

Universidad Autónoma de Baja California

Instituto de Ingeniería Campus Mexicali



“Reducción de la adhesión microbiana por nanoporos de TiO_2 sintetizados por oxidación química controlada”

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias

Presenta:

Jonathan Alexis Beltrán Pérez

Director:

Dr. Ernesto Alonso Beltrán Partida

Codirector:

Dr. Benjamín Valdez Salas



INSTITUTO DE INGENIERÍA
Universidad Autónoma de Baja California
EXCELENCIA E INNOVACIÓN EN INGENIERÍA

Mexicali, B.C., 06 de junio del 2020

I. DEDICATORIA

El presente trabajo se lo dedico con mucho amor y gratitud a mis padres María Guadalupe y Ramón Humberto por brindarme una formación de superación constante, por siempre apoyarme y estar al pendiente de mí. También a mi novia Jessica por siempre darme su afecto y apoyo, el cual me dio ánimos para alcanzar esta meta.

II. AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer al Dr. Ernesto Alonso Beltrán Partida y al Dr. Benjamín Valdez Salas, primeramente, por brindarme la oportunidad de realizar un postgrado, así como por compartir sus conocimientos conmigo y por la confianza depositada en mi para realizar este proyecto, que sin su invaluable guía y gran paciencia no hubiera sido posible concluir.

También agradezco al Instituto de Ingeniería de la UABC campus Mexicali, así como a todo su personal administrativo y docente por su gran disponibilidad para resolver cualquiera de mis dudas.

Agradezco también a mis compañeros Jorge Salvador, Armando Ramírez y el Dr. Ricardo Salinas por su apoyo y compañía en mi estancia en el Instituto de Ingeniería, me dio mucho gusto coincidir con ustedes y poder llamarlos amigos, así como colegas.

Se agradece al apoyo de la convocatoria de Investigación Científica Básica CB2017-2018 No. A1-S-38368 del “Fondo Sectorial de Investigación para la Educación” SEP-CONACYT, porque parte del financiamiento de este proyecto provino de este importante proyecto de investigación científico.

Por último, pero no menos importante agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme una beca (CVU 893560) y financiar mis estudios de maestría ¡Muchas Gracias!

III. ABSTRACT OF THE DISSERTATION

Dental implants (DI) are mainly fabricated using Titanium (Ti) and Ti-based alloys (such as Ti6Al4V) due to its corrosion resistance, mechanical properties closely related to the bone, and mainly by its high biocompatibility. However, the oral cavity is a very humidity zone that presents one of the most plentiful microbiotas among the human body, which difficult the insertion of medical devices or DI. Thus, taking into care those critical considerations it is imperative to develop DI with antimicrobial properties, which could promote DI success. Therefore, paying attention to the above-stated problems, in this work, we synthesized titanium dioxide (TiO₂) nanoporous (NPs) by a chemical nanopatterning strategy using a novel formulated solution constituted of phosphoric acid (H₃PO₄) and hydrogen peroxide (H₂O₂) in same proportions 1:1. The chemical nanopatterning was applied for 15 min, 30 min, and 60 min at room temperature, which resulted in NPs of approximately 44 nm, 3 nm and 52 nm, respectively. The chemical analysis showed trace levels of oxygen (O) and phosphate (P), which could be due to the chemical formulation. The wettability was similar between each surface treatment. To evaluate the antimicrobial capability of the modified materials, we used *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, a Gram +), and *Candida albicans* (*C. albicans*, a yeast). Interestingly, the surfaces of the materials showed similar outcomes of *S. aureus* growth after 2h of culture. However, the experimental materials were capable of diminish the colonization growing-capability after 6h, illustrating a similar viability behavior to those of 2h of culture. Furthermore, *C. albicans* exhibited similar outcomes to

those of *S. aureus*, almost disrupting the colonization rate between 2h and 6h of culture under static conditions. Far more attractive, the synthesized materials can sustain the osteoblast growth after 5h of culture, suggesting that the required surface biocompatibility of Ti6Al4V was not altered after the physicochemical modifications. The present work opens a novel road for the development of economic and facile modification techniques for improving Ti-based implant materials, with high biocompatibility, microbial resistance, and scalable for industrial applications.

IV. RESUMEN

Los implantes dentales (DI, por sus siglas en ingles) son fabricados principalmente con titanio (Ti) y aleaciones a base de Ti (como Ti6Al4V) por su resistencia a la corrosión, propiedades mecánicas estrechamente relacionadas con el hueso y principalmente por su gran biocompatibilidad. Sin embargo, la cavidad oral es una zona demasiado húmeda que presenta una de las microbiotas más abundantes del cuerpo humano, lo que dificulta la inserción de dispositivos médicos o DI. Por lo tanto, teniendo en cuenta esas consideraciones críticas, es imperativo desarrollar DI con propiedades antimicrobianas, lo que podría promover el éxito del DI. Observando con atención la problemática mencionada anteriormente, en este proyecto, se sintetizó nanoporos de TiO₂ mediante una estrategia química de nanoarreglos utilizando una nueva formulación compuesta por ácido fosfórico (H₃PO₄) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en proporciones iguales 1:1. El tratamiento químico se aplicó durante 15 min, 30 min y 60 min a temperatura ambiente, lo que dio como resultado NPs de aproximadamente 44 nm, 3 nm y 52 nm, respectivamente. El análisis químico sugirió la presencia de niveles traza de P y alto nivel de O. La humectabilidad fue similar entre cada tratamiento de superficie. Para evaluar la capacidad antimicrobiana de los materiales modificados, se utilizaron *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, un Gram +) y *Candida albicans* (*C. albicans*, una levadura). Curiosamente, las superficies de los materiales mostraron resultados similares del crecimiento de *S. aureus* después de 2h de cultivo. Sin embargo, los materiales experimentales fueron

capaces de disminuir la capacidad de colonización después de 6h, ilustrando un comportamiento de viabilidad similar a los de 2 h de cultivo. Además, *C. albicans* exhibió resultados similares a los de *S. aureus*, casi interrumpiendo la tasa de colonización entre 2h y 6h de cultivo en condiciones estáticas. Por si fuese poco, los materiales sintetizados pueden sostener el crecimiento de los osteoblastos después de 5 h de cultivo, lo que sugiere que la biocompatibilidad de la superficie requerida de Ti6Al4V no se alteró después de las modificaciones fisicoquímicas. El presente trabajo abre un camino novedoso para el desarrollo de técnicas de modificación económicas y fáciles para mejorar los materiales de implantes basados en Ti, con alta biocompatibilidad, resistencia microbiana y escalable para aplicaciones industriales.

V. TABLA DE CONTENIDOS

I. DEDICATORIA	2
II. AGRADECIMIENTOS	3
III. ABSTRACT OF THE DISSERTATION	4
IV. RESUMEN	6
V. TABLA DE CONTENIDOS	8
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	11
1.1. Antecedentes	11
1.2. Planteamiento del problema	13
1.3. Justificación	17
1.4. Hipótesis	20
1.5. Objetivo general	21
CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO	22
2.1. Estructura y propiedades del titanio	22
2.2. Oxidación química controlada	23
Figura 1. Comparación entre un implante maquinado (izquierda) y uno tratado con grabado ácido (derecho). [16]	26
2.3. Análisis de ángulo de contacto y su relevancia con la biocompatibilidad	27
2.4. Caracterización de morfología y química de superficie	30
Figura 2. Representación de los componentes y funcionamiento de un SEM. [55]	31
2.5. Inhibición y reducción de adhesión microbiana sobre TiO ₂ nanoestructurado	32
2.6. Cultivo celular en superficies de TiO ₂ nanoestructurado	37
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA Y EQUIPO	40
3.1. Preparación de muestras.	40
Figura 3. Imágenes captadas durante el baño ultrasónico para la limpieza y desengrase de las muestras.	40
3.2. Síntesis de nanoporos de TiO ₂ por oxidación química controlada	41
Figura 4. Imágenes del proceso de oxidación química controlada a) vista general del material usado dentro de la campana de extracción, b) vista superior de las muestras a pocos minutos de iniciada la reacción, c) vista lateral de las muestras a pocos minutos de inicio de la reacción, d) vista superior de las muestras con 1 hora de reacción, e) vista lateral de las muestras con 1 hora de reacción.	42
3.3. Análisis de humectabilidad mediante ángulo de contacto	43
Figura 5. Imágenes del uso de tensiómetro para las mediciones de ángulo de contacto.	43

3.4. Caracterización fisicoquímica y morfología	44
3.5 Evaluación de la adhesión microbiana	44
Figura 6. Imágenes tomadas durante el proceso, a) preparación del medio de agar nutritivo, b) realizando las diluciones seriadas, c) inoculando el agar y estriando, d) microplaca con pocillos con las muestras sumergidas en solución PBS, e inciso e) cultivo y conteo de la dilución 2 y 3 de UFC de <i>C. albicans</i> con incubación de 6 horas.	47
Figura 7. Muestras sumergidas en solución salina dentro de los pocillos de la microplaca; con la micropipeta se realiza una remoción mecánica y para tomar el volumen una vez hecha la remoción mecánica con la puntilla de plástico.	48
Figura 8. Se utilizó un volumen fijo de 0.99 mL y un volumen de paso de 10 µL realizado 3 diluciones seriadas de la alícuota del pocillo de cada muestra.	48
Figura 9. Se tomaron 10 µL de cada dilución y se inocularon las cajas de Petri con agar realizando un estriado en 4 direcciones en zigzag con un asa estéril.	49
3.5.1 Tratamiento para analizar muestras biológicas por FE-SEM	50
Debido a que el SEM trabaja con bajo vacío y un requisito para poder analizar muestras es que estas no contengan humedad, las muestras con cultivos de <i>C. albicans</i> y <i>S. aureus</i> se sometieron a un tratamiento de deshidratación y fijación para hacer posible su visualización con el SEM. Primeramente, las bacterias no adheridas se deben retirar suavemente en cada pocillo donde se incubaron con enjuagues con PBS (buffer fosfato salino). Después los microorganismos se deben fijar de 18 a 24 horas con glutaraldehído. Posteriormente las muestras fijas se deben secar con una serie de tratamientos con etanol a distintas concentraciones (50 %, 70%, 95%) durante 2 minutos cada uno, seguido de un secado con hexametildisilazano (HMDS) durante 15 minutos. Por último, las muestras se dejan secar al aire entre 12 a 24 horas. [7, 8, 57]	50
3.6. Pruebas de adherencia osteoblástica	51
Figura 10. Imagen de las muestras para cultivos osteoblásticos.	53
3.7. Análisis Estadístico	53
CAPÍTULO 4: RESULTADOS	54
4.1. Caracterización de superficies tratadas	54
Figura 11. Micrografías SEM y EDS de las superficies tratadas por oxidación química controlada a diferentes tiempos a) 30 min, b) 60 min y c)120 min.	55
4.2. Análisis de humectabilidad	56
Figura 12. Análisis de ángulo de contacto en las superficies tratadas, a) muestra control sin tratamiento, b) muestra con tratamiento de 30 minutos, c) muestra con tratamiento de 60 minutos, d) muestra con tratamiento de 120 minutos.	57
Figura 13. Análisis de los ángulos de contacto medidos en las superficies tratadas contra el control. Entre las superficies del tratamiento de 60 min y el control no hubo diferencia significativa (ns), hay una gran significancia estadística (*) entre el control y el tratamiento de 120 min siendo el tratamiento de 120 min el de mayor	

valor (#). Para la obtención de estos análisis estadísticos se utilizó one-way ANOVA con un nivel de confianza $P < 0.05$.	58
4.3. Evaluación de adhesión bacteriana	58
Figura 14. Crecimiento bacteriano vs tiempos de incubación en diferentes tratamientos de superficies. No hubo un cambio significativo (no significativo = ns) entre tratamientos en el mismo tiempo de incubación. Entre las superficies del mismo tratamiento a distintos tiempo de incubación si hubo cambios significativos en todos tratamientos siendo el más significativo la de tratamiento de 60 min (*) así mismo fue el que tuvo menor crecimiento bacteriano (#). Para la obtención de estos análisis estadísticos se utilizó two-way ANOVA con un nivel de confianza $P < 0.05$.	59
Figura 15. Micrografías en SEM de <i>S. aureus</i> en superficies de control sin tratamiento a) incubación de 2 horas, b) incubación de 6 horas.	60
y superficies con tratamiento c) incubación de 2 horas, d) incubación de 6 horas.	60
4.4. Evaluación de adhesión de <i>C. albicans</i>	60
Figura 16. Crecimiento micótico vs tiempos de incubación en diferentes tratamientos de superficies. No hubo un cambio significativo (no significativo = ns) entre tratamientos comparándolos en un mismo tiempo de incubación. Entre las superficies del mismo tratamiento a distintos tiempo de incubación tampoco hubo cambios significativos, pero el tratamiento que mostró un valor más bajo de UFC/mL fue el tratamiento de 60 min (#) con incubación de 2 horas, aunque tuvo una mayor desviación estándar. Para la obtención de estos análisis estadísticos se utilizó two-way ANOVA con un nivel de confianza $P < 0.05$.	61
Figura 17. Micrografías en SEM de <i>C. albicans</i> en superficies de control sin tratamiento a) incubación de 2 horas, b) incubación de 6 horas.	62
y superficies con tratamiento c) incubación de 2 horas, d) incubación de 6 horas.	62
4.5. Ensayo de cultivos osteoblásticos	62
Figura 18. Medición de densidad óptica de ensayo MTT para determinar el crecimiento de osteoblastos en las superficies tratadas vs el control. No hubo un cambio significativo (ns) entre superficies de distintos tratamientos. Para la obtención de estos análisis estadísticos se utilizó one-way ANOVA con un nivel de confianza $P < 0.05$.	63
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN	64
Figura 19. Representación de la interacción entre las soluciones utilizadas y el material en los tratamientos de oxidación química controlada.	65
CAPÍTULO 6: CONCLUSION	69
6.1 Recomendaciones	70
REFERENCIAS	71

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

En los últimos años los avances en el estudio de las propiedades del TiO_2 han resultado en la síntesis y desarrollo de diferentes formas estructurales como nanocables, nanotiras, nanotubos y nanoporos. Actualmente se investiga y utiliza el TiO_2 y las estructuras que se forman de este con distintos tratamientos para la prevención y tratamiento del cáncer, aplicaciones antibacteriales y de autolimpieza. [1, 2]

Debido a la capa pasiva de TiO_2 que se forma de manera espontánea en las prótesis de Ti es por lo que el Ti es biocompatible; esta capa pasiva es una reacción natural al fenómeno de corrosión que sufre el Ti al contacto con una agente oxidante en este caso el oxígeno dentro de un sistema biológico. El TiO_2 actúa como aislante que previene que la superficie se siga corroyendo y actúa como una interfaz cerámica entre el implante y el líquido intersticial. [3, 4]

La unión entre el hueso y el implante de TiO_2 permite mejorar el tiempo de vida del implante. Por lo que se ha investigado la interacción de nanoestructuras de TiO_2 con osteoblastos (células formadoras de hueso). Las razones para usar las nanoestructuras de TiO_2 son la facilidad con la que se adhieren los osteoblastos formando hueso sobre la prótesis, mostrando gran biocompatibilidad, y excelentes propiedades mecánicas. [2, 4, 5, 6]. Diversos métodos de síntesis se pueden usar para generar nanoestructuras de TiO_2 , entre los más usados están el anodizado, el grabado con ácido, la oxidación controlada, aunque estos últimos métodos de síntesis requieren del uso de químicos muy agresivos como agentes oxidantes. Se suelen realizar postratamientos como el recocido para cambiar la microestructura o la deposición por vapor de plasma (PVD) para dopar la superficie con otro elemento como por ejemplo la plata (Ag). Los postratamientos mencionados anteriormente se realizan con la finalidad de potenciar o dotar de alguna característica a las nanoestructuras de TiO_2 como lo pueden ser su capacidad de osteointegración o brindarle propiedades antimicrobianas. [2, 5, 7, 9, 10, 11]

Reducir la infección bacteriana es un desafío importante ya que la colonización microbiana puede poner en peligro el éxito de los implantes que se utilizan en la cavidad bucal. Diversos estudios se han realizado para producir implantes con modificaciones que resulten en una actividad antibacteriana, cuyo objetivo sea disminuir tales complicaciones sin afectar la osteointegración. [12]

1.2. Planteamiento del problema

Este proyecto se enfocó en los NPs de TiO₂ sintetizados por oxidación controlada, por ser un método eficaz para producir estos tipos de nanoestructuras [6, 14] que agregan propiedades de bioactividad y proliferación celular al Ti [14]. Con el objetivo de mejorar la eficiencia para potenciar la osteogénesis con estas nanoestructuras de TiO₂ fabricadas con dicho procedimiento, ya que se ha demostrado que el TiO₂, con diferentes morfologías nanométricas exhiben efectos de mejora en las tasas de crecimiento y la capacidad de formación ósea. [14, 17, 18] Muchos investigadores utilizan la técnica de nanoestructuración de superficie de Ti común con anodización electroquímica para crear estructuras nanotubulares en la superficie para estimular el crecimiento celular rápido y la mineralización de osteoblastos. [17, 18]

Para sintetizar tan relevante material para el área clínico-dental, como lo son los NPs de TiO_2 se utilizó H_3PO_4 y H_2O_2 con el método de oxidación controlada. Se optó por la manejo de las sustancias mencionadas, debido a que en contraste a otras sustancias utilizadas con este mismo método, el H_3PO_4 y H_2O_2 no reaccionan tan violentamente. Este hallazgo permitió optimizar el proceso de síntesis al volverlo más sencillo y posiblemente más fácil de escalarlo, ya que no requiere equipamiento especial al que se encuentra en cualquier laboratorio. Cabe mencionar que esta formulación no ha sido probada antes y se desconocen sus propiedades osteogénicas o antimicrobianas. Por lo anterior, se determinó usar este método químico ya que con otras formulaciones con otros ácidos las nanoestructuras obtenidas han mostrado tener buenos resultados osteogénicos, por lo que nos podemos centrar en estudiar las posibles propiedades antimicrobianas que puede brindar este método utilizando H_3PO_4 . [1, 2,14]

Los grabados ácidos reportados en la literatura suelen utilizar ácido sulfúrico (H_2SO_4) como reactante grabador, el cual es bien conocido por ser altamente corrosivo, también se sabe que es un compuesto muy reactivo e inestable, lo que hace muy peligroso para su manejo. Considerando estos puntos, se optó por utilizar el proceso de oxidación controlada H_3PO_4 en lugar de H_2SO_4 ya que posee propiedades menos corrosivas y agresivas y se descubrió que también permite la fabricación de nanoestructuras de TiO_2 , y es menos peligroso que el H_2SO_4 . [19]

Por ser el titanio y sus aleaciones materiales con alta demanda por su relevancia clínica-dental, se busca analizar si los NPs de TiO_2 que se sintetizaron por los métodos de oxidación controlado tienen alguna capacidad de disminuir la adhesión microbiana. Es importante describir parte de los mecanismos de adherencia microbianos en algunos de los microorganismos más abundantes en la microbiota bucal como lo son *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. [20, 23, 24, 25]

Es de alto interés clínico el caracterizar el comportamiento microbiano de los NPs sintetizados, ya que podrían auxiliar en los tratamientos mecánicos de periimplantitis actuales. [26, 27] Para este proyecto se trabajó primordialmente con *S. aureus* y *C. albicans* siendo estos microorganismos de entre los más encontrados en la cavidad bucal. Además, las especies del género *Staphylococcus* se encuentran en una alta proporción en tejidos blandos, saliva y en la lengua. También, se optó por *C. albicans* por las interacciones entre hongos y bacterias que pueden influir en la salud bucal como lo ejemplifica la relación sinérgica entre *C. albicans* y estreptococos orales. [20, 28]. Por lo expuesto anteriormente, se optó por susodichos microorganismos (*S. aureus* y *C. albicans*) para el presente proyecto y se realizaron pruebas de adhesión sobre las superficies tratadas con oxidación controlada para caracterizar su potencial antimicrobiano.

Considerando lo anteriormente mencionado, y los amplios requisitos clínicos para el manejo de implantes dentales, en el presente estudio se sintetizaron NPs de diferentes diámetros por oxidación controlada con una nueva formulación con H_3PO_4 . Para controlar el tamaño de poro que se obtuvo se variaron los tiempos de reacción, y con el objetivo de caracterizar el comportamiento microbiológico, se utilizaron como modelo a *S. aureus* y *C. albicans*.

1.3. Justificación

En esta investigación se plantea la caracterización de la actividad antimicrobiana en la inhibición de la adherencia en superficies tratadas por oxidación química controlada. Este proceso de síntesis demostró poseer una potencial aplicación para la fabricación de implantes dentales, los cuales se requiere para un amplio sector de la sociedad, como nos lo indica la Organización Mundial de la Salud (OMS) con los siguientes datos:

- El 60%-90% de los escolares y casi el 100% de los adultos tienen caries dental en todo el mundo.
- Las enfermedades periodontales graves, que pueden desembocar en la pérdida de dientes, afectan a un 15%-20% de los adultos de edad media (35-44 años).
- Alrededor del 30% de la población mundial con edades comprendidas entre los 65 y los 74 años no tiene dientes naturales.
- Las dolencias bucodentales, tanto en niños como en adultos, tienden a ser más frecuentes entre los grupos pobres y desfavorecidos. [29]

El Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales (SIVEPAB) de México despliega los siguientes datos recolectados en los últimos diez años:

- De los adolescentes que asisten a los servicios de salud 8 de cada 10 tienen un periodonto sano.
- En los últimos cuatro años el 40% de los adultos usuarios (35 a 44 años) tienen un periodonto sano. Entre los adultos mayores (65 a 74 años) se reduce considerablemente la proporción de adultos sanos 30% aproximadamente.
- Alrededor de 7 de cada 10 adultos mayores mantienen una oclusión funcional (20 dientes naturales presentes). [30]

De acuerdo con la investigación de Cuesta, A. I. *et al.* (2010) las personas con implantes dentales de cualquier tipo tienen mayor población de microorganismos (*S. aureus* y *C. spp*). También, es de considerarse que aproximadamente del 5 al 11% de los implantes dentales fallan en gran parte por infecciones microbianas en etapas tempranas por alguna infección nosocomial. Además, en etapas tardías puede haber complicaciones hasta después de 1 año por formación de placa bacteriana en el implante; lo que puede derivar en múltiples escenarios como un tratamiento con antibióticos, pérdida del implante o incluso la muerte. [12, 13, 20, 90]

Los datos expuestos muestran que la proporción y severidad de los padecimientos bucales se ha mantenido igual de severa que hace diez años. Al mismo tiempo, se sabe *de facto* la creciente resistencia a los antimicrobianos que han desarrollado diversos microorganismos entre ellos *S. aureus* y *C. albicans*, que a su vez la coexistencia de ambos microorganismos en la cavidad bucal y su sinergia les permite producir biopelículas (biofilms). Estas entidades microbianas al producir un biofilm en conjunto evitando la acción de los medicamentos aumentando la probabilidad de sobrevivir a los tratamientos para las infecciones causadas por estos microorganismos [22, 31, 32]. Se tiene conocimiento que más del 60% de las infecciones microbianas se dan por la formación de biofilms y que aproximadamente el 65% de los casos de candidiasis se da gracias a la formación de biofilms. Por lo que se requiere de más estudios en los materiales que se usan para la fabricación de implantes dentales para reducir la adherencia microbiana y la formación de biofilm. De esta forma, se mejorará la calidad de vida de los sectores vulnerables de la población que requieren el uso de DI y sufren de otra condición que los hace vulnerables a infecciones. [20, 21, 22, 33, 34, 35, 90]

1.4. Hipótesis

La síntesis de NPs de TiO_2 por el método de oxidación química controlada utilizando H_3PO_4 y H_2O_2 , resultará en la fabricación de NPs de TiO_2 de distintos diámetros. Los NPs reducirán la adhesión de *S. aureus* y *C. albicans*, y permitirán el crecimiento inicial de osteoblastos.

1.5. Objetivo general

Sintetizar nanoporos de TiO_2 por medio de oxidación química controlada con diferentes tamaños de poro y caracterizar su comportamiento contra *S. aureus* y *C. albicans*.

Objetivos específicos

1. Sintetizar nanoporos de TiO_2 mediante tratamientos de oxidación química controlada con H_3PO_4 y H_2O_2 a distintos tiempos.
2. Realizar pruebas de humectabilidad de las superficies tratadas midiendo su ángulo de contacto mediante el método de la gota sésil, para estimar su biocompatibilidad.
3. Comprobar el tipo de nanoestructura obtenida mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).
4. Caracterizar la conformación química de las superficies por espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS)
5. Realizar cultivos microbiológicos de *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* sobre las superficies tratadas.
6. Evaluar la adhesión microbiana mediante conteos de unidades formadoras de colonias (UFC) comparando cada una de las superficies a distintos tiempos de incubación.
7. Realizar cultivos iniciales de osteoblastos sobre las superficies experimentales.
8. Demostrar estadísticamente los cambios y diferencias entre tratamientos.

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1. Estructura y propiedades del titanio

El Ti es un metal de microestructura hexagonal compacta, es duro, refractario y buen conductor de la electricidad y del calor. Presenta una alta resistencia a la corrosión y en su estado de pureza es ligero, fuerte brillante y de densidad baja. El Ti es un metal abundante en la tierra con propiedades notablemente buenas por lo que es usado en la industria médica, química, naval y aeroespacial. [36, 37, 38]

El Ti se usa ampliamente como implante debido a su excelente biocompatibilidad y alta resistencia mecánica. Sin embargo, la respuesta del tejido del huésped al implante de Ti no siempre es favorable debido a su naturaleza bioinerte con una capa de óxido nativa. Está bien establecido que la capa de TiO_2 sintético no solo mejora la resistencia potencial a la corrosión, sino que también mejora la bioactividad del implante. Por lo tanto, es deseable que los implantes de Ti formen una capa de TiO_2 compacta y homogénea sobre la superficie del metal mediante técnicas de modificación de la superficie. [3, 14, 15, 17]

Utilizando el método de oxidación controlada se puede obtener una capa pasiva de TiO_2 más gruesa que reduzca la posible corrosión de los implantes dentales, impidiendo así que se liberen iones metálicos que desencadenen procesos inflamatorios en los tejidos circundantes y provoquen el rechazo del implante. [39, 40, 41, 42]

2.2. Oxidación química controlada

La oxidación química controlada es un proceso químico de formación de capas de óxido en la superficie del metal por medio de la combinación de dos o más ácidos y/o agentes oxidantes a distintas concentraciones, tiempos y temperaturas. [14, 15]

Los tratamientos con ácidos tienden a dejar áreas de mayor corrosión en los picos y valles de las ranuras que deja la fabricación de la superficie. Las ventajas de este método residen en el hecho de que a partir de él es posible controlar el grado de porosidad de la superficie, así como el de permitir un adecuado método para la limpieza de las impurezas no deseadas, generadas durante la manufactura del implante. De acuerdo con Takeuchi, M et al (2003) el ácido clorhídrico (HCl) puede disolver restos de sales indeseables sin debilitar la superficie de Ti en comparación con el H_2SO_4 . [44, 45, 46]

Los compuestos mayormente empleados para los tratamientos ácidos son el ácido fluorhídrico (HF), el H_2SO_4 y el HCl. Se suelen emplear tratamientos ácidos con la técnica de doble grabado que mezcla ácido sulfúrico y ácido clorhídrico que permite la formación de una capa de óxido rugosa de carácter uniforme con un espesor mayor a 10 nm. [43, 44, 45]

A la combinación de H_2SO_4 y H_2O_2 que se suele utilizar en los grabados ácidos se le conoce como solución piraña, la cual se debe manipular con extremo cuidado debido a que es altamente reactiva y enfriar en hielo para reducir la temperatura. Los tiempos a los que se expone el Ti varían según la literatura, entre los más usados están los de 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, y 4 horas. También, se pueden manipular las concentraciones de la solución ácida para determinar el tamaño de poro que busca obtener. [14, 15]

Se ha empleado el uso de tratamientos ácidos controlados utilizando H_3PO_4 y H_2O_2 para el grabado de placas semiconductoras de germanio (Ge) y de fosforo de indio (InP). [47, 48] Así mismo se han usado estos mismos compuesto en tratamientos similares para producir recubrimientos de TiO_2 dopado con niobio (Nb) que, de acuerdo con Okazaki, S. *et al.* (2013) se obtienen estructuras amorfas de TiO_2 , para aplicación optoelectrónica. Okazaki, S. *et al.* (2013) resaltan que obtuvieron mejores resultados con la combinación $\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ que con las combinaciones $\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ y $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$, así mismo

proponen un modelo de reacción de 2 pasos. En el que primero el H_2O_2 forma una capa de óxido sobre el semiconductor y posteriormente la capa de óxido es disuelta por el H_3PO_4 formando una superficie con relieves, lo cual podría tener un efecto similar en el Ti6Al4V y su capa de óxido. [49, 50]

La naturaleza física de los productos de corrosión que a menudo tiene una gran influencia en la velocidad de corrosión. Se pueden dividir los productos en tres tipos básicos:

- iones disueltos.
- recubrimientos porosos.
- recubrimientos compactados.

La corrosión de los metales en un ambiente ácido normalmente produce hidratación, cationes o complejos que se disuelven en el electrolito y se difunden lejos de la superficie del metal y no suelen afectar la tasa de corrosión de un modo significativo. Otros productos de corrosión como los hidróxidos y sales metálicas, precipitan en la superficie del metal de modo que forman un material poroso o una compacta capa pasiva. Tal capa pasiva en ocasiones no protege del todo al metal de la corrosión, aunque pueden ralentizar su ritmo. El óxido formado en la superficie del acero expuesto a una atmósfera húmeda es un ejemplo de este tipo de producto de corrosión. [51]

En la **figura 1** se pueden observar 2 implantes, uno maquinado y otro el cual se sometió a un tratamiento con ácidos para potenciar el crecimiento osteoblástico para disminuir el tiempo de recuperación del paciente. Se puede apreciar la diferencia de entre ambos a simple vista, siendo el maquinado más brillante y color plateado, mientras que el que fue tratado con ácidos es más opaco y grisáceo.

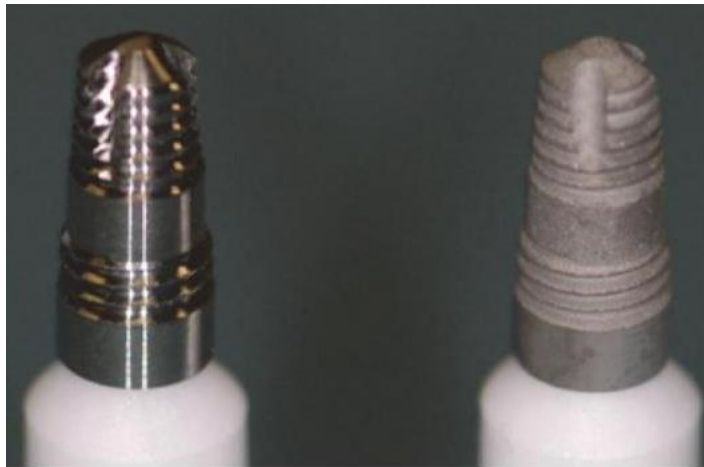


Figura 1. Comparación entre un implante maquinado (izquierda) y uno tratado con grabado ácido (derecho). [16]

2.3. Análisis de ángulo de contacto y su relevancia con la biocompatibilidad

El fenómeno del ángulo de contacto puede explicarse como un equilibrio en el cual la fuerza con la que las moléculas del líquido (en la gota) se atraen entre sí (fuerza de cohesión), y la atracción de las moléculas líquidas por las moléculas que conforman la superficie (fuerza de adhesión). Un equilibrio entre estas fuerzas es establecido, como la energía mínima. El balance de fuerzas entre la tensión de superficie líquido-vapor (γ_{lv}) de una caída de líquido y la tensión interfacial entre un sólido y la gota (γ_{sl}), manifestada a través del ángulo de contacto (θ) de la gota con la superficie, se puede utilizar para caracterizar cuantitativamente la energía de la superficie (γ_{sv}). La relación básica que describe este equilibrio de fuerzas es:

$$\gamma_{sv} = \gamma_{sl} + \gamma_{lv} \cos \theta \quad [54, 84]$$

La humectabilidad de la superficie da a conocer la energía de la superficie. Es uno de los parámetros más importantes que influye en la respuesta biológica con el biomaterial implantado, porque determina en gran medida el grado de contacto con el entorno fisiológico. La humectabilidad afecta la adsorción de proteínas, la adhesión plaquetaria, la coagulación sanguínea, y la adhesión tanto celular como microbiana. Por lo general, la unión celular es pobre en cualquier superficie hidrófoba en comparación con superficies moderadamente hidrófilas. [52, 54]

Las superficies de Ti, cubiertas por películas de TiO_2 , son hidrófilas debido a la alta polaridad del enlace Ti – O, aunque la contaminación de la superficie, como la adsorción de carbono o hidrocarburos, produce valores más altos de contacto con el agua. Otro problema es que los métodos de limpieza y esterilización de los implantes producen cambios significativos en la química y la energía de la superficie. Por otra parte, se ha establecido que la adsorción de proteínas es el primer evento que tiene lugar en la superficie de un biomaterial, después de su contacto con fluidos biológicos, y que la respuesta biológica está controlada por la naturaleza y la conformación de las proteínas adsorbidas en la superficie. [52, 60]

Las moléculas de agua suelen ser las primeras en depositarse en la superficie del implante, y se describe que es en nanosegundos, también se sabe que el agua interactúa y se une de manera diferente según las propiedades de la superficie; así, el agua en la superficie influye en la unión de proteínas y otras moléculas, que llegan posteriormente. En la mayoría de los casos se suelen presentar diferentes proteínas en un ambiente biológico, como es por ejemplo la saliva o el plasma sanguíneo, por lo que hay cierta competencia entre las distintas proteínas por depositarse en la superficie del implante. La fuerza de las interacciones proteicas que se depositaron primero en la superficie influye aún más en las interacciones con otras diferentes proteínas que llegan después. Por lo tanto, se sabe que la humectabilidad tiene un papel muy importante en la cantidad de proteínas que se depositan en la superficie del material y los posibles cambios conformacionales de las proteínas adsorbidas y la adhesión de las células. Por lo anterior mencionado, se conoce que, al llegar las células a la superficie del implante, estas responden más bien a una superficie cubierta de proteínas; por lo que, las interacciones célula-superficie son más bien interacciones entre células y las proteínas ancladas a la superficie. En general, las superficies hidrofóbicas se consideran más adsorbentes de proteínas que las superficies hidrofílicas, debido a las fuertes interacciones hidrofóbicas que se producen en estas superficies. [52, 60]

2.4. Caracterización de morfología y química de superficie

Para poder visualizar la morfología de las superficies sintetizadas y sus efectos en la inhibición de la adherencia microbiana, se utilizó un microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés). El SEM utiliza un haz de electrones para formar una imagen ampliada de la superficie de la muestra. El SEM permite la observación y caracterización superficial de sólidos inorgánicos y orgánicos. Suele estar equipado con varios sensores como se puede apreciar en la **figura 2**, como: un detector de electrones secundarios (SEI Secondary Electron Image) y un detector de electrones retrodispersados (BEI Backscattered Electron Image), para obtener imágenes que permiten ver a detalle en distintas escalas de grises la morfología de superficie. También, cuenta con un detector de energía dispersiva de rayos X EDS (Energy Dispersive X-Ray Spectrometer, por sus siglas en inglés) que permite coleccionar los Rayos X generados por la muestra y realizar diversos análisis semicuantitativos y de distribución de los elementos químicos que están presentes en la superficie de interés. [55, 58, 59]

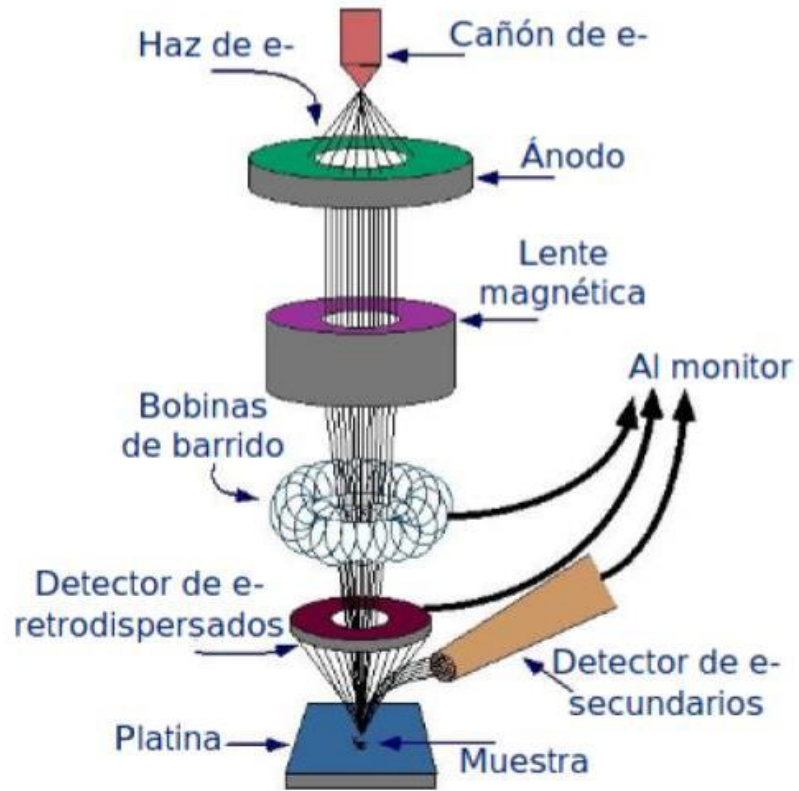


Figura 2. Representación de los componentes y funcionamiento de un SEM. [55]

2.5. Inhibición y reducción de adhesión microbiana sobre TiO₂ nanoestructurado

La presente investigación evaluó la eficiencia de nanoporos de TiO₂ en Ti6Al4V frente a los microorganismos *S. aureus* y *C. albicans* que son frecuentemente encontrados en la cavidad bucal y por lo tanto son una amenaza potencial para la salud de aquel paciente que tenga algún implante dental. [21, 70]

La adhesión bacteriana a las superficies de biomateriales es de gran importancia para cualquier dispositivo implantable. Debido a que en la cavidad bucal existen las condiciones para que estas superficies de los dispositivos implantados, sean invadidos por microorganismos naturales en la microbiota bucal. El tipo de superficie del material y su química pueden influir en la capacidad de adhesión de estos microorganismos y posiblemente en la formación de placa bacteriana. Los microorganismos pueden llegar a interactuar con el biomaterial por medio de alguno de los siguientes mecanismos de difusión y la dinámica de fluidos propios de la cavidad bucal, una vez que las bacterias están a una distancia de 50 nm del biomaterial la primera interacción que tienen con la superficie del biomaterial es por fuerzas de Van der Waals y electrostáticas [71, 72, 73, 74]

Cuando ya se dan las primeras interacciones electrostáticas se da pie a la adherencia de los microorganismos en función a su afinidad a la superficie. Acto seguido, inicia la formación de biopelículas por medio de enzimas glucosiltransferasas con la propiedad de metabolizar la sacarosa y descomponerla en glucosa y fructosa produciendo una película de exopolisacáridos (EPS) y proteínas como las adhesinas. Como consecuencia formando una arquitectura tridimensional mejor conocida como biofilm (biopelícula). Estos biofilms pueden promover infecciones prolongadas, falla de implantes y cirugías de revisión. Estas infecciones relacionadas con los implantes son difíciles de tratar ya que el biofilm envuelve a la bacteria y la protege del sistema inmune y los tratamientos antibacterianos. [11, 71, 74, 75, 76, 77]

Los dispositivos médicos deberían ser capaces de sostener una exitosa funcionalidad tisular, mientras que, minimicen o inhiben la formación del biofilm. Las propiedades de los biomateriales, como la química de la superficie, la humectabilidad y la topografía, pueden afectar la adhesión y la migración bacteriana; por lo tanto, se han hecho esfuerzos en el desarrollo de superficies nanoestructuradas con recubrimientos antibacterianos, para poder así, reducir el riesgo de infección. [71, 75]

La mayoría de los estudios sugieren que optimizar las microestructuras y las topografías a nanoescala pueden minimizar la adhesión bacteriana. Aunque en la mayoría de los casos las células adheridas mantienen su viabilidad. Varios estudios han evaluado la adhesión bacteriana en sustratos modelados con características tales como pilares, líneas y pocillos. Algunos de estos estudios han demostrado que el área de contacto entre un microorganismo y la superficie afecta su adhesión, y muchos sugieren que una topografía de superficie óptima con funciones antibacterianas depende primordialmente del tamaño y la forma del microorganismo del cual se busca impedir su adhesión. [71, 75, 77]

En la interfase de tejidos blandos, por ejemplo, la unión gingival con funcionalidad adhesiva celular para queratinocitos y fibroblastos es obligatoria para asegurar un sello epitelial ajustado que evite la infiltración bacteriana. Para ambas interfaces, la colonización bacteriana se considera un riesgo principal para infecciones graves como la periimplantitis. Esta misma inflamación va de la mano con una contaminación bacteriana de las superficies de los implantes, seguida de la pérdida de osteointegración debida a una reacción inmunológica del huésped llamado "pérdida de hueso". [26] Por lo que, tanto de manera transgingival como supragingival, las interfaces implante/saliva deben tener funcionalidades antiadhesivas o antibacterianas para impedir la formación de biofilm. El desafío para las modificaciones

avanzadas en la superficie del implante dental para evitar la colonización bacteriana y promover la integración tisular se suele llamar "carrera por la superficie". [26]

Streptococcus mutans (*S. mutans*) tiene la capacidad de adherirse a superficies y aglomerarse por la adición de dextranos de alto peso molecular estableciendo así comunidades con otros estreptococos y con otras especies de bacterias. También, se ha reportado que ciertas cepas de *S. mutans* suelen interactuar con levaduras como con *C. albicans*. Estos microorganismos interactúan por medio de sistemas complejos que son multifactoriales en función a que otros microorganismos estén presentes, así mismo, la dieta también es un factor importante, especialmente el consumo de sacarosa que puede influir en que cantidad que estarán presentes las diferentes especies bacterianas que forman el biofilm. Para el caso particular entre *S. aureus* y *C. albicans*, estos producen en conjunto un entorno acidogénico, el cual es favorable para ambos. [20, 21, 25, 78]

Se sabe por otras investigaciones que *S. aureus* y *S. epidermidis* tienen una preferencia a adherirse a superficies con sustratos hidrofóbicos, por medio de la producción de una matriz extracelular mezclada con proteínas adhesinas capaces de enlazarse con colágeno y fibronectina.[79] De acuerdo con los resultados de Puckett, S. D. *et al.* (2010) se ha observado un decremento en la adhesión de *S. aureus*, *S. epidermidis*, y *P. aeruginosa* en superficies con nanorugosidad tratadas

por deposición con un rayo de electrones (PVD, por sus siglas en inglés) en comparación con las superficies con nano-arreglos tubulares obtenidos por anodización. [80] Por otro lado, *C. albicans* se suele adherir a células del hospedero y así poder comenzar una relación comensal. Es por esto, que es considerado un patógeno oportunista, coloniza las células epiteliales y endoteliales, así como los materiales inertes implantados en el cuerpo del hospedero. *C. albicans* posee distintos mecanismos para interactuar con su entorno y adherirse a una superficie, tal como la hidrofobicidad de la superficie, así como también cuenta con mecanismos específicos que implican el uso de adhesinas y receptores en el sustrato. [76, 79, 81] Se sabe de antemano por estudios realizados por Chen, S. *et al.* (2020) que las aleaciones de Ti pueden liberar iones metálicos como en el caso de la aleación Ti-6Al-4V, que libera iones de aluminio y vanadio los cuales presentan cierta toxicidad en *C. albicans* afectando sus mecanismos de adhesión en comparación con otras aleaciones. [7]

En su investigación Ábalos, C. (2005) comenta que las bacterias con mayor energía superficial se adherirán mejor a superficies con mayor energía superficial y viceversa. También, se menciona que las superficies más rugosas promueven mayor adhesión bacteriana, y que la rugosidad es un factor más relevante para determinar si habrá mayor o menor adhesión. [71, 73, 77]

2.6. Cultivo celular en superficies de TiO₂ nanoestructurado

En 1969 se descubrió por primera vez el fenómeno de osteointegración por el profesor Per-Ingvar Branemark al observar una pieza de Ti anclada en el hueso de un conejo. En términos de efectos nanotopográficos sobre los osteoblastos (células formadoras de hueso), se ha demostrado que las cerámicas, como el TiO₂, con diferentes configuraciones nanoestructuradas exhiben efectos que potencian las tasas de crecimiento y formación de hueso. [56]

Diversos investigadores utilizan la técnica de anodización electroquímica para crear estructuras nanotubulares en la superficie de Ti para estimular el crecimiento celular rápido y la mineralización de las células de osteoblastos. [17, 18]

A pesar de que la técnica de anodización tiene ciertas ventajas en la que destaca no tener que utilizar H₂SO₄ en concentraciones potencialmente peligrosas, los tratamientos ácidos también tienen resultados prometedores en el crecimiento osteoblástico. Zhang, R. *et al* (2016) describe como su método produce una mezcla de microestructuras y nanoestructuras en forma de pocillos. Los cuales tienen mejor rango de adhesión de osteoblastos, que ejemplares con superficies pulidas y las superficies que solo poseen microestructuras. Ueno, T. *et al.* (2016) también ha tenido resultados de crecimiento

osteoblástico en superficies nanorugosas obtenidas por tratamientos con ácidos al agregar un postratamiento con luz ultravioleta (UV). [43, 61]

Por otra parte, en diversos trabajos en los que se ha usado grabado ácido y otros métodos como tratamientos térmicos en Ti, expresan que la adhesión celular se debe principalmente a los factores de rugosidad y la presencia de grupos hidroxilo (OH) [62, 63, 64]. Los implantes dentales con mayor rugosidad se fijan mejor con el pasar del tiempo, este fenómeno se produce porque el hueso crece mejor dentro de irregularidades de la superficie, esto se debe a que la rugosidad en la superficie suele favorecer el anclaje de las células y la absorción de proteínas. [52, 65]

El tratamiento ácido ha demostrado tener una mayor osteointegración comparándose con implantes tratados por otros medios como plasma, aerosol o arenados [53, 66], sin embargo; otros autores han comprobado por medio de estudios en conejos, que el anclaje del hueso en una superficie de nanotubos era superior que en superficies mecanizadas o arenadas y grabadas con ácido [67]. Además, se ha observado en otros estudios un incremento de la adhesión y del crecimiento celular en las superficies anodizadas con respecto a las superficies grabadas con ácido o superficies pulidas. [68] A pesar de que diversos estudios han concluido que los tratamientos de anodizado son superiores a otros tratamientos incluyendo los tratamientos con ácidos.

De acuerdo con Herrero-Climent, M. *et al.* (2013) que realizó estudios de osteointegración con implantes maquinados, con tratamiento de arenado, tratamiento ácido, y arenado/ácido concluyó que ninguno de los tratamientos arenado/ácido fallo en promover una osteointegración sólida en un lapso de 10 semanas con respecto a los otros tratamientos puestos a prueba. [69]

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA Y EQUIPO

3.1. Preparación de muestras.

Se utilizaron láminas de Ti grado 5 de dimensiones 0.1x100x300 mm fabricadas con el estándar ASTM B265. [82] Posteriormente se recortaron las láminas en varios cuadros de 1.2x1.2 cm y una vez recortados los especímenes necesarios se limpiaron con un tratamiento de agua de grifo y jabón para eliminar impurezas en la superficie, se enjuagan con agua destilada para eliminar las sales y se aplica un baño ultrasónico (BRANSON) en acetona para eliminar residuos orgánicos, grasas, y se dejan secar a temperatura ambiente (25 °C) de acuerdo con el estándar ASTM E3-95 como se muestra en la **figura 3**. [14, 83]



Figura 3. Imágenes captadas durante el baño ultrasónico para la limpieza y desengrase de las muestras.

3.2. Síntesis de nanoporos de TiO₂ por oxidación química controlada

Se le dio un tratamiento de ataque ácido a las láminas de aleación de Ti6Al4V para crear en su superficie una capa de óxido nanoestructurada. Para las primeras pruebas se trabajarán con tres tiempos de 30, 45 y 60 minutos.

Se trabajó en campana de extracción de vapores a temperatura ambiente (25°C), se vertió gentilmente H₂O₂ al 30% (FERMONT) con H₃PO₄ al 85% (Sigma-Aldrich) obteniendo una solución 1:1 de ambos reactivos. Se homogeneizó la solución suavemente con agitación manual, posteriormente se vertió la mezcla en un recipiente con láminas de Ti6Al4V. Se realizaron tratamientos de duración de 30, 60 y 120 minutos como se muestra en la **figura 4**. Luego de transcurrido el tiempo requerido, se diluyó la solución con agua destilada para detener la reacción y se dispuso la mezcla en otro recipiente. Se recuperaron las láminas de Ti6Al4V tratadas y se enjuagaron con agua destilada y alcohol isopropílico y se dejaron secar al aire.



Figura 4. Imágenes del proceso de oxidación química controlada **a)** vista general del material usado dentro de la campana de extracción, **b)** vista superior de las muestras a pocos minutos de iniciada la reacción, **c)** vista lateral de las muestras a pocos minutos de inicio de la reacción, **d)** vista superior de las muestras con 1 hora de reacción, **e)** vista lateral de las muestras con 1 hora de reacción.

3.3. Análisis de humectabilidad mediante ángulo de contacto

Se realizaron análisis de ángulo de contacto por el método de la gota sésil utilizando un tensiómetro óptico (Attension theta), mostrado en la **figura 5**.

Para las mediciones, se depositó una gota de 5 μL de agua destilada en 3 distintos puntos de cada superficie a temperatura ambiente. [23]

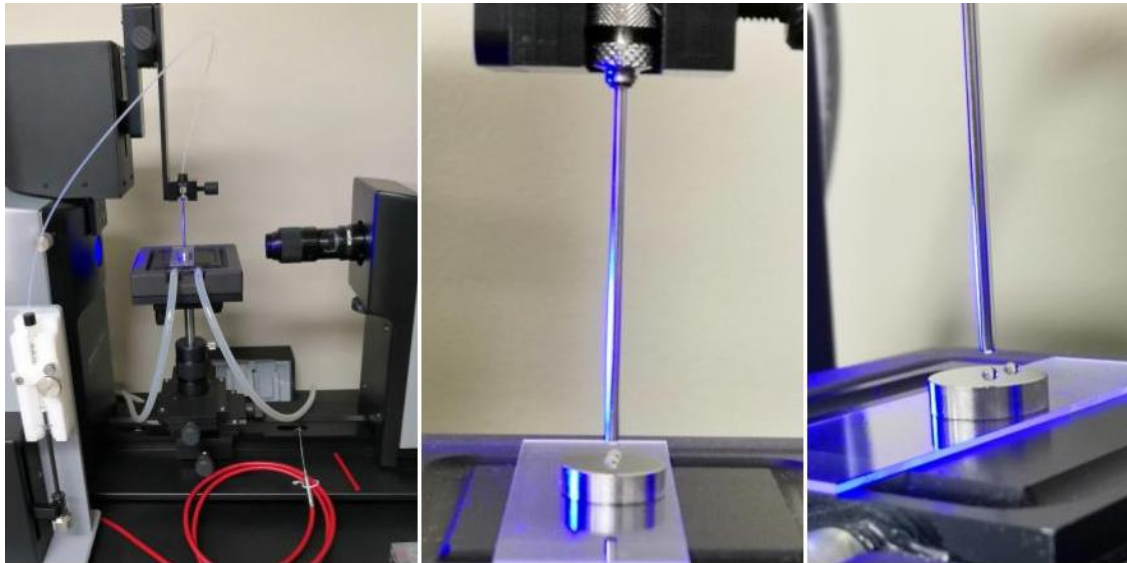


Figura 5. Imágenes del uso de tensiómetro para las mediciones de ángulo de contacto.

3.4. Caracterización fisicoquímica y morfología

Se caracterizó la morfología de las superficies tratadas utilizando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FE-SEM Tescan LYRA 3) con espectroscopia de dispersión de rayos X (EDS) para evaluar la química de superficie.

3.5 Evaluación de la adhesión microbiana

Para caracterizar la adhesión microbiana se inocularon las superficies tratadas con *S. aureus* y *C. albicans* y se dejaron incubando lotes de 2 horas y 6 horas de ambos ya terminado el tiempo de incubación se pasó a desprender los microorganismos que no estuviesen realmente adheridos a las superficies con enjuagues de PBS. Se utilizaron técnicas de dilución (factor de dilución final $\times 10^{-6}$) y se sembraron por técnica de estriado en agar nutritivo (AN; BD Bioxon) para *S. aureus* y agar dextrosa Sabouraud (APD; BD Bioxon) para *C. albicans*. Posteriormente se dejaron incubando (VWR Symphony Incubator) los cultivos en posición invertida por 24 horas a 37°C y terminado el tiempo de incubación se hizo un conteo de unidades formadoras de colonia (UFC), una vez contabilizadas se realizó otro conteo a las 48 horas de incubación. [7, 84, 89]

El procedimiento para evaluar la adherencia de *S. aureus* y *C. albicans* es mostrado en la **figura 6** y descrito a continuación paso a paso:

1. Para preparar al microorganismo se inocularon 100 μL de un concentrado de *S. aureus* en 1 mL de infusión cerebro corazón (ICC; BD Bioxon) en tubo Eppendorf, y se dejó incubando 24 horas. (Para *C. albicans* utilizó caldo Sabouraud)
2. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se tomó el inóculo y se diluyeron 50 μL en 1 mL esta alícuota es la que se usó para inocular las superficies.
3. En condiciones estériles se depositaron las superficies tratadas previamente desinfectadas (sumergidas 24 horas en etanol al 70%) en microplacas (Corning) de 12 pocillos estériles para separar las muestras en dos lotes una para incubar por 2 horas y otro por 6 horas.
4. Se inocularon con micropipeta todas las superficies con 10 μL de la alícuota con el inóculo (50 μL :1 mL), después se humectaron las superficies agregando 50 μL de PBS y se dejaron incubando las superficies a 37°C un lote por 2 horas y otro por 6 horas.
5. Terminado el tiempo de incubación para cada lote se enjuagaron con PBS dejándolas sumergidas con un volumen de 2 mL durante

5 minutos, y al retirar la solución salina se homogeneizó suavemente con micropipeta repitiendo el mismo procedimiento tres veces, se dejaron las muestras sumergidas al final en 2 mL de PBS.

6. Con las muestras aún sumergidas en solución salina dentro de las microplacas, se depositó con mucho cuidado la microplaca en el equipo de sonicación para dar un baño ultrasónico (BRANSON) de 2 minutos en intervalos de 10 segundos alternando entre sonicación y reposo para no lisar los microorganismos y solo desprender aquellos microorganismos que no estén bien anclados a las superficies.
7. Al concluir el baño ultrasónico a las muestras se les realizó un desprendimiento mecánico a las superficies con la puntilla de plástico de la micropipeta como se representa en la **figura 7**, con las muestras aún sumergidas en los 2 mL de solución salina.
8. Ya retiradas las bacterias de las superficies se realizaron diluciones en serie de las alícuotas de los pocillos de la microplaca como se muestra en la **figura 8**, con un volumen de paso de 10 μL de la alícuota del pocillo depositándola en un tubo Eppendorf con 0.99 mL (volumen fijo) de solución salina, luego de esa dilución se tomaron 10 μL se realizaron 3 diluciones obteniendo un factor de dilución final de 1×10^{-6} .

9. Terminadas las diluciones se utilizó una sola caja Petri para dos cultivos realizando una técnica de estriado en cuatro direcciones como se muestra en la **figura 9**, para tener un cultivo mejor esparcido para una formación de UFC más puntual y facilitar el conteo de UFC.

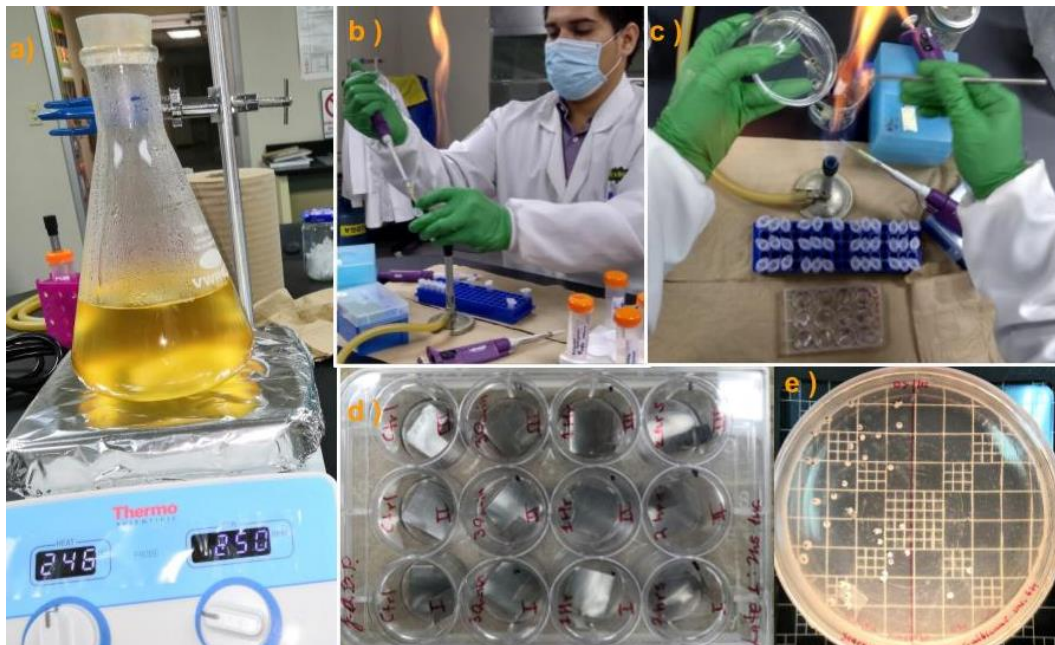


Figura 6. Imágenes tomadas durante el proceso, **a)** preparación del medio de agar nutritivo, **b)** realizando las diluciones seriadas, **c)** inoculando el agar y estriando, **d)** microplaca con pocillos con las muestras sumergidas en solución PBS, e inciso **e)** cultivo y conteo de la dilución 2 y 3 de UFC de *C. albicans* con incubación de 6 horas.

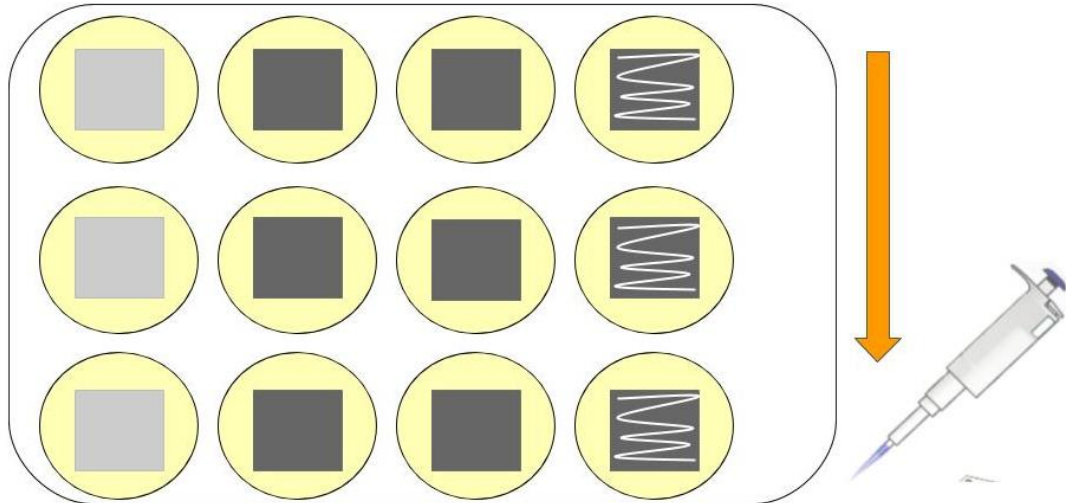


Figura 7. Muestras sumergidas en solución salina dentro de los pocillos de la microplaca; con la micropipeta se realiza una remoción mecánica y para tomar el volumen una vez hecha la remoción mecánica con la puntilla de plástico.

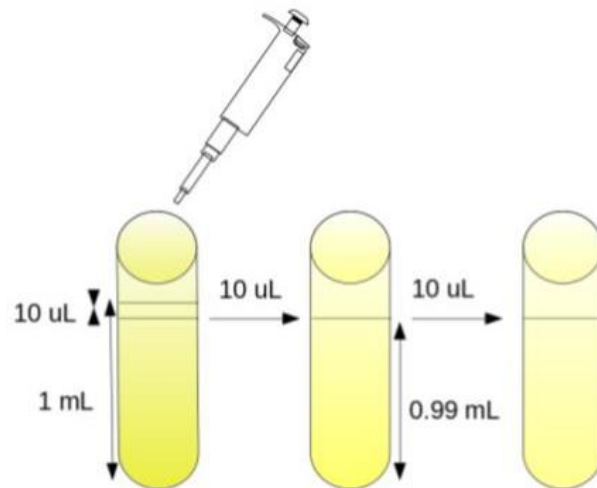


Figura 8. Se utilizó un volumen fijo de 0.99 mL y un volumen de paso de 10 μ L realizado 3 diluciones seriadas de la alícuota del pocillo de cada muestra.

Gira 45° para estriar desde el centro de la caja Petri donde se inoculó

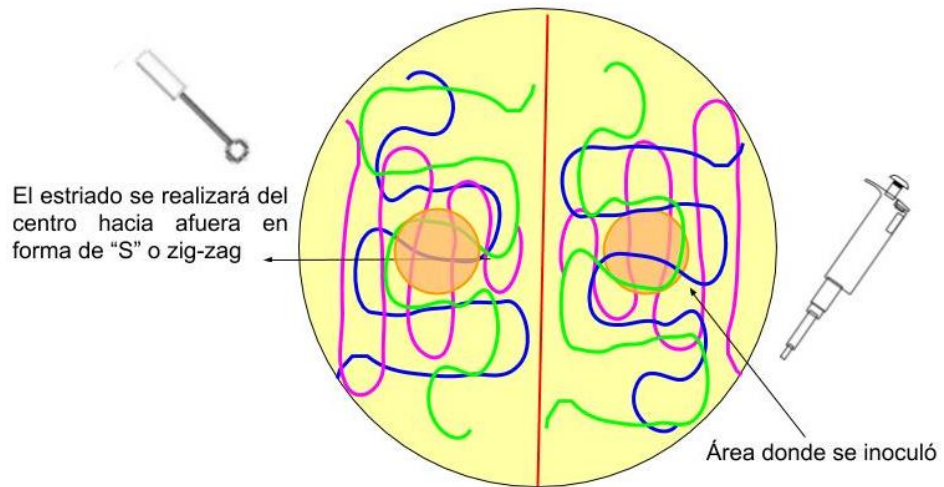


Figura 9. Se tomaron 10 μ L de cada dilución y se inocularon las cajas de Petri con agar realizando un estriado en 4 direcciones en zigzag con un asa estéril.

3.5.1 Tratamiento para analizar muestras biológicas por FE-SEM

Debido a que el SEM trabaja con bajo vacío y un requisito para poder analizar muestras es que estas no contengan humedad, las muestras con cultivos de *C. albicans* y *S. aureus* se sometieron a un tratamiento de deshidratación y fijación para hacer posible su visualización con el SEM. Primeramente, las bacterias no adheridas se deben retirar suavemente en cada pocillo donde se incubaron con enjuagues con PBS (buffer fosfato salino). Después los microorganismos se deben fijar de 18 a 24 horas con glutaraldehído. Posteriormente las muestras fijas se deben secar con una serie de tratamientos con etanol a distintas concentraciones (50 %, 70%, 95%) durante 2 minutos cada uno, seguido de un secado con hexametildisilazano (HMDS) durante 15 minutos. Por último, las muestras se dejan secar al aire entre 12 a 24 horas. [7, 8, 57]

3.6. Pruebas de adherencia osteoblástica

Para la realización de cultivo celular osteoblástico las muestras de superficies tratadas y sin tratar se dejaron sumergidas por 24 horas en etanol al 70% dentro de una campana de flujo laminar estéril y posteriormente se dejaron en luz ultravioleta por 20 minutos previamente a su utilización. Las células osteoblásticas (MC3T3-E1, osteoblastos de calvaria de ratón) fueron cultivadas previo a su utilización en Frascos T25 (70mL Inclinado, Corning), con 4 mL de medio α MEM (Alpha Minimum Essential Medium; Invitrogen), suplementado con 10% suero bovino fetal (SBF; Invitrogen) y 1% antibiótico-antimicótico (Invitrogen) y se dejaron incubando a 37°C, 5% CO₂, por 24 horas.

Terminado las preparaciones de las muestras y osteoblastos a utilizar, se expandieron los osteoblastos y se retiró el medio de las células con una micropipeta y una pipeta serológica. Posteriormente se despegaron las células realizando 3 lavados con 3 mL de PBS durante 5 minutos, terminando se retiró el PBS con una pipeta serológica, luego se adicionaron 2 mL de tripsina (Invitrogen) y se incubaron las células a 37°C durante 5 minutos para despegarlas. Con una pipeta serológica se agregaron 8 mL de medio α MEM (Invitrogen), y luego se vertió la solución en un tubo cónico para centrifuga de 15 mL. Se centrifugó a 1200 rpm por 10 minutos para sedimentar un pellet celular. Se retiró con

una pipeta serológica el sobrenadante y el pellet celular obtenido se tomó con una pipeta de 10 mL. [9, 88]

El pellet celular obtenido de la centrifugación se resuspendió con 5 mL de medio α MEM (SBF 10% y 1% antibiótico). Posteriormente se contabilizaron las células vivas utilizando cámara de Neubauer y se sembraron aproximadamente 15,000 células/mL sobre las superficies tratadas en las cajas de 12 pocillos (Corning) como se ve en la **figura 10**. Terminado el proceso de deposición celular en cada muestra se vertieron gentilmente 4 mL de medio y se dejaron incubando a 37°C, 5% CO₂, por 24 horas. [9, 88]

Después de 24h, se retiró el medio y se enjuagaron las muestras 3 veces con PBS por 5 minutos, y se transfirieron los especímenes una caja nueva de 12 pocillos estéril, se les vertieron 500 μ l de medio nuevo con MTT (5 mg/ml; Sigma-Aldrich) al 10 %. Después de agregar el nuevo medio con MTT se dejaron las muestras y se incubaron a 37°C por 5 horas. Una vez terminado el tiempo de incubación se retiró el medio y se adicionaron 50 μ l de DMSO (Sigma-Aldrich) a cada muestra, las muestras se volvieron a incubar por 25 minutos a 37°C, concluido el tiempo de incubación se agitó suavemente de forma manual la caja de pocillos para disolver los cristales de formazán que se produjeron. Por último, se vertieron 100 μ l de la suspensión de cada pocillo de cada muestra a otra caja de 96 pocillos y se realizaron lecturas de densidad

óptica a 595 nm con un lector de ELISA (Multiskan, ThermoFisher). [86, 87, 88]

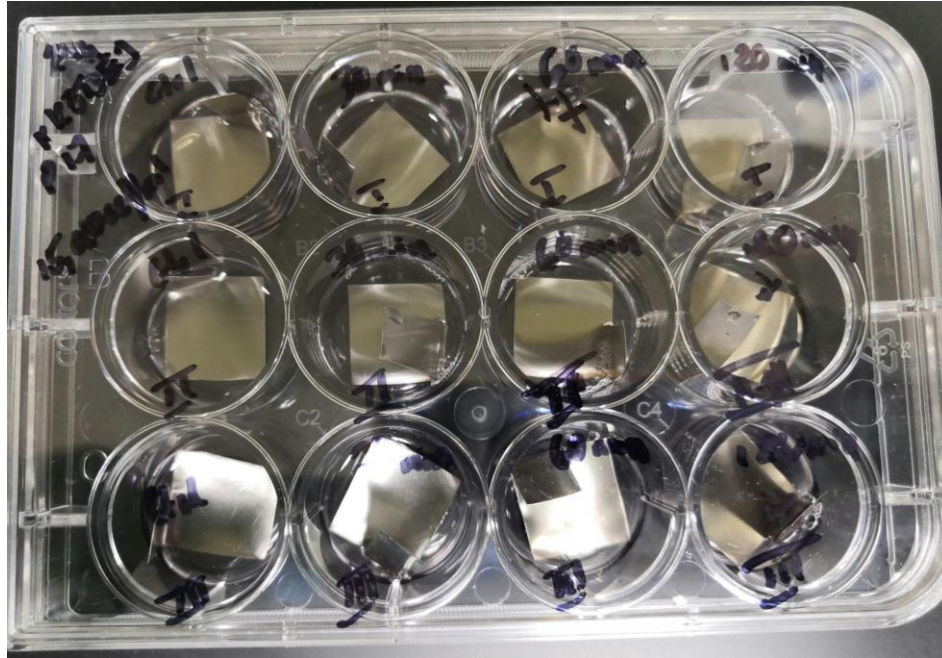


Figura 10. Imagen de las muestras para cultivos osteoblásticos.

3.7. Análisis Estadístico

Cada experimento realizado se hizo por triplicado y todos los datos obtenidos se analizaron y graficaron utilizando el software estadístico GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., USA), los gráficos poseen barras de error \pm la desviación estándar en relación con los N valores obtenidos. Los datos se sometieron a un análisis de varianza de una o dos vías (one-way or two way ANOVA) según se requiriera y a la par se calcularon los intervalos de confianza entre medias mediante la prueba de Turkey. Se utilizó un valor $P < 0.05$ para determinar si las diferencias entre resultados son estadísticamente significativas.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

4.1. Caracterización de superficies tratadas

En la **figura 11** es posible apreciar la morfología de superficie formada a partir de los tratamientos oxidación controlada así como su composición elemental. Para la medición de los poros se tomaron como muestras 5 poros de diferente tamaño y en distintos puntos de la superficie. En el tratamiento de 30 minutos se sintetizaron NPs con una media de 44 nm, pero con un rango que va desde los 29 a los 75 nm teniendo una desviación estándar de 18.49. En el caso del tratamiento de duración de 60 minutos se muestran poros apenas perceptibles de manera más dispersa y con un aspecto más homogéneo se estima que poseen un diámetro menor a 2.7 nm y que entre estos no hay una desviación estándar tendiendo a cero. Por otra parte, para tratamiento de 120 minutos se aprecia una formación de NPs con mayor diámetro con una media de 51.62 nm, con un rango que va desde 24 nm hasta 91 nm por lo que resulta en una desviación estándar muy amplia de 24.59. Estas diferencias de poro con respecto al tiempo del tratamiento se pueden visualizar mejor en la **figura 12**, donde se resalta la significancia estadística ($P < 0.05$) que poseen los NPs del tratamiento de 60 minutos contra los otros de 30 y 120 minutos.

En cuanto a la composición elemental no se detectaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos mediante un EDS como se muestra en la **tabla 1**. Tampoco se detectó la presencia de O ni de P mas no se descarta su presencia por tratarse de estructuras de TiO₂ mediante una síntesis que involucra H₃PO₄.

Tabla 1. Cuantificación promedio del contenido puntual de elementos en las superficies tratadas

Tratamientos	Cantidad de elementos (%)			
	C	Al	Ti	V
30 min	0.38	5.44	86.35	3.28
60 min	0.35	4.82	84.71	5.65
120 min	0.54	4.94	87.67	6.28

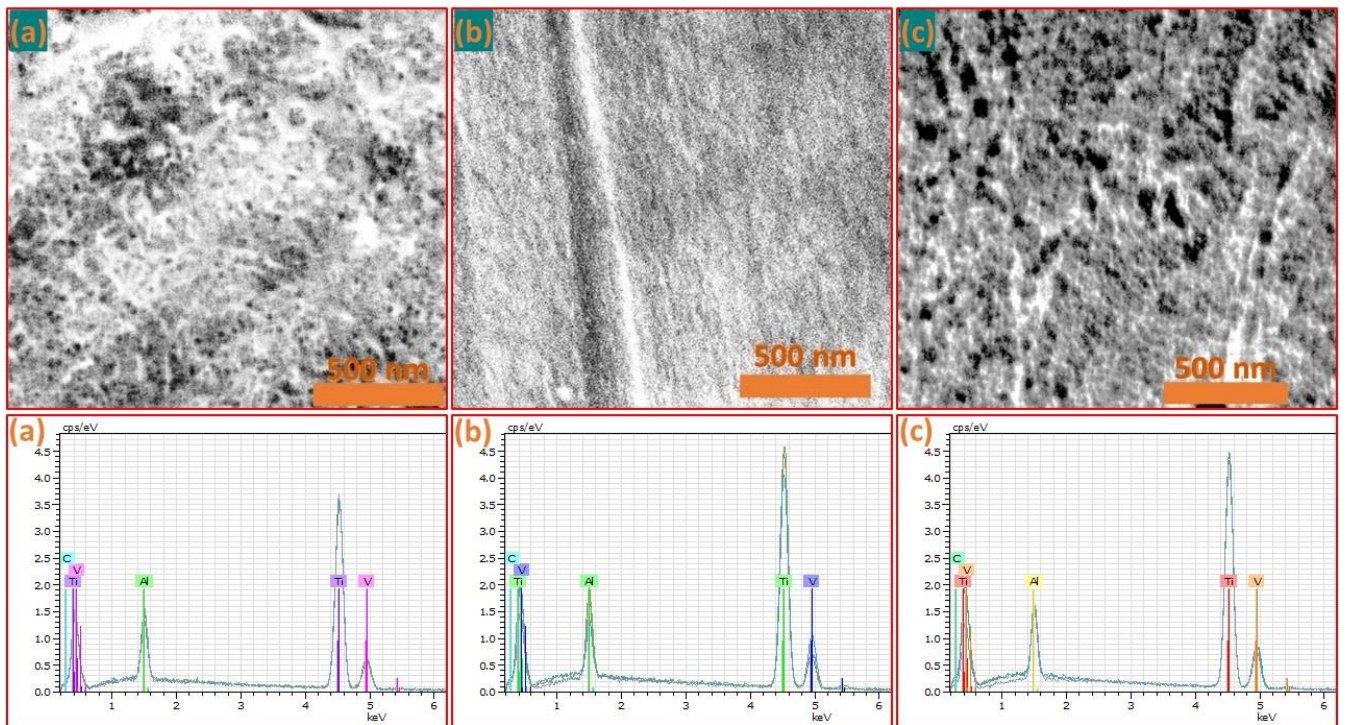


Figura 11. Micrografías SEM y EDS de las superficies tratadas por oxidación química controlada a diferentes tiempos **a)** 30 min, **b)** 60 min y **c)** 120 min.

Morfología de Superficie

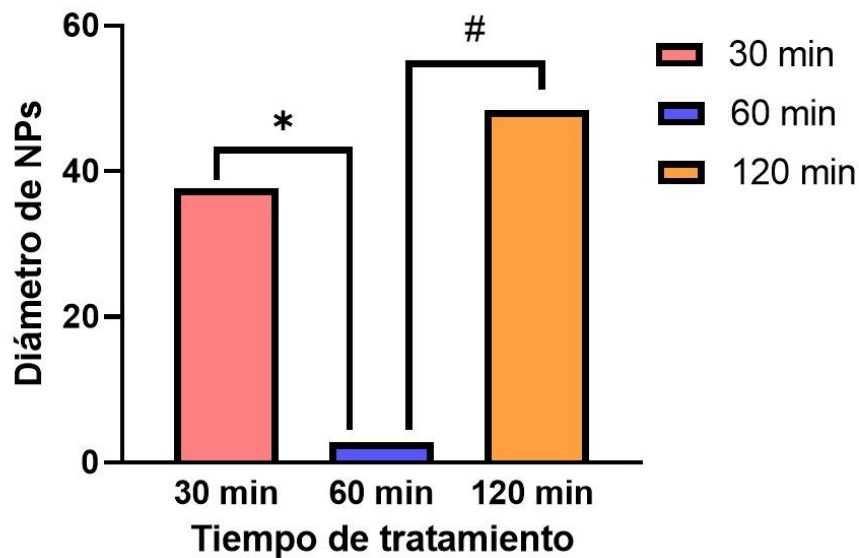


Figura 12. Análisis y comparación del promedio de NPs obtenidos en los diferentes tiempos de tratamiento. En el gráfico se muestra una significancia estadística amplia entre los tratamientos de 30 min vs los de 60 min (*), así como también entre los de 60 min vs los de 120 min (#). Para la obtención de estos análisis estadísticos se utilizó one-way ANOVA con un nivel de confianza $P < 0.05$.

4.2. Análisis de humectabilidad

El análisis de ángulo de contacto nos dio como resultado que los tratamientos tienen un comportamiento ligeramente hidrofílico. Los tratamientos más hidrofóbicos fueron de 30 y 120 minutos que poseen un ángulo de contacto de 97° y 99° respectivamente, mientras que la muestra tratada de 60 minutos tiene un ángulo de contacto 89° que ya es considerado hidrofílico pero no tanto si se compara con el control que obtuvo un ángulo de contacto de 86° , como se puede visualizar en la **figura 12**.

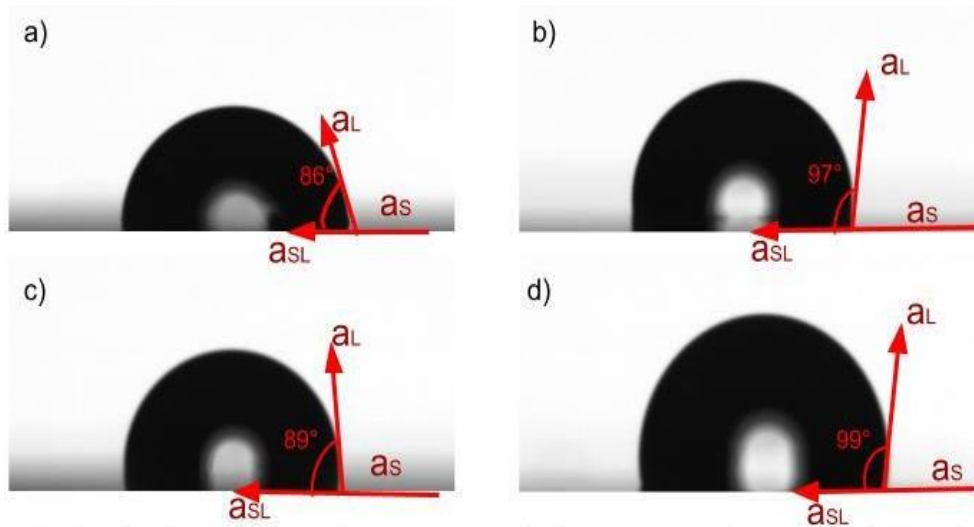


Figura 12. Análisis de ángulo de contacto en las superficies tratadas, **a)** muestra control sin tratamiento, **b)** muestra con tratamiento de **30 minutos**, **c)** muestra con tratamiento de **60 minutos**, **d)** muestra con tratamiento de **120 minutos**.

Las diferencias entre las superficies a pesar de ser poca diferencia, estadísticamente hablando poseen cambios significativos cuando se les compara ($P < 0.05$) entre si, como se puede apreciar en la **figura 13**. Entre el control y el tratamiento de 120 minutos hay una diferencias significativas, mientras que entre el control y el tratamiento de 60 minutos no hubo cambios.

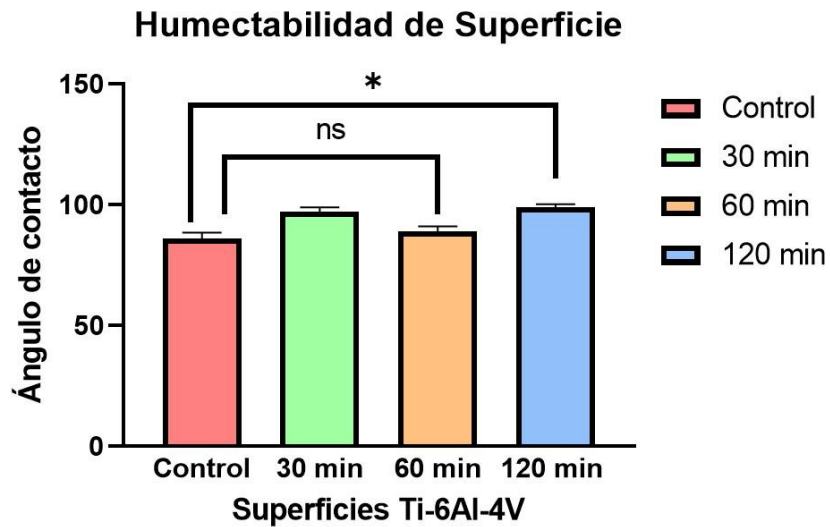


Figura 13. Análisis de los ángulos de contacto medidos en las superficies tratadas contra el control. Entre las superficies del tratamiento de 60 min y el control no hubo diferencia significativa (ns), hay una gran significancia estadística (*) entre el control y el tratamiento de 120 min siendo el tratamiento de 120 min el de mayor valor (#). Para la obtención de estos análisis estadísticos se utilizó one-way ANOVA con un nivel de confianza $P < 0.05$.

4.3. Evaluación de adhesión bacteriana

Las pruebas de adhesión bacteriana no demostraron diferencias significativas en el crecimiento sobre las superficies tratadas con respecto al control, en ningún tiempo de incubación como se puede apreciar en la **figura 14**. Aunque el valor más bajo lo obtuvo el tratamiento de 60 minutos con un valor de 8.4 log UFC/mL en el tiempo de incubación de 2 horas. Sin embargo, cuando se compara el crecimiento de un mismo tratamiento a distinto tiempo de incubación es visible una diferencia estadística en la cual el tratamiento de 60 min es el que posee una mayor significancia estadística (*).

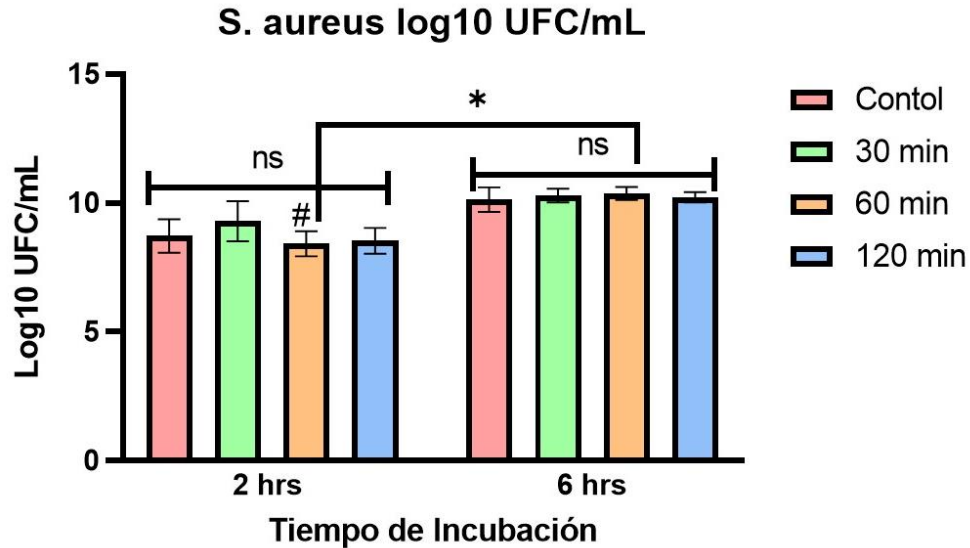


Figura 14. Crecimiento bacteriano vs tiempos de incubación en diferentes tratamientos de superficies. No hubo un cambio significativo (no significativo = ns) entre tratamientos en el mismo tiempo de incubación. Entre las superficies del mismo tratamiento a distintos tiempo de incubación si hubo cambios significativos en todos tratamientos siendo el más significativo la de tratamiento de 60 min (*) así mismo fue el que tuvo menor crecimiento bacteriano (#). Para la obtención de estos análisis estadísticos se utilizó two-way ANOVA con un nivel de confianza $P < 0.05$.

Por lo que se puede interpretar en el gráfico de la **figura 14** el tratamiento de 60 min retrasa el crecimiento de *S. aureus*, por lo que captaron micrografías en SEM mostradas en la **figura 15**. Además, se compararon el control contra el tratamiento de 60 min, confirmando diferencias significativas entre el crecimiento bacteriano a distintos tiempos de incubación de 2 horas y 6 horas. Se puede ver claramente como el tratamiento de 60 min inhibe mejor el crecimiento de *S. aureus* a distintos tiempos de incubación con respecto le control, inclusive hasta 6 horas de crecimiento.

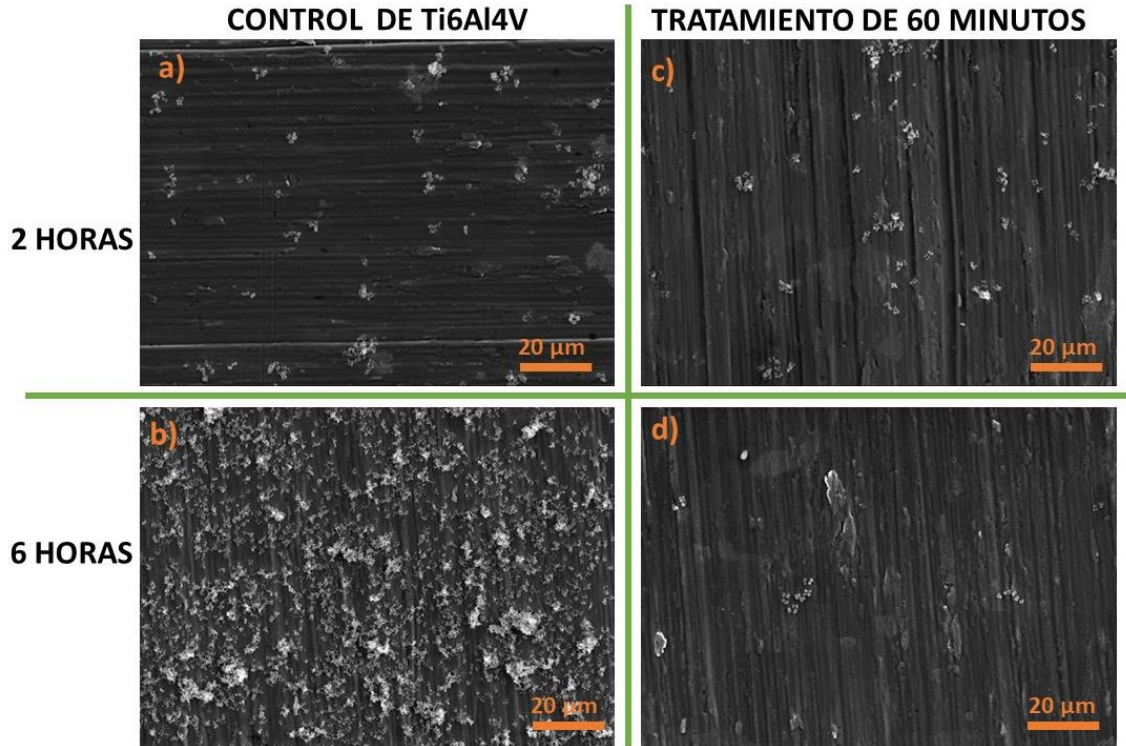


Figura 15. Micrografías en SEM de *S. aureus* en superficies de control sin tratamiento **a)** incubación de **2 horas**, **b)** incubación de **6 horas**. y superficies con tratamiento **c)** incubación de **2 horas**, **d)** incubación de **6 horas**.

4.4. Evaluación de adhesión de *C. albicans*

Las adhesión fúngica se evaluó de la misma manera que la adhesión bacteriana (sección 3.5), y los datos obtenidos de las colonia que se formaron a partir del inóculo que se incubó en las superficies tratadas se representan en el gráfico de la **figura 16**. En la que se puede apreciar que no hubo ninguna significancia estadística (ns) entre los tratamientos en un mismo tiempo de incubación, así como también comparando el mismo tratamiento a distinto tiempo de incubación, el valor más pequeño fue el del tratamiento de 60 min con incubación de 2 horas.

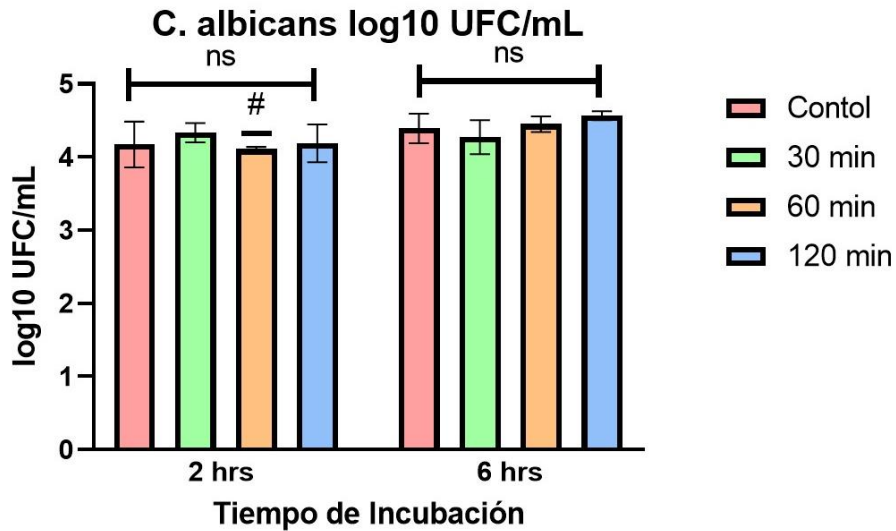


Figura 16. Crecimiento micótico vs tiempos de incubación en diferentes tratamientos de superficies. No hubo un cambio significativo (no significativo = ns) entre tratamientos comparándolos en un mismo tiempo de incubación. Entre las superficies del mismo tratamiento a distintos tiempo de incubación tampoco hubo cambios significativos, pero el tratamiento que mostró un valor más bajo de UFC/mL fue el tratamiento de 60 min (#) con incubación de 2 horas, aunque tuvo una mayor desviación estándar. Para la obtención de estos análisis estadísticos se utilizó two-way ANOVA con un nivel de confianza $P < 0.05$.

Se tomaron micrografías por SEM del tratamiento de 60 min porque, fue el de menor crecimiento, así como también demostró buenas propiedades de adhesión bacteriana. Por lo que se optó por tomar micrografía del tratamiento de 60 min y del control como se muestra en la **figura 17**. Las adhesión en las primeras 2 h de incubación es menor en el tratamiento de 60 min y se mantiene en cantidades similares hasta las 6 h de incubación, sugiriendo un menor crecimiento en comparación con los controles en sus respectivos tiempos de incubación.

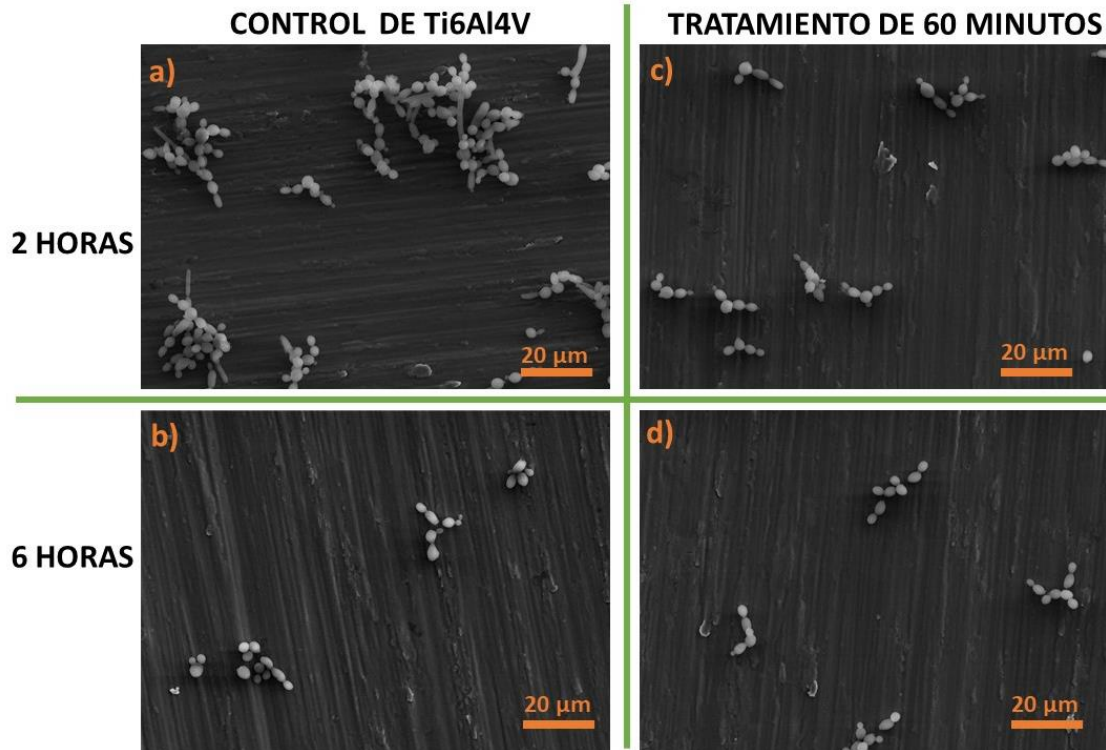


Figura 17. Micrografías en SEM de *C. albicans* en superficies de control sin tratamiento **a)** incubación de **2 horas**, **b)** incubación de **6 horas**. y superficies con tratamiento **c)** incubación de **2 horas**, **d)** incubación de **6 horas**.

4.5. Ensayo de cultivos osteoblásticos

Se realizaron cultivos de osteoblastos en los tratamientos realizados para garantizar que la actividad antimicrobiana no afectara la viabilidad de osteoblastos, propiedad también crucial para que el buen anclaje del DI. En la **figura 18** se puede ver que con respecto al control de Ti6Al4V, los demás tratamientos tuvieron un desempeño similar a este al no haber significancia estadística (ns) entre estos y el control en un lapso de incubación de 24 h.

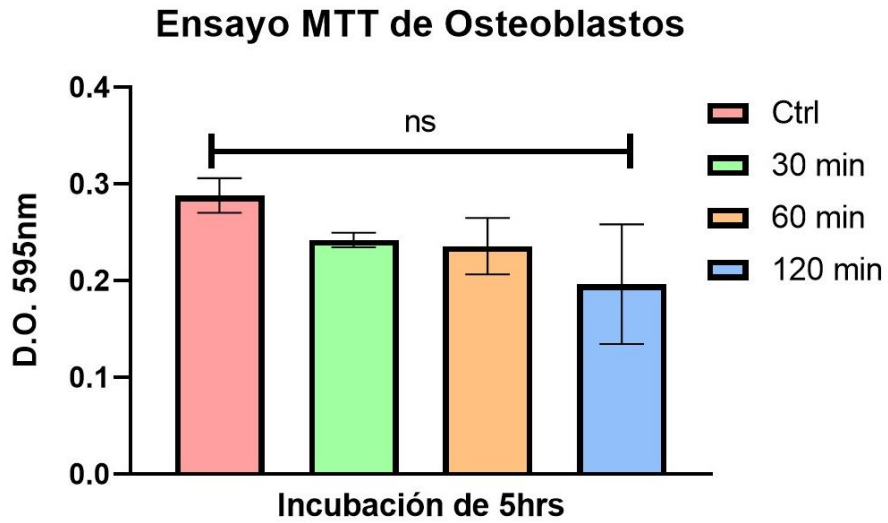


Figura 18. Medición de densidad óptica de ensayo MTT para determinar el crecimiento de osteoblastos en las superficies tratadas vs el control. No hubo un cambio significativo (ns) entre superficies de distintos tratamientos. Para la obtención de estos análisis estadísticos se utilizó one-way ANOVA con un nivel de confianza $P < 0.05$.

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

Las micrografías de la figura 11 muestran que entra más tiempo de tratamiento el poro no siempre se hace más grande, de hecho cuando se compara el tamaño de NPs del tratamiento de 30 min y 60 min. El de 60 min nos brinda un tamaño de NP menor de 3nm el cual es aproximadamente 13 veces más pequeño que el NP promedio del tratamiento de 30 min. Sin embargo, si pasa más tiempo como con el tratamiento de 120 min el tamaño de poro aumenta considerablemente hasta 17 veces más grande que en el tratamiento de 60 min, así como también pierde homogeneidad ya que el tamaño de poro varía considerablemente. Por lo que, si lo que se busca es sintetizar NP de 3 nm o menos y que estos sean más homogéneos sin tanta variabilidad, el tratamiento de 60 min es la mejor opción. Este cambio tan pronunciado en el diámetro de los NPs con respecto al tiempo del tratamiento nos infiere que el modelo de 2 pasos que se mencionó en la sección 2.2 para el grabado de semiconductores también aplica para el Ti como se propone en el esquema mostrado en la **figura 19**.

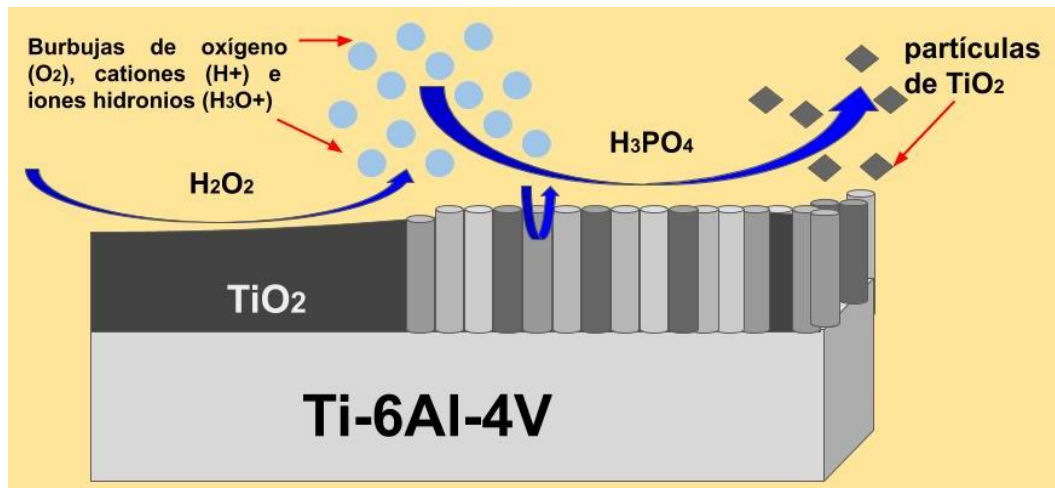


Figura 19. Representación de la interacción entre las soluciones utilizadas y el material en los tratamientos de oxidación química controlada.

En la **figura 19** se puede apreciar como el H_2O_2 produce una capa de óxido en la superficie del material, sobre la que actúa el H_3PO_4 disolviendo la capa de óxido produciendo una superficie porosa y rugosa a la vez que libera iones y oxígeno molecular como consecuencia de las interacciones de ambas sustancias. Este modelo de reacción de 2 pasos forma NPs de TiO_2 , la capa de óxido se vuelve a formar aproximadamente a los 30 min disminuyendo el tamaño del NP. Sin embargo, al dejarse más tiempo como el caso del tratamiento de 120 min, el poro aumenta su tamaño inclusive aún más que en el tratamiento de 30 min, generando NPs de formas irregulares y de distintos diámetros.

No hubo diferencias significativas en la composición química de superficie entre los distintos tratamientos. Los análisis de EDS no detectaron la presencia de O o P más no se descarta la posibilidad de que estén presentes en una cantidad ínfima estos pudieron reducir su cantidad debido a los procesos de lavado y esterilización de las muestras.

El análisis de ángulo de contacto mostró que algunas de las muestras tratadas tienen un comportamiento ligeramente hidrofílico como las de 30 y 120 min. Mientras que, las más hidrofílicas fueron las de 60 min siendo esta solo ligeramente más hidrofílica que el control sin tratamiento y teniendo un ángulo de contacto de 89° que es considerado un comportamiento hidrófilo por ser menor a 90° . Se necesita un equilibrio apropiado de entidades de superficie hidrófilas e hidrófobas, porque las superficies excesivamente hidrófobas mejoran la afinidad celular y reducen la biocompatibilidad, pero las superficies altamente hidrófilas evitan las interacciones entre las células, que son particularmente importantes en la ingeniería de tejidos, ya que generalmente los dispositivos dentales necesitan un ángulo de contacto bajo en su superficie para tener una alta biocompatibilidad. [23, 84, 85]

En cuanto adhesión bacteriana, la que menor adhesión tuvo respecto al tiempo fue la superficie de tratamiento de 60 minutos. Sin embargo, todas las superficies al final de la incubación de 6 horas tienen tasas de crecimiento similares ya que de acuerdo con los análisis de varianza no hubo diferencias significativas entre las superficies como se puede apreciar en la **figura 14**. Por lo que la inhibición se da primordialmente en las primeras 2 horas de incubación y se mantiene así hasta las 6 horas. En las micrografías por SEM del crecimiento bacteriano del control y el tratamiento de 60 minutos, se aprecia un decremento en la tasa de crecimiento entre un tiempo de incubación y otro al comparar el tratamiento de 60 min con el control se ve claramente en la **figura 15** como el control en el tiempo de incubación de 6 horas tiene un mayor aglomeración de *S. aureus* mientras que el tratamiento de 60 min mantiene una cantidad similar de bacterias. Este hallazgo se puede atribuir principalmente al tamaño de NP menor a 3 nm en la cual es la diferencia mas significativa en comparación a los otros tratamientos, así como la ligera hidrofobicidad que se determina por el ángulo de contacto de 89° que le da la energía de superficie apropiada para que *S. aureus* no se ancle con éxito a la superficie. También, podría ser que la posible presencia de fosfatos y grupos fosforilo pudiesen influir ya que estos podrían interactuar con la membrana de la bacteria o alterar ciertos procesos de síntesis de proteínas [91 ,92].

La adhesión de *S. aureus* se vio reducida hasta un 23% en promedio con el tratamiento de 60 min con respecto al control, teniendo una desviación estándar casi de 1.3 por lo que se puede interpretar en que no solo inhibe también controla la proliferación, como se comprobó en las micrografías de la **figura 15**.

Respecto a una inhibición o reducción micótica no se apreció una diferencia significativa entre tratamientos; únicamente en el de 60 minutos hubo un menor crecimiento. Sin embargo, en las micrografías tomadas por SEM se apreció una diferencia de crecimiento con respecto el control y no se observó formación de hifas ni biofilm. Se sabe por lo expuesto en la sección 2.5 que los iones de vanadio pueden afectar algunos procesos de *C. albicans*, esto puede explicar su falta de crecimiento en todas las superficies usadas y que no haya diferencias significativas entre estas.

Los cambios fisicoquímicos que se realizaron en los tratamientos si bien poseen propiedades antimicrobianas estas no afectan la viabilidad osteogénica de las superficies ya que no hubo diferencias significativas en la reducción de MTT entre los tratamientos y el control el cual es un material con propiedades de biocompatibilidad bien conocidas como se muestra en la **figura 18**.

CAPÍTULO 6: CONCLUSION

Se han logrado sintetizar nanoporos de distintos diámetros dependiendo la duración del tratamiento de oxidación química controlada. A distinto tamaño de NPs se obtuvieron distintos ángulos de contacto, que dotan de distinto grado de hidrofobicidad a las muestras tratadas con respecto al control. El tratamiento de 60 min demostró inhibir la adhesión de *S. aureus* con respecto al tiempo de incubación, lo cual se atribuye principalmente al tamaño de NP menor a 3 nm. En el caso de *C. albicans*, si bien no hubo diferencia significativa entre los tratamientos aplicados, se visualizó en las micrografías que no hubo formación de hifas ni biofilm, por lo que se puede esperar que la inhibición de formación de biofilm de ambos microorganismos faciliten la acción de antibióticos y antimicóticos, ya que se sabe que estos pueden reducir su tasa de éxito debido a la formación de biofilm mixtos entre estos organismos. Cabe resaltar que los tratamientos utilizados no se le agrego ningún post tratamiento adicional, lo cual es muy conveniente ya que otros postratamientos cómo agregar partículas o iones de plata pueden causar genotoxicidad en células humanas. Por otra parte, los tratamientos utilizados no afectan significativamente el crecimiento osteoblástico ni su viabilidad metabólica, ya que, no hubo una diferencia estadística significativa entre los tratamientos y el control con acabado de maquinado el cual promueve de manera completa el crecimiento y anclaje de osteoblastos. Además es importante resaltar que esta

novedosa formulación es más segura que los clásicos tratamientos ácidos reportados en la literatura. Incluso, sugieren potencial para aplicarse a otro tipo de materiales metálicos y su escalamiento para la industria que desarrolla dispositivos médicos.

6.1 Recomendaciones

Se deberían realizar más estudios de los tratamientos con cultivos mixtos con *C. albicans* y *S. aureus* para entender cómo afectan estos tratamientos su interacción. Ya que se sabe que en superficies de vidrio *C. albicans* al interactuar con *S. aureus* puede aumentar hasta un 56% la formación de hifas [93], y así identificar otras formulaciones de tratamientos de superficie con otras concentraciones y compararlo con otros tratamientos para evaluar su efectividad contra la inhibición de adhesión bacteriana.

REFERENCIAS

- [1] Muflikhun, M. A., Frommelt, M. C., Farman, M., Chua, A. Y., & Santos, G. N. C. (2019). Structures, mechanical properties and antibacterial activity of Ag/TiO₂ nanocomposite materials synthesized via HVPG technique for coating application. *Heliyon*, 5(4), e01475.
- [2] Ali, I., Suhail, M., Alothman, Z. A., & Alwarthan, A. (2018). Recent advances in syntheses, properties and applications of TiO₂ nanostructures. *RSC advances*, 8(53), 30125-30147.
- [3] Molera Sola, P., (1990). Metales resistentes a la corrosión. (pp. 87 -95). Marcombo.
- [4] Hanawa, T. (2019). Titanium-tissue interface reaction and its control with surface treatment. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 170.
- [5] Zhang, J., Xie, Y., Zuo, J., Li, J., Wei, Q., Yu, Z., & Tang, Z. (2017). Cell responses to titanium treated by a sandblast-free method for implant applications. *Materials Science and Engineering: C*, 78, 1187-1194.
- [6] Tan, G., Tan, Y., Ni, G., Lan, G., Zhou, L., Yu, P., Liao, J., Zhang, Y., Yin, Z., Wang, H. W., y Ning, Y. (2014, mayo). Controlled oxidative nanopatterning of microrough titanium surfaces for improving osteogenic activity. Springer Science+Business. Vol. 25. 1875-1884.

- [7] Chen, S., Tsoi, J. K., Tsang, P., Park, Y. J., Song, H. J., & Matinlinna, J. P. (2020). Candida albicans aspects of binary titanium alloys for biomedical applications. *Regenerative Biomaterials*.
- [8] Mehdizadeh, K. A., Tahermanesh, K., Chaichian, S., Joghataei, M. T., Moradi, F., Tavangar, S. M., ... & Abed, S. M. (2014). How to prepare biological samples and live tissues for scanning electron microscopy (SEM).
- [9] Zhang, L., Hongwei, B., Liu, L., y Sun D. D. (2018, febrero). Dimension induced intrinsic physio-electrical effects of nanostructured TiO₂ on its antibacterial properties. Chemical Engineering Journal. Vol 334, 1309-1315
- [10] Malekshahi Byranvand, M., Nemati Kharat, A., Fatholahi, L., & Malekshahi Beiranvand, Z. (2013). A review on synthesis of nano-TiO₂ via different methods. *Journal of nanostructures*, 3(1), 1-9.
- [11] Knetsch, M. L., & Koole, L. H. (2011). New strategies in the development of antimicrobial coatings: the example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. *Polymers*, 3(1), 340-366.
- [12] Norowski Jr, P. A., & Bumgardner, J. D. (2009). Biomaterial and antibiotic strategies for peri-implantitis: A review. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 88(2), 530-543.

[13] Eichler, M., Katzur, V., Scheideler, L., Haupt, M., Geis-Gerstorfer, J., Schmalz, G., ... & Rupp, F. (2011). The impact of dendrimer-grafted modifications to model silicon surfaces on protein adsorption and bacterial adhesion. *Biomaterials*, 32(35), 9168-9179.

[14] Variola, F., Yi, J., Richert, L., Wuest, J. D., Rosei, F., y Nanci, A. (2007, diciembre). Tailoring the surface properties of Ti6Al4V by controlled chemical oxidation. Biomaterials. Vol. 29, 1285-1298.

[15] Yi, J. H., Bernard, C., Variola, F., Zalzal, S. F., Wuest, J. D., Rosei, F., & Nanci, A. (2006). Characterization of a bioactive nanotextured surface created by controlled chemical oxidation of titanium. *Surface Science*, 600(19), 4613-4621.

[16] Turkyilmaz, I. (Ed.). (2011). *Implant dentistry: a rapidly evolving practice*. BoD–Books on Demand.

[17] Brammer, K. S., Frandsen, C. J., y Sungho, J. (2012, junio). TiO₂ nanotubes for bone regeneration. Trends in Biotechnology, CellPress, Vol. 30, No. 6, 315-322.

[18] Gulati, K., Moon, H., y Li, T. (2018, mayo). Titania nanopores with dual micro-/nano-topography for selective cellular bioactivity. Materials Science & Engineering. C 91,624–630.

[19] Standard System for the Identification of the Hazards of Materials for Emergency Response. (2017). NFPA 704: Standard System for the Identification

of the Hazards of Materials for Emergency Response.

https://www.nfpa.org/Assets/files/AboutTheCodes/704/704_FAQs.pdf

[20] Cuesta, A. I., Jewtuchowicz, V., Brusca, M. I., Nastri, M. L., & Rosa, A. C. (2010). Prevalence of Staphylococcus spp and Candida spp in the oral cavity and periodontal pockets of periodontal disease patients. *Acta Odontológica Latinoamericana*, 23(1), 20-26.

[21] Ibarra-Trujillo, C., Villar-Vidal, M., Gaitán-Cepeda, L. A., Pozos-Guillen, A., Mendoza-de Elias, R., & Sánchez-Vargas, L. O. (2012). Ensayo de formación y cuantificación de biopelículas mixtas de Candida albicans y Staphylococcus aureus. *Revista Iberoamericana de Micología*, 29(4), 214-222.

[22] Senpuku, H., Sogame, A., Inoshita, E., Tsuha, Y., Miyazaki, H., & Hanada, N. (2003). Systemic diseases in association with microbial species in oral biofilm from elderly requiring care. *Gerontology*, 49(5), 301-309.

[23] Narendrakumar, K., Kulkarni, M., y Addison, O. (2015, septiembre). Adherence of oral streptococci to nanostructured titanium surfaces. Dental materials. Vol. 31, 1460-1468.

[24] Loesche W. J. (1986). Role of Streptococcus mutans in human dental decay. *Microbiological reviews*, 50(4), 353-80.

[25] Bowen, H., Koo H. (2011). Biology of Streptococcus mutans Derived Glucosyltransferases: Role in Extracellular Matrix Formation of Cariogenic Biofilms. Caries Research. Vol. 45, 69-86.

- [26] Rupp, F., Liang, L., y Geis-Gerstorfer, J. (2017, septiembre). Surface characteristics of dental implants: A review. Dental Materials. Vol. 34, 40-57.
- [27] Cohn, D.J., Cheng, A., y Kahn, A. (2016, febrero). Novel osteogenic Ti6AL4V device for restoration of dental function in patients with large bone deficiencies: Desings, development and implementation. SCI. REP. 6, 20493; DOI: 10.1038/SREP20493.
- [28] Cruz Quintana, S. M., Díaz Sjostrom, P., Arias Socarrás, D., y Mazón Baldeón, G. M. (2017). Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal. Revista Cubana de Estomatología. Vol. 54(1), 84-99.
- [29] Organización Mundial de la Salud (2012, abril). Salud Bucodental. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/> Nota informativa No. 318.
- [30] Mejia Gonzalez, A. M., Rodriguez Gonzalez, K. G., y Lomeli Buyoli, G. (2015, diciembre). Patologías Bucales. Sistema de Vigilancia Epidemiologica de Patologías Bucales. 41-42.
- [31] Kong, E. F., Tsui, C., Kucharíková, S., Andes, D., Van Dijck, P., & Jabra-Rizk, M. A. (2016). Commensal protection of *Staphylococcus aureus* against antimicrobials by *Candida albicans* biofilm matrix. *MBio*, 7(5), e01365-16.
- [32] Nazar, J. (2007). Biofilms bacterianos. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, 67(1), 161-172.
- [33] Morales, D. K., & Hogan, D. A. (2010). *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. *PLoS pathogens*, 6(4).

- [34] Blot, S., Vandewoude, K., & Colardyn, F. (1998). Staphylococcus aureus infections. *The New England journal of medicine*, 339(27), 2025-6.
- [35] Tuazon, C. U., Perez, A., Kishaba, T., & Sheagren, J. N. (1975). Staphylococcus aureus among insulin-injecting diabetic patients: an increased carrier rate. *Jama*, 231(12), 1272-1272.
- [36] Ballesteros, M. N. S. (2005). *Tecnología de proceso y transformación de materiales* (Vol. 82). Universitat Politecnica de Catalunya. Iniciativa Digital Politecnica.
- [37] Bolaños Rodríguez, V. (2016). *Efectos de la adición del tantalio sobre la biocompatibilidad de los implantes de titanio* (Doctoral dissertation).
- [38] Rodríguez, V. C. B. (2016). *Efectos de la adición del tantalio sobre la biocompatibilidad de los implantes de titanio* (Doctoral dissertation, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria).
- [39] Rius, D. R., Sánchez, P. S., & Gil, F. J. (2010). Anodización del titanio para la mejora ante la degradación química de material quirúrgico. *Gaceta dental: Industria y profesiones*, (216), 184-190.
- [40] de Lera, D. D. (2013). Biomateriales: el titanio en odontología. *Cuadernos del Tomás*, (5), 233-258.
- [41] Labajos Gutiérrez, R. (2017). Comportamiento corrosivo y tribocorrosivo en medio biológico de aceros inoxidables libres de níquel y manganeso para la fabricación de prótesis.

[42] Duffo, G. (2011). Materiales y materias primas. *Materiales y Materias Primas*, 8(1), 1-43.

[43] Ueno, T., Ikeda, T., Tsukimura, N., Ishijima, M., Minamikawa, H., Sugita, Y., & Ogawa, T. (2016). Novel antioxidant capability of titanium induced by UV light treatment. *Biomaterials*, 108, 177-186.

[44] Costantino, A. (2016). *Caracterización nanométrica de superficies lisas, ácido grabadas y anodizadas de titanio mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) para aplicación en implantología odontológica* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).

[45] Liu, X., Chu, P. K., & Ding, C. (2004). Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 47(3-4), 49-121.

[46] Takeuchi, M., Abe, Y., Yoshida, Y., Nakayama, Y., Okazaki, M., & Akagawa, Y. (2003). Acid pretreatment of titanium implants. *Biomaterials*, 24(10), 1821-1827.

[47] Kagawa, S., Mikawa, T., & Kaneda, T. (1982). Chemical Etching of Germanium with H₃PO₄-H₂O₂-H₂O Solution. *Japanese Journal of Applied Physics*, 21(11R), 1616.

[48] Mouton, A., Sundararaman, C. S., Lafontaine, H., Poulin, S., & Currie, J. F. (1990). Etching of InP by H₃PO₄, H₂O₂ solutions. *Japanese journal of applied physics*, 29(10R), 1912.

- [49] Okazaki, S., Ohhashi, T., Nakao, S., Hirose, Y., Hitosugi, T., & Hasegawa, T. (2013). Wet Etching of Amorphous TiO₂ Thin Films Using H₃PO₄-H₂O₂ Aqueous Solution. *Japanese Journal of Applied Physics*, 52(9R), 098002.
- [50] Qiu, J., Wang, Q., Shen, F., Yang, G., Zhang, Y., Deng, S., ... & Song, C. (2017). Optimizing phosphoric acid plus hydrogen peroxide (PHP) pretreatment on wheat straw by response surface method for enzymatic saccharification. *Applied biochemistry and biotechnology*, 181(3), 1123-1139.
- [51] Landolt, D. (2007). *Corrosion and surface chemistry of metals*. EPFL press.
- [52] González-Carrasco, J. L. (2009). Metals as bone repair materials. In *Bone repair biomaterials* (pp. 154-193). Woodhead Publishing.
- [53] Piattelli, A., Celletti, R., Marinho, V. C., Traini, T., Orsini, G., Bracchetti, G., & Perrotti, V. (2006). Bone contact around osseointegrated implants: a histologic study of acid-etched and machined surfaces. *Journal of long-term effects of medical implants*, 16(2).
- [54] Gittens, R. A., Scheideler, L., Rupp, F., Hyzy, S. L., Geis-Gerstorfer, J., Schwartz, Z., & Boyan, B. D. (2014). A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects. *Acta biomaterialia*, 10(7), 2907-2918
- [55] Servicios técnicos de investigación. (2012). Microscopía electrónica de barrido. 2018, marzo 3, de universidad de Alicante Recuperado de <https://ssyf.ua.es/es/formacion/documentos/cursos->

programados/2012/especifica/tecnicas-instrumentales-en-el-analisis-de-superficie/sem-sesion-12-de-noviembre.pdf

[56] Pye, A. D., Lockhart, D. E. A., Dawson, M. P., Murray, C. A., & Smith, A. J. (2009). A review of dental implants and infection. *Journal of Hospital Infection*, 72(2), 104-110.

[57] MacKintosh, E. E., Patel, J. D., Marchant, R. E., & Anderson, J. M. (2006). Effects of biomaterial surface chemistry on the adhesion and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 78(4), 836-842.

[58] (n.d.). Microscopía electrónica de barrido en la caracterización de materiales (2013). Recuperado el marzo 3, 2018, de <http://aargentinapciencias.org/wp-content/uploads/2018/01/RevistasCel/tomo63-3/5-MICROSCOPIA-ELECTRONICA-DE-BARRIDO-EN-LA-CARACTERIZACION-DE-MATERIALES-cei63-3-2013-5.pdf>

[59] (n.d.). CIMAV Monterrey. Recuperado el marzo 3, 2018, de <http://mty.cimav.edu.mx/>

[60] Junkar, I. (2016). Interaction of Cells and Platelets with Biomaterial Surfaces Treated with Gaseous Plasma. In *Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly* (Vol. 23, pp. 25-59). Academic Press.

[61] Zhang, R., Wan, Yi, Ai, X., Wang, T., y Men, B. (2016, Abril). Preparation of micro-nanostructure on titanium implants and its bioactivity. Transactions of Nonferrous Metals Society of China. Vol. 26, No. 4, 1019-1024.

[62] Feng, B., Weng, J., Yang, B. C., Qu, S. X., & Zhang, X. D. (2003). Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblast. *Biomaterials*, 24(25), 4663-4670.

[63] Sader, M. S., Balduino, A., de Almeida Soares, G., & Borojevic, R. (2005). Effect of three distinct treatments of titanium surface on osteoblast attachment, proliferation, and differentiation. *Clinical oral implants research*, 16(6), 667-675.

[64] Zhao, G., Schwartz, Z., Wieland, M., Rupp, F., Geis-Gerstorf, J., Cochran, D. L., & Boyan, B. D. (2005). High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 74(1), 49-58.

[65] Lario-Femenía, J., Amigó Mata, A., Vicente-Escuder, Á., Segovia-López, F., & Amigó, V. (2016). Desarrollo de las aleaciones de titanio y tratamientos superficiales para incrementar la vida útil de los implantes. *Revista de metalurgia*, 52(4), e084-e096.

[66] Ban, S., Iwaya, Y., Kono, H., & Sato, H. (2006). Surface modification of titanium by etching in concentrated sulfuric acid. *Dental Materials*, 22(12), 1115-1120.

[67] Salou, L., Hoornaert, A., Louarn, G., & Layrolle, P. (2015). Enhanced osseointegration of titanium implants with nanostructured surfaces: an experimental study in rabbits. *Acta biomaterialia*, 11, 494-502.

[68] Sista, S., Nouri, A., Li, Y., Wen, C., Hodgson, P. D., & Pande, G. (2013). Cell biological responses of osteoblasts on anodized nanotubular surface of a titanium-zirconium alloy. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 101(12), 3416-3430.

[69] Herrero-Climent, M., Lázaro, P., Rios, J. V., Lluch, S., Marqués, M., Guillem-Martí, J., & Gil, F. J. (2013). Influence of acid-etching after grit-blasted on osseointegration of titanium dental implants: in vitro and in vivo studies. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(8), 2047-2055.

[70] Ucar Barroeta, A., Rojas de Médez, G., y Ballester Lelis, A. (2006, marzo). Acción de agentes químicos en la eliminación de *Cándida albicans* sobre Prótesis Dentales. Acta Odontológica Venezolana. Vol. 45, No. 2, 1-2.

[71] Ábalos, C. (2005). Adhesión bacteriana a biomateriales. Avances en Odontoestomatología, 21(1), 347-353.

[72] Kerkouch, D. (2013). Tratamiento de superficie de titanio con propiedades antibacterianas para aplicaciones biomédicas.

[73] Quirynen, M., & Bollen, C. M. L. (1995). The influence of surface roughness and surface-free energy on supra-and subgingival plaque formation in man: A review of the literature. *Journal of clinical periodontology*, 22(1), 1-14.

[74] Roosjen, A., Norde, W., van der Mei, H. C., & Busscher, H. J. (2006). The use of positively charged or low surface free energy coatings versus polymer brushes in controlling biofilm formation. In *Characterization of polymer surfaces and thin films* (pp. 138-144). Springer, Berlin, Heidelberg.

[75] Skoog, S. A., Kumar, G. y Narayan, R. J. (2017, Julio). Biological responses to immobilized microscale and nanoscale surface topographies. Pharmacology & Therapeutics. Vol. 182, 33–55.

[76] Coenye, T. K. D. P., De Prijck, K., Nailis, H., & J Nelis, H. (2011). Prevention of *Candida albicans* biofilm formation. *The Open Mycology Journal*, 5(1).

[77] An, Y. H., & Friedman, R. J. (1998). Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of biomedical materials research*, 43(3), 338-348.

[78] Ojeda-Garcés, J. C., Oviedo-García, E., y Salas, L. A. (2013). *Streptococcus mutans* y caries dental. CES Odontología, 26(1), 44-56.

[79] Doyle, R. J. (2000). Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. *Microbes and infection*, 2(4), 391-400.

[80] Puckett, S. D., Taylor, E., Raimondo, T., & Webster, T. J. (2010). The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment. *Biomaterials*, 31(4), 706-713.

[81] De la calle Rodríguez, N., Santa Vélez, C., & Cardona Castro, N. (2012). Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. CES Medicina, 26(1), 43-55.

[82] ASTM B265, Standard Specification for Titanium and Titanium Alloy Strip, Sheet, and Plate, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2001, www.astm.org

[83] ASTM E3-95, Standard Practice for Preparation of Metallographic Specimens, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2001, www.astm.org

[84] Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Lemons, J. E. ... [et al.], (2004), *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*, San Diego, USA, Elsevier Academic Press.

[85] Menzies, K. L. y Jones, L. (2010). The impact of contact angle on the biocompatibility of biomaterials. Optometry and vision science. Vol.87, 387-399.

[86] De Castro de Pardo, C. (2006, diciembre). Pruebas de Tamizaje para determinar efectos citotóxicos en extractos, fracciones o sustancias, utilizando la prueba MTT. Facultad de Medicina. Fundación Universitaria San Martín. Bogotá, Colombia.1-11.

[87] Escobar, L., Rivera, A., y Aristizábal, F. A. (2010, febrero). Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. Revista de la Facultad de Química Farmaceutica de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Vol. 17, No. 1, 67-74.

[88] Castillo Uribe, S. L. (2018). *Incremento de la viabilidad osteoblástica a través de la liberación sostenida de (-)-Epicatequina en Nanotubos de TiO₂* (tesis de maestría). Universidad Autónoma de Baja California, México.

[89] Camacho, A., M.Giles, A.Ortegón, M.Palao, B.Serrano y O.Velázquez.(2009). Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.

[90] Shirliff, M. E., Peters, B. M., & Jabra-Rizk, M. A. (2009). Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS microbiology letters*, 299(1), 1-8.

[91] Cozzone, A. J. (2012). An insight into future antibacterial therapy. *Emerging microbes & infections*, 1(1), 1-3.

[92] Li, X. F., Feng, X. Q., & Yang, S. (2010). A mechanism of antibacterial activity of chitosan against Gram-negative bacteria. *Food Sci*, 13, 037.

[93] Peters, B. M., Jabra-Rizk, M. A., Scheper, M. A., Leid, J. G., Costerton, J. W., & Shirliff, M. E. (2010). Microbial interactions and differential protein

expression in *Staphylococcus aureus*–*Candida albicans* dual-species biofilms.
FEMS Immunology & Medical Microbiology, 59(3), 493-503.