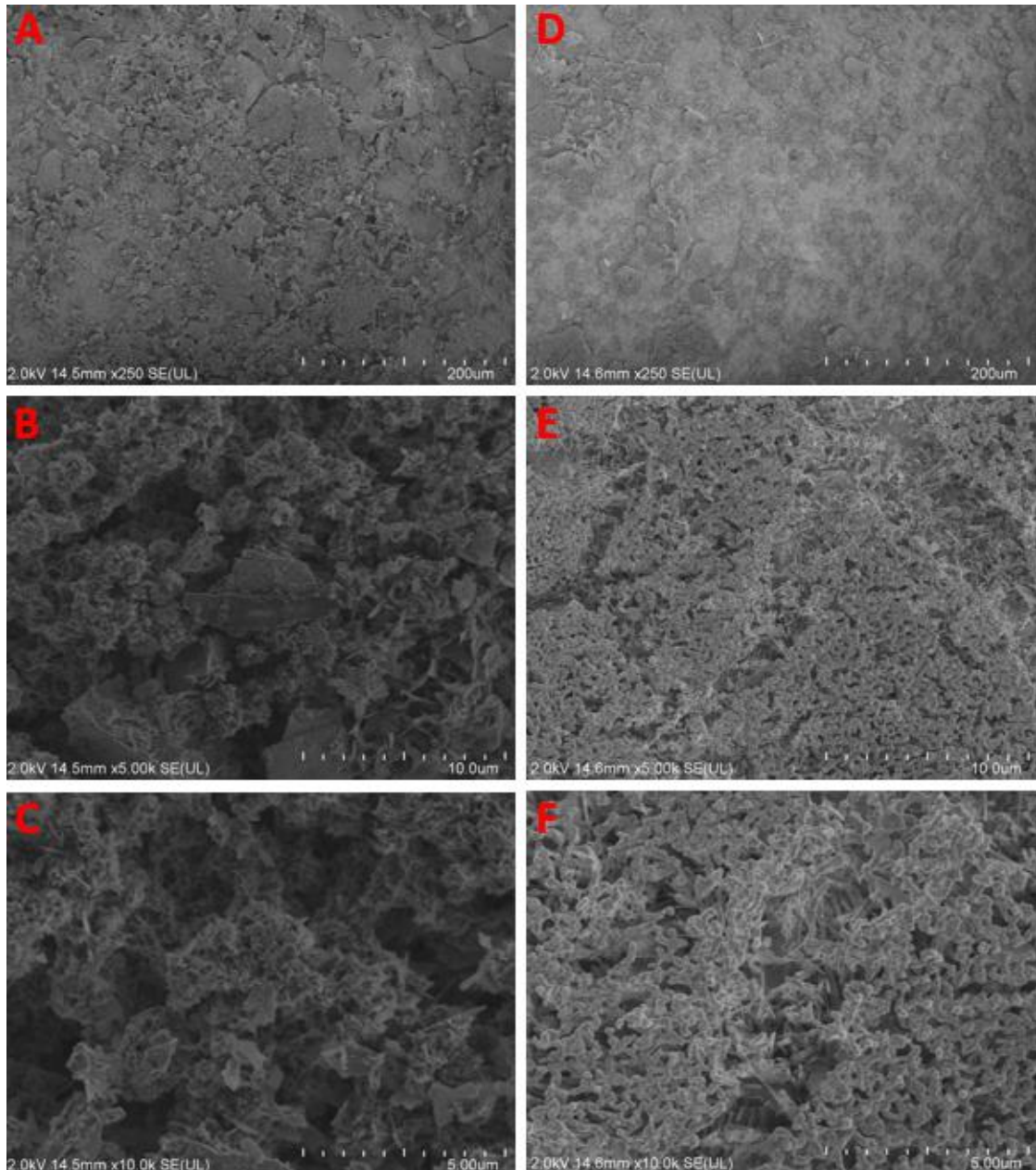


Figura 22. Micrografías FE-SEM de la superficie recubierta. A, B y C: SBFX10 - 6 horas. D, E y F: Tratamiento térmico. Magnificaciones 250x, 5000x y 10000x.

La superficie muestra una cobertura uniforme, con aglomerados de partículas más compactos, lo cual es consistente con un crecimiento del recubrimiento dominado por nucleación secundaria y crecimiento cristalino sostenido.

No obstante, a diferencia de la variante VD3, la presencia de agrietamiento en determinadas zonas indica que el incremento excesivo del espesor genera tensiones residuales, probablemente asociadas a diferencias en los coeficientes de expansión térmica entre el recubrimiento y el sustrato, así como procesos de contracción durante el secado y el tratamiento térmico.

Tras el tratamiento térmico (Figura 22D–F), el agrietamiento se hace más evidente, aunque también se observa la formación de “cuellos” entre partículas, similar a lo observado en VD3. Este comportamiento sugiere que, si bien la densificación mejora la cohesión local, el exceso de espesor compromete la integridad mecánica global del recubrimiento.

El análisis composicional de las capas depositadas mediante VD4 fue evaluado mediante EDS (Figura 23). El análisis (Figura 23A) evidenció las mayores concentraciones de Ca (12.17 %) y P (5.98 %) entre todas las variantes, lo que confirma mayor carga de material CaP. Los análisis puntuales realizados (Figura 23B y C), muestran que en mayor o menor porcentaje se detectó la presencia de Ca y P indicando la homogeneidad del recubrimiento obtenido. En la Figura 23D se presenta el espectro EDS obtenido del análisis realizado a muestras con tratamiento térmico pos-deposición.

El mapeo elemental (ver Figura 24) mostró una distribución relativamente homogénea de Ca y P, lo cual indica una cobertura completa de la superficie.

Sin embargo, desde el punto de vista funcional, la presencia de grietas representa un factor crítico, ya que puede favorecer el desprendimiento del recubrimiento, la delaminación bajo carga y una liberación iónica no controlada. Por tanto, aunque VD4 maximiza la cantidad de CaP depositado, no constituye necesariamente la condición óptima para aplicaciones biomédicas.

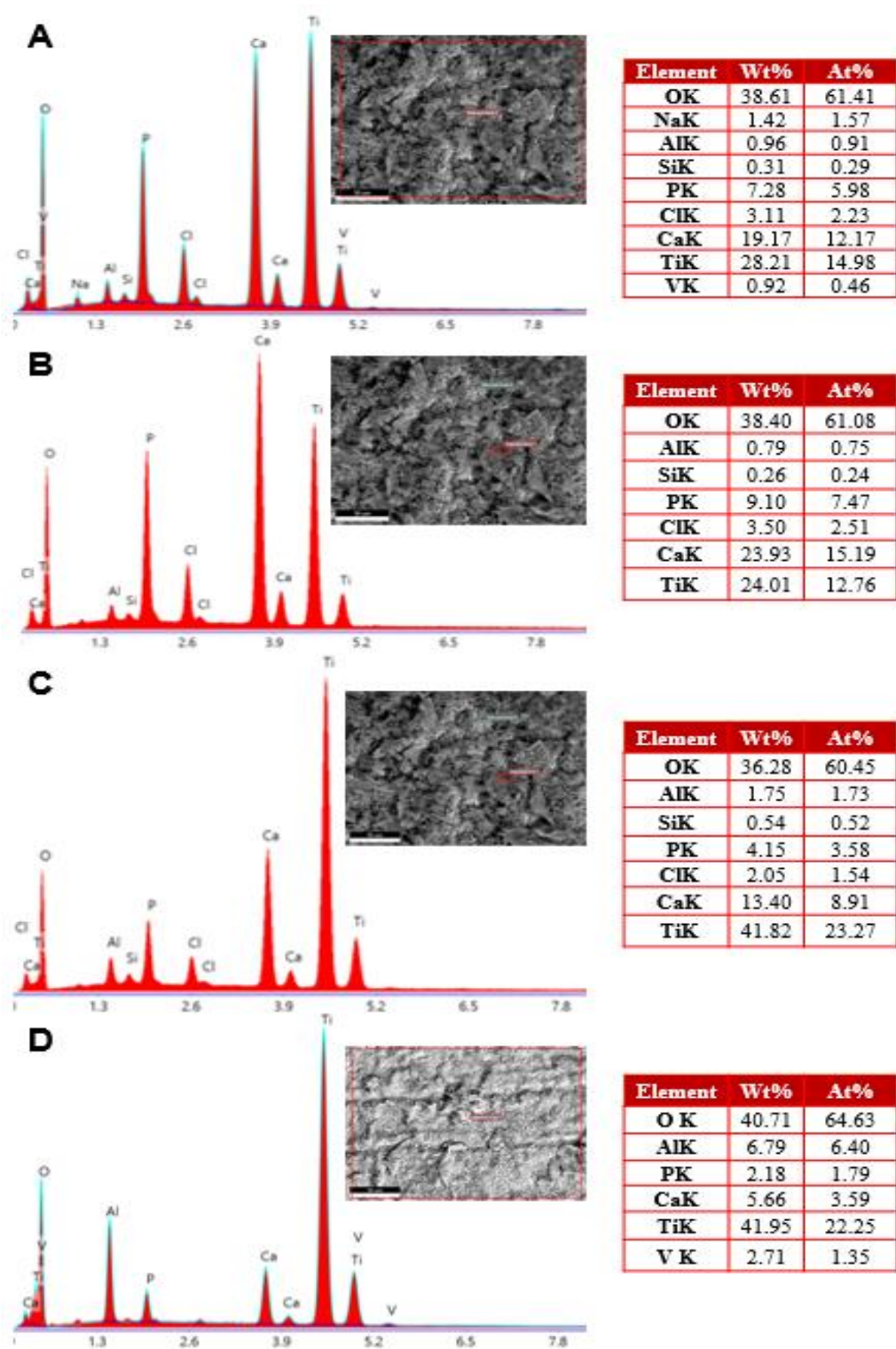


Figura 23. Espectros EDS de las superficies recubiertas con la VD4.

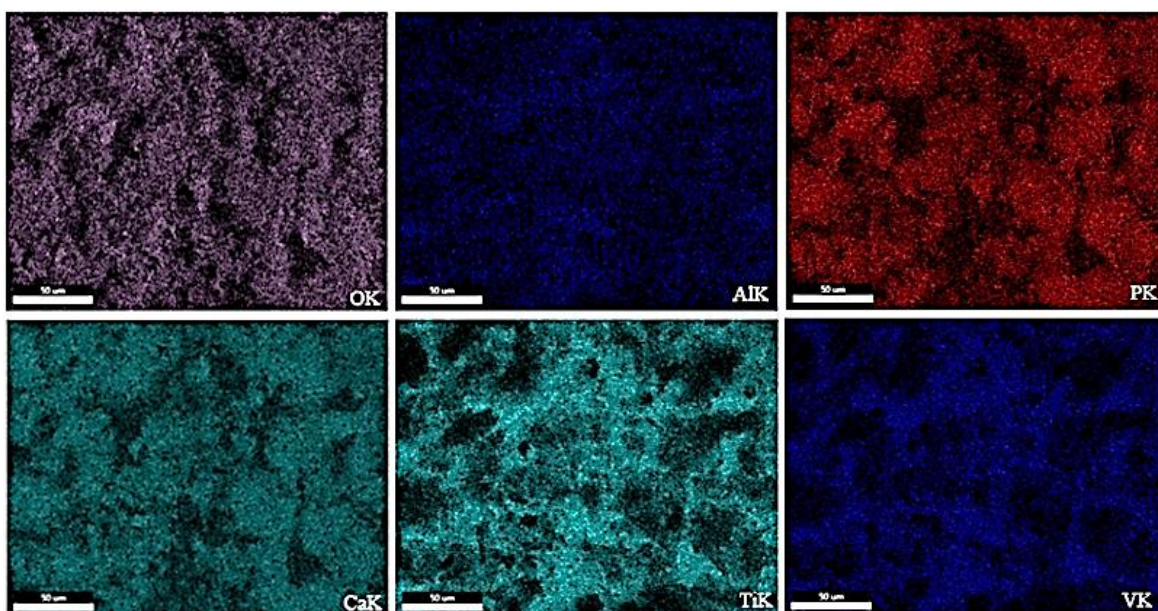


Figura 24. Distribución elemental obtenida por EDS para la superficie de Ti6Al4V recubierta con VD4.

El análisis comparativo de las cuatro variantes de deposición muestra que tanto la concentración iónica como el tiempo de inmersión son factores determinantes para controlar la morfología, homogeneidad, espesor y estabilidad del recubrimiento. En particular, las variantes VD1 y VD2 muestran capas delgadas y heterogéneas, con una cobertura que no es del todo completa; esto sugiere que una sobresaturación limitada y/o un tiempo de crecimiento insuficiente están restringiendo la formación de una red continua de fosfatos de calcio. Aunque al aumentar el tiempo de inmersión en VD2 se logró una mayor acumulación de CaP en comparación con VD1, se notó que los recubrimientos seguían siendo parcialmente discontinuos.

Al analizar la variante VD3, se observó que presenta una capa continua, homogénea, densa y sin agrietamientos significativos. La mayor actividad iónica aumentó la sobresaturación en comparación con la apatita, lo que facilitó una nucleación heterogénea rápida y un crecimiento cristalino lateral sostenido. Como resultado, se logró una capa de CaP en un tiempo de deposición relativamente corto. El tratamiento térmico posterior a la deposición causó una densificación

parcial y la formación de cuellos entre partículas, lo que sugiere una mayor cohesión del recubrimiento y, potencialmente, una adhesión más fuerte al sustrato. Estas características son coherentes con las ventanas optimizadas de deposición biomimética que se han reportado en la literatura [85, 86].

Con la variante VD4, se generaron recubrimientos más gruesos y los niveles más altos de Ca y P. Sin embargo, se notó un agrietamiento significativo, que se atribuye al espesor excesivo y a los esfuerzos residuales relacionados con la contracción durante el secado y el desajuste en los coeficientes de expansión térmica. Este comportamiento refleja el compromiso entre maximizar la deposición de CaP y mantener la confiabilidad mecánica del recubrimiento [87].

En este sentido, la variante VD3 (SBFX10 – 4 h) se destaca como la mejor opción para continuar con el proceso de incorporación de Zn^{2+} , ya que ofrece un equilibrio adecuado entre cobertura superficial, homogeneidad y estabilidad estructural. Estas características son esenciales para asegurar una distribución uniforme del Zn, una cinética de liberación controlada y una actividad antibacteriana reproducible, alineándose con la hipótesis central de esta tesis.

4.4 Evaluación de los recubrimientos de fosfatos de calcio modificados con zinc

Una vez concluida la etapa de activación superficial, las muestras de Ti6Al4V fueron empleadas como sustratos para la deposición biomimética de recubrimientos Zn-CaP. El proceso se realizó durante 4 h en soluciones SBF×10, enriquecidas en Ca^{2+} y especies fosfato, a las cuales se adicionaron iones Zn^{2+} en concentraciones controladas para favorecer su incorporación en las capas de fosfatos de calcio formadas sobre la superficie metálica

La inclusión de Zn^{2+} en recubrimientos basados en fosfatos de calcio se fundamenta en su reconocido papel biológico, tanto en procesos de osteogénesis como en la modulación de la actividad antibacteriana y antiinflamatoria. Diversos estudios han demostrado que el zinc puede incorporarse parcialmente en la red

cristalina de la hidroxiapatita mediante sustitución isomórfica de Ca^{2+} , o bien permanecer adsorbido superficialmente, modificando la cinética de nucleación, el tamaño cristalino y la estabilidad termodinámica de la fase apatítica [88-91].

Con el fin de evaluar de manera sistemática el efecto del Zn, se diseñaron tres variantes de deposición con diferente concentración de zinc en la solución: baja (VDZn1), intermedia (VDZn2) y alta (VDZn3). Este enfoque permitió analizar la influencia del contenido de Zn sobre la morfología, composición y homogeneidad del recubrimiento, así como su impacto en la cinética de liberación iónica y, en consecuencia, en la bioactividad y la respuesta antibacteriana del sistema.

4.4.1 Morfología de los recubrimientos biomiméticos Zn-CaP

Las características morfológicas de los recubrimientos obtenidos con la variante VDZn1, asociada al menor contenido de Zn y posterior al proceso de tratamiento térmico, se presentan en la Figura 25 mediante micrografías FE-SEM obtenidas a diferentes magnificaciones.

El recubrimiento se caracteriza por la formación de aglomerados de partículas con presencia de estructuras laminares organizadas en configuraciones tipo flor, sobre las cuales crecen precipitados secundarios de morfología globular. Esta morfología es consistente con mecanismos de nucleación heterogénea y crecimiento orientado típico de fosfatos de calcio obtenidos por rutas biomiméticas, donde la sobresaturación local favorece la formación inicial de fases amorfas o poco cristalinas, que evolucionan progresivamente hacia estructuras tipo apatita [92, 93].

La presencia de zinc en bajas concentraciones no inhibe de manera significativa la formación de estas estructuras; sin embargo, puede modificar la energía superficial de los núcleos de apatita, favoreciendo una ligera refinación microestructural, en concordancia con lo reportado para sistemas Zn-HA y Zn-CaP en condiciones similares [94, 95].

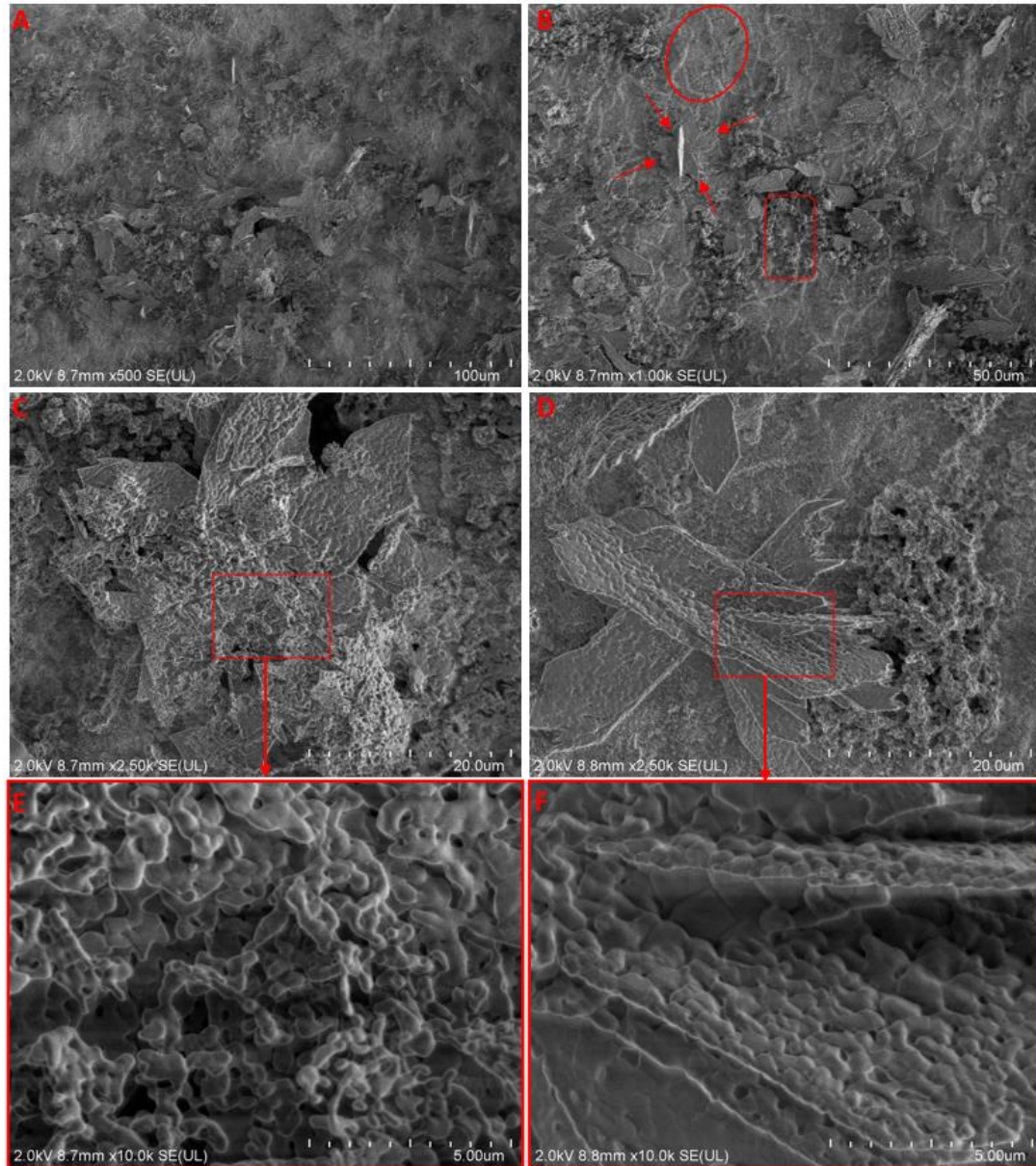


Figura 25. Micrografías FE-SEM de la superficie VDZn1 (menor concentración).
Magnificaciones 500x, 1000x, 2500x y 10000x.

Para la variante VDZn2 (Figura 26), correspondiente a una concentración intermedia de Zn, se observa una morfología global similar a la de VDZn1; no obstante, se evidencia una disminución en el tamaño promedio de partícula y un mayor grado de fragmentación de los aglomerados.

Este comportamiento es consistente con el papel del Zn como modulador de la cinética de cristalización, actuando como inhibidor parcial del crecimiento

cristalino de la apatita, reduciendo el tamaño de cristal y/o grano sin alterar drásticamente la fase apatítica principal [94, 96].

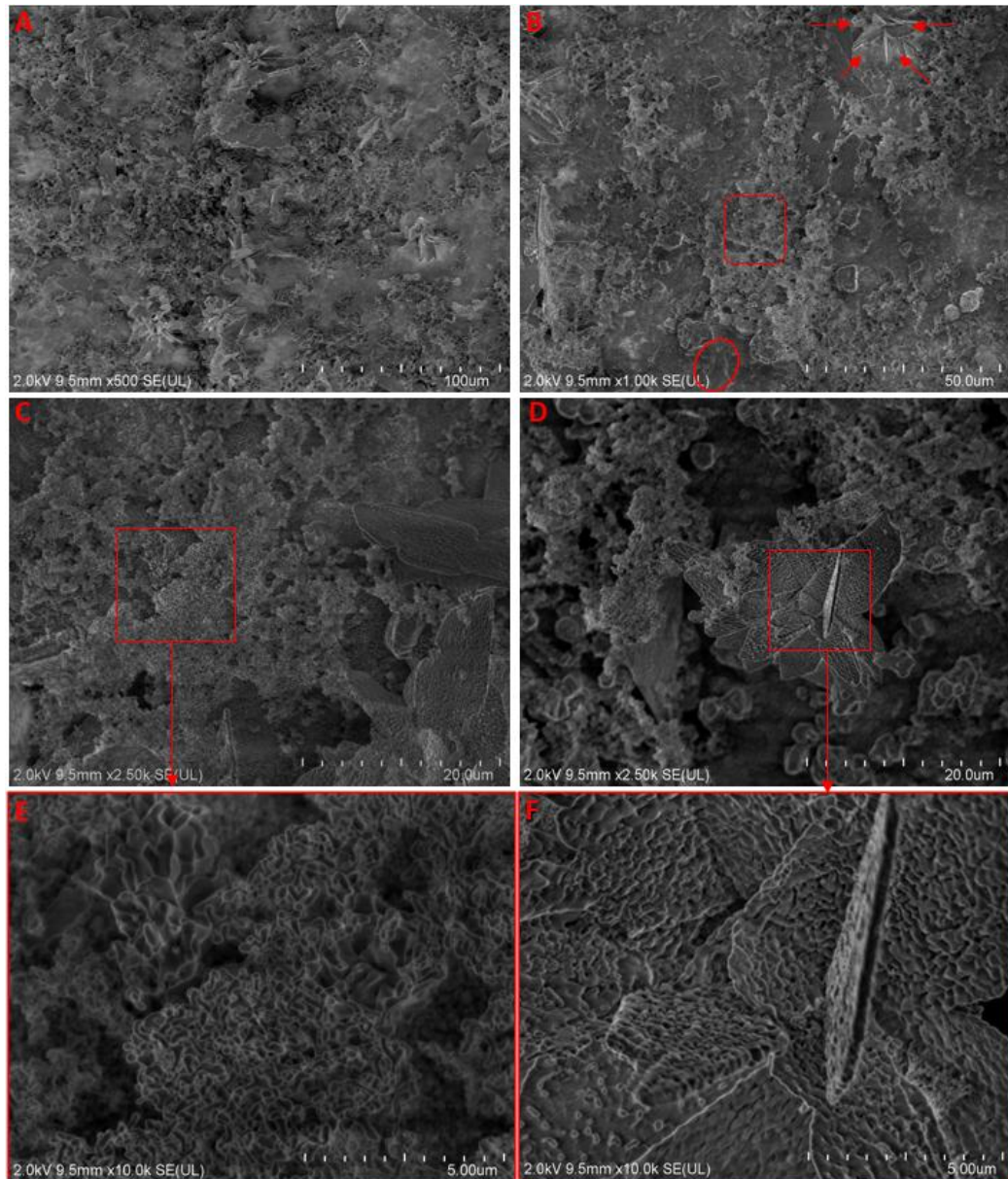


Figura 26. Micrografías FE-SEM de la superficie VDZn2 (concentración intermedia).
Magnificaciones 500x, 1000x, 2500x y 10000x.

En sistemas basados en hidroxiapatita, la incorporación o adsorción de iones Zn^{2+} puede competir con iones Ca^{2+} por los sitios de coordinación lo que provoca distorsiones locales en la red. Esto, a su vez, disminuye la tasa de crecimiento de

las caras cristalinas y favorece la formación de partículas más finas y menos compactas [95, 97]. Este fenómeno se relaciona con una ligera refinación microestructural y una mayor fragmentación que se observa en VDZn2 en comparación con VDZn1.

En la variante VDZn3 (ver Figura 27), que tiene la mayor concentración de Zn, no se observan cambios morfológicos cualitativos significativos en las formas de las estructuras. Sin embargo, se evidencia una menor densidad de cobertura superficial y una distribución de partículas no tan homogénea. A diferencia de VDZn1 y VDZn2, este comportamiento sugiere que altas concentraciones de Zn no solo limitan el crecimiento cristalino, sino que también impactan los procesos de nucleación, reduciendo la formación y agregación de partículas en el recubrimiento.

Este fenómeno ha sido ampliamente documentado, donde un exceso de zinc puede reducir la sobresaturación efectiva y estabilizar fases intermedias amorfas, lo que a su vez retrasa la precipitación de fosfatos de calcio [91, 98]. Además, en procesos electroquímicos, altas concentraciones de Zn han mostrado favorecer morfologías menos compactas y con una distribución heterogénea debido a cambios en la cinética de deposición y en la orientación preferente del crecimiento cristalino [99, 100]

Por tanto, el efecto observado en VDZn3 es consistente con un mecanismo donde el exceso de zinc actúa como inhibidor tanto de nucleación como del crecimiento, resultando en recubrimientos menos densos y con partículas distribuidas de forma más dispersa.

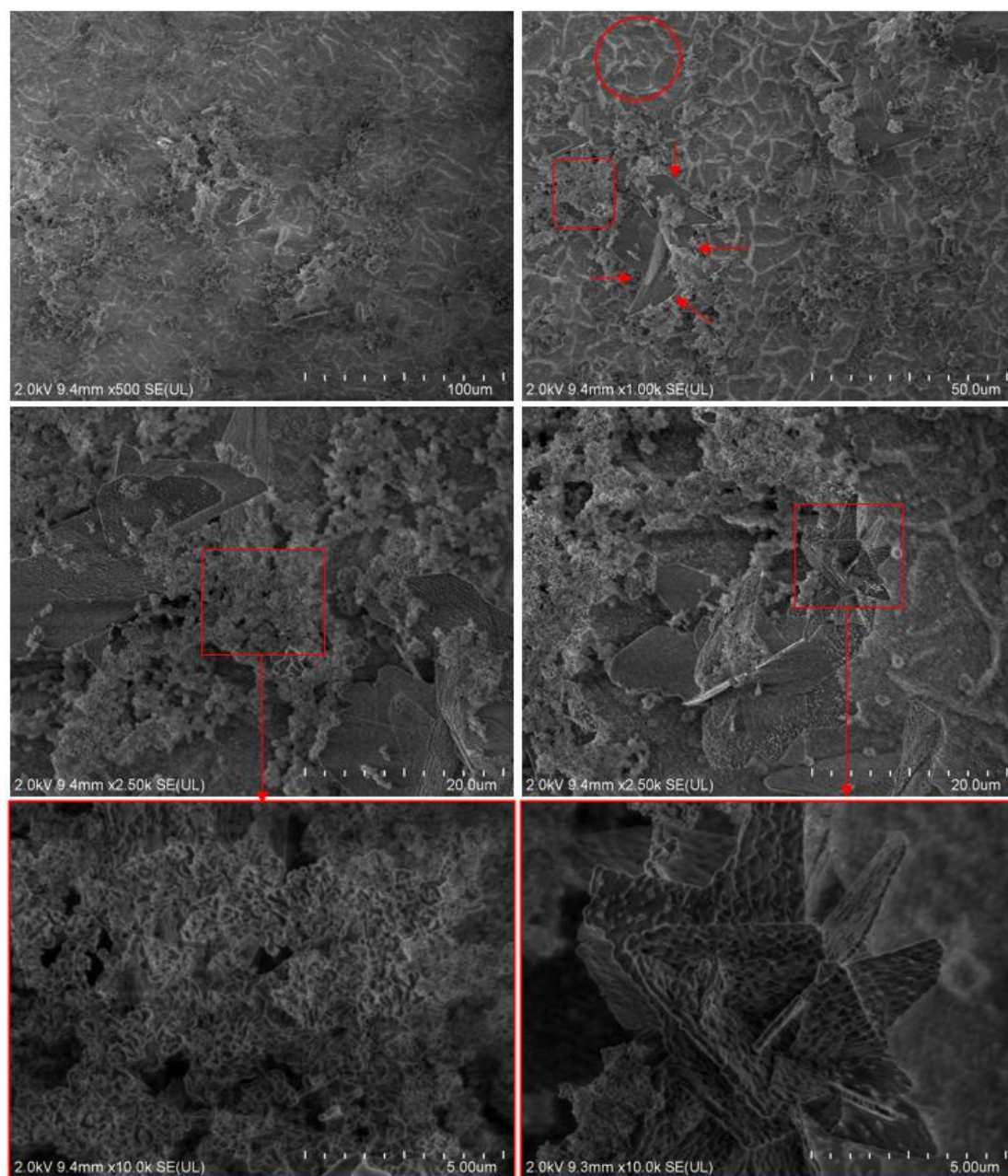


Figura 27. Micrografías FE-SEM de la superficie VDZn3 (mayor concentración).
Magnificaciones 500x, 1000x, 2500x y 10000x.

De manera general, las tres variantes evidencian que el incremento en la concentración de Zn conduce a una transición desde recubrimientos relativamente compactos (VDZn1) hacia estructuras más refinadas y fragmentadas (VDZn2), hasta sistemas menos densos y más heterogéneos (VDZn3).

Este comportamiento microestructural tiene implicaciones directas en la bioactividad, ya que la rugosidad, el tamaño de partícula y la heterogeneidad superficial influyen en la adsorción de proteínas, adhesión celular y posterior formación de una capa de apatita *in vivo* [101].

4.4.2 Composición elemental de los recubrimientos biomiméticos Zn-CaP

En la Figura 28 se presentan los espectros EDS correspondientes a las superficies recubiertas con las variantes VDZn1, VDZn2 y VDZn3. En todos los casos se identifican picos asociados a Ca, P y O, lo que confirma la formación de una capa de fosfatos de calcio. También se detecta una señal correspondiente al elemento Zn, junto con Ti y Al, elementos provenientes del sustrato de Ti6Al4V.

Los resultados semicuantitativos del análisis EDS (Tabla 5) evidencian un aumento progresivo en el contenido atómico de Zn en el recubrimiento a medida que su concentración en la solución aumenta, alcanzando valores de 0.4 at% para VDZn1, 0.7 at% para VDZn2 y 0.9 at% para VDZn3. Este comportamiento confirma la incorporación efectiva del zinc mediante el método biomimético y coincide con estudios que indican que el Zn puede integrarse tanto por sustitución parcial del Ca^{2+} como por adsorción superficial en las fases de hidroxiapatita, afectando la composición y estructura cristalina sin eliminar la fase principal [102, 103].

Adicionalmente, se observa un ligero incremento en los contenidos de Ca y P especialmente en la variante VDZn2, lo que sugiere una ventana óptima donde concentraciones moderadas de Zn favorecen tanto la nucleación de apatita como la incorporación de Zn^{2+} , sin inhibir de manera significativa el crecimiento cristalino.

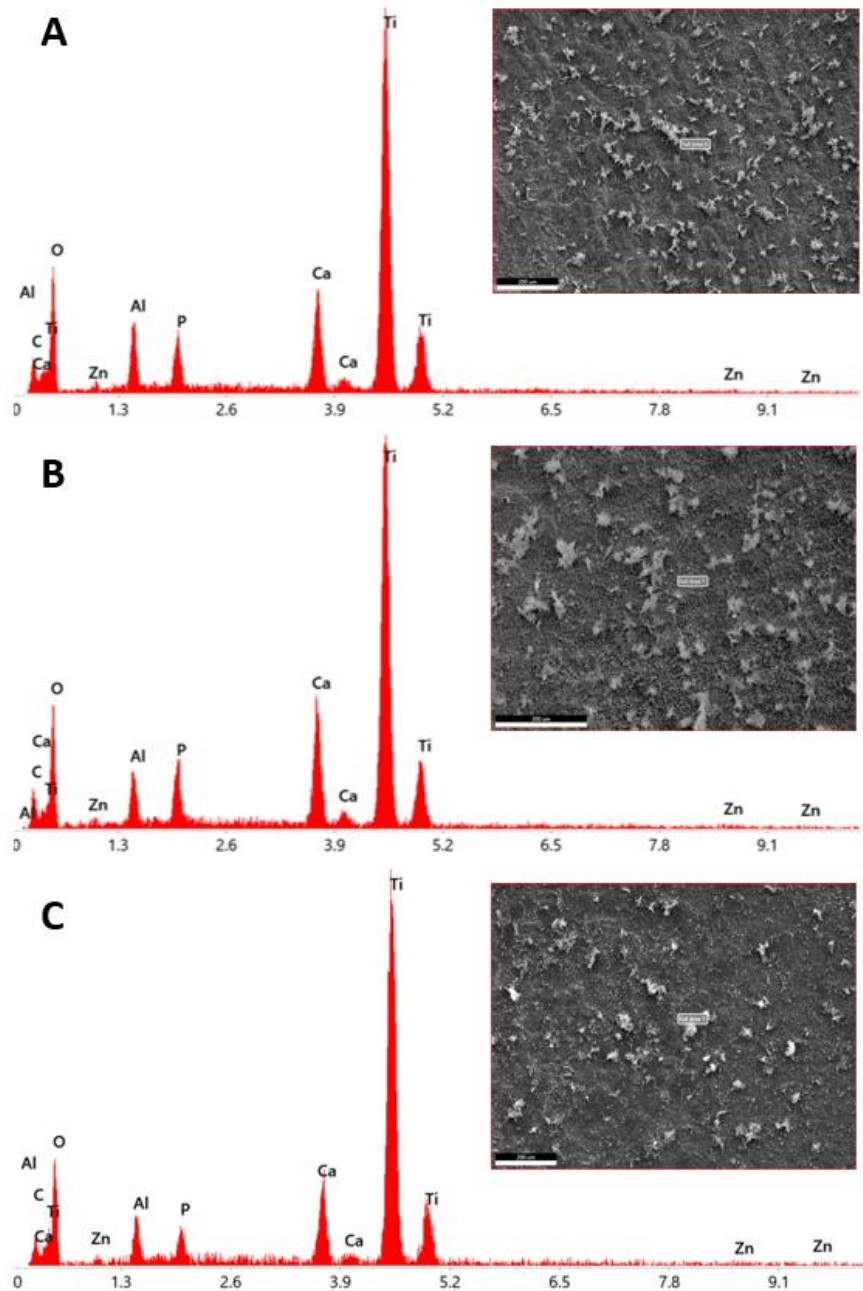


Figura 28. Espectros EDS de las superficies recubiertas con: A, VDZn1; B, VDZn2; y C, VDZn3.

Este fenómeno ha sido reportado como beneficioso para la bioactividad, ya que el Zn modifica la energía superficial de los cristales y favorece la interacción con el medio biológico [91, 104, 105]. En este contexto, VDZn2 resalta como una configuración donde se alcanza un equilibrio entre el crecimiento de la fase CaP y la incorporación de Zn.

Tabla 5. Análisis semicuantitativo mediante EDS de las variantes de depósito con inclusión de Zn.

VARIANTE DEPOSICIÓN	ELEMENTOS (At%)						
	C	O	Al	P	Ca	Ti	Zn
VDZn1	24.2	51.5	2.4	1.6	3.3	16.6	0.4
VDZn2	22.4	51.6	2.0	1.9	4.2	17.2	0.7
VDZn3	21.5	51.6	2.1	1.2	3.1	19.6	0.9

El análisis EDS puntual (Figura 29) confirma que las estructuras con morfología tipo flor presentan altos contenidos de Ca, P y O, característicos de precipitados de apatita, lo cual respalda la formación de recubrimientos biomiméticos típicos, independientemente del nivel de inclusión de Zn.

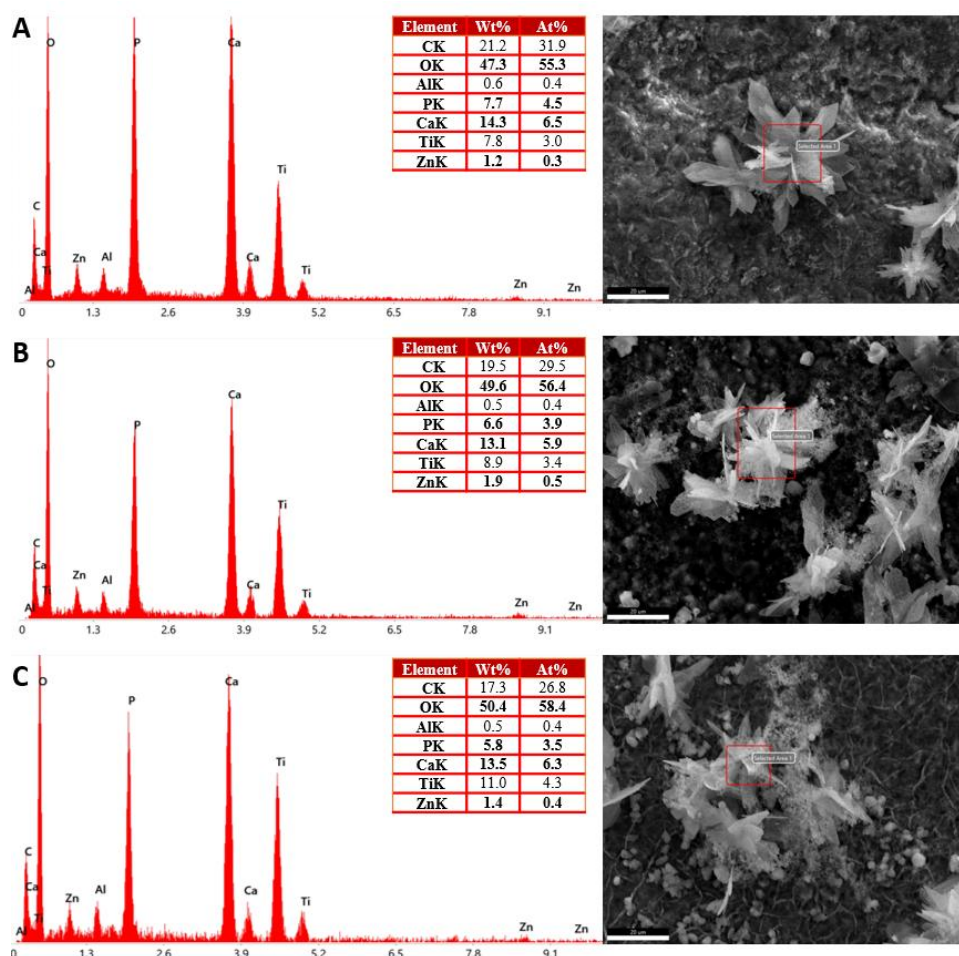


Figura 29. Análisis EDS puntuales de las superficies de Ti6Al4V recubiertas con la VDZn1 (A), VDZn2 (B) y VDZn3 (C).

La detección simultánea de Zn indica que el zinc está asociado directamente a la fase CaP, ya sea incorporado en la red cristalina o adsorbido en la superficie de los cristales.

Para corroborar la incorporación del zinc y evaluar su estado químico superficial, se realizó un análisis por XPS (Figura 30). Los resultados confirman la presencia de Zn en todas las variantes, con contenidos superficiales crecientes de 0.24 at%, 0.59 at% y 0.93 at% para VDZn1, VDZn2 y VDZn3, respectivamente. Estos valores son coherentes con los resultados semicuantitativos obtenidos por EDS, lo que indica una incorporación consistente de Zn tanto a escala micrométrica, evaluada mediante EDS, como en los primeros nanómetros de la superficie.

Las energías de enlace detectadas son consistentes con Zn^{2+} coordinado en ambientes oxigenados típicos de hidroxiapatita dopada con zinc (ver Tabla 6). Estos valores están en concordancia con reportes previos para Zn-HA y otros CaP modificados [90, 91, 101].

- ✓ O1s (~530–531 eV), atribuible a oxígeno enlazado en grupos fosfato y especies hidroxilo asociadas a la fase apatítica,
- ✓ Ca2p (~346–347 eV), típico de Ca^{2+} en apatitas,
- ✓ P2p (~133.5 eV), característico de grupos fosfato,
- ✓ Zn2p (~1020–1022 eV), atribuible a Zn^{2+} coordinado en ambientes oxigenados.

Tabla 6. Energías de enlace determinadas por XPS para los recubrimientos Zn-CaP depositados sobre Ti6Al4V.

VARIANTE DEPOSICIÓN	ENERGÍA DE ENLACE (EV)				
	C1s	O1s	Ca2p	P2p	Zn2p
VDZn1	284.6	530.7	347.2	133.5	1021.9
VDZn2	284.6	530.0	346.7	133.5	1020.7
VDZn3	284.6	529.3	346.2	133.5	1021.3

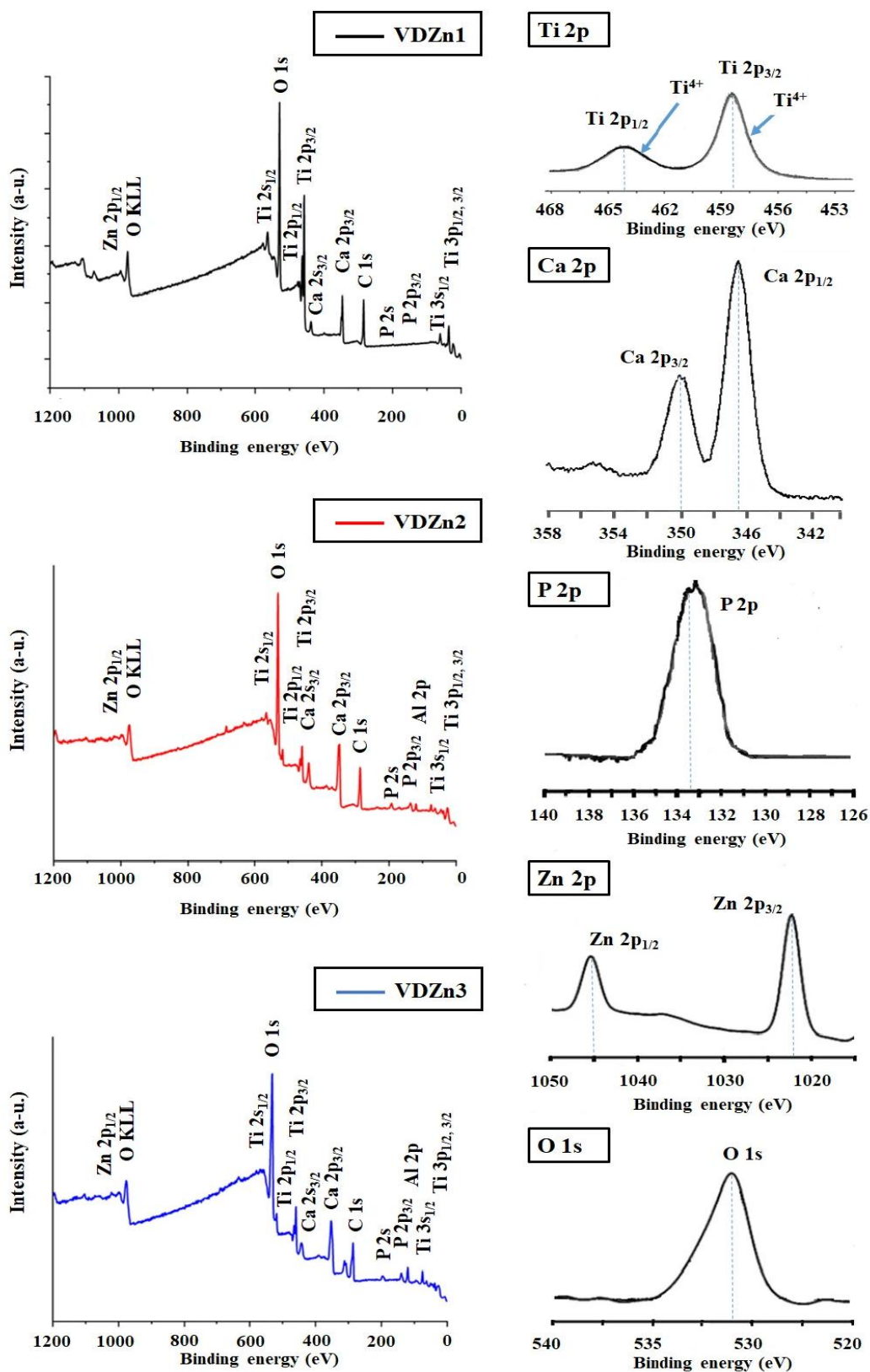


Figura 30. Caracterización química superficial por XPS de los recubrimientos Zn-CaP depositados sobre Ti6Al4V.

Los espectros de alta resolución correspondientes a Ti 2p, O 1s, Ca 2p, P 2p y Zn 2p fueron analizados mediante una asignación más clara de los estados químicos asociados. Para el estado de oxidación Ti^{4+} , las señales más relevantes se detectaron en la región Ti 2p_{3/2}, que oscila entre 458.3 y 458.8 eV, y en la región Ti 2p_{1/2}, que se sitúa aproximadamente entre 463.9 y 464.5 eV. En cuanto a las señales de Ca 2p y P 2p, son características de las fases de fosfato de calcio. Los dos picos que se identificaron en la región de Ca 2p, con energías de enlace de 346.8 eV y 350.3 eV, coinciden con las posiciones típicas de Ca 2p_{3/2} y Ca 2p_{1/2}, respectivamente.

La señal de Zn 2p_{3/2}, que se encuentra entre 1021 y 1022 eV, respalda la presencia de especies de Zn, sin que haya evidencia de zinc metálico ni de otros estados de oxidación. Además, el espectro O 1s fue deconvolucionado en contribuciones relacionadas con oxígeno de red, grupos hidroxilo y especies adsorbidas, lo que brinda información adicional sobre la química superficial y los posibles sitios de nucleación.

La falta de desplazamientos significativos hacia energías de enlace que correspondan al Zn metálico sugiere que el zinc está en estado oxidado (Zn^{2+}), y no en forma de agregados metálicos [106]. Por otro lado, la variación relativamente estrecha en las posiciones de Ca 2p y P 2p entre las tres variantes indica que la estructura apatítica global mantiene una estabilidad química, a pesar de la incorporación de Zn.

Un análisis más profundo de la señal O 1s revela un ligero desplazamiento hacia energías de enlace más bajas a medida que aumenta el contenido de Zn, pasando de 531.1 eV en VDZn1 a 529.2 eV en VDZn3. Este cambio sutil podría reflejar diferencias en el entorno químico local del oxígeno, posiblemente relacionadas con la coordinación Zn-O o, con variaciones en la cantidad de grupos hidroxilo dentro de la red apatítica. De manera similar, las pequeñas variaciones en las posiciones de los picos Ca 2p podrían estar vinculadas a distorsiones menores de la red provocadas por la incorporación de Zn, ya que el radio iónico de Zn^{2+} es

más pequeño que el de Ca^{2+} . Incluso una sustitución limitada puede generar perturbaciones electrónicas que se pueden detectar con técnicas sensibles a la superficie como la XPS [107].

La incorporación de zinc en los recubrimientos de CaP mediante la ruta biomimética constituye una de las contribuciones centrales de este estudio. Los análisis por EDS y XPS confirman la introducción exitosa de pequeñas pero medibles cantidades de Zn en todas las variantes evaluadas. Es importante señalar que el análisis por XPS demuestra que el zinc se encuentra presente como Zn^{2+} en un entorno coordinado con oxígeno, lo cual es coherente con su asociación química con la fase de fosfato de calcio, más que con una simple contaminación superficial. Este resultado confirma que el proceso biomimético permite una integración química efectiva del zinc dentro del recubrimiento [108].

La química de precipitación de los fosfatos de calcio se ve influenciada por la adición de zinc. La variación progresiva de la relación atómica Ca/P desde VDZn1 hasta VDZn3 indica que la concentración de Zn altera el desarrollo de fases y la dinámica del crecimiento cristalino. En concentraciones bajas y medias de Zn (VDZn1 y VDZn2), las relaciones Ca/P están vinculadas a una apatita con bajo contenido de calcio, una fase que se caracteriza por tener mayor solubilidad y reactividad biológica en comparación con la hidroxiapatita estequiométrica. Bajo las condiciones evaluadas, tanto la morfología típica de la apatita como una adecuada cobertura superficial se mantienen en gran medida, lo que sugiere que la incorporación moderada de Zn no afecta el equilibrio entre la nucleación y el crecimiento en el sistema biomimético.

Entre las condiciones estudiadas, la variante de depósito VDZn2 se destaca como la formulación más equilibrada. Esta variante combina una concentración moderada de zinc con una relación Ca/P más cercana a la estequiometría de la apatita, lo que sugiere un crecimiento cristalino controlado sin comprometer la estabilidad de fase. Este equilibrio en la composición y microestructura es relevante para aplicaciones biomédicas. La apatita con bajo contenido de calcio

puede favorecer el intercambio iónico y la reactividad en la superficie, al mismo tiempo que mantiene una integridad estructural suficiente para asegurar la estabilidad del recubrimiento.

La mayor concentración de Zn (VDZn3) hace que la composición se desplace hacia un entorno más rico en calcio ($\text{Ca/P} = 1.80$). Esto sugiere un cambio en la dinámica de precipitación y una posible heterogeneidad de fases. Esta desviación está relacionada con una menor homogeneidad del recubrimiento y una cobertura superficial reducida, lo que indica que un exceso de Zn podría desestabilizar la ventana óptima para la deposición biomimética [109].

Aunque el análisis por XPS confirma el estado químico del zinc en la superficie, esta técnica no puede determinar con certeza si el Zn^{2+} se incorpora de manera sustitucional en la red apatítica o si, por el contrario, se encuentra mayormente adsorbido en la superficie de los cristales. Dado que XPS se limita a la capa más externa del material y proporciona principalmente información sobre el estado de oxidación y el entorno químico local, es fundamental realizar estudios estructurales complementarios para aclarar el mecanismo de incorporación.

La técnica de difracción de rayos X con refinamiento Rietveld podría revelar cambios sutiles en los parámetros de red; la espectroscopía FTIR o Raman permitiría identificar desplazamientos vibracionales relacionados con los grupos fosfato o hidroxilo; y los estudios de liberación iónica en medios fisiológicos ayudarían a determinar el comportamiento de disolución y la cinética de liberación de Zn^{2+} [110].

La presencia controlada de Zn en la capa CaP es relevante biológicamente porque el Zn^{2+} ha demostrado que estimula la diferenciación osteoblástica, promueve la mineralización ósea, exhibe actividad antibacteriana frente a patógenos comunes asociados a infecciones de implantes y modula la respuesta inflamatoria local [9, 91, 111]. Por tanto, los recubrimientos Zn-CaP representan sistemas multifuncionales que pueden mejorar tanto la osteointegración como reducir el

riesgo de infección en implantes óseos, estableciendo una conexión directa con los estudios posteriores de bioactividad y capacidad antibacteriana.

4.4.3 Espesor de los recubrimientos biomiméticos Zn-CaP

La Figura 31 muestra el espesor de los recubrimientos obtenidos para las variantes Zn-CaP (VDZn1, VDZn2 y VDZn3), determinado mediante el análisis de la sección transversal por FE-SEM. Para ello, se obtuvieron micrografías representativas en corte transversal, lo que permitió observar directamente la interfaz entre el recubrimiento y el sustrato.

Los resultados indican que los recubrimientos presentan un espesor relativamente uniforme, con valores promedio en un intervalo aproximado de 9-11 μm . Este rango de espesor es consistente con capas de CaP obtenidas por deposición biomimética bajo condiciones similares, donde el crecimiento del recubrimiento está controlado por procesos de nucleación y difusión iónica en fluido biológico simulado. La uniformidad que se observa indica lo efectivo del tratamiento previo de activación superficial para promover una nucleación homogénea sobre el sustrato.

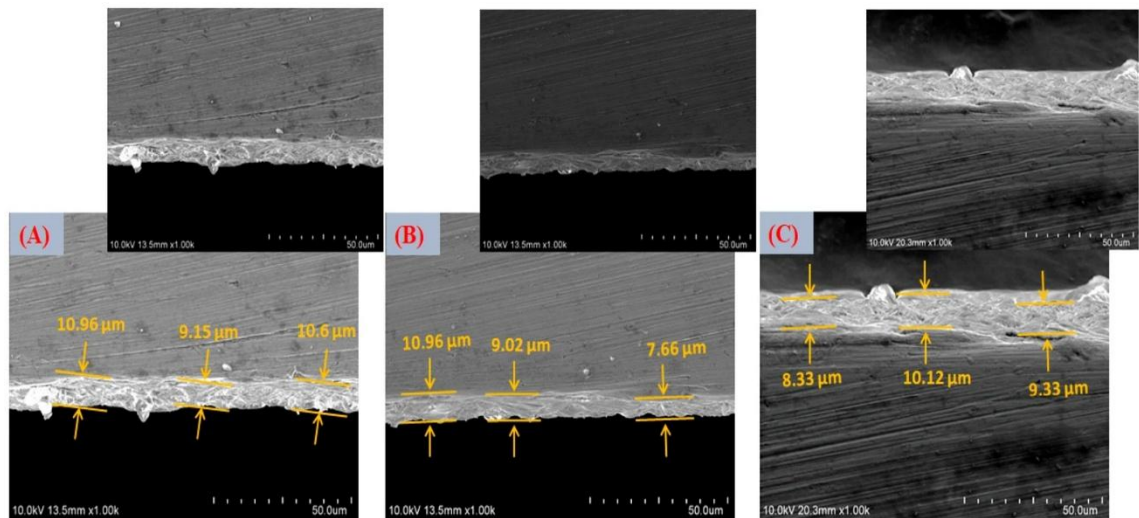


Figura 31. Micrografías FE-SEM del espesor de los recubrimientos Zn-CaP: (A) VDZn1, 1000 $\times$; (B) VDZn2, 1000 $\times$; y (C) VDZn3, 1000 $\times$.

Desde una perspectiva de funcionalidad, los valores de espesor obtenidos son adecuados para ofrecer una cobertura completa de la superficie, asegurando una adecuada adhesión en la interfaz y evitando la generación de esfuerzos internos excesivos. Además, se ha reportado que los recubrimientos dentro de este intervalo de espesor favorecen una liberación iónica controlada y un comportamiento bioactivo, sin comprometer la estabilidad mecánica.

Para complementar la evaluación de la composición homogénea en el recubrimiento y confirmar la incorporación de Zn, se realizó un mapeo elemental mediante FE-SEM/EDS para cada variante Zn-CaP (ver Figura 32). Los resultados de EDS (ver Tabla 7) confirmaron que todos los recubrimientos están compuestos principalmente por O, Ca y P, lo que coincide con la formación de fases de fosfato de calcio, además de la presencia de Zn.

Tabla 7. *Análisis semicuantitativo por mapeo elemental EDS de las variantes de recubrimiento con incorporación de Zn (% atómico).*

VARIANTE DEPOSICIÓN	ELEMENTOS (At%)			
	O	P	Ca	Zn
VDZn1	85.4	2.4	11.6	0.6
VDZn2	82.7	4.2	12.4	0.7
VDZn3	86.4	4.6	8.0	1.0

En el caso de VDZn1, la composición fue de 70.5 % en peso de O, 23.9 % en peso de Ca, 3.8 % en peso de P y 1.9 % en peso de Zn (0.6 at%), lo que indica una incorporación exitosa de Zn en bajos niveles. Se observó una tendencia composicional similar para VDZn2, lo que confirma la reproducibilidad del proceso biomimético y sugiere que la incorporación de Zn en condiciones intermedias se mantiene relativamente estable sin modificar significativamente la composición de la matriz de CaP.

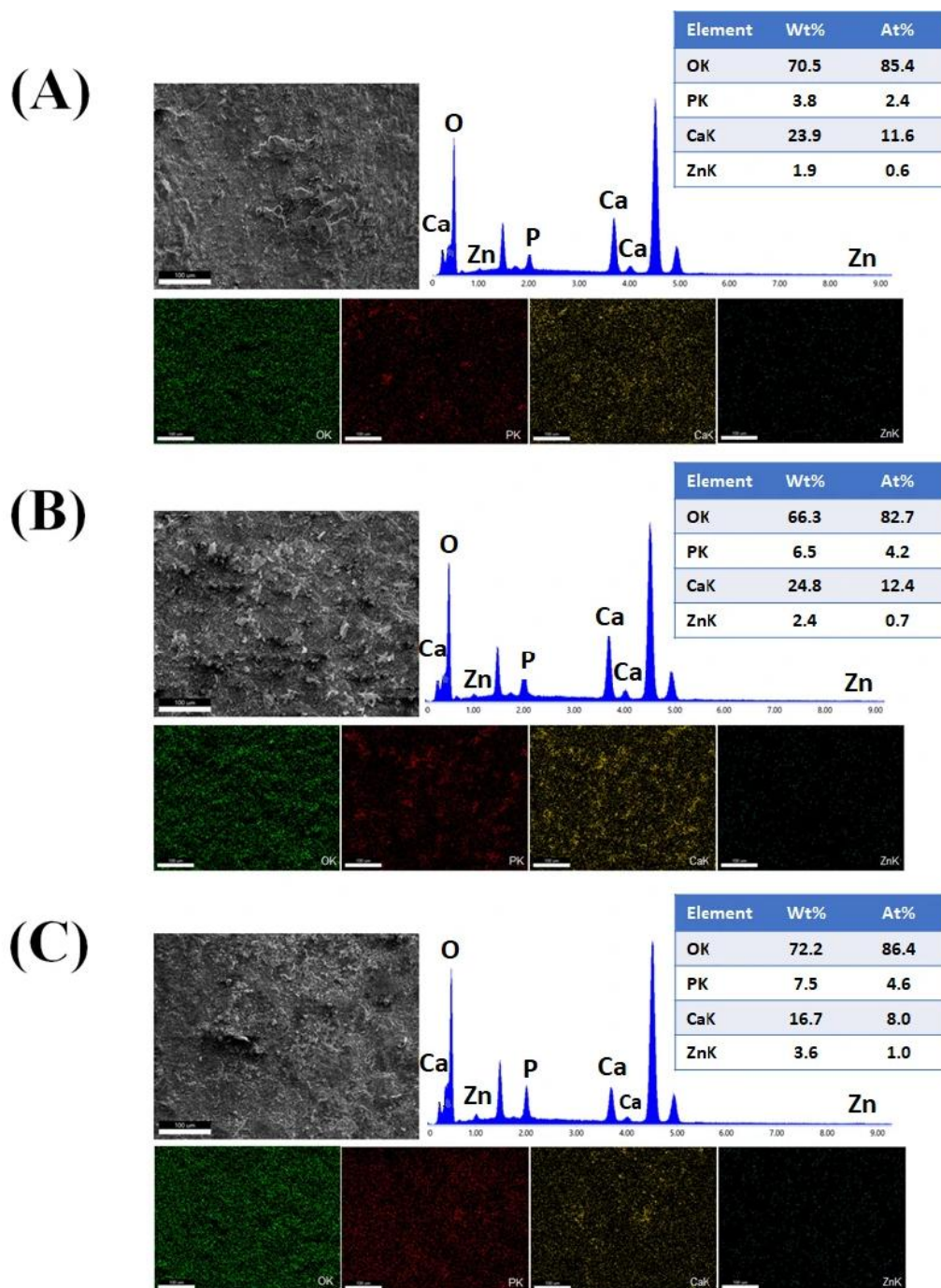


Figura 32. Mapeo elemental de las variantes Zn-CaP mediante FE-SEM-EDS: (A) VDZn1, (B) VDZn2 y (C) VDZn3.

Por otro lado, VDZn3 presentó un mayor contenido de Zn (3.6 % en peso, 1.0 % atómico), junto con una disminución en el contenido de Ca (16.7 % en peso) y un aumento en la concentración de oxígeno (72.2 % en peso). Este cambio en la

composición sugiere que una mayor inclusión de Zn modifica la química de precipitación, posiblemente favoreciendo la formación de fases de fosfato de calcio más hidratadas o con mayor densidad de defectos.

La disminución del contenido de calcio, junto con niveles de fósforo que se mantienen bastante estables, sugiere un cambio de una apatita estequiométrica hacia una fase que es más deficiente en calcio o que presenta alteraciones estructurales. Esto es coherente con las tendencias de Ca/P que hemos observado en secciones anteriores. El mapeo elemental mostró una distribución espacial bastante uniforme de calcio, fósforo y zinc a lo largo del espesor del recubrimiento en todas las variantes, sin señales de aglomerados ricos en zinc ni segregación de fases. Esta distribución equilibrada apoya la idea de que el zinc se incorpora tanto dentro de la matriz de CaP como en sitios accesibles en la superficie, en lugar de formar fases separadas basadas en zinc.

Desde una perspectiva microestructural, la combinación de un espesor uniforme y una distribución elemental homogénea sugiere que el proceso de deposición biomimética permite una incorporación controlada y reproducible de zinc, sin comprometer la continuidad ni la integridad del recubrimiento. Sin embargo, las variaciones en la composición que se observan con niveles más altos de zinc (VDZn3) indican que una incorporación excesiva de este ion puede alterar la cinética de crecimiento cristalino y la estequiometría local, lo que podría afectar tanto el comportamiento de disolución como la respuesta biológica.

La integración del análisis FE-SEM en sección transversal con los datos de composición y mapeo elemental por EDS ofrece una visión más completa de la relación entre estructura y composición en los recubrimientos de Zn-CaP. Estos resultados confirman que el espesor del recubrimiento, la distribución elemental y la incorporación de zinc están interrelacionados y deben equilibrarse cuidadosamente para lograr un rendimiento funcional óptimo.

4.4.4 Adhesión de los recubrimientos biomiméticos Zn-CaP

La evaluación de la adhesión de los recubrimientos biomiméticos Zn-CaP obtenidos se realizó de manera cualitativa mediante el análisis FE-SEM de la sección transversal de las muestras recubiertas. Posterior a los procesos de manipulación mecánica y limpieza ultrasónica a los que fueron sometidos, se observó que los recubrimientos no presentaron signos de delaminación, agrietamiento o desprendimiento, lo que sugiere una unión fuerte en la interfaz del recubrimiento con el sustrato de Ti6Al4V.

Bajo estas condiciones de procesamiento, el análisis FE-SEM reveló una interfaz continua y bien integrada, sin separaciones o defectos visibles, lo cual se relaciona comúnmente con una buena adhesión en sistemas biomiméticos (ver Figura 33).

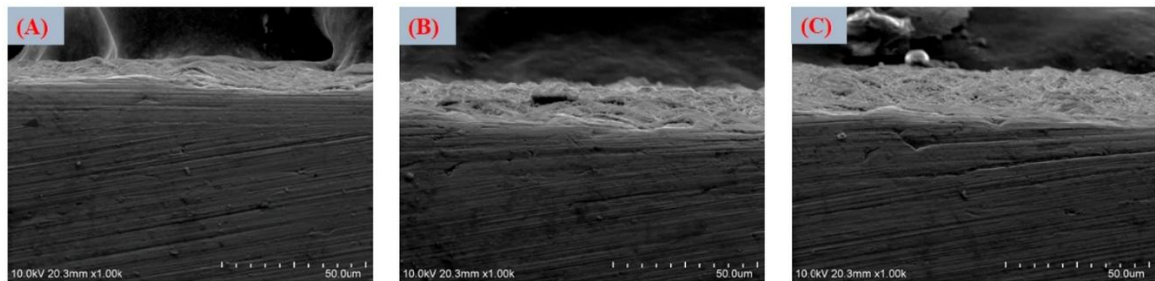


Figura 33. Micrografías FE-SEM de la capa de recubrimiento Zn-CaP después de la manipulación mecánica y limpieza ultrasónica: (A) VDZn1, 1000 $\times$; (B) VDZn2, 1000 $\times$; y (C) VDZn3, 1000 $\times$.

La propiedad de adhesión observada se puede atribuir principalmente a dos factores. Primero, el tratamiento de activación superficial crea una capa de TiO_2 que es micro rugosa y rica en iones OH^- , lo que favorece tanto el anclaje mecánico como la unión química. En segundo lugar, las bajas temperaturas durante el proceso de deposición biomimética facilitan la nucleación y el crecimiento gradual de CaP directamente sobre el sustrato, lo que ayuda a reducir los esfuerzos residuales que a menudo se presentan con otros métodos de recubrimiento, como la pulverización por plasma. Sin embargo, es crucial llevar a cabo estudios cuantitativos adicionales para evaluar con mayor precisión las propiedades mecánicas de estos recubrimientos.

Aunque en este trabajo no se incluyó inicialmente una prueba cuantitativa estandarizada de adhesión, como el ensayo de tracción tipo de acuerdo con la norma ASTM C633 (*Standard Test Method for Adhesion or Cohesion Strength of Thermal Spray Coatings*; ASTM International: West Conshohocken, PA, USA, 2013), o el ensayo de rayado conforme a ASTM C1624-05 (*Standard Test Method for Adhesion Strength and Mechanical Failure Modes of Ceramic Coatings by Quantitative Single Point Scratch Testing*; ASTM International: West Conshohocken, PA, USA, 2005), las características morfológicas que presenta la interfaz y los recubrimientos obtenidos son comparables con las reportadas por otros autores, quienes informaron valores de resistencia adhesiva en un intervalo aproximado de 10 a 30 MPa [112-114].

Estos valores son inferiores a los reportados para algunos recubrimientos obtenidos mediante procesos a alta temperatura, sin embargo, se consideran generalmente adecuados para aplicaciones en implantes dentales, donde la transferencia de carga es soportada principalmente por el sustrato metálico y la estabilidad a largo plazo se alcanza mediante fijación biológica, es decir, por oseointegración, más que únicamente por la adhesión del recubrimiento.

También es importante señalar que una resistencia adhesiva excesivamente alta no siempre es necesaria ni deseable en recubrimientos bioactivos, ya que la disolución parcial y la remodelación en la interfaz forman parte de su función biológica. En este contexto, la combinación de una adhesión inicial adecuada y una unión ósea progresiva resulta más relevante para el desempeño clínico

4.5 Caracterización biológica de recubrimientos Zn-CaP

4.5.1 Ensayo de citotoxicidad

La evaluación de la citotoxicidad de los recubrimientos Zn-CaP se realizó mediante el ensayo colorimétrico MTT, el cual se basa en la capacidad de las células viables para reducir el MTT a su forma insoluble, formazán, a través de la actividad de enzimas oxidoreductasas mitocondriales. En consecuencia, la cantidad de formazán formada es directamente proporcional a la integridad

mitocondrial, a la actividad metabólica celular y, por tanto, a la viabilidad [115] [116].

En una primera aproximación cualitativa, se observó un cambio de coloración del medio de cultivo hacia tonalidades violetas tras el contacto directo de las superficies correspondientes a las variantes VDZn1, VDZn2 y VDZn3 durante un periodo de 24 h (Figura 34). Este cambio cromático indica la reducción efectiva del MTT y confirma la preservación de la actividad metabólica básica de ambas líneas celulares, lo que sugiere que, aun en presencia de zinc, las superficies evaluadas no inducen una inhibición completa de la actividad mitocondrial.

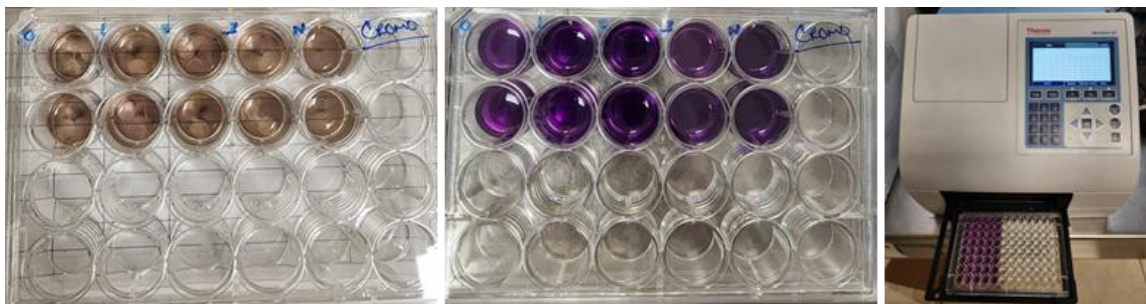


Figura 34. Cambio en la coloración del cultivo celular que estuvo en contacto directo con las muestras de las variantes de tratamiento VDZn0, VDZn1, VDZn2 y VDZn3.

Lector de microplacas.

Posteriormente, la cuantificación espectrofotométrica mediante lector de microplacas permitió determinar la absorbancia asociada a los cristales de formazán, a partir de la cual se calcularon los porcentajes de viabilidad celular empleando la Ecuación (1). Los resultados obtenidos para HGF y HDF, empleando controles negativo (CN) y positivo (CP) se presentan en la Figura 35.

Los valores obtenidos evidencian una disminución progresiva de la viabilidad celular con el incremento del contenido de zinc incorporado en el recubrimiento, comportamiento consistente para ambas líneas celulares (Tabla 8). En particular, los recubrimientos base CaP sin zinc (VDZn0) presentaron elevados porcentajes de viabilidad (≈ 90 -92 %), lo cual confirma la reconocida biocompatibilidad de los fosfatos de calcio y su amplio uso en aplicaciones biomédicas [64, 92].

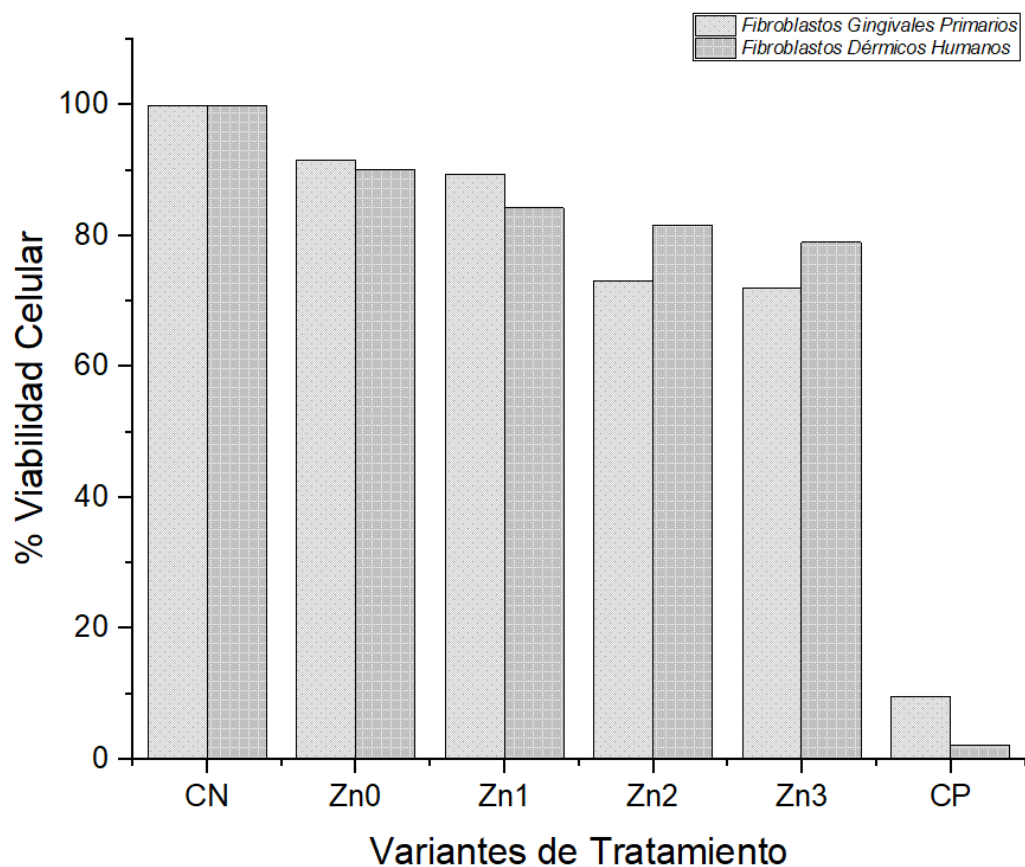


Figura 35. Respuesta celular de HGF y HDF frente a las superficies estudiadas, expresada como porcentaje de viabilidad. CN: control negativo; CP: control positivo.

En la variante con menor concentración de zinc (VDZn1), el porcentaje de viabilidad celular se mantuvo elevado (> 85 %), lo que indica que bajas cantidades de Zn^{2+} no causan efectos citotóxicos significativos. Este comportamiento es coherente con reportes donde se ha demostrado que la presencia de zinc incluso en concentraciones puede favorecer la proliferación celular y la actividad osteoblástica, actuando como cofactor enzimático y regulador de la expresión génica relacionada con la mineralización [89, 91].

Tabla 8. Porcentaje de viabilidad celular determinado mediante el ensayo MTT para las superficies evaluadas.

VARIANTE DEPOSICIÓN	VIABILIDAD CELULAR SEGÚN LÍNEA CELULAR (%) $\pm$ DE	
	Fibroblastos Gingivales Primarios	Fibroblastos Dérmicos Humanos
VDZn0	91.68 $\pm$ 2.10	90.26 $\pm$ 2.35
VDZn1	89.55 $\pm$ 2.45	84.36 $\pm$ 2.80
VDZn2	73.19 $\pm$ 3.10	81.74 $\pm$ 2.95
VDZn3	72.86 $\pm$ 3.25	79.07 $\pm$ 3.05

En el caso de VDZn2 y VDZn3, que son variantes con concentraciones intermedia y alta de zinc, se notó una disminución más marcada en la viabilidad celular. Las reducciones fueron del 26.81 % y 27.14 % para los fibroblastos gingivales, y del 18.26 % y 20.93 % para los fibroblastos dérmicos, en comparación con el control negativo. Este comportamiento sugiere que el Zn^{2+} tiene un efecto que depende de la dosis sobre la respuesta celular, algo que se ha documentado ampliamente en la literatura. Además, se relaciona con alteraciones en la homeostasis iónica intracelular, la generación de estrés oxidativo a concentraciones elevadas y posibles interferencias en los procesos metabólicos mitocondriales.

Los resultados del ANOVA mostraron que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales. El CP presentó una viabilidad celular significativamente menor en comparación con todos los demás grupos ($p < 0.001$), confirmando la sensibilidad del ensayo, mientras que el CN presentó los valores más altos de viabilidad.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el CN y el recubrimiento de CaP sin zinc (VDZn0) ($p > 0.05$), lo que indica la excelente biocompatibilidad del recubrimiento base. De manera similar, la variante con menor contenido de Zn (VDZn1) no presentó diferencias significativas respecto a

VDZn0 ($p > 0.05$), lo que sugiere que la incorporación de bajas concentraciones de Zn no afecta negativamente la viabilidad celular.

En contraste, los recubrimientos con concentraciones intermedias y altas de Zn (VDZn2 y VDZn3) mostraron una reducción estadísticamente significativa en el porcentaje de viabilidad celular en comparación con CN y VDZn0 ($p < 0.05$). Esto confirma el impacto que tiene la dosis de Zn en la respuesta celular. Sin embargo, no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre VDZn2 y VDZn3 ($p > 0.05$), lo que sugiere que el efecto citotóxico podría estabilizarse a concentraciones más elevadas de Zn.

A pesar del porcentaje de reducción cuantificado, todas las muestras con Zn mantuvieron valores de viabilidad celular por encima del 70 % para ambas líneas celulares. De acuerdo con los criterios establecidos por la norma ISO 10993-5, materiales que presentan viabilidades celulares superiores a este umbral pueden considerarse no citotóxicos o con citotoxicidad leve, lo que respalda la biocompatibilidad de los recubrimientos Zn-CaP desarrollados biomédicos [117, 118]. Los bajos valores de desviación estándar ($< 5\%$) respaldan además la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados obtenidos mediante el ensayo MTT.

Los resultados obtenidos evidencian la importancia de optimizar la cantidad de Zn incorporada en los recubrimientos con el fin de mantener una adecuada compatibilidad celular sin perder las propiedades funcionales asociadas a este elemento [91]. En particular, la variante VDZn1, y potencialmente a VDZn2, pueden considerarse configuraciones biológicamente prometedoras, al combinar niveles elevados de viabilidad celular con la presencia de Zn en la matriz del recubrimiento.

Como es bien conocido, la respuesta celular en los ensayos de citotoxicidad por contacto directo está determinada por la combinación de diversos factores, entre los que se incluyen no solo la liberación de Zn^{2+} , sino también propiedades

superficiales como la rugosidad, la química/carga superficial, la humectabilidad y la rigidez.

Los sustratos de Ti6Al4V sometidos a grabado ácido presentan un incremento de la rugosidad a escala micrométrica y una superficie de TiO₂ hidroxilada, características que favorecen la adsorción de proteínas y la adhesión celular inicial. Después de la deposición biomimética, los recubrimientos de CaP exhiben una morfología moderadamente rugosa y porosa, así como un carácter hidrofílico, factores que contribuyen a la adhesión y extensión celular.

Al mismo tiempo, la incorporación de Zn modifica la química superficial y puede influir en la carga local de la superficie y en los procesos de intercambio iónico en la interfaz. Por lo tanto, el comportamiento celular observado se interpreta como resultado de un efecto combinado: por un lado, características topográficas y fisicoquímicas favorables que promueven la adhesión celular y, por otro, la liberación de Zn²⁺, que puede modular el metabolismo celular de manera dependiente de la dosis.

Estos resultados constituyen además una base para la interpretación de los ensayos de actividad antibacteriana presentados a continuación, donde se espera que la presencia y la liberación de Zn²⁺ contribuya a modular el comportamiento biológico de las superficies implantables en la interfaz implante-tejido.

4.5.2 Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana de las muestras de Ti6Al4V recubiertas con fosfatos de calcio y con incorporación de zinc se evaluó mediante el método de recuento en placa, empleando la bacteria Gram positiva *S. mutans* como microorganismo modelo. Esta cepa fue seleccionada debido a su relevancia clínica en la formación de biopelículas orales y su papel fundamental en procesos de colonización bacteriana asociados a aplicaciones odontológicas e implantológicas [119-121].

Tras un periodo de incubación de 24 h en agar nutritivo, se cuantificó el número de colonias bacterianas formadas en cada placa Petri, tanto para las placas

originales como para sus réplicas, con el fin de asegurar la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados. Un ejemplo representativo del crecimiento bacteriano observado se presenta en la Figura 36. Adicionalmente, se incluyen imágenes correspondientes a incubaciones prolongadas (7 días) para las variantes VDZn2 y VDZn3, lo que permite evaluar cualitativamente la persistencia del efecto antibacteriano a tiempos mayores.

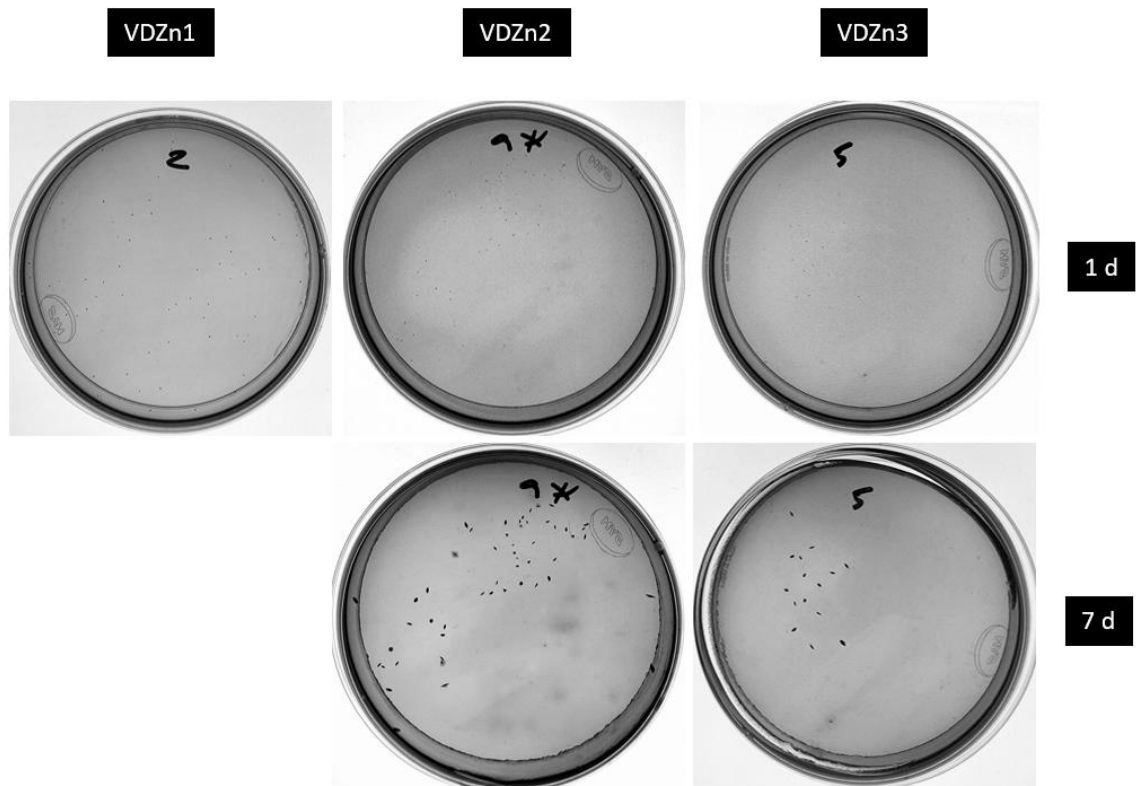


Figura 36. Crecimiento bacteriano de colonias de *S. mutans* en contacto con las variantes de tratamiento VDZn1, VDZn2 y VDZn3 transcurrido un día de siembra en agar. Crecimiento en VDZn2 y VDZn3 transcurrido 7 días de incubación.

El número promedio de colonias por tratamiento (VDZn1, VDZn2 y VDZn3) se utilizó para calcular las UFC empleando la Ecuación (2), cuyos valores se resumen en la Tabla 9. Posteriormente, se determinó el porcentaje de reducción de colonias bacterianas mediante la Ecuación (3), utilizando como superficie control las muestras recubiertas únicamente con CaP sin incorporación de zinc (VDZn0) (ver Figura 37).

Tabla 9. Unidades formadoras de colonias por variante de tratamiento.

VARIANTE DEPOSICIÓN	UFC ± DE
VDZn0	$(76 \pm 2.5) \times 10^7$
VDZn1	$(68 \pm 2.4) \times 10^7$
VDZn2	$(52 \pm 2.1) \times 10^7$
VDZn3	$(40 \pm 1.8) \times 10^7$

Los resultados cuantitativos muestran una disminución progresiva en el número de UFC con el incremento del contenido de zinc en la capa del recubrimiento, pasando de 76×10^7 UFC para el control VDZn0 a 40×10^7 UFC para la variante con mayor concentración de zinc (VDZn3). Este comportamiento indica que la incorporación de Zn confiere a los recubrimientos una funcionalidad antibacteriana dependiente de la concentración.

Los resultados del ANOVA indicaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de UFC entre las distintas variantes de recubrimiento ($p < 0.05$). El recubrimiento de CaP sin zinc (VDZn0) presentó valores de UFC significativamente mayores en comparación con todas las variantes con Zn ($p < 0.01$), confirmando el efecto antibacteriano asociado a la incorporación de zinc.

Además, se observó que al aumentar el contenido de Zn desde VDZn1 hasta VDZn3 tuvo lugar una disminución progresiva y estadísticamente significativa de las UFC ($p < 0.05$), demostrando una respuesta antibacteriana asociada a la dosis. También se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones intermedia y alta de Zn (VDZn2 vs. VDZn3, $p < 0.05$), lo que indica que concentraciones mayores de Zn intensifican la inhibición bacteriana. Los bajos valores de desviación estándar ($< 5\%$) confirman una buena reproducibilidad experimental y confiabilidad del ensayo microbiológico, respaldando la solidez de las tendencias antibacterianas observadas.

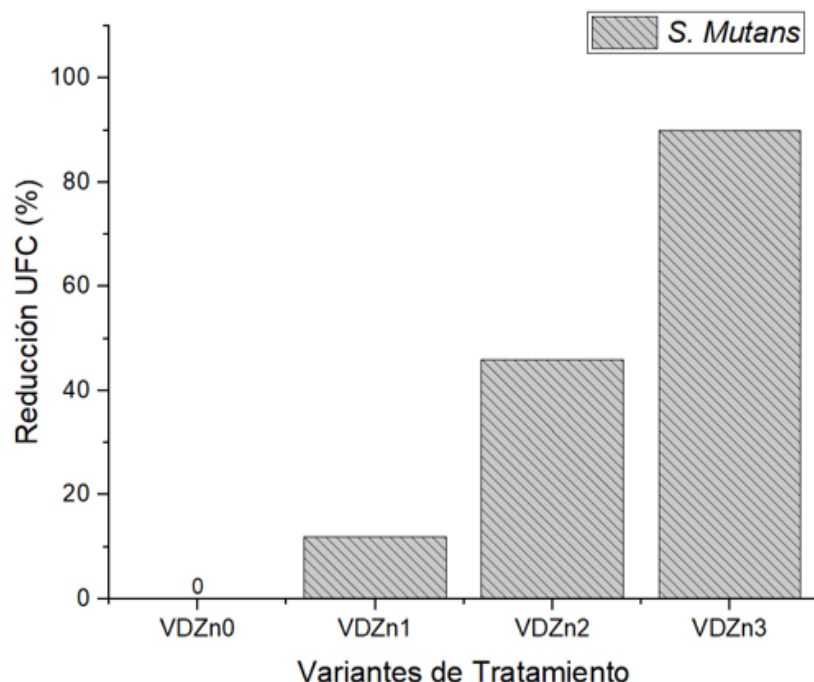


Figura 37. Porcentaje de reducción de UFC transcurridas 24 horas de sembradas en agar nutritivo. La VDZn0 se tomó como superficie control.

En términos generales, los recubrimientos con zinc exhibieron un efecto antibacteriano claro y dependiente de la concentración contra a *S. mutans*. La reducción sistemática de colonias viables respalda el hipótesis de que la inclusión de zinc otorga funcionalidad antibacteriana efectiva a la matriz de CaP. Este comportamiento se debe principalmente a la liberación controlada de iones Zn^{2+} desde la matriz de fosfato de calcio hacia el medio fisiológico. Varios estudios han demostrado que el Zn^{2+} puede tener actividad antibacteriana a través de diferentes mecanismos, como alterar la integridad de la membrana celular bacteriana, inhibir sistemas enzimáticos esenciales al interactuar con grupos sulfhidrilo, inducir estrés oxidativo en el interior de la célula e interferir con procesos de adhesión y formación de *biofilms* [119, 122, 123].

En el caso específico de *S. mutans*, se ha reportado que el zinc puede influir en procesos metabólicos relacionados con la glicólisis, la producción de ácidos y la adhesión a superficies, lo que reduce su capacidad de colonización y formación de *biofilms* [119, 124-126]. Estos efectos son especialmente importantes en

aplicaciones implantológicas ya que la prevención de la colonización bacteriana temprana es un factor determinante para el éxito del implante.

Es fundamental señalar que los resultados obtenidos muestran una tendencia inversa entre la viabilidad celular y la actividad antibacteriana a medida que aumenta el contenido de zinc. Mayores concentraciones de Zn favorecen la inhibición bacteriana y a su vez disminuyen moderadamente la viabilidad celular, manteniéndose en todos los casos por encima del umbral del 70 % establecido por la norma ISO 10993-5. Este comportamiento resalta la importancia del balance entre estas propiedades cuando se desarrollan recubrimientos dopados con iones metálicos con actividad antimicrobiana [91, 127, 128].

El proceso de liberación de Zn^{2+} desde el recubrimiento hacia el medio, es un factor crucial para regular de manera simultánea la eficacia antibacteriana y la respuesta biológica del sistema. La cantidad de zinc incorporado, su estado químico y distribución dentro de la matriz, determinan la disponibilidad efectiva de Zn^{2+} para interactuar con el medio biológico, tanto frente a microorganismos infecciosos como células huésped [95, 130].

De acuerdo con los resultados obtenidos, la variante VDZn3 presenta el mayor potencial antibacteriano, mientras que la variante VDZn1 ofrece el mejor equilibrio entre una alta viabilidad celular y una actividad antibacteriana moderada. Por otro lado, la variante VDZn2 se puede considerar como una opción intermedia ideal, ya que combina una reducción significativa de UFC con niveles aceptables de viabilidad celular.

En conjunto, estos resultados respaldan la estrategia de diseño de recubrimientos multifuncionales basada en la incorporación controlada de Zn en matrices de CaP, y se establece una base para correlacionar la liberación iónica de Zn^{2+} con el comportamiento biológico observado en estos sistemas.

4.6 Liberación de iones Zn^{2+} al medio

4.6.1 Fundamentos fisicoquímicos de la liberación iónica en recubrimientos de CaP

Los recubrimientos de fosfato de calcio que se obtienen mediante deposición biomimética presentan una similar a la apatita biológica en cuanto a composición y estructura. Al ser parcialmente cristalinos y carbonatados, presentan una elevada reactividad superficial y una capacidad intrínseca para intercambiar iones con el medio fisiológico [64, 92]. Como resultado, durante la interacción con fluidos biológicos la capa de CaP se disuelve parcialmente seguida de procesos de reprecipitación que favorecen la formación de apatita tipo ósea, fenómeno asociado a la bioactividad de estos sistemas.

La incorporación de iones Zn^{2+} en la matriz de CaP puede ocurrir de varias maneras: mediante sustitución parcial de Ca^{2+} en posiciones cristalográficas de la apatita, a través de la inclusión en fases amorfas o pobremente cristalinas de fosfato de calcio, o por la adsorción en sitios ricos en grupos fosfato e hidroxilo. La diferencia en radio iónico entre Ca^{2+} ($\approx 1.00 \text{ \AA}$) y Zn^{2+} ($\approx 0.74 \text{ \AA}$) introduce distorsiones en la red cristalina que incrementan la energía libre del sistema y favorecen una mayor solubilidad local del recubrimiento [91, 129].

En consecuencia, fases pobremente cristalinas, con mayor densidad de defectos estructurales o con sustituciones iónicas, tienden a presentar mayores tasas de disolución y liberación iónica [92, 129]. Este comportamiento resulta particularmente relevante para los recubrimientos Zn-CaP, ya que la liberación controlada de Zn^{2+} puede modular tanto la bioactividad del sistema como su funcionalidad antibacteriana.

4.6.2 Cinética de liberación y acoplamiento con bioactividad biomimética

Con el fin de evaluar la cinética de liberación de zinc, se realizó un ensayo de liberación iónica en medio fisiológico, cuantificando la concentración de Zn^{2+} presente en el medio a distintos tiempos de incubación mediante espectrometría.

Las mediciones se realizaron a 1, 3 y 7 días de contacto entre las muestras y el medio.

Las curvas de liberación correspondientes a las variantes de tratamiento VDZn1, VDZn2 y VDZn3 se presentan en la Figura 38. En términos generales, todas las muestras manifiestan un comportamiento caracterizado por una liberación inicial relativamente mayor durante las primeras 24 h, seguida de una disminución progresiva en la cantidad de Zn liberada en intervalos de tiempo posteriores. Este tipo de perfil se encuentra comúnmente en fosfatos de calcio que han sido dopados con iones y representa un reflejo de la distribución heterogénea de las especies dopantes dentro del recubrimiento.

A las 24 h de ensayo, la variante VDZn1 correspondiente al recubrimiento con menor contenido atómico de zinc presentó la mayor concentración de iones zinc liberados al medio (0.059 mg/l), en comparación con los valores cuantificados para las variantes VDZn2 (0.023 mg/l) y VDZn3 (0.033 mg/l).

Posteriormente, a las 72 h de incubación, las concentraciones liberadas disminuyeron para las tres variantes, registrando valores de 0.022 mg/l, 0.020 mg/l y 0.019 mg/l para VDZn1, VDZn2 y VDZn3, respectivamente.

Después de los 7 días de ensayo, las concentraciones tendieron a estabilizarse obteniendo valores de 0.020 mg/l para VDZn1 y aproximadamente 0.017 mg/l para las variantes VDZn2 y VDZn3. La liberación acumulada al término del ensayo alcanzó valores de aproximadamente 0.101 mg/l para VDZn1, 0.060 mg/l para VDZn2 y 0.069 mg/l para VDZn3. (Ver Tabla 10)

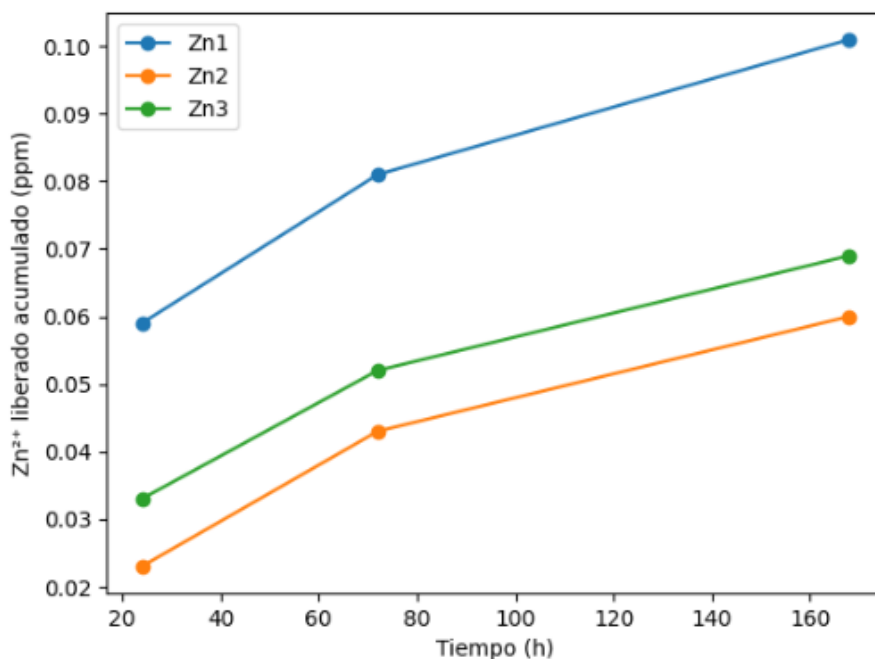


Figura 38. Perfil de liberación de Zn^{2+} en 50ml de PBS.

Tabla 10. Concentración (ppm) acumulada de Zn^{2+} liberado a medio fisiológico.

TIEMPO	VDZn1 ppm $\pm$ DE	VDZn2 ppm $\pm$ DE	VDZ3 ppm $\pm$ DE
24 h	0.059 $\pm$ 0.003	0.023 $\pm$ 0.0015	0.033 $\pm$ 0.0020
72 h	0.081 $\pm$ 0.004	0.043 $\pm$ 0.0025	0.052 $\pm$ 0.0030
168 h	0.101 $\pm$ 0.006	0.060 $\pm$ 0.0035	0.069 $\pm$ 0.0040

Estos resultados obtenidos muestran que la liberación total de Zn^{2+} hacia el medio no se relaciona de manera estrictamente proporcional con la cantidad inicial de zinc que se incorporó en el recubrimiento. Este comportamiento sugiere que existen diferentes estados químicos del Zn dentro de la matriz de CaP, incluyendo especies que se encuentran adsorbidas en la superficie y otras estructuralmente incorporadas, cada una con distintos grados de estabilidad y solubilidad.

El perfil de liberación observado es consistente con un proceso en dos etapas: primeramente, tiene lugar una liberación inicial relativamente rápida que se atribuye a los iones de zinc localizados en la superficie o débilmente unidos a la

capa de recubrimiento. Posteriormente, ocurre una liberación más lenta, que está controlada por procesos de difusión y disolución parcial de la matriz apatítica.

Después de 72 h, las concentraciones de Zn obtenidas para todas las variantes indican que la influencia de las especies fácilmente intercambiables se vuelve mínima, y el proceso de liberación comienza a estar más influenciado por la disolución de la matriz. La estabilización que se observa después de 7 días refuerza aún más esta interpretación, sugiriendo que se ha alcanzado un cuasi-equilibrio entre los procesos de disolución y reprecipitación en la interfaz recubrimiento-solución.

A las 72 h y 168 h, se observó una disminución de las diferencias entre VDZn2 y VDZn, que no resultaron estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en algunos casos, lo que indica la dirección hacia un régimen de liberación controlado por difusión. Además, el análisis ANOVA de dos vías realizado, que consideró tanto la concentración de Zn como el tiempo de incubación como factores independientes, confirmó que ambas variables, así como su interacción, tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre la liberación de Zn^{2+} ($p < 0.05$). Este resultado confirma que la liberación iónica está regida por un mecanismo acoplado que involucra tanto factores composicionales como cinéticos.

Los resultados estadísticos refuerzan la validez de las tendencias observadas y confirman que las diferencias en la liberación de Zn^{2+} no son simplemente el resultado de la variabilidad aleatoria, sino que están intrínsecamente relacionadas con las características fisicoquímicas de los recubrimientos.

4.6.3 Implicaciones biológicas de la liberación de Zn^{2+}

La liberación controlada de Zn^{2+} desde los recubrimientos Zn-CaP tiene un impacto directo en el comportamiento biológico del sistema. Diversos estudios han demostrado que el zinc puede ejercer actividad antibacteriana mediante múltiples mecanismos, entre los que se incluyen la alteración de la integridad de la

membrana celular bacteriana, la inhibición de enzimas esenciales mediante interacción con grupos tiol, y la inducción de estrés oxidativo intracelular.

En el caso de bacterias Gram positivas como *S. mutans*, el Zn^{2+} puede interferir en procesos metabólicos asociados a la glicólisis reduciendo la capacidad de acidogénesis y adhesión a superficies, afectando la capacidad de colonización y formación de *biofilms* sobre superficies biomédicas [123, 130].

Los resultados experimentales obtenidos en este estudio son consistentes con estos mecanismos. La reducción en las unidades formadoras de colonias, especialmente para la condición VDZn3, indica que la concentración local de Zn^{2+} alcanzó niveles suficientes para inhibir el crecimiento bacteriano; sin alcanzar concentraciones tóxicas para las células.

Sin embargo, la disminución en la viabilidad celular a medida que aumenta el contenido de zinc indica que hay una ventana terapéutica bastante estrecha. Mientras que niveles moderados de Zn^{2+} pueden estimular la actividad osteogénica y mejorar la eficacia antibacteriana, concentraciones demasiado altas pueden obstaculizar la proliferación celular. Esto subraya la importancia de optimizar cuidadosamente la incorporación de Zn, asegurando que las tasas de liberación se mantengan dentro de un rango que favorezca la integración de los tejidos y, al mismo tiempo, evite la colonización bacteriana. Por otro lado, el aumento en la disponibilidad de iones Zn^{2+} en el medio también influye en la respuesta celular, ya que se observa una disminución moderada de la viabilidad celular con el incremento del contenido de zinc en el recubrimiento.

La comparación realizada confirma que, para lograr un equilibrio óptimo entre la eficacia antimicrobiana y la viabilidad celular, se requiere un control preciso del comportamiento de degradación y de las tasas de liberación iónica. Por lo tanto, los resultados de este estudio respaldan el concepto de que el diseño de recubrimientos bioactivos debe ser abordado desde una perspectiva dinámica, donde la transformación controlada del material y la liberación de iones sean diseñadas intencionalmente para regular las respuestas biológicas.

4.7 Evolución de la rugosidad superficial y sus implicaciones

La rugosidad superficial desempeña un papel crítico en el desempeño biológico de los implantes basados en titanio, ya que influye directamente en la adsorción de proteínas, la adhesión celular y la posterior integración tisular. En el presente estudio, las mediciones de rugosidad se realizaron mediante un perfilómetro de contacto, con el fin de cuantificar los cambios topográficos inducidos por los tratamientos superficiales secuenciales y la posterior deposición de recubrimientos Zn-CaP.

4.7.1 Rugosidad superficial posterior a los tratamientos previos

La evolución de la rugosidad superficial refleja estrechamente las transformaciones morfológicas y composicionales inducidas por cada etapa de modificación, evidenciando una transición progresiva desde una superficie relativamente lisa y anisotrópica hacia una interfaz más compleja y funcionalmente activa. La Tabla 11 resume la evolución de los parámetros de rugosidad superficial (R_a , R_z y R_q) después de cada etapa de pretratamiento superficial.

El sustrato de Ti6Al4V en condición maquinada presentó los valores más bajos de rugosidad ($R_a \approx 0.163 \mu\text{m}$), lo cual es consistente con su topografía anisotrópica característica, definida por las marcas de maquinado. Este tipo de superficie presenta un área efectiva limitada y una baja densidad de sitios activos, lo que restringe su interacción con el entorno fisiológico y disminuye su capacidad para favorecer el anclaje biológico.

Después del proceso de grabado ácido, se observó un aumento significativo de la rugosidad ($R_a \approx 0.490 \mu\text{m}$), lo cual está relacionado con la formación de una red uniforme de microporos y valles. Este tratamiento elimina de manera efectiva las marcas de maquinado, al mismo tiempo que genera una superficie microestructurada con una mayor amplitud pico-valle. Desde una perspectiva fisicoquímica, esta modificación resulta relevante, ya que aumenta el área

superficial disponible y promueve la nucleación heterogénea al generar sitios energéticamente favorables para las reacciones posteriores.

Tabla 11. Valores de rugosidad superficial obtenidos después de los tratamientos superficiales secuenciales. Los valores se reportan como media $\pm$ desviación estándar ($n = 3$). Ra: rugosidad media aritmética; Rz: altura máxima promedio del perfil; Rq: rugosidad cuadrática media.

TRATAMIENTO	Ra (μm) $\pm$ DE	Rz (μm) $\pm$ DE	Rq (μm) $\pm$ DE
MAQUINADO	0.163 $\pm$ 0.034	1.313 $\pm$ 0.273	0.306 $\pm$ 0.275
GA	0.490 $\pm$ 0.023	3.812 $\pm$ 0.283	0.635 $\pm$ 0.026
NaOH	0.365 $\pm$ 0.047	2.566 $\pm$ 0.509	0.471 $\pm$ 0.073
CaCl ₂	0.477 $\pm$ 0.100	3.564 $\pm$ 0.741	0.615 $\pm$ 0.110
TT	0.551 $\pm$ 0.095	3.966 $\pm$ 0.761	0.718 $\pm$ 0.128

El tratamiento alcalino con NaOH logró una reducción moderada de la rugosidad micrométrica ($Ra \approx 0.365 \mu\text{m}$), a pesar de que generó una nanoestructura altamente porosa. Esta aparente contradicción sugiere que la formación de una capa de gel de titanato sódico provoca un alisamiento parcial a nivel micrométrico, al mismo tiempo que aumenta la complejidad superficial a escala nanométrica. Esto resalta una limitación importante de los parámetros convencionales de rugosidad (Ra , Rz), que pueden no reflejar completamente las características estructurales en diferentes escalas.

Más que simplemente aumentar la rugosidad, el tratamiento alcalino activa la superficie de manera química, enriqueciendo su composición con grupos reactivos que son esenciales para la posterior formación del recubrimiento.

El tratamiento para la incorporación de calcio a través de la solución de CaCl₂ resultó en un aumento notable de la rugosidad ($Ra \approx 0.477 \mu\text{m}$), junto con una mayor variabilidad en los valores obtenidos. Este fenómeno es coherente con la formación localizada de precipitados ricos en calcio, que introducen una heterogeneidad superficial y crean sitios preferenciales para la nucleación de

fosfatos de calcio. Estas características sugieren una transición hacia una superficie que está activada tanto química como topográficamente.

Los valores más altos de rugosidad se obtuvieron después del tratamiento térmico ($R_a = 0.551 \pm 0.095 \mu\text{m}$; $R_z = 3.966 \pm 0.761 \mu\text{m}$). Esto se puede atribuir a la consolidación y estabilización de la capa tipo gel obtenida previamente. La deshidratación térmica y la contracción estructural probablemente inducen la formación de microgrietas, lo que aumenta la complejidad de esta superficie. Estas características no solo favorecen el anclaje mecánico, sino que también mejoran la reactividad superficial al exponer sitios activos adicionales.

Aunque no se evaluó la rugosidad del tratamiento hidrotermal (TH_2O), se espera que su principal contribución sea más química que topográfica. Esta fase promueve el intercambio iónico y la formación de grupos hidroxilo en la superficie (Ti-OH), que son conocidos por aumentar la bioactividad y facilitar la nucleación de apatita, sin alterar significativamente la rugosidad a nivel micrométrico.

La evolución de la rugosidad no sigue un patrón lineal; en cambio, refleja la interacción entre procesos de disolución, reorganización y crecimiento en la superficie. Lo más importante es que estos hallazgos sugieren que la activación de la superficie no depende solo de la magnitud de la rugosidad, sino del efecto combinado de la topografía y la química de la superficie. La superficie final tratada, que presenta una rugosidad moderada-alta, funcionalidad química y porosidad jerárquica, proporciona una base ideal para la deposición biomimética de recubrimientos.

Se realizó un análisis estadístico para evaluar la relevancia de las diferencias observadas en los parámetros de rugosidad superficial (R_a , R_z y R_q) entre los distintos tratamientos superficiales. Se aplicó un análisis de varianza de manera independiente para cada parámetro de rugosidad, considerando la condición de tratamiento como el factor principal ($n = 3$ por grupo). Los resultados mostraron que el tratamiento superficial tuvo un efecto estadísticamente significativo en todos los parámetros de rugosidad ($p < 0.01$ para R_a , R_z y R_q), lo que sugiere

que las modificaciones provocadas en cada etapa del tratamiento no son variaciones aleatorias, sino cambios sistemáticos en la morfología de la superficie.

Las condiciones de grabado ácido y tratamiento térmico (TT) presentaron valores de rugosidad significativamente más altos en comparación con la superficie maquinada ($p < 0.05$) para todos los parámetros. En particular, R_a aumentó de $0.163 \pm 0.034 \mu\text{m}$ en la condición maquinada a $0.490 \pm 0.023 \mu\text{m}$ después del grabado ácido y a $0.551 \pm 0.095 \mu\text{m}$ después del TT, lo que confirma una modificación considerable del perfil superficial. De manera similar, R_z y R_q siguieron la misma tendencia, con incrementos estadísticamente significativos después de los tratamientos químicos y térmicos.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre algunos tratamientos intermedios, como las superficies tratadas con NaOH y CaCl_2 , lo que sugiere que estas etapas contribuyen a la modificación superficial de manera más gradual. Sin embargo, el efecto acumulativo del tratamiento secuencial, particularmente después del tratamiento térmico final, produjo los valores más altos de rugosidad, los cuales fueron estadísticamente distinguibles respecto a la condición inicial.

Estos resultados estadísticos confirman que los tratamientos superficiales aplicados generan modificaciones significativas y reproducibles en la rugosidad superficial, respaldando su papel en el incremento de la reactividad superficial y en la generación de condiciones favorables para la posterior deposición biomimética de CaP.

4.7.2 Rugosidad superficial de los recubrimientos biomiméticos Zn-CaP

La Tabla 12 presenta los parámetros de rugosidad superficial de los recubrimientos Zn-CaP en función de la incorporación de Zn. La rugosidad de estos recubrimientos evidencia una relación clara entre la topografía superficial, la morfología del recubrimiento y la composición química, destacando el papel del Zn como regulador del crecimiento biomimético.

Tabla 12. *Parámetros de rugosidad superficial (Ra, Rz y Rq) de los recubrimientos biomiméticos Zn-CaP depositados sobre sustratos de Ti6Al4V a diferentes concentraciones de Zn. Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar (n = 3). Ra: rugosidad media aritmética; Rz: altura máxima promedio del perfil; Rq: rugosidad cuadrática media.*

VARIANTE DEPOSICIÓN	Ra (μm) $\pm$ DE	Rz (μm) $\pm$ DE	Rq (μm) $\pm$ DE
VDZn0	0.75 $\pm$ 0.07	8.39 $\pm$ 0.64	0.98 $\pm$ 0.09
VDZn1	0.50 $\pm$ 0.18	3.83 $\pm$ 0.51	0.69 $\pm$ 0.11
VDZn2	0.39 $\pm$ 0.04	2.81 $\pm$ 0.24	0.49 $\pm$ 0.04
VDZn3	0.72 $\pm$ 0.08	4.87 $\pm$ 0.30	0.95 $\pm$ 0.04

El recubrimiento sin zinc (VDZn0) presentó los valores más altos de rugosidad ($Ra \approx 0.75 \mu\text{m}$), lo cual se correlaciona con la formación de estructuras apatíticas de mayor tamaño y morfología tipo flor, observadas mediante FE-SEM. Este tipo de morfología suele asociarse con condiciones de alta sobresaturación, en las que el crecimiento cristalino rápido y poco controlado favorece la agregación heterogénea y el incremento de las irregularidades superficiales.

La incorporación de Zn en bajas concentraciones (VDZn1) llevó a una notable disminución de la rugosidad ($Ra \approx 0.50 \mu\text{m}$) y a un refinamiento de la microestructura. Aunque la morfología tipo flor se mantuvo, se observó una reducción en el tamaño de las partículas y una distribución más uniforme. La presencia de Zn, confirmada mediante EDS y XPS, sugiere que los iones Zn^{2+} comienzan a modificar la energía superficial de los núcleos en crecimiento, actuando como reguladores cinéticos que limitan el crecimiento cristalino excesivo sin frenar la formación de CaP.

Este efecto se hizo más evidente a una concentración intermedia de Zn (VDZn2), donde se registraron los valores más bajos de rugosidad ($Ra = 0.39 \pm 0.04 \mu\text{m}$; $Rz = 2.81 \pm 0.24 \mu\text{m}$). La microestructura correspondiente mostró agregados más pequeños y fragmentados, así como una mayor uniformidad en la superficie. El análisis composicional reveló mayores contenidos de Ca y P, junto con una mayor incorporación de Zn, lo que sugiere un equilibrio entre la nucleación y el

crecimiento. Como resultado, se logró un recubrimiento más compacto y homogéneo, reflejando un proceso de cristalización más controlado. Al aumentar la concentración de Zn (VDZn3), la rugosidad volvió a incrementarse ($R_a \approx 0.72 \mu\text{m}$), acercándose a los valores observados en el sistema sin zinc. Este comportamiento es coherente con una disminución en la cobertura del recubrimiento y una mayor heterogeneidad superficial, como se evidenció en las imágenes SEM. Aunque el contenido de Zn es mayor, una concentración excesiva de este ion parece inhibir tanto la nucleación como el crecimiento ordenado de la fase CaP, resultando en estructuras menos compactas y más irregulares.

Los resultados analizados muestran que hay una relación no lineal entre la concentración de Zn y la rugosidad de la superficie, lo que sugiere un cambio en cómo se forma el recubrimiento. En ausencia de Zn, el crecimiento se basa principalmente en la cristalización por sobresaturación, lo que da lugar a estructuras gruesas y desiguales. En concentraciones bajas y medias, el Zn actúa como un modulador del crecimiento, ayudando a crear recubrimientos más finos y uniformes. Sin embargo, cuando las concentraciones son más altas, el Zn tiene un efecto inhibitorio, alterando el proceso de cristalización y aumentando nuevamente la rugosidad.

Este comportamiento es muy relevante desde un punto de vista funcional. La rugosidad de la superficie no solo influye en el anclaje mecánico, sino también en la adsorción de proteínas, la adhesión celular y la adherencia bacteriana. En este contexto, la condición VDZn2 parece ofrecer un equilibrio ideal entre homogeneidad estructural, rugosidad controlada e incorporación de Zn. Esta combinación podría potenciar la bioactividad, al mismo tiempo que preserva la funcionalidad antibacteriana, lo que la hace especialmente adecuada para aplicaciones en superficies implantable.

El análisis estadístico confirmó que la incorporación de Zn influye significativamente en los parámetros de rugosidad superficial (R_a , R_z y R_q) de los recubrimientos Zn-CaP ($p < 0.01$), evidenciando que las variaciones observadas

corresponden a cambios sistemáticos asociados al contenido de Zn. La condición VDZn2 presentó los valores de rugosidad más bajos y una morfología más homogénea, reflejando un crecimiento cristalino más controlado. En contraste, VDZn3 mostró un incremento significativo de la rugosidad respecto a VDZn2 ($p < 0.05$), con valores similares a los del recubrimiento sin Zn, lo que sugiere que concentraciones elevadas de Zn alteran el crecimiento regular de la fase CaP y favorecen una mayor heterogeneidad superficial.

Finalmente, se determinó que existe una relación no lineal entre la concentración de Zn y la rugosidad superficial. VDZn2 se presenta como la condición óptima para reducir de rugosidad y lograr una superficie más uniforme. Estos resultados refuerzan el papel del Zn como regulador clave en el crecimiento biomimético y resaltan la importancia de controlar su concentración para ajustar la topografía superficial y el desempeño funcional del recubrimiento.

4.7.3 Relación estructura–propiedad asociada con la rugosidad superficial

Los resultados sobre la rugosidad superficial mostraron una relación no lineal con la adición de Zn, lo que está relacionado con cambios en la microestructura, la composición química, la liberación de iones y el rendimiento biológico de los recubrimientos. En la condición sin Zn (VDZn0), se observaron los valores más altos de rugosidad, debido a la formación de grandes y heterogéneos agregados de apatita, resultado de un crecimiento cristalino poco controlado. Al añadir pequeñas cantidades de Zn (VDZn1), la rugosidad disminuyó y la microestructura se refinó, lo que favoreció una distribución más uniforme de las partículas y una liberación inicial de Zn^{2+} que pudo inducir actividad antibacteriana sin afectar de manera significativa la adhesión celular.

La condición VDZn2 mostró los valores más bajos de rugosidad y una morfología más homogénea, lo que se asocia con una incorporación más eficiente de Zn en la red de CaP y un perfil de liberación más controlado. Esta combinación logró un buen equilibrio entre la actividad antibacteriana y la citotoxicidad. Por otro lado, las concentraciones más altas de Zn (VDZn3) aumentaron nuevamente la

rugosidad y la heterogeneidad superficial, mejorando la actividad antibacteriana, pero provocando una acumulación localizada de Zn y una disminución en la viabilidad celular.

En resumen, estos resultados indican que el Zn actúa como un regulador del crecimiento biomimético y de la formación microestructural del recubrimiento, controlando al mismo tiempo la rugosidad, la liberación de iones y la respuesta biológica.

4.8 Discusión final

Este capítulo se enfocó en el desarrollo y la caracterización de recubrimientos bioactivos y antibacterianos sobre sustratos de Ti6Al4V ELI. Para ello, se utilizó una estrategia secuencial combinando la activación superficial, la deposición biomimética de fosfatos de calcio y la funcionalización con iones de zinc. Los resultados obtenidos permiten establecer conexiones claras entre la microestructura del recubrimiento, su química superficial, los mecanismos de liberación iónica y la respuesta biológica observada, brindando una visión completa del rendimiento multifuncional de los sistemas desarrollados.

La activación químico-térmica ($\text{NaOH-CaCl}_2\text{-TT-H}_2\text{O}$) creó una superficie con una estructura jerárquica, caracterizada por una red micro- y nanoporosa rica en especies de titanato y calcio que se incorporan en la superficie. Esta arquitectura no solo aumenta el área específica y la energía superficial del material, sino que también introduce sitios químicamente activos que actúan como centros preferenciales para la nucleación de la deposición biomimética de fosfatos de calcio. Este comportamiento se alinea con los modelos *propuestos por* Kokubo y Takadama, donde la presencia de capas de titanato y grupos hidroxilo en la superficie favorece la formación de apatita bioactiva a través de mecanismos de disolución-reprecipitación.

La evaluación de los parámetros de deposición permitió identificar una ventana de procesamiento definida para obtener recubrimientos estructuralmente confiables.

Las variantes de deposición biomimética (VD1-VD4) demostraron claramente cómo la concentración iónica en la solución y el tiempo de inmersión afectan la morfología, homogeneidad y espesor del recubrimiento formado. Al aumentar la concentración de Ca^{2+} y PO_4^{3-} en la solución (SBF $\times$ 10), junto con tiempos de tratamiento más prolongados, se favoreció la creación de capas más continuas, densas y homogéneas. Sin embargo, estas condiciones también incrementaron la tendencia a la formación de grietas, debido a las tensiones generadas durante el secado y la densificación térmica. Entre las condiciones evaluadas, el tratamiento SBF $\times$ 10-4 h (VD3) logró un equilibrio óptimo, produciendo recubrimientos homogéneos, sin grietas y con una alta cobertura superficial. Estos hallazgos subrayan la importancia de controlar la sobresaturación y la cinética de deposición para lograr recubrimientos biomiméticos que sean mecánicamente estables y funcionalmente confiables.

La inclusión de zinc en los recubrimientos introdujo una funcionalización adicional destinada a conferir actividad antibacteriana al sistema sin comprometer del todo su bioactividad. Desde el punto de vista microestructural, la presencia de Zn modificó la cinética de nucleación y crecimiento de la apatita, generando morfologías tipo flor, una mayor tendencia a la aglomeración de partículas y, en concentraciones elevadas, una menor cobertura superficial del sustrato. Este comportamiento puede explicarse por la incorporación parcial de Zn^{2+} en la red apatítica y su adsorción en la superficie del recubrimiento, lo que aumenta el grado de desorden estructural y modifica la energía interfacial durante los procesos de cristalización.

El análisis químico superficial realizado con EDS y XPS confirmó que el zinc se incorpora en todas las variantes de Zn-CaP, mostrando un aumento progresivo en su contenido desde VDZn1 hasta VDZn3. Además, teniendo en cuenta la baja cristalinidad que caracteriza a las apatitas biomiméticas, estos hallazgos sugieren que una parte considerable del zinc está vinculada a estados estructurales menos estables, lo que facilita su posterior liberación iónica en el medio fisiológico. La respuesta biológica mostró un comportamiento claramente definido y dependiente

de la dosis. Por un lado, los ensayos de citotoxicidad revelaron que el aumento en el contenido de zinc en el recubrimiento resultó en una disminución progresiva de la viabilidad celular, tanto en fibroblastos gingivales como en fibroblastos dérmicos. Sin embargo, en todos los casos, los valores de viabilidad se mantuvieron por encima del umbral del 70%, que es el criterio establecido por normas internacionales para considerar que no hay citotoxicidad. Estos resultados confirman que los recubrimientos desarrollados presentan niveles adecuados de biocompatibilidad dentro del rango de concentraciones evaluado.

Por otro lado, los ensayos de actividad antibacteriana frente a *S. mutans* mostraron un aumento progresivo en la inhibición del crecimiento bacteriano a medida que aumentaba el contenido de zinc en el recubrimiento. Este comportamiento respalda el papel funcional del Zn como agente antibacteriano activo, cuya acción se relaciona con mecanismos como la alteración de la integridad de la membrana bacteriana, la inhibición enzimática y perturbación del metabolismo celular bacteriano.

Los resultados de la liberación iónica revelaron que la cantidad de Zn^{2+} liberada no se relaciona de manera directa con el contenido atómico de Zn que se ha incorporado en el recubrimiento. En cambio, el perfil de liberación parece estar fuertemente afectado por cómo se incorpora el ion dentro de la matriz de fosfato de calcio. Un mayor contenido de zinc favorece su integración parcial en la red de CaP, lo que resulta en una interacción estructural más estable y, por lo tanto, en una liberación más controlada y gradual hacia el medio.

La liberación de Zn^{2+} está estrechamente relacionada con los resultados que se observan en los ensayos biológicos. Por un lado, la presencia de este ion en el medio contribuye a aumentar la actividad antibacteriana de los recubrimientos contra *S. mutans*. Por otro lado, su incremento también influye en la respuesta celular, mostrando una disminución moderada en la viabilidad a medida que se eleva el contenido de zinc. Desde la perspectiva de los mecanismos que rigen este proceso, la liberación controlada de Zn^{2+} , junto con la de Ca^{2+} y PO_4^{3-} , genera

un microambiente interfacial dinámico donde coexisten procesos de bioactividad, modulación celular y actividad antibacteriana. Este vínculo entre disolución, liberación iónica y reprecipitación de apatita es clave para el rendimiento multifuncional del sistema. El análisis conjunto de los resultados revela un equilibrio interesante entre la viabilidad celular y la capacidad antibacteriana de los recubrimientos. En este sentido, las variantes con bajo o medio contenido de zinc (VDZn1 y VDZn2) se destacan como opciones especialmente prometedoras, ya que logran un buen balance entre la viabilidad celular y la inhibición de bacterias. Por otro lado, la variante VDZn3 muestra la mayor actividad antibacteriana, aunque esto se traduce en una mayor disminución de la viabilidad celular.

En resumen, estos hallazgos posicionan a los recubrimientos Zn-CaP como plataformas muy prometedoras para aplicaciones en implantológicas, especialmente en situaciones clínicas donde la prevención de infecciones y una rápida osteointegración son claves para el éxito del implante. Además, este estudio establece las bases para futuras investigaciones orientadas a optimizar la cinética de liberación de iones, evaluar la formación y estabilidad de *biofilms* bacterianos a largo plazo, y validar *in vivo* el desempeño multifuncional de estas superficies.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos con relación a la hipótesis planteada, se concluye lo siguiente:

1. Los tratamientos de activación superficial generaron modificaciones morfológicas, composicionales y topográficas en la aleación Ti6Al4V, produciendo superficies micro y nanoporosas con presencia de especies ricas en Ca^{2+} , que actúan como sitios activos para la nucleación y crecimiento de fases tipo apatita.
2. Los recubrimientos de CaP obtenidos mediante deposición biomimética presentan una morfología característica compuesta por agregados de partículas tipo racimos o ramilletes, y estructuras laminares o tipo placa. Se observó una mayor uniformidad y cobertura superficial en las variantes VD3 y VD4, confirmándose mediante análisis composicional su naturaleza fosfocálcica.
3. La incorporación de Zn en los recubrimientos no afectó negativamente la formación de la matriz de CaP, sino que generó modificaciones en la microestructura y en la química superficial evidenciadas por un arreglo heterogéneo con mayor tendencia a la aglomeración a medida que aumenta el contenido de zinc. El análisis composicional confirmó la presencia de Zn en todas las variantes de deposición, siendo la variante VDZn3 la que presentó el mayor contenido de este elemento en la capa.
4. El ensayo de citotoxicidad evidenció una disminución progresiva de la viabilidad celular con el incremento del contenido de Zn ($\text{VDZn1} > \text{VDZn2} > \text{VDZn3}$), observándose el menor porcentaje de viabilidad celular para el caso de la variante VDZn3. Sin embargo, todas las variantes mantuvieron

valores superiores al 70 %, indicando una biocompatibilidad aceptable dentro del rango evaluado.

5. Desde el punto de vista antibacteriano, los resultados de recuento en placa frente a *S. mutans* demostraron un aumento en la capacidad antibacteriana con el incremento del contenido de zinc, evidenciada por la reducción progresiva en el número de UFC ($VDZn1 < VDZn2 < VDZn3$), confirmando el papel del Zn^{2+} como agente antibacteriano activo dentro de la matriz CaP.
6. Los ensayos de liberación iónica demostraron que los recubrimientos Zn-CaP presentan una liberación controlada de Zn^{2+} , caracterizada por una etapa inicial más pronunciada durante las primeras 24 horas, seguida de una fase de estabilización a tiempos mayores. Este comportamiento no sigue una relación estrictamente proporcional con el contenido total de zinc, sino que depende del estado químico, la distribución y el mecanismo de incorporación del Zn en la matriz de CaP.

De manera general, los resultados evidencian que los recubrimientos de Zn-CaP desarrollados en este estudio presentan una liberación controlada de Zn^{2+} , lo que permite inhibir el crecimiento de microorganismos infecciosos sin generar efectos citotóxicos, manteniendo valores de viabilidad celular superiores al 70 %. En este sentido, las variantes con contenidos bajos a intermedios de zinc representan un balance adecuado entre funcionalidad antibacteriana y biocompatibilidad. Finalmente, se concluye que la incorporación controlada de zinc en recubrimientos biomiméticos de fosfato de calcio constituye una estrategia efectiva para el desarrollo de superficies implantables multifuncionales, capaces de inhibir la colonización bacteriana sin comprometer la respuesta celular, validando así la hipótesis planteada y su potencial aplicación en implantología y dispositivos biomédicos avanzados.

CAPÍTULO 6

RECOMENDACIONES

- ✓ Ampliar el estudio de las señales XPS de alta resolución, con el propósito de identificar con mayor precisión los estados de oxidación de los elementos presentes en los recubrimientos y contribuir a la estimación de las fases formadas.
- ✓ Complementar la caracterización química mediante FTIR para la validación del intercambio iónico entre Zn^{2+} y Ca^{2+} .
- ✓ Evaluar las propiedades mecánicas de los recubrimientos de Zn-CaP específicamente la adherencia al sustrato y la dureza.
- ✓ Desarrollar ensayos de respuesta celular utilizando modelos celulares con capacidad de diferenciación osteogénica, debido a que estos recubrimientos están orientados a interactuar con tejido óseo.
- ✓ Evaluar el desempeño biológico de las superficies en modelos animales, con el objetivo de analizar la respuesta del tejido óseo y validar su potencial de integración en condiciones fisiológicas reales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Robertson SF, Bandyopadhyay A, Bose SJS, Technology C. Titania nanotube interface to increase adhesion strength of hydroxyapatite sol-gel coatings on Ti-6Al-4V for orthopedic applications. *Surface and Coatings Technology*. **2019**;372(140-7). <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2019.04.071>.
2. Chozhanathmisra M, Pandian K, Govindaraj D, Karthikeyan P, Mitu L, Rajavel RJJoC. Halloysite Nanotube-Reinforced Ion-Incorporated Hydroxyapatite-Chitosan Composite Coating on Ti-6Al-4 V Alloy for Implant Application. *Journal of Chemistry*. **2019** <https://doi.org/10.1155/2019/7472058>.
3. Prado da Silva MH, Moura FN, Navarro da Rocha D, Gobbo LA, Costa AM, Louro LHL. Zinc-modified hydroxyapatite coatings obtained from parascholzite alkali conversion. *Surface and Coatings Technology*. **2014**;249(109-17). <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2014.03.052>.
4. Chouirfa H, Bouloussa H, Migonney V, Falentin-Daudré C. Review of titanium surface modification techniques and coatings for antibacterial applications. *Acta Biomaterialia*. **2019**;83(37-54). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.10.036>.
5. Dehghanghadikolaei A, Fotovvati BJM. Coating techniques for functional enhancement of metal implants for bone replacement: A review. *Materials*. **2019**;12(11):1795. <https://doi.org/10.3390/ma12111795>.
6. Jonauske V, Stanionyte S, Chen S-W, Zarkov A, Juskenas R, Selskis A, et al. Characterization of Sol-Gel Derived Calcium Hydroxyapatite Coatings Fabricated on Patterned Rough Stainless Steel Surface. *Coatings*. **2019**;9(5):334. <https://doi.org/10.3390/coatings9050334>.
7. Koju N, Sikder P, Ren Y, Zhou H, Bhaduri SB. Biomimetic coating technology for orthopedic implants. *Current Opinion in Chemical Engineering*. **2017**;15(49-55). <https://doi.org/10.1016/j.coche.2016.11.005>.
8. Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. A review of the clinical implications of anti-infective biomaterials and infection-resistant surfaces. *Biomaterials*. **2013**;34(33):8018-29. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.048>.
9. Predoi D, Iconaru SL, Predoi MV, Buton N, Motelica-Heino M. Zinc Doped Hydroxyapatite Thin Films Prepared by Sol-Gel Spin Coating Procedure. *Coatings*. **2019**;9(3):156. <https://doi.org/10.3390/coatings9030156>.
10. do Nascimento C, da Rocha Aguiar C, Pita MS, Pedrazzi V, de Albuquerque RF, Jr., Ribeiro RF. Oral biofilm formation on the titanium and zirconia substrates.

Microscopy research and technique. **2013**;76(2):126-32. <https://doi.org/10.1002/jemt.22143>.

11. Szczes A, Holysz L, Chibowski E. Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications. *Advances in colloid and interface science.* **2017**;249(321-30). <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.04.007>.

12. Khan AS, Chaudhry AA. Handbook of Ionic Substituted Hydroxyapatites: *Woodhead Publishing*; **2019**.

13. Matsunaga K, Murata H, Mizoguchi T, Nakahira A. Mechanism of incorporation of zinc into hydroxyapatite. *Acta biomaterialia.* **2010**;6(6):2289-93. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.11.029>.

14. Kulkarni Aranya A, Pushalkar S, Zhao M, LeGeros RZ, Zhang Y, Saxena D. Antibacterial and bioactive coatings on titanium implant surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* **2017**;105(8):2218-27. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36081>.

15. Guglielmotti MB, Olmedo DG, Cabrini RL. Research on implants and osseointegration. *Periodontology* 2000. **2019**;79(1):178-89. <https://doi.org/10.1111/prd.12254>.

16. Ullah I, Siddiqui MA, Liu H, Kolawole SK, Zhang J, Zhang S, et al. Mechanical, biological, and antibacterial characteristics of plasma-sprayed (Sr, Zn) substituted Hydroxyapatite coating. **2020**;6(3):1355-66. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b01396>.

17. Spriano S, Yamaguchi S, Baino F, Ferraris S. A critical review of multifunctional titanium surfaces: New frontiers for improving osseointegration and host response, avoiding bacteria contamination. *Acta Biomaterialia.* **2018**;79(1-22). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.08.013>.

18. Gálvez C, Diana C. Obtención y caracterización de hidroxiapatita dopada con nanopartículas de ZnO con potenciales aplicaciones biomédicas [Tesis de Maestría]: Universidad Nacional de Colombia; **2017**.

19. Wubneh A, Tsekoura EK, Ayranci C, Uludağ H. Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia.* **2018**;80(1-30). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.031>.

20. Albrektsson T, Wennerberg A. On osseointegration in relation to implant surfaces. **2019**;21(S1):4-7. <https://doi.org/10.1111/cid.12742>.

21. Souza JC, Sordi MB, Kanazawa M, Ravindran S, Henriques B, Silva FS, et al. Nano-scale modification of titanium implant surfaces to enhance

- osseointegration. *Acta biomaterialia*. **2019**;94(112-31).<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.045>.
22. Miranda G, Sousa F, Costa MM, Bartolomeu F, Silva FS, Carvalho O. Surface design using laser technology for Ti6Al4V-hydroxyapatite implants. *Optics & Laser Technology*. **2019**;109(488-95).<https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2018.08.034>.
23. Anjum S, Rajasekar A. Surface modifications of dental implants: An overview. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*. **2021**;10(17):1246-50.<https://doi.org/10.14260/jemds/2021/265>.
24. Chen J-C, Ko C-L, Lin D-J, Wu H-Y, Hung C-C, Chen W-C. In vivo studies of titanium implant surface treatment by sandblasted, acid-etched and further anchored with ceramic of tetracalcium phosphate on osseointegration. *Journal of the Australian Ceramic Society*. **2019**;55(3):799-806.<https://doi.org/10.1007/s41779-018-00292-5>.
25. Graziani G, Bianchi M, Sassoni E, Russo A, Marcacci M. Ion-substituted calcium phosphate coatings deposited by plasma-assisted techniques: A review. *Materials Science and Engineering: C*. **2017**;74(219-29).<https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.018>.
26. Zafar MS, Farooq I, Awais M, Najeeb S, Khurshid Z, Zohaib S. Chapter 11 - Bioactive Surface Coatings for Enhancing Osseointegration of Dental Implants. In: Kaur G, editor. *Biomedical, Therapeutic and Clinical Applications of Bioactive Glasses: Woodhead Publishing*; **2019**. p. 313-29.
27. Habraken W, Habibovic P, Epple M, Böhner M. Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future? *Materials Today*. **2016**;19(2):69-87.<https://doi.org/10.1016/j.mattod.2015.10.008>.
28. Shadanbaz S, Dias GJ. Calcium phosphate coatings on magnesium alloys for biomedical applications: a review. *Acta biomaterialia*. **2012**;8(1):20-30.<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.10.016>.
29. Sadat-Shojai M, Khorasani M-T, Dinpanah-Khoshdargi E, Jamshidi A. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomaterialia*. **2013**;9(8):7591-621.<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.012>.
30. Fihri A, Len C, Varma RS, Solhy A. Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis. *Coordination Chemistry Reviews*. **2017**;347(48-76).<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.06.009>.

31. Mondal S, Dorozhkin SV, Pal U. Recent progress on fabrication and drug delivery applications of nanostructured hydroxyapatite. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. **2018**;10(4):e1504. <https://doi.org/10.1002/wnan.1504>.
32. Graziani G, Boi M, Bianchi M. A Review on Ionic Substitutions in Hydroxyapatite Thin Films: Towards Complete Biomimetism. *Coatings*. **2018**;8(8):269. <https://doi.org/10.3390/coatings8080269>.
33. Türk S, Altınsoy I, Efe GÇ, Ipek M, Özacar M, Bindal CJMS, et al. Biomimetic synthesis of Ag, Zn or Co doped HA and coating of Ag, Zn or Co doped HA/fMWCNT composite on functionalized Ti. **2019**;99(986-98). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.02.025>.
34. Deng Y, Lv W. Biofilms and implantable medical devices: infection and control: *Woodhead Publishing*; **2016**.
35. Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U. Biofilm highlights: *Springer Science & Business Media*; **2011**.
36. Shirliff M, Leid JG, Shirliff M. The role of biofilms in device-related infections: *Springer*; **2009**.
37. Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. **2014**;33(4):499-515. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1993-7>.
38. Lemos J, Palmer S, Zeng L, Wen Z, Kajfasz J, Freires I, et al. The biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiology spectrum*. **2019**;7(1):1128. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0051-2018>.
39. Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the human mouth: a sticky situation. *PLoS pathogens*. **2013**;9(10):e1003616. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003616>.
40. Nadafpour N, Montazeri M, Moradi M, Ahmadzadeh S, Etemadi A. Bacterial colonization on different suture materials used in oral implantology: a randomized clinical trial. *Frontiers in dentistry*. **2021**;18(25). <https://doi.org/10.18502/fid.v18i25.6935>.
41. Stanić V, Dimitrijević S, Antić-Stanković J, Mitrić M, Jokić B, Plečaš IB, et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper and zinc-doped hydroxyapatite nanopowders. *Applied Surface Science*. **2010**;256(20):6083-9. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2010.03.124>.

42. Thian E, Konishi T, Kawanobe Y, Lim P, Choong C, Ho B, et al. Zinc-substituted hydroxyapatite: a biomaterial with enhanced bioactivity and antibacterial properties. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. **2013**;24(2):437-45.<https://doi.org/10.1007/s10856-012-4817-x>.
43. Tank KP, Chudasama KS, Thaker VS, Joshi MJ. Pure and zinc doped nano-hydroxyapatite: synthesis, characterization, antimicrobial and hemolytic studies. *Journal of Crystal Growth*. **2014**;401(474-9).<https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2014.01.062>.
44. Ding Q, Zhang X, Huang Y, Yan Y, Pang X. In vitro cytocompatibility and corrosion resistance of zinc-doped hydroxyapatite coatings on a titanium substrate. *Journal of materials science*. **2015**;50(1):189-202.<https://doi.org/10.1007/s10853-014-8578-4>.
45. Iconaru S, Prodan A, Buton N, Predoi D. Structural characterization and antifungal studies of zinc-doped hydroxyapatite coatings. *Molecules*. **2017**;22(4):604.<https://doi.org/10.3390/molecules22040604>.
46. Predoi D, Iconaru S, Deniaud A, Chevallet M, Michaud-Soret I, Buton N, et al. Textural, structural and biological evaluation of hydroxyapatite doped with zinc at low concentrations. *Materials*. **2017**;10(3):229.<https://doi.org/10.3390/ma10030229>.
47. Anwar A, Akbar S, Sadiqa A, Kazmi M. Novel continuous flow synthesis, characterization and antibacterial studies of nanoscale zinc substituted hydroxyapatite bioceramics. *Inorganica Chimica Acta*. **2016**;453(16-22).<https://doi.org/10.1016/j.ica.2016.07.041>.
48. Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3. *Journal of biomedical materials research*. **1990**;24(6):721-34.<https://doi.org/10.1002/jbm.820240607>.
49. Hu C, Yu L, Wei M. Sectioning studies of biomimetic collagen-hydroxyapatite coatings on Ti-6Al-4V substrates using focused ion beam. *Applied Surface Science*. **2018**;444(590-7).<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.03.045>.
50. Qu H, Wei M. The effect of temperature and initial pH on biomimetic apatite coating. *Journal of Biomedical Materials Research* **2008**;87(1):204-12.<https://doi.org/10.1002/jbm.b.31096>.
51. Kokubo T, Yamaguchi S. Growth of novel ceramic layers on metals via chemical and heat treatments for inducing various biological functions. *Frontiers in*

52. Adawy A, Abdel-Fattah WI. An efficient biomimetic coating methodology for a prosthetic alloy. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications.* **2013**;33(3):1813-8.<https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.12.056>.
53. Barrere Fv, Van Blitterswijk C, De Groot K, Layrolle P. Nucleation of biomimetic Ca-P coatings on Ti6Al4V from a SBF× 5 solution: influence of magnesium. *Biomaterials.* **2002**;23(10):2211-20.[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00354-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00354-4).
54. Iwaya Y, Machigashira M, Kanbara K, Miyamoto M, Noguchi K, Izumi Y, et al. Surface properties and biocompatibility of acid-etched titanium. *Dental Materials Journal.* **2008**;27(3):415-21.<https://doi.org/10.4012/dmj.27.415>.
55. Dorozhkin SV. Calcium orthophosphate deposits: Preparation, properties and biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C.* **2015**;55(272-326).<https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.05.033>.
56. Li P, Ohtsuki C, Kokubo T, Nakanishi K, Soga N, de Groot KJJobmr. The role of hydrated silica, titania, and alumina in inducing apatite on implants. **1994**;28(1):7-15.<https://doi.org/10.1002/jbm.820280103>.
57. Uchida M, Kim HM, Kokubo T, Fujibayashi S, Nakamura T. Structural dependence of apatite formation on titania gels in a simulated body fluid. *Journal of Biomedical Materials Research* **2003**;64(1):164-70.<https://doi.org/10.1002/jbm.a.10414>.
58. Ohtsuki C, Kamitakahara M, Miyazaki T. Coating bone-like apatite onto organic substrates using solutions mimicking body fluid. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine.* **2007**;1(1):33-8.<https://doi.org/10.1002/term.3>.
59. Ryu HS, Song W-H, Hong S-H. Biomimetic apatite induction on Ca-containing titania. *Current Applied Physics.* **2005**;5(5):512-5.<https://doi.org/10.1016/j.cap.2005.01.022>.
60. Forsgren J, Svahn F, Jarmar T, Engqvist H. Formation and adhesion of biomimetic hydroxyapatite deposited on titanium substrates. *Acta Biomaterialia.* **2007**;3(6):980-4.<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.03.006>.
61. Li F, Feng Q, Cui F, Li H, Schubert H. A simple biomimetic method for calcium phosphate coating. *Surface and Coatings Technology.* **2002**;154(1):88-93.[https://doi.org/10.1016/S0257-8972\(01\)01710-8](https://doi.org/10.1016/S0257-8972(01)01710-8).

62. Ramos AP, Ybarra GO, Pazos LM, Parodi MB, Rodríguez L, Hernández ML, et al. Manufacture of nanosized apatite coatings on titanium with different surface treatments using a supersaturated calcification solution. *Química Nova*. **2016**;39(1159-64).<https://doi.org/10.21577/0100-4042.20160161>.
63. Barrere F, van Blitterswijk Cd, De Groot K, Layrolle P. Influence of ionic strength and carbonate on the Ca-P coating formation from SBF× 5 solution. *Biomaterials*. **2002**;23(9):1921-30.[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00318-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00318-0).
64. Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*. **2006**15):2907-15.<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>.
65. Kokubo T, Kim H-M, Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*. **2003**;24(13):2161-75.[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00044-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00044-9).
66. Kurup A, Dhattrak P, Khasnis N. Surface modification techniques of titanium and titanium alloys for biomedical dental applications: A review. *Materials Today: Proceedings*. **2021**;39(84-90).<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.06.163>.
67. Han X, Ma J, Tian A, Wang Y, Li Y, Dong B, et al. Surface modification techniques of titanium and titanium alloys for biomedical orthopaedics applications: A review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **2023**;227(113339).<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113339>.
68. Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T. Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment. *Journal of Biomedical Materials Research*. **1996**;32(3):409-17.[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199611\)32:3%3C409::AID-JBM14%3E3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199611)32:3%3C409::AID-JBM14%3E3.0.CO;2-B).
69. Kim HM, Kokubo T, Fujibayashi S, Nishiguchi S, Nakamura T. Bioactive macroporous titanium surface layer on titanium substrate. *Journal of Biomedical Materials Research*. **2000**;52(3):553-7.[https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20001205\)52:3%3C553::AID-JBM14%3E3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20001205)52:3%3C553::AID-JBM14%3E3.0.CO;2-X).
70. Habibovic P, Barrère F, Van Blitterswijk CA, de Groot K, Layrolle P. Biomimetic hydroxyapatite coating on metal implants. *Journal of the American Ceramic Society*. **2002**;85(3):517-22.<https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.2002.tb00126.x>.
71. Billeter E, Łodziana Z, Borgschulte A. Surface properties of the hydrogen–titanium system. *The Journal of Physical Chemistry C*. **2021**;125(45):25339-49.<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c08635>.

72. Gys J, Mullens S, Meynen V. How substrate surface area and surface curvature determine kinetics and titanate formation during non-hydrothermal alkali treatment of titanium microspheres. *Surfaces and Interfaces*. **2024**;53(105081).<https://doi.org/10.1016/j.surfin.2024.105081>.
73. Rastegari S, Salahinejad E. Surface modification of Ti-6Al-4V alloy for osseointegration by alkaline treatment and chitosan-matrix glass-reinforced nanocomposite coating. *Carbohydrate polymers*. **2019**;205(302-11).<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.082>.
74. Kizuki T, Takadama H, Matsushita T, Nakamura T, Kokubo T. Preparation of bioactive Ti metal surface enriched with calcium ions by chemical treatment. *Acta biomaterialia*. **2010**;6(7):2836-42.<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.01.007>.
75. Kim DH, Min KH, Pack SP. Efficient bioactive surface coatings with calcium minerals: Step-wise biomimetic transformation of vaterite to carbonated apatite. *Biomimetics*. **2024**;9(7):402.<https://doi.org/10.3390/biomimetics9070402>.
76. Durdu S, Deniz ÖF, Kutbay I, Usta M. Characterization and formation of hydroxyapatite on Ti6Al4V coated by plasma electrolytic oxidation. *Journal of Alloys and Compounds*. **2013**;551(422-9).<https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2012.11.024>.
77. Rokosz K, Hryniewicz T, Gaiaschi S, Chapon P, Raaen S, Pietrzak K, et al. Characterisation of calcium-and phosphorus-enriched porous coatings on CP Titanium Grade 2 fabricated by plasma electrolytic oxidation. *Metals*. **2017**;7(9):354.<https://doi.org/10.3390/met7090354>.
78. Parau AC, Büyüksungur S, Li G, Liu Q, Badillo E, Blum L, et al. Zn-doped CaP coating equips Ti implants with corrosion resistance, biomineralization, antibacterial and immunotolerant activities. *Journal of Advanced Research*. **2025**<https://doi.org/10.1016/j.jare.2025.01.045>.
79. Kim H-M, Himeno T, Kokubo T, Nakamura T. Process and kinetics of bonelike apatite formation on sintered hydroxyapatite in a simulated body fluid. *Biomaterials*. **2005**;26(21):4366-73.<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.11.022>.
80. Prakash K, Kumar R, Yu S, Khor K, Cheang P. On the kinetics of apatite growth on substrates under physiological conditions. *Langmuir*. **2006**;22(1):269-76.<https://doi.org/10.1021/la0522348>.
81. Oyane A, Kim HM, Furuya T, Kokubo T, Miyazaki T, Nakamura T. Preparation and assessment of revised simulated body fluids. *Journal of*

82. Lotsari A, Rajasekharan AK, Halvarsson M, Andersson M. Transformation of amorphous calcium phosphate to bone-like apatite. *Nature communications*. **2018**;9(1):4170.<https://doi.org/10.1038/s41467-018-06570-x>.
83. Barrere F, Layrolle P, Van Blitterswijk C, De Groot K. Biomimetic calcium phosphate coatings on Ti6Al4V: a crystal growth study of octacalcium phosphate and inhibition by Mg²⁺ and HCO₃⁻. *Bone*. **1999**;25(2):107S-11S.[https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(99\)00145-3](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(99)00145-3).
84. Bose S, Ke D, Vu AA, Bandyopadhyay A, Goodman SB. Thermal oxide layer enhances crystallinity and mechanical properties for plasma-sprayed hydroxyapatite biomedical coatings. *ACS applied materials & interfaces*. **2020**;12(30):33465-72.<https://doi.org/10.1021/acsami.0c05035>.
85. Fornell J, Feng Y, Pellicer E, Suriñach S, Baró M, Sort J. Mechanical behaviour of brushite and hydroxyapatite coatings electrodeposited on newly developed FeMnSiPd alloys. *Journal of Alloys and Compounds*. **2017**;729(231-9).<https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2017.09.187>.
86. Nazir M, Khan ZA, Stokes K. Analysing the coupled effects of compressive and diffusion induced stresses on the nucleation and propagation of circular coating blisters in the presence of micro-cracks. *Engineering Failure Analysis*. **2016**;70(1-15).<https://doi.org/10.1016/j.engfailanal.2016.07.003>.
87. Xia W, Fu L, Engqvist H. Critical cracking thickness of calcium phosphates biomimetic coating: Verification via a Singh-Tirumkudulu model. *Ceramics International*. **2017**;43(17):15729-34.<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.08.134>.
88. Gibson I, Rehman I, Best S, Bonfield* W. Characterization of the transformation from calcium-deficient apatite to β -tricalcium phosphate. *Journal of materials science: materials in medicine*. **2000**;11(9):533-9.<https://doi.org/10.1023/A:1008961816208>.
89. Yamaguchi M. Role of zinc in bone formation and bone resorption. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine: The Official Publication of the International Society for Trace Element Research in Humans*. **1998**;11(2-3):119-35.[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-670X\(1998\)11:2/3%3C119::AID-JTRA5%3E3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-670X(1998)11:2/3%3C119::AID-JTRA5%3E3.0.CO;2-3).
90. Landi E, Tampieri A, Celotti G, Sprio S. Densification behaviour and mechanisms of synthetic hydroxyapatites. *Journal of the European Ceramic*

Society. **2000**;20(14-15):2377-87.[https://doi.org/10.1016/S0955-2219\(00\)00154-0](https://doi.org/10.1016/S0955-2219(00)00154-0).

91. Bose S, Fielding G, Tarafder S, Bandyopadhyay A. Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics. *Trends in biotechnology*. **2013**;31(10):594-605.<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.06.005>.

92. Dorozhkin SV. Calcium orthophosphates as bioceramics: state of the art. *Journal of functional biomaterials*. **2010**;1(1):22-107.<https://doi.org/10.3390/jfb1010022>.

93. Dorozhkin SV. Calcium orthophosphate (CaPO₄)-based bioceramics: preparation, properties, and applications. *Coatings*. **2022**;12(10):1380.<https://doi.org/10.3390/coatings12101380>.

94. Ofudje EA, Adeogun AI, Idowu MA, Kareem SO. Synthesis and characterization of Zn-Doped hydroxyapatite: scaffold application, antibacterial and bioactivity studies. *Heliyon*. **2019**;5(5):<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01716>.

95. Mardziah C, Ramesh S, Wahid MA, Chandran H, Sidhu A, Krishnasamy S, et al. Effect of zinc ions on the structural characteristics of hydroxyapatite bioceramics. *Ceramics International*. **2020**;46(9):13945-52.<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.02.192>.

96. Ortiz IY, dos Santos AR, Costa AM, Mavropoulos E, Tanaka MN, da Silva MHP, et al. In vitro assessment of zinc apatite coatings on titanium surfaces. *Ceramics International*. **2016**;42(14):15502-10.<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.06.203>.

97. Kanzaki N, Onuma K, Treboux G, Tsutsumi S, Ito A. Inhibitory effect of magnesium and zinc on crystallization kinetics of hydroxyapatite (0001) face. *The Journal of Physical Chemistry B*. **2000**;104(17):4189-94.<https://doi.org/10.1021/jp9939726>.

98. Bigi A, Boanini E, Bracci B, Facchini A, Panzavolta S, Segatti F, et al. Nanocrystalline hydroxyapatite coatings on titanium: a new fast biomimetic method. *Biomaterials*. **2005**;26(19):4085-9.<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.034>.

99. Nikolić N, Lović J, Maksimović V, Vuković N, Ignjatović N, Živković P, et al. Correlation Between Morphology and Crystal Structure of Electrolytically Produced Zinc Dendritic Particles. *Metals*. **2024**;14(12):1468.<https://doi.org/10.3390/met14121468>.

100. Wang S, Wang Z, Yin Y, Li T, Chang N, Fan F, et al. A highly reversible zinc deposition for flow batteries regulated by critical concentration induced nucleation. *Energy & Environmental Science*. **2021**;14(7):4077-84. <https://doi.org/10.1039/D1EE00783A>.
101. Palazzo B, Iafisco M, Laforgia M, Margiotta N, Natile G, Bianchi CL, et al. Biomimetic hydroxyapatite–drug nanocrystals as potential bone substitutes with antitumor drug delivery properties. *Advanced Functional Materials*. **2007**;17(13):2180-8. <https://doi.org/10.1002/adfm.200600361>.
102. Gomes S, Nedelec J-M, Jallot E, Sheptyakov D, Renaudin G. Unexpected mechanism of Zn²⁺ insertion in calcium phosphate bioceramics. *Chemistry of materials*. **2011**;23(12):3072-85. <https://doi.org/10.1021/cm200537v>.
103. Barrea RA, Pérez CA, Ramos AY, Sánchez HJ, Grenón M. Distribution and incorporation of zinc in biological calcium phosphates. *X-Ray Spectrometry: An International Journal*. **2003**;32(5):387-95. <https://doi.org/10.1002/xrs.657>.
104. Lu T, Yuan X, Zhang L, He F, Wang X, Zhang Y, et al. High throughput synthesis and screening of zinc-doped biphasic calcium phosphate for bone regeneration. *Applied Materials Today*. **2021**;25(101225). <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2021.101225>.
105. Burduhos-Nergis D-P, Cimpoesu N, Epure E-L, Istrate B, Burduhos-Nergis D-D, Bejinariu C. Ca–Zn phosphate conversion coatings deposited on Ti6Al4V for medical applications. *Coatings*. **2023**;13(6):1029. <https://doi.org/10.3390/coatings13061029>.
106. Escobal MA, Candidato RT. Zinc ion sorption onto solution-precursor plasma-sprayed hydroxyapatite coatings via raman and X-ray photoelectron spectroscopies. *Spectroscopy Letters*. **2021**;54(6):472-86. <https://doi.org/10.1080/00387010.2021.1947323>.
107. Walczyk D, Malina D, Krol M, Pluta K, Sobczak-Kupiec A. Physicochemical characterization of zinc-substituted calcium phosphates. *Bulletin of Materials Science*. **2016**;39(2):525-35. <https://doi.org/10.1007/s12034-016-1163-5>.
108. Matsunaga K. First-principles study of substitutional magnesium and zinc in hydroxyapatite and octacalcium phosphate. *The journal of chemical physics*. **2008**;128(24):<https://doi.org/10.1063/1.2940337>.
109. Jallot E, Nedelec J-M, Grimault AS, Chassot E, Grandjean-Laquerriere A, Laquerriere P, et al. STEM and EDXS characterisation of physico-chemical reactions at the periphery of sol–gel derived Zn-substituted hydroxyapatites during

interactions with biological fluids. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. **2005**;42(3-4):205-10. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.03.001>.

110. Cruz R, Calasans-Maia J, Sartoretto S, Moraschini V, Rossi AM, Louro RS, et al. Does the incorporation of zinc into calcium phosphate improve bone repair? A systematic review. *Ceramics International*. **2018**;44(2):1240-9. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.10.157>.

111. Negrila C, Predoi M, Iconaru S, Predoi D. Development of Zinc-Doped Hydroxyapatite by Sol-Gel Method for Medical Applications. *Molecules*. **2018**;23(11):2986. <https://doi.org/10.3390/molecules23112986>.

112. Rocha RC, Galdino AGdS, Silva SNd, Machado MLP. Surface, microstructural, and adhesion strength investigations of a bioactive hydroxyapatite-titanium oxide ceramic coating applied to Ti-6Al-4V alloys by plasma thermal spraying. *Materials Research*. **2018**;21(4):e20171144. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2017-1144>.

113. Ke D, Vu AA, Bandyopadhyay A, Bose S. Compositionally graded doped hydroxyapatite coating on titanium using laser and plasma spray deposition for bone implants. *Acta biomaterialia*. **2019**;84(414-23). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.041>.

114. Cao L, Ullah I, Li N, Niu S, Sun R, Xia D, et al. Plasma spray of biofunctional (Mg, Sr)-substituted hydroxyapatite coatings for titanium alloy implants. *Journal of Materials Science & Technology*. **2019**;35(5):719-26. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2018.10.020>.

115. Plumb JA. Cell sensitivity assays: the MTT assay. Cancer cell culture: methods and protocols. 88: *Springer*; **2004**. p. 165-9.

116. Van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. Cancer cell culture: methods and protocols. 731: *Springer*; **2011**. p. 237-45.

117. De Jong W, Carraway J, Geertsma R. In vivo and in vitro testing for the biological safety evaluation of biomaterials and medical devices. Biocompatibility and performance of medical devices: *Elsevier*; **2020**. p. 123-66.

118. Li W, Zhou J, Xu Y. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomedical reports*. **2015**;3(5):617-20. <https://doi.org/10.3892/br.2015.481>.

119. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community—implications for health and disease. *BMC Oral health*. **2006**;6(Suppl 1):S14. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-6-S1-S14>.

120. Koo H, Falsetta M, Klein M. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *Journal of dental research*. **2013**;92(12):1065-73.<https://doi.org/10.1177/0022034513504218>.
121. Daubert DM, Weinstein BF. Biofilm as a risk factor in implant treatment. *Periodontology 2000*. **2019**;81(1):29-40. <https://doi.org/10.1111/prd.12280>.
122. Raghupathi KR, Koodali RT, Manna AC. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. *Langmuir*. **2011**;27(7):4020-8.<https://doi.org/10.1021/la104825u>.
123. Sirelkhatim A, Mahmud S, Seeni A, Kaus NHM, Ann LC, Bakhori SKM, et al. Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-micro letters*. **2015**;7(3):219-42.<https://doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x>.
124. Hamad AM, Mahmood Atiyea Q. In vitro study of the effect of zinc oxide nanoparticles on Streptococcus mutans isolated from human dental caries. *Journal of Physics: Conference Series*. **2021**;1879(2):022041.<https://doi.org/10.1088/1742-6596/1879/2/022041>.
125. Almoudi MM, Hussein AS, Hassan MIA, Zain NM. A systematic review on antibacterial activity of zinc against Streptococcus mutans. *The Saudi dental journal*. **2018**;30(4):283-91.<https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2018.06.003>.
126. Malheiros SS, Borges MHR, Rangel EC, Fortulan CA, da Cruz NC, Barao VA, et al. Zinc-doped antibacterial coating as a single approach to unlock multifunctional and highly resistant titanium implant surfaces. *ACS Applied Materials & Interfaces*. **2025**;17(12):18022-45.<https://doi.org/10.1021/acsami.4c21875>.
127. Zhao L, Chu PK, Zhang Y, Wu Z. Antibacterial coatings on titanium implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. **2009**;91(1):470-80. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31463>.
128. Akshaya S, Rowlo PK, Duple A, Nathanael AJ. Antibacterial coatings for titanium implants: recent trends and future perspectives. *Antibiotics*. **2022**;11(12):1719.<https://doi.org/10.3390/antibiotics11121719>.
129. Elliott JC. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates: *Elsevier*; **2013**.
130. Emami-Karvani Z, Chehraz P. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle on gram-positive and gram-negative bacteria. *Afr J Microbiol Res*. **2011**;5(12):1368-73.<https://doi.org/10.5897/AJMR10.159>.