



Desarrollo de recubrimientos multicapa antibacteriales de TiO₂/Ag por magnetron sputtering para potencial aplicación en implantes no permanentes

Sebastián Rodríguez Maya

Magíster en Ingeniería de Materiales

Director

Francisco Javier Bolívar Osorio, Doctor (PhD) en Ingeniería

Codirector

Gilberto Bejarano Gaitán, Doctor (PhD) en Ingeniería

Universidad de Antioquia

Facultad de Ingeniería

Maestría en Ingeniería de Materiales

Medellín, Antioquia, Colombia

2024

Cita	Sebastian Rodriguez Maya [1]	
Referencia	[1]	S. Rodríguez Maya, "Desarrollo de recubrimientos multicapa antibacteriales de TiO ₂ /Ag por magnetron sputtering para potencial aplicación en implantes no permanentes", Tesis de maestría, Maestría en Ingeniería de Materiales, Universidad de Antioquia, Medellín, Antioquia, Colombia, 2024.
Estilo IEEE (2020)		



Maestría en Ingeniería de Materiales, Cohorte L.

Grupo de Investigación Centro de Investigación, Innovación y Desarrollo de Materiales (CIDEMAT).

Sede de Investigación Universitaria (SIU).



Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

1 8 0 3

Facultad de Ingeniería

Departamento de Ingeniería de Materiales

Centro de Investigación, Innovación y Desarrollo de Materiales - CIDEMAT

**Desarrollo de recubrimientos multicapa antibacteriales de TiO_2/Ag
por magnetron sputtering para potencial aplicación en implantes
no permanentes**

**Trabajo de investigación para optar al grado de Magister en Ingeniería de
Materiales**

Sebastián Rodríguez Maya

Director: Francisco Javier Bolívar Osorio

Codirector: Gilberto Bejarano Gaitán

A mis padres Mónica y Pablo, quienes con su amor, paciencia, esfuerzo y apoyo incondicional, siempre me han permitido alcanzar las metas que me he propuesto.

A mi abuela María Marleny, por su cariño como segunda madre, por ser un pilar en mis momentos de incertidumbre y por su fe en Dios para el bien de todos.

Finalmente, para toda mi familia, mis amigos y conocidos, por confiar en mí, por brindarme enseñanzas y fortaleza para ser cada día una mejor persona.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis padres, a mi abuela, a mi hermano y a toda mi familia por ser la mayor fuente de apoyo en mis momentos tanto de plenitud y regocijo, como de incertidumbre y debilidad, ya que con sus consejos, enseñanzas, tolerancia y amor me han dado ese respaldo incondicional y absoluto para superar esta valiosa etapa de mi vida. Así como a mis amigos y conocidos, por los cálidos momentos, el acompañamiento y las experiencias vividas.

Quiero agradecer muy especialmente a mi tutor, el profesor Francisco Javier Bolívar Osorio, por su acompañamiento durante todo el trabajo de investigación, gracias por el conocimiento y confianza que me ha brindado, gracias por las palabras de apoyo en los momentos de desconcierto y por regalarme la oportunidad de realizar mi Maestría.

Muchísimas gracias a mi compañera Magali Restrepo Posada por su admirable tenacidad y perseverancia, por los cafés y los agradables ratos compartidos, por los consejos y su maravillosa música.

Al profesor Julián Andrés Lenis por todo el conocimiento y acompañamiento que me obsequió, por las conversaciones y los momentos compartidos.

Al grupo CIDEMAT y a todos los profesores que me formaron como profesional, así como a mi codirector, el profesor Gilberto Bejarano, por ser un ejemplo de profesionalismo y asiduidad.

Finalmente, un profundo agradecimiento al CODI, por financiar mi trabajo de investigación mediante el proyecto “Desarrollo de recubrimientos multicapa antibacteriales mediante pulverización catódica magnetrón para aplicaciones en implantes temporales”, bajo el identificador #2020-34116 en el SIIU. Igualmente, a la Universidad de Antioquia, sus directivos, y asistentes por abrirme las puertas de una comunidad académica única y por apoyarme mediante el programa “Estudiante Instructor” para la realización de mi investigación.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	5
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	7
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	8
2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	9
2.1. Uso de implantes metálicos.....	9
2.2. Oseointegración y biocompatibilidad en implantes metálicos.....	11
2.3. Recubrimientos y tratamientos superficiales sobre Ti6Al4V.....	12
2.4. Magnetron sputtering como técnica de fabricación de recubrimientos.....	16
2.5. Propiedades antibacteriales de la plata (Ag).....	17
2.6. Generalidades del TiO ₂	18
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. Objetivo general.....	20
3.2. Objetivos específicos.....	20
4. EXPERIMENTACIÓN.....	21
4.1. Preparación de sustratos de Ti6Al4V.....	21
4.2. Caracterización de sistemas monocapa de TiO ₂	21
4.3. Obtención y caracterización de sistemas multicapa de TiO ₂ -Ag.....	22
5. RESULTADOS	
5.1. RECUBRIMIENTOS DE MONOCAPAS DE TiO ₂	26
5.1.1. Ensayos de perfilometría.....	26
5.1.2. Mediciones de mojabilidad.....	28
5.1.3. Análisis micro-Raman.....	29
5.2. RECUBRIMIENTOS MULTICAPA DE TiO ₂ /Ag.....	31
5.2.1. Caracterización física y química	31
5.2.2. Propiedades mecánicas	41
5.2.3. Ensayos de adhesión.....	43
5.2.4. Ensayos biotribológicos.....	44
5.2.5. Ensayos de liberación de Ag.....	46
5.2.6. Ensayos de citotoxicidad.....	47
5.2.7. Ensayos de adhesión celular.....	48
5.2.8. Actividad antibacteriana.....	51
CONCLUSIONES.....	54
TRABAJO FUTURO.....	55
REFERENCIAS.....	56

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** (a-izq.) Historial de estudios de recubrimientos multicapa para aplicaciones biomédicas. (b-der.) Estudios que además incluyen el uso de titanio en los sistemas multicapa.....19
- Figura 2.** Rugosidad de los sistemas monocapa en dos relaciones gaseosas de Ar:O₂, a la izquierda una relación 2:1, a la derecha una relación 3:1.....27
- Figura 3.** Espesor de los sistemas monocapa utilizando relaciones gaseosas de 2:1 y 3:1.....28
- Figura 4.** Mediciones de ángulo de contacto para los sustratos de Ti6Al4V y recubrimientos delgados en dos atmósferas, 2:1 y 3:1 (Ar:O₂).....29
- Figura 5.** Gráficas de espectrometría Raman para las muestras E3 a la izquierda y E6 a la derecha.....30
- Figura 6.** Espectros micro-Raman para TM (Rojo), 10TiO₂/Ag (Verde) y 15TiO₂/Ag (Azul).....32
- Figura 7.** Difractogramas de rayos X para TM, 10TiO₂-Ag y 15TiO₂-Ag.....33
- Figura 8.** Micrografías SEM superficiales de TM (a), 10TiO₂-Ag (b) y 15TiO₂-Ag (c) e imágenes EDS para Ag (Amarillo) de 10TiO₂-Ag (d) y 15TiO₂-Ag (e).....34
- Figura 9.** Micrografías FESEM de la morfología superficial y corte transversal para 10TiO₂-Ag (a)-(b) y 15TiO₂-Ag (c)-(d) respectivamente.....36
- Figura 10.** Espesor de los recubrimientos (izq.) y medidas de rugosidad (der.)38
- Figura 11.** Mediciones de ángulo de contacto para el sustrato de Ti6Al4V, la monocapa de TiO₂ (TM), 10TiO₂-Ag y 15TiO₂-Ag.....40
- Figura 12.** Dureza (H) y módulo de Young (E) para los recubrimientos y sustrato.....42

Figura 13. Micrografías ópticas del ensayo de adhesión Daimler-Benz para los sistemas TM (a), 10TiO₂-Ag (c) y 15TiO₂-Ag (c).....44

Figura 14. Gráficos de coeficiente de fricción (μ) y tasa de desgaste (k), micrografías ópticas y SEM de las huellas de desgaste para TM (a,d), 10TiO₂-Ag (b,e) y 15TiO₂-Ag (c,f) respectivamente.....46

Figura 15. Adhesión celular a 24h sobre Ti6Al4V (14-a), TM (14-b), 10TiO₂-Ag (14-c), 15TiO₂-Ag (14-d) y a 72h para 10TiO₂-Ag (14-e) y 15TiO₂-Ag (14-f).....50

Figura 16. Evaluación de halo de inhibición bacteriano para *P. aeruginosa* y *S. aureus* sobre TM (A-E), 10TiO₂-Ag (B-F), Antibiótico ciprofloxacina (C-G) y Control de no inhibición (D-H).....52

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de deposición para el recubrimiento monocapa de TiO₂ (TM) y sistemas multicapa 10TiO₂/Ag and 15TiO₂/Ag.....23

Tabla 2. Análisis EDS para TM, 10TiO₂-Ag y 15TiO₂-Ag.....36

Tabla 3. Energía superficial del sustrato de Ti6Al4V y los recubrimientos obtenidos.....40

Tabla 4. Liberación de Ag⁺ para los recubrimientos multicapa a 6, 24, 72, 168, 360 y 720 h..... 42

Tabla 5. Relaciones H/E* y H³/E*² de los recubrimientos obtenidos..... 47

Tabla 6. Porcentajes de viabilidad de células Saos-2 cultivadas sobre el sustrato y los recubrimientos obtenidos..... 48

Tabla 7. Diámetros de los halos en mm para Ti6Al4V, TM, 10TiO₂-Ag, Control de no inhibición y Antibiótico ciprofloxacina.....52

RESUMEN

El desarrollo de superficies idóneas para el uso de implantes metálicos y dispositivos de estabilización ósea requieren de la consideración de aspectos como la formación de biofilms bacterianos en la superficie de éstos y por ende, el desarrollo de infecciones o el rechazo como tal de los dispositivos. Por otro lado, el sobre crecimiento de material óseo alrededor de estos dispositivos constituye una barrera a la hora de removerlos en el momento en que la función de éstos se cumplió. Debido a esto se propone el desarrollo de recubrimientos antibacteriales multicapa sobre sustratos de Ti6Al4V por medio de la técnica de Magnetron Sputtering para su potencial uso en implantes no permanentes. Para ello se propuso enmarcar el proyecto en la formación de una tesis de maestría en la que diseñó y caracterizó recubrimientos multicapa según sus propiedades microestructurales, la adhesión del sistema multicapa sobre los sustratos, la de células óseas sobre los recubrimientos y los efectos antibacteriales dentro de los límites citotóxicos del cuerpo humano.

ABSTRACT

The development of ideal surfaces to be used in metal implants and osseous stabilization devices require the consideration of different phenomena such as the formation of a bacterial biofilm on the surface followed by the usual appearance of infections or the total rejection of the device. On the other hand, the overgrowth of bone material around these devices constitutes a barrier when it comes to removing them when their function has been fulfilled. Due to this, the development of multilayer antibacterial coatings on Ti6Al4V substrates by means of the Magnetron Sputtering technique for its potential use in non-permanent implants is suggested. Therefore, it is proposed to frame the project within the formation of a master's thesis in which multilayer coatings will be designed and characterized according to their microstructural properties, the adhesion of the multilayer system on the substrates, that of bone cells on the coatings and the antibacterial effects within the cytotoxic limits of the human body.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso y la remoción de implantes ortopédicos es un procedimiento rutinario en el tratamiento de traumas como fracturas y protocolos de estabilización ósea, éstos incluyen el uso de implantes de carácter temporal, es decir, una vez ha propiciado una adecuada reparación ósea, se deben extraer del sitio quirúrgico; sin embargo, se presentan inconvenientes asociados a dicha remoción hasta en el 10% de los pacientes, complicaciones tales como sangrado excesivo, introducción de residuos o partículas exógenas, daño a tejidos y nervios circundantes, retardo en la consolidación, mal alineamiento, acortamiento de extremidades, síndrome compartimental e incluso el desarrollo de infecciones bacterianas [1].

Esto se debe en parte al sobre crecimiento de tejido óseo en la superficie del implante lo que dificulta su remoción. Esta alta afinidad es resultado de la usual presencia de micro rugosidades y tratamientos superficiales favorables para el anclaje de células óseas [2]–[4]. Así pues, existe un interés elevado en desarrollar implantes temporales que presenten una afinidad reducida hacia células osteogénicas con respecto a superficies de implantes de uso prolongado y, a su vez, presentando suficiente actividad antibacteriana durante la fijación en el hueso por medio de la modulación de las propiedades superficiales de recubrimientos depositados por medio de pulverización catódica reactiva por magnetron, técnica también conocido como magnetron sputtering [5].

Por otro lado, se ha explorado la incorporación de plata (Ag) en dispositivos terapéuticos multicapa, demostrando una alta capacidad bactericida de amplio espectro y reducida migración de iones hacia el medio, pero también con elevados niveles de proliferación de células óseas en miras hacia una completa osteointegración [6]–[8].

Con respecto a los diferentes recubrimientos cuyo uso ha sido propuesto en dispositivos terapéuticos permanentes y no permanentes, se puede resaltar el óxido de titanio por su alto potencial asociado a su biocompatibilidad [9]–[11]. Por esto, la adhesión ósea sobre el implante es, ocasionalmente, muy favorable, permitiendo un adecuado proceso de osteointegración. Esto es ideal para dispositivos que permanecen de manera indefinida en contacto con el hueso, sin embargo, no lo es para dispositivos de tipo temporal, pues durante el proceso de remoción se pueden generar traumatismos añadidos [1].

En consecuencia, se percibe la oportunidad de utilizar una aproximación similar a los sistemas multicapa anteriormente mencionados, haciendo uso de óxidos modificados superficialmente y con la inclusión de fases alternadas de Ag por medio de la técnica de Magnetron Sputtering, lo cual resultaría en una reducida adhesión ósea que facilite el proceso de eventual remoción en implantes temporales sin comprometer la resistencia a la formación de biofilms bacterianos [12].

Así pues, se plantea la siguiente hipótesis: Es posible la obtención y caracterización de recubrimientos multicapa con propiedades antibacteriales sobre aleaciones de Ti6Al4V a través del depósito de 10 y 15 bicapas de TiO₂/Ag con adhesión de células reducida en miras a su uso potencial en implantes no permanentes

2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

2.1. Uso de implantes metálicos

En un contexto nacional se han realizado variados estudios relacionados con la incidencia de infecciones de sitio operatorio, por ejemplo, A. Martínez et al. estudió la rehabilitación de 37 pacientes con diagnóstico de fractura expuesta de la diáfisis de la tibia. El tratamiento requerido en el 45% de pacientes fue la inclusión de dispositivos de estabilización como clavos intramedulares, placas metálicas de compresión, soportes de fijación externa o una combinación de estos, donde se encontró una prevalencia de infecciones en el 7.4% de casos, estas infecciones se debieron a una ausencia de unión o baja osteointegración. La presencia de infecciones fue la principal causante de nuevas intervenciones quirúrgicas, la cual aumentó la estancia promedio de internado clínico a 23 días, esto comparado con 4 días para pacientes con una única intervención. Dos casos resultaron en deceso asociado a infección [13].

En lo que respecta al desarrollo de infecciones de sitio operatorio en fracturas cerradas, el estudio realizado por D.F. Rincón-Cardozo et al. en la Universidad Industrial de Santander, Colombia, analizó una muestra de 256 individuos donde el 6.6% desarrollaron complicaciones bacterianas. De manera más detallada, 102 registros afectaron los miembros superiores, el cual presentó una prevalencia de

infección del 3.9%, mientras que 154 casos se reportaron en miembros inferiores, con una tasa de infección del 8.4%. Estos sitios quirúrgicos incluyen placas, tornillos, clavos, entre otros y los huesos más afectados fueron el fémur (21.9%) y el radio (20.7%) [14].

En un contexto internacional, el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) estima que cada año se tratan 290.000 casos de infección tan solo en los Estados Unidos, donde al rededor del 22% de estas son infecciones de sitio operatorio. Infortunadamente esta incidencia tiene una tendencia creciente debido al aumento de factores de riesgo, como obesidad, diabetes, tabaquismo, alcoholismo, nutrición deficiente y el preocupante aumento de cepas bacterianas resistentes a antibióticos tradicionales, siendo de especial importancia las cepas de estafilococo aureus resistentes a la meticilina y las cepas de enterococos resistentes a la vancomicina. La prevalencia de estas infecciones resulta en un gasto aproximado entre 1.000 y 10.000 millones de dólares en costos directos e indirectos [15].

Otro tema de profunda discusión y disertación en el ámbito médico está relacionado con la pertinencia o no de intervenir a los pacientes en una segunda instancia para remover los implantes una vez se ha estabilizado la zona quirúrgica; en términos generales se intenta evitar dichas reintervenciones. A pesar de que los beneficios pueden ser atractivos para la calidad de vida, como la reducción de dolor y mejoría funcional de locomoción, estos procedimientos suelen ser complicados y suelen resultar en daños neurovasculares en la zona circundante o incluso la nueva generación de fracturas. Estos temores se originan en el temprano desarrollo de implantes durante la Segunda Guerra Mundial, donde las aleaciones más utilizadas incluían acero inoxidable con elementos como níquel, cromo y molibdeno, aleaciones que con el tiempo se corroían, resultando en la migración de iones hacia el medio biológico, generando reacciones inflamatorias en los tejidos, muchas veces con respuestas necróticas.

Posteriormente se introdujo la nueva generación de materiales para fabricación de implantes, éstas son aleaciones de titanio, aluminio y niobio (TAN; Synthes®) y titanio, aluminio y vanadio (Stryker®) con una biocompatibilidad muy superior a las aleaciones mencionadas anteriormente. Sin embargo, en muchos casos se presenta un sobre crecimiento óseo alrededor del implante, lo que dificulta su remoción. Es por esto que varios miembros del cuerpo médico internacional sugieren limitar estas intervenciones en casos no críticos, específicamente se remarca la importancia de no

remover un dispositivo de este tipo si el paciente se encuentra asintomático de complicaciones asociadas a infecciones del sitio quirúrgico [16]. Para ilustrar este punto, un estudio retrospectivo realizado por F.M. Kovar entre los años 1992 y 2008, analizó los casos de 371 pacientes con fracturas de fémur proximal y la posterior remoción de los dispositivos de estabilización. La población se dividió en un primer grupo, cuyo proceso de remoción estaba recomendado por razones médicas para 299 individuos y un segundo grupo cuya remoción no estaba sustentada por factores críticos sino por el deseo del paciente de someterse al procedimiento. Este último grupo presentó una incidencia de complicaciones mayor al grupo cuya intervención era mandatoria (28% comparado con 11.46%) [17].

2.2. Oseointegración y biocompatibilidad en implantes metálicos

En el momento en que un objeto exógeno entra en contacto con el medio biológico del cuerpo, se genera una reacción inmediata en la cual las células del sistema inmune intentan colonizar la nueva superficie para contrarrestar la acumulación de microorganismos patógenos y en consecuencia, la formación de un biofilm que inhiba las funciones biológicas y se genere un rechazo del dispositivo. A este proceso se le conoce como osteointegración [18] y se determina como un proceso exitoso por medio de indicativos relacionados con la funcionalidad final del hueso, la fisiología del tejido circundante y la ausencia de dolor o incomodidad asociado al implante [19].

Existen diferentes acercamientos para reducir la tendencia a formar un biofilm bacteriano en la superficie de los implantes, todos buscando la formación de un ambiente local favorable para la acumulación de proteínas y la formación de una matriz extracelular para el crecimiento de osteoblastos, fibroblastos, entre otros. La adecuada esterilización del espacio y los implementos durante el procedimiento de implante o remoción, la aplicación de ciclos de antibióticos de corta y elongada duración y la modificación de la superficie y composición de los implantes son ejemplos de prevención frente a infecciones relacionadas al procedimiento médico [6], [8].

En mayor detalle, la interfaz entre el hueso y la superficie del material es altamente heterogénea y se compone de áreas mineralizadas, parcialmente mineralizadas y zonas que no presentan mineralización. Dicha distribución es determinada por las interacciones físicas y químicas que presente el implante.

El material más ampliamente usado para este tipo de aplicaciones es el titanio junto con sus óxidos (TiO_2) y aleaciones (Ti6Al4V) debido a sus excelentes propiedades mecánicas, buena resistencia a la corrosión y al desgaste y una biocompatibilidad adecuada [20]. Al exponerse al aire, el titanio forma en su superficie una delgada capa de óxido de 5-10 nm de espesor que bloquea la migración de especies reactivas o iónicas y aumenta la resistencia al desgaste. Adicionalmente, por encima del punto isoeléctrico, el TiO_2 tiende a reducirse en especies Ti-O^- , resultando en la atracción de iones corporales como Ca^{2+} y PO_4^{3-} en los planos cristalográficos (001) y (100) del rutilo, la forma cristalina más común del TiO_2 , en consecuencia, se inicia el crecimiento de una fase inestable de fosfato de calcio (CaP) que, al cristalizarse, genera una estructura similar a la apatita formada de manera natural en el hueso [21]. Por otro lado, los factores que mayor influencia tienen con respecto a la formación de un biofilm bacteriano son la rugosidad, textura y humectabilidad (o mojabilidad) del material. En esta última es generalmente aceptada la búsqueda y desarrollo de superficies hidrofílicas, sin embargo, existe evidencia conflictiva, pues ciertos tratamientos superficiales han resultado en materiales hidrofóbicos con elevado potencial de crecimiento óseo [22].

2.3. Recubrimientos y tratamientos superficiales sobre Ti6Al4V

En la búsqueda de crear un ambiente favorable para el anclaje y la proliferación de células óseas en la superficie de los implantes de Ti6Al4V , numerosas aproximaciones se han diseñado para este fin, desde el desgaste químico o físico de la superficie buscando modificar la rugosidad y mojabilidad, técnicas como maquinado, micro-maquinado, pulido por arenado (sandblasting), grabado al ácido, oxidación anódica y aspersion térmica a plasma han sido ampliamente exploradas, así como la inclusión de capas, estructuras o dopantes intermedios que aporten al comportamiento biológico, como agentes antibacterianos, sistemas de liberación controlada de antibióticos, mejoras frente a la resistencia a la corrosión, entre otras [23].

Liwen Lin et al. utilizó técnicas de fácil acceso para construir variadas topografías de TiO_2 en implantes de Ti, estas incluyen estructuras nanotubulares, en forma de nano-esponjas y estructuras en forma de nano/micro nidos, posteriormente se caracterizaron sus propiedades físicas y se evaluó el comportamiento biológico por medio de

histología y tests de torque de remoción en ensayos in vivo. La estructura nanotubular se generó por medio de anodización electroquímica en una solución de ácido fluorhídrico 0.5% y un potencial de 20 V, la estructura en forma de esponja se preparó en las mismas condiciones mencionadas anteriormente, pero con un voltaje de 50 V, mientras que la estructura de nano/micro nidos se fabricó por medio de un tratamiento hidrotermal con NaOH 10M a 150 °C.

Estos tratamientos aumentaron significativamente tanto la rugosidad como el área superficial específica, obteniendo los mayores valores en la técnica de tratamiento hidrotermal. De forma similar, los implantes obtenidos por esta técnica presentaron la mejor integración en la interfaz hueso - implante [24].

Otro fenómeno importante en el diseño de un implante es la consideración de la transferencia de cargas asociada a la diferencia que hay entre las propiedades mecánicas del dispositivo y el tejido óseo, refiriéndose específicamente al módulo de Young, este fenómeno también se conoce como “*stress shielding*”. En la medida en que estos módulos se alejan el uno del otro, aumenta la posibilidad de desarrollar osteopenias, más conocidas como atrofiás óseas, las cuales resultan en pobres fijaciones de los dispositivos sobre el hueso y puede acarrear nuevas fracturas del mismo. Así pues, los módulos de Young de las aleaciones de mayor uso comercial en implantes de acero inoxidable (SUS316L) y de cobalto - cromo son de aproximadamente 180 GPa y 210 GPa respectivamente. En contraste, las aleaciones de titanio generalmente presentan módulos significativamente menores, tal como lo es en la aleación de Ti-6Al-4V ELI que presenta un módulo cercano a 110 GPa. Esto presenta una mejoría, sin embargo, sigue siendo muy superior al módulo del tejido óseo, el cual varía entre 10-30 GPa. Para ello se ha estudiado el efecto de la presencia de fases α , fases β , o una mezcla de ambas en el titanio y sus aleaciones; las fases α tienen una configuración cristalina de red hexagonal compacta (HCP) y es estable hasta los 882 °C, por encima de esta temperatura se genera un cambio hacia una estructura cúbica centrada en el cuerpo (BCC). Sin embargo, esta fase se puede observar a temperatura ambiente en aleaciones $\alpha+\beta$, β metaestables y β estables por medio de la inclusión de elementos en soluciones sólidas como el Mo, V, Nb, Ta, Fe, W, Cr, Si, Ni, Co, Mn, H y Zr, mientras que los aleantes que resultan en fases α son Al, O, N, C [3].

G. Bhardwaj et al. propuso el desarrollo de dos recubrimientos con propiedades antibacteriales y una mejor adhesión de osteoblastos asociada a la modificación de

una superficie de óxido de titanio por medio de la técnica de deposición electroforética. Las superficies con formulación codificada T-160 y T-120 mostraron una reducción del crecimiento de *Staphylococcus aureus* (patógeno gram-positivo) en un 95.6%, en un 90.2% de *Pseudomonas aeruginosa* (patógeno gram-negativo) y en un 81.1% de cepas de *Escherichia coli* resistentes a la meticilina comparados con la superficie de óxido de titanio sin tratamientos. En contraste, la estructura resultante en la superficie T-120 obtuvo una reducción de crecimiento de los patógenos anteriormente mencionados en un 86.8%, 82.1% y 48.6% respectivamente, sin embargo, ésta fomentó un aumento del crecimiento de osteoblastos al tercer día en un 120.7% y de 168.7% al quinto día comparado con la superficie inicial sin modificación [2]. Este estudio remarca la importancia de evaluar la mayor variedad posible de patógenos, o por lo menos, sus grupos más distintivos como lo son bacterias gram-positivas, gram-negativas y cepas resistentes a medicamentos antibacteriales de uso general, pues todas estas se encuentran con frecuencia en la vecindad de los sitios quirúrgicos y tienen una alta probabilidad de invadir y colonizar las heridas abiertas que facilitan su ingreso al cuerpo.

Sistemas de recubrimientos más complejos que involucran la presencia de estructuras claramente diferenciadas y propiedades características, ya sean propiedades del titanio y sus óxidos o la inclusión de fases distintas como nitruros o carburos representan otro foco importante de estudio en estos dispositivos. C-M. Han et al. crearon estructuras jerárquicas de TiO_2 sobre superficies de titanio para mejorar la compatibilidad del dispositivo en el medio biológico. Por medio de una combinación de técnicas de oxidación por micro-arco (MAO), evaporación por haz de electrones (e-beam) y oxidación anódica (AO) se generaron estructuras porosas con diferentes magnitudes, desde poros en la micro escala de 0.5-2 μm hasta la generación de nano poros uniformes de ~ 70 nm al interior de la microestructura porosa. Éste sistema presentó un comportamiento hidrofílico considerablemente superior a la superficie densa y sin tratamientos ($55.9 \pm 0.7^\circ$, $36.2 \pm 1.5^\circ$ y $17.1 \pm 2.3^\circ$ para la superficie inicial, MAO y AO respectivamente), adicionalmente se observó una mejoría in vitro, no solo en la colonización de osteoblastos sobre la superficie sino también en la rapidez de diferenciación de éstas células para construir la matriz extracelular que facilita la osteointegración de los implantes sobre la superficie ósea [20].

Otro tipo de estructuras obtenidas por medio de la técnica de anodizado sobre sustratos de titanio son superficies cubiertas de nanotubos, cuyo diámetro y longitud depende del tiempo de tratamiento y el voltaje aplicado. En este sentido, A.

Rajyalakshmi et al. generó estructuras tubulares de titanio con diámetros de 40-50 nm y 60-70 nm por medio de anodizado con ácido fluorhídrico y voltajes de 10, 15 y 20V. En este estudio se describió el crecimiento de macrófagos sobre las distintas formulaciones, obteniendo una menor adhesión de estos en las superficies tubulares. Se concluye adicionalmente que éste fenómeno puede ser o no atractivo dependiendo del tipo de aplicación biomédica específica [4].

Al interior del grupo de investigación “Centro de Investigación, Innovación y Desarrollo de Materiales” CIDEMAT de la Universidad de Antioquia se han estudiado estos sistemas y, en consecuencia, se han desarrollado variados sistemas. En particular, J. A. Lenis et al. estudió el efecto de la variación de los parámetros de procesado en la técnica de magnetron sputtering por radiofrecuencia como la temperatura de deposición y la distancia entre el sustrato y el blanco sobre la microestructura, las fases cristalinas y las propiedades mecánicas y tribológicas de sistemas multicapa compuestos de hidroxiapatita y plata donde las mejores propiedades se obtuvieron a 200 °C y a una distancia de 4 cm del blanco. (Lenis, Gómez, et al., 2019) En un segundo estudio se incluyó una capa intermedia de nitruro de titanio y titanio (TiN-Ti) entre un sustrato de aleación de titanio Ti6Al4V y el sistema multicapa de hidroxiapatita y plata anteriormente descrito. Con esta estructura adicional se logró aumentar la cristalinidad del sistema multicapa en un 7%, una reducción de los esfuerzos residuales del 36% y una mejoría en la adhesión del sistema en un 32% comparado con el sistema multicapa inicial y además se encontró una ausencia de citotoxicidad asociada a la liberación controlada de iones de plata en el medio biológico. (Lenis, Bejarano, et al., 2019) Por último, en un tercer estudio se adicionó una capa intermedia adicional de dióxido de silicio entre el sistema multicapa de hidroxiapatita y plata y la capa de TiN-Ti. En éste se encontró un aumento del 84% en la adhesión comparado con el sistema multicapa por sí solo, una cristalinidad de la hidroxiapatita similar al sistema de hidroxiapatita, plata y TiN-Ti, al igual que una reducida proliferación de cepas de *Staphylococcus aureus* a bajas concentraciones de plata (<0.25 mg/L). Adicionalmente se observó nuevamente la ausencia de efectos citotóxicos sobre las células óseas durante los ensayos de crecimiento y diferenciación celular in vitro [25].

Con base en los sistemas y arquitecturas estudiadas recientemente, tanto al interior de la Universidad de Antioquia, como a nivel nacional e internacional se puede expandir el alcance de éstos hacia aplicaciones biomédicas de corto y mediano plazo y

proponer sistemas novedosos y explorar las diferentes propiedades que rigen el proceso de osteointegración.

2.4. Magnetron sputtering como técnica de fabricación de recubrimientos

Numerosas aproximaciones hacia la síntesis y preparación de recubrimientos compuestos para aplicaciones biomédicas han sido estudiadas, desde técnicas como spin-coating, sol-gel y otros métodos foto-químicos, biológicos y físicos como lo son la ablación por láser, haz de fase gaseosa y magnetron sputtering. Ésta última técnica ha alcanzado una buena madurez en el sentido de uso a escala industrial para el depósito de recubrimientos duros con un alto control microestructural. Consiste en una cámara con atmósfera controlada en la que un gas (típicamente argón) es inyectado y posteriormente ionizado por medio de fuertes campos electromagnéticos, estos iones bombardean el target o blanco, desprendiendo átomos o moléculas que eventualmente se depositan sobre un sustrato, generando un recubrimiento. Dependiendo de la complejidad del equipo, puede haber más de un target, se pueden alcanzar mayores vacíos o pueden ser aplicados los campos electromagnéticos en diferentes modos en corriente directa, ya sean frecuencias de radio o de microondas, o en modos pulsados dependiendo de la naturaleza de los materiales usados o de la microestructura final deseada. Otros parámetros clave de control de las superficies son la temperatura del sustrato, la relación gaseosa y sus presiones relativas en caso de que haya más de un gas de arrastre, ya sea porque se desean incluir fases cerámicas, como óxidos o nitruros, el tiempo y la tasa de deposición, la velocidad de giro de los porta sustratos y la distancia entre estos y los blancos, entre otros [26].

Como consecuencia del paulatino desarrollo y optimización de esta técnica, estudios recientes han asociado cambios micro-nano estructurales en las superficies por medio de la variación de los parámetros mencionados anteriormente y el método de pulverizado. En general, se desea minimizar la generación de productos en la superficie del blanco metálico, proceso conocido como “envenenamiento”, resultado del uso de una alta potencia específica (W/cm^2) en los blancos. Sin embargo, se debe alcanzar una potencia mínima en la cual se produzca una tasa de deposición adecuada asociada a la densidad del plasma. Makówka et al. determinaron la técnica de magnetron sputtering reactiva como un proceso superior para la obtención eficiente de recubrimientos densos y cristalinos comparado con otras variantes de pulverizado,

como lo es la técnica de magnetron sputtering por gas inyectado GIMS por sus siglas en inglés [27].

Por otro lado, Suárez et al. estudiaron la influencia de la presión y el tiempo de deposición en procesos de magnetron sputtering por radiofrecuencia (RFMS), asociando una influencia directamente proporcional sobre características superficiales como el espesor, la cristalinidad, dureza y rugosidad de los recubrimientos. Esto es, a mayor presión de depósito se obtuvieron recubrimientos más rugosos y con mayor presencia de la fase anatasa, indicando una mayor cristalinidad. Igualmente se encontró que espesores delgados (<110 nm) y presiones entre 0.8 y 1.0 Pa favorecen una mejor adhesión del recubrimiento sobre el sustrato [28].

2.5. Propiedades antibacteriales de la plata (Ag)

Existen tres principales aproximaciones para favorecer la prevención y tratamiento de crecimientos patógenos sobre implantes: superficies antiadherentes, superficies bactericidas por contacto y superficies bactericidas por liberación [29]. La última aproximación se caracteriza por la inclusión de elementos que por sus características fisicoquímicas presentan actividad bactericida como el cobre (Cu) o la plata (Ag), siendo más común el uso de la plata debido a su menor tendencia a formar óxidos. Las ventajas de dicha inclusión es la entrega inmediata de iones antibacteriales con bajos efectos adversos a la interfaz superficie-tejido humano [23], [30]. En mayor detalle, el mecanismo asociado con la actividad antibacteriana de la plata se puede dividir en dos aspectos, el primero se asocia a la presencia de iones Ag^+ , los cuales al entrar en contacto con bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, desencadenan una serie de interrupciones críticas en el funcionamiento de la especie, lo cual resulta en la inhibición de su proliferación; esto incluye el bloqueo de los canales de la membrana celular, desnaturalización de ribosomas, interrupción de la producción de ATP, generación de especies reactivas de oxígeno que impiden el transporte celular e interferencias en la replicación del ADN. En una segunda instancia, si el medio contiene plata nanoestructurada en forma de nanopartículas, éstas no sólo favorecen el proceso de desnaturalización de la membrana celular, sino que también la pueden directamente perforar, induciendo el deceso bacteriano [31]. Los dos factores críticos son el conteo y control de la migración excesiva de iones, la cual puede generar muerte celular no deseada, dado que estos iones en suficiente cantidad suprimen el transporte de material a través de la membrana celular [32]. El

segundo factor es la interacción al existir contacto directo entre las nanopartículas o el continuo de plata con las células óseas, que afecta de igual manera la viabilidad biológica de los recubrimientos [33].

Cabe destacar que la inclusión de plata en recubrimientos a base de titanio fabricados por magnetron sputtering afecta el mecanismo de crecimiento y las propiedades superficiales, como la rugosidad, mojabilidad y cristalinidad [34], en mayor detalle, la típica estructura columnar pasa a ser una estructura más desordenada, a veces exhibiendo superficies de tipo “coliflor” [35] o con micro y nano poros con aglomeraciones localizadas de Ag [36].

2.6. Generalidades del TiO₂

Durante el proceso de revisión bibliográfica, a través de las ecuaciones de búsqueda “TITLE-ABS-KEY (Multilayer AND Coating AND (Bio OR Biomedical OR Implant OR Medical))” y “TITLE-ABS-KEY (Multilayer AND Coating AND (Titanium OR Ti OR TiO₂) AND (Bio OR Biomedical OR Implant OR Medical))”, cuyos resultados se presentan en la Figura 1, se encontró un aumento considerable del número de estudios anuales relacionados con recubrimientos multicapa en aplicaciones biomédicas realizados a partir del año 2006, esto se evidencia en la Figura 1-a. Este crecimiento se mantiene y presenta un comportamiento similar al desarrollo de recubrimientos que incluyen en su formulación el uso de titanio tal y como se observa en la Figura 1-b. La revisión se realizó utilizando Scopus durante el último cuarto del año 2023.

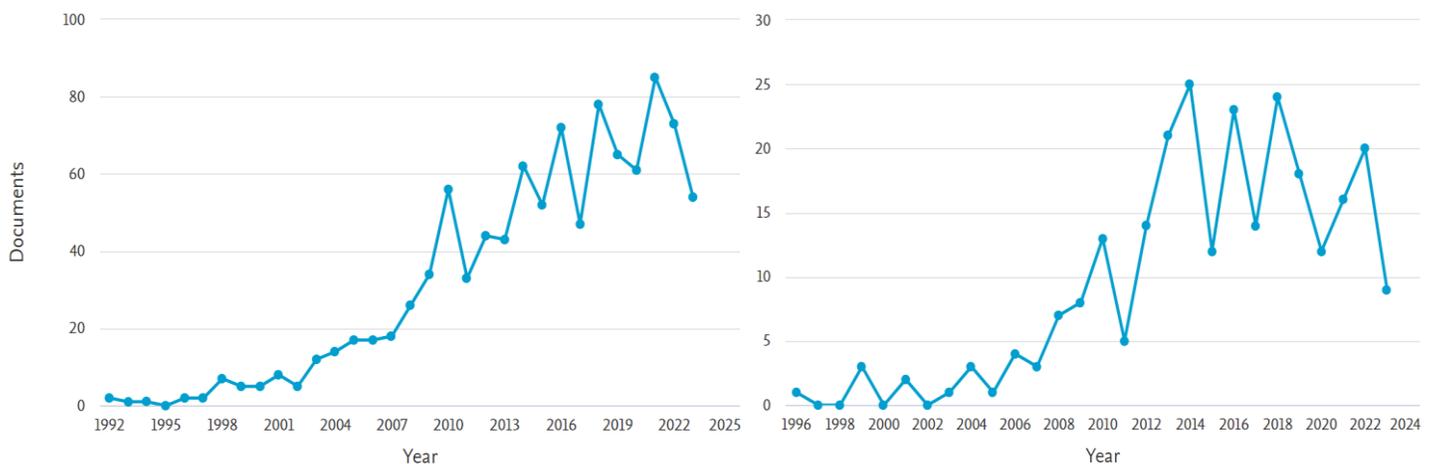


Figura 1. (a-izq.) Historial de estudios de recubrimientos multicapa para aplicaciones biomédicas. (b-der.) Estudios que además incluyen el uso de titanio en los sistemas multicapa.

En este sentido se remarca la importancia de la innovación y desarrollo en el área de recubrimientos con propiedades antibacteriales y alta biocompatibilidad para ser aplicados en los campos mencionados anteriormente. En mayor detalle se propone el desarrollo de recubrimientos multicapa antibacteriales sobre superficies comerciales de aleaciones de titanio a base de plata y óxidos de titanio por medio de la técnica de magnetron sputtering para ser potencialmente aplicados en implantes no permanentes. Para ello es importante tener en cuenta los parámetros clave de funcionamiento de la cámara del magnetron, la arquitectura del sistema, la adhesión y microestructura objetivo y los efectos antibacteriales dentro de los límites citotóxicos del cuerpo humano.

3. OBJETIVOS

Los objetivos encaminados al desarrollo de la investigación se pueden separar en una sección enfocada a la obtención y caracterización de las monocapas, y una vez determinados los parámetros de fabricación de los sistemas multicapa se procedió a la fabricación de dichos sistemas y su posterior caracterización:

3.1 Objetivo general

- Desarrollar recubrimientos multicapa con propiedades antibacteriales de TiO_2 -Ag sobre sustratos de Ti6Al4V mediante magnetrón sputtering para potencial aplicación en implantes no permanentes con adhesión reducida.

3.2 Objetivos específicos

- Diseñar la arquitectura de los recubrimientos multicapa TiO_2 -Ag sobre sustratos de Ti6Al4V mediante magnetrón sputtering.
- Establecer los parámetros de las monocapas de TiO_2 variando el tiempo de recubrimiento y relación gaseosa para modular las propiedades superficiales finales.
- Determinar las propiedades físicas y químicas de las monocapas obtenidas para establecer los parámetros de depósito de los sistemas multicapa.
- Obtener los sistemas multicapa de TiO_2 -Ag a partir de los parámetros obtenidos previamente.
- Determinar la microestructura, morfología y las propiedades mecánicas y biotribológicas de los sistemas multicapas obtenidos.
- Evaluar las propiedades biológicas de los sistemas multicapa y las propiedades antibacteriales asociadas a la presencia de plata.

4. EXPERIMENTACIÓN

4.1. Preparación de sustratos

Se pulieron sustratos de aleación de titanio de grado 5 biomédico, también conocidos como Ti6Al4V, en forma de monedas de 1 pulgada de diámetro utilizando papel de lija de SiC de granos 120, 240, 320, 600, 1000 y 1500. Luego, se aplicó paño a todos los sustratos hasta obtener una superficie tipo espejo con polvo de alúmina de 1 μm y 0.05 μm .

Cada grupo de sustratos fue sumergido en un baño ultrasónico (60 Hz, Intertek CD-4800) durante 15 minutos en una solución de etanol-acetona 3:1 para desprender los residuos adheridos, seguido de un bombardeo con iones de argón dentro de la cámara de vacío a 200 °C para eliminar cualquier contaminante restante, la cual se mantuvo a esta temperatura durante todo el proceso de deposición.

Con el fin de establecer los parámetros de las monocapas de TiO_2 para evaluar el efecto que tienen éstos sobre las propiedades superficiales finales, y teniendo en cuenta un espesor final objetivo cercano a 1 μm para los sistemas multicapa, se seleccionaron 3 grados de pulido, utilizando lijas 600, 1000 y 1500, y 2 relaciones gaseosas $\text{Ar}:\text{O}_2$, 2:1 y 3:1. Así pues, se determinaron 6 tratamientos superficiales, cada uno con un tiempo de depósito de 120, 90 y 60 mins, donde los ensayos E1-E3 corresponden a las monocapas obtenidas en una atmósfera $\text{Ar}:\text{O}_2$ 2:1, depositados por 120 mins (E1), 90 mins (E2) y 60 mins (E3), mientras que las monocapas obtenidas con una relación $\text{Ar}:\text{O}_2$ 3:1 durante 120, 90 y 60 mins corresponden a los ensayos E4, E5 y E6 respectivamente. Adicionalmente, en las secciones siguientes, se asociará a cada ensayo (E1-E6) el grado de pulido de interés de acuerdo a la necesidad, esto es, E1-600, E2-1000, E3-1500, etc.

4.2. Caracterización de sistemas monocapa de TiO_2

Para identificar la naturaleza química de los recubrimientos obtenidos se realizaron mediciones micro-Raman a través de un equipo Horiba Yovinybon,

modelo Labram HR en un rango entre 100 y 1000 cm^{-1} con un láser He-Ne de 633 nm, 17 mW para observar las vibraciones características de los enlaces Ti-O esperados.

Para observar la morfología de los recubrimientos obtenidos se empleó un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6490LVTM a 20 kV.

Se utilizó un perfilómetro BRUKER DEKTAK-XT DXT equipado con un lápiz tipo B-ASM, radio de 2 μm y una carga de 30 mN para medir el espesor del recubrimiento mediante una medición escalonada de recubrimiento-no recubierto, también se calculó la rugosidad promedio (R_a) mediante un barrido lineal de 2000 μm . Cada medida se replicó tres veces para cada grupo.

Finalmente, las mediciones del ángulo de contacto (C.A.) se realizaron utilizando el método de la gota sésil en un goniómetro/tensiómetro estándar Ramé-Hart Modelo 250 con gotas de agua destilada de 4 μL . Todas las muestras se almacenaron en la oscuridad durante al menos 24 horas antes de las mediciones para reducir el efecto de la fotoactividad de la anatasa. La energía superficial se calculó mediante la ecuación de Newman [24]:

$$\cos \theta = 2 \left(\frac{\gamma_S}{\gamma_L} \right)^{0.5} \exp[-\beta(\gamma_L - \gamma_S)^2] - 1 \quad (1)$$

Donde θ es el ángulo de contacto medido, $\gamma_L = 72.8 \text{ mJ/m}^2$ y $\beta=0.0001247 \text{ m}^2/\text{mJ}$. Se aplicó iteración numérica para resolver la ecuación.

4.3. Obtención y caracterización de sistemas multicapa de TiO_2 -Ag

Los sustratos metálicos fueron recubiertos en una cámara de vacío de fabricación propia (CIDEMAT) con dimensiones de 700 x 700 x 800 mm^3 utilizando blancos de Ti y Ag de alta pureza (99,95%) y de dimensiones 500 x 100 x 6 mm^3 a potencias de 1,2 kW y 0,02 kW respectivamente con una fuente de CC (MARIS, ADS).

El proceso de recubrimiento fue estático, esto es, el soporte del sustrato se giró para enfrentar los sustratos hacia los blancos en cada capa consecutiva, es decir, no se utilizó una configuración rotacional durante este trabajo.

La Tabla 1 presenta los parámetros de operación de deposición que se determinaron según resultados previos obtenidos por los investigadores de nuestro grupo de investigación [7], [25], [37]–[39]. Se obtuvo una capa de adhesión de titanio para todas las muestras durante 3 minutos con los mismos parámetros de operación que las capas de Ag y ajustando la potencia del objetivo a 1,2 kW y se empleó un voltaje de bias constante de -70 V y la presión base previa a comenzar el proceso de deposición fue de 0,1 Pa.

El tiempo/capa de recubrimiento especificado en la tercera columna de la Tabla 1 corresponde al tiempo que cada muestra enfrentó a los blancos. Los sustratos se cubrieron entre los eventos de rotación para cada capa, ubicándolos hacia el lado opuesto de cada cátodo operativo mientras se ajustaba la potencia del objetivo.

El flujo total de gas (Ar-O₂) se fijó en 50 sccm debido al gran volumen de la cámara, utilizando una mezcla de 33 sccm de Ar y 17 sccm de O₂ para cada capa de TiO₂, mientras que todas las capas de Ag se obtuvieron utilizando un flujo de gas de 50 sccm de Ar. Finalmente, la presión de deposición utilizada en cada capa se estableció en 0,4 ± 0,1 Pa.

Muestra	Potencia (kW)		Tiempo/capa (min)	Tiempo total de deposición (min)	Espesor final (nm)	Distancia hacia el blanco (cm)	T (C°)	P (Pa)	Bias (V)	Relación Ar:O ₂
TM	Ti	1.2	168	168	1285	8	200	0.4	-70	2:1
	Ag	---	---							
10TiO ₂ -Ag	Ti	1.2	10	133	704					
15TiO ₂ -Ag	Ag	0.02	2	193	730					

Tabla 1. Parámetros de deposición para el recubrimiento monocapa de TiO₂ (TM) y sistemas multicapa 10TiO₂/Ag y 15TiO₂/Ag.

De manera complementaria a la caracterización descrita en la sección 4.2, se realizaron medidas SEM/EDS a 20 kV en recubrimientos depositados sobre obleas de silicio para evaluar la composición química elemental de las distintas superficies y evitar señales de Ti no deseadas del sustrato de Ti6Al4V. De manera complementaria, se tomaron imágenes de alta resolución en un microscopio FESEM Thermo Scientific Scios 2® Dual Beam® a 2, 5 y 20 kV sobre cortes transversales para evidenciar la presencia de capas y evaluar la deposición de Ag en los recubrimientos.

Por otro lado, se observó el comportamiento biotribológico de cada sistema, para ello se utilizó un tribómetro de tipo pin-disco con una pista de desgaste de 2 mm de radio, un contracuerpo de alúmina de 4 mm de diámetro y una velocidad rotacional de 50 rpm bajo una carga normal de 1.5 N a 200 ciclos para evaluar el comportamiento temprano y la influencia de la plata en las capas más externas utilizando una solución *buffer* fosfato (PBS) a 37 °C. Luego se utilizó un microscopio Unitron MEC4 para observar las huellas de desgaste después de cada ensayo, todos éstos ensayos se realizaron por triplicado.

El análisis microestructural de los recubrimientos se realizó utilizando un difractómetro de rayos X Rigaku Miniflex 600 equipado con una fuente de Cu, K α con $\lambda = 1.15405$ nm, 45 kV, ángulo de incidencia de 1° y un paso de 0.026°/s en un rango de 2θ entre 10° y 70°.

La dureza y el módulo de Young se calcularon por medio de ensayos de nanoindentación empleando un equipo MTS'a XP System Corporation equipado con una punta de diamante Berkovich a temperatura ambiente. Se procedió según el método de Oliver y Pharr de acuerdo con la norma ASTM E2546 para las curvas de desplazamiento de carga, realizando 8 medidas por muestra. Se realizó un barrido de cargas con el objetivo de limitar la profundidad de penetración a un máximo de 10% del espesor total del recubrimiento.

Se realizó el test de adhesión Daimler-Benz a los sistemas por medio de un ensayo Rockwell-A con una carga de 588.6 N y se observó la huella con un microscopio óptico Unitron MEC4 a un aumento de 100x de acuerdo a las pautas de la norma ISO 26443, posteriormente se le asignó una clase de adhesión entre 0 y 3 de acuerdo al nivel de delaminación y fracturas observadas,

donde las clases 0 y 1 se interpretan como una adhesión adecuada, mientras que las clases 2 y 3 representan una deficiente adhesión del recubrimiento. Cada medida se realizó por duplicado.

La evaluación biológica de los sistemas comprendió ensayos de liberación de plata y ensayos de citotoxicidad, adhesión celular y actividad antibacteriana de la siguiente manera:

Para cuantificar la liberación de iones de plata se sumergieron muestras de $\sim 5 \times 5 \text{ mm}^2$ por duplicado en contenedores tipo Falcon de 50 mL con PBS en una incubadora a 37°C . Posteriormente se tomaron alícuotas de 5 mL, reponiendo la muestra tomada con PBS nuevo bajo agitación a las 6, 24, 72 horas y 7, 14 y 30 días. Finalmente se cuantificó de acuerdo a la norma EPA 3015^a por medio de absorción atómica de masas.

Se determinó la citotoxicidad de los recubrimientos y sustrato sobre células Saos-2, utilizando el método del MTT. Las células fueron sembradas sobre los materiales en platos de cultivo utilizando como medio de cultivo, McCoy's con suero fetal bovino al 10%. Se incubó durante 72 horas a 37°C , 5% CO_2 . Seguidamente se adicionó el MTT y luego de 4 horas de incubación a 37°C , se adicionó DMSO. Finalmente se determinó la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro. Los ensayos se realizaron en dos experimentos independientes, cada uno por duplicado.

Para los ensayos de adhesión celular se sembraron células Saos-2 HTB 85, ATCC, sobre los sustratos de Ti6Al4V, monocapa de TiO_2 (TM) y recubrimientos multicapa en platos de cultivo utilizando como medio de cultivo, McCoy's con suero fetal bovino al 10%. Se incubaron durante 24 horas a 37°C , 5% CO_2 . Se realizó un segundo ensayo a 72 horas con los recubrimientos multicapa. Seguidamente se realizó el proceso de fijación para su observar la adherencia por medio de microscopía SEM.

La actividad antibacteriana se evaluó por medio de la adición de un inóculo bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC®27853TM) (*P. aeruginosa*) y *Staphylococcus aureus* (ATCC®29213TM) (*S. aureus*) en medio de agar LB a 37°C , se homogenizó y se sembraron en cajas de Petri. Seguidamente se ubicaron muestras de Ti6Al4V, TM y $10\text{TiO}_2\text{-Ag}$ en el centro de la caja y se

dejaron en cabina de flujo hasta su gelificación. Se incubó durante 18 horas a 37°C. Como control de no inhibición se utilizó papel filtro y como control de inhibición se empleó un sensidisco de ciprofloxacina, medicamento para el cual las cepas de *P. aeruginosa* y *S. aureus* son sensibles. El ensayo fue realizado por duplicado, en un tiempo experimental.

5. RESULTADOS

5.1. RECUBRIMIENTOS DE MONOCAPAS DE TiO₂

5.1.1. Ensayos de perfilometría

La Figura 2 presenta la rugosidad superficial de sustratos sin recubrimiento y muestras recubiertas con diferentes tiempos de pulverización, empleando una relación de Ar:O₂ de 2:1 a la izquierda y de 3:1 a la derecha. La rugosidad superficial de los sustratos disminuyó a medida que aumentaba el número de grano del papel de lija, obteniendo la menor rugosidad de alrededor de 100 nm en los sustratos pulidos hasta un grano 1500. De igual manera, los sustratos pulidos hasta un número de grano de 600 mostraron una rugosidad ligeramente superior de aproximadamente 125 nm.

Una vez que los sustratos fueron recubiertos, se observó la tendencia opuesta en cada tratamiento a excepción de dos ensayos (E3 y E6), es decir, se observó una tendencia creciente de la rugosidad con grados de pulido más finos en las muestras recubiertas. Por otro lado, los ensayos E3 y E6, que corresponden a los tiempos de recubrimiento más cortos y se muestran como líneas verdes en la Figura 2, revelaron menos irregularidades superficiales a medida que aumentaba la calidad del pulido. Esto se debe en gran medida a un paso intermedio donde el material pulverizado llena progresivamente los pequeños valles del sustrato, resultando en una superficie menos rugosa que la inicial [40].

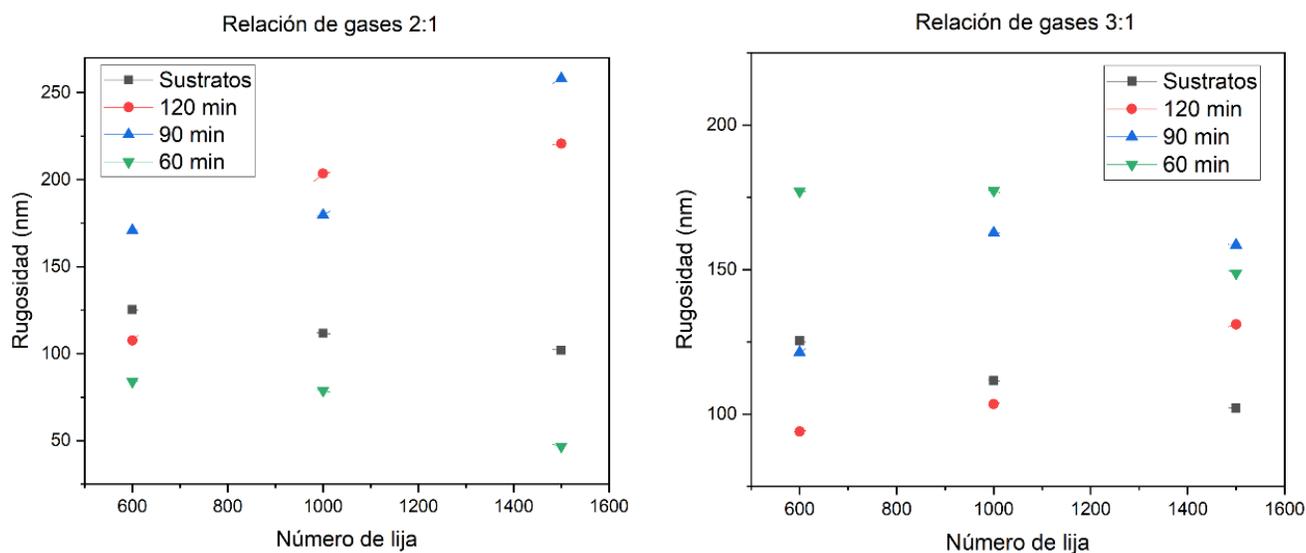


Figura 2. Rugosidad de los sistemas monocapa en dos relaciones gaseosas de Ar:O₂, a la izquierda una relación 2:1, a la derecha una relación 3:1

La Figura 3 ilustra el espesor del recubrimiento obtenido para cada ensayo, en este sentido, todos los recubrimientos obtenidos con una concentración más alta de oxígeno exhibieron una mayor tasa de deposición y resultaron en capas más gruesas a comparación con una relación Ar:O₂ de 3:1. P. Baroch et al. estudiaron el uso de la técnica de *magnetron sputtering* en modo oxidativo, en el cual se observan bajas tasas de deposición (<10 nm/min) como resultado de una primera formación de TiO₂ en la superficie de un blanco metálico de Ti seguido de la posterior pulverización de éste para finalmente depositarse sobre el sustrato, este fenómeno, también llamado envenenamiento de blanco es altamente influenciado por variaciones mínimas en las presiones parciales y totales durante el proceso de depósito [41]. Debido a lo anterior, la reducida variación en las tasas de deposición para la configuración rotacional a 60 minutos de las monocapas (0.84 y 1.15 nm/min para Ar:O₂ 3:1 y 2:1 respectivamente) puede no ser el resultado de la variación en las presiones parciales de oxígeno, sino en una variación general en el control de presión durante la fabricación de los recubrimientos.

A partir de los resultados obtenidos con las mediciones de rugosidad y espesor y de acuerdo al espesor y rugosidad deseadas en los sistemas multicapa de 10

y 15 bicapas, esto es, un espesor cercano a 1 μm y rugosidades menores a 0.2 μm para favorecer el comportamiento biológico de los sistemas [42]–[44] se seleccionó la combinación que resultó en monocapas de 70 nm, esto es, un tiempo de depósito de 60 mins en una relación de Ar:O₂ de 2:1.

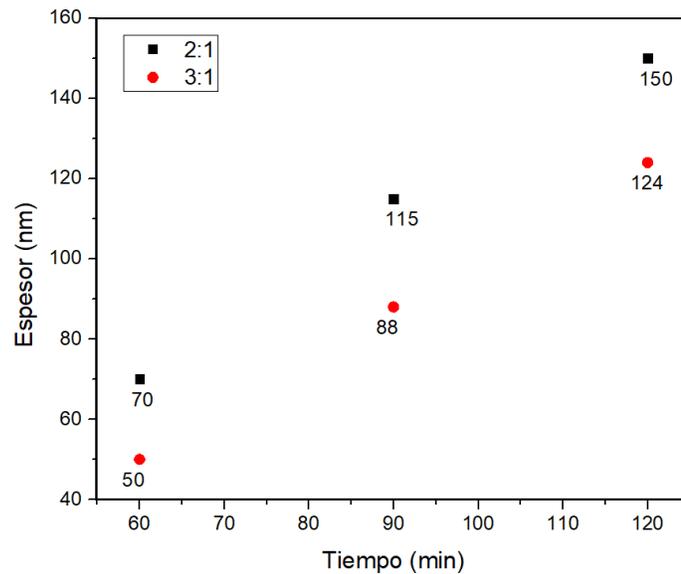


Figura 3. Espesor de los sistemas monocapa utilizando relaciones gaseosas de Ar:O₂ 2:1 y 3:1

5.1.2. Mediciones de mojabilidad

La Figura 4 presenta las mediciones de mojabilidad de cada sistema bajo las mismas relaciones gaseosas de las secciones anteriores. En los sustratos de Ti6Al4V se observa una tendencia creciente en los ángulos de contacto a medida que se aplican grados de pulido más finos. En otras palabras, se puede observar un comportamiento más hidrofóbico a medida que la superficie presentaba menor rugosidad. Sin embargo, una vez que los sustratos fueron sometidos al proceso de recubrimiento, se observó un comportamiento opuesto. Se evidenció una tendencia decreciente en el ángulo de contacto en ambas atmósferas, con la excepción de los sustratos pulidos hasta un grano de 1000 en los ensayos E1 y E2. Esto indica que los recubrimientos depositados bajo tiempos de recubrimiento más largos (120 y 90 minutos) y contenidos de

oxígeno más altos (2:1 Ar:O₂) exhibieron un comportamiento atípico, esto es posible debido a la pobre cristalinidad de la monocapa consolidada bajo estas condiciones. Sin embargo, dado que se desea una superficie moderadamente hidrofílica en los recubrimientos diseñados para ser utilizados en implantes removibles, ya que esto reduce la adhesión tanto de las bacterias como de las células humanas, la combinación más atractiva corresponde a los recubrimientos obtenidos en el ensayo E3. Más específicamente, los sustratos pulidos con papel de lija de grano 1000 exhibieron un comportamiento hidrofóbico con un ángulo de contacto de 96° y una superficie relativamente suave con una rugosidad promedio de 80 nm.

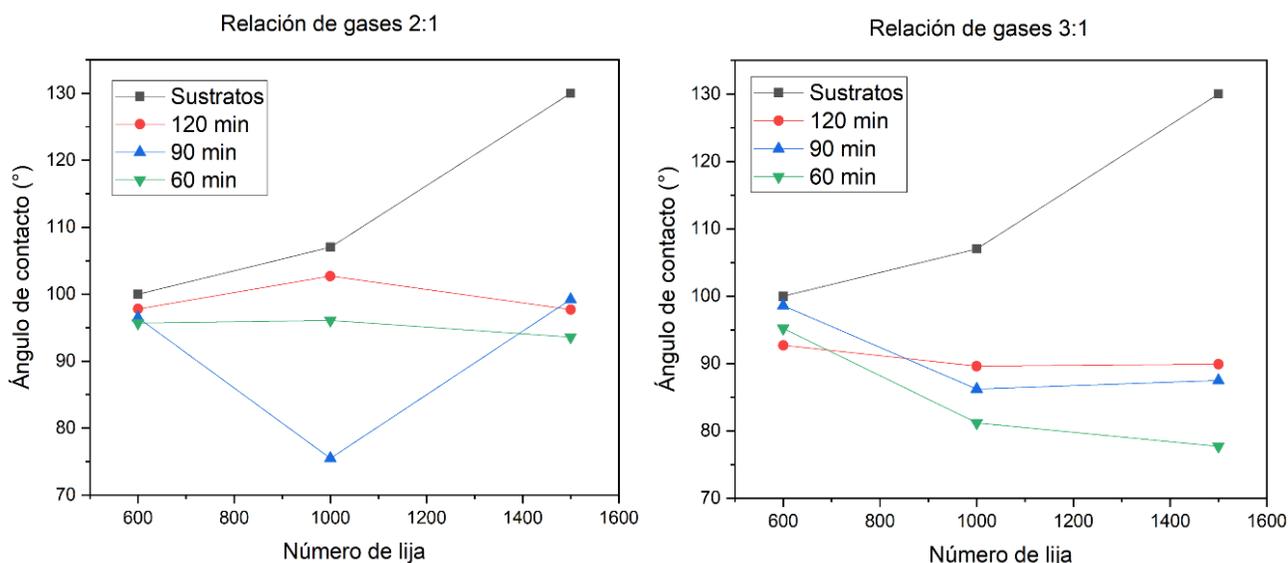


Figura 4. Mediciones de ángulo de contacto para los sustratos de Ti6Al4V y recubrimientos delgados en dos atmósferas, 2:1 y 3:1 (Ar:O₂)

5.1.3. Análisis micro-Raman

La Figura 5 presenta las gráficas de espectrometría Raman para los recubrimientos depositados durante 60 minutos en dos atmósferas, a la izquierda se presenta una relación gaseosa de Ar:O₂ de 2:1, a la derecha se tiene una relación 3:1. Se pueden observar cuatro bandas en 144, 397, 517 y 639 cm⁻¹, que corresponden a los modos vibracionales característicos de la fase cristalina anatasa, éstos son Eg, B1g, A1g + B1g, y Eg respectivamente [28].

De este modo se pudo confirmar que el proceso de pulverización permite la formación de TiO_2 cristalino bajo todas las condiciones experimentales, sin embargo, las bandas más definidas, con picos más angostos y mejores intensidades se observaron en las muestras depositadas en una relación gaseosa de 2:1 y grados de pulido con lijas 1000 y 1500, estas son, E3-1000 y E3-1500. P. Baroch et al. halló un efecto significativo sobre la cristalinidad de los recubrimientos de TiO_2 obtenidos en función de las relaciones $\text{Ar}:\text{O}_2$, donde a una mayor concentración parcial de oxígeno, mejor fue la deposición de TiO_2 cristalino en los recubrimientos, a pesar de presentar una completa oxidación de los blancos (envenenamiento) en todas las relaciones gaseosas evaluadas [41], [45].

Como todos los recubrimientos en los ensayos E3 y E6 son extremadamente delgados (<70 nm), la posibilidad de que pequeñas concentraciones de material se agreguen unas encima de otras y resulten en una superficie más irregular es menor que la de llenar "agujeros" o cavidades cercanas y consolidar una superficie más regular. Este fenómeno es posible debido a la conocida pulverización homogénea de material en películas delgadas proporcionada por la técnica de Magnetron Sputtering [46].

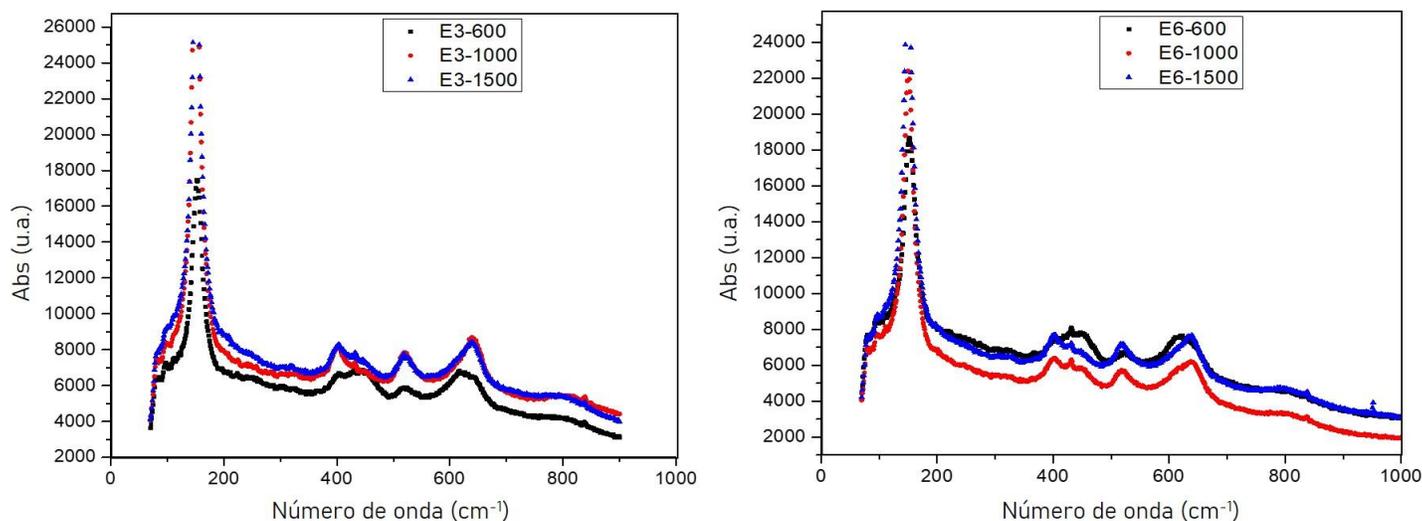


Figura 5. Gráficas de espectrometría Raman para las muestras E3 a la izquierda y E6 a la derecha.

A partir de los resultados obtenidos entre las secciones 5.1.1. a 5.1.3. se puede evidenciar el efecto de la preparación superficial y el grado de pulido de los sustratos de Ti6Al4V sobre las propiedades físicas y químicas de los monocapas de TiO₂ que se seleccionaron como base de los sistemas multicapa obtenidos en las secciones que se discutirán a continuación. En términos generales, se observa un aumento tanto en rugosidad como espesor de los recubrimientos obtenidos a altas concentraciones de oxígeno (Ar:O₂ 2:1), lo cual resulta llamativo a la hora de considerar los posibles efectos en sistemas multicapa con 10 y 15 bicapas, dado el interés que se tiene por obtener superficies con estas rugosidades y espesores cercanos a 1 μm. En relación con la mojabilidad de las monocapas, se evidenció un mejor comportamiento para las muestras obtenidas en atmósferas Ar:O₂ de 2:1 y pulidas con lija 1000. Finalmente, las mediciones micro-Raman se pudo confirmar la obtención de TiO₂ cristalino en forma de anatasa, sin embargo, una leve disminución en la intensidad y el ancho de los picos a menores grados de pulido sugieren una mínima variación de la cristalinidad de los recubrimientos. En este caso, las monocapas depositadas a relaciones gaseosas 2:1 y grados de pulido 1000 presentaron las mejores bandas. Así pues, se determinó que la combinación E3 sería la más adecuada a la hora de la fabricación de los sistemas multicapa.

5.2. RECUBRIMIENTOS MULTICAPA DE TiO₂/Ag

5.2.1. Caracterización física y química

De acuerdo a la literatura, el TiO₂ cristalino existe en una de tres configuraciones: anatasa, rutilo y brookita. Mientras que la brookita es la menos común de las tres y el rutilo tiene algunas aplicaciones, principalmente donde se desean propiedades ópticas específicas y las temperaturas de trabajo o los procedimientos de recocido superan los 600 °C, la anatasa es la fase cristalina más buscada para este tipo de aplicaciones a baja temperatura, como lo son dispositivos e implantes biomédicos, debido a una mejor adaptación de las propiedades superficiales y químicas utilizando la técnica de magnetron sputtering [45], [47]. Como se observa en la Figura 6, los espectros Raman de cada recubrimiento indican una banda principal a 144 cm⁻¹ y tres bandas subsiguientes, menos intensas, a 397, 517 y 639 cm⁻¹,

correspondientes a los modos E_g , B_{1g} y A_{1g} de la anatasa, respectivamente. Además, el espectro de TM, esto es, la línea punteada roja, presenta la banda más intensa y definida, mientras que en ambos sistemas multicapa (10 y 15 bicapas correspondientes a las líneas punteadas verde y azul respectivamente) se observa una disminución en la cristalinidad a medida que se atenúa la intensidad relativa y aumenta la relación señal/ruido debido a la inclusión de Ag dentro de cada bicapa, alterando la dinámica de deposición de TiO_2 .

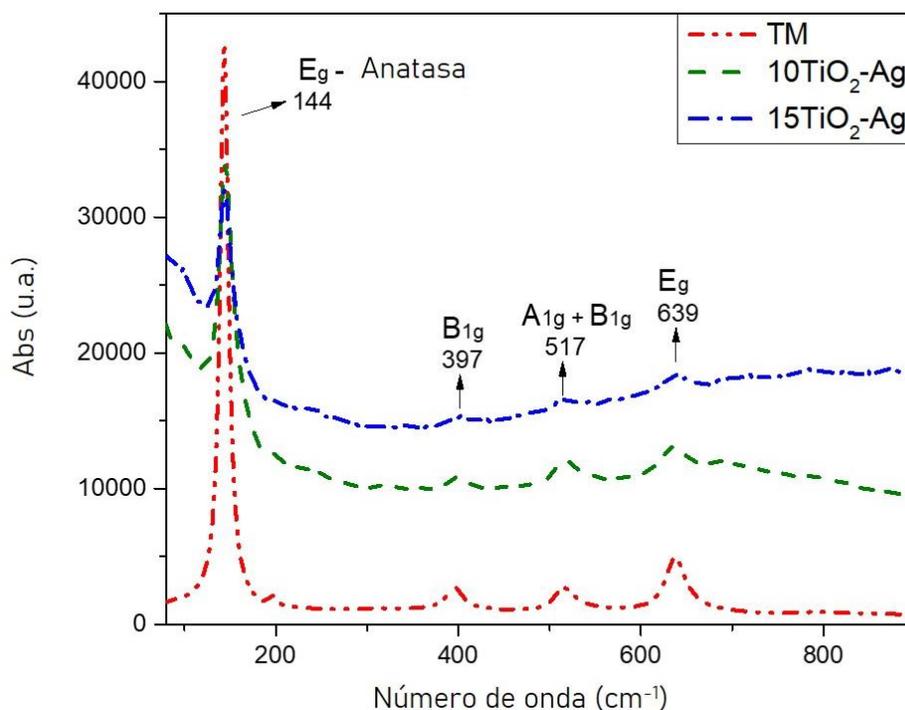


Figura 6. Espectros micro-Raman para TM (Rojo), $10TiO_2/Ag$ (Verde) y $15TiO_2/Ag$ (Azul)

La Figura 7 muestra los patrones de difracción para el recubrimiento mono-composicional TM y ambos sistemas multicapa, en los que se evidencia la presencia de la fase anatasa de TiO_2 con un pico principal alrededor de 25° correspondiente a la orientación (101). Todos los patrones exhiben un pico fuerte a 42° asociado al contenido de hierro del sustrato de acuerdo con la base de datos del software HighScore Plus. Además, los picos cerca de 38° y 44° indican la presencia de Ag metálico con orientaciones (111) y (020) respectivamente en los espectros de los recubrimientos multicapa, este último se superpuso con la señal del sustrato, aumentando su intensidad relativa y disminuyéndola para los picos

principales de TiO_2 de manera similar a trabajos previamente reportados, donde se evidenció la influencia de Ag en la estructura de fase de TiO_2 -Ag [48], [49]. De manera similar, Banas-Gac et al. depositaron películas delgadas de TiO_2 con diferentes espesores sobre monocapas de CuO mediante la técnica de pulverización catódica y encontraron una correlación entre la temperatura del sustrato y la cristalinidad del recubrimiento, al realizar la deposición a $350\text{ }^\circ\text{C}$ se obtuvo una capa altamente cristalina, mientras que a temperaturas más bajas la fase de TiO_2 resultó en zonas más amorfas, este mismo fenómeno se observó de acuerdo al análisis de DRX y Raman previamente mencionado, donde, a partir de una leve disminución en la intensidad y un aumento en el ancho de los picos a medida que el número de bicapas aumenta, se sugiere una mínima variación de la cristalinidad en los recubrimientos multicapa [50].

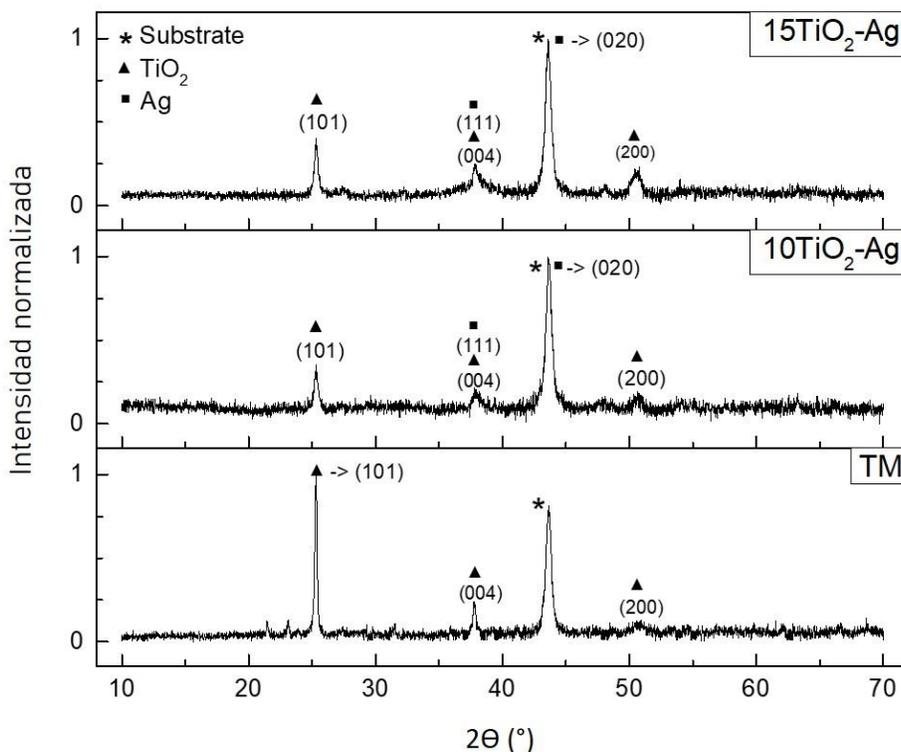


Figura 7. Difractogramas de rayos X para TM, $10\text{TiO}_2\text{-Ag}$ y $15\text{TiO}_2\text{-Ag}$

Las imágenes SEM de TM presentadas en la Figura 8-a revelan el mecanismo de crecimiento columnar denso típico del TiO_2 depositado por magnetrón sputtering.

En cuanto a las micrografías superficiales de los sistemas multicapa $10\text{TiO}_2\text{-Ag}$ y $15\text{TiO}_2\text{-Ag}$ en la Figura 8-b y 8-c respectivamente, estas exhiben la presencia de varios puntos brillantes a lo largo de la superficie del recubrimiento (marcas rojas) sugiriendo la formación de cúmulos de Ag, las cuales se estudiaron más a fondo utilizando EDS. Se evidenció un alto contenido de Ag en peso atómico en éstas áreas brillantes, la Tabla 2 muestra la composición elemental aproximada para cada recubrimiento, donde se puede observar que todas las relaciones O-Ti se aproximan a una relación 2:1, esto fortalece la evidencia de la presencia de anatasa en cada uno de los sistemas. Por otro lado, se observó una tendencia creciente con respecto al contenido de Ag de 1,6 a 2,8 % atómico para $10\text{TiO}_2/\text{Ag}$ y $15\text{TiO}_2/\text{Ag}$ respectivamente debido al aumento en el número de bicapas en los sistemas multicapa [51]. Por otra parte, varios estudios han evidenciado una tendencia de la plata a migrar y difundirse a lo largo de las capas, especialmente cuando el proceso de pulverización se realiza en condiciones de temperatura como lo fue en el trabajo presente [23], [52], [53].

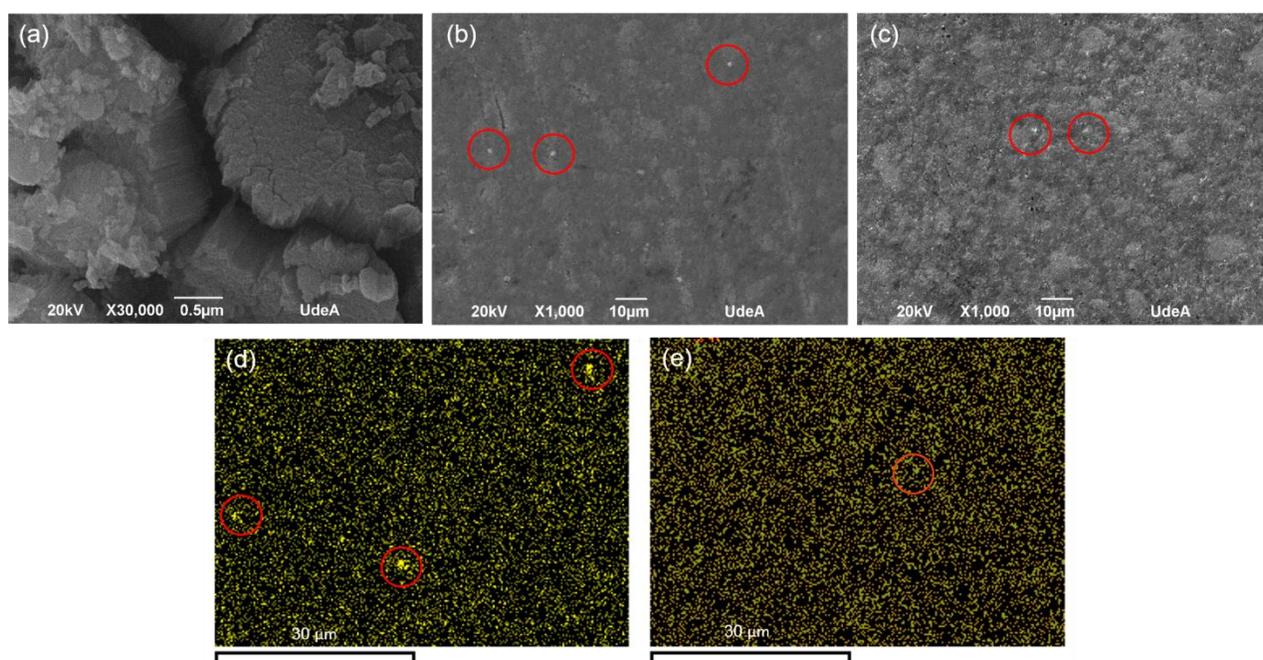


Figura 8. Micrografías SEM superficiales de TM (a), $10\text{TiO}_2\text{-Ag}$ (b) y $15\text{TiO}_2\text{-Ag}$ (c) e imágenes EDS para Ag (Amarillo) de $10\text{TiO}_2\text{-Ag}$ (d) y $15\text{TiO}_2\text{-Ag}$ (e)

Para un mayor detalle, la Figura 9 presenta micrografías superficiales y transversales por FESEM de los recubrimientos multicapa desarrollados. Las vistas superficiales evidencian la formación de acumulaciones considerables de

material en la parte superior de los recubrimientos, aunque en mayor medida para el sistema 15TiO₂/Ag. Esto puede explicarse por un efecto predominante de apantallamiento o en inglés, *shadowing effect*, donde los átomos pulverizados que viajan en trayectorias oblicuas se depositan en los puntos más altos de la superficie, aumentando el tamaño de las aglomeraciones superficiales en lugar de favorecer el crecimiento uniforme en los sistemas multicapa [54]. También es posible la confirmación de nanopartículas de Ag como los puntos brillantes observados en las micrografías SEM. En términos de recuento de capas, el sistema 10TiO₂-Ag exhibió 8 capas de TiO₂ mientras que 15TiO₂-Ag presentó como máximo 13 capas de TiO₂, todas éstas con un espesor entre 25 y 40 nm. Adicionalmente, ambos sistemas presentan una capa de adhesión de Ti de 15 nm. Por otro lado, ambas vistas transversales sugieren una deposición continua y uniforme de Ag durante las primeras capas, pero a medida que el recubrimiento crece, la plata migra a lo largo de los canales de la estructura columnar de TiO₂ hacia la superficie y se acumula en zonas de mayor tamaño, creciendo en ocasiones en formas de fibra o varilla como se indica en los círculos rojos de la Figura 9-d. En trabajos previos, se ha observado la formación de vacíos entre capas de una matriz TiO₂/Ag/TiO₂ debido a la migración de Ag, esto es, como resultado del efecto Kirkendall incluso a temperaturas inferiores a 250 °C. Esto resultó en una alteración significativa de la dinámica de crecimiento en capas de TiO₂ depositadas sobre Ag, lo cual explicaría la morfología menos clara obtenida en las capas más externas de los recubrimientos, en especial el sistema 15TiO₂/Ag.

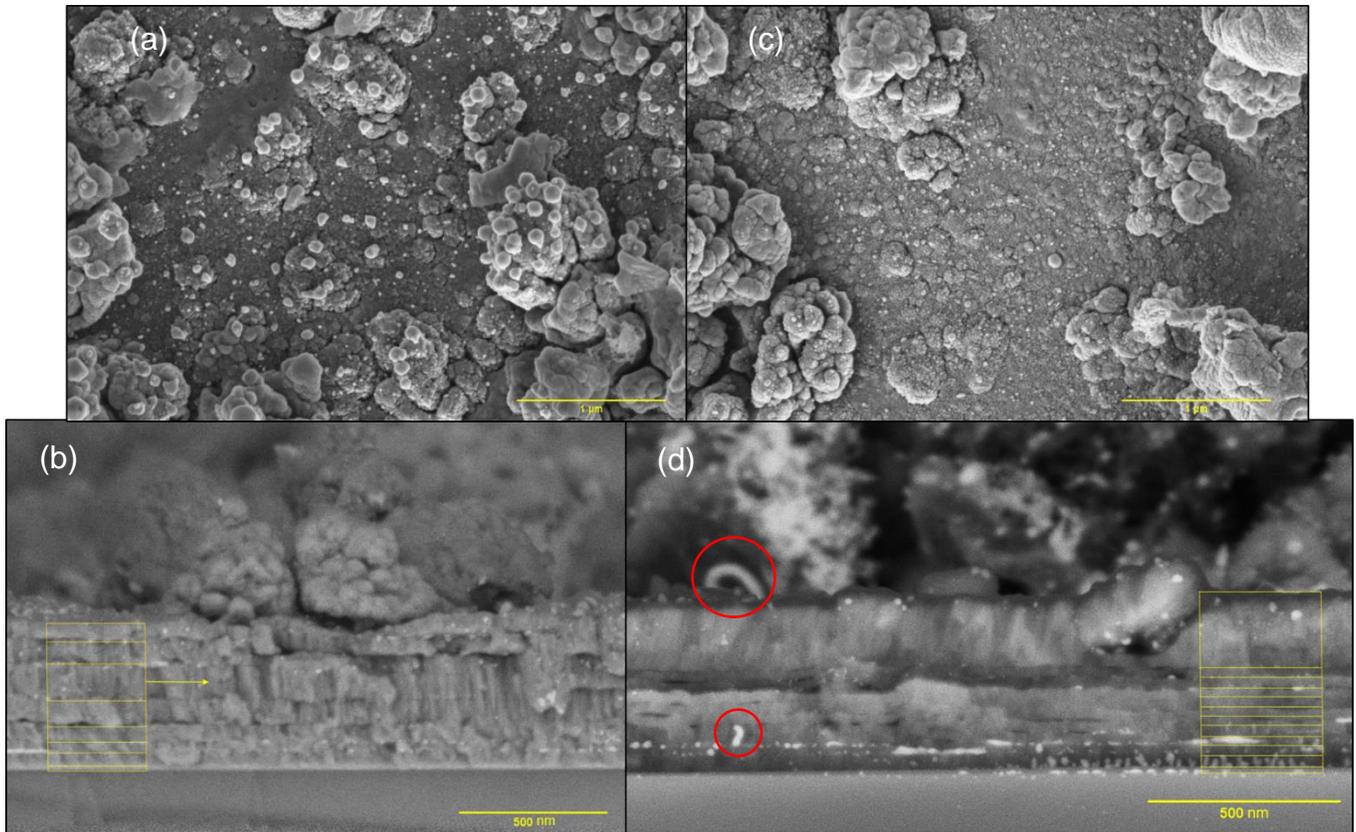


Figura 9. Micrografías FESEM de la morfología superficial (SE 50.000X) y corte transversal (BSE 100.000X) para 10TiO₂-Ag (a)-(b) y 15TiO₂-Ag (c)-(d) respectivamente.

		Elemento (% Atómico)			Proporción O-Ti
		Ti	O	Ag	
Muestra	TM	32	68	---	2,13
	10TiO ₂ -Ag	26	73	1,6	2,84
	15TiO ₂ -Ag	27	71	2,8	2,65

Tabla 2. Análisis EDS para TM, 10TiO₂-Ag y 15TiO₂-Ag.

En la Figura 10 se presentan las mediciones de espesor y rugosidad de los recubrimientos obtenidos. De manera consistente con la literatura, se observa un aumento general en la rugosidad a mayores espesores de recubrimiento, ya sea debido a un tiempo de deposición más prolongado para TM o a la inclusión de mayores cantidades de bicapas en los sistemas multicapa. Se puede evidenciar a

partir de la figura que tanto el espesor total de los recubrimientos multicapa, así como su rugosidad, aumentan marginalmente con un número de bicapas mayor. El incremento en rugosidad se puede atribuir a la acumulación de plata en la superficie del recubrimiento debido al fenómeno de difusión a través de los espacios intercolumnares del TiO_2 .

En general, un consenso común apunta a superficies con una rugosidad superficial de hasta $0,2 \mu\text{m}$ y ángulos de contacto bajos para obtener una mayor biocompatibilidad en dispositivos biomédicos como implantes [22], [57]–[59]. Además, las tasas de deposición indican una pulverización de material relativamente rápida durante las primeras etapas del proceso de recubrimiento, seguida de una disminución en éstas a medida que se incluyen más capas en los sistemas. Este fenómeno puede ser el resultado de variaciones en las propiedades superficiales de cada capa subyacente durante la fabricación de los sistemas, como se resultado de los fenómenos discutidos anteriormente como el apantallamiento y el efecto Kirkendall. También es importante mencionar que el efecto de las propiedades superficiales de cada capa sobre el crecimiento de las capas subsecuentes puede tener una influencia más notable en los recubrimientos multicapa con un alto número de bicapas, especialmente al utilizar un material altamente difusivo como la plata, este fenómeno puede explicar las tasas de crecimiento observadas [50]. No obstante, se han evidenciado otros numerosos factores que pueden resultar en menores tasas de deposición, como lo es la presión de trabajo, el flujo de gas reactivo y no reactivo, los gradientes de temperatura

dentro de una cámara de deposición voluminosa, el número y la naturaleza de los blancos en uso, el grado de envenenamiento de éstos, etc [57], [60], [61].

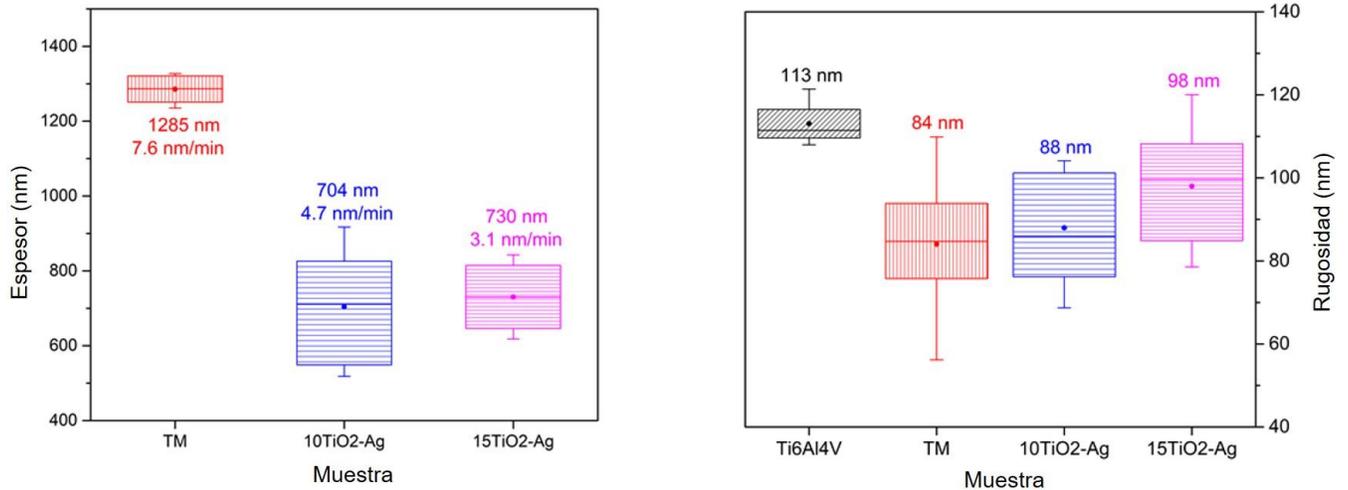


Figura 10. Espesor de los recubrimientos (izq.) y medidas de rugosidad (der.)

La Figura 11 presenta los ángulos de contacto (A.C.) para cada sistema. Mientras que los sustratos de Ti6Al4V exhiben un carácter altamente hidrofóbico (130°), las mediciones de mojabilidad de los recubrimientos revelan un comportamiento cada vez más hidrofílico a medida que aumenta el número de bicapas. El recubrimiento de TiO₂ (TM) tuvo un ángulo de contacto de $86,3^\circ$, mientras que los recubrimientos multicapa de 10TiO₂-Ag y 15TiO₂-Ag tuvieron un A.C. de $68,5^\circ$ y $55,2^\circ$, respectivamente. Estudios similares han observado una disminución en el A.C. de películas delgadas de TiO₂, lo cual se ha asociado con espesores de recubrimiento más altos y también con la naturaleza fotocatalítica intrínseca de la fase anatasa de TiO₂, lo que le permite formar especies activas de oxígeno debido a reacciones redox que tienen lugar en la superficie. Dichas reacciones están asociadas con huecos positivos creados en la banda de valencia y la aparición de electrones excitados en la banda de conducción. Además, la liberación de estas especies, como grupos hidroxilo (-OH), aniones superóxido (O₂⁻) y radicales perhidroxilo (HOO•), respalda las propiedades antibacterianas de los recubrimientos, ya que favorecen la desintegración de las membranas celulares bacterianas [57], [62], [63]. Además, las superficies más hidrofílicas han mostrado una liberación mejorada de iones Ag⁺ en medios biológicos simulados

en comparación con recubrimientos compuestos de naturaleza hidrofóbica, ya que en éstos se forman pequeñas cápsulas de aire que obstaculizan la migración, mientras que las superficies hidrofílicas están directamente en contacto con un medio líquido, favoreciendo la liberación de iones Ag [64]. Además, la influencia de la mojabilidad de Ag en el sistema multicapa se puede observar, ya que ambos sistemas multicapa comparten valores similares de espesor y rugosidad, pero difieren en el contenido de Ag. Otros estudios también han atribuido una disminución en los ángulos de contacto para los recubrimientos que contienen Ag en comparación con las muestras sin Ag en sistemas diseñados para uso biomédico [36], [42]. Finalmente, la Tabla 3 muestra los valores de energía superficial, todos los valores son positivos, lo que respalda el carácter hidrofílico de cada recubrimiento. A pesar de que el sustrato de Ti6Al4V presentó un carácter hidrofóbico, un valor positivo de energía superficial menor en comparación con los sistemas multicapa, indica que la superficie aún puede humedecerse en presencia de moléculas de agua [65].

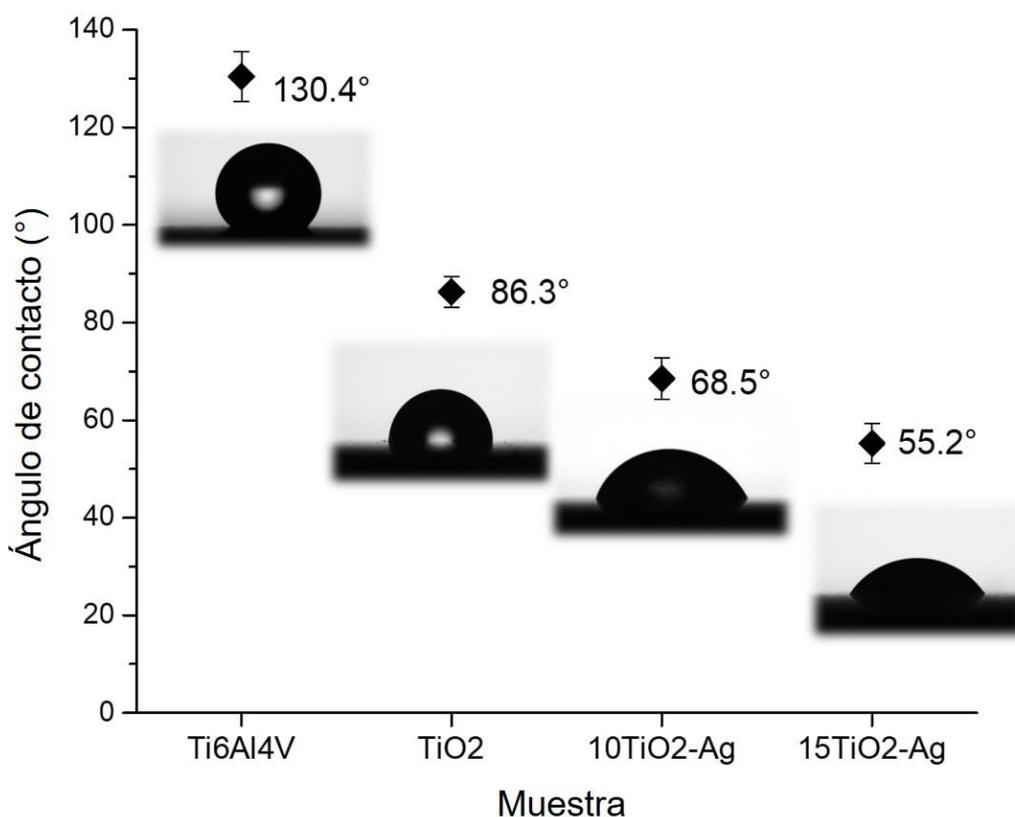


Figura 11. Mediciones de ángulo de contacto para el sustrato de Ti6Al4V, la monocapa de TiO₂ (TM), 10TiO₂-Ag y 15TiO₂-Ag

		Energía superficial (mJ/m²)
Muestra	Ti6Al4V	33.09
	TM	25.58
	10TiO ₂ -Ag	61.67
	15TiO ₂ -Ag	36.57

Tabla 3. Energía superficial del sustrato de Ti6Al4V y los recubrimientos obtenidos

5.2.2. Propiedades mecánicas

La figura 12 presenta las mediciones de dureza y módulo de Young para el sustrato y los recubrimientos obtenidos. Con una dureza de 7.42 ± 1.75 GPa y un módulo de 194.69 ± 30.9 GPa, la monocapa de TiO₂ presentó una mejoría en ambas propiedades con respecto al sustrato de Ti6Al4V, el cual exhibió una dureza de 5.73 ± 0.67 GPa y un módulo de 151.61 ± 10.44 GPa, lo cual es consistente con reportes de recubrimientos de TiO₂ depositados por la técnica de magnetron sputtering con valores entre 5.6 y 10.5 GPa en función de la atmósfera utilizada durante el proceso de deposición [66]. Por otro lado, y como consecuencia de la inclusión de metales blandos como lo es la plata, los sistemas multicapa exhibieron disminuciones en ambas propiedades con respecto a la monocapa de TiO₂; el sistema de 10 bicapas presentó una dureza de 6.87 ± 3.09 GPa y un módulo muy similar al del sustrato (151.11 ± 32.54 GPa), sin embargo, el sistema de 15 bicapas tuvo una disminución significativa en dureza y módulo (2.67 ± 1.61 GPa y 106.31 ± 26.19). Esto es consistente con la microestructura menos uniforme observada en los cortes transversales de las muestras 15TiO₂-Ag, donde el crecimiento desordenado de las capas superiores y la generación de vacíos como resultado de la migración de plata afectaron el comportamiento mecánico de dicho sistema. Adicionalmente, se puede argumentar que un

contenido de casi el doble de Ag (% At.) en las muestras de 15 bicapas tiene un aporte significativo, en conjunto con los cambios en las microestructuras, con respecto a la disminución de la dureza de las muestras.

Con el fin de complementar los análisis de las propiedades mecánicas, se calculó la resistencia elástica (H/E^*) y la resistencia a la deformación plástica (H^3/E^{*2}), las cuales serán discutidas a profundidad en las secciones de adhesión (5.2.3.) y comportamiento biotribológico (5.2.4.) respectivamente. Éstos se presentan en la tabla 4, en ella se puede notar que la muestra $10\text{TiO}_2\text{-Ag}$ presentó las mejores proporciones en ambos valores, con una mejoría del 19% en resistencia elástica y del 31% en resistencia a la deformación plástica con respecto a la monocapa de TiO_2 , mientras que la muestra $15\text{TiO}_2\text{-Ag}$ presentó una reducción del 34% en resistencia elástica y una muy significativa disminución del 84% en términos de resistencia a la deformación plástica con respecto a la monocapa (TM).

Por último, es importante mencionar que, aunque puede ser más llamativo el uso de técnicas como la microdureza Vickers o Knoop, incluso a bajas cargas, para calcular la dureza promedio de recubrimientos con altos dopajes de plata, la profundidad de penetración máxima presentaría inconvenientes a la hora de evaluar los recubrimientos obtenidos debido al reducido espesor de éstos, por esto se decidió utilizar una técnica con el mejor control de profundidad posible, además de una adecuada calibración del equipo para el rango de cargas utilizado y tomando un número idóneo de lecturas [67], [68].

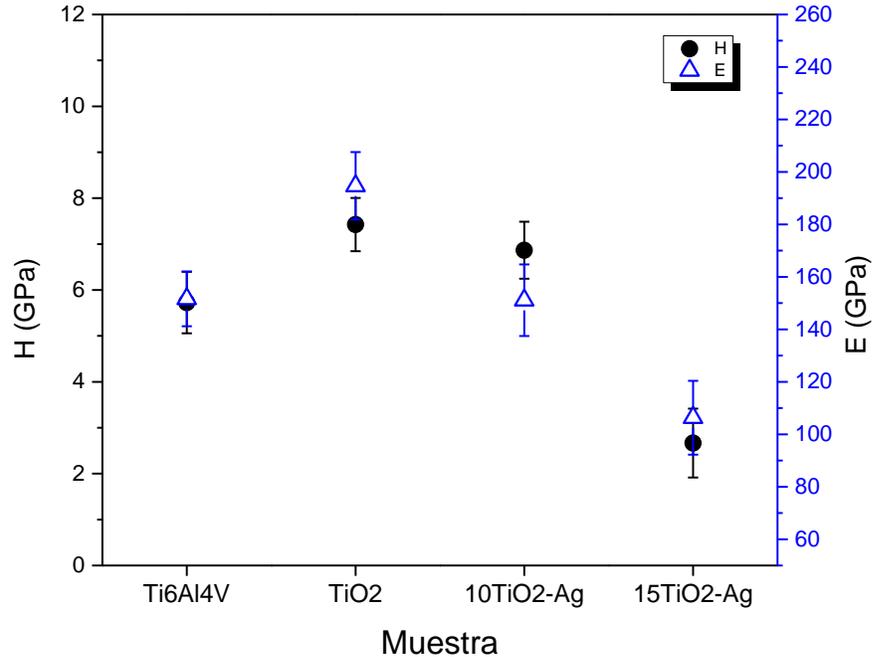


Figura 12. Dureza (H) y módulo de Young (E) para los recubrimientos y sustrato.

		$H/E^* \times 10^{-2}$	$H^3/E^{*2} \times 10^{-3}$
Muestra	TM	3.8 ± 0.7	10.8 ± 1.1
	10TiO ₂ -Ag	4.5 ± 0.9	14.2 ± 1.8
	15TiO ₂ -Ag	2.5 ± 0.5	1.7 ± 0.8

Tabla 4. Relaciones H/E^* y H^3/E^{*2} de los recubrimientos obtenidos.

5.2.3. Ensayos de adhesión

La figura 13 presenta las indentaciones obtenidas bajo los parámetros del test de adhesión de Daimler-Benz, en éste se observó una ausencia absoluta de grietas y zonas de delaminación y tan solo algunas zonas de deformación, o *spallation* en inglés, principalmente alrededor de la indentación de TM. De forma complementaria, al realizar mediciones micro-Raman alrededor de las huellas en las muestras multicapa ofrecieron señales fuertes de anatasa, lo que indica que los recubrimientos no se delaminaron. Según las categorías de adhesión reportadas

en la literatura y en la norma ISO 26443, los recubrimientos presentes poseen un nivel de adhesión adecuado entre las Clases 0 y 1 [69], [70]. Ben D. Beake halló que una alta resistencia a la formación de fracturas y delaminación en recubrimientos delgados, como se observa en las muestras obtenidas, son el resultado no sólo de relaciones H/E^* óptimas, que proveen alta tenacidad, resistencia a la erosión y a la deformación plástica, sino también a las propiedades superficiales y factores microestructurales con arquitecturas complejas y altamente modulables, así como lo permiten múltiples técnicas de PVD como el *magnetron sputtering* [71].

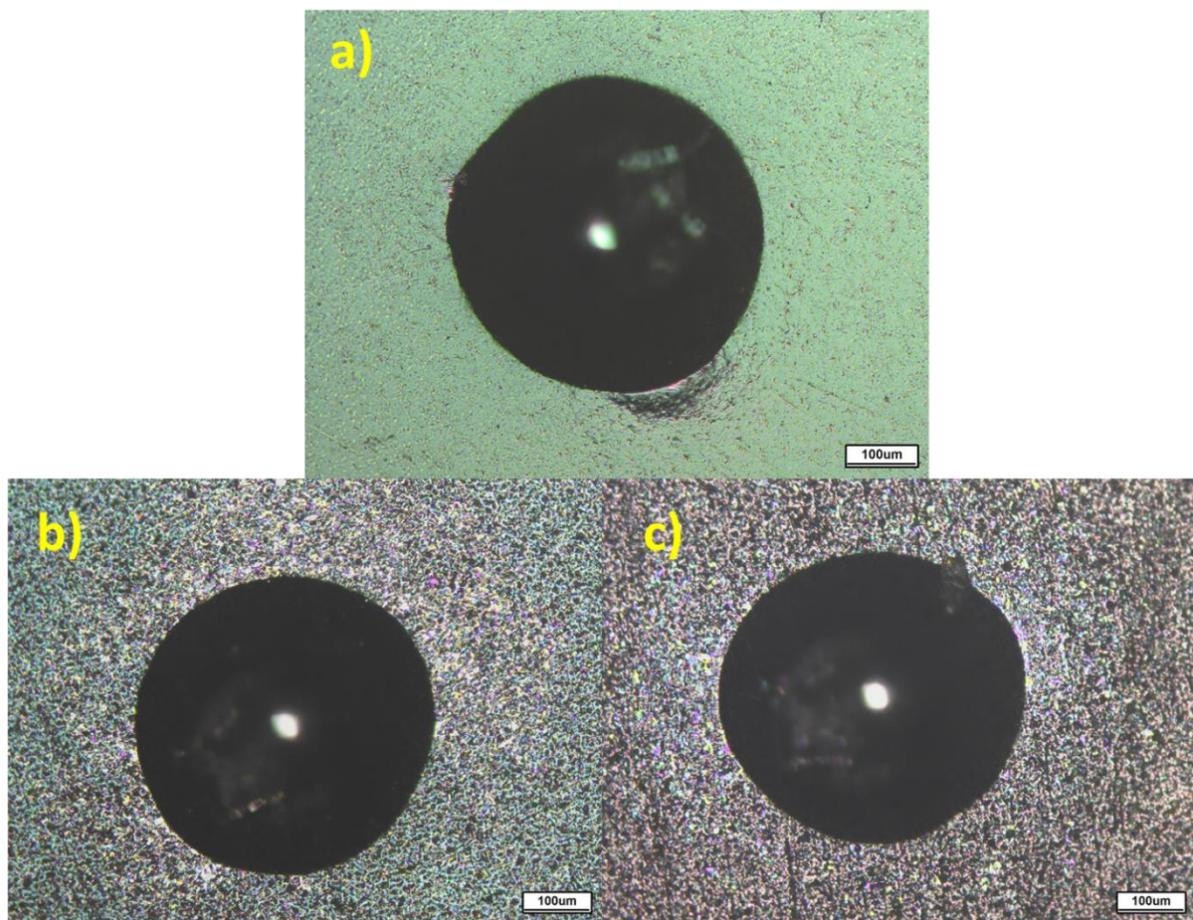


Figura 13. Micrografías ópticas del ensayo de adhesión Daimler-Benz para los sistemas TM (a), $10\text{TiO}_2\text{-Ag}$ (c) y $15\text{TiO}_2\text{-Ag}$ (c)

5.2.4. Ensayos biotribológicos

La Figura 14 muestra los resultados de coeficiente de fricción (μ) y tasa de desgaste (k) en la parte superior y micrografías ópticas y SEM en la parte inferior para el sustrato Ti6Al4V y los tres recubrimientos. El rendimiento tribológico en etapas tempranas revela una disminución en el coeficiente de fricción (de 0,26 para Ti6Al4V a 0,24 para TM y 0,17 para 10TiO₂-Ag) y una mejoría en las tasas de desgaste para la monocapa de TiO₂ y el sistema 10TiO₂-Ag con una reducción del -49% y -86%, respectivamente, lo cual es consistente con la inclusión de metales blandos con propiedades autolubricantes como lo es la Ag. Además, la liberación de iones Ag⁺ en un medio biológico como el fluido periprotésico, el cual está presente en el espacio entre las articulaciones, promueve la adsorción de proteínas desnaturalizadas en la superficie de un implante, actuando efectivamente como una película bio-lubricante, y por ende, reduciendo la tasa de desgaste [72], [73]. Sin embargo, se observó un aumento en el coeficiente de fricción (0,22) y la tasa de desgaste (+92%) para el sistema 15TiO₂-Ag con respecto al recubrimiento 10TiO₂-Ag, este efecto puede explicarse debido a la migración de plata que resulta en una microestructura llena de vacíos como se presenta en la Figura 9 [74], sin embargo, el coeficiente de fricción sigue siendo inferior al del sustrato y TM, esto ha sido observado en estudios que analizan el efecto del dopaje de plata en recubrimientos diseñados para aplicaciones biomédicas, como la investigación de Jadon et al. [75], quienes evaluaron el comportamiento tribológico de recubrimientos de MgO dopados con plata sobre sustratos de acero. Además, los resultados de resistencia a la deformación plástica (H^3/E^{*2}) presentados en la tabla 4 tienen una correlación directa con los coeficientes de desgaste observados, donde una reducción del 84% en el valor de H^3/E^{*2} para 15TiO₂-Ag resultó en un notable aumento de la tasa de desgaste, mientras que los recubrimientos 10TiO₂-Ag presentaron las mejores relaciones H^3/E^{*2} y tasas de desgaste. Por último, las micrografías de microscopía óptica y SEM de las huellas de desgaste indican un desgaste abrasivo de dos cuerpos y una componente de desgaste adhesivo sin delaminación total del recubrimiento.

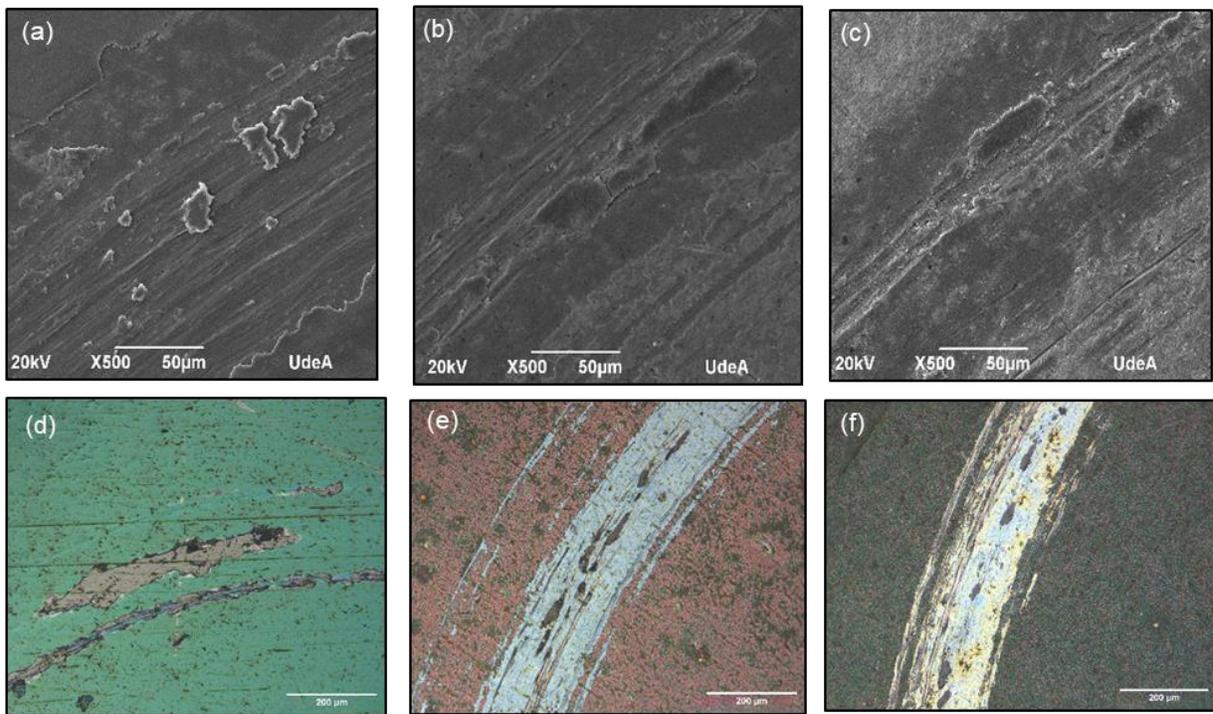
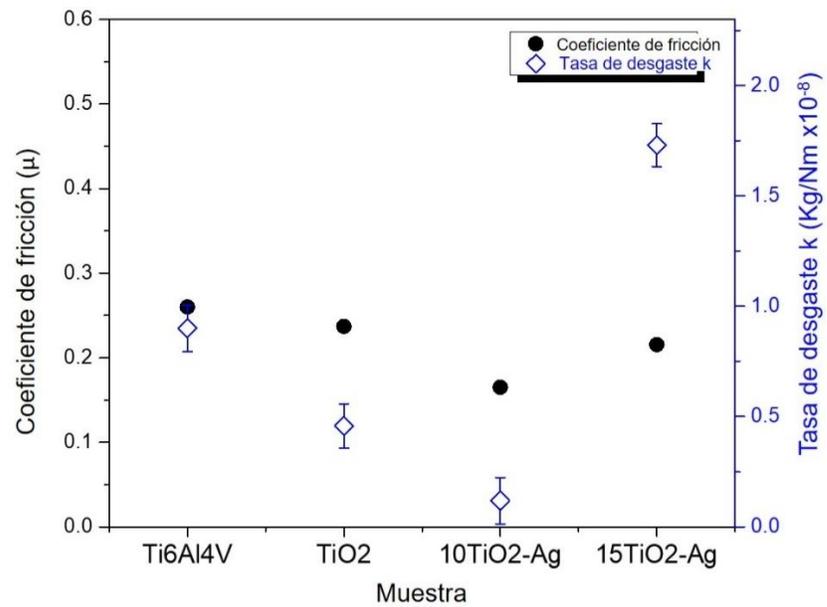


Figura 14. Gráficos de coeficiente de fricción (μ) y tasa de desgaste (k), micrografías ópticas y SEM de las huellas de desgaste para TM (a, d), $10\text{TiO}_2\text{-Ag}$ (b, e) y $15\text{TiO}_2\text{-Ag}$ (c, f) respectivamente.

5.2.5. Ensayos de liberación de Ag

La Tabla 5 presenta la concentración de iones de Ag^+ liberada para cada intervalo de tiempo hasta el día 30. En ésta se observa la tendencia típica esperada para sistemas de este tipo, esto es, una liberación rápida inicial, con una concentración máxima de 0.208 mg/L a los 3 días (72 h) para el sistema con mayor número de bicapas ($15\text{TiO}_2\text{-Ag}$), seguida de una atenuación en las concentraciones liberadas a tiempos superiores. Por otro lado, el recubrimiento $10\text{TiO}_2\text{-Ag}$ presentó una liberación menor a su contraparte de 15 bicapas, e incluso inferior al límite de detección de 0.05 mg/L en tiempos superiores a 24 horas, lo cual se puede asociar a una menor cantidad de Ag en los recubrimientos como resultado de la arquitectura y una menor migración de material hacia la superficie, así como una microestructura con menos poros y canales, y, por ende, una menor liberación de iones al medio externo. Todos los valores registrados se encuentran por debajo de los límites citotóxicos reportados en la literatura, donde C. Sengstock *et al.* y A. Peetsch *et al.* encontraron efectos adversos sobre células madre mesenquimales a concentraciones de Ag entre 1 y 3 mg/L [76], [77].

Tiempo (h)	Concentración Ag^+ (mg/L)	
	$10\text{TiO}_2\text{-Ag}$	$15\text{TiO}_2\text{-Ag}$
6	0,071	0,064
24	0,073	0,152
72	<0,05	0,208
168	<0,05	0,173
360	<0,05	0,125
720	<0,05	0,07

Tabla 5. Liberación de Ag^+ para los recubrimientos multicapa a 6, 24, 72, 168, 360 y 720 h.

5.2.6. Ensayos de citotoxicidad

Los resultados de citotoxicidad se presentan en la Tabla 6 y se expresan como el porcentaje de viabilidad con relación a las células control no tratadas. Los osteoblastos Saos-2 cultivados sobre el sustrato exhibieron porcentajes de viabilidad del 89%, mientras que los porcentajes de viabilidad de los recubrimientos presentaron valores muy cercanos a los observados en el control no tratado. Lo anterior indica que el contacto de los osteoblastos con los recubrimientos y el sustrato permitió mantener la viabilidad celular, lo cual se traduce en un comportamiento potencialmente no tóxico y adecuado para la aplicación presente.

Tratamiento	Promedio \pm DS
Control no tratado	100.0 \pm 0.7
Ti6Al4V	89.5 \pm 2.8
TM	98.8 \pm 5.2
10TiO₂-Ag	96.6 \pm 3.6
15TiO₂-Ag	97.4 \pm 5.5

Tabla 6. Porcentajes de viabilidad de células Saos-2 cultivadas sobre el sustrato y los recubrimientos obtenidos.

5.2.7. Ensayos de adhesión celular

La figura 15 presenta los resultados de adhesión celular a 24 horas para el sustrato de Ti6Al4V, la monocapa de TiO₂ y los recubrimientos de 10 y 15 bicapas. Adicionalmente se presentan micrografías de adhesión a 72 horas para los recubrimientos multicapa. La figura 15-a presenta un crecimiento extenso de osteoblastos sobre toda la superficie del sustrato, lo cual es consistente con la excelente biocompatibilidad de esta aleación de titanio y, por ende, se evidencia su amplio uso en implantes biomédicos [37], [78], [79]. De manera similar al sustrato, la notable adhesión celular sobre la monocapa de TiO₂ en la figura 15-b sugiere una alta afinidad de las células sobre la superficie, donde no sólo se observa un elevado número de éstas, sino también su típico modo de crecimiento

alargado en el que se procura abarcar la mayor área superficial posible. Por otra parte, la adhesión sobre los recubrimientos multicapa a 24 horas presentan una evidente reducción en número de células y sin presencia de alargamientos, en especial el recubrimiento 10TiO₂-Ag (figura 15-c) presentó tan sólo unos cuantos osteoblastos en disposición circular, mientras que 15TiO₂-Ag (figura 15-d) presenta un leve aumento en adhesión con respecto al recubrimiento de 10 bicapas, esto indica una colonización tardía de la superficie en ambas muestras. Una vez transcurridas las 72 horas (figuras 15-e y 15-f), aún se puede observar una adhesión significativamente reducida en comparación con el sustrato y la monocapa a 24 horas, sin embargo, las células ya empiezan a crecer y extenderse de forma alargada, especialmente en los recubrimientos de 15 bicapas como resultado de las propiedades superficiales analizadas anteriormente, estas son: rugosidades más elevadas (98 nm para 15TiO₂-Ag vs 88 nm para 10TiO₂-Ag) y ángulos de contacto más hidrofílicos (55.2° para 15TiO₂-Ag vs 68.2° para 10TiO₂-Ag), con una microestructura más irregular y porosa. Estas propiedades de porosidad han evidenciado mejor adhesión temprana en andamiajes biomédicos, como lo evidenció Huang et al. quienes evaluaron 24 muestras de Ti6Al4V con estructuras en la micro y nano escala, donde las mejores propiedades de adhesión se observaron en muestras con altos grados de irregularidades y porosidades [79].

Con base en estos resultados, y teniendo en cuenta la aplicación propuesta, se puede concluir que el sistema 10TiO₂-Ag presentó el mejor comportamiento entre todos los recubrimientos obtenidos, pues en ésta se observó la menor adhesión, incluso a 72 horas, comparada con el sustrato de Ti6Al4V a 24 horas sin comprometer la viabilidad celular según los resultados obtenidos en la sección 5.2.6.

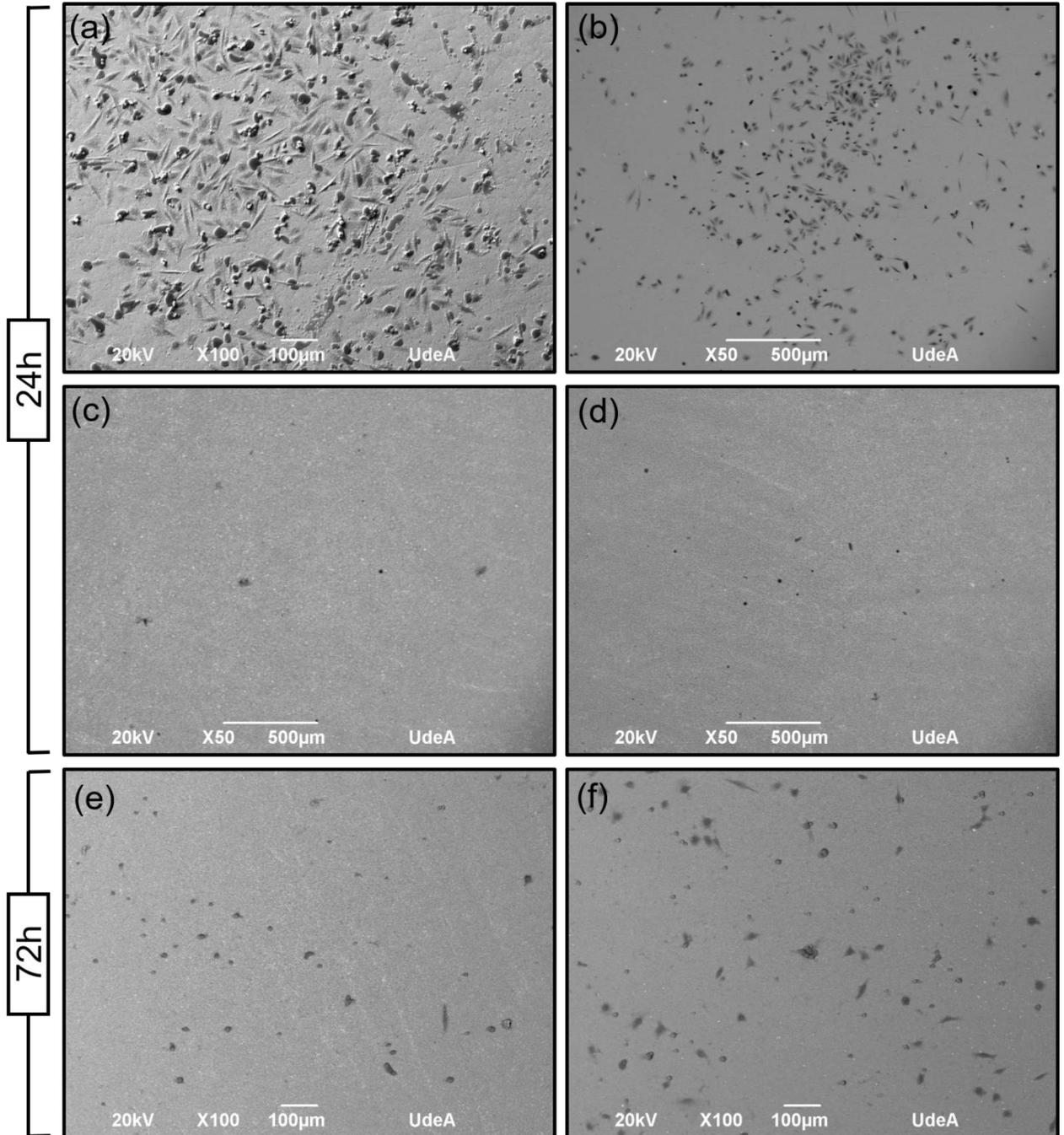


Figura 15. Adhesión celular a 24h sobre Ti6Al4V (a), TM (b), 10TiO₂-Ag (c), 15TiO₂-Ag (d) y a 72h para 10TiO₂-Ag (e) y 15TiO₂-Ag (f).

5.2.8. Actividad antibacteriana

La figura 16 presenta las imágenes de inhibición de crecimiento bacteriano para especímenes Gram negativos (*P. aeruginosa*) y Gram positivos (*S. aureus*) sobre los recubrimientos TM y 10TiO₂-Ag, un control de inhibición, que corresponde al antibiótico ciprofloxacina y un control de no inhibición, que corresponde a una muestra de papel filtro. Adicionalmente, las mediciones del diámetro de los halos se presentan en la tabla 7.

Los resultados evidencian que tanto el sustrato como la monocapa de TiO₂ no tuvieron una actividad antibacteriana significativa, sin embargo, el recubrimiento multicapa 10TiO₂-Ag presentó una considerable inhibición en la proliferación bacteriana con un halo de inhibición de 12 mm de diámetro para el cultivo de *P. aeruginosa* y 14 mm para *S. aureus*, como era de esperar dado el contenido de plata, tanto al interior como en la superficie de la muestra multicapa. Esto sumado a la presencia de nanopartículas de Ag, se confirma la actividad antibacteriana de este material, así como se describió en la sección 2.5, lo cual aporta un componente importante en el diseño de materiales dirigidos a aplicaciones biomédicas [42], [80].

Finalmente, se podría esperar que recubrimientos con mayores contenidos de Ag como las muestras 15TiO₂-Ag presenten una actividad antibacteriana igual o mejor a 10TiO₂-Ag.

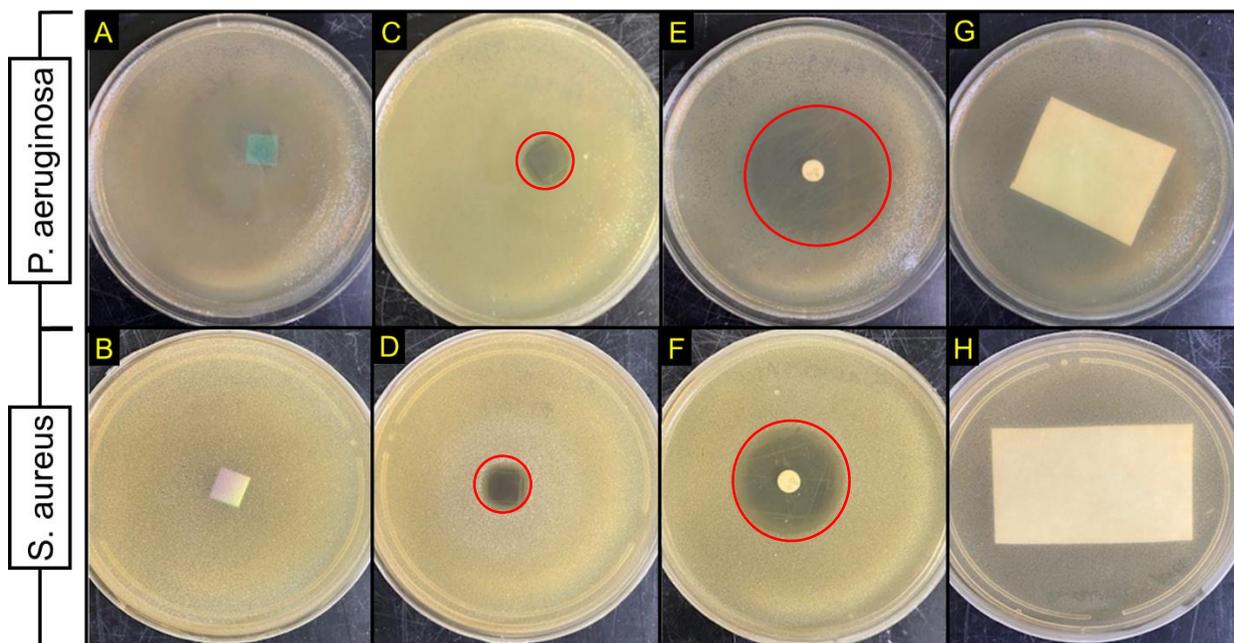


Figura 16. Evaluación de halo de inhibición bacteriano para *P. aeruginosa* y *S. aureus* respectivamente sobre TM (A-B), $10\text{TiO}_2\text{-Ag}$ (C-D), Antibiótico ciprofloxacina (E-F) y Control de no inhibición (G-H).

Tratamiento/Bacteria	Halos de inhibición (mm)	
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
Control de no inhibición	0	0
Ti6Al4V	0	0
TM	0	0
$10\text{TiO}_2\text{-Ag}$	12	14
Antibiótico Ciprofloxacina	31	28

Tabla 7. Diámetros de los halos en mm para Ti6Al4V, TM, $10\text{TiO}_2\text{-Ag}$, Control de no inhibición y Antibiótico ciprofloxacina.

A manera de recapitulación de la caracterización de los recubrimientos multicapa realizada, se pudo confirmar la deposición de TiO_2 cristalino en forma de anatasa en sistemas con espesores cercanos a 800 nm, rugosidades promedio (R_a) inferiores a 100 nm y superficies hidrofílicas con ángulos de contacto menores a 69° , así como la obtención de un sistema multicapa con capas uniformes de TiO_2 y Ag de manera

inicial, pero a medida que aumenta el número de bicapas se observó una migración de plata hacia la superficie, resultando en una disminución en el rendimiento tribológico en los sistemas donde tiene lugar una mayor migración y la subsecuente formación de espacios vacíos entre capas, especialmente para el recubrimiento $15\text{TiO}_2\text{-Ag}$, donde se obtuvo un aumento significativo en la tasa de desgaste, pero coeficientes de fricción incluso menores al sustrato y a la monocapa de TiO_2 (TM) [36], [52], [55], [56]. También se obtuvo una adhesión adecuada de los recubrimientos sobre los sustratos debido a la ausencia de fracturas o delaminaciones a través del test Daimler-Benz. Por otro lado, en la caracterización biológica realizada en las secciones 5.2.5.-5.2.8. se observó una rápida liberación inicial de iones Ag^+ hacia el medio biológico en ambos sistemas (10 y 15 bicapas), seguida de una reducción de la liberación a partir de las 72 horas, esto se observó en mayor medida para las muestras $15\text{TiO}_2\text{-Ag}$ como resultado de un mayor contenido de plata al interior de las capas y en la superficie de los recubrimientos como resultado de una mayor difusión de material, sin embargo, las cantidades observadas no excedieron los valores reportados en la literatura, por encima de los cuales se pueden presentar problemas de citotoxicidad en el cuerpo. Esto fue corroborado con los ensayos de citotoxicidad de la sección 5.2.6, en los cuales se observó una alta viabilidad de todos los recubrimientos obtenidos, sugiriendo un comportamiento no tóxico y adecuado para la aplicación propuesta. Asimismo, los ensayos de adhesión celular exhibieron una alta afinidad de las células por las superficies de Ti6Al4V y la monocapa de TiO_2 , mientras que los recubrimientos multicapa presentaron una adhesión significativamente reducida en las primeras 24 horas, e incluso una adhesión inferior a 72 horas comparada con los sustratos, sin embargo, en dicha ventana de tiempo se pudo observar un mejor anclaje de las células, lo cual apoya la biocompatibilidad de los sistemas y sugiere una excelente aplicación potencial en implantes no temporales. Por último, la evaluación de la actividad antibacterial demostró una óptima función de la plata en los recubrimientos multicapa como agente bactericida, combatiendo la colonización bacteriana de especies tanto Gram positivas como Gram negativas sobre el material, lo cual resultaría ventajoso a la hora de mejorar la adaptabilidad de los dispositivos biomédicos al interior del cuerpo humano.

CONCLUSIONES

- En el trabajo presente se diseñaron y obtuvieron recubrimientos multicapa con propiedades antibacteriales constituidos por 10 y 15 bicapas de TiO_2/Ag sobre sustratos de Ti6Al4V mediante la técnica de magnetrón sputtering con potenciales aplicaciones biomédicas para implantes no permanentes con adhesión celular reducida.
- Se determinaron los parámetros de fabricación para cada monocapa de TiO_2 de acuerdo al tiempo de depósito y relación de atmósfera, para los cuales las mejores propiedades se obtuvieron con 60 minutos equivalentes de depósito bajo una relación de $\text{Ar}:\text{O}_2$ de 2:1 para sustratos de Ti6Al4V pulidos con lija 1000.
- Las monocapas de TiO_2 seleccionadas presentaron rugosidades promedio de 80 nm, un espesor de 70 nm y ángulos de contacto ligeramente hidrofóbicos de 96° . Adicionalmente se confirmó la obtención de TiO_2 cristalino en forma de anatasa para todas las muestras.
- Los sistemas multicapa denominados 10 TiO_2 -Ag y 15 TiO_2 -Ag presentaron espesores cercanos a los 800 nm y superficies hidrofílicas con ángulos de contacto menores a 68.2° . Las imágenes SEM y FESEM evidencian capas uniformes de TiO_2 y plata en las secciones más internas de los recubrimientos y la formación de nanopartículas de Ag en la superficie, así como la formación de poros, cavidades y alteraciones en el crecimiento columnar del TiO_2 en las capas más externas como resultado de la migración de plata asociado a la temperatura de depósito a través de los espacios intercolumnares, especialmente en las muestras 15 TiO_2 -Ag. Esta microestructura afectó en gran medida la tasa de desgaste del sistema de 15 bicapas, mientras que 10 TiO_2 -Ag, con una estructura menos porosa presentó mejorías no solo en la tasa de desgaste sino también en el coeficiente de fricción, demostrando un adecuado comportamiento tribológico. Por último, se presentó una disminución en la dureza y módulo de los recubrimientos debido a la plata, pero se mantuvo una adecuada adherencia de los recubrimientos sobre los sustratos.
- Se observó un excelente comportamiento biológico de los recubrimientos, con liberaciones de iones Ag^+ considerablemente inferiores a los límites citotóxicos, una muy alta viabilidad celular, una adhesión celular reducida con respecto a los sustratos de Ti6Al4V y una elevada actividad antibacteriana asociada a la presencia de plata, especialmente para el

recubrimiento 10TiO₂-Ag. Lo anterior describe un potencial formidable de los recubrimientos multicapa para ser aplicados en el campo biomédico como implantes no permanentes.

TRABAJO FUTURO

Un estudio a profundidad de los muchos parámetros empleados durante la realización de este trabajo podría nutrir el desarrollo de materiales aún más modulables en términos de la microestructura y propiedades físicas y químicas, para poder así, dirigir y enfocar la aplicación de implantes no temporales a tiempos y lugares de implantación específicos en el cuerpo humano. Asimismo, estudios *in vivo* podrían complementar de manera extensa las excepcionales propiedades biológicas encontradas en los recubrimientos obtenidos.

REFERENCIAS

- [1] G. Reith *et al.*, “Metal implant removal: benefits and drawbacks - a patient survey,” *BMC Surg.*, vol. 15, no. 1, Aug. 2015.
- [2] G. Bhardwaj and T. J. Webster, “Reduced bacterial growth and increased osteoblast proliferation on titanium with a nanophase TiO₂ surface treatment,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 12, pp. 363–369, 2017.
- [3] M. Niinomi, “Design and development of metallic biomaterials with biological and mechanical biocompatibility,” *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 107, no. 5, pp. 944–954, May 2019.
- [4] A. Rajyalakshmi, B. Ercan, K. Balasubramanian, and T. J. Webster, “Reduced adhesion of macrophages on anodized titanium with select nanotube surface features,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 6, pp. 1765–1771, 2011.
- [5] X. Zhao, M. Niinomi, M. Nakai, T. Ishimoto, and T. Nakano, “Development of high Zr-containing Ti-based alloys with low Young’s modulus for use in removable implants,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 31, no. 7, pp. 1436–1444, Oct. 2011.
- [6] C. L. Romanò, H. Tsuchiya, I. Morelli, A. G. Battaglia, and L. Drago, “Antibacterial coating of implants: are we missing something?,” *Bone Joint Res.*, vol. 8, pp. 199–206, 2019.
- [7] J. A. Lenis, L. J. Toro, and F. J. Bolívar, “Multi-layer bactericidal silver - calcium phosphate coatings obtained by RF magnetron sputtering,” *Surf. Coatings Technol.*, vol. 367, pp. 203–211, Jun. 2019.
- [8] L. Zhao, P. K. Chu, Y. Zhang, and Z. Wu, “Antibacterial coatings on titanium implants,” *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, vol. 91, no. 1, pp. 470–480, Oct-2009.
- [9] X.-M. Cheng, B.-M. Nie, and S. Kumar, “Preparation and bioactivity of SiO₂ functional films on titanium by PACVD,” 2008.
- [10] S. Koie, M. Asakura, S. Hasegawa, T. Hayashi, T. Kawai, and T. Nagao, “Proliferation of mouse fibroblasts and osteoblastic cells on ZrO₂-, SiO₂-, and ZnO-deposited pure titanium discs using atomic layer deposition,” *Mater. Lett.*, vol. 303, Nov. 2021.
- [11] W. E. Yang and H. H. Huang, “Multiform TiO₂ nano-network enhances biological response to titanium surface for dental implant applications,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 471, pp. 1041–1052, Mar. 2019.
- [12] J. S. Hayes, U. Seidenglanz, A. I. Pearce, S. G. Pearce, C. W. Archer, and R. G. Richards, “Surface polishing positively influences ease of plate and screw removal,” *Eur. Cells Mater.*, vol. 19, pp. 117–126, 2010.
- [13] A. Martínez Rondanelli, M. A. I. Soto, and S. Mera Cerón, “Caracterización de

- pacientes con fracturas diafisarias expuestas de tibia en el Hospital Universitario del Valle,” *Rev. Colomb. Ortop. y Traumatol.*, vol. 28, no. 2, pp. 46–54, Jun. 2014.
- [14] D. Rincón-Cardozo, N. Sauza-Rodríguez, L. Padilla-Rueda, P. Rincón-Cardozo, C. Díaz-Mantilla, and C. Abril-Gaona, “Prevalencia y frecuencia de factores asociados a infección en pacientes mayores de 18 años con fracturas cerradas,” *Acta ortopédica mexicana*, Vol 30, no.3, 2016. [Online]. Available: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2306-41022016000300123. [Accessed: 09-May-2022].
- [15] P. M. Huddleston *et al.*, “Surgical site infection prevention and control: An emerging paradigm,” *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A*, vol. 91, no. SUPPL. 6. pp. 2–9, 01-Nov-2009.
- [16] D. I. Vos, M. H. J. Verhofstad, D. I. Vos, and M. H. J. Verhofstad, “Indications for Implant Removal after Fracture Healing a review of literature.”
- [17] F. M. Kovar, E. Strasser, M. Jandl, G. Endler, and G. Oberleitner, “Complications following implant removal in patients with proximal femur fractures – an observational study over 16 years,” *Orthop. Traumatol. Surg. Res.*, vol. 101, no. 7, pp. 785–789, Nov. 2015.
- [18] G. Subbiahdoss, *Bridging the gap between in vitro and in vivo evaluation of biomaterials-associated infections*. s.n.], 2010.
- [19] A. Pérez Padrón, J. Alberto Pérez Quiñones, D. Yensi Diaz Martell, R. Bello Fuentes, and D. Lisette Castillo Matheu, “Revisión Bibliográfica sobre la implantología: causas y complicaciones,” *Rev. Médica Electrónica*, vol. 42, no. 1, Jan. 2020.
- [20] C. M. Han, H. E. Kim, and Y. H. Koh, “Creation of hierarchical micro/nanoporous TiO₂ surface layer onto Ti implants for improved biocompatibility,” *Surf. Coatings Technol.*, vol. 251, pp. 226–231, Jul. 2014.
- [21] F. A. Shah, P. Thomsen, and A. Palmquist, “Osseointegration and current interpretations of the bone-implant interface,” *Acta Biomaterialia*, vol. 84. Acta Materialia Inc, pp. 1–15, 15-Jan-2019.
- [22] T. Wassmann, S. Kreis, M. Behr, and R. Buegers, “The influence of surface texture and wettability on initial bacterial adhesion on titanium and zirconium oxide dental implants,” *Int. J. Implant Dent.*, vol. 3, no. 1, 2017.
- [23] S. Calderon Velasco, A. Cavaleiro, and S. Carvalho, “Functional properties of ceramic-Ag nanocomposite coatings produced by magnetron sputtering,” *Prog. Mater. Sci.*, vol. 84, pp. 158–191, 2016.
- [24] L. Lin *et al.*, “Enhanced osteointegration of medical titanium implant with surface modifications in micro/nanoscale structures,” *J. Orthop. Transl.*, vol. 2, no. 1, pp. 35–42, 2014.
- [25] J. A. Lenis, P. Rico, J. L. G. Ribelles, M. A. Pacha-Olivenza, M. L. González-

- Martín, and F. J. Bolívar, “Structure, morphology, adhesion and in vitro biological evaluation of antibacterial multi-layer HA-Ag/SiO₂/TiN/Ti coatings obtained by RF magnetron sputtering for biomedical applications,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 116, p. 111268, 2020.
- [26] G. Benetti, E. Cavaliere, F. Banfi, and L. Gavioli, “Antimicrobial nanostructured coatings: A gas phase deposition and magnetron sputtering perspective,” *Materials (Basel)*, vol. 13, no. 3, 2020.
- [27] M. Makówka, A. Sobczyk-Guzenda, W. Pawlak, B. Wendler, M. Gazicki-Lipman, and H. Szymanowski, “Correlation between plasma parameters and structure of thin TiO₂ films deposited by conventional and pulsed magnetron sputtering methods,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 578, p. 151808, Mar. 2022.
- [28] S. Suárez *et al.*, “Parameters to be considered for the development of highly photoactive TiO₂ layers on aluminium substrates by RF magnetron sputtering for treating polluted air,” *Catal. Today*, vol. 413–415, p. 113970, Mar. 2023.
- [29] X. Chen, J. Zhou, Y. Qian, and L. Zhao, “Antibacterial coatings on orthopedic implants,” 2023.
- [30] M. A. Surmeneva *et al.*, “Incorporation of silver nanoparticles into magnetron-sputtered calcium phosphate layers on titanium as an antibacterial coating,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 156, pp. 104–113, 2017.
- [31] I. X. Yin, J. Zhang, I. S. Zhao, M. L. Mei, Q. Li, and C. H. Chu, “The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 15, p. 2555, 2020.
- [32] B. Echalar *et al.*, “Effects of antimicrobial metal nanoparticles on characteristics and function properties of mouse mesenchymal stem cells,” *Toxicol. Vitro*, vol. 87, p. 105536, Mar. 2023.
- [33] Z. Yuan, Y. He, C. Lin, P. Liu, and K. Cai, “Antibacterial surface design of biomedical titanium materials for orthopedic applications,” *J. Mater. Sci. Technol.*, vol. 78, pp. 51–67, 2021.
- [34] A. Dziejczak *et al.*, “Structure and antibacterial properties of Ag and N doped titanium dioxide coatings containing Ti₂.85O₄N phase, prepared by magnetron sputtering and annealing,” *Surf. Coatings Technol.*, vol. 393, p. 125844, Jul. 2020.
- [35] F. L. G. Marín, G. Bejarano, and G. Torres Lindarte, “Influence of silver content on microstructural, bactericidal, and cytotoxic behavior of TiAlVN (Ag) composite coatings deposited by magnetron sputtering,” *Mater. Chem. Phys.*, vol. 291, p. 126776, Nov. 2022.
- [36] Y. Xu, J. Zhang, F. Liang, M. Yin, and M. He, “Investigation of magnetron sputtered nano-silver coating on titanium surface with micro-nanostructure,” *Surfaces and Interfaces*, vol. 38, p. 102770, Jun. 2023.
- [37] K. Pérez Zapata, J. A. Lenis, P. Rico, J. L. G. Ribelles, and F. J. Bolívar,

- “Determination of synergistic effect between roughness and surface chemistry on cell adhesion of a multilayer Si - Hydroxyapatite coating on Ti6Al4V obtained by magnetron sputtering,” *Thin Solid Films*, vol. 760, no. September, 2022.
- [38] J. A. Lenis, M. A. Gómez, and F. J. Bolívar, “Effect of deposition temperature and target-substrate distance on the structure, phases, mechanical and tribological properties of multi-layer HA-Ag coatings obtained by RF magnetron sputtering,” *Surf. Coatings Technol.*, vol. 378, Nov. 2019.
- [39] J. A. Lenis *et al.*, “Mechanical, structural, and biological evaluation of multilayer HA-Ag/TiO₂/TiN/Ti coatings on Ti6Al4V obtained by magnetron sputtering for implant applications,” *Surf. Coatings Technol.*, vol. 449, p. 128925, Nov. 2022.
- [40] S. Davisdóttir, R. Shabadi, A. C. Galca, I. H. Andersen, K. Dirscherl, and R. Ambat, “Investigation of DC magnetron-sputtered TiO₂ coatings: Effect of coating thickness, structure, and morphology on photocatalytic activity,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 313, pp. 677–686, Sep. 2014.
- [41] P. Baroch, J. Musil, J. Vlcek, K. H. Nam, and J. G. Han, “Reactive magnetron sputtering of TiO_x films,” *Surf. Coatings Technol.*, vol. 193, no. 1–3, pp. 107–111, Apr. 2005.
- [42] L. Dragomir (Nicolescu) *et al.*, “Preparation and characterization of hydroxyapatite coating by magnetron sputtering on Mg–Zn–Ag alloys for orthopaedic trauma implants,” *Ceram. Int.*, vol. 49, no. 16, pp. 26274–26288, 2023.
- [43] C. Lorenz, J. G. Brunner, P. Kollmannsberger, L. Jaafar, B. Fabry, and S. Virtanen, “Effect of surface pre-treatments on biocompatibility of magnesium,” *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 7, pp. 2783–2789, 2009.
- [44] K. Mustafa, B. S. Lopez, K. Hultenby, A. Wennerberg, and K. Arvidson, “Attachment and proliferation of human oral fibroblasts to titanium surface blasted with TiO₂ particles,” *Clinical Oral Implants Research*, vol. 9, pp. 1985–207, 1998.
- [45] D. Chittinan *et al.*, “Tailoring the structural and optical properties of fabricated TiO₂ thin films by O₂ duty cycle in reactive gas-timing magnetron sputtering,” *Vacuum*, vol. 214, p. 112205, Aug. 2023.
- [46] M. A. Surmeneva *et al.*, “Nano-hydroxyapatite-coated metal-ceramic composite of iron-tricalcium phosphate: Improving the surface wettability, adhesion and proliferation of mesenchymal stem cells in vitro,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 135, pp. 386–393, 2015.
- [47] S. Gürakar, H. Ot, S. Horzum, and T. Serin, “Variation of structural and optical properties of TiO₂ films prepared by DC magnetron sputtering method with annealing temperature,” *Mater. Sci. Eng. B*, vol. 262, p. 114782, Dec. 2020.

- [48] M. B. Poudel and A. A. Kim, “Silver nanoparticles decorated TiO₂ nanoflakes for antibacterial properties,” *Inorg. Chem. Commun.*, vol. 152, no. January, p. 110675, 2023.
- [49] F. Meng and F. Lu, “Pure and silver (2.5-40 vol%) modified TiO₂ thin films deposited by radio frequency magnetron sputtering at room temperature: Surface topography, energy gap and photo-induced hydrophilicity,” *J. Alloys Compd.*, vol. 501, no. 1, pp. 154–158, 2010.
- [50] J. Banas-Gac, M. Radecka, A. Czapla, E. Kusior, and K. Zakrzewska, “Surface and interface properties of TiO₂/CuO thin film bilayers deposited by rf reactive magnetron sputtering,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 616, no. August 2022, p. 156394, 2023.
- [51] S. Ferraris *et al.*, “Antibacterial inorganic coatings on metallic surfaces for temporary fixation devices,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 508, no. October 2019, 2020.
- [52] Y. Liu, W. Zhang, Y. Sun, and W. Liang, “Diffusion behavior of Ag in TiO₂ nanofilms,” *Mater. Res. Bull.*, vol. 98, no. August 2017, pp. 240–249, 2018.
- [53] H. D. an Mejía V, A. M. Echavarría, J. A. Calder on, and G. G. Bejarano, “Microstructural and electrochemical properties of TiAlN(Ag,Cu) nanocomposite coatings for medical applications deposited by dc magnetron sputtering,” 2020.
- [54] T. Karabacak, “Thin-film growth dynamics with shadowing and re-emission effects,” *J. Nanophotonics*, vol. 5, no. 1, p. 052501, 2011.
- [55] D. Cavaleiro *et al.*, “The role of interfaces and morphology on silver diffusion in hard coatings,” *Surfaces and Interfaces*, vol. 41, p. 103182, Oct. 2023.
- [56] J. Kulczyk-Malecka *et al.*, “Investigation of silver diffusion in TiO₂/Ag/TiO₂ coatings,” *Acta Mater.*, vol. 66, pp. 396–404, Mar. 2014.
- [57] B. S. Lou *et al.*, “High power impulse magnetron sputtering (HiPIMS) for the fabrication of antimicrobial and transparent TiO₂ thin films,” *Curr. Opin. Chem. Eng.*, vol. 36, p. 100782, Jun. 2022.
- [58] C. N. Elias, Y. Oshida, J. H. C. Lima, and C. A. Muller, “Relationship between surface properties (roughness, wettability and morphology) of titanium and dental implant removal torque,” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 1, no. 3, pp. 234–242, 2008.
- [59] W. Chen *et al.*, “In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 32, pp. 5512–5517, 2006.
- [60] S. Berg and T. Nyberg, “Fundamental understanding and modeling of reactive sputtering processes,” *Thin Solid Films*, vol. 476, no. 2, pp. 215–230, Apr. 2005.
- [61] A. Rossouw *et al.*, “Ti and TiO₂ magnetron sputtering in roll-to-roll fabrication of hybrid membranes,” *Surfaces and Interfaces*, vol. 31, p. 101975, Jul. 2022.
- [62] S. H. Nam *et al.*, “Comparison of hydrophilic properties of TiO₂ thin films

- prepared by sol–gel method and reactive magnetron sputtering system,” *Thin Solid Films*, vol. 519, no. 20, pp. 6944–6950, Aug. 2011.
- [63] Y. Xie, X. Zhao, H. Tao, Q. Zhao, B. Liu, and Q. Yuan, “The influence of O₂ partial pressure on the structure and surface wettability of C-modified TiO₂ films prepared by magnetron co-sputtering,” *Chem. Phys. Lett.*, vol. 457, no. 1–3, pp. 148–153, May 2008.
- [64] L. Gui *et al.*, “Difference and association of antibacterial and bacterial anti-adhesive performances between smart Ag/AgCl/TiO₂ composite surfaces with switchable wettability,” *Chem. Eng. J.*, vol. 431, no. December 2021, 2022.
- [65] A. M. Echavarría, P. Rico, J. L. Gómez Ribelles, M. A. Pacha-Olivenza, M. C. Fernández-Calderón, and G. Bejarano-G, “Development of a Ta/TaN/TaN_x(Ag)_y/Ta_n nanocomposite coating system and bio-response study for biomedical applications,” *Vacuum*, vol. 145, pp. 55–67, 2017.
- [66] M. Mazur, “Analysis of the properties of functional titanium dioxide thin films deposited by pulsed DC magnetron sputtering with various O₂:Ar ratios,” *Opt. Mater. (Amst.)*, vol. 69, pp. 96–104, 2017.
- [67] ASTM, “Standard Test Method for Vickers Indentation Hardness of Advanced Ceramics 1,” 2023.
- [68] N. Vidakis, A. Antoniadis, and N. Bilalis, “The VDI 3198 indentation test evaluation of a reliable qualitative control for layered compounds,” *J. Mater. Process. Technol.*, vol. 143–144, no. 1, pp. 481–485, 2003.
- [69] E. Broitman and L. Hultman, “Adhesion improvement of carbon-based coatings through a high ionization deposition technique,” *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 370, no. 1, 2012.
- [70] D. GORMAN, C. GREEN, T. FRY, and M. GEE, “ROCKWELL INDENTATION TEST FOR EVALUATION OF ADHESION OF COATINGS - AKA DAIMLER-BENZ ADHESION TEST,” Teddington, 2022.
- [71] B. D. Beake, “The influence of the H/E ratio on wear resistance of coating systems – Insights from small-scale testing,” *Surf. Coatings Technol.*, vol. 442, p. 128272, Jul. 2022.
- [72] M. Birkett *et al.*, “Multi-functional bioactive silver- and copper-doped diamond-like carbon coatings for medical implants,” *Acta Biomater.*, no. xxxx, 2023.
- [73] P. P. Jing, Y. H. Su, Y. X. Li, W. L. Liang, and Y. X. Leng, “Mechanism of protein biofilm formation on Ag-DLC films prepared for application in joint implants,” *Surf. Coatings Technol.*, vol. 422, no. July, 2021.
- [74] N. Xiao, C. Zhang, X. Yin, K. Yang, F. Zhang, and B. Xiong, “Soft metal micro/nanolubricant in tribology,” *Mater. Sci. Eng. B*, vol. 295, no. June, p. 116600, 2023.

- [75] M. S. Jadon, G. Bhanjana, N. Dilbaghi, N. K. Singhal, and S. Kumar, "Fabrication and evaluation of silver-doped magnesium oxide nanocomposite coatings for orthopaedics applications," *J. Alloys Compd.*, p. 172848, Nov. 2023.
- [76] C. Sengstock, J. Diendorf, M. Epple, T. A. Schildhauer, and M. Köller, "Effect of silver nanoparticles on human mesenchymal stem cell differentiation," *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 5, no. 1, pp. 2058–2069, 2014.
- [77] A. Peetsch *et al.*, "Silver-doped calcium phosphate nanoparticles: Synthesis, characterization, and toxic effects toward mammalian and prokaryotic cells," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 102, pp. 724–729, 2013.
- [78] J. Liu *et al.*, "Ti6Al4V biomimetic scaffolds for bone tissue engineering: Fabrication, biomechanics and osseointegration," *Mater. Des.*, vol. 234, p. 112330, Oct. 2023.
- [79] H. Huang *et al.*, "Biocompatibility of micro/nano structures on the surface of Ti6Al4V and Ti-based bulk metallic glasses induced by femtosecond laser," *Biomater. Adv.*, vol. 139, p. 212998, Aug. 2022.
- [80] S. Mohanbaba and S. Gurunathan, "Differential biological activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria: A novel approach for antimicrobial therapy," *Nanobiomaterials Antimicrob. Ther. Appl. Nanobiomaterials*, pp. 193–227, Jan. 2016.