



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

**SÍNTESIS E INMOVILIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE
SUBSTRATOS DE TITANIO POROSO CON POTENCIAL USO EN
MATERIALES IMPLANTABLES**

Juliana Gaviria Restrepo

Universidad de Antioquia

Corporación Ciencias Básicas Biomédicas

Medellín, Colombia

Año 2020



Síntesis E Inmovilización De Nanopartículas De Plata Sobre Substratos De Titanio Poroso
Con Potencial Uso En Materiales Implantables

Juliana Gaviria Restrepo

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al
título de:

Magister en Ciencias Básicas Biomédicas

Asesores (a):

Junes Abdul Villarraga¹, Ingeniero Mecánico; Yadir Torres Hernández, Ingeniero en
Materiales ²; Freimar Segura Sánchez ³; Químico Farmacéutico; José Antonio Rodríguez ⁴,
Ingeniero en Materiales

Línea de Investigación: énfasis Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa
Grupo de Investigación: Biomateriales Avanzados y Medicina Regenerativa
BARM

Universidad de Antioquia
Corporación Ciencias Básicas Y Biomédicas

Medellín, Colombia
2020

(Dedicatoria)

Les doy gracias a Dios, a mi madre Ángela Patricia Restrepo y mi hermana Verónica Gaviria Restrepo. Quienes han sido mi motivación y constante compañía. A mí muy querido amigo Oscar Lopera quien le da alegría a mis días y me acompaña a culminar este ciclo de aprendizaje. Y en memoria de mi querido profesor Juan José Pavón al cual le debo y agradezco la oportunidad y confianza de emprender mi proceso académico de maestría. Q.E.P.D

“las personas que saben a café les brillan los ojos, la esencia la humildad...” Jessica Gonzales

RESUMEN.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 Planteamiento del problema.....	11
1.2 Justificación.....	15
2. MARCO TEÓRICO.....	18
2.1 Biomateriales.....	18
2.1.1 El tejido óseo.....	18
2.1.2 Biomateriales para sustitución ósea.....	23
2.1.3 Clasificación de Biomateriales.....	24
2.1.4 Modificación superficial de Ti.....	25
2.2 Nanopartículas.....	26
2.2.1 Síntesis y métodos de preparación de NpsAg.....	30
2.2.2 Modificación superficial en NpsAg.....	36
2.2.3 Estabilidad del sistema coloidal NpsAg.....	36
2.2.4 Caracterización de NpsAg.....	38
2.3 Mecanismo de funcionalización por silanización sobre Ti.....	40
3. OBJETIVOS.....	42
3.1 Objetivo general.....	42
3.2 Objetivos específicos.....	42
4. METODOLOGÍA.....	43
4.1 Síntesis de NPsAg por reducción química.....	43
4.1.1 Caracterización de NpsAg.....	44
4.2 Modificación superficial Titanio macizo.....	45
4.3 Modificación superficial Titanio Poroso.....	¡Error! Marcador no definido.
4.3.1 Pulido Mecánico –Preparación superficial de Ti poroso.....	46
4.3.2 Caracterización superficial de Titanio modificado con NpsAg.....	47
4.3.3 Evaluación capacidad bactericida de titanio poroso modificado NpsAg.....	48
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
5.1 Sistema coloidal de NpsAg.....	49
5.1.1 Identificación de Ag en suspensión coloidal.....	51
5.1.2 Identificación de Potencial Z, Distribución de Tamaño y Estabilidad de NpsAg.....	54
5.1.3 Imágenes TEM y EDX de suspensión coloidal NpsAg.....	58

5.2	Caracterización superficial de Ti macizo y poroso.....	62
5.2.1	Caracterización superficial de titanio macizo modificado con NpsAg.....	65
5.2.2	Caracterización de superficie de titanio poroso modificada con NpsAg	67
5.3	Actividad antibacteriana de NpsAg inmovilizadas sobre titanio.....	79
5.1	Análisis descriptivo de los datos	82
6.	CONCLUSIONES	93
7.	REFERENCIAS.....	95
8.	ANEXOS.....	113

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Probabilidad de fallo en función de la vida útil del implante tomado de Shibata et al. 2015 (33)	16
Figura 2 Representación esquemática de la estructura ósea (58)	20
Figura 3. Ilustración de la organización y formación del tejido óseo con sus componentes orgánicos (1)	20
Figura 4. Mecanismos de regulación de masa ósea (57).....	23
Figura 5. Clasificación de NpsAg antimicrobianas (18)	27
Figura 6. Mecanismos de acción antibacterianos de los sistemas nanoparticulados (34).....	28
Figura 7. Materiales para fabricación de Nanopartículas antibacterianas (18)	29
Figura 8. Métodos obtención de Nps Top-down y Bottom up (75)	30
Figura 9. Distribución de tamaño de Nps sintetizadas en sistemas coloidales de Ag (100)	32
Figura 10. Método de Síntesis de NpsAg por reducción química modificado de (110)....	32
Figura 11. Métodos organometálicos de síntesis de nanopartículas de plata (121).....	34
Figura 12. Modelo Helmholtz. a) Repulsión, distancia entre partículas es mayor (línea roja) a la distancia de la doble capa (flecha verde). b) Interacción, ambas dobles capas se traslapan indicando su fusión (línea roja) cercanía de partículas (121).....	37
Figura 13. Representación esquemática de la silanización superficial de Ti	40
Figura 14. Funcionalización de material orgánico por silanización (135).....	41
Figura 15. Proceso de síntesis por reducción química de sistema nanoparticulado de plata.	43
Figura 17 Equipo Pulido Mecánico Buehler Cidemat, para muestras de Titanio.....	47
Figura 18. Representación de zona de inhibición bacteriana Staphylococcus aureus	48
Figura 19. Sistema coloidal nanoparticulado de plata por reducción química.....	50
Figura 20 Absorbancias para sistemas nanoparticulados sintetizados por reducción química. a) medición realizada después de 10 min. b) medición realizada después de 2 meses.....	52
Figura 21 Espectros de DLS a) Potencial Z de suspensión en contacto(L-b) y b) Tamaño de NpsAg en suspensión sumergida en (L-b). c) Potencial Z de suspensión en contacto (L-a). d) Tamaño de partícula suspensión en contacto con(L-a).....	55
Figura 22. Espectros de rayos X de dispersión de energía (EDX) de partículas sintetizadas NpsAg 15ml con 0.002M AgNO ₃ (a,d,g). Micrografías electrónicas de transmisión TEM (b,e,h) e histogramas de distribución de tamaño de NpsAg (c,f,i).	60
Figura 23. Espectros de EDS de las suspensiones de NpsAg elaboradas metodo sumergido y in situ. Síntesis de NpsAg a) condiciones de reducción húmeda sumergido b) reducción húmeda in situ.	62
Figura 24. Micrografías Tratamiento L-a: En 5M de NaOH a 60°C por 24 h a) NpsAg distribuidas en superficie de Ti macizo. b) NpAg-Ti, c) Superficie hidroxilada con NaOH y NpsAg, d) EDS agregado de Ag. e) Analisis EDS identificación química de Ti modificado con Ag y Si	65

Figura 25. Micrografías ópticas con aumento de 50x con tamaño de poro 100-200 μm y 355-500 μm , para distintas densidades de poro 30%, 40%, 60%. a) 30% vol. 355-500 μm , b) 30% 100-200 μm , c) 40% vol. 355-500 μm , d) 40% vol.100-200 y e) 60% vol. 355-500 μm , f) 60% vol. 100-200 μm	68
Figura 26. Titanio poroso pulido sin NpsAg a) Ti-NpsAg b) Densidades de poros de 1:60%, 2:40%, 3:30%.....	69
Figura 27. Micrografías TEM micrografias de superficie de titanio poroso. a) superficie de titanio silanizado atacado por tratamiento L-a, 5M de NaOH a 60°C por 24 h. b) Espectro EDS, presencia de grupos Ti y Si. c) Ti silanizado con NpsAg , d) espectro EDS que establece la presencia de NpsAg y silanos. e), f) y g) Mapeo de compuestos cuadro amarillo Ag ,verde Si y verde azul Ti.	71
Figura 28. Micrografías SEM micrografias de superficie de titanio poroso. a) Ti grabado con "solución de piraña" tratamiento B, durante 1,5 horas a 75°C, solución de piraña: 3:7 peróxido de hidrógeno al 30%; ácido sulfúrico. b) Espectro EDS, presencia de grupos silanos en superficie de Ti poroso. c) Ti-NpsAg , d) espectro EDS que establece la presencia de Ag y silanos atacada por "Piraña". Y Mapping comopsicional representado por el cuadros color amarillo indican presencia de Ag en superficie, verde silanos y verde azul titanio.	73
Figura 29. Micrografias SEM densidades de poro 30%, 40%, 60%. Micrografías SEM micrografias de superficie de titanio inmovilizadas con NpsAg, grabada con "solución de piraña" durante 1,5 horas a 75°C, solución de piraña: 3:7 y peróxido de hidrógeno 30% con ácido sulfúrico	76
Figura 30. Las muestras de Ti c.p macizo modificadas superficialmente con NpsAg, efecto antibacteriano dentro del círculo rojo, zona inhibición de bacteria Gram-positiva Staphylococcus aureus (ATCC 25923).	80
Figura 31. Efecto antibacteriano frente a la bacteria Gram-positiva Staphylococcus aureus (ATCC 25923) en substratos de Ti-NpsAg poroso, a) Ti-Si control negativo ausencia zona inhibición bacteriana, b) Ti-NpsAg poroso con zona inhibición bacteriana, c) disco Ti-Si ausencia zona inhibición bacteriana, d) zona inhibición bacteriana disco Titanio con NpsAg.	81
Figura 32. Formación de Halo de Inhibición vs % de densidad.....	90

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición ósea. Modificado del Atlas de la anatomía humana (57).	19
Tabla 2. Clasificación de técnicas bottom-up (100)	31
Tabla 3. Metodologías de síntesis de NPs Ag (76), (122)	35
Tabla 4. Estrategias de modificación superficial de implantes según el comportamiento bacteriano (136)(137)	41
Tabla 5 Representación esquemática de preparación de la superficie de Ti poroso	46
Tabla 6 Potencial Zeta (ZP), Tamaño de Partícula (T), Índice de Polidispersidad (PDI) de NpsAg	57
Tabla 7. Modificación estructural de superficies de titanio atacadas químicamente con tratamiento L-a (NaOH) y tratamiento L-b (Piraña) ambas desprovistas de NpsAg para superficies de titanio 100-200 μm , 355-500 μm , y densidades 30% -40%-60%.....	64
Tabla 8. Resumen de comparación de medias para % de densidad vs Ti.	82
Tabla 9. Resumen de Análisis Descriptivo para % densidad de Ti.	83
Tabla 10. Resumen de muestras de Ti para para densidades 30%, 40, 60%.	83
Tabla 11. Resumen de prueba de Normalidad para Ti con densidades 30%, 40, 60%.	84
Tabla 12. Resumen de prueba de Homocedasticidad para Densidad.....	84
Tabla 13. Resumen de Análisis Descriptivo para % densidad de Ti.	85
Tabla 14. Resumen de Tamaños de poros evaluados en Ti-NpsAg.....	85
Tabla 15. Resumen de prueba de Normalidad para Tamaño μm	86
Tabla 16. Resumen de prueba de Homocedasticidad para % Densidad.	86
Tabla 17. ANOVA - % de Densidad.	87
Tabla 18. ANOVA – Tamaño de Poro.	88
Tabla 19. Resumen descriptivo de análisis de Factores inter-sujetos (% densidad vs tamaño).	88
Tabla 20. Pruebas ANOVA independiente (Inhibición~Densidad*Tamaño).	89
Tabla 21. Pruebas ANOVA con Interacción (Inhibición~Densidad*Tamaño).	89

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Micrografías TEM de superficie de titanio grabado con "solución de piraña" tratamiento B, durante 1,5 horas a 75°C. Equivalen a las figuras blanco y negro. Los espectros son el análisis EDS que establece la presencia de Ag y silano y titanio.....	113
Anexo 2. Micrografías TEM de superficie de titanio grabado con "solución de piraña" tratamiento B, durante 1,5 horas a 75°C. Equivalen a las figuras blanco y negro. Figuras color Rojo (mappig presencia de Oxígeno), verde (Titanio), amarillo (Ag) que valida presencia de Ag. Los espectros son el análisis EDS que establece la presencia de Ag y silano y titanio.....	114
Anexo 3. Micrografías TEM micrografías de superficie de titanio poroso. Figuras izquierda, Ti grabado con "solución de piraña" tratamiento B, durante 1,5 horas a 75°C, solución de piraña: 3:7 peróxido de hidrógeno al 30%; ácido sulfúrico. Y figura de la derecha espectro EDS que establece la presencia de Ag y silanos.	115
Anexo 4. Micrografías Tratamiento A: En 5M de NaOH a 60°C por 24 h, a la izquierda superficie de Ti atacada con NaOH, formación de nanoporos. Y derecha EDS identificación de presencia de la silanización del sustrato de interés.	116
Anexo 5. Micrografías Tratamiento A: En 5M de NaOH a 60°C por 24 h, a la izquierda superficie de Ti atacada con NaOH. Y derecha EDS identificación de presencia de la silanización del sustrato de interés e inmovilización de NpsAg.	116
Anexo 6. Formación de Halo de Inhibición vs Porcentaje de densidad de Ti poroso. ...	117
Anexo 7. Formación de Halo de Inhibición Vs Tamaño de poro de Ti.	117
Anexo 8. Formación de Halo de Inhibición según propiedades intrínsecas del material	118

RESUMEN

Los biomateriales implantados como el titanio (Ti) c.p desempeñan un papel clave en el éxito actual de los procedimientos ortopédicos. La modificación superficial a micro y nano escala revela tener un efecto beneficioso en su biocompatibilidad ya que permite el crecimiento del hueso hacia el interior del implante manteniendo los requisitos mecánicos de los tejidos óseos corticales. No obstante, las metodologías requeridas para la texturización aún no se encuentran comercialmente disponibles, dado sus altos costos y/o su falta de validación clínica. En general, los implantes de Ti son biocompatibles y permiten el crecimiento óseo de manera ordenada, pero, en los cinco años posteriores a la implantación, 5-10% fracasan a raíz de una osteointegración deficiente. En particular, los fallos biomecánicos pueden favorecer infecciones bacterianas. Por todo lo anterior, existe una creciente necesidad de mejorar la biocompatibilidad para evitar segundas cirugías y asegurar tiempos de recuperación más cortos. En este trabajo se sintetizaron nanopartículas de plata (NpsAg) para su posterior inmovilización sobre sustratos de titanio poroso (i.e. 100-500 μm), los cuales podrían tener un uso potencial como materiales implantables. Se ha observado que las NpsAg tienen propiedades antibacterianas y podría evitar la colonización durante los siguientes 30 días al implante, tiempo ideal para prevenir la infección en las etapas tempranas e intermedias. Las NpsAg se sintetizaron por reducción química húmeda con NaBH_4 , a partir de AgNO_3 y se caracterizaron por espectroscopia de absorción UV-vis, dispersión de luz dinámica (DLS) y dispersión de luz electroforética (ELS). Se obtuvo una suspensión coloidal de NpsAg (i.e. 30-119,5 nm), por metodologías “*in situ*” y “*sumergido*” respectivamente, medianamente polidispersas (PDI 0,332-0,407). La inmovilización en los sustratos de Ti poroso se realizó por silanización con APTES (i.e. $\text{C}_9\text{H}_{23}\text{NO}_3\text{Si}$), previa hidroxilación con hidróxido de sodio o solución piraña (i.e. NaOH y H_2O_2 / H_2SO_4). El Ti así funcionalizado se caracterizó por microscopía electrónica de barrido (SEM) acoplado a espectroscopia de dispersión de energía (EDX). Se evidenciaron cambios anisotrópicos en la topografía de los sustratos de titanio tratados con NaOH y superficies suaves con grandes regiones cóncavas y convexas en los sustratos tratados con solución piraña, características que han sido asociadas al favorecimiento de la osteointegración. Los sustratos funcionalizados con NpsAg mostraron actividad anti-bacteriana en cultivos de *Staphylococcus aureus*, donde se observaron halos de inhibición evidentes. En conclusión, se obtuvo un sistema nanoparticulado que pudo ser inmovilizado en sustratos de titanio poroso, el cual mostró una actividad antibacteriana que sugiere un gran potencial como posible material biocompatible en injertos con fines ortopédicos.

Palabras claves: Nanopartículas de plata, titanio poroso, material implantable.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del problema

El hueso es el tejido del sistema músculo-esquelético con una mayor frecuencia de reemplazos. Esto se asocia mayormente a compromisos patológicos derivados del envejecimiento y de los traumas (v.gr. accidentes de tránsito, deportes de impacto, etc.), o ambos. Las prácticas clínicas más frecuentes para reparación ósea son la implantología dental, las artroplastias parciales y totales (v.gr. hombro, codo, cadera, rodilla, columna) y la fijación de fracturas u osteosíntesis. En particular para pacientes jóvenes donde el material estará sometido a niveles de esfuerzo significativos durante más tiempo (1).

Los biomateriales implantados desempeñan un papel clave en el éxito actual de los procedimientos ortopédicos. La modificación superficial a micro y nano escala revela tener un efecto beneficioso al modificar la morfología superficialmente favoreciendo la adhesión de osteoblastos y otros procesos de osteointegración, en especial entre la interfase implante-tejido. La modificación química superficial también es utilizada particularmente en la conversión química de titanio bioinerte a bioactivo, mejorando procesos de funcionalización superficial ya sea con células, factores de crecimiento, entre otras moléculas inertes como las nanopartículas.

No obstante, dichos desarrollos tecnológicos aún no se encuentran comercialmente disponibles dado sus altos costos o la falta de validación clínica para dichas superficies. Por ello, se requieren estudios médicos que respalde el uso de superficies de implantes mejoradas (2). Entre el 5 y 10% de los implantes de Ti fallan a raíz de una osteointegración deficiente, siendo más frecuente entre los 5 años posteriores a la implantación (1). Es claro que la mayoría de estas fallas indican la necesidad de desarrollar biomateriales con propiedades superficiales que favorezcan su osteointegración, adaptación al hueso e interacción con el tejido circundante.

El Ti comercialmente puro (c.p.) se ha considerado un caso especial dentro de los materiales biocompatibles, ya que, una vez se introduce en tejido duro, como el hueso, permite su crecimiento de manera ordenada aún en contacto directo. Este efecto se deriva de interacciones entre el microambiente celular y la superficie del material (3). A partir de estas observaciones, se han venido implementando múltiples estrategias para la mejora de las propiedades superficiales de los implantes. Sin embargo, a pesar de los enormes esfuerzos en esa dirección; sigue siendo un reto alcanzar el equilibrio biomecánico y biofuncional, sin comprometer el éxito clínico. Los fallos biomecánicos aparecen por la diferencia entre el módulo de Young del implante y del tejido óseo, lo cual conduce a un desajuste mecánico de apantallamiento de tensiones o "*stress-shielding*" (4) y a una consecuente carga prematura o excesiva, reabsorción ósea, disminución de la densidad del hueso adyacente, e incremento de la probabilidad de fractura. El daño estructural del implante por una mala selección del material o diseño, también son

frecuentemente asociados a fallos por fatiga. Como factores propios a controlar pueden ser la degradación de la resistencia mecánica y la fatiga (14) (15), la presencia de poros y el efecto de la concentración de esfuerzos a su alrededor, así como cambios microestructurales durante los procesos de fabricación de material a altas temperatura.

Entre las metodologías que pueden dar solución al apantallamiento de tensiones están aquellas dirigidas al desarrollo de materiales con un módulo de Young cercano al hueso, a saber: i) matriz cerámica (6); ii) acero inoxidable 316L poroso (7); iii) aleación cromo-cobalto, iv) aleación titanio-beta metaestable (8), v) magnesio y aleaciones (9), vi) materiales porosos y espumas (10). Adicionalmente, se ha tratado de mejorar las propiedades porosas a través de metodologías como i) técnicas de sinterización, ii) inyección directa gas-metal o agentes espumantes (11); iii) moldeo por enfriamiento direccional (12) y iv) técnicas de obtención de metales porosos en función gradiente (13).

Por su parte, los fallos biofuncionales se relacionan principalmente a problemas que ocurren en la intercara implante-hueso, a saber: micro-movimientos excesivos que inhiben la formación del hueso nuevo, osteointegración deficiente y/o la sobre manipulación durante el acto quirúrgico. Como resultado se da la formación de una capa fina de tejido fibroso y posterior encapsulación. Las infecciones tempranas post-quirúrgicas pueden llevar a la formación y acumulación de una placa bacteriana que impide una buena cicatrización, haciéndola muy lenta (i.e. >1 año). De lo anterior se explica la creciente necesidad de evitar segundas cirugías, así como asegurar tiempos de recuperación y de carga más cortos (v.gr. implantes de carga inmediata).

Existen ventajas y beneficios de implantes fabricados con materiales biodegradables, siendo la esperanza de muchos investigadores en el campo de la biomedicina (16). Los primeros estudios en materiales biodegradables comenzaron a finales del siglo XIX. Por ejemplo, el estudio del material a base de magnesio, el cual está rompiendo el paradigma de la ciencia del biomaterial (16). Entre otros, se encuentran los materiales utilizados para la fabricación de andamios, "*scaffolds*", reabsorbibles, muy útiles para la ingeniería de tejidos. Por ejemplo los biocerámicos porosos biodegradables a base de fosfato y los poliésteres alifáticos (v.gr. ácido poli-láctico, PLA; ácido poliglicólico o PGA). Sin embargo, su escasa resistencia mecánica comparada con el hueso humano proporciona una oportunidad a los metales biocompatibles para ser un nuevo referente en la fabricación de *scaffolds*, tejidos óseos y cartilagosos (16).

Por otro lado se encuentra el desarrollo de materiales porosos, que permiten la colonización de osteoblastos al interior de su estructura, dando lugar al crecimiento de nuevo hueso. Los poros interconectados permiten el transporte de líquidos y nutrientes a los tejidos dañados o heridos, mejorando su crecimiento en el interior del implante y favoreciendo su osteointegración e interacción al medio circundante. Al final se obtienen implantes ortopédicos que ofrecen un soporte de carga adecuado para la sustitución ósea (17)(18).

Materiales como el magnesio (Mg), hierro (Fe) y el cinc (Zn), son una buena opción para reemplazo óseo. Con un módulo elástico del Mg (41-45 GPa) semejante al del tejido óseo cortical, si se lo compara con la rigidez del Zn y Fe (211,4 GPa y 90 GPa, respectivamente) (2)(14). Sin embargo, a pesar de dichas bondades y uso en materiales con aleaciones a base de Mg, se destacan efectos negativos como una pobre resistencia a la fatiga, así como una alta tasa de degradación y consecuente pérdida de propiedades mecánicas.

Finalmente, y como alternativas para una mejor interacción intercara implante/hueso, se requiere superar fallos tardíos asociados a las propiedades superficiales de los biomateriales. Se han implementado múltiples estrategias dirigidas a favorecer la osteointegración y la cicatrización del tejido óseo, disminuyendo la posibilidad de colonización por bacterias.

Las variables más estudiadas son la microestructura, propiedades mecánicas y la composición química del material. En particular la inmovilización de proteínas (v.gr fibronectina o vitronectina) o de moléculas que favorezcan la respuesta celular, siguen siendo los principales elementos para facilitar la adhesión, y la diferenciación de células formadoras de hueso (19). A continuación, se citan algunos estudios, donde se exponen diferentes rutas para la obtención de material con potencial uso de sustitución ósea:

- Manipulación de la rugosidad y textura de la superficie del implante (20) a través de medios de diferente naturaleza que normalmente están encaminados a alcanzar los parámetros de rugosidad adecuados. Entre las metodologías más utilizadas están: la proyección de partículas de titanio por plasma, el granallado o arenado (21), generación de recubrimientos y/o superficies porosas y tratamientos químicos y electroquímicos (22). En el caso de estas últimas, Pavón *et al.* (23) expone cómo al utilizar inhibidores orgánicos durante el ataque con ácido fluorhídrico (HF), además de lograr parámetros deseados de rugosidad, permite obtener morfologías superficiales que favorecen la adhesión de los osteoblastos. En ese trabajo también se obtienen capas porosas de Ti c.p. por “*spark anodizing*”, mostrando el gran potencial para mejorar la adhesión celular, especialmente por pequeñas adiciones de fluoruro de sodio (NaF) a mezclas con electrolitos de ácido sulfúrico (H₂SO₄) y ácido fosfórico (H₃PO₄).
- Modificación química y estructural de la superficie en el contacto implante-hueso. Las técnicas más utilizadas son: recubrimiento bioactivo de hidroxiapatita (HA) sintética o vidrios bioactivos (24), conversión química del titanio bioinerte a bioactivo, biofuncionalización con proteínas específicas y factores de crecimiento óseo. Los factores de crecimiento de mayor uso que favorecen la adhesión son las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), el factor transformante (TGF), los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (25). Finalmente, se ha usado síntesis por irradiación dirigida (DIS), la cual permite manipular superficies de materiales usando fuentes de modificación

basadas en iones y bajo condiciones no térmicas. Y la radiación de partículas cargadas que provocan estructuras o patrones de topografía única a escala nanométrica por “sputtering” (26); esto permite crear intercaras avanzadas, de mayor similitud en estructuras reales y multifuncionales, así como diseños de superficies nanoestructuradas útiles en ingeniería y biología celular (27).

Por lo anterior, el desarrollo de superficies nanoestructuradas puede mitigar riesgos de colonización microbiana como lo indican los estudios de Geissler *et al.* (28) y Groessner-Schreiber *et al.* (29). Así como promover la adhesión de fibroblastos y queratinocitos para mejorar la cicatrización y la formación del epitelio, sobre el implante. A ésta estrecha interrelación se le conoce como “sellado biológico”, la cual es conocida en implantes dentales, impidiendo la entrada de bacterias y detritos alimenticios al medio interno desde la cavidad oral.

Finalmente, las superficies antibacterianas se pueden clasificar en dos grandes grupos: “antibiofouling” y bactericidas. Las superficies “antibiofouling” son aquellas que repelen las células bacterianas induciendo condiciones desfavorables ya sea de manera física o química. Las superficies bactericidas son las que eliminan las células bacterianas por agentes químicos que interrumpen su contacto causando la muerte celular y evitan su proliferación (30). Las NpsAg exhiben propiedades antibacterianas y fungicidas. Tienen la capacidad de acumularse en la pared celular de las bacterias y liberar iones de Ag que penetran en las células gracias a su tamaño nanométrico. Diversas técnicas han sido aplicadas con la plata como protagonista: películas finas de nano compuestos de Ag-SiO₂ de tipo sol gel, materiales de compuestos Ag/TiO₂ y NpsAg embebidas en matrices porosas (31)(32).

1.2 Justificación

Estudios actuales sobre NpsAg se han centrado en la implementación de novedosas plataformas de síntesis a nanoescala, así como innovadoras técnicas de obtención e incorporación de los nanomateriales en matrices de interés favoreciendo la biocompatibilidad (33). Por lo tanto, en el área de materiales para sustitución de hueso, estos juegan un papel importante en la ingeniería de biomateriales, un área de muy alta demanda (i.e. prótesis). Concretamente, cada vez toma más fuerza el desarrollo de investigaciones de biomateriales funcionalizados con NpsAg, con capacidad bactericida. Aunque las NPsAg muestran actividad antimicrobiana considerable, también existen reportes adversos, dada su capacidad de liberar iones plata en fase acuosa. La plata es un ácido débil y su tendencia es a reaccionar con bases débiles en células que contienen azufre y fósforo (v.gr. ácido desoxirribonucleico). Esto último puede ocasionar, a su vez, destrucción y muerte celular (34). Por ello se requiere un balance adecuado entre el tipo de síntesis, reactivos empleados y control de su biodisponibilidad para mitigar los posibles efectos negativos.

En los últimos años, se ha avanzado en la obtención de nanopartículas metálicas y óxidos metálicos de base plata (35), cobre (36), oro (37), óxido de cobre (38) y óxido de zinc (39), con aplicaciones clínicas, odontológicas, farmacéuticas y biológicas. Su actividad antibacteriana se centra generalmente en contrarrestar un grupo representativo de microorganismos patógenos. De modo que, el desarrollo y/o mejoramiento de las metodologías existentes que permitan garantizar la inmovilización de las NPsAg en superficies de interés, posibilitarían el desarrollo de procesos mucho más seguros, controlados y benéficos para la humanidad desde el punto de vista clínico.

Actualmente los criterios requeridos en la obtención de materiales óptimos de sustitución ósea aún no han sido estandarizados. Por ello, continúa siendo tema de investigación el desarrollo de metodologías que confieran la capacidad antibacteriana así como su biocompatibilidad, y a la vez que cumplan con los criterios de calidad, practicidad y economía. Además que permitan alcanzar la rigidez deseada sin comprometer la resistencia mecánica y la fatiga de los implantes. Para ello, es de vital importancia realizar estudios más exhaustivos sobre la correlación existente entre porosidad, microestructura de la matriz metálica (40) y el comportamiento mecánico del implante poroso (41).

Una vez se cuenta con un biomaterial con las características mecánicas y funcionales más cercanas al hueso. Se deberá analizar los posibles fallos en la intercara implante/tejido, ocasionados por infecciones potenciales (3). El tratamiento superficial de titanio poroso con NpsAg, es ideal dadas las características expuestas anteriormente (42), especialmente durante los primeros días del procedimiento de reemplazo óseo, evitando la adhesión bacteriana durante los siguientes 30 días, el cual, puede reducir el crecimiento de biofilms bacterianos desde el inicio del contacto implante-tejido. En la Figura 1 se observa como,

en los primeros días del establecimiento del implante, la presencia de infección es el primer factor que sobresale en poco tiempo del reemplazo de hueso, como lo indican estudios reportados por el equipo de Shibata *et al.* (33). Induciendo entonces a que la probabilidad de fallo sea inminente por encima de otros factores como el aflojamiento, fractura y desgaste del material.

M. Croes *et al.* hace énfasis en cómo las infecciones asociadas a implantes (IAI), son a menudo recurrentes, costosas de tratar y están asociadas con altas tasas de mortalidad (43). Recientes estudios evalúan la actividad antibacteriana, inmunogénica, osteogénica y antibacteriana utilizando recubrimientos a base de plata. En particular, el recubrimiento denominado “*electrophoretic deposition*” (EPD), es una buena opción para la biofuncionalización de implantes de titanio porosos con compuestos antibacterianos (44). Cabe resaltar que su efectividad aún es objeto de estudio ya que se han encontrado recubrimientos a base de Ag que parecen ser menos efectivos que los recubrimientos con antibióticos. Por ejemplo, se han visto efectos adversos en la respuesta inmune que podrían contrarrestar los efectos antibacterianos.

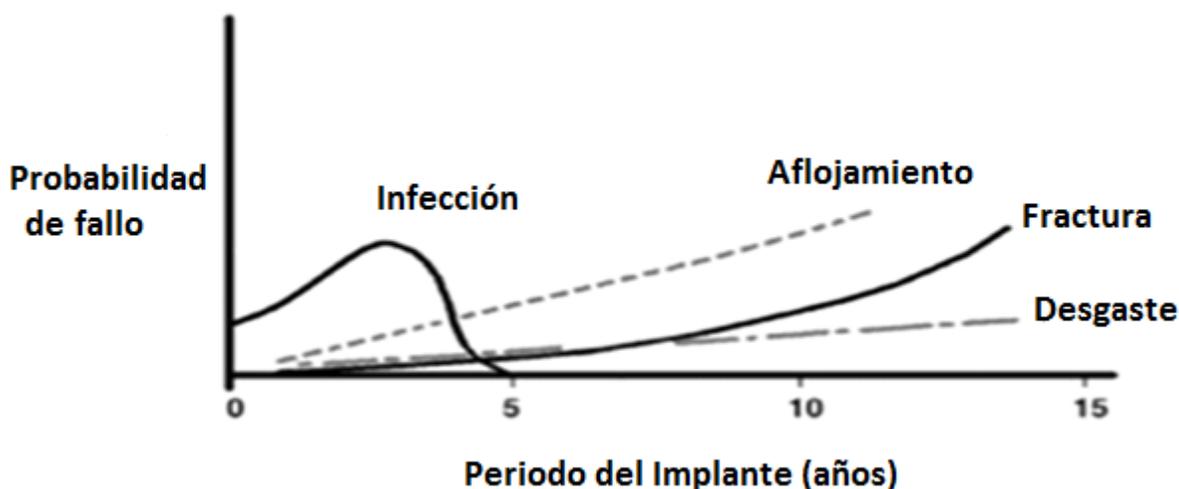


Figura 1. Probabilidad de fallo en función de la vida útil del implante. Tomado y modificado de (33).

La biocompatibilidad es otra variable importante al considerar el desarrollo de implantes de titanio inmovilizando con NpsAg. No solo debe responder adecuadamente a la resistencia mecánica y fatiga, sino que debe ser bioseguro y biofuncional. Según el sistema de nomenclatura sistemático de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), la biocompatibilidad es la “capacidad para estar en contacto con un sistema vivo sin producir un efecto adverso” (45), es decir, la habilidad del material para estar en contacto con el huésped, sin producirle un efecto desfavorable. En el caso de la sustitución ósea, la biocompatibilidad de un material dado, se referirá entonces a su capacidad para generar una buena interacción en la intercara entre el hueso y el implante, minimizando la liberación de productos corrosivos o de degradación.

Finalmente, se prevé que el mercado de biomateriales para la producción de dispositivos sustitutos de hueso crezca a 13,19% en el periodo 2016-2021, lo que se ha asociado a factores como la osteoartritis, la degeneración ósea, la obesidad, la diabetes, la preservación ósea y el tiempo de cicatrización, principalmente entre la población geriátrica. En los últimos años se ha visto un incremento en el mercado de biomateriales ortopédicos asociable al reciente desarrollo de las cirugías mínimamente invasivas (5). Si bien el mercado ha sido fuerte en las regiones de América del Norte y Europa, se espera que el crecimiento mejore, impulsado por las naciones emergentes de Asia del Pacífico entre otras (6).

Colombia es un país dependiente de la importación de dispositivos médicos. En los últimos años ha influido una caída de las importaciones especialmente de Estados Unidos, país del que proviene el 35 % de la mercancía importada que abastece al sector salud de la nación (7). A razón, que las buenas prácticas tengan una marcada tendencia actual en el desarrollo de dispositivos médicos, al que se ha sumado la industria, imprimiendo al sector salud efectividad, rapidez y desarrollo de tecnología segura (7).

En 2013, los dispositivos médicos como los implantes ocuparon el tercer lugar prevaleciendo sobre los dispositivos tipo consumible, seguido por equipos biomédicos (46)(47). En Colombia el 89% (2036 unidades) de los dispositivos son importaciones, mientras el 11% (250 unidades) son producto de fabricantes nacionales poniendo de relieve la importancia de este tipo de investigaciones para la ampliación del catálogo terapéutico ofertado por nuestro Sistema Nacional de Salud. Los injertos y sustitutos óseos son uno de los mercados más prometedores de la industria ortopédica, con ingresos que superan el mercado global para el año 2013 de \$1.391 de US\$ y para el año 2017 según un informe publicado por “Bone Grafts & Substitutes - Global Análisis and Market Forecasts”, una cifra que llegó a \$2.6 Billones de US\$ para el 2016, con el pronóstico de alcanzar para 2023 la cifra cercana a \$3.3 Billones de US\$ (162). Por esta razón, el desarrollo de investigaciones direccionadas a la búsqueda de mitigar esta necesidad es cada vez más pertinente a nivel mundial.

Este trabajo expone la síntesis de nanopartículas de plata e inmovilización en sustratos de titanio poroso con potencial osteointegrativo por silanización, encaminadas al desarrollo de sustitutos óseos. Este tipo de biofuncionalización de Ti poroso con moléculas orgánicas se basa en la formación de un tipo de enlace covalente al depositar NpsAg en superficies micro-rugosas del sustrato de Ti como lo reportan varios equipos de trabajo (46) (48), (49).

El objetivo central de este trabajo fue obtener una ruta de elaboración de nanopartículas de plata y deposición sobre sustratos de titanio poroso con fines de mejorar su biocompatibilidad, particularmente en su propiedad antibacteriana. Se pretende una variación de las metodologías de obtención de nanopartículas en el proceso de suspensión así como de las técnicas de internalización de las NpsAg en el sustrato de Ti. Cabe

mencionar que los substratos de titanio c.p. se obtuvieron en el contexto de un macroproyecto que se lleva a cabo en la Universidad de Sevilla, España.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Biomateriales

La aparición de sustitutos óseos sintéticos en las últimas décadas ha traído alternativas, en especial cuando encontramos que las cantidades de injertos de hueso natural disponible están lejos de satisfacer la demanda clínica actual (50). El concepto de biomaterial hace parte de la ciencia de los materiales que analiza la relación entre la estructura, propiedades y su entorno biológico. Su definición señala el sector de los materiales que se diseñan para intervenir un sistema biológico, donde establece contacto íntimo de manera permanente o intermitente en pro de restaurar, o reemplazar las funciones de tejidos, órganos y/o articulaciones óseas (46).

2.1.1 El tejido óseo

El hueso es un tejido conectivo del sistema músculo-esquelético que presenta la mayor frecuencia de reemplazos, resultado de patologías asociadas no solo a envejecimiento, sino también a diversos traumas, como accidentes recurrentes en población cada vez más joven. Lo cual lleva a que injertos y sustitutos óseos sea uno de los mercados más prometedores de la industria ortopédica.

2.1.1.1 Composición del tejido óseo

La creación de hueso, se desarrolla inicialmente gracias a la matriz osteoinductiva que dará inicio a la integración celular y el desarrollo del tejido. Seguido del fenotipo celular, la interacción con la matriz que renueva y repara el tejido óseo. Y finaliza con el producto óseo, ligado a el comportamiento fisiológico, forma y función final (51). El hueso es un tejido en constante formación y destrucción a lo largo de la vida. Su función está dada según su ubicación anatómica (52), morfología de tipo osificación endocondral o intramembranosa (53), procesos de curación ya sea por regeneración y reparación (54). O según el tipo de unión a tejidos anatómicos secundarios o terciarios (55).

El hueso presenta múltiples componentes: una fase orgánica, inorgánica y una fase compuesta de agua. La orgánica con el 35-40% de la composición del hueso, el 98% hace parte de la denominada matriz, que contiene a su vez 95% colágeno. Dicha fase contiene un alto componente celular, cuenta con células como osteoblastos, que darán lugar a dicha matriz, así como a los osteocitos y osteoclastos. Finalmente, se encuentra la fase inorgánica con el 60% de la composición, donde el porcentaje de hidroxiapatita alcanza el 95%, matriz mineralizada ubicada entre los extremos de las fibras colágenas (56).

La Tabla 1, muestra en detalle la organización estructural del tejido óseo, la fase inorgánica, en presencia de hidroxapatita cálcica y fosfato dicálcico dihidratado. La fase orgánica u osteoide, con macromoléculas como proteínas y el componente celular que hacen parte del proceso de recambio óseo.

Tabla 1. Composición ósea. Modificado del Atlas de la anatomía humana (56).

COMPOSICIÓN OSEA	
Fase Inorgánica (minerales p. ej Ca ⁺⁺)	Fase inorgánica. Corresponde al 60% del peso corporal. <ul style="list-style-type: none"> • Hidroxapatita cálcica. Mineral principal del hueso. Aporta resistencia a la compresión. • Fosfato dicálcico dihidratado. La brushita, mineral secundario/ menor del hueso.
Fase Orgánica (matriz: proteínas, macromoléculas, células) Colágeno Proteoglicanos Proteínas no colágenas Células	Fase orgánica. También denominada, osteoide, antes de su mineralización; alrededor del 35% del peso corporal. <ul style="list-style-type: none"> • Colágeno tipo uno. Aporta resistencia a la tensión. Corresponde al 90% de la fase orgánica. En zonas de orificio y alrededor de los poros de las fibras de colágeno ocurre la mineralización. • Macromoléculas constituidas por esqueleto hialurónico con glucosaminoglucanos, GAG. Formados por proteínas con ramificaciones de condroitina y queratina. Aporta resistencia a la compresión. • Osteocalcina. Indicador de aumento del recambio óseo. • Osteoblastos, osteocitos, y osteoclastos
Agua	• Corresponde al 60% del peso corporal. Varía según la edad y localización.

El hueso se puede dividir en hueso compacto y esponjoso. El hueso compacto se encuentra en el eje (o diáfisis) de un hueso largo, organizado en subunidades llamadas osteonas. Con un vaso sanguíneo y un nervio justo en el centro del osteón dentro de una abertura denominada canal de Havers, rodeados a su vez por círculos radiales de hueso compacto conocidos como lamillas. El hueso esponjoso, se encuentra en el extremo (epífisis) compuesto por trabéculas, que dan soporte y fuerza al tejido óseo. En la Figura 2, se observa la estructura ósea. Donde el hueso compacto se presenta como una matriz densa en la superficie externa y para el caso del hueso esponjoso, dentro del hueso compacto, organizado con trabéculas formando pequeños espacios irregulares (57).

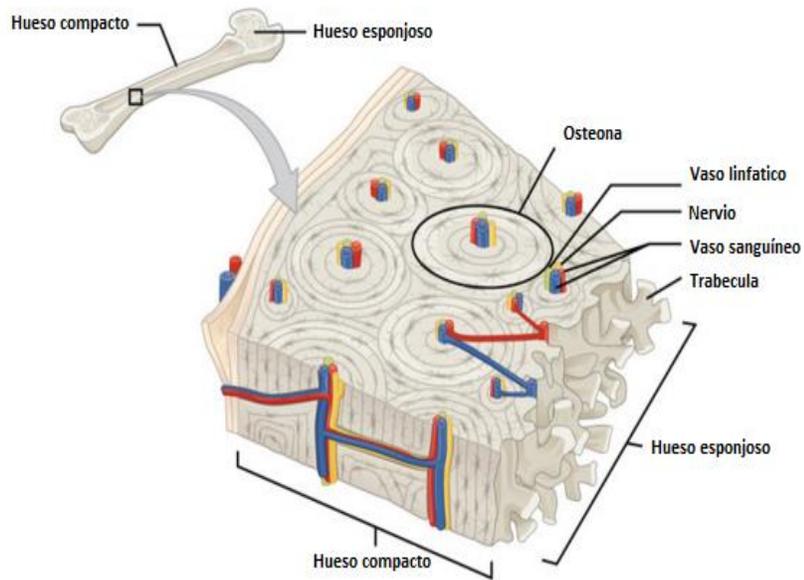


Figura 2. Representación esquemática de la estructura ósea (57).

2.1.1.2 Regeneración del tejido óseo

El desarrollo del hueso, y cómo responde a su entorno se conoce gracias al estudio de la osteología. Casi todos los tipos de huesos del cuerpo humano contienen tejido óseo esponjoso y compacto. Ambos, formados por osteocitos y osteoblastos. Estos componentes orgánicos están contruidos por fibras de colágeno, que confieren la resistencia a la tracción y elasticidad al tejido óseo. En la Figura 3 se describe la organización del tejido óseo, los canales de Havers y osteonas con diámetros de 100 μm , organizado por patrones de fibras con 50 μm y fibras de 5 μm . Las cuales están mineralizadas de colágeno de 500 nm ya sea a escala atómica como el colágeno e hidroxiapatita.

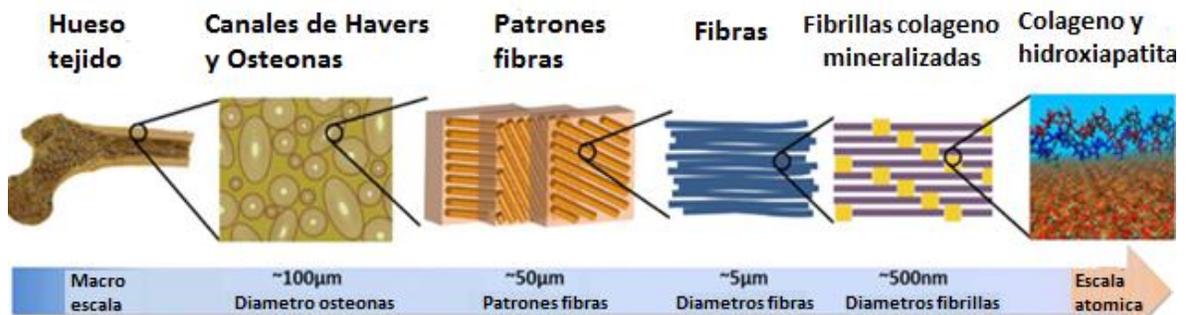


Figura 3. Ilustración de la organización y formación del tejido óseo con sus componentes orgánicos. Tomado y modificado de (1).

El proceso de construcción y pérdida de tejido óseo viejo, conocido como remodelación del hueso se lleva a cabo por tensiones nuevas a lo largo de la vida. En este proceso participan:

- *Osteoclastos*: células procedentes de los monocitos de la medula ósea. Se localizan en la superficie de absorción del hueso y avanzan al interior del tejido. Su función es la degradación de hueso viejo, mediante sustancias químicas liberadas por cristales minerales y calcio almacenado hacia el torrente sanguíneo. Además, están encargadas de preparar el camino para que los osteoblastos formen hueso nuevo. Para ello disuelven la fase mineral de la matriz y reabsorben los componentes orgánicos.
- *Osteoblastos*: responsables de formar los componentes orgánicos de la matriz ósea. Adicionalmente, están encargados de depositar cristales que contienen calcio a lo largo de la red de fibras de colágeno en la matriz extracelular. Se encuentran localizados en la superficie de los huesos en crecimiento y aquellos dañados. Por último, una vez culmina su función son degradados por apoptosis o diferenciados a células de borde. Y son parte fundamental del proceso de degradación y formación de hueso constante, realizado en conjunto con las células osteoclastos.
- *Osteocitos*: son células óseas, están en mayor proporción en el hueso maduro. Así mismo, proceden de los osteoblastos cuya capacidad de síntesis se ha perdido, quedando atrapada en la matriz del tejido óseo. Finalmente, los osteocitos conservan el estado de la matriz, al controlar al intercambio de calcio con el torrente sanguíneo.
- *Osteogénicas*: son células con capacidad de diferenciarse a osteoblastos. Su actividad es alta, particularmente, en la fase de crecimiento óseo y durante la reparación de lesiones óseas. Se ubican en la capa más profunda del periostio, endostio y conductos de Havers.

En la Figura 4 se observa el trabajo constante de osteoblastos y osteoclastos responsables de la regulación ósea (56). Y de manera general, se describen los cuatro mecanismos de regulación ósea que abarca todo el proceso de formación del hueso:

- *Estímulo del depósito*: es un mecanismo donde los osteoblastos inician la formación del hueso por intermedio de los osteocitos. Presentes cuando la exposición a la actividad de carga es mayor. A su vez, regula la fase de crecimiento del hueso, fluoruro y electricidad. Por último, permite el crecimiento constante de los niveles de masa ósea.
- *Inhibición del depósito*: se caracteriza por conservar la menor cantidad de osteoblastos de baja actividad. La falta en la actividad de carga es el resultado de una escasa actividad osteoblastos y marcada actividad de osteoclastos. La inhibición refleja pocos niveles de masa ósea, ya sea por una mal nutrición crónica,

enfermedades asociadas al alcoholismo, condiciones físicas como envejecimiento y hipercortisolismo etc.

- *Inhibición de la reabsorción:* en este caso, los osteoclastos encargados de la pérdida de hueso (reabsorción ósea) tienen una menor actuación. Durante el tercer mecanismo de regulación ósea, los estrógenos actúan sobre los osteoclastos ya activados incrementando su apoptosis. Y en el caso de la hormona calcitonina, influye sobre la reabsorción ósea, directamente en la actividad osteoclástica, ya sea de forma transitoria, por un fenómeno rápido de regulación, “*downregulation*”, de sus receptores expresados sobre los osteoclastos.
- *Estímulo de la reabsorción:* la reabsorción siempre precede a la formación de las cantidades de hueso reabsorbidas, las cuales son similares a las neoformadas. Al presentar mayor actividad de osteoclastos comenzarán a disolver la matriz mineral y a descomponer la matriz osteoide. Este proceso es concluido por los macrófagos al favorecer la liberación de los factores de crecimiento contenidos en la matriz, TGF- β (factor transformante del crecimiento β), PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas), IGF-I y II (factor análogo a la insulina I y II).

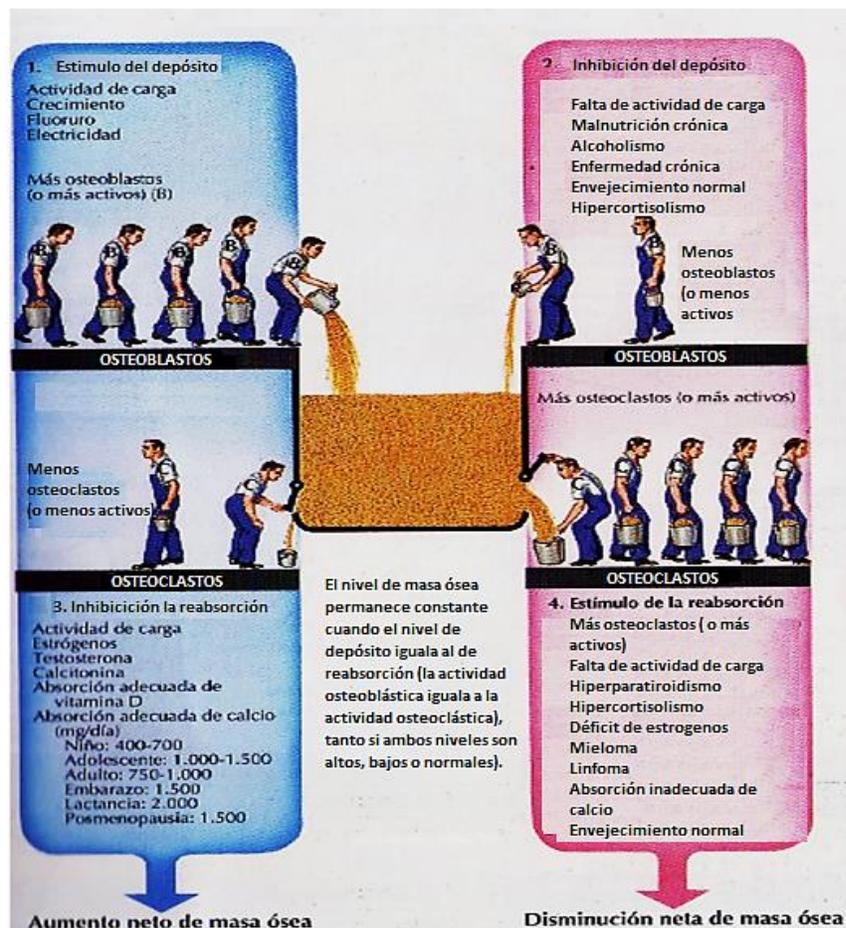


Figura 4. Mecanismos de regulación de masa ósea. Tomado y modificado de (56)

2.1.2 Biomateriales para sustitución ósea

Los materiales para sustitución ósea son un reto fundado por la alta demanda de prótesis, así como la creciente necesidad de acceder a materiales de calidad que sigan sin ser suficientes para el desarrollo de implantes que garanticen su fiabilidad (58). El concepto de biomaterial hace parte de la ciencia de los materiales encargados de analizar la relación de su estructura y propiedades intrínsecas del biomaterial. Se denominan así, debido a que se diseñan para intervenir en un sistema biológico, estableciendo un contacto íntimo con el sistema vivo circundante sin generar efectos dañinos, favoreciendo además su inclusión en el cuerpo con la finalidad de restaurar, o reemplazar funciones de tejidos, órganos y/o articulaciones. Una vez son incorporados o implantados, estos pueden permanecer en contacto permanente o intermitente (46).

Hasta hace unos años los biomateriales eran materiales seleccionados con el criterio de ser biológicamente aceptables no tóxicos, con la función principal de dar soporte. Sin embargo, actualmente los biomateriales se diseñan y fabrican pensando en la aplicación médica a la cual serán destinados, es decir, que se incluyen características bio-funcionales además de inertes durante su elaboración, entendiendo funcionalidad como la habilidad del implante en realizar la función para la cual es diseñado (59).

El uso de biomateriales en la sustitución de hueso requiere una serie de características esenciales que deberá cumplir el material. Una vez se encuentra en interacción con el hueso aledaño, elementos como el diseño establecen parámetros (química de la superficie, nano, micro rugosidad, porosidad etc.) que evitan un rechazo y segundas cirugías (60). Por lo tanto, la ingeniería del tejido es un área adecuada para su comprensión, al permitir conocer más a fondo la fisiología homeostática y regenerativa del hueso. A su vez, la creación del material debe ser acertado y acoplarse con prontitud al sistema óseo.

Algunos biomateriales para aplicaciones médicas son constante motivo de estudio, debido a desafíos en la obtención de estructuras óseas cercanas a la fisiología natural. Muchos son los fallos que interrumpen este objetivo, como los causados por colonización bacteriana y por ende respuestas inflamatorias indeseadas. Además, la química superficial de los biomateriales, la cual sigue sin estar adaptada a los requisitos clínicos (61). De esta manera la funcionalidad del biomaterial con la fisiología del hueso son los responsables de inducir el acoplamiento celular, viabilidad, mitogénesis, biomecánica y vascularidad que establecen el éxito del biomaterial elegido y su aplicación médica (62).

Estrategias actuales en la creación de hueso van en aumento. A continuación, iremos ampliando el tema desde la clasificación de los materiales, la modificación superficial y las propiedades destacables que favorecen la formación de tejido óseo.

2.1.3 Clasificación de Biomateriales

El estudio de los biomateriales, desde su antecedente histórico, científico y tecnológico ha mejorado la calidad de vida del paciente a través de la introducción de materiales que favorecen significativamente la osteointegración. Los materiales sintéticos han sido objeto de investigación desde hace mucho tiempo, hallazgos antropológicos lo evidencian en las excavaciones que reportan restos óseos con diversos materiales, reparando o sustituyendo partes del cuerpo desde hace más de 2000 años. Los primeros estudios de compatibilidad biológica utilizaron plata, oro, plomo y platino. Ya sea durante el desarrollo de placas para facilitar la reparación ósea, o el caso del carbón en sistemas de tornillos para placas de fijación de fractura de huesos, aceros inoxidables resistente a la corrosión adecuado para dispositivos ortopédicos. Además del vidrio, aplicado en dispositivos para prótesis parciales de cadera y clavos para la fijación de huesos. Así como, el caso del acrílico en lentes intraoculares; el teflón y el polimetilmetacrilato, aplicados en el reemplazo de cadera con polímeros y cemento para hueso. Y por último materiales porosos para el crecimiento del hueso a su alrededor (63).

El desarrollo e integración de materiales, tecnologías, estructuras, finalmente benefician el progreso y obtención materiales sustitutos óseos. A continuación se describe la categorización de los biomateriales en oficio a la generación o funcionalidad, composición química, aplicación, tipo de respuesta del material; se denominan así:

- *Primera generación:* se categorizan como bioinertes y se utilizan por sus buenas propiedades físicas, mecánicas y capacidad de reemplazo de tejido óseo. Como principal desventaja se encuentra su nula interacción con el tejido, generando implantes aislados rodeados por una capsula fibrosa lo cual puede favorecer el crecimiento bacteriano (46).
- *Segunda generación:* cuya característica implica materiales cada vez más biocompatibles con su entorno, su denominación implica materiales bioactivos o bioabsorbibles. Como principal particularidad se presenta en el diseño, ya que este busca obtener una respuesta biológica en el área de contacto o en la interfaz del biomaterial (64). En el caso de los bioactivos, su interacción con el tejido circundante favorece la respuesta biológica desde su enlazamiento tejido-superficie, además promueve la curación y crecimiento de tejido óseo (65), y los bioabsorbibles se conocen como materiales con capacidad bioabsorbible, así como la degradación paulatina a medida que se da la regeneración de tejido nuevo.
- *Tercera generación:* son aquellos materiales resultantes de la conjugación del material bioactivo y bioabsorbible donde su objetivo principal es la obtención de respuesta celular desde la combinación de ambas propiedades.
- *Cuarta generación:* designada por materiales conocidos como biomiméticos o inteligentes. Presentan una fiel réplica de la microestructura ósea natural o ciertos

materiales. En estos, la regeneración de tejido se da por procesos fisiológicos de remodelación natural y se considera como una herramienta efectiva en el progreso de procesos de curación (66).

- *Clasificación según la composición química:* están los materiales metálicos, como por ejemplo el titanio y sus aleaciones, el oro, la plata, el acero inoxidable etc. Estos aunque se caracterizan por sus buenas propiedades mecánicas, presentan problemas de corrosión, fatiga o desgaste; en cuanto a los poliméricos, tienen la capacidad de ser inerte ante el tejido circundante. Así como, los cerámicos, cuya característica es la alta dureza y resistencia al desgaste; siendo entonces uno de los materiales más usados, sin embargo por su fragilidad es limitado; su uso en zonas que requieran mayor esfuerzo y rigidez. Y los materiales compuestos, que como su nombre lo indica implican la combinación de materiales que en su conjunto presentan buenas propiedades mecánicas (7), (63).
- *Clasificación por respuesta de hueso;* según la aplicación del material ya sea implantable o no, y el *tipo de medio de implantación*. Estos últimos se dividen como medios limpios, cuando no presentan interacción con el medio exterior y medio sucios en el caso contrario. También se puede clasificar desde el tiempo de permanencia ya sea temporal o permanente. Así como la función asignada al momento de desempeñar una acción, como; soporte, diagnóstico o tratamiento (63).
- *Clasificación según el tipo de respuesta,* cuando entra en contacto con el tejido orgánico circundante. Se clasifican como: tóxicos, que genera la muerte de tejido. Y no tóxicos y/o biológicamente inactivos, donde al interactuar el implante y tejido se forma una capsula fibrosa que rodea el implante (46). Por ejemplo, las aleaciones de titanio, alúmina o circonio se han visto rodeadas de una capa fibrosa delgada, caso contrario se encuentra en materiales reactivos, como el acero inoxidable con un mayor espesor (59). Con respecto a la relación entre la reactividad superficial y la formación de capa fibrosa, son determinantes en el tiempo de formación de la misma ya que a mayor reactividad, más tiempo le tomara a la capa obtener un equilibrio químico entre el área de contacto del material y el tejido circundante. Recordemos que mientras más espesor conserve dicha cápsula fibrosa, la probabilidad de fallo del implante será mayor, lo que induce a la fractura del hueso en regiones adyacentes al implante (63).

2.1.4 Modificación superficial de Ti

Las modificaciones en los biomateriales en especial el titanio c.p, desempeñan un papel clave en el éxito actual de los procedimientos ortopédicos, debido a que se puede inhibir el crecimiento bacteriano, que es una de las principales razones de fracaso, minimizando así el riesgo de segundas cirugías (136), (135).

Los inconvenientes asociados al uso sistémico de antibióticos (cepas resistentes), aumenta la dificultad de recuperación clínica del paciente (135), por tal motivo las investigaciones

actuales se han direccionado a investigar y desarrollar nuevas alternativas, como la de biofuncionalizar en lugar de recubrir y usar agentes antibacterianos alternativos a los antibióticos. Tales como, los implantes biofuncionalizados con plata, cobre y zinc, ya que, al ser agentes antibacterianos inorgánicos, son candidatos de interés al brindar propiedades bactericidas a superficies metálicas (67).

El titanio c.p es un material bioinerte, cuya capa de óxido de titanio se constituye de manera natural y espontánea en su superficie. Dicha capa es protectora al evitar la oxidación incontrolada, corrosión, reacciones químicas y biológicas indeseables. Por el contrario, también definen el titanio como material bioactivo; responsable de la adsorción de iones y proteínas presentes en los tejidos, donde los óxidos de la capa anteriormente mencionada sufren, hidroxilación o hidratación.

Así que; las modificaciones de superficies metálicas oxidadas como el Ti, obedecen a la reactividad de los grupos disponibles en su superficie, donde en puntos activos de enlace, la disposición de capa de óxido superficial producto de la limpieza y oxidación controlada causan la modificación (funcionalización).

2.2 Nanopartículas

Las Nps son nanomateriales, agrupaciones de átomos de uno o varios compuestos con dimensiones que miden varios nanómetros de diámetro (68). El prefijo nano se utiliza para simbolizar a la mil-millonésima parte, 1×10^{-9} de un metro. La geometría y el tamaño de las Nps, dependerán de la actividad catalítica, interacción con la luz y el comportamiento magnético (69). Como principales aplicaciones se destacan el desarrollo de depósitos en tratamientos de heridas, recubrimiento de materiales, protectores solares, novedosos modelos como agentes antifúngicos entre otros (70).

Estos nanosólidos pueden ser obtenidos por metodologías que incluyen iones de plata (Ag^{++}) o plata metálica, sales metálicas entre otras (71). Que dependerán a su vez de las propiedades fisicoquímicas (v.gr. tamaño, área superficial, carga, forma; revestimiento etc.). Y determinará el tipo de interacción entre el sistema nanoparticulado y su entorno (72). La aglomeración posibilita la acumulación de manera indeseada en citoplasma o el núcleo, alterando el funcionamiento celular (73); otro posible fallo es la oxidación superficial de las Nps, y la presencia de plata iónica (74). De este modo es preciso diseñar y probar metodologías que garanticen o amenoren problemas en el control de la estabilidad, agregación, control de tamaño y distribución (75).

La estabilidad de las Nps se determina a través del potencial zeta, a partir de la movilidad electroforética medida por velocimetría de láser doppler. La cual apunta a conocer la presencia o ausencia de la estabilidad en el sistema cuando brindan valores entre -30 a +30mV. Otra manera de realizarlo es utilizando el perfil de resonancia plasmónica de

superficie medido por espectrofotometría de UV-vis, el cual consiste en la excitación colectiva y registro de la periodicidad con que se mueve la nube de electrones en las partículas. Esta variable ha sido medida en Nps con multiplicidad de formas y composiciones tales como: esféricas, nanobastones (76), forma-U (77), nano-flores (78), y nano-barras (79), de composición orgánica e inorgánica (80), de uso electroquímico (v.gr. nanotubos TiO_2 $\text{Li}_4\text{Ti}_5\text{O}_{12}$) (81), Nps de níquel (82), Nps de carbono y Nps- TiO_2 (83).

En la Figura 5 se observan algunas nanopartículas con propiedades antimicrobianas. Con una marcada variedad de morfología en cuanto a matrices como: fibras, nanotubos o piezas. Así como, aquellos nanomateriales sintetizados en suspensiones acuosas desprovistos de modificaciones, o por el contrario estabilizadas por presencia de cargas en la superficie de las nanopartículas inducida por agentes estabilizantes.

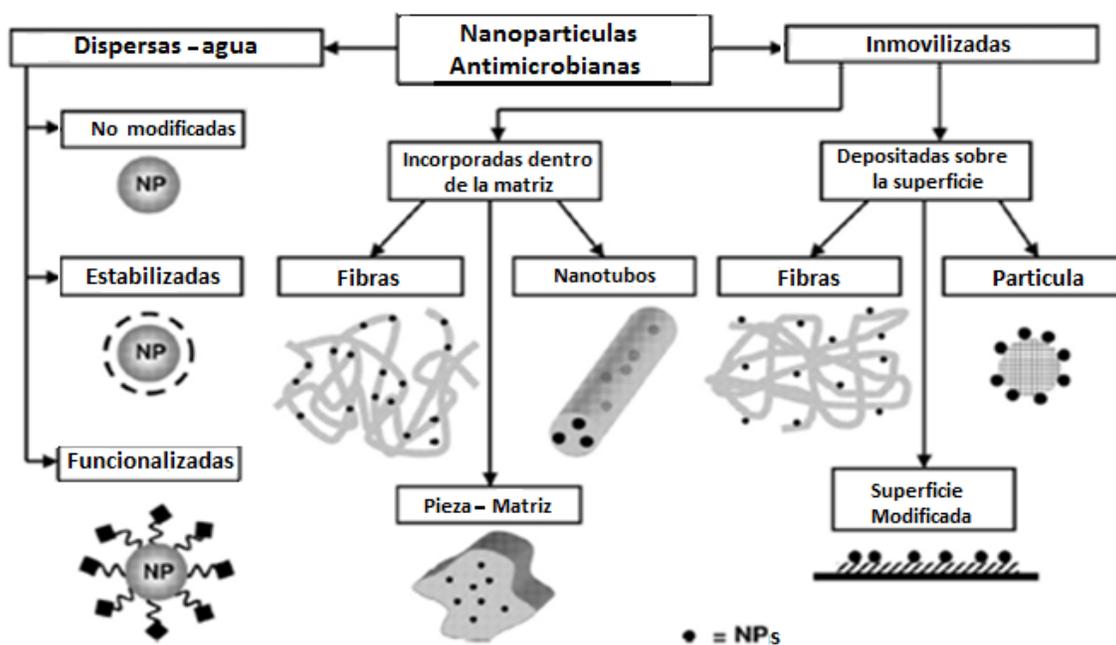


Figura 5. Clasificación de NpsAg antimicrobianas tomado y modificado de (18)

Para obtener una adecuada incorporación de las NPs en la superficie de una matriz de interés y conservar la actividad bactericida, estas deben ser lo suficientemente pequeñas para abarcar la mayor área posible. En tal caso, si las NPs son muy pequeñas, una mayor área de interacción con la pared bacteriana permitirá mayor efecto bactericida; facilitando el paso a través de la membrana celular bacteriana, que a su vez dependen por completo de un adecuado tamaño y estabilidad (34) al garantizar el control del proceso de agregación.

La Figura 6 muestra los mecanismos que explican el efecto bactericida de las NPsAg. En primer lugar se desestabiliza irreversiblemente la membrana, dada la capacidad de las NpsAg en permearla. La tasa con que ocurre esto, está en función del tamaño; donde las más pequeñas son mucho más rápidas. Y en segundo lugar, los iones de plata liberados

desde las NP_sAg; cuya característica principal es su habilidad para generar un cambio de conformación/estructural en el citoplasma (suspensión coloidal de la célula). Finalmente, se sabe que, una vez dentro de la célula, los iones de plata interactúan con compuestos que tienen grupos sulfhidrilos (34).

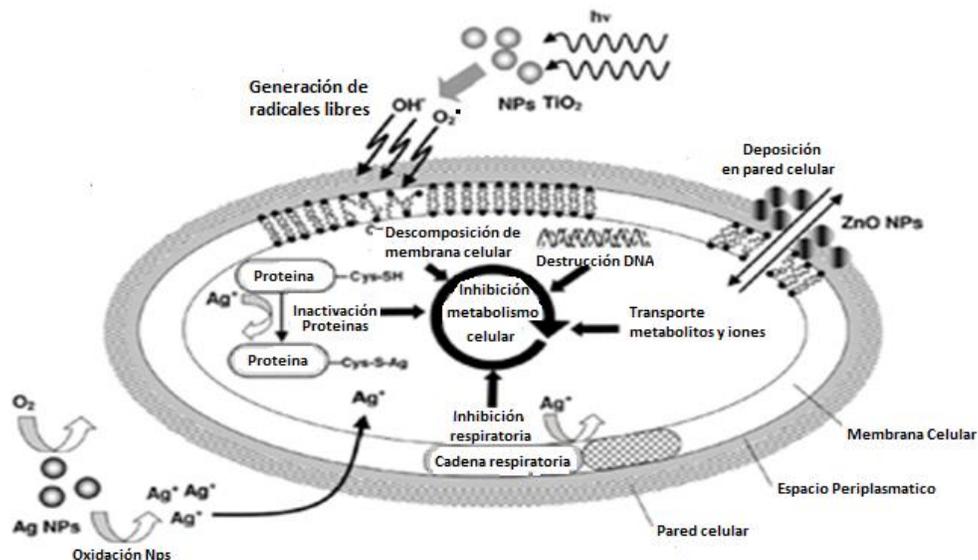


Figura 6. Mecanismos de acción antibacterianos de los sistemas nanoparticulados tomado y modificado de (34)

Cabe resaltar que dichos mecanismos se pueden llevar a cabo de manera simultánea (84). Por otro lado, se sabe que las condiciones oxidativas y los fenómenos de desorción actúan de manera sinérgica; en el caso de las NP_sAg se contemplan mayores efectos antibacterianos (85). No obstante, aún no es clara la relación dosis carga bacteriana, que garantice un efecto antibacteriano significativo, lo cual puede cambiar según el patógeno. El espectro de acción antibacteriano de las NP_sAg abarca microorganismos como las enterobacterias (v.gr. *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *E. faecium*), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Klebsiella pneumoniae* (18) todas ellas de gran interés clínico.

Hasta aquí, se ha visto que las variables físicas pueden alterar y de hecho determinan la actividad antibacteriana de las NPs, pero, además la composición y la técnica de obtención, a saber: en la Figura 7, se observan algunos de los elementos puros (v.gr. plata Ag, Oro, Au, Cobre, Cu) (86); óxidos metálicos (v.gr. óxido de titanio (TiO₂); óxido de zinc (ZnO); óxido de cobre (CuO) (87); sales metálicas) (88); hidróxidos (v.gr. dihidróxido de magnesio (Mg(OH)₂) (89); nano-transportadores (90); materiales híbridos (v.gr. Nps metálicas con polímeros orgánicos, como es el caso de las Nps con nailon, Nps de óxido de hierro con polímeros biodegradables, como el poliglicolato o ácido poliglicólico, PGA) (91)(92)(93)(94). Y finalmente, Nps de compuestos orgánicos (v.gr. cúrcuma). En este último caso se ha reportado la obtención de nanopartículas de plata por biosíntesis verde de extractos naturales como polvo de tubérculos (95).

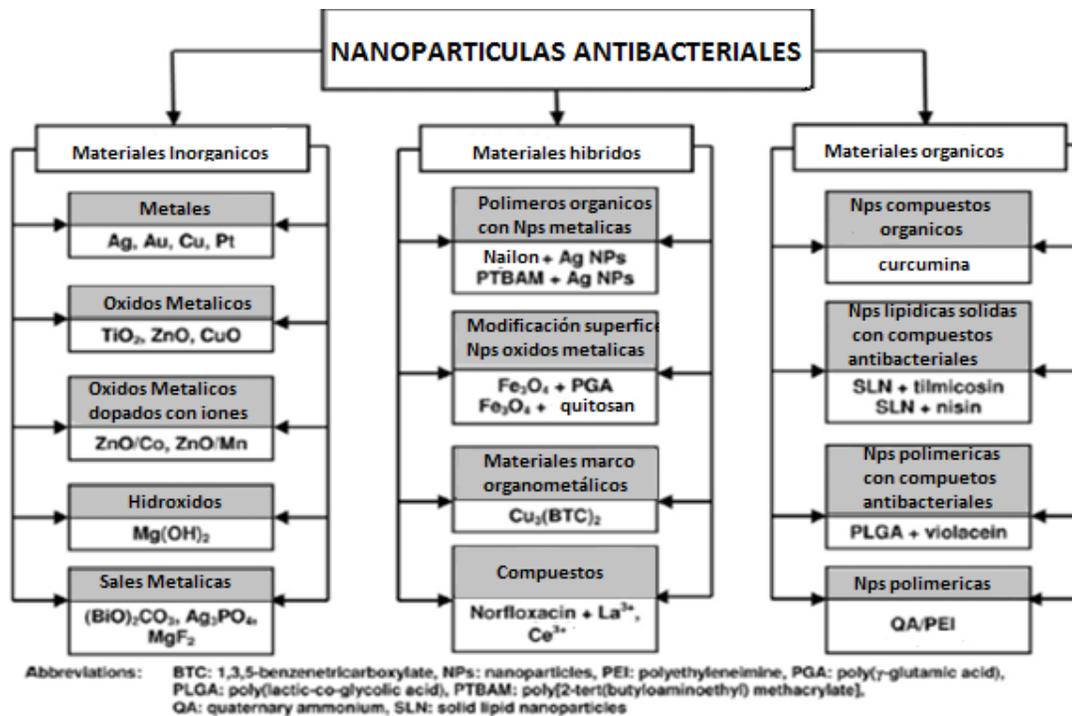


Figura 7. Materiales para fabricación de Nanopartículas antibacterianas tomado y modificado de (18).

Las NpsAg también presentan mecanismos de acción antifúngica. En este caso una permeabilidad de la membrana conlleva a posibles modificaciones en la capacidad respiratoria, división celular, hasta generar la muerte del hongo. También se ha descrito la interacción ion de Ag a grupos tiol (96). Resulta interesante destacar que las NpsAg pueden ser sintetizadas biológicamente ya sea por bacterias, hongos y plantas, resaltando que en el caso de los hongos, se genera una especie de captura de los iones Ag^{++} en la superficie. Hoy por hoy se utilizan extractos de plantas como la mejor alternativa para sintetizar Nps, pues lo realizan en periodos de tiempo cortos (97).

2.2.1 Síntesis y métodos de preparación de NpsAg

La Figura 8 muestra las dos metodologías más representativas de preparación de las NpsAg: “*top-down*”, (métodos físicos) y “*bottom-up*”, (métodos químicos) (98). En el caso del “*bottom-up*” utilizada en el autoensamblaje, emulsificación y desarrollo de NPs con aplicabilidad biomédica. Además, presenta un limitado control de fabricación de Nps con tamaño y morfología uniformes. Caso contrario al “*top-down*”, donde se obtiene mayor uniformidad durante el proceso de elaboración de NpsAg.

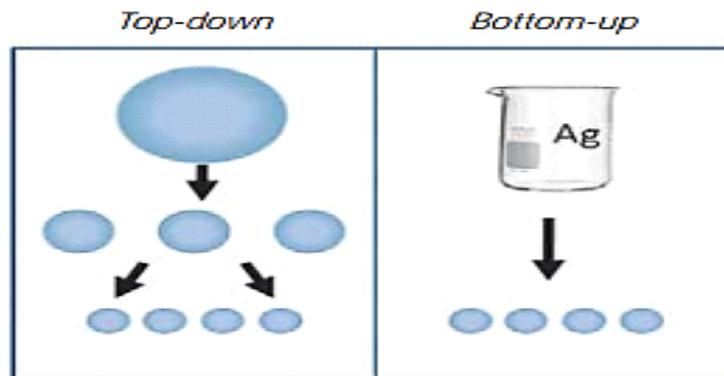


Figura 8. Métodos obtención de Nps *Top-down* y *Bottom up* tomado y modificado de (75)

El “*Top-down*” exhibe un gasto energético mayor a diferencia del “*bottom-up*”, ya que inicia de sistemas más complejos, que irá perdiendo tamaño hasta el punto de obtener dimensiones deseadas. En el caso del “*bottom-up*”, incluye una metodología contraria, partiendo de una dispersión molecular o estado de agregación nanométrico donde gracias a procesos de nucleación y crecimiento se obtienen Nps de mayor tamaño (99). Hay que mencionar que los tratamientos “*top-down* y *bottom-up*” son metodologías viables en el proceso de obtención de Nps metálicas. Por ejemplo en los métodos químicos, se han obtenido Nps a partir de gradientes metálicos (98), en los físicos, con la reducción electroquímica de metales (100), y en biológicos por intermedio de la síntesis química verde (101).

Por último, existe una clasificación de las técnicas “*bottom-up*” representadas en la Tabla 2, donde se han establecido algunas metodologías existentes, denominadas como: fase gaseosa (v.gr. depósitos físicos, combustión, implantación de iones etc); fase líquida (v.gr. ensamble molecular, nucleación, reducción de sales metálicas, electrodeposición etc) ; fase sólida (v.gr. fotolitografías ópticas, de haz de partícula y de nanoimpresión etc), y finalmente de tipo biológico que abarca tecnología a partir de sistemas vivos, como agentes de reducción química de origen vegetal.

Tabla 2. Clasificación de técnicas *bottom-up* (99)

Métodos en fase de gas.	Se caracteriza por la presencia de gases con alta dispersión molecular y atómica. Como principales técnicas se encuentran: Depósito físico en fase vapor, combustión, pirólisis o termólisis, implantación de iones, entre otros.
Métodos en fase líquida.	La elección del disolvente adecuado es un parámetro determinante. Como principales técnicas se localizan: medios de ensamble molecular, nucleación y procesos sol-gel, reducción de sales metálicas, métodos electroquímicos, electrodeposición, entre otros.
Métodos en fase sólida.	Son procesos que implican litografía, como por ejemplo: fotolitografía óptica, litografía de haz de partícula, litografía de nanoimpresión, litografía de nanoesferas, litografía de interferencia, litografía nanoimpresión litografía nanosfera.
Métodos biológicos.	Son tecnologías producto de la nanociencia a partir de sistemas vivos. Donde se sustituyen biomoléculas sintéticas (agentes reductores) por moléculas de origen vegetal como pétalos de flores, plantas, algas, levaduras, hongos y bacterias.

Indiscutiblemente, los métodos físicos aunque favorecen la obtención de grandes cantidades de NPs, limitan el control insuficiente del tamaño restringiendo su acceso a sistemas biológicos. Caso contrario se observa en la síntesis química debido a su capacidad de elaboración de Nps pequeñas. La Figura 9 representa diferentes distribuciones de tamaño de partícula sintetizadas en una suspensión coloidal: a) distribución gaussiana b) bimodal c) de Poisson. Para el primer tipo se observa la distribución tipo gaussiana, donde el tamaño de las partículas es amplio, representada en el gráfico por una amplia distribución de la campana (Figura 9a). Seguidas de las bimodales representadas por dos tipos de distribución de NPs simbolizadas por dos poblaciones de nanomateriales (figura 9b). Y, Finalmente la distribución de Poisson la cual como se observa representa NPs uniformes con una distribución gaussiana estrecha con un tipo de tamaño definido y uniforme (72).

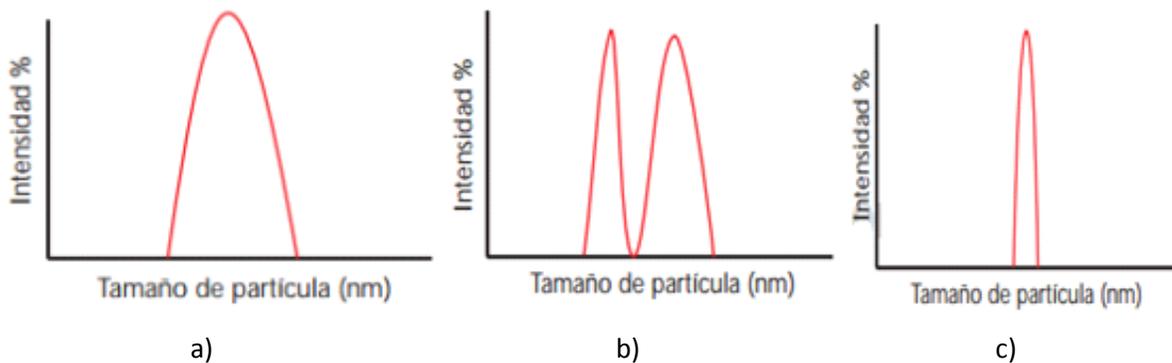


Figura 9. Distribución de tamaño de Nps sintetizadas en sistemas coloidales de Ag tomado y modificado de (99)

Además, la formación de agregados, también es una limitante recurrente en sistemas coloidales nanoparticulados, interfiriendo en su interacción con sistemas biológicos (72). De manera que, el uso de estabilizantes: (alcanotioles (102), surfactantes (103), polímeros (104), azúcares (101) y dendrímeros (105) (106)). Harán parte de la fabricación de nanoestructuras con mayor o menor crecimiento cambiantes en el tiempo (107). Sin embargo, el tipo de morfologías también presenta un impacto significativo elaboración de sistemas estables. Krutyakov *et al.*, reporto partículas esféricas sintetizadas, que revelaron ser termodinámicamente más estables, junto a hallazgos que además afirmaron mejorar las condiciones termodinámicas durante la reducción de los iones de plata (108).

En general, los componentes del sistema de Nps metálicas contienen: el precursor metálico; el agente reductor; el agente estabilizante y una disolución coloidal a partir una reducción química, constituida por una fase inicial de nucleación y crecimiento. La Figura 10, representa el proceso de obtención de NpsAg donde se concluyó para una primera fase de síntesis, que el sistema demanda un gasto energético de activación alto, a diferencia de la contigua fase de crecimiento, donde se requiere una baja energía de activación (109).

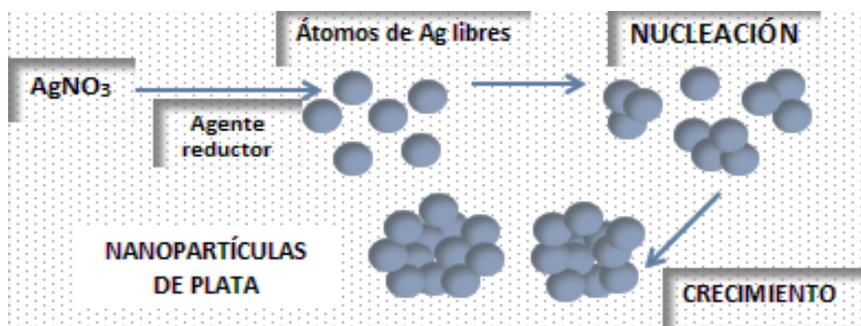


Figura 10. Método de Síntesis de NpsAg por reducción química tomado y modificado de (109).

Entre los primeros métodos descritos en la literatura se encuentra el mecanismo de síntesis en presencia de una disolución coloidal, descrito por Lee y Meisel (110) y el método de Creighton *et al.* (111). En el caso de Lee y Meisel, el método se dio a partir de la modificación del otro método de Turkevich en este caso para la síntesis de nanopartículas de oro, sustituyendo el agente precursor HAuCl_4 por AgNO_3 , en presencia de un agente reductor, citrato de sodio. Con respecto a la distribución de tamaño el método Lee-Meisel permitía obtener nanopartículas, polidispersas, que correspondían a amplias distribuciones en las dimensiones de Nps (112). En el caso del método Creighton utiliza AgNO_3 en presencia del agente reductor NaBH_4 , siendo este en la actualidad más popular y dando lugar a NpsAg desde los 10 nm y con una distribución estrecha de tamaños, monodispersas. A continuación se desarrollan otros métodos sobresalientes de síntesis de NpsAg, estos son:

- *Método de reducción controlada con sales Ag:* Como se indicó en el párrafo anterior no solo Lee y Meisel (110) y Creighton (111), fueron reportados como las primeras metodologías descritas de síntesis en Nps. Se caracteriza por la presencia de reacciones de oxidación de NpAg, con un alto potencial de reducción de plata que permite obtener suspensiones acuosas sin agentes estabilizantes, en el caso de la formación de capas eléctricas dobles alrededor de Nps. En el caso de la contar con una suspensión coloidal de baja fuerza iónica es necesario el uso de agentes estabilizantes como: monocapas auto-ensambladas (113), surfactante (103), polímeros (104) o dendrímeros (105)(106), en búsqueda garantizar mayor tiempo de estabilidad, mitigar procesos de aglomeración, así como el control de tamaño etc.
- *Método de tollens.* Sistemas de obtención de Nps con tamaños controlados en un solo paso. El método tollens es un proceso de reducción del ion $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$, siendo un complejo estable debido a la afinidad del amoniacó y el ion plata. Se realiza en disolución, aldehídos y azúcares reductores, con menos concentración de plata durante la producción de solución coloidal (31).
- *Reducción en fase acuosa con Borohidruro de sodio.* Es un método de síntesis cuyo agente reductor principal es borohidruro de sodio, (NaBH_4). Sigue la reacción $\text{BH}_4^- + 6\text{Ag}^+ + 8\text{OH}^- \rightarrow \text{BO}_2^- + 6\text{H}_2\text{O} + 6\text{Ag}(\text{s})$. Donde entra en contacto el agente reductor y el estabilizante, sumados a una solución de sal de plata (31). A diferencia del método anterior, es posible sintetizar NpsAg estables a concentraciones altas, utilizando agentes estabilizantes ya sea de origen polimérico (alto y bajo peso molecular), con carga neta, iónica o neutra.
- *Método de DMF - con agentes estabilizantes.* Como su nombre lo indica utiliza estabilizantes como aminopropiltriétoxissilano (APS) o polivinilpirrolidona (PVP), básicos al momento de garantizar la estabilidad del sistema, evitar aglomeraciones y riesgo de pérdida de dimensiones a escala nano (114). (v.gr. ligandos orgánicos de cadena alquílica con grupos tioles (115), carboxilatos (116), fosfinas oxidadas (117) o aminas (104).

Finalmente, se destaca que todas las condiciones de síntesis de Nps, no requieren la presencia de dichos agentes estabilizantes, en especial si el sistema cuenta con moléculas versátiles que actúen como disolvente y/o agente reductor. Por ejemplo: la sal acetato de plata y el ligando hexadecilamina, conservan la capacidad disolvente y agente estabilizante, en presencia de acetaldehído como agente reductor (118).

- *Métodos organometálicos.* Se da gracias a la reducción química de sales metálicas con agentes reductores químicos fuertes como NaBH_4 , el proceso suele presentar poca variabilidad en el control de la forma. Como se observa en la Figura 11 y como dato interesante se puede presentar un fenómeno denominado la pasivación superficial de las nanopartículas, este efecto suele estar asociado a la presencia de agua y sales que pueden modificar las superficies de las nanopartículas incidiendo en cambios como reactividad. A su vez los compuestos organometálicos bajo condiciones moderadas de reacción o denominadas suaves presentan una rápida tendencia a descomponerse dando lugar a la formación de nanopartículas metálicas en presencia de agentes estabilizantes (119).

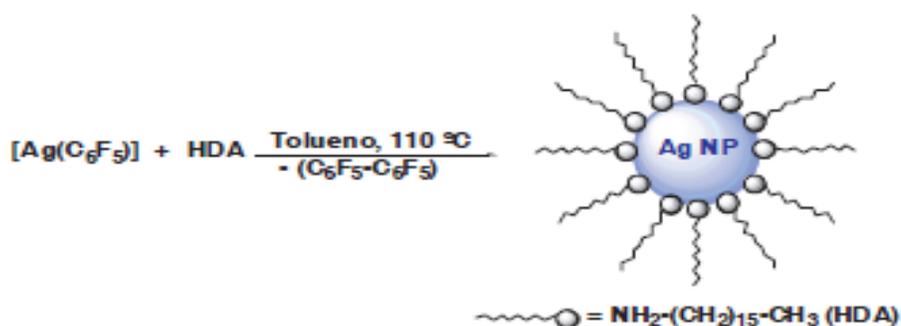


Figura 11. Métodos organometálicos de síntesis de nanopartículas de plata (120)

Para conservar una morfología de interés, estructuras y tamaños de las Nps definidos es necesario: en principio identificar el método de interés (v.gr. reducción acuosa, ultrasonido etc). Así como elegir un solvente-reductor, seleccionar el agente-protector (v.gr. estabilizante), identificar la morfología esperada de las nanosuspensiones, controlar los subproductos y condiciones fisicoquímicas o térmicas. A continuación se presenta una Tabla 3 resumen, donde se desarrolla la clasificación general de metodologías propias de síntesis de nanomateriales.

Tabla 3. Metodologías de síntesis de NPs Ag (75), (121)

Métodos	Solvente-Reductor	Agente-protector	Morfologías	Factores influyen
Reducción acuosa	Citrato sodio	Citrato	Nanobarras	Concentración hidroxilos
	Reactivo Tollens	No	Nanoesferas	Estabilidad (carga superficial).
	NaBH ₄	Dodecanotiol	Nanoesferas	Tamaño de partículas.
Reducción electroquímica	Voltametría cíclica	Polifenilpirrol	Nanoesferas	Electrodeposición de plata.
Reducción Ultrasonido	Foto-electrodeposición	Polivinilpirrolidona	Nanoesferas	Onda ultrasónica de pulso.
	Sonicación NaBH ₄	PDCE y DPS	Nanoesferas	Precursor y estabilizante.
Microemulsión	KBH ₄	KBH ₄	Nanocables	Tiempo ultrasonicación.
	NaBH ₄	PFPE-NH ₄	Nanoesferas	Agente reductor
Reducción por métodos verdes	Hojas de Geranio	Proteínas, enzimas	Nanocables	Alta concentración de Ag.
	Levaduras	Proteínas	Nanoesferas	Síntesis de proteínas.
	Hongos	Proteínas, enzimas	Nanoesferas	Hidrosoles de Ag.
	Extractos de hojas de <i>Eucalyptus</i>	Extractos <i>E. macrocarpa</i>	Nanopartículas	Tasa de reducción química

2.2.2 Modificación superficial en NpsAg

En muchas aplicaciones donde se requiere el uso de sistemas coloidales nanoparticulados, la modificación superficial es un tema de interés. En especial, cuando hablamos de funcionalizar la superficie de las NpsAg. Término otorgado al proceso químico de insertar grupos funcionales que facilitan la incorporación de moléculas, ya sea por activación o funcionalización activa, o en el caso contrario para reducir o eliminar interacciones indeseables de las nanopartículas con su entorno.

Bolei *et al.* (122) reporta procesos de adsorción en NpsAg funcionalizados con moléculas tiol, con ayuda de (SH) “*Second harmonic generation*”, donde se identifican moléculas tiol en la capa superficial, además de la energía libre de adsorción, energía de activación, y en conjunto con otras técnicas como la química adsorción superficial en NpsAg, la carga negativa superficial del nanomaterial metálico (122). La modificación superficial de las Nps, se puede explicar en el proceso de adsorción como un mecanismo que se desarrolla en una secuencia de pasos: i) el proceso de fisisorción, ii) fase de rápido aumento de interacciones intermoleculares que conduce a la formación de una monocapa completa ordenada. iii) la interacción intermolecular que incluye las denominadas fuerzas atractivas o fuerzas laterales y repulsivas.

2.2.3 Estabilidad del sistema coloidal NpsAg

En la estabilidad de los sistemas coloidales de plata, participan fuerzas moleculares conocidas como van der Waals, denominadas fuerzas débiles presentes en distancias cortas entre las partículas, además de movimientos brownianos que benefician la coalescencia y aglomeración del sistema de Nps. De ahí la importancia de utilizar estabilizantes que induzcan fuerzas repulsivas. Por lo tanto, los cambios que se pueden suscitar durante la producción de las NpsAg; implican el incremento de átomos en la superficie, la energía localizada en un área específica y cambios asociados a la energía superficial que favorece el crecimiento de Nps por floculación.

Por el contrario, en el caso de una reducción de la energía superficial, también se pueden dar modificaciones de las Nps; en particular a través de dos mecanismos asociados a cambios energéticos. El primero denominado sinterización, proceso donde las estructuras individuales se funden en una sola. Y el segundo mecanismo denominado “*Ostwald Ripening*”, donde se forman estructuras de mayor dimensión a partir del crecimiento de partículas más pequeñas. Donde el aumento de los nanomateriales se dará hasta alcanzar un estado de equilibrio. En cuanto a la estabilidad de las Nps y formación de tamaños constantes se establecen cuatro tipos de mecanismos (120):

- *Estabilización estérica.* Se caracteriza por la formación de partículas redispersables, sistemas multifases que se alcanzan en concentraciones altas de Nps, con una distribución de tamaño estrecho. Un caso común es la presencia de capas poliméricas

en la superficie que hace las veces de una barrera que limita el crecimiento y aglomeración.

- *Estabilización electroestérica.* Se genera a raíz de fuerzas de repulsión electrostática y/o estérica, generadas por un potencial adyacente a la superficie, el cual evita la aglomeración. Tal es el caso del efecto de polímeros en la superficie de la partícula, donde el potencial generado en la superficie evita la aglomeración por fuerzas de repulsión electrostática y estérica.
- *Estabilización electroestática.* En este caso es el resultado del efecto denominado adsorción de doble carga. La adsorción de iones se da en la proximidad de la superficie dando lugar a la formación de una doble capa eléctrica. La cual resulta de la repulsión entre las partículas. El modelo Helmholtz conocido como modelo de doble capa eléctrica lo puede explicar; representado en la Figura 12 donde se observa que decrece la doble capa de la superficie a medida que los iones son absorbidos. Y donde la interacción de las partículas, está dado por la distancia entre ellas, es decir si la distancia entre las partículas (línea roja) es mayor en relación con la distancia de la capa se puede decir que no hay interacción (a), donde es evidente la repulsión, debido a que la distancia entre ellas es mayor (línea roja) a la distancia de la doble capa (flecha verde). Caso contrario (b), donde se observa la Interacción de partículas donde la línea roja indica que ambas dobles capas serán traslapadas indicando su fusión.
- *Estabilización con ligandos.* Hace referencia a la unión de ligandos que ofrecen estabilidad en el sistema. La cual se efectúa con la aproximación de ligandos como tioles, aminas, fosfinas, silanos, monóxido de carbono. Donde una vez se obtiene su interacción con la superficie favorecen la reducción de problemas de aglomeración en el sistema.

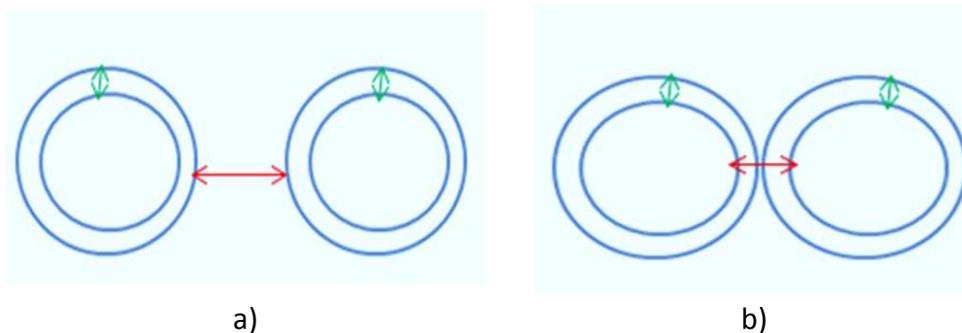


Figura 12. Modelo Helmholtz. a) Repulsión, donde la distancia entre partículas es mayor (línea roja) a la distancia de la doble capa (flecha verde). b) Interacción, ambas dobles capas se traslapan indicando su fusión (línea roja) cercanía de partículas tomado y modificado de (120).

2.2.4 Caracterización de NpsAg

Para caracterizar las nanopartículas se utilizan técnicas de microscopía electrónica de transmisión, TEM (123), microscopía electrónica de barrido, SEM (124), dispersión de luz dinámica, DLS, dispersión de luz electroforética, ELS (125), espectroscopía de fotoelectrones de rayos X, XPS (126), difracción de rayos X-XRD (127), y espectroscopia UV-vis (128). El uso de estas técnicas es determinante para establecer parámetros, como tamaño de partícula, forma, cristalinidad, dimensiones fractal, entre otras. En resumen se obtiene con mayor aproximación experimental características micro, nano estructurales de la superficie del material de estudio.

2.2.4.1 *Espectroscopia UV-visible*

Es una técnica que permite identificar y cuantificar compuestos orgánicos e inorgánicos. Opera bajo la ley de Lambert Beer, es ideal para determinar las propiedades electrónicas intrínsecas, como la banda que identifica al material de interés disperso en solventes o inmersas en una matriz. En ambos casos la absorción de la radiación incidente, genera un efecto denominado resonancia del plasmón superficial (RPS). Definida como aquellas ondas de luz capturadas en la superficie debido a la interacción de fotones. Además, cada tipo de Nps le corresponde una banda particular de (RPS), que aparece a una longitud de onda puntual y depende de varios factores como son: la naturaleza del metal, el tamaño de las Nps y los procesos físicos como la quimisorción, desorción de ligandos, entre otras reacciones superficiales que afecten la forma y posición de la banda (69) (129).

Los espectros Uv-vis pueden dar información de las propiedades ópticas en Nps metálicas. El cual se observa como el ensanchamiento de la banda y/o desplazamiento de la misma. Por ejemplo, si el tamaño de las Nps aumenta, el sistema indica que el máximo de absorción se desplazará hacia mayores longitudes de onda y por ende la banda de absorbancia crece (83). La espectroscopia de absorbancia UV-vis genera una “huella espectral” establecida para Ag (130) que forma un espectro, conocido como efecto campana; donde su punto máximo indicará la presencia del nanomaterial de interés.

2.2.4.2 *Dispersión de luz dinámica*

También denominada espectroscopia de correlación de fotones, dispersión de luz cuasi elástica o (DLS), “*dynamic light scatterin*”. Donde se obtiene el perfil de distribución de tamaños de partículas en suspensión o macromoléculas en solución, variando en el tiempo la intensidad de la luz dispersa en aquellas partículas afectadas por el movimiento browniano. El DLS facilita caracterizar el tamaño y grado de aglomeración de las Nps en función del tiempo. Y Finalmente, se comparan los resultados del DLS con imágenes TEM para identificar rangos de tamaño a partir de 0,1 nm a decenas de micrones.

2.2.4.3 *Microscopia electrónica*

La microscopia electrónica utiliza electrones para la formación de imágenes; a diferencia de la microscopia óptica que usa radiación electromagnética en el espectro visible. Así como, posibilitar la capacidad de aumento y resolución mucho mayor que la microscopia óptica; gracias a la longitud de onda de electrones. Al obtener electrones acelerados con una longitud de onda menor de 1 Å, hasta alcanzar, una resolución atómica (154).

El SEM utiliza voltajes de aceleración de electrones primarios en el rango de 0.5 kV – 50 kV. Este haz de electrones primarios creará una serie de radiaciones al interactuar con la muestra. Al barrer el haz de electrones primario punto a punto por toda la muestra, se recolectarán los electrones secundarios que formarán la imagen (131). Dependiendo del voltaje de aceleración utilizado, tendremos información más superficial (baja energía) o más del interior de la muestra (más energía).

El principio de formación de imágenes en un TEM es diferente. Un haz de electrones se focaliza sobre una muestra muy delgada (electrón-transparente) y se colectan los electrones que han atravesado la muestra. Los electrones difractados al pasar a través de la muestra con la ayuda de lentes magnéticas, forman imágenes que será la proyección de su estructura cristalina (132), (133)

El TEM puede trabajar en modo imagen o modo difracción. En modo imagen se evidencia la estructura de la muestra de estudio, y en modo difracción con el diagrama resultante de electrones difractados a través de la muestra. Los detalles de las imágenes atómicas alcanzan 1,000,000 aumentos, con versatilidad al tipo de muestra que permite analizar muestras de naturaleza conductora y no conductoras. Y finalmente contar con patrones de difracción que facilitan su interpretación.

2.3 Mecanismo de funcionalización por silanización sobre Ti

Funcionalizar un material por silanización, como se observa en Figura 13 es un proceso químico donde participan grupos silicio, se forman enlaces covalentes y cuenta con superficies dispuestas con moléculas (v.gr amino, carboxilo, grupo ácido o base) que a su vez conlleva a formar enlaces tipo amida entre el titanio y la molécula de interés (NpsAg). Como se observa a continuación, la capa de óxido y presencia de grupos OH, hidroxilos, se lleva a cabo mediante la activación de la superficie con un ataque químico con ácidos. En el caso de superficies activadas, su interacción con biomoléculas se da gracias a puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas o polares. Dicho proceso permitirá entonces la funcionalización con NpsAg en superficies de titanio previamente tratadas como fue mencionada.

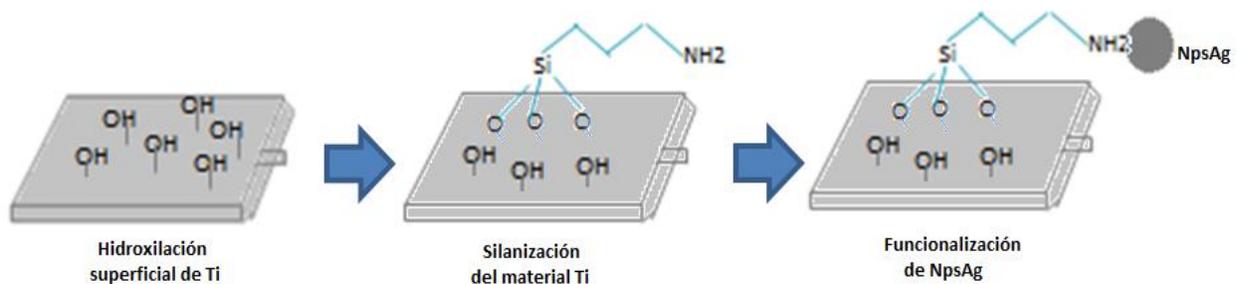


Figura 13. Representación esquemática de la silanización superficial de Ti

El proceso de silanización requiere entonces moléculas como agentes químicos, denominados organosilanos, conocidos como monómeros de silicio (Si). El silicio forma enlaces ($\text{CH}_3\text{-Si}$) por medio de cuatro enlaces de C y presenta una electronegatividad inferior al carbono. En general los organosilanos tienen la capacidad de flexibilizar la molécula inmovilizada, por la presencia de agentes espaciadores (v.gr cadenas alquiladas).

En la

Figura 14 se observa los elementos que participan en la funcionalización por silanización, el componente estructural inorgánico, grupos alcoxi que activan el proceso de hidroxilación. Además superficies con tres grupos hidroxilos; que interactúan (v.gr silicona, alúmina, cuarzo, superficies metálicas). Y un grupo organofuncional que forma enlaces con grupos que establecen el ataque de tipo nucleófilo. Finalmente, cada componente del organosilano actúa como interfaz material inorgánico-orgánico.

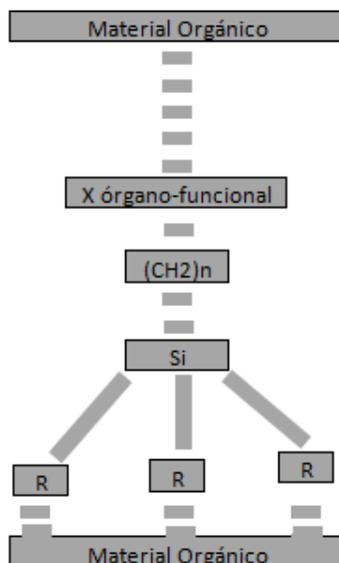


Figura 14. Funcionalización de material orgánico por silanización tomado y modificado de (134)

Campoccia *et al.* (135) y Minqi Wang *et al.* (136) examinaron a fondo algunos tipos de biomateriales antibacterianos y las estrategias subyacentes que involucran modificación superficial según el mecanismo de acción bacteriano (v.gr adherencia, proliferación, formación de biopelículas). En la Tabla 4 se observan algunas estrategias para modificar superficialmente un material, ya sea para prevenir problemas de adherencia y proliferación bacteriana, o contrarrestar la formación de biofilm.

Tabla 4. Estrategias de modificación superficial de implantes según el comportamiento bacteriano (135)(136).

ESTRATEGIAS DE MODIFICACIÓN SUPERFICIAL	
Acción bacteriana (Adherencia bacteriana)	Estrategia Prevención de adherencia Modificación Recubrimiento Cambios microestructura Humectabilidad
Acción bacteriana (Proliferación bacteriana)	Estrategia Daño celular por contacto Modificación Antibióticos Cambios microestructurales
Acción bacteriana (Formación Biopelículas)	Estrategia Daño de Antibiofilm Modificación Enzimas Antibióticos Inhibidores Qs quorum
Acción bacteriana (Bacterias que difunden desde el borde)	Estrategia Antibiótico Modificación Quitosan – Plata – Cobre- Zinc

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Establecer una ruta de elaboración de nanopartículas de plata y su deposición sobre los sustratos de titanio poroso con fines de mejorar su biocompatibilidad.

3.2 Objetivos específicos

1. Obtener suspensiones de nanopartículas de plata mediante síntesis por reducción química.
2. Evaluar estructural y morfológicamente nanopartículas de plata obtenidas mediante una ruta química.
3. Caracterizar superficies de titanio funcionalizadas con nanopartículas de plata (Ti-NpsAg).
4. Evaluar la actividad antibacteriana de sustratos de titanio funcionalizados con NpsAg.

4. METODOLOGÍA

El desarrollo de este proyecto se inició con la síntesis de las NpsAg por reducción química, donde se realizó la selección de la metodología adecuada, que garantizó la obtención de Nps de Ag para la posterior funcionalización de superficies de Ti. A continuación se caracterizó e identificó la suspensión coloidal de NpsAg obtenida, se observó su morfología y propiedades físico químicas (tamaño, carga, estabilidad). Posteriormente se realizaron los ensayos pilotos en el material de prueba (Ti macizo); que permitió validar la hidroxilación, la metodología de silanización, y la presencia de NpsAg e identificar cambios nano o micro estructurales a nivel superficial. Con los resultados satisfactorios de la prueba piloto se procedió entonces a cambiar el material de estudio por titanio poroso para su hidroxilación, biofuncionalización con NpsAg y por último se observó el efecto antibacteriano del material poroso.

En la síntesis de NpsAg por reducción química se utilizó nitrato de plata (AgNO_3 , 99.9%); borohidruro de sodio (NaBH_4 , 96%). Para la hidroxilación de la superficie de titanio (macizo y poroso); peróxido de hidrógeno (H_2SO_4 , 99,99%); ácido sulfúrico (H_2O_2 , 97%) de J.T. Baker®. En la silanización superficial de Ti; acetona 3-aminopropil-trietoxisilano (APTES, 99,5%) marca Sigma Aldrich. Y muestras de titanio macizo y poroso (relación de masa 99%, 5 mm de diámetro). Además de Agua ultra pura, Millipore Milli-Q systems.

4.1 Síntesis de NPsAg por reducción química

El proceso de síntesis de las NpsAg en suspensión se observa en la Figura 15. Se preparó de acuerdo a modificaciones de la metodología expuesta en Lee and Meisel's (110). A partir de 15 ml de agua Milli-Q con 0,002M AgNO_3 , se adicionó NaBH_4 al 1% (v/v) hasta que la solución alcanzó un color amarillo, todo esto manteniendo agitación vigorosa 115 rpm/min por 30 minutos en un baño de hielo (137), (138).

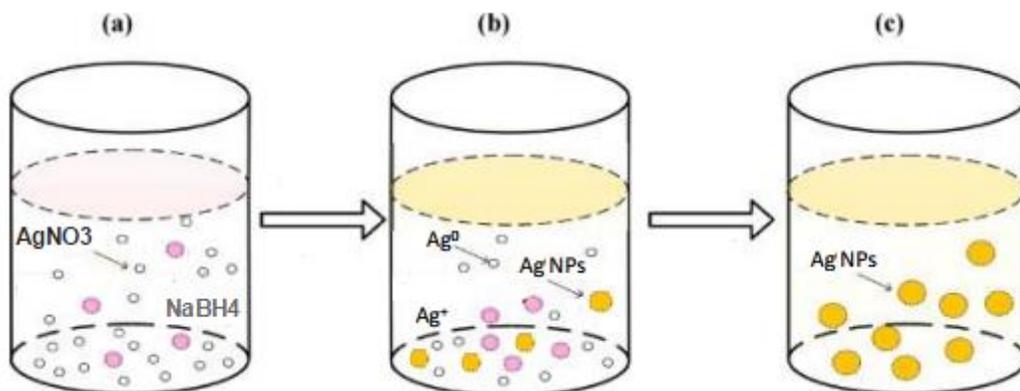


Figura 15. Proceso de síntesis por reducción química de un sistema nanoparticulado de plata.

En la Figura 16 se observa la fabricación de NpsAg en presencia o ausencia del material de titanio. Durante el ensayo piloto, se establecieron las condiciones de síntesis para la fabricación de los nanomateriales, es decir, se realizó la síntesis de las NpsAg en presencia del material de titanio y se denominó síntesis “*in situ*” (i) y en un segundo ensayo, se obtuvo primero la suspensión de NpsAg y luego se realizó la inmersión de la muestra de Ti, a esta se le denominó “sumergido” (s). Ambos procesos de fabricación utilizaron las mismas condiciones.

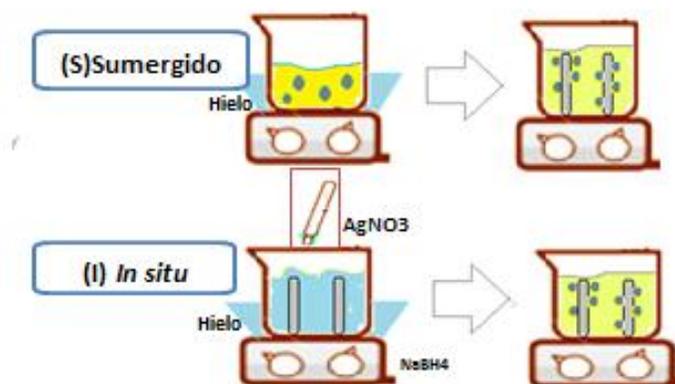


Figura 16. Representación esquemática de la síntesis de NpsAg (Titanio macizo)

4.1.1 Caracterización de NpsAg

4.1.1.1 Identificación de banda de resonancia del plasmón.

Las mediciones de absorción espectral se efectuaron por espectroscopia de absorción UV-vis con el equipo, UV-vis CARY 50 Bio. Además, se realizó un escaneo entre longitudes de 200 hasta 700 nm; un espectro de absorbancia entre 400-450 nm donde se identificó Ag. Las nanopartículas preparadas se midieron a una temperatura de 25 °C y repitió tres veces para cada muestra.

4.1.1.2 Identificación del potencial zeta (Z-P); tamaño de partícula (T); índice de polidispersidad (Pdi)

Las medidas fueron realizadas en un equipo NanoSizer Nano ZS®, donde se calculó el potencial Z, mediante el análisis de dispersión de luz electroforética, ELS, y en el caso de la distribución de tamaño de partícula y el Índice de polidispersidad fueron analizados con la dispersión de luz dinámica, DLS. De manera que, el análisis de la suspensión de nanopartículas preparadas, se realizó después de ejecutar su dilución con 500 µl de agua destilada. Por último, el tamaño de la partícula y las mediciones Pdi, identificadas, se realizaron a una temperatura de 25°C.

Finalmente, se calculó el diámetro hidrodinámico a partir de la función de autocorrelación de la intensidad de la luz dispersada de las partículas, con el supuesto, de que las partículas tenían forma cuasiesféricas. En el caso de las muestras para Z-P se colocaron en una celda zeta desechable y se tomaron tres medidas para obtener una lectura promedio de cada muestra.

4.1.1.3 Identificación de la forma, tamaño y composición.

Se realizó por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), usando el equipo (Tecnai G2 F20 de FEI). Como pretratamiento de la muestra, se tomó una muestra coloidal y se re-dispersó por ultrasonido y vortéx, que luego se depositó en una rejilla, porta muestras, para la toma de micrografías a escala nanométrica. Finalmente, se realizó un análisis semicuantitativo de la composición química de la suspensión de NpsAg, por espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDX) utilizando el sistema acoplado al equipo de TEM.

4.2 Modificación superficial Titanio macizo

Se realizó un ensayo piloto en muestras de titanio c.p macizo, con una superficie en acabado tipo espejo, por lo tanto no fueron sometidas a desbaste y pulido mecánico. Las muestras piloto se dividieron en dos lotes (L-a) y lote (L-b). Para la hidroxilación superficial del titanio: el primer lote (L-a) se sometió a un ataque químico convencional en una solución de NaOH (5 M), reportado por Pavón *et al* (23). El segundo lote (L-b) se hidroxiló con la exposición del Ti a una solución de ácido sulfúrico.

4.2.1 Tratamiento de Hidroxilación superficial de Ti macizo

Tratamiento (L-a): En 5 M de NaOH a 60 °C por 24 h fue embebida las muestras de titanio macizo de 1 milímetro de grosor. Seguidamente, se sometieron a un excesivo lavado con agua milli Q y burbujeo con nitrógeno (N₂).

Tratamiento (L-b): La superficie de titanio se grabó con "*solución de piraña*" durante 1,5 horas a 75 °C, 3:7 peróxido de hidrógeno al 30 % y ácido sulfúrico concentrado al 70 %. Hasta finalizar con el lavado de las muestran en agua milli q y su secado en una corriente de nitrógeno (N₂).

4.2.2 Silanización en muestras de titanio macizo c.p

Se realizó la silanización de la superficie de titanio hidroxilada (L-a) y (L-b), sumergiéndolas en una solución de (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES) al 1 % (V/V) durante 15 minutos en agitación constante, seguido de un tratamiento térmico en estufa de secado (BINDER[®]) convencional de transferencia de calor con aire convectivo a 115 °C por 1,5 h; adicional se

realizó tres lavados para el enjuague con agua y finalmente un secado en una corriente de nitrógeno (N₂).

4.1 Modificación superficial Titanio Poroso

Con los resultados satisfactorios obtenidos en la prueba piloto, equivalentes a obtener superficies de titanio macizo funcionalizado con NpsAg, se procedió al cambio de material Ti macizo a titanio poroso, se utilizó 36 muestras de titanio poroso con dos tamaños de poro 100-200 µm y 355-500 µm, para distintas densidades de poro 30 %, 40 %, 60 % respectivamente como se describió detalladamente en la Tabla 5.

Tabla 5 Representación esquemática de preparación de la superficie de Ti poroso

Densidad	30 %					
Tamaño	100-200 µm			355-500 µm		
Silanización + NpsAg	Ti-Si-NpsAg	Ti-Si-NpsAg	Ti-Si-NpsAg	Ti-Si-NpsAg	Ti-Si-NpsAg	Ti-Si-NpsAg
Tl control + Si	Ti-Si	Ti-Si	Ti-Si	Ti-Si	Ti-Si	Ti-Si
Densidad	40 %					
Tamaño	100-200 µm			355-500 µm		
Silanización + NpsAg	Ti-Si-NpsAg	Ti-Si-NpsAg	Ti-Si-NpsAg	Ti-Si-NpsAg	Ti-Si-NpsAg	Ti-Si-NpsAg
Tl control + Si	Ti-Si	Ti-Si	Ti-Si	Ti-Si	Ti-Si	Ti-Si
Densidad	60 %					
Tamaño	100-200 µm			355-500 µm		
Silanización + NpsAg	Ti-Si-NpsAg	Ti-Si-NpsAg	Ti-Si-NpsAg	Ti-Si-NpsAg	Ti-Si-NpsAg	Ti-Si-NpsAg
Tl control + Si	Ti-Si	Ti-Si	Ti-Si	Ti-Si	Ti-Si	Ti-Si

4.3.1 Pulido Mecánico –Preparación superficial de Ti poroso

El titanio poroso fue desbastado a pulido mecánicamente. El proceso se realizó en lijadoras rotativas Buehler, Figura 17, utilizando papel abrasivo con número de grano desde 240, 320, 400, 600, 1000, 2500 hasta 4000, utilizando agua como refrigerante de manera constante. Cada muestra se giró 90 grados hasta que todas las líneas de rayado alcanzaron la misma orientación. En último lugar se realizó la limpieza, expulsando las partículas residuales por vibraciones con ultrasonido, empleando acetona por 30 min e inmediatamente lavadas tres veces con agua milli q para retirar el exceso de acetona. Se gasificó con nitrógeno para prevenir una contaminación superficial durante su

almacenamiento y retirar el exceso de la solución. Las muestras se dejaron reposando sobre una cama de algodón hasta dar inicio a los tratamientos de hidroxilación con (L-a) y (L-b), silanización y finalmente la inmovilización de plata.



Figura 17 Pulidora Buehler ®

5.3.1.1 Hidroxilación de Ti poroso

La superficie limpia de Ti poroso con densidad de poro de 30 %, 40 % y 60 % se hidroxiló en NaOH 5 M a 60 °C por 24 h con el tratamiento (L-a), y las muestras de Ti con densidad poro 40 % se hidroxiló con el reactivo solución piraña (L-b) durante 1,5 horas a 75 °C. Esta última para examinar cambios microestructurales para una densidad de poro intermedia. Seguidamente todos los substratos de titanio poroso se sometieron a un excesivo lavado con agua milli q y burbujeo con nitrógeno.

5.3.1.2 Silanización en muestras de titanio poroso c.p

Se realizó la silanización en superficies de titanio poroso hidroxilatado, embebidas en solución de (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES) al 1 % (V/V) durante 15 minutos en agitación constante a pH 10.4. Seguida de un tratamiento térmico en estufa a 115⁰C por 15min, tres lavados consecutivos con agua y secado en una corriente de N₂. Inmediatamente.

4.3.2 Caracterización superficial de Titanio modificado con NpsAg

El Ti c.p se caracterizó con la ayuda de SEM (JEOL 6460LV), acoplado con equipo de dispersión de energía, EDX, para estudiar la composición, morfología, topografía (rugosidad), homogeneidad de la superficie y distribución de las NpsAg en Ti. Además, se observó la silanización en la superficie porosa NPsAg-Si-Ti y la integridad estructural (presencia de grietas) producto del pulido y desbaste mecánico.

4.3.3 Evaluación de la capacidad bactericida de titanio poroso modificado con NpsAg

Se validó la capacidad bactericida del titanio con NpsAg en *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Se usó el método de difusión Kirby-bauver, para su activación en agar sangre por 24 horas. Se preparó agar Müller-Hinton y con un hisopo de madera con punta de algodón estéril se inoculó 1×10^4 células/mL (i.e CFU/mL). Inmediatamente se depositó el Ti silanizado con NpsAg (Ti-Si-Nps) y su respectivo control (Ti-Si). Se identificó formación de zona de inhibición de crecimiento alrededor de la muestra de titanio.

Las muestras de Ti con NpsAg y su control se depositaron en cajas de vidrio por separado con *Staphylococcus aureus* por triplicado. Se incubaron a 37 °C en condiciones aerobias por 24 horas y se registró fotográficamente la formación de halos de inhibición. Se midieron las zonas de inhibición con el programa *imagen j* en la Figura 18, se puede observar, la representación del disco de Ti, la zona de inhibición alrededor del disco y la medición de la zona de inhibición. Para el análisis estadístico, se tomaron tres medidas para $n = 3$ de los distintos disco de titanio y superficies de control, correspondientes a 18 lecturas para superficie de muestra de Ti poroso.

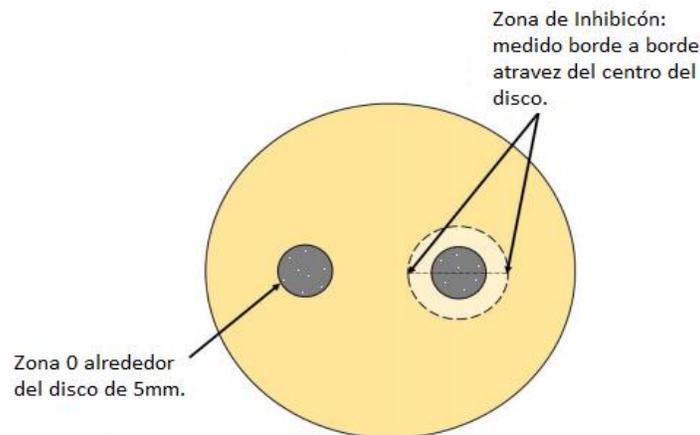


Figura 18. Representación de zona de inhibición bacteriana *Staphylococcus aureus*

5.4 Análisis estadístico

El tratamiento estadístico se realizó en las muestras de titanio con densidades de poro (30 %, 40 % y 60 %) y tamaño de poro (100-200 μm y 355-500 μm). Utilizando el programa estadístico R-estudio, donde se evaluó por análisis de varianza ANOVA independiente, con un R cuadrado de 0.989. Se validó los requisitos de: independencia; normalidad (ajuste a una distribución normal); homogeneidad de varianzas (homocedasticidad). Y por último el test Shapiro-Wilk, para identificar la distribución normal de la variable % densidad y tamaño de poro.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de obtener una ruta apropiada para la fabricación de NpsAg y la funcionalización superficial de titanio poroso. En un inicio la suspensión coloidal, se analizó por UV-vis donde la banda de resonancia del plasmón indicó presencia de Ag. Luego se calculó el potencial Z y el tamaño de partícula para estimar el tamaño, la carga y el índice de polidispersidad. Además, con la ayuda de TEM-EDX se observó la forma, composición y distribución de las NpsAg. Por último, se examinó el cambio superficial adquirido tanto en la prueba piloto (Ti-macizo) y el material de interés (Ti-poroso) silanizado, hidroxilatado e inmovilizado con NpsAg, caracterizados por micrografías SEM-EDX. Finalmente, se observó la formación del halo de inhibición alrededor del material que reveló actividad antibacteriana del material de titanio poroso sensibilizado con NpsAg.

5.1 Sistema coloidal de NpsAg

En la Figura 19 se observa el resultado de la elaboración de la suspensión coloidal de NpsAg, la cual correspondió a un típico color amarillo pálido indicativo de posible presencia de un sistema nanoparticulado, derivado de la reducción de la sal de plata AgNO_3 . Además, la proyección del láser observado que atraviesa la suspensión que inicialmente indica la presencia de nanopartículas, lo cual fue ratificado con técnicas como UV- vis.

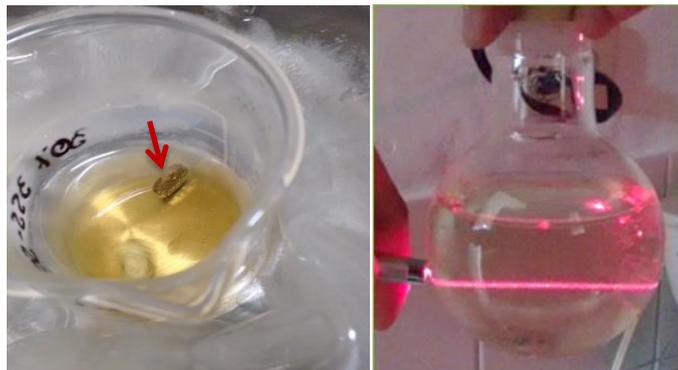


Figura 19. Sistema coloidal nanoparticulado de plata por reducción química.

La formación del sistema coloidal metálico implicó el desarrollo de una de fase nucleación y de crecimiento característico del proceso de síntesis de NpsAg por reducción química húmeda (109). Ambas presentes durante la obtención del crecimiento y tamaño de partículas observado en la suspensión coloidal de NPsAg denominada “*in situ*” (i) y sumergido (s) descrita en la Figura 16; donde se observó que al adicionar NaBH_4 a la solución, en condiciones de enfriamiento (hielo), ocurrió una rápida reducción y formación de la suspensión color gris oscura, propio de una nucleación rápida y la formación de Nps agregadas. Además se observó que al agregar NaBH_4 gota a gota la suspensión tomó un color gris justo después de su adición, el cual desapareció al garantizar condiciones de refrigeración (hielo) constante, hasta adquirir un color amarillo.

La temperatura de síntesis puede evitar la aglomeración de NpsAg. Li *et al.* (139) obtuvo cambios físicos similares a los observados en este trabajo; donde la suspensión coloidal reportada es de aspecto amarillo claro y gris. Este último relacionado con la aglomeración de la NpsAg en suspensión asociado a cambios de la fuerza iónica de la suspensión resultante. Además de factores que afectan directamente la suspensión final; como la velocidad de adición del agente reductor y concentración de catión sodio que modifican la característica final de Nps. En este caso para evitar la formación de agregados, la velocidad de adición del agente reductor se realizó por goteo, lentamente y con una constante agitación vigorosa a 115 rpm, donde se garantizó que el NaBH_4 entrara en contacto y se diluyera completamente.

Gonzales *et al.* (140) reportó cómo la temperatura ambiente en la suspensión influyó en la elaboración de suspensiones con tonos amarillos intensos. Y cambios notables a bajas y altas temperaturas donde la suspensión coloidal de NpsAg mostró un color amarillo claro, exponiendo a su vez morfologías predominantes cuasiesféricas propias de la condición térmica. Hegazy *et al.* (141) a su vez examinaron las condiciones de enfriamiento de la suspensión y observaron cambios entre amarillo claro y luego amarillo oscuro hasta rojizo ambos propios de una suspensión de Nps. Cabe destacar que la presencia de Ag en el sistema coloidal obtenido, se corrobora al analizar la suspensión por UV- vis, espectro de absorción ilustrado en la Figura 20, con una resonancia plasmónica en ambos casos que indica Ag en la suspensión fabricada.

La metodología desarrollada es consistente con Pillai y Kamat (142); estos utilizaron condiciones térmicas cercanas a la temperatura de ebullición y agentes de reducción diferentes. Además, obtuvieron un sistema coloidal final de NpsAg similar al obtenido en este trabajo. En el caso del agente reductor reportado (ion citrato) formó un complejo (quelato) con el ion plata en condiciones térmicas altas, debido al requerimiento de la reacción ya que este tipo de agentes tienen poca capacidad de reducción. En contraste con el agente reductor NaBH_4 empleado en este estudio bajo un sistema refrigerado (adicionando hielo), necesario ya que es un agente reductor fuerte y en caso contrario si es sometido a las altas temperaturas incrementaría su reactividad al punto de generar reacciones secundarias indeseadas como la reducción de iones de plata y no del ion

borohidruro. Finalmente, conocer las características fisicoquímicas del agente de reducción elegido para el proceso de elaboración de las NpsAg, así como las condiciones térmicas de la síntesis puede entonces favorecer los resultados deseados como son NpsAg con morfologías definidas sin reacciones secundarias.

Finalmente Qingxin *et al.* (143) observaron también cambios en el color de la suspensión de NpsAg, donde esta pudo alcanzar un color más oscuro al final de la reacción, este cambio de color fue asociado a un fenómeno conocido como excitación de las vibraciones del plasmón superficial en las NpsAg, siendo este supeditado por la formación de nanopartículas en suspensión de mayor tamaño. A continuación se explicará en detalle la banda plasmón y su importancia durante la obtención del sistema coloidal nanoparticulado.

5.1.1 Identificación de Ag en suspensión coloidal

La espectroscopia ultravioleta visible (UV-vis) al ser una técnica analítica que se caracteriza por lograr especificidad permite conocer las propiedades ópticas de la solución coloidal de NpsAg elaboradas. Gracias al envío de luz a la muestra obtenida durante la síntesis y medir la cantidad de absorción de luz. La técnica permitió examinar la longitud de onda a la que produjo la máxima banda de absorción (λ_{max}). En este caso la Ag se identifica entre 350λ y 450λ (144). Y por último como se desarrolla a continuación se puede ver su relación con las condiciones propias de las NpsAg.

En la Figura 20, se observan los espectros de absorción UV-vis en un intervalo de longitudes de onda de 200 a 800 nm de la banda de Resonancia del plasmón (UV-vis) más representativos; obtenidos de las muestras coloidales resultantes al sintetizar NpsAg. Estas mediciones se realizaron sobre las mismas muestras en dos momentos diferentes, a) diez minutos después de realizada la síntesis y b) dos meses después de su almacenamiento. Como se puede observar, los espectros de absorción netos de la suspensión presentan una banda de absorción principal; ambos centrados alrededor de 400 nm entre 387 y 388 nm. La posición de estas bandas se mantuvo para todas las muestras de NpsAg, sintetizadas tanto en las pruebas piloto y aquellas desarrolladas durante la fase de modificación superficial del titanio poroso.

En el caso de los espectros de absorción de las muestras sintetizadas y medidas a los 10 min se observa una absorción de 387 nm de longitud de onda. Además de varias bandas que no mantienen la posición del nivel máximo de absorbancia al realizar la medida, pero conservan el máximo de longitud de onda mencionado a). En este caso se observan tres curvas, el color morado y azul son curvas que resultan de sonicar la muestra antes de su medición, donde la energía del sistema coloidal de las NpsAg dispersas por la sonicación, genera un efecto de vibración y/o resonancia plasmón mayor que la muestra analizada en la curva roja; la cual se midió directamente después del proceso de fabricación de NpsAg. En el caso de la curva b), se observan dos curvas rojas y azul las cuales ambas son el resultado de analizar la suspensión coloidal de Ag a los dos meses de su elaboración y

almacenamiento, esta medición se realizó por duplicado sin observar cambios en la longitud de onda máxima.

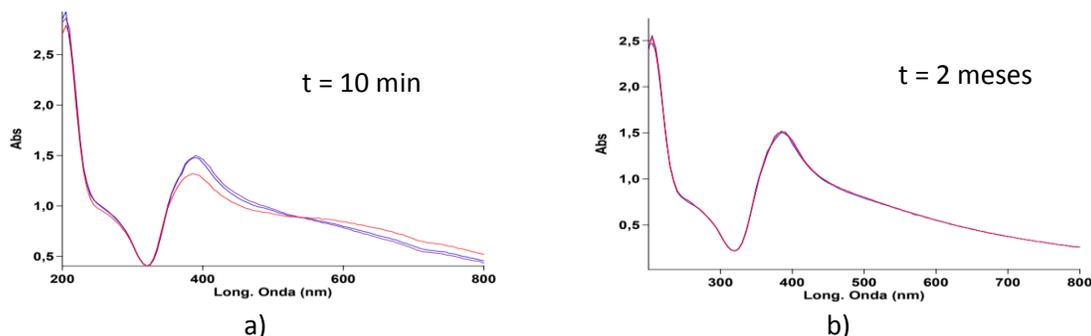


Figura 20. Absorbancias para sistemas nanoparticulados sintetizados por reducción química. a) medición realizada después de 10 min. b) medición realizada después de 2 meses

El máximo de la banda de absorción principal en ambos momentos de la medición se observan en a) y b) se encuentran centrados alrededor de los 400nm, lo que confirma la presencia de Ag en la suspensión. Y son consistentes con resultados similares después de realizar la caracterización UV-vis reportados por Chowdhury *et al* (145); al obtener un máximo pico de absorbancia alrededor de los 410 nm de longitud de onda después de analizar la suspensión coloidal de plata elaborada. Por lo tanto, se considera que el método de síntesis por reducción química empleado fue un método apropiado que permitió la obtención de Ag en la suspensión coloidal elaborada; ya que como se mencionó este material absorbe energía en forma de fotones y se presenta en longitudes de onda específicas propias de plata entre 350 nm y 450 nm (144). Lo cual ratificó la presencia de plata después de la fabricación de la suspensión. Drahanaky *et al.* (146) reportaron un espectro un UV-vis e indicaron un pico de absorbancia de 320 nm y 416 nm que correspondió a nanoesferas de plata en una dispersión coloidal de color amarilla, característico de NpsAg de forma esférica.

Por otro lado, al comparar los resultados de las Figuras 20 a) y b) estos dan prueba de la conservación de una suspensión coloidal de Ag a los dos meses de almacenamiento. Sin embargo, en la banda de absorción a) se observan bandas con espectros amplios (anchos) lo que probablemente se debe; a que la suspensión coloidal de Nps presenta amplia distribución de tamaño y zonas aglomeradas de NpsAg corroboradas en algunas regiones observadas en la muestra analizada en TEM. Finalmente en la Figura 20 b), se nota como se conservó propiedades ópticas similares a los espectros de absorción preparados inicialmente en la figura a), donde se presume mantuvo condiciones ópticas equivalentes y similitud de tamaños de partículas en la suspensión.

Roldán *et al.* (147) reportaron la presencia de silanos en sistemas de NpsAg estables, lo cual probablemente explica que la estabilidad observada en este trabajo; se benefició por

la interacción fuerte entre superficie de plata y el grupo amina del APTES utilizado en la funcionalización de titanio. Lo que permitió conservar a los dos meses de la síntesis la aparición de escasos cambios dominantes en los espectros observados. Sin embargo, para el otro caso, a pesar que, dicha posibilidad planteada no recae netamente sobre los grupos silanos, si es atribuible a la formación del Potenciales Zeta de -36 mV y -29.9 mV que favorece la repulsión de las NpsAg debido a la carga neta negativa entre la carga superficial de las NpsAg sistema coloidal de Ag.

Según estudios reportados por Liang *et al.* (147) utilizaron condiciones similares al presente estudio; obtenido con 2 mM de AgNO_3 y más altas de 10 mM, ambas permitieron la fabricación de nanopartículas cuasiesféricas, medianas y pequeñas. Donde a medida que las nanopartículas aumentaron de tamaño, el pico de absorción se desplazó a una longitud de onda más alta. Caso contrario fueron reportados por Prathna *et al.* (148), donde la formación de la absorbancia incrementó en suspensiones de NpsAg con morfologías pequeñas esféricas exhibiendo un solo pico de absorbancia alrededor de los 400 nm de longitud de onda disminuyendo la simetría de las nanopartículas.

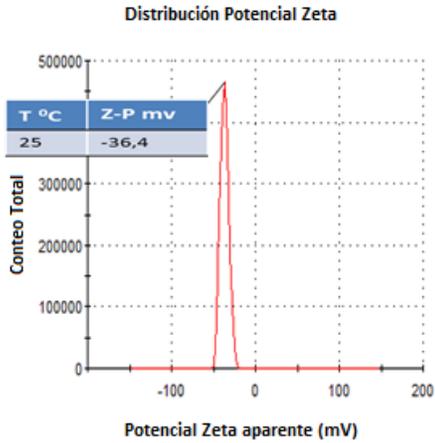
Vigneshwaran *et al* (149) reportaron como dicha cantidad de absorción de luz estará entonces ligada a las dimensiones nanométricas de la suspensión. Además, sugirió más detalles del sistema como es la disponibilidad de Ag o el estado agregado de las nanopartículas, derivado de la simetría de la banda plasmónica obtenida, al reportar una banda simétrica e indicar que la solución obtenida no contenía muchas partículas de plata agregadas, la cual fue validada con los resultados expuestos en la micrografía electrónica donde se evidenció dicha afirmación. Sayed *et al.* (150) establecieron que la absorbancia de plasmón reportada en literatura para coloides de plata abarcaba longitudes de onda entre 400-450 nm y varía dependiendo de forma, tamaño, dispersión y método de síntesis, donde también se obtuvieron en este estudio durante las pruebas pilotos observando un máximo de absorbancia aproximada de 435 nm, informado en el Anexo 9. Donde la presencia de un pico ancho corresponde a NpsAg polidispersas que conduce al acoplamiento de las vibraciones de Plasmón entre partículas vecinas, con morfologías cuasiesféricas confirmadas por micrografía TEM.

Kumbhar *et al* (151) reportaron algunas propiedades ópticas adquiridas durante el análisis de la suspensión coloidal de plata, donde esta correspondió a los diferentes tamaños de partículas en relación a los espectros de emisión de NpsAg. Evidenciaron espectros energéticos denominados discretos correspondientes a NpsAg con longitudes de onda más bajas, Zimasa *et al* (144) indicaron la interacción existente del espectro de absorción de las NpsAg y su relación directa con el tamaño de las Nps. Reportaron como se amplió el espectro de absorción debido al incremento de la distribución del tamaño de partícula. Lo cual corresponde a lo observado en la Figura 20, con una amplitud similar en el espectro UV-vis y se comprobará a continuación en el análisis de distribución de tamaño de NpsAg observado en la Figura 21.

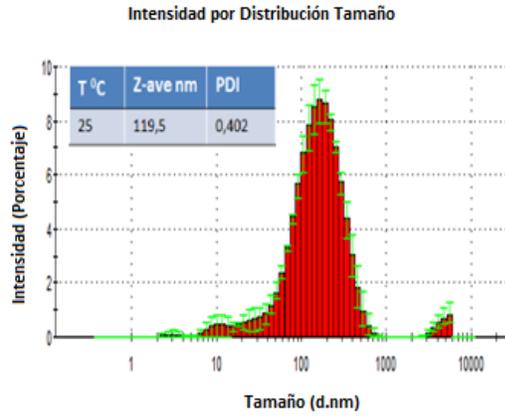
Evanoff y Chumanov (152) establecieron que el espectro de emisión de nanopartículas más pequeñas de 60 nm se da netamente por la absorción de la luz. Reportaron un espectro de la longitud de onda de NpsAg; entre un rango más amplio al observado de 400 nm y 600 nm en una región denominada “*dipolar*”. Caso contrario para partículas más grandes de 60 nm donde se reportó un desnivel en el espectro Uv-vis sobre los 400 nm de longitud de onda, ubicado en una zona “*Octupole*” del espectro. Para partículas aún más grandes que alcanzaron los 100 nm, con un espectro UV-vis de 550 nm esta zona fue reportada como “*Cuadrupol*”. En relación y según a lo observado en la Figura 20, estos resultados apuntan a que la población de NpsAg observada presenta una distribución de tamaño amplia, donde la absorbancia se observa en una zona “*Octupol*”.

5.1.2 Identificación de Potencial Z, Distribución de Tamaño y Estabilidad de NpsAg.

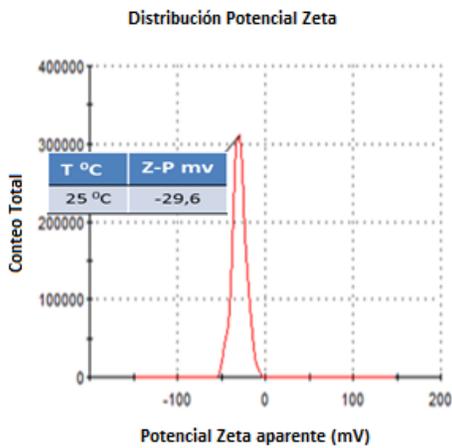
Los espectros de absorbancia observados tanto por Potencial Zeta (Z-P), Distribución de tamaño (T) e Índice de Polidispersidad (Pdi) del sistema coloidal, se identificaron mediante NanoSizer ZS. Dispersión de Luz dinámica, DLS, para T y Pdi y dispersión de luz electroforética, ELS, el Z-P. En Figura 21, se observan los espectros DLS, la distribución del tamaño de las partículas y la carga superficial de las mismas. Ambos para la suspensión obtenida y expuesta a titanio macizo con su respectivo tratamiento superficial establecido como (L-a) o (L-b), “*NaOH*” y “*Solución de piraña*” respectivamente. Donde la preparación de las NpsAg, se realizó en ambos casos bajo las mismas condiciones de reacción de acuerdo a modificaciones metodológicas descritas por Lee y Meisel's como tipo de agente reductor, condiciones térmicas (110).



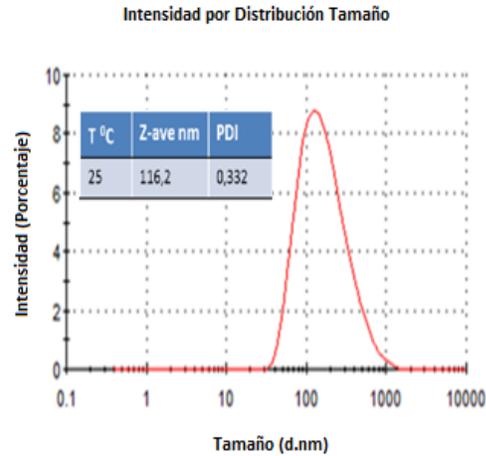
a) Z-P de NpsAg (L-b)



b) Z-tamaño de NpsAg (L-b)



c) Z-P de NpsAg (L-a)



d) Z-tamaño de NpsAg (L-a)

Figura 21 Espectros de DLS a) Potencial Z de suspensión adquirida por metodo “sumergido” en contacto(L-b) y b) Tamaño de NpsAg en suspensión sumergida en (L-b). c) Potencial Z de suspensión en contacto (L-a). d) Tamaño de partícula suspensión en contacto con(L-a).

En la Figura 21 se observa una amplia distribución de tamaño de partículas en promedio con valores promedios cercanos a los 100 nm, así como partículas que alcanzaron la escala micrométrica, donde según el grado de aglomeración adquirido superó la escala nano como se analizara más adelante en la Figura 24. Estos agregados pudieron dar lugar a la formación de depósitos de iones plata. Adema se presume que el agente precursor de plata utilizado en la formación de nanopartículas agregadas favoreció la obtención de tamaños superiores a 100 nm como ha sido descrito en Maroof *et al* (141) donde reportaron nanopartículas de plata con morfologías cuasi-esféricas desde 10–17 nm, medianas, bien definidas, como semillas de plata. Así como algunas otras NPsAg de mayor tamaño alcanzando un promedio de 119.5 nm las cuales fueron bien definidas como nanopartículas de plata.

Con respecto a la medición del potencial Z, esta metodología de síntesis de NpsAg “sumergida” si bien permitió una aproximación de la estabilidad del sistema coloidal. Las medidas de Índice de distribución de tamaño por el contrario muestran la tendencia a formar agregados. Este comportamiento es posible que se deba a la misma metodología empleada, donde el proceso de fabricación sumergida favoreció la formación de procesos de aglomeración. Caso contrario se observó durante la elaboración de sistemas coloidales “*in situ*” donde se notó una reducción de tamaño de NpsAg notable y el sistemas sin duda correspondió a una suspensión coloidal de NpsAg pequeñas posiblemente monodispersas.

Es importante precisar que valores de carga superficial en suspensiones con Nps que se encuentren en el rango comprendido inferior a -30 mV o valores superiores a +30 mV es donde reflejará una mayor estabilidad de la solución coloidal obtenida. Por lo tanto, los resultados alcanzados de Potencial Z observados en la Figura 21 a) y c), indican que la suspensión coloidal de Ag alcanzó valores de -29.6 mV y -36.4 mV a 25 °C, tanto para NpsAg en contacto con Ti (L-a) y (L-b). Dicha carga superficial evidenció el desarrollo final de un sistema coloidal de NpsAg con regiones estables. En ambos casos las NpsAg sintetizadas exhibieron una carga superficial negativa de -29.6 mV, lo que indicó una suspensión coloidal con valores de potencial Zeta en promedio estables.

Además, se precisa que dicha estabilidad es atribuible en primer lugar, al reactivo sobrante en la suspensión como el 3-aminopropil-trietoxisilano (APTES). Donde el efecto de estabilización en la suspensión se sugiere que no solo se da por la interacción electrostática, sino por efectos estéricos causados por el extenso enlace que el APTES forma a en la superficie de las nanopartículas evitando la formación de agregados de Ag. Bantz *et al* (153) exhibieron un potencial Z de -40 mV, que superó al máximo observado en este estudio de -36.4 mV, lo cual favorecía en el caso de una carga superficial muy negativa obtener sistemas de NpsAg con mayor estabilidad coloidal así como incidir en la interacción de las Nps con el medio biológico. En el caso contrario donde el APTES no estuvo presente es posible entonces, que estas sea zonas con una repulsión electrostática fuerte la cual se puede relacionar a los valores reportados con anterioridad de -36.4 mV que favoreció los valores de estabilidad reportados.

Un caso diferente lo observaron en Nur *et al.* (154) con un valor de potencial Zeta de -53.77 mV, el valor negativo indicó la absorción de varios aniones en la superficie de NpsAg y un valor de zeta alto que mostró la mayor probabilidad de agregarse. En reportes hechos por los autores Nur *et al.* (155) A partir de un estudio de estabilidad de NpsAg en suspensión, investigaron que el potencial Zeta adquirió un pico a -15.58 mV denominándolas como NpsAg estables, obtenida gracias a una carga superficial lo suficientemente alta que finalmente evitó la regulación de la formación de agregados, y a partir del valor de potencial zeta concluyeron que la suspensión de las NpsAg era cercano.

Finalmente Kyaw *et al.* (156) estableció el potencial Z como un factor importante durante el control del tamaño nanométrico resultante, así como controlar la estabilidad de la suspensión, además de la dispersión de las NpsAg, y características específicas como la

morfología del nanomaterial y tamaño de las NpsAg que pueden establecer daño celular e inducir a la muerte bacteriana. Ya sea por la disrupción de membrana celular, formación de especies reactivas de oxígeno, ROS, que presentan una interacción con ADN y generan un daño irreversible y finalmente por inhibición enzimática.

La distribución del tamaño de partícula y el índice de polidispersidad obtenido en la Figura 21 b) y d), ambas sintetizadas por el método denominado “sumergido” donde se observan distribuciones de tamaño de partículas obtenidas y expuestas a Ti macizo (L-a) y (L-b) respectivamente. Este reveló para el primer caso una suspensión de partículas de Ag con un diámetro promedio de 116,2 nm y un índice de polidispersidad, Pdi, 0,332. Y en el segundo caso partículas de 119,5 nm a 25 °C y un Pdi de 0,402. Se puede observar que indistinto del tipo de tratamiento superficial desarrollado en el material macizo y que entro en contacto con suspensión coloidal de Ag. En ambos casos los resultados son consistentes, como se indica en resumen en la

Tabla 6 con valores promedios de tamaño de partícula (T) cercanos y propiedades físicas como Pdi específicas determinadas para los dos Tipos de materiales de Ti macizo expuesto a las NpsAg sintetizada por reducción química a 25 °C y pH 7. Finalmente respaldados por la bibliografía citada con anterioridad se resalta que los tamaños reportados de Ag en suspensión coloidal por el método “sumergido” son denominados como NpsAg por ende se menciona que dicho tamaño aún conserva la escala nano aunque en promedio su tamaño supera los 100 nm.

Tabla 6. Potencial Zeta (ZP), Tamaño de Partícula (T), Índice de Polidispersidad (Pdi) de suspensión coloidal de Ag.

Reducción Química NpsAg 25°C				
Hidroxilación	ZP mV	Tamaño d. nm	Pdi	pH
Ti-(L-a)	-29,6	116,2	0,332	7
Ti-(L-b)	-36,4	119,5	0,402	7

Se resalta el caso del índice de polidispersión expuesto anteriormente, este corresponde a la medida de la amplitud de la distribución del tamaño promedio de las partículas (157). Cuanto menor sea este valor, las partículas tendrán una mayor tendencia a encontrarse en un rango pequeño de distribución de tamaño. Wu, Jian y Wiwi (158) indicaron que un valor Pdi, definido en términos del tamaño medio de la partícula y distribución de tamaño. Indica para un Pdi de 0,1 a 0,25 una distribución de tamaño estrecha, caso contrario a un valor Pdi mayor de 0,5 descrito como una distribución amplia. Como es evidente, para ambos tamaños promedios de las partículas obtenidas de 116,2 nm y 119,5 nm, se pueden observar que los valores de índice de polidispersión son inferiores a 0.5. Ambos obtenidos por el analizador de la muestra con valores de Pdi 0,332 y 0,402 respectivamente. Estos son consistentes con el valor de estabilidad observado en el Potencial zeta, ZP, que puede ser la razón principal para producir tamaños de partícula

con un índice de distribución medianamente estrecho en ambos casos, valores similar se adquirieron con un Pdi de 0,369 reflejados en una formación estable de AgNPs de color amarilla clara a un pH de 8 sin sedimentos (155).

Sin embargo en las investigaciones de Haque *et al.* (159) revelaron valores de índice de polidispersidad desde 0,130 hasta 0.212, donde el valor Pdi es menor a 0,3 que es el adquirido en este estudio. Además, reportaron como Valores Pdi igual y/o mayor que 1 indicó la precipitación de la solución. Por ende, ambos valores Pdi superaron el máximo reportado con Pdi de 0.402, alejado del Pdi mínimo establecido de 0,130 el cual reflejó buenas propiedades coloidales, lo que sugiere que aunque en ambos se favorecen la precipitación el valor Pdi 0,332 tienden a conservar mejores propiedades coloidales que 0,402 ya que conserva una menor estabilidad coloidal como lo evidencio el estudio. Por último, el valor Pdi 0,130 reportado se observó fue asociado a la relación $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3= 10:1$ y en el caso del Pdi mínimo 0,212 en la relación $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3= 2:1$. Siendo este último similar a desarrollado en el trabajo con 0,002 M AgNO_3 y NaBH_4 al 1% (v/v). Sin embargo, aunque los valores Pdi observados no oscilaron en valores Pdi 0,1 la suspensión presento NpsAg en la mayoría de las suspensiones analizadas, que aunque se reportaron precipitados en algunos casos estos no interfirieron en el anclaje homogéneo y poli disperso en la superficie de titanio funcionalizado.

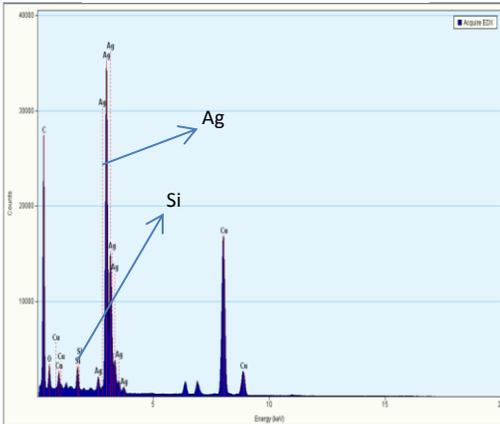
Finalmente, a partir del valor de la distribución de tamaño de partícula (T) resultante se observa la tendencia para formar sistemas coloidales estables. Tal comportamiento sugirió la presencia de cargas superficiales fuertes en las NpsAg que dificultaron la aglomeración, como cargas eléctricas efectivas que obstaculizaron aglomeraciones en el sistema y estabilidad en algunas regiones de la suspensión estudiada como se reportan en la Figura 22 b), e) y h) correspondientes con a aquellos resultados adquiridos para estabilidad de NpsAg en suspensión (160). Sin embargo, el tamaño promedio y el Pdi observado por DLS coincide con los resultados de la imagen TEM y la distribución del tamaño de partícula evaluada, que son los que finalmente validaron la formación de NpsAg para la funcionalización del Ti. Además al estudiar la dispersión dinámica de la luz, queda claro que las NPsAg exhiben una distribución de tamaño medianamente estrecha. Pero dichos valores de potencial zeta -36,4 mV indicaron una estabilización que no es en su totalidad completa de la NpsAg, que puede ser la razón principal para producir partículas con un índice de distribución de tamaño amplio y aglomeración observados en algunos casos.

5.1.3 Imágenes TEM y EDX de suspensión coloidal NpsAg

Para concluir la caracterización de las NpsAg sintetizadas durante la fase inicial del trabajo, se realizó una toma de imágenes en TEM, acoplado a un análisis de dispersión de energía de rayos X, EDX e histogramas de tamaño de partículas. En la Figura 22 a), d) y g) se exponen los espectros obtenidos EDX de las NpsAg sintetizadas por la metodología “in situ”, micrografías electrónicas de transmisión, TEM, (b,e,h) e histogramas de distribución de tamaño de NpsAg (c,f,i). Donde se observa en diferentes puntos de la muestra en

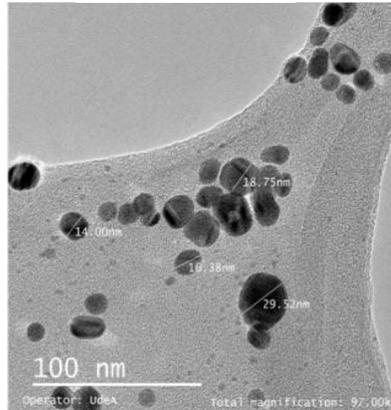
suspensión que efectivamente las morfologías son pequeñas cuasiesféricas y en el análisis de composición corroborar con éxito la presencia de NpsAg elaborada, así como presencia de otros materiales intrínsecos de la rejilla del equipo como se expone a continuación.

EDX Dispersión de energía



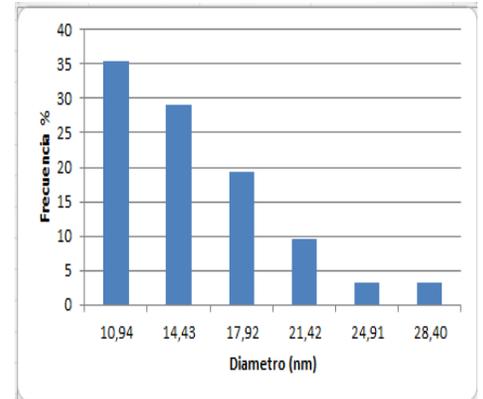
a)

Micrografía TEM

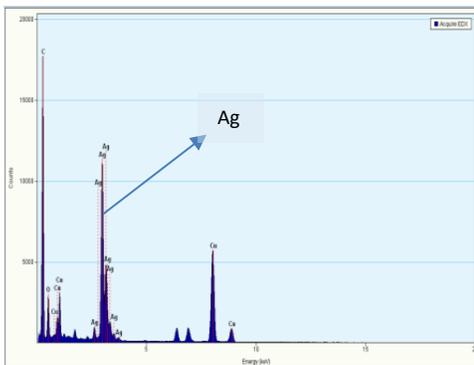


b)

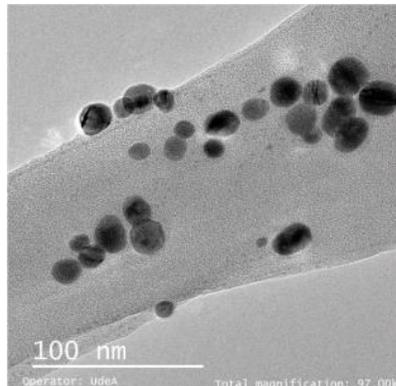
Histograma (Tamaño)



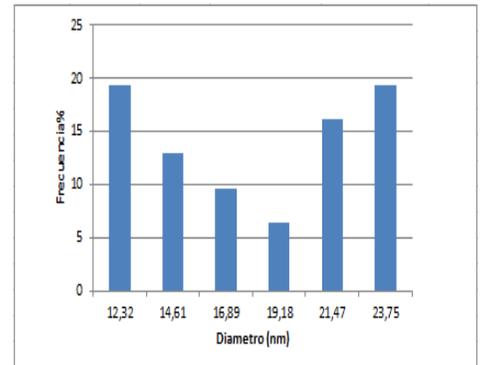
c)



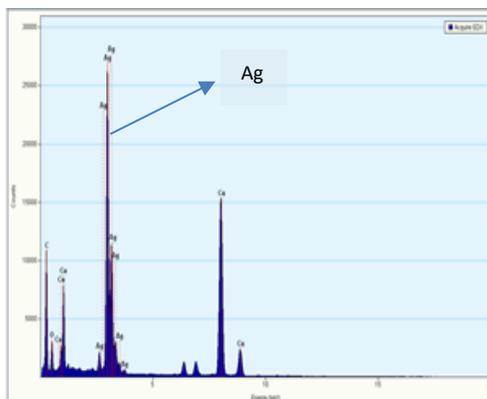
d)



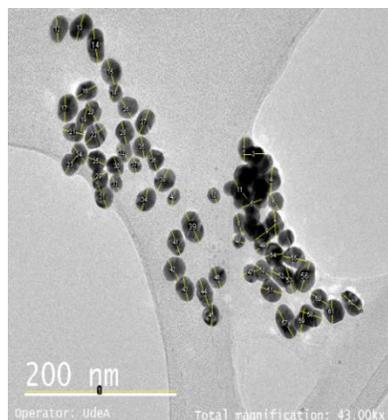
e)



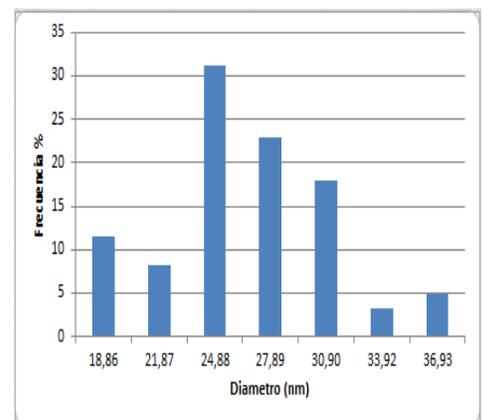
f)



g)



h)



i)

Figura 22. Espectros de rayos X de dispersión de energía (EDX) de NpsAg sintetizadas por la metodología “*in situ*” con 15 ml con 0.002 M AgNO₃ (a,d,g). Micrografías electrónicas de transmisión TEM (b,e,h) e histogramas de distribución de tamaño de NpsAg (c,f,i).

Las NpsAg se observan como pequeños y medianos puntos grises cuasiesféricos, con tamaños relativamente uniformes representados en la figura 22 b), e) y h) que pertenecen a las micrografías TEM de campo brillante donde se reflejan muestras de suspensiones coloidales desprovistas de agregados de plata. Nanopartículas medianas que a juzgar por las micrografías observadas probablemente presentan una distribución de tamaño y variación de unos pocos a decenas de nanómetros. La mayoría con un tamaño relativamente uniforme en el rango aproximado de 10 nm a 36,9 nm. A diferencia de lo observado en figura 22 b) donde se identificó una nueva condición en la dispersión de las muestras analizadas, densidades de Ag alta, levemente agregadas que alcanzan un diámetro promedio de 119 nm descrito en el histograma de distribución de tamaño. Lo que indica que se requiere mayor control en el proceso de aglomeración durante el proceso de síntesis donde se establezcan con rigurosidad y precisión sistemas monodispersos.

Figura 22 b), exhibe la formación de las nanopartículas más pequeñas sintetizadas, y en el caso del histograma c) se observa además que predominan los diámetros de 10,94 nm, a diferencia de la figura f) y i) donde predominan tamaños de 23,75 nm y 24,88 nm respectivamente. Observando una densidad de Nps alta que alcanza un tamaño de 30,90 nm. Agnihotr *et al* (161) reportó tamaños y morfologías similares en suspensiones de NpsAg dispersas, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 50, 63, 85, y 100 nm descubrieron que en su mayoría las nanopartículas fueron esféricas. Además, de la coexistencia de Nps con diámetros mayores, atribuidos a manchas secundarias de distracción reportadas por micrografías TEM, descritas como cristales interpuestos, corroborando nanopartículas de plata con un tamaño promedio superior a 10 nm.

En la Figura 22 a), se observa presencia de Si, en la suspensión coloidal analizada. Si bien con anterioridad se aseveró el caso de dicho material como un factor que posiblemente mejoró la dispersión. Es prematuro señalarlo con fuerza que su presencia, Si, es la responsable de garantizar la dispersión de las Nps fabricadas ya que se requiere un mayor estudio, sin embargo, en la mayoría de las micrografías analizadas, TEM, no se observan nanopartículas superpuestas ni formación reiterativa de agregados. Interesante entonces sería validar en futuros estudios sí la presencia de Si establece una proporcionada estabilidad ya sea de tipo electrostático y/o electroestérica en procesos de fabricación de nanomateriales de plata como al parecer ocurrió en este estudio.

En cuanto a los histogramas de distribución de tamaño de NpsAg observados en la Figura 22, fueron elaborados a partir de las micrografías obtenidos en TEM, procesando los diámetros en el analizador de imagen Image J, se aprecian nanopartículas con diámetros hasta 36,7 nm que indican el crecimiento máximo en las NpsAg observado. Además muestras donde predominan menores diámetros de 10,94 nm a 17,42 nm. Sivera *et al*

(162) han reportado la presencia de pequeñas NpsAg dispersas con morfologías circulares de 10 nm, con ayuda de TEM confirmaron su dimensión real afirmando a su vez que los valores presentados por EDX no correspondían a las micrografías TEM, por lo tanto dicha técnica se reportó como inexacta para determinar el diámetro real de las NpsAg sintetizadas, además no fue viable para conocer la tendencia relacionada con el cambio de la concentración.

Finalmente, los espectros de rayos X de dispersión de energía (EDX) de partículas sintetizadas y observadas en TEM se tomaron para la amplitud de toda la imagen que validó la formación de Nps Ag. Que a su vez corresponde a los resultados analíticos de los espectros UV-vis donde se corrobora la formación de sistemas coloidales de plata en el párrafo 6.2.1. El complemento de los resultados analíticos de EDX se observan en las Figuras 22 a), d) y g) obtenido de tres muestras diferentes. La suspensión coloidal caracterizada en la figura b), e) y h), demuestra que las NpsAg cuasiesféricas identificadas en el espectro entre (2,5 -3,2 keV). Como lo indicó Liang *et al.* (163) donde por análisis de composición elemental exhibió un pico de Ag entre (3,0 y 3,2 keV), que confirmó NpsAg observadas en las imágenes TEM si correspondieron a átomos de Ag puros.

El éxito de la formación de NpAg en suspensión se confirma con los picos de (Ag) dominantes en todos los espectros EDX observados, que corrobora que la formación de nanopartículas observadas en TEM era de Ag. Además, los picos de cobre (Cu) y oxígeno (O) observados están asociados a la rejilla que se usó como sustrato para sostener la muestra. Azarkhalil y Keyvani (164) identificaron nanopartículas esféricas superiores a las sintetizadas 36,93 nm, con diámetros de 50 a 70 nm. La composición de las muestras analizadas por EDX, indicó que la técnica fue efectiva y respaldó las morfologías de los nanomateriales de Ag observadas por SEM. Hani, Soon y Mohd (165) reportaron resultados similares al analizar y caracterizar NpsAg con el mismo método de estudio por reducción química en presencia del agente reductor borohidruro de sodio. Resultados reportados por rayos X de dispersión de energía ratificaron el mayor rendimiento de plata (Ag), 67.39 % como el observado en la figura 22 a), d) y g) al analizar tres muestras diferentes donde se observan que los espectros de Ag sobresalen con un pico máximo en todas las muestras. Y mediante análisis por EDX validar la composición de las Nps elaboradas y observadas en TEM. Caso contrario al método de síntesis en condiciones de enfriamiento (hielo) donde se observó la presencia de Ag en rango 2,5 a -3,2 keV, fue el reportado por leila *et al.*, (166) bajo condiciones de síntesis entre 400 °C y 800 °C. Y presencia de plata en 2,75 keV y 3,04 keV respectivamente. A raíz de un menor efecto de atracción entre los electrones de conducción, iones metálicos a medida que reportaron una disminución del tamaño de partícula y menos números de átomos que formaban las nanopartículas metálicas.

5.2 Caracterización superficial de Ti macizo y poroso

Se realizó un análisis semicuantitativo por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), acoplado con una espectrometría de dispersión de energía (EDS). Como se aprecia en la Figura 23 a) y b) bandas de la composición superficial de Ti macizo modificado con la suspensión coloidal de Ag. En el primer caso se expone el espectro EDS de la caracterización superficial de Ti macizo, en contacto con la suspensión de NpsAg fabricadas por la metodología a) “sumergido” y para el segundo la metodología b) “*in situ*”.

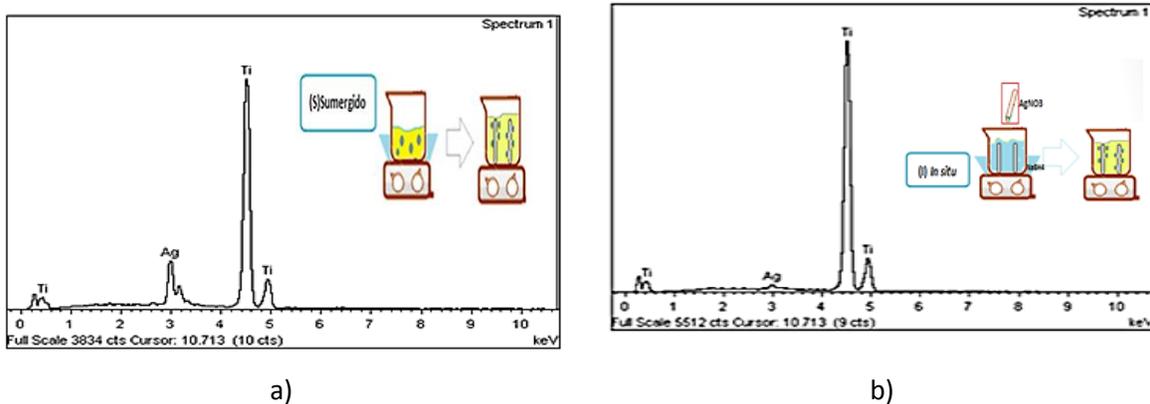


Figura 23. Espectros de EDS de las suspensiones de NpsAg elaboradas metodo sumergido y in situ. Síntesis de NpsAg a) condiciones de reducción húmeda sumergido b) reducción húmeda in situ.

Los espectros, obtenidos al analizar la suspensión coloidal de NpsAg por la metodología, “*in situ*” y la metodología de síntesis “*sumergido*” elaboradas bajo las mismas condiciones de Reducción química húmeda como se explicó en la metodología de síntesis de NpsAg. Permiten entonces observar en la Figura 23 a), es el resultado del protocolo “sumergido”, con un espectro mucho más pronunciado de Ag en 3 keV y Ti 4,5 keV superando al observado en la Figura 23 b) con un espectro de Ag menos sobresaliente en 3 keV. Se evidencian también los espectros netos de Ti, y confirman la presencia de Ag en Ti puro macizo ya que no se observan espectros asociados a otro tipo de material el cual se corroboró en análisis por mapeo composicional.

Tanto en los proceso de síntesis de fabricación de NpsAg denominados “*in situ*” y “*sumergido*” se obtuvo que en ambos protocolos superficies de Ti funcionalizados con Ag y por análisis en SEM se observó entonces que la metodología “*in situ*” permite una buena distribución de Ag en la superficie del titanio macizo. En especial ya que una vez se obtenían las NpsAg en simultaneo estas eran inmovilizadas homogéneamente en la superficie como se observa en la Figura 23 a), a diferencia de las NpsAg obtenidas por el proceso “*sumergido*”, donde si bien el espectro de EDS de Ag en la figura 24 a) se observa que fue más alto en 3 Kev, donde estas presentaban una distribución de tamaño amplia

como se observó en la figura 21 , debido a la posible formación de agregados de Ag al entrar en contacto con la superficie de Ti con tamaños asociados a escala micras. Cabe resaltar que resultados similares donde se establezca la diferencia de inmovilización de Ag planteada para ambos casos no ha sido reportada en superficies de Ti inmovilizado con NpsAg. Sin embargo Pris y Krzysztof *et al.* (167) indicaron la importancia del efecto de agitación con respecto a la aglomeración de las NpsAg. Para este caso la agitación fue rigurosa y constante a 115rpm, en plancha de agitación donde aseguraba la mezcla de los reactivos y su dispersión de las NpsAg. En contraste Pris y Krzysztof *et al.* (167) mostraron cambios observados durante la elaboración de la suspensión coloidal de NpsAg, con una agitación superior a 30 min, el cual expuso variaciones en el color observando tonos oscuros y aún más cuando establecieron tiempos más extensos de agitación donde registraron la aglomeración notoria de las partículas en el medio. Por otro lado la formación de agregados fue reportada en el mayor tiempo de agitación sugiriendo el agotamiento de los reactivos de manera desigual, y formación de Nps a diferentes tiempos de reacción.

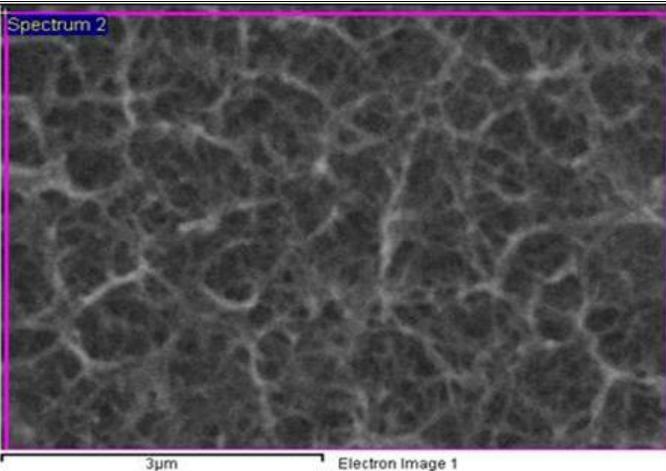
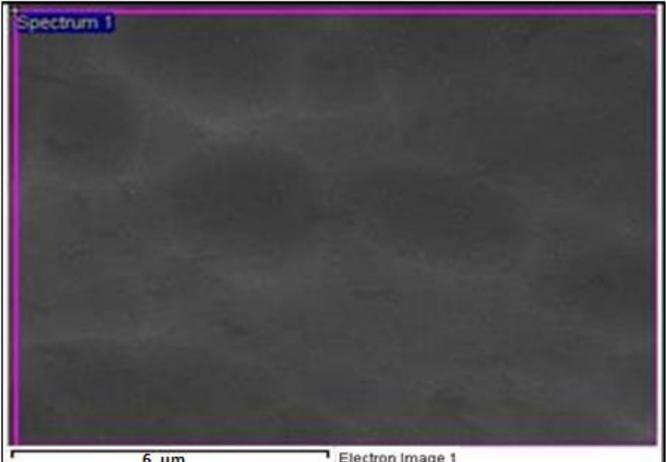
Es importante precisar a continuación el trabajo reportado por Burda *et al.* (109) donde evidenciaron la pertinencia de conocer otros factores como la energía de activación en la suspensión de NpsAg, al ser un parámetro que incide en el rendimiento de la suspensión coloidal de las NPs. Reportado entonces como un factor que controla diferentes estados de gasto energético de activación muy variante durante el proceso de elaboración, donde la activación es alta en la etapa inicial de la síntesis de NPs, y de baja energía durante la fase de crecimiento.

Por lo tanto, este tipo de análisis responden a resultados variantes con respecto a activación energética en especial si se cuentan con poblaciones coloidales con distribuciones de tamaño amplios donde probablemente presenta diferentes zonas energéticas donde inciden con mayor durante los procesos de elaboración de semillas de plata observados en la formación de sistemas coloidales con dimensiones cercanas a los 12 nm. Caber resaltar que en los sistemas nanoparticulados de Ag fabricados, se ha sugerido que la energía de área específica presente por unidad de masa incrementó con el total de área de superficie y depende de las dimensiones del nanomaterial donde de ser abordadas en este estudio, se garantizaría nanopartículas en suspensión con características favorables, tamaños definidos para su posterior inmovilización en superficies de titanio c.p.

Por otro lado Hubenthal (169) ha afirmado en la importancia de mejorar superficies de Ti inmovilizadas con una proporción adecuada de nanomateriales ya sea en presencia de especies estabilizantes que garanticen el control de cambios a nivel nanométrico. Sin embargo los hallazgos del presente estudio evidencian una distribución homogénea de los nanomateriales de interés sobre la mayoría de superficies de Titanio macizo y poroso descritos a continuación, lo que indica que el desarrollo de este tipo de metodologías favorece modificaciones con NpsAg con una buena homogeneidad superficial en Ti.

Los resultados de las observaciones de SEM fueron comparadas en la Tabla 7, donde se observó los cambios microestructurales adquiridos a causa del ataque químico efectuado de la hidroxilación superficial del Ti. Siendo de interés para la preparación superficial del Ti antes de su inmovilización con NpsAg. En la Tabla 7 se identifica cambios drásticos obtenidos durante la exposición superficial de Ti a metodología L-a, y se observó superficies rugosas, presencia de superficies irregulares dentro de la escala de 1 μ m como se observa en la figura 28 c y tabla 7, la cual corresponde a la alteración morfológica del material hidroxilado. En el caso de L-b con una mayor formación de superficies lisas, ausencia de anisotropismo y mayor regularidad del material atacado. En vista de que las superficies atacadas en la prueba piloto mostraron con éxito la inmovilización superficial de NpsAg, se procedió a realizar ensayos en probetas porosas y finalmente empleadas en pruebas de comportamiento antibacteriano, como se explica en las siguientes secciones.

Tabla 7. Modificación estructural de superficies de titanio atacadas químicamente con tratamiento L-a (NaOH) y tratamiento L-b (Piraña) ambas desprovistas de NpsAg para superficies de titanio 100-200 μ m, 355-500 μ m, y densidades 30 % -40 %-60 %.

TITANIO	TRATAMIENTO	OBSERVACIÓN
100-200 μ m 355-500 μ m 30 % -40 %-60 %	L-a	
100-200 μ m 355-500 μ m 30 % -40 %-60 %	L-b	

5.2.1 Caracterización superficial de titanio macizo modificado con NpsAg

La Figura 24 se observa microestructuras adquiridas en superficies caracterizadas en muestras de Ti macizo y poroso hidroxiladas y silanizados. Por micrografías SEM se revelan NpsAg depositadas, distribuidas como pequeños puntos luminosos reportados en la Figura c) y algunos agregados como se observa en la Micrografía d). La topografía se conservó tanto para las muestras de titanio modificadas macizas y porosas. Las muestras de Ti lavadas y atacadas con NaOH observada en Figura 24 a), mostro un cambio superficial topográfico significativo, mayor irregularidad en su estructura, texturas cóncavas y convexas, orientaciones superficiales denominadas anisotrópicas, y rugosidades < 100 nm, ya que se encontraron en la escala de 1 μm . Equivalente a el ataque químico sin zonas de preferencia de menores cambios superficiales, sugiriendo que este tratamiento en material macizo atacó toda la superficie.

Tratamiento L-a de Ti macizo con NpsAg

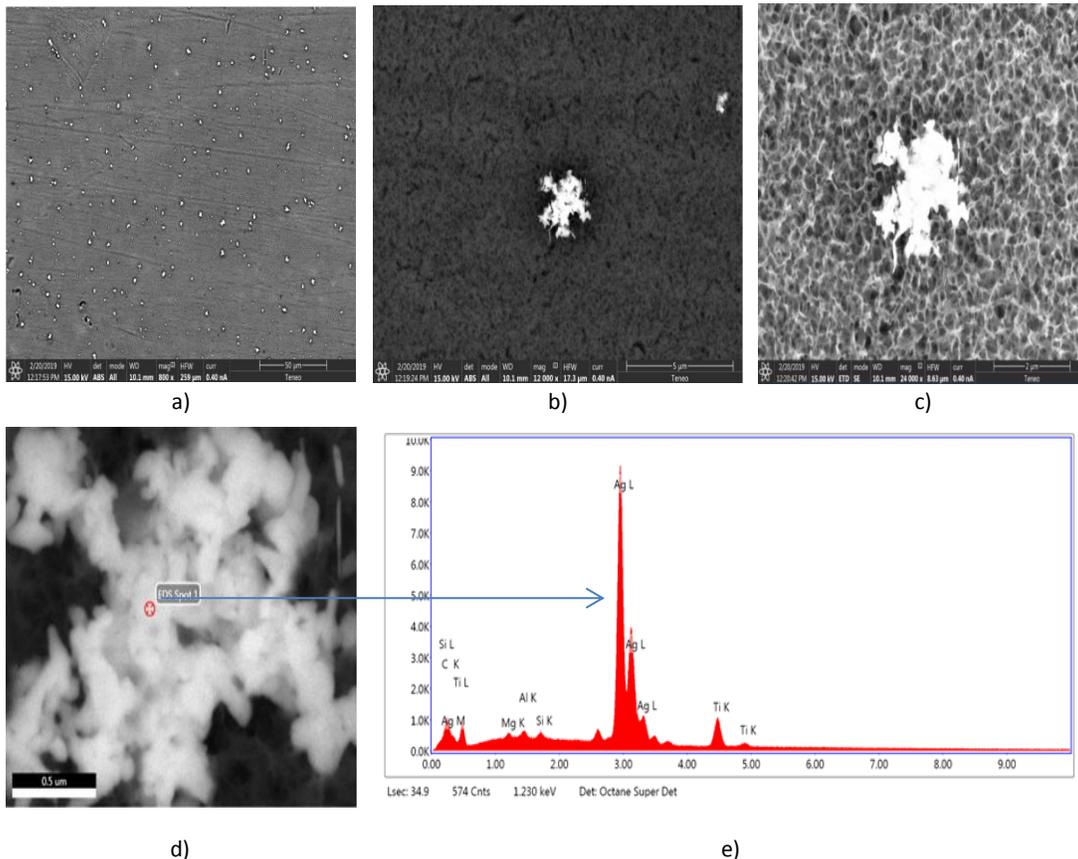


Figura 24. Micrografías Tratamiento L-a: En 5 M de NaOH a 60 °C por 24 h a) NpsAg distribuidas en superficie de Ti macizo. b) NpAg-Ti, c) Superficie hidroxilada con NaOH y NpsAg, d) EDS agregado de Ag. e) Analisis EDS identificación química de Ti modificado con Ag y Si

Goharian (170) indico formación de rugosidades de 70 nm, con características topográficas que eventualmente mejoraron la osteointegración del material. Similar a las rugosidades de la Figura 24 a) dimensiones 70 nm. Reportando además la unión de células osteoblásticas al implante, ejerciendo contacto con el tejido óseo nanoporoso, sugiriendo que a mayor rugosidad de material de titanio mejora la proliferación de células osteogénicas entre superficie del material y la interfaz del implante óseo ya que mejora propiedades como la hidrofiliidad del material, anclaje de proteínas y finalmente células como osteoblastos como se discutirá más adelante.

Finalmente, las micrografías SEM revelaron la deposición de NpsAg en titanio macizo expuestos tanto al tratamiento L-b como L-a. En el caso del primero como se analiza en la Figura 25 a), se observa una zona con una menor presencia de Ag por unidad de área y algunos puntos más sobresalientes en el caso de la Figura b) que sugiere la formación de agregados. Este tipo de tratamiento dispuso áreas superficiales planas a comparación del NaOH. Se verifica que las Nps observadas son en esencia de Ag gracias a el análisis EDS adquirido en la Figura 25 c) donde la sonda detectó presencia Ag en 3 a 3,4 keV y un valor máximo de Titanio c.p que indico su modificación como también se destaca en el Anexo 1.

Tratamiento L-b Ti-NpsAg macizo

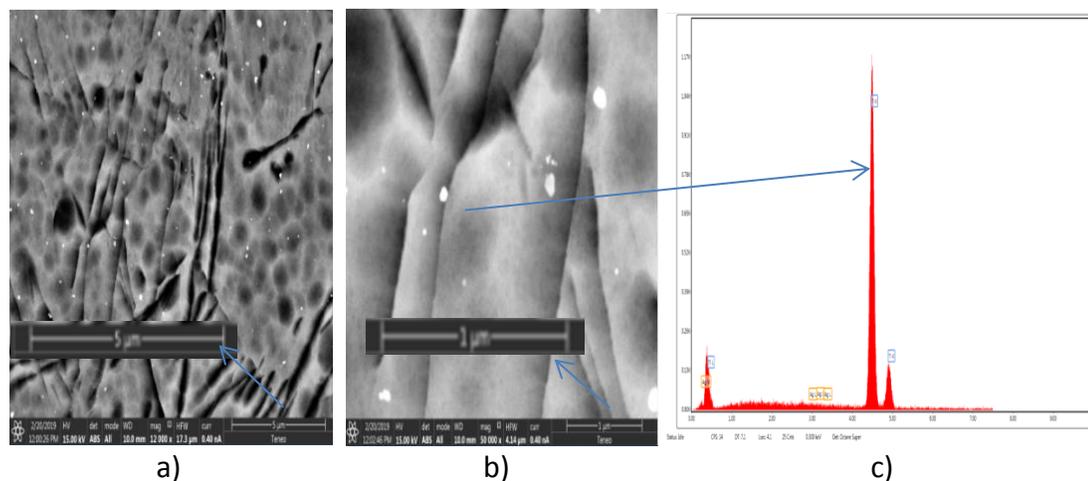


Figura 25. Micrografías Tratamiento L-b :a) y b) micrografías de superficie de titanio grabada con "solución de piraña" durante 1,5 horas a 75 °C, 3:7 peróxido de hidrógeno al 30 %; ácido sulfúrico. b) Obtención de NpsAg c) EDS-presencia de grupos Ag y Si.

Como se puede observar en este estudio una vez fue sometido el Ti macizo al proceso de salinización, se corroboró la presencia de grupos Si en el EDS de la Figura 25-d. Dichos resultados son congruentes con Pareja *et al.* (134) reportando la silanización del material una vez se generó la unión del 3-aminopropil trietoxisilano (APTES), donde este formó una reacción con SiO₂ en la superficie del Ti. Y en el caso de los grupos etóxido que una vez se unieron al silicio protonaron los oxígenos de este grupo, los OH del titanio reaccionaron con el silicio del APTES, formando finalmente un enlace covalente entre el titanio y el APTES. Lo que posiblemente permitió que las nanopartículas fueran inmovilizadas. Finalmente, al obtener resultados favorables en los sustratos de Ti macizos analizados se procedió a realizar el montaje experimental en superficies de titanio poroso. Cabe resaltar que los resultados reportados por Pareja *et al.* (134) Son congruentes con lo observado en este estudio ya que como se ha analizado lo largo del trabajo, el titanio es funcionalizado con NpsAg, confirmado por SEM de manera homogénea gracias a la etapa de funcionalización mediante metodología “*in situ*” que correspondió a la fabricación de suspensiones coloidales previo a una etapa de hidroxilación que generó cambios microestructurales del Ti con el fin de observar los efectos bactericidas como se establece más adelante

5.2.2 Caracterización de superficie de titanio poroso modificada con NpsAg

En la figura 26 se observan imágenes de microestructuras de superficies de Ti pulido mecánicamente. Se obtuvo superficies devastadas para los dos tamaños de poros entre 100-200 μm y 355-500 μm analizados con sus respectivas densidades de poro de 30 %, 40 % y 60 % analizados por triplicado. Las superficies pulidas facilitaron la observación efectiva de presencia de NpAg, morfologías de poros asimétricos así como confirmar la diversidad en las densidades de poro del material. La Figura 26 e) y f) muestran superficies de Ti con la máxima densidad de poro concentrado del 60 % observado en un microscopio con aumentos de 10 x y 20 x. Caso contrario con una menor aproximación entre los huecos, más distantes son aquellos analizados en la Figura 26 a) y b) con el 30 % de densidad de poro. Por lo tanto se observa que la densidad de poro de las muestras de Ti en la figura disminuye de derecha a izquierda.

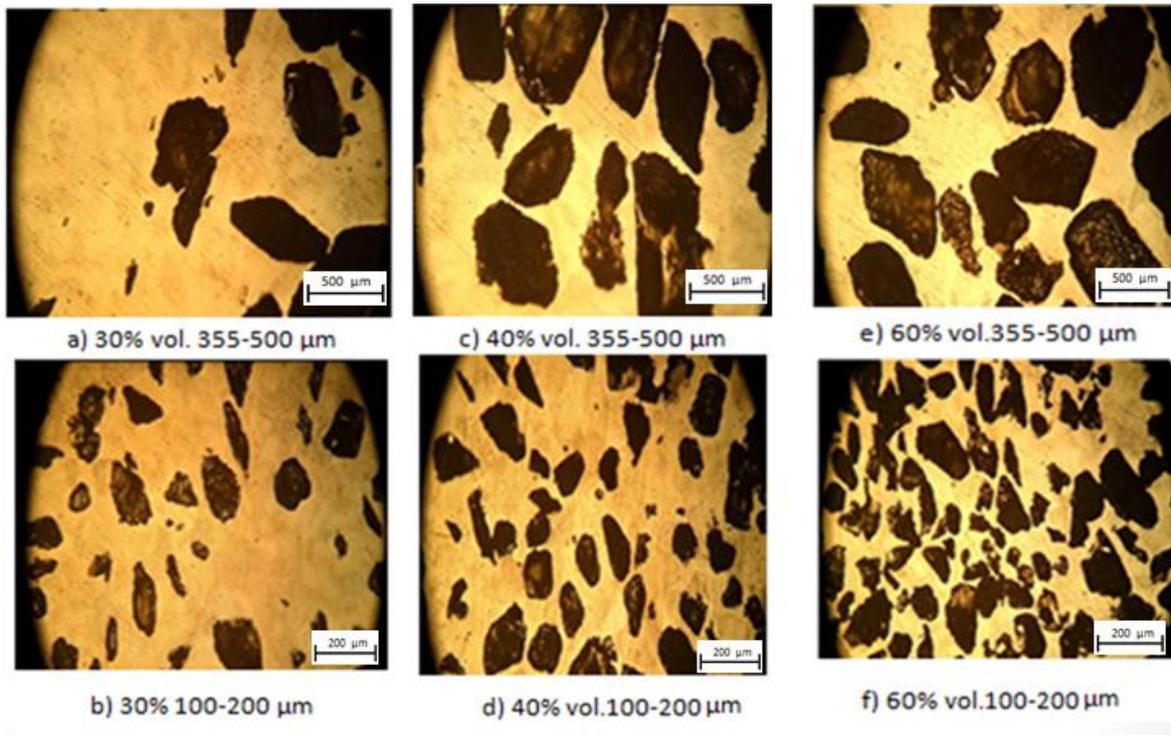
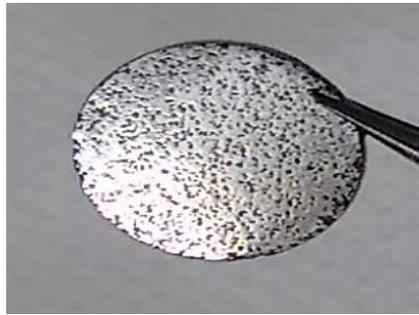


Figura 25. Micrografías ópticas con aumento de 50 x con tamaño de poro 100-200 μm y 355-500 μm , para distintas densidades de poro 30 %, 40 %, 60 %. a) 30 % vol. 355-500 μm , b) 30 % 100-200 μm , c) 40 % vol. 355-500 μm , d) 40 % vol. 100-200 μm y e) 60 % vol. 355-500 μm , f) 60 % vol. 100-200 μm .

Se precisa que el estudio de la variación de tamaño y el diámetro de los poros han ayudado en la búsqueda de obtener un módulo de Young más cercano al hueso, así como el desarrollo de superficies de materiales con variación de poros ya sean de tipo regular a escalonado, se direccionan a formación de arquitecturas que permitan la interacción del material con el tejido óseo y potencie a mediano o largo plazo la inducción del crecimiento celular. Así como la combinación de propiedades mecánicas y estructurales que promuevan una fijación implante-tejido óseo.

La Figura 26 ilustra el Ti pulido con diferentes densidades poro modificado superficialmente. En el caso de la Figura a) se observa un material de aspecto pulido, uniforme, inicialmente conserva un color plata que indica una superficie porosa desprovista de NpsAg. Caso contrario se observa en b) donde el color oro es notable y corresponde a la modificación superficial de NpsAg. Los valores asignados como 1, 2 y 3 pertenecen a las densidades de poro desde la máxima con 60 %, 40 % hasta la mínima de 30 % en superficie de titanio.



a)



b)



c)



d)



e)



f)

Figura 26. Titanio poroso pulido sin NpsAg a) Ti-NpsAg b) Densidades de poros de 1:60 %, 2:40 %, 3:30 %.

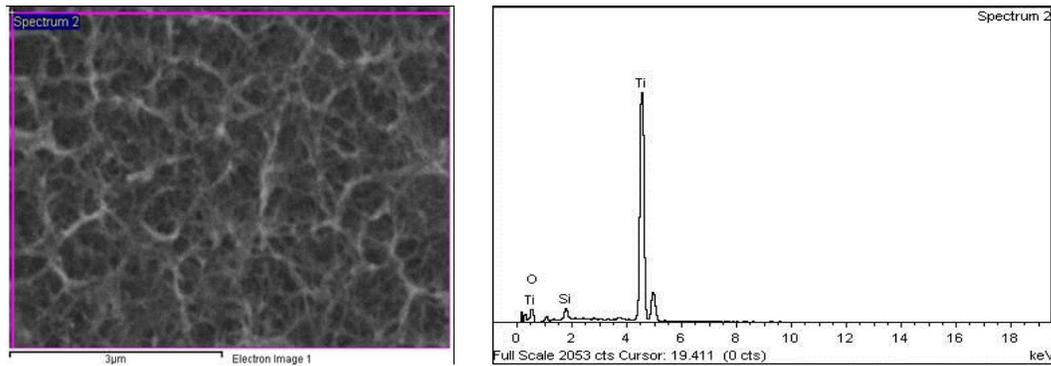
El cambio de color de plata a dorado es notable y se observa en la Figura 27 b) donde se obtuvo después de haber sido grabado con la solución de “piraña” y “NaOH” y finalmente adquirido al entrar en contacto con la suspensión de NpsAg indicadas en la Figura 19. Para el estudio de la microestructura analizada con el Microscopio Electrónico de Barrido JEOL-JSM 6490LV. Se evidenció con éxito la modificación superficial de Ti poroso pulido, hidroxilado y silanizado con presencia de NpsAg en la cara superior e inferior de la placa circular observada en todas las densidades de poroso investigadas por triplicado. Donde la figura 27 a), c) y e) es claro observar superficies plateadas desprovistas de NpsAg, caso contrario de superficies de Ti poroso en figura 27 b), d) y f) funcionalizados con NpsAg corroborado en análisis TEM, donde en este caso fue evidente el cambio de color al ser sumergido en la suspensión coloidal de Ag tomando un color dorado.

Gracias a los resultados obtenidos en ensayos piloto se eligió continuar con la fabricación e inmovilización de NpsAg utilizando la metodología “*in situ*” con un tiempo de síntesis alrededor de 30 min. Debido a que se encontró una buena dispersión del nanomaterial sobre la superficie, sugiriendo una menor tendencia a formación de agregados y tamaños de NpsAg pequeños 30 nm. Simultáneamente, aunque en la metodología establecida en esta etapa con material poroso si se identificó formación algunas zonas con agregados de Ag, siendo menos usual, lo cual se asumió como un efecto positivo. Ya que en dicha condición se conservó una inmovilización superficial de Ag en escala nano donde estos agregados pueden ser vistos como pequeños depósitos promisorios que liberan iones de Ag^+ y pueden causar muerte bacteriana por periodos de tiempo prolongados.

En el caso de las micrografías SEM indagadas en la Figura 28 a) se observa superficies de Ti poroso control (silanizado e hidroxilado) con cambios superficiales notables, formación de nanoporos equivalentes al observado en los ensayos piloto usando el tratamiento L-a (NaOH). Además, se observa irregularidad superficial, morfologías anisotrópicas, aumento de la rugosidad y formación de texturas convexas que acompañaron las superficies modificadas similares a las desarrolladas en pruebas piloto.

Por otro lado, la Figura 28 b) coincide con una superficie de Ti con Si en 2 KeV desprovista de NpsAg, la cual se validó con el análisis EDS, sin observar espectros asociados a Ag, solo espectros de absorción óptica en 2 keV, específico de (Si). Caso inverso se observa en la Figura 28 c) con una superficie de Ti con puntos luminosos cuasiesféricos, analizados por EDS donde se confirma la presencia de Ag específica en 3 KeV evidente en la Figura 28 d) al observar una superficie de titanio poroso con Ag en menor cuantía y de distribución escasa validada finalmente en la Figura c).

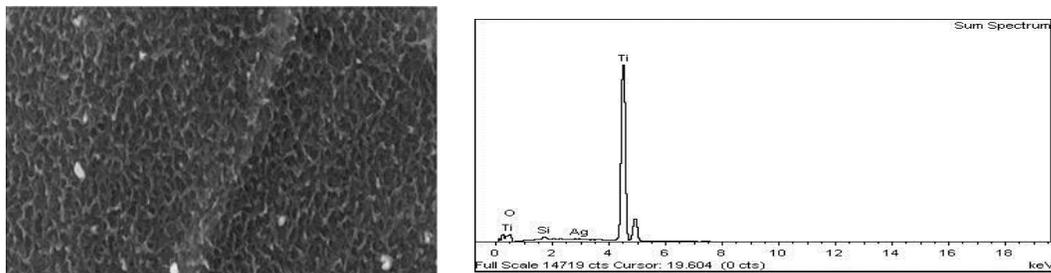
Tratamiento L-a, Ti poroso Control



a)

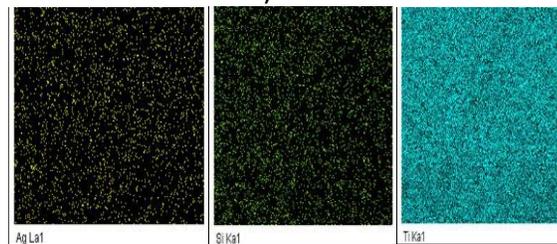
b)

Tratamiento L-a Ti poroso con NPs de Ag



c)

d)



e)

Figura 27. Micrografías TEM micrografías de superficie de titanio poroso. a) superficie de titanio silanizado atacado por tratamiento L-a, 5 M de NaOH a 60 °C por 24 h. b) Espectro EDS, presencia de grupos Ti y Si. c) Ti silanizado con NpsAg, d) espectro EDS que establece la presencia de NpsAg y silanos. e) Mapeo de compuestos cuadro amarillo Ag, verde Si y verde azul Ti.

El grabado superficial obtenido en la Figura 28 corresponde entonces a morfologías equivalentes a las adquiridas por *Ferraris et al.* (171) con la formación superficial de microestructuras irregulares y anisotrópicas. Así como superficies nanoestructuradas presencia de una capa de óxido, que pueden mejorar la bioactividad del material, así como procesos de osteointegración, observados a raíz de grabados con ácidos señalados en generar rugosidades menores a 1 μm, adicional a la contundente presencia de plata depositada en la superficie de titanio. Sin embargo, su capacidad de modificación se ve restringida al considerar que dicho material conserva áreas de estudio “limitada”, lo que

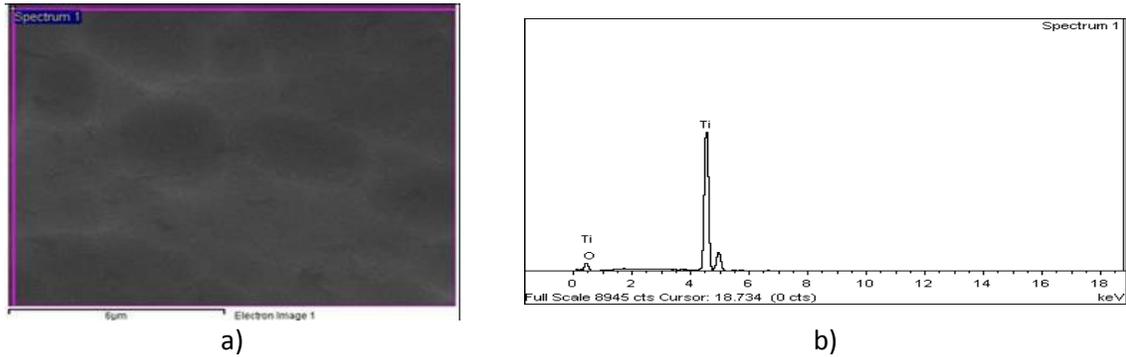
hace valioso el trabajo de modificar materiales porosos donde se obtienen mayores áreas texturizadas por debajo de 1 μm corroborado en SEM de la figura 30d.

Para confirmar la deposición de NpsAg en la superficie de sustratos de titanio grabados con la metodología L-b (piraña). Se lograron identificar en micrografías de Ti control desprovisto de NpsAg de la Figura 29 a) donde la superficie tienen una apariencia suavizada, ausencia de puntos luminosos que indican Ti sin NpsAg. Además, es evidente entonces, la diferencia frente a aquellas superficies inmovilizadas con Ag como ocurre en la Figura 29 c) al observar pequeños puntos luminosos, donde al corroborar con la espectroscopia de rayos X de dispersión de energía (EDS) exhibida en la figura 29 d) que ratifico la presencia de Ag en la superficie de titanio poroso. Y finalmente examinadas con ayuda de, el mapeo de composición química presentadas la Figura 29 e) donde se reveló que el titanio es el elemento dominante en la superficie (color verde), seguido de presencia de Ag (color amarillo) en menor cuantía.

A nivel general la inmovilización de NpsAg se observó con éxito en todos los sustratos de titanio poroso, a su vez de la deposición de las nanopartículas. En todas las superficies de Ti estudiadas se apreció cambios drásticos micro y nano estructurales ya sea con el ataque superficial con ácidos producto de eliminación de la capa de óxido nativo propio de Ti poroso, donde se sugiere se logró una oxidación controlada, producto de la formación de la hidroxilación superficial de titanio de así como la formación del óxido de titanio texturizado que facilito la inmovilización de NpsAg.

Los resultados de las observaciones de SEM en las muestras de Ti poroso con presencia de nano precipitados se han recopilado y comparado en la figura 30. Se realizó un cribado para elegir la superficie con las mejores características microestructurales finales observadas, resultantes de la modificación y deposición de NpsAg. Las superficies que pasaron este análisis fueron caracterizadas por XPS y finalizar con las pruebas de comportamiento antibacteriano del titanio poroso, como se discute en la siguiente sección.

Tratamiento L-b Ti poroso silanizado control



Tratamiento L-b Ti poroso silanizado + NpsAg

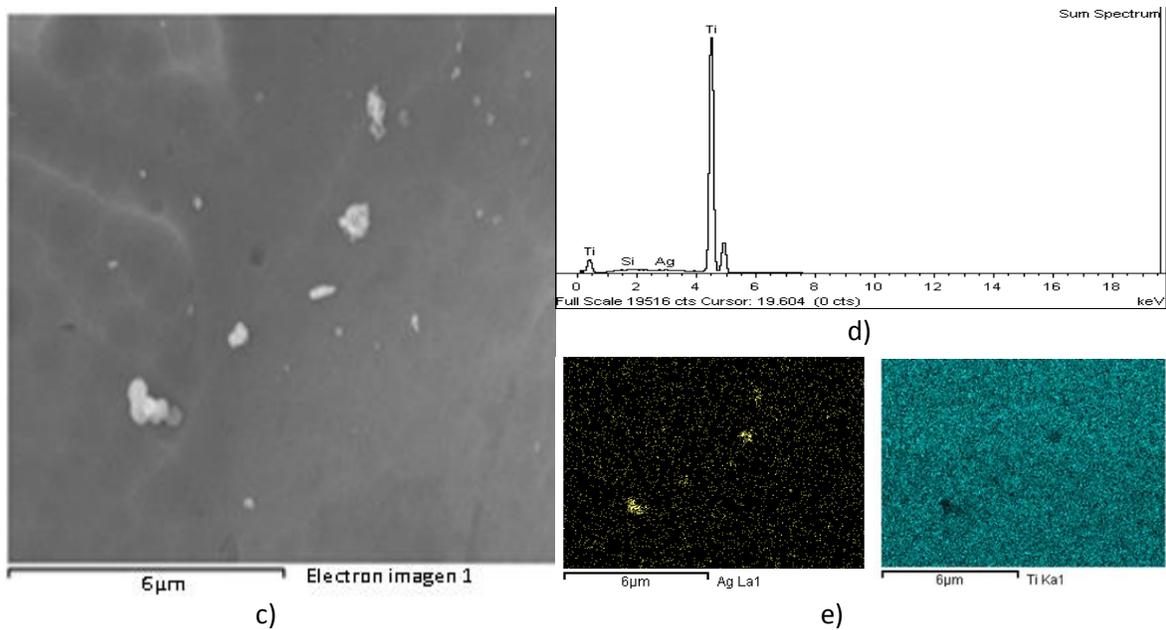
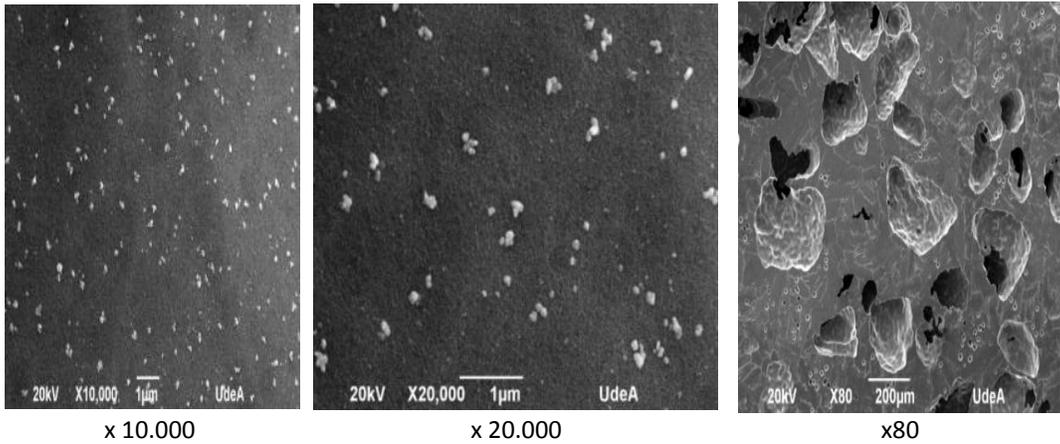


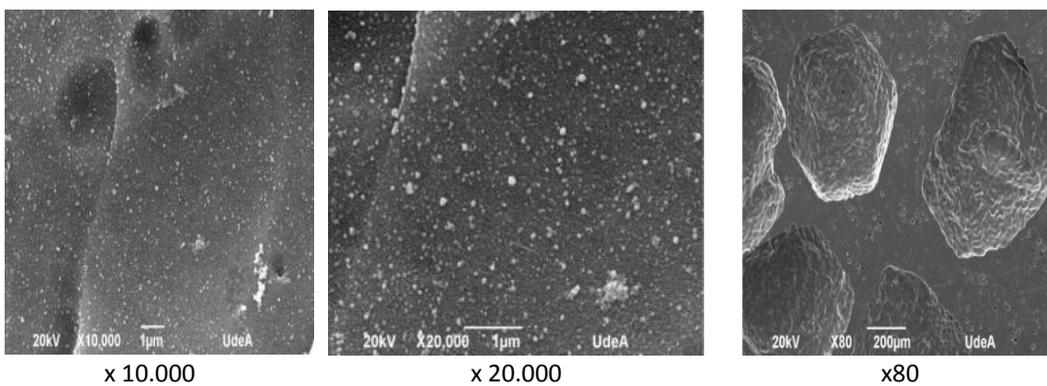
Figura 28. Micrografías SEM micrografías de superficie de titanio poroso. a) Ti grabado con "solución de piraña" tratamiento B, durante 1,5 horas a 75 °C, solución de piraña: 3:7 peróxido de hidrógeno al 30 %; ácido sulfúrico. b) Espectro EDS, presencia de grupos silanos en superficie de Ti poroso. c) Ti-NpsAg , d) espectro EDS que establece la presencia de Ag y silanos atacada por "Piraña". e) Mapeo comopsicional representado por el cuadros color amarillo indican presencia de Ag en superficie, verde silanos y verde azul titanio.

La figura 30, muestra una visión general de las topografías adquiridas en superficies de Ti poroso c.p, gravadas con L-a y L-b y silanizadas como se observada en la Figura 30 a), b) y c). Se precisa que no se anexaron las micrografías en SEM de las superficies control (desprovistas de NpsAg). Por el contrario, se reportaron las imágenes obtenidas a partir de un aumento 80×, (primera columna, de izquierda a derecha) para investigar la eventual presencia de nano y micro precipitados de plata. Hasta aquellas imágenes de mayor aumento, 10000×, 20000×, para verificar el desarrollo de la capa superficial de óxido nano texturizada y la deposición de NpsAg incrustadas a nivel superficial. La figura 30 informa que cada muestra analizadas con tres aumentos fueron comparadas con al menos 3 imágenes de áreas diferentes para cada muestra.

a) 30 % vol. 100 – 200 μm a-1



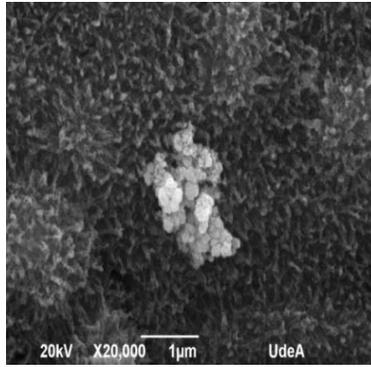
b) 30% vol. 355- 500 μm a-2



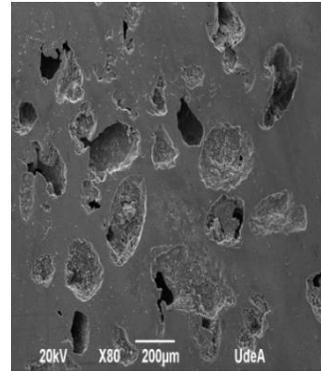
c) 40 % vol. 100 -200 μm b-1



x 10.000

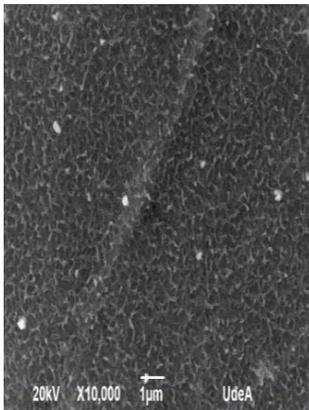


x 20.000

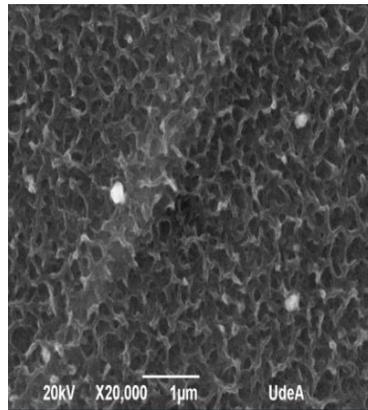


x80

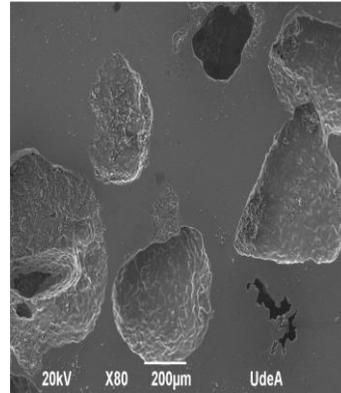
d) 40% vol. 355-500 μm b-2



x 10.000

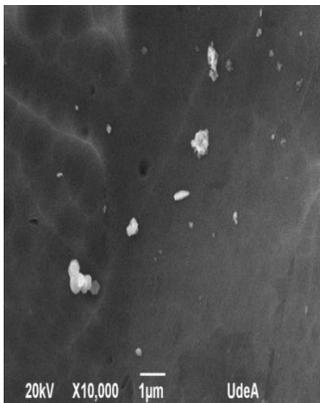


x 20.000

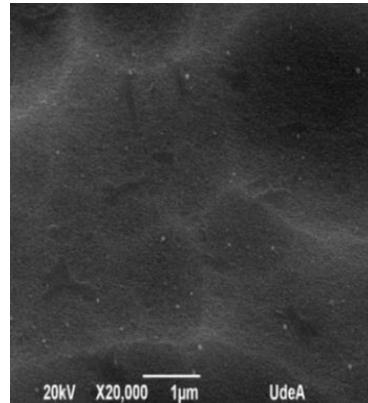


x80

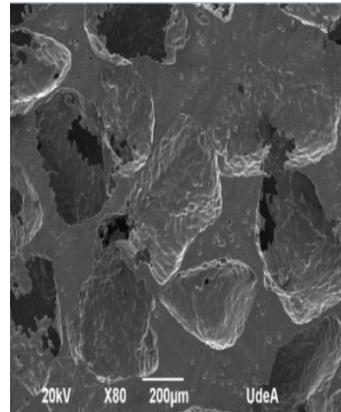
e) 60 % vol. 100 – 500 μm c-1



x 10.000



x 20.000



x80

f) 60 % vol. 355– 500 μm c-2

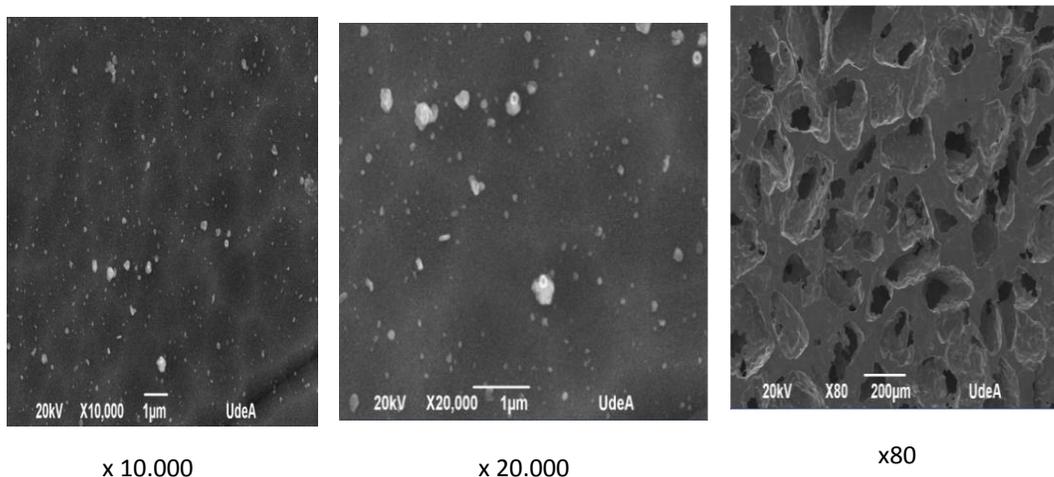


Figura 29. Micrografías SEM densidades de poro 30 %, 40 %, 60 %. Micrografías SEM micrografías de superficie de titanio inmovilizadas con NpsAg, grabada con "solución de piraña" durante 1,5 horas a 75 °C, solución de piraña: 3:7 y peróxido de hidrógeno 30 % con ácido sulfúrico

La observación de las imágenes de bajo aumento en la Figura 30 (80x) se utilizó para enunciar los poros de 30 %, 40 % 60 %, como lo indica la primera columna (de derecha a izquierda) en particular, no fue posible la observación de al menos un aglomerado de plata a escala micro, solo en el caso de muestras de titanio con imágenes de 10000x, 20000x aumentos, ambos para la metodología observada en Figura c) con NaOH donde se observó que finalmente si cumplían el criterio de aceptación del Ti inmovilizado con Ag agregada.

Se usaron imágenes de mayor aumento que corresponden a las filas de la Figura 30a), b) y c) para investigar tanto la presencia de NpsAg como la nanotextura del gravado con L-a y L-b. La observación dio como resultado identificación de agregados de NpsAg en menor cuantía en los tres tipos de densidades. Análogamente, la observación de nanotexturas en superficies son comparables con aquellas adquiridas por Souza *et al.* (2); Domínguez *et al.* (63); Torres *et al.* (133) y Goharian *et al.* (170). Con nanotexturas apropiadas, que correspondió a formas y dimensiones de nanoporos con una cobertura superficial con tendencia homogénea.

Se observaron microprecipitados (5-20 µm) no apreciables para todas las superficies tratadas de titanio poroso, superficies de Ti tratadas y examinadas como la Figura 29 y 30: estos resultados no están lejos de los obtenidos Jia *et al.* (11). Los análisis de EDS (informado ANEXOS) confirmaron que estos microprecipitados están constituidos primordialmente por Ag. Las observaciones de múltiples áreas en las superficies de la muestra sugieren una reducción moderada del número de estos precipitados de Ag⁺; en especial en lo observado Figura 30 a) y b) de 30 %, y en contraste con Figura e) y f) que corresponden a la densidad de poro más alta del 60 %, se observó mayor formación de microprecipitados pero menor cobertura de Ag en la superficie. Finalmente, ninguno de

los tipos de microestructuras generadas por el grabado con ácidos L-a y L-b según lo observado se considera capaz de evitar la precipitación de microagregados de plata en Ti poroso cp.

En aquellas superficies de Ti poroso con densidad del 40 %, se observa que los microprecipitados son visibles en las muestras para el tamaño de poro analizado (100-200 μm) como se observa en la Figura 30 c). Con respecto a la capa de óxido esta se desarrolló con éxito en todas las superficies, el tipo de grabado y nano-estructura no afecta la adhesión de NpsAg. Los análisis EDS para cada micrografía observada en la Figura 30) no se realizó. Se encontraron algunas dificultades debido a la pequeña dimensión y capacidad de análisis a nivel superficial de la técnica SEM, sin embargo, es suficiente para observar la funcionalización superficial del Ti poroso con NpsAg. Donde la mayor cantidad de muestras porosas presento una distribución de NpsAg homogénea observado en la Figura 30 a), b), c), e) y f). Con algunas grietas en la superficie de las muestras Ti figura 30 fenómenos que pudo deberse a una corrosión superficial inicial inducida por el PH siendo más evidente en las pruebas piloto.

Como se indicó con anterioridad la arquitectura porosa observada en la Figura 30) es apropiada para crecimiento interno del hueso a lo largo de las longitudes del mismo. con posible capacidad de crecimiento de osteoblastos hacia el interior de los poros, gracias a que la texturización observada puede proporcionar espacios para el transporte de sustancias, nutrientes y mantener la biofuncionalidad superficial (21) , lo que requiere de más investigación. Se presumen que el titanio poroso modificado observado con NpsAg, en la Figura 30, con micro y nano estructuras desarrolladas en diferentes direcciones es un material promisorio a la conducción de diferentes comportamientos mecanismos y biológicos como adhesión celular y muerte bacteriana.

Una observación morfométrica importante entre la superficie de subtratos macizos y porosos son las modificaciones microestructurales reportadas. Donde no hubo evidencia morfológica, en como la condición de porosidad del titanio puede favorecer o mejorar la inmovilización de Ag en algunos sitios de preferencia. En contraste, se sugiere que la inmovilización de NpsAg en el material poroso favorece un mejor contacto con el hueso así como la interacción con la interfaz material-tejido. Varios investigadores han estudiado cómo la distribución de los poros influye en las propiedades mecánicas del Ti. Como es el caso de reportes donde se precisan los factores que influyen en el comportamiento mecánico del material poroso mediante simulación en titanio con poros distribuidos al azar, o por ejemplo aquellos reportados con una reducción del módulo de Young en 7 GPa y resistencia en 30 MPa garantizando tamaño de poro controlados similares a la matriz extracelular ósea así como la integración compacta del nuevo hueso laminar a través del área de implante-hueso (7),(170),(172).

Adicionalmente se resalta desde la literatura reportada que la pertinencia de obtener microestructuras de Ti similares a las desarrolladas en este estudio, en especial una matriz de titanio poroso inmovilizado con Ag sugiere que en este material existe la tendencia a presentar una capacidad osteoconductora, ya que la formación de nanotexturas observadas en las micrografías apuntan a la construcción de capas porosas texturizadas inferiores a $1\mu\text{m}$, que en futuros experimentos aumentarían tanto la adhesión de células osteogénicas a la superficie del implante desde su diferenciación y proliferación. Como también el flujo de sangre, como lo precisa Moritz *et al* (18) donde establecieron como el flujo de la sangre aumenta significativamente en estructuras porosas y junto a él, procesos de mineralización de las células osteogénicas al tiempo que una mayor existencia de proteínas, factores de crecimiento, genes, osteoblastos dentro de microestructuras porosas garantizando procesamientos rápido y efectivo en la remodelación ósea en la interfaz del implante óseo.

Por lo tanto contar con superficies porosas de titanio interconectada como las establecidas en el presente estudio, tienen un efecto adicional al proporcionar mayor interconexión y relación estructural más cercana al hueso biológico al promover de manera significativa la creación de estructuras de titanio para sustitución ósea dinámica (170).

Es importante mencionar que este estudio el factor diferenciador es el desarrollo de las superficies funcionalizados de NpsAg así como matrices de Ti texturizados tanto en substratos porosos y macizos con capacidad bactericida. Donde a diferencia de los estudios reportados en el mundo no se encontraron estudios similares que relacionen el factor de fabricación de suspensiones de NpsAg y como esta mejora su inmovilización en substratos de titanio poroso en superficies micros texturizados y aquellas por debajo de $1\mu\text{m}$. Ya que a diferencia los estudios reportados en la literatura están enmarcados al desarrollo de estrategias que favorecen la inmovilización de Nps o el desarrollo de estructuras de mayor fijación del material al hueso de manera independiente.

Por lo tanto, el desarrollo de este tipo de estudios tendrá un marcado interés que data en una mayor efectividad durante los procesos de fijación del titanio al hueso el cual se conoce como procesos de fusión desde una capa intermedia entre el implante y la estructura porosa, siendo la difusión de la capa porosa en la superficie del implante uno de los procesos que aún no ha sido contralado en su totalidad actualmente. Así como el control de la exposición a altas temperaturas, que también pueden causar la alteración de poros particularmente en el tamaño. Con relación a los datos obtenidos en el presente estudio se recomienda establecer el estudio condiciones de hidroxilación y formación de texturas que puedan garantizar la formación de mayor osteointegración y funcionalidad del material, además del mejoramiento de actividad antibacteriana como se observó en el presente estudio y fue de interés en este trabajo.

Por último, se indica sobre la pertinencia de desarrollar capas intermedias finas entre el implante y tejido en pro de reemplazar o integrar las metodologías tradicionales, como es el uso de cemento óseo utilizado comúnmente en reemplazos a presión a través del hueso. Sin embargo, este tipo de sistemas aún no son exitosos y requieren de estudios previos ya que su principal limitación es la obstrucción de los poros interconectados de dicha capa afectando directamente la diferenciación celular osteogénica y el crecimiento óseo.

Las superficies obtenidas en el presente estudio señalan entonces la obtención de superficies nano texturizadas e inmovilización de NpsAg, afines a desarrollar efectos de biocompatibilidad, diferenciación celular y oseointegración de hueso (173), (174), (175), (176). Activación de plaquetas sanguíneas, migración de células osteogénicas a la interfaz hueso-implante (177), (178), (179), (180), (181). Sin embargo se requiere establecer mayor control sobre el desarrollo de dichas nanoestructuras en el Ti poroso ya que pueden afectar funciones celulares como se ha establecido (2), (170), (173) afirmado que en materiales con topografías micro y nanoescala se pueden alcanzar hasta tamaños similares a las proteínas de la matriz extracelular ECM (v.gr fibronectina y colágeno), así como favorecer la interconectividad el cual puede presentar mejorar su biocompatibilidad gracias al efecto hidrofílico de las nanotexturas desarrolladas en el presente estudio.

5.3 Actividad antibacteriana de NpsAg inmovilizadas sobre titanio

Finalmente, se realizó una prueba preliminar de actividad antibacteriana en superficies de titanio poroso, a través de la medición de un halo de inhibición en agaros cultivados con la bacteria gram positiva, *Staphylococcus aureus*. Los resultados revelaron que, en general, los substratos de titanio funcionalizado con NpsAg tienen actividad antibacteriana, puesto que se observó una zona de inhibición del crecimiento de la bacteria alrededor de las muestras de Ti funcionalizados con NpsAg, tanto macizo como poroso (figura 31). Solo se muestra el material fotográfico de las muestras de titanio que presentaron halos de inhibición bien definidos, los demás substratos Ti-NpsAg porosos no fueron reportados debido a que presentaron zonas de inhibición de crecimiento bacteriano similares a las observadas (Figura 32).

La formación de la zona de inhibición para las superficies de Ti poroso evaluadas es el hallazgo que se puede resaltar en relación a su actividad antibacteriana, lo que puede ser atribuible a la presencia de las NpsAg y/o iones de plata liberados desde las mismas. Un comportamiento similar fue observado por Li *et al.* (60) en discos de titanio sensibilizados con micro esferas de gelatinas cargadas con Ag. Ahamed *et al.* (182), asocia la actividad bactericida de las NpsAg a la inestabilidad generada en la membrana celular. Lo anterior sugiere que no solo es importante la inmovilización del nanomaterial bactericida, sino también el control sobre la deposición del bactericida. Liao *et al.* (183) desarrolló matrices de Ti, silanizadas y sensibilizadas con NpsAg, con capacidad bactericida (i.e. 94 % de inhibición para *Staphylococcus aureus* y 95 % de *Escherichia coli*), perfilando dicho

desarrollo como un material prometedor con capacidad antibacteriana y potencialmente implantable.

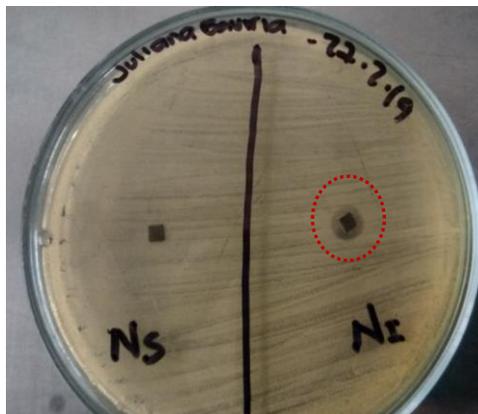
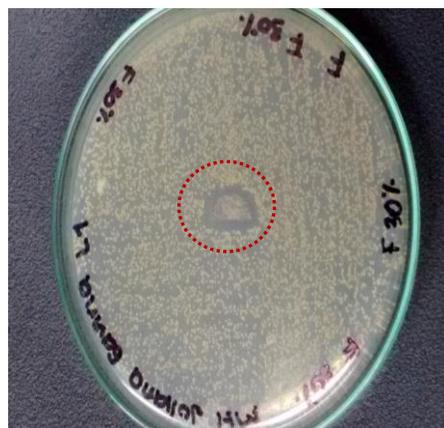


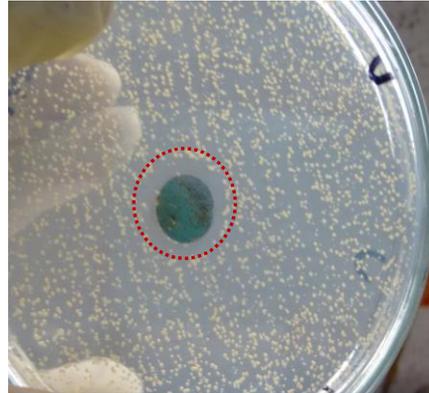
Figura 30. Las muestras de Ti c.p macizo modificadas superficialmente con NpsAg: Efecto antibacteriano dentro del círculo rojo. Zona de inhibición para el Gram-positivo *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).



a)



b)



c)

d)

Figura 31. Efecto antibacteriano frente a la bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) en substratos de Ti-NpsAg poroso, a) Ti-Si control negativo. b) Ti-NpsAg poroso. c) disco Ti-Si. d) Titanio con NpsAg.

Si bien existen mecanismos para inhibir la formación de placa bacteriana en la superficie del titanio que impiden la adhesión inicial de las bacterias, y su colonización. En este estudio, adoptamos por identificar la formación de la zona de inhibición ausente de crecimiento bacteriano es decir su actividad antibacteriana en superficies porosas de Ti-nAg.

5.1 Análisis descriptivo de los datos

5.1.1 Determinación de número de muestra (substratos de T-NpsAg)

Se realizó un muestreo usando 3 substratos de Ti con NpsAg, para cada % de densidad, con dos tamaños de poro en el primer caso (a) 100-200 μm y (b) 355 a 500 μm . El resultado observado con relación a la desviación estándar como lo indica la tabla 8, fue (a) 0,8369 y b). 0,1881 para 30 %), (a. 0,282 – b. 0,9104) 40 %, y (a. 0,856 – 0,379) 60 %. No se encontró una diferencia significativa entre los tamaños de poro indicado en la Tabla 8 con una Sig. Máxima 0.008, todo para un número de tres observaciones en 18 muestras de titanio estudiadas.

Tabla 8. Resumen de comparación de medias para % de densidad vs Ti.

	Comparación de Medias					
	30%		40%		60%	
	100-200 μm	355-500 μm	100-200 μm	355-500 μm	100-200 μm	355-500 μm
D. Media	6,75867	6,258	5,89267	6,156333	5,577	5,686
Desviación E.	0,836972	0,188183	0,282567	0,910474	0,856458	0,379609
T-student. Sig	0,005	0,006	0,000	0,007	0,008	0,001

Como se observa en la Tabla 9 el cincuenta por ciento de las muestras de Ti con densidad del 30 % está por encima del 6,915 mm, lo que significa que la mitad de los halos de inhibición corresponden a formación de halos de inhibición significativos, en comparación con el obtenido para densidad del 60 % con halo de inhibición de 5.87 mm. Lo anterior va de acuerdo con que en promedio, la formación de halo de inhibición de discos de titanio con densidad del 30 % se ubican en 6.649, desviados en promedio de ese dato 0,78 unidades de la escala según la desviación estándar. Para finalizar, se resalta dos observaciones: ningún disco de titanio poroso presentó formación de halo de inhibición igual a 5 mm y la formación promedio de halos de inhibición formados para densidades de 40 % fueron 6,675 mm y 60 % 5.77 mm.

Tabla 9. Resumen de Análisis Descriptivo para % densidad de Ti.

Descriptivos – Densidad %											
Densidad %		Estad	Desv. E	Densidad %		Estad	Desv. E	Densidad %			
Media		6,649	0,320	Media		6,675	0,177	Media		5,770	0,284
95 % de intervalo de confianza para la media	L.i	5,827		95 % de intervalo de confianza para la media	L. i	6,219		95 % de intervalo de confianza para la media	L. i	5,040	
	L.s	7,471			L.s	7,131			L.s	6,500	
Mediana		6,915		Mediana		6,630		Mediana		5,872	
Varianza		0,614		Varianza		0,189		Varianza		0,484	
Desv. Desviación		0,783		Desv. Desviación		0,434		Desv. Desviación		0,695	
Rango intercuartil		1,508		Rango intercuartil		0,876		Rango intercuartil		1,318	

Tabla 10. Resumen de muestras de Ti para para densidades 30 %, 40 %, 60 %.

Densidad - %							
Densidad		Válido		Casos Perdidos		Total	
		N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Inhibición promedio	30 %	6	100,0 %	0	0,0 %	6	100,0 %
	40 %	6	100,0 %	0	0,0 %	6	100,0 %
	60 %	6	100,0 %	0	0,0 %	6	100,0 %

Como se observa a continuación la aplicación de la prueba paramétrica con respecto al % densidad, efectivamente presentó requisitos: independencia, normalidad (ajuste a una distribución normal); y homogeneidad de varianzas (homocedasticidad) mencionado en la Tabla 11. El test Shapiro-Wilk indica, según la hipótesis nula, H_0 , consideró la distribución de la variable % densidad seleccionada que proviene de una distribución normal, por ende, no rechazamos H_0 , ya que el p-valor (sig) es 0.345, 0.234, 0.717 > 0.05 para % 30, % 40, % 60 respectivamente. Por tanto, según este test, se considera que la distribución de los datos es normal para el factor densidad.

Tabla 11. Resumen de prueba de Normalidad para Ti con densidades 30 %, 40 %, 60 %.

Densidad- Pruebas de normalidad							
Densidad %		Kolmogorov-Smirnova			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Inhibición: promedio	30	0,240	6	,200*	0,895	6	0,345
	40	0,229	6	,200*	0,872	6	0,234
	60	0,212	6	,200*	0,947	6	0,717

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.
a. Corrección de significación de Lilliefors

Tabla 12. Resumen de prueba de Homocedasticidad para Densidad

Prueba de homogeneidad de varianzas - homocedasticidad entre los grupos por Densidad						
Inhibición: Promedio		Estad.				
		Levene	gl1	gl2		Sig.
Homocedasticidad entre los grupos por Densidad.	Se basa en la media	1,112	2	15		0,355
	Se basa en la mediana	0,432	2	15		0,657
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	0,432	2	10,475		0,660
	Se basa en la media recortada	1,052	2	15		0,374

Con respecto a formación de halo de inhibición vs tamaño de poro, se observa Tabla 13, que el cincuenta por ciento de la muestras de Ti con Tamaño de poro de 100-200 μm está por encima de 6,410 mm, lo que significa que la mitad de los halos de inhibición corresponden a formación de zona de inhibición, muy similares en comparación con el obtenido para Ti poroso de 355-500 μm con halo de inhibición de 6,310 mm. Ya que en promedio se observó una formación 6,438 en discos de titanio con 100-200 μm , desviados en promedio 0,781 unidades de la escala según la desviación estándar. Para finalizar se resalta que al igual que % de densidad ningún disco de titanio en ambos tamaños presentó formación de halo de inhibición igual a 5 mm, y en cuanto a la formación promedio de halos de inhibición tanto para poros 100-200 μm y 355-500 μm no presentaron diferencia significativa.

Tabla 13. Resumen de Análisis Descriptivo para % densidad de Ti.

Descriptivos – Tamaño poro								
T. poro		Estad	Desv. E	T. poro		Estad	Desv. Error	
100-200 μm	Media	6,438	0,260	355-500 μm	Media	6,291	0,253	
	95% de inter confianza para la media	L. i	5,838		L. i	95% de intervalo confianza para la media	5,706	
		L. s	7,038			L. i	6,876	
	Mediana	6,410			Mediana	6,310		
	Varianza	0,610			Varianza	0,580		
	Desv. Desviación	0,781			Desv. Desviación	0,761		
	Rango intercuartil	1,308			Rango intercuartil	1,247		

Tabla 14. Resumen de Tamaños de poros evaluados en Ti-NpsAg.

Tamaño - % Inhibición promedio							
Tamaño μm		Casos					
		Válido		Perdidos		Total	
		N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Inhibición:	100-200	9	100,0%	0	0,0%	9	100,0%
Promedio	355-500	9	100,0%	0	0,0%	9	100,0%

A continuación se reporta el test paramétrico para el factor Tamaño de poro (μm), el cual cumplió el criterio de normalidad como se indicó en la tabla 15, y homogeneidad de varianzas (homocedasticidad) observado en tabla 16. Por lo tanto, se consideró que la distribución con respecto al factor tamaño, para ambos tamaños de poro evaluados proviene de una distribución normal, por lo anterior la hipótesis nula no se rechazó, para un p-valor de 0.844 y un p-valor 0.522 >0.05 que corresponden a tamaño de poro de 100-200 μm , 355-500 μm respectivamente.

Tabla 15. Resumen de prueba de Normalidad para Tamaño μm .

Pruebas de normalidad							
Tamaño μm		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Inhibición: Promedio	100-200 μm	0,152	9	,200*	0,965	9	0,844
	355-500 μm	0,189	9	,200*	0,934	9	0,522

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.
a. Corrección de significación de Lilliefors

Tabla 16. Resumen de prueba de Homocedasticidad para % Densidad.

Prueba de homogeneidad de varianzas - homocedasticidad entre los grupos por Tamaño					
		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Inhibición: Promedio	Se basa en la media	0,018	1	16	0,894
	Se basa en la mediana	0,016	1	16	0,900
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	0,016	1	15,997	0,900
	Se basa en la media recortada	0,022	1	16	0,884

Con respecto a las hipótesis establecidas para los siguientes análisis se plantearon para dos factores, densidad (%) y tamaño de poro (μm), y se analizó como variable respuesta la formación de halo de inhibición.

Hipótesis H0: La formación de halo de inhibición para sustratos de titanio con NpsAg es igual para todos los sustratos titanio poroso evaluados.

Hi: Al menos un tipo de sustrato de titanio poroso presenta formación de halo de inhibición diferente.

% Densidad:

H0: μ 30 % = μ 40 % = μ 60 %

Hi: donde al menos una $\neq \mu$

Tamaño- poro:

$$H_0: \mu_{100-200 \mu m} = \mu_{355-500 \mu m}$$

$$H_1: \mu_{100-200 \mu m} \neq \mu_{355-500 \mu m}$$

En la Tabla 17. La ANOVA para formación de halo de Inhibición de Ti-NpsAg, en el factor % densidad, se observó que en substratos de Ti con diámetros de 5 mm donde se observa diferencias en la densidad de poro en el disco de Titanio. De acuerdo con el análisis de varianza efectuado al experimento, hay evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula H_0 , de esta manera existe diferencias en el % de densidad promedio entre 30 %, 40 % y 60 % debido a substratos de Ti generado por la presencia de NpsAg en superficie. Además, la Tabla 16 muestra que la suma de cuadrados de los tratamientos es menor a la suma de cuadrados de los residuales ($SSTrat < SSE$). Este resultado no indica explícitamente que los tratamientos estén mal seleccionados puesto que el valor p es menor a 0.049, sí no que pueden existir variables o interacción entre ellas, que son aspectos que explican mejor el fenómeno y no se incluyeron en este experimento. Al realizar las mediciones en substratos de Ti fueron preparadas las muestras realizando corte por hilo, pulido mecánico, bloquearon factores de variación de formación de halo: homogeneidad, modificación superficial. Adicionalmente, al realizar los ensayos en la superficie, bajo las mismas condiciones de ataque superficial y usando el mismo material para pruebas bacterianas, hacen que durante protocolo de preparación, estos parámetros de contacto, sean los que menos afecten el aumento de la suma de cuadrados de los residuales, siendo las variables intrínsecas del material como pérdida del material, grosor durante el proceso las candidatas más opcionados en el aumento de este estadístico de prueba.

Tabla 17. ANOVA - % de Densidad.

ANOVA - Densidad					
Inhibición: Promedio	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3,184	2	1,592	3,714	0,049
Dentro de grupos	6,430	15	0,429		
Total	9,614	17			

Los datos obtenidos del ANOVA con respecto al factor de tamaño de poro, en substratos de Ti con diámetro de 5 mm, como se observa, en la tabla 18. De acuerdo con el análisis de varianza, no hay evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula H_0 , de esta manera no existe diferencias en substratos de Ti por lo tanto se acepta H_0 , donde las medias de la inhibición para los dos niveles de tamaño de poro no presentan diferencia estadísticamente significativa. Además, se muestra que la suma de cuadrados de los tratamientos es menor a la suma de cuadrados de los residuales ($SSTrat < SSE$). Este resultado indica que pueden existir variables o la interacción entre ellas, que son aspectos que explican mejor el fenómeno y se analizaran en un ANOVA más adelante. Finalmente el

experimento presento limitación de número de substratos de titanio poroso, pérdida del material como se mencionó anteriormente.

Tabla 18. ANOVA – Tamaño de Poro.

ANOVA – Tamaño μm					
Inhibición: Promedio	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	0,096	1	0,096	0,162	0,693
Dentro de grupos	9,518	16	0,595		
Total	9,614	17			

5.1.2 Análisis– Prueba Efectos Inter-sujetos complementario.

Para el análisis de validación si hay o no diferencias entre las densidades de poro establecidas y entre los tamaños de poro, con respecto a la formación de halo de inhibición como se describe en tabla 19, para el número de muestra por % de densidad de 30 %, 40 % y 60 % y los Tamaños de poro evaluados.

Tabla 19. Resumen descriptivo de análisis de Factores inter-sujetos (% densidad vs tamaño).

Factores inter-sujetos			
		Etiqueta de valor	N
Densidad %	30	30%	6
	40	40%	6
	60	60%	6
Tamaño μm	1	100-200 μm	9
	2	355-500 μm	9

En la Tabla 20 se expone la prueba de efectos inter-sujetos del % de densidad y Tamaño de poro de manera independiente, se observó que el modelo estadísticamente no explica el fenómeno. Sin embargo, con un R cuadrado de 0.991, (R al cuadrado ajustada = 0,989). El factor que presentó un efecto significativo es la densidad con una Sig de 0,058. Por lo anterior solo fue ajustado un modelo para % densidad, como el factor que presentó un efecto significativo con respecto a la variable respuesta (Halo de inhibición) como se describió anteriormente.

Tabla 20. Pruebas ANOVA independiente (Inhibición~Densidad*Tamaño).

Pruebas de efectos inter-sujetos					
Variable dependiente:	Inhibición promedio				
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo	732,434 ^a	4	183,108	404,771	0,000
Densidad	3,184	2	1,592	3,520	0,058*
Tamaño	0,096	1	0,096	0,213	0,652
Error	6,333	14	0,452		
Total	738,767	18			

a. R al cuadrado = ,991 (R al cuadrado ajustada = ,989)

Finalmente se realizó un análisis complementario observado en Tabla 21 ANOVA de dos vías con interacción Densidad: Tamaño. Los datos anteriormente reportados van acuerdo con los aquí expuestos ya que hay diferencia estadística que establezca una relación Densidad: Tamaño en la formación de halo de inhibición, observada que después de hacer tanto los análisis descriptivos, encontramos que el único análisis significativo con un valor Pr (>F) de 0,0822 * es la densidad.

Tabla 21. Pruebas ANOVA con Interacción (Inhibición~Densidad*Tamaño).

Pruebas Anova (Inhibición~Densidad*Tamaño)					
Variable	Df	Suma Sq	Media Sq	F valor	Pr(>F)
Densidad %	2	3,035	1,5177	3,100	0,0822 *
Tamaño μm	1	0,078	0,0784	0,160	0,6961
Densidad: Tamaño	2	0,263	0,1313	0,268	0,7692
Residuales	12	5,875	0,4896		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Finalmente se relacionó el halo de inhibición evaluado en términos de densidad y el tamaño como se mencionó en la tabla 21; donde se observa que la diferencia estadística entre el número de tamaño de poro evaluados, en ambos fueron muy similares con nivel de peso bajo (0,6961). A diferencia del % densidad del poro con 0,0822 *. En la figura 33 se indicó con un histograma de barras que en todos se presenta formación de halo de inhibición, donde los substratos de titanio poroso con densidades entre el 30 % y 40 % presentó un efecto de inhibición similar a diferencia de la máxima densidad establecida de % 60.

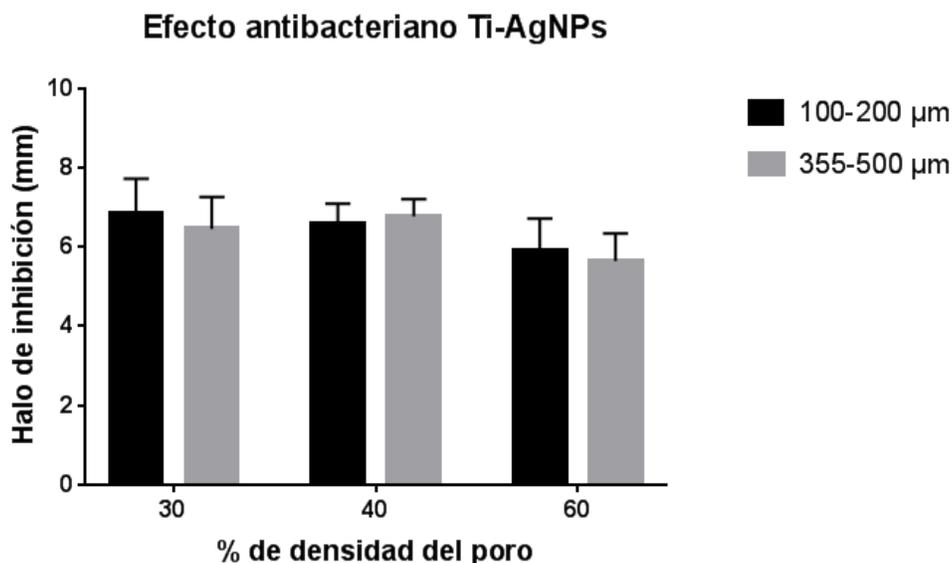


Figura 32. Formación de Halo de Inhibición vs % de densidad.

Comparaciones con análisis previos y propuestas futuras

Los análisis publicados en relación a la actividad antibacteriana de Ti funcionalizado con NpsAg, han sido controvertidos ya que si bien se encuentran estudios donde no se reporta efecto bactericida de las NpsAg inmovilizadas en Ti (184), (185), (186). También se encuentran reportes donde es inminente el efecto antibacteriano como los realizados por otros autores (11), (14), (170), (187), (188), donde sí se reportó actividad antibacteriana en Ti poroso y macizo funcionalizado con NpsAg. Además se ha sugerido que el Ti tiene efectos antimicrobiano y antiinflamatorio, asociados a la formación de peróxidos en la superficie del Ti *in vitro* (189). Así como un estudio previo por de X. Wang *et al.* (190) que observó en Ti liso baja adherencia bacteriana de *S. aureus*, lo que dio como resultado una baja capacidad de infección bacteriana. En los resultados obtenidos en esta investigación se observó que después de 24 horas de incubación de *S. aureus* y en presencia de las superficies de Ti c.p poroso, se observa que el subtrato funcionalizado con NpsAg tiene capacidad antibacteriana. En general dicha capacidad de adherencia de las bacterias a superficies de Ti implicaron procesos no solo físicos; también químicos, interacciones hidrofóbicas, las fuerzas de van der Waals, las interacciones electrostáticas, las fuerzas hidrodinámicas (191) y aspereza (39); y al modificar la textura de la superficie de los materiales del implante, se sugiere que mejorará la unión del tejido con el implante, lo que da como resultado un material que debería ser al menos tan bueno como el titanio sin modificación superficial como lo indican estudio reportado por Huang *et al.* (191)

En consecuencia, futuras investigaciones se requieren para establecer un modelo que describa el comportamiento de la formación de halo bajo en superficies texturizadas y se cuente con mayor material de estudio donde se dé el control de material (energía superficial efectiva) y pérdida del material. Como la reportada en el trabajo de Chao Hu *et al.* (192) donde coinciden que la difusión de partículas propias de desgaste de los

implantes, con capacidad de pasar pared celular, causar inmuno-reacción y daño de ADN, afectando la estabilidad a largo plazo de las prótesis. Dichas variables mencionadas, aunque no fueron consideradas deberán ser evaluadas en una futura investigación. Así como la evaluación de factor de tamaño que se incluyó en el modelo, pero es considerado con un nivel de peso bajo estadístico ya que el valor-pr fue de (0,6961).

Por otro lado, como factor importante que se debe tener en cuenta, es la hidrofobicidad e hidrofiliidad del titanio poroso. Puesto que, bajo grandes porcentajes de humedad, el material aumenta su capacidad de adhesión de superficie e interacción con tejido celular. Y a su vez, puede ser una limitante para la adhesión. Estas afectaciones deben evaluarse, en especial en el sustrato de Ti atacado con NaOH, puesto que, para el caso de la mecánica de contacto, la capa superficial generada determina su interacción con tejido circundante. Bajo ciertas condiciones de alta hidrofiliidad, el ángulo de contacto se ve afectado por condiciones de la superficie concibiendo la adhesión de células osteoblastos unas a otras Jahangir *et al.* (117), lo que se traduce en el incremento del área real de contacto y la adhesión, modificando sustancialmente la respuesta del tejido óseo.

Por lo anterior, para evaluar de mejor manera, formación de halo de inhibición (actividad bacteriana), se debe realizar un diseño experimental de mayor complejidad, que incluya: grosor de muestras de Ti, número de nanomaterial inmovilizado, pérdida del material y liberación de iones plata. Puesto que la formación de halo de inhibición no se ve afectado únicamente por el porcentaje de densidad del poro, si no por el aporte individual de las variables enumeradas anteriormente y la interacción de otras que no se consideraron en este estudio, como las propiedades mecánicas del material, así como la hidrofiliidad mencionada con anterioridad, la cual afecta las funciones biológicas, reportada por Mie *et al.* (193) Donde al evaluar hidrofiliidad, en función de la adhesión y propagación de bacterias / células, presentó que el efecto antibacteriano en superficies de Ti con NpsAg no era fuerte para superficies con la máxima adhesión, pero observó menor cantidad de bacterias totales en superficies con mayor inmovilización de Ag, como es NT-Ag-1.0kv en lugar de NT-Ag-0.5kv, esto fue posiblemente porque la superficie hidrofóbica de NT-Ag-1.0 desfavorece la adhesión de bacterias.

Sin embargo, el estudio de actividad antibacteriana, así como el desarrollo superficial de materiales biocompatibles es uno de los grandes desafíos, debido a que es un campo transversal entre la micro y nanoestructuras del material, con factores que puede incidir o retardar tanto el crecimiento bacteriano, celular, proteínas ect. Según estudio de Ermis *et al.* (194), afirman que las topografías a nanoescala afectan a las células directamente, ya que tienen un tamaño similar con las proteínas ECM, matriz extra celular, como la fibronectina, el colágeno. Estas subunidades de tejido contienen una gran cantidad de células, por lo que la topografía submilimétrica también puede afectar las interacciones célula-célula, la señalización célula-célula y otras actividades celulares.

Finalmente para establecer la conjugación de obtener un material con propiedad antibacteriana y contribuir al desarrollo de sustratos de Ti poroso con potencial uso en materiales implantables, se puede ver claramente que las topografías de superficie juegan

un papel importante en su desarrollo. De modo que; en futuras investigaciones se requiere el estudio y control de la rugosidad. Al favorecer la fijación del implante al hueso, como lo establecieron Hu *et al.* (192), donde al construir modificaciones adecuadas en superficies de material para sustitución ósea, y por ende rugosidades adecuadas, se facilita la propagación de hueso, y diferenciación de células osteogénicas, expresión de genes, promover neovascularización, e inhibir la actividad de osteoclastos y reducción de bacterias, tal es el caso de la investigación de Yun *et al.* (195), donde reportan implantes de titanio funcionalizados con nanomateriales que cambian sus propiedades superficiales, modulando significativamente la respuesta celular. (196). Finalmente se hace hincapié en la necesidad que existe acerca del desarrollo de estudios que consignent modificaciones topográficas estandarizadas de superficies que descifren la interacción entre células óseas y/o medio circundante al material o la topografía superficial, lo que permitiría el desarrollo de material con superficies diseñadas de manera óptima para los implantes óseos.

En Chao, Hu *et al.* (192) fue reportada la dinámica de modificación superficial en material de sustitución ósea, para suprimir bacterias con la ayuda del acabado superficial, el cual se puede adquirir de dos maneras: la modificación pasiva y activa. En la primera se altera la química y estructura de la superficie, la cual se observó en el presente estudio como lo indican las figuras 25, 26, 27 y 28. Donde se observaron cambios de rugosidad de la superficie, carga, hidrofobicidad en comparación con el material desprovisto de nanomaterial. Dicha alteración generada por modificación activa se establece como la responsable de evitar la adhesión bacteriana sin liberar agentes antibacterianos. Por el contrario, como segunda forma, denominada modificación activa, empleada también en este estudio, con la inmovilización de NpsAg (197). Esta última responde entonces al mecanismo donde se incorporan agentes bactericidas, como antimicrobianos inorgánicos como iones de plata, depositados en la superficie para inhibir la infección al matar el patógeno en este caso representado por la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Por lo anterior al emplear estos dos tipos de acabados superficiales en el presente estudio, ambos incidieron favorablemente en la obtención de un material con actividad bactericida para los substratos de titanio poroso, el cual requiere de más estudios, que permitan identificar con mayor precisión, la interacción entre densidad de poro y tamaño de poros y micro y nanoestructuras ya que como se observó se sugiere que cada uno de los factores evaluados puede presentar un efecto específico que incide directamente sobre las propiedades del material de Ti.

6. CONCLUSIONES

El método de síntesis por reducción química y la metodología denominada "*in situ*" garantizó la funcionalización de superficies de titanio poroso funcionalizadas con NpsAg y la mejor distribución de NpsAg observada en SEM con formación de agregados en menor cuantía.

Se sugiere que la formación de sistemas coloidales nanoparticulados de plata, y sus propiedades intrínsecas, son influenciadas por el tamaño, forma y carga superficial. Sin embargo, dado que una caracterización exhaustiva de los nanomateriales es compleja y requiere de tiempo, se recomienda realizar en primera instancia una caracterización de las propiedades fisicoquímicas, estado de la suspensión y análisis microestructural como se observó en este estudio.

El método de síntesis por reducción química garantizó la fabricación de un sistema nanoparticulado con una distribución de tamaño amplia y geometría redondeada, sin embargo la metodología denominada "*in situ*" permitió la obtención de superficies de titanio poroso con mejor distribución de NpsAg observada en TEM. Además el sistema fue estable con un Potencial Z de -29.6 mV y -36.4 mV a 25 °C la mayoría polidispersas con formación de agregados en menor cuantía.

De acuerdo con análisis Sem-EDX, según el tipo de ataque utilizado, ya sea "*piraña*" o "*NaOH*", se evidencian cambios en la topografía de los substratos de titanio generando superficies anisotrópicas e isotrópicas, texturas cóncavas y convexas, así como orientaciones irregulares de las superficies. La topografía general texturizada de la superficie de Ti c.p. y su rugosidad dependen básicamente del ataque químico. El tratamiento L-b o "*solución piraña*" tiene un ligero efecto de redondeo de pico en la superficie. En contraste al tratamiento L-a "*NaOH*", donde el efecto superficial mostró superficies nano rugosas o nano texturizadas apreciables en mayor cuantía. Esto último se debe al carácter nanométrico de la rugosidad asociada estrictamente a la capa anódica del titanio.

Los resultados de Sem-EDX, Potencial Z, Tamaño de partícula muestran una interacción entre las NpsAg y las superficies de titanio. El uso del método de silanización mostró ser una estrategia favorable para la inmovilización de NpsAg. Sin embargo, es necesario el uso de técnicas como FTIR-ATR, para validar el tipo de enlace establecido.

La actividad antibacteriana dependió de la presencia de NpsAg en la superficie de Ti, básicamente de la exposición superficial del titanio micro texturizado a las NpsAg. Sin embargo existe una información asociada a la densidad de poro que probablemente presenta un mayor efecto en la capacidad bactericida. En contraste el tamaño de poro no mostró ser un factor influyente en la inhibición bacteriana. Se observó que la formación

de zona inhibida no depende solamente de la texturización superficial resultante del ataque químico y por el contrario es atribuible con mayor fuerza a la presencia de NpsAg en la superficie de Ti acompañada de dicha texturización.

Las muestras de Ti c.p poroso tratadas con la adición de tratamiento “NaOH” y “Piraña” mostraron una superficie promisorias con capacidad bactericida. En el caso de superficie micro poroso de titanio observado se sugiere que pueden tener una baja capacidad de ángulo de contacto con el agua y revelar una alta humectabilidad como por ejemplo con la sangre o afinidad por la absorción de proteínas. Lo cual indica que este tipo de material poroso es prometedor para el desarrollo de biomateriales con efecto antibacteriano inhibiendo crecimiento de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) en superficies de titanio poroso macro y nano-texturizado.

Como principales problemas destacados en la investigación fueron la precipitación de agregados micrométricos de plata y una posible liberación incontrolada de iones de plata, que pueden interferir en los procesos de biocompatibilidad del material.

Perspectivas futuras

Existe una posible liberación incontrolada de iones de plata, que pueden interferir en los procesos de biocompatibilidad del material a futuro. Por ende se sugiere que en futuros montajes experimentales sean evaluados parámetros de síntesis como liberación de iones plata y aumentar el número de muestras para garantizar la significancia estadística. Además si bien en este trabajo se realizó la exploración de la actividad antibacteriana de los substratos de Ti funcionalizados con NpsAg; es pertinente la inclusión de otros microorganismos (hongos, bacterias gram negativa). Y finalmente funcionalizar la plataforma de Ti poroso con otros compuestos potenciales como biomoléculas. Además de cultivos celulares para evaluar efectos citotóxicos.

7. REFERENCIAS

1. Torres Y, Sarria P, Gotor FJ, Gutiérrez E, Peon E, Beltrán AM, et al. Surface modification of Ti-6Al-4V alloys manufactured by selective laser melting: Microstructural and tribo-mechanical characterization. *Surf Coatings Technol* [Internet]. 2018;348(February):31–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2018.05.015>
2. Souza JCM, Sordi MB, Kanazawa M, Ravindran S, Henriques B, Silva FS, et al. Nano-scale modification of titanium implant surfaces to enhance osseointegration. *Acta Biomater* [Internet]. 2019;94:112–31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.045>
3. Chatzinikolaidou M, Lichtinger TK, Müller RT, Jennissen HP. Peri-implant reactivity and osteoinductive potential of immobilized rhBMP-2 on titanium carriers. *Acta Biomater*. 2010;6(11):4405–21.
4. Huiskes R, Weinans H, Van Rietbergen B. The relationship between stress shielding and bone resorption around total hip stems and the effects of flexible materials. *Clin Orthop Relat Res*. 1992;124–34.
5. Branemark P-I. Osseointegration and its experimental background. *J prosthet Dent*. 1983;50:399–410.
6. Jurczyk MU, Jurczyk K, Miklaszewski A, Jurczyk M. Nanostructured titanium-45S5 Bioglass scaffold composites for medical applications. *Mater Des*. 2011;32(10):4882–9.
7. S.Müller JA. *Revista Latino Americana de Metalurgia y Materiales*. 2015;35(1):1–149.
8. Li Y, Yang C, Zhao H, Qu S, Li X, Li Y. New developments of Ti-based alloys for biomedical applications. *Materials (Basel)*. 2014;7(3):1709–800.
9. Carboneras M, Hernández-Alvarado LA, Mireles YE, Hernández LS, García-Alonso MC, Escudero Rincón ML. Tratamientos químicos de conversión para la protección de magnesio biodegradable en aplicaciones temporales de reparación ósea. 2010;
10. Betts C. Benefits of metal foams and developments in modelling techniques to assess their materials behaviour: a review. *Mater Sci Technol*. 2012;28(2):129–43.

11. Jia J, Siddiq AR, Kennedy AR. Porous titanium manufactured by a novel powder tapping method using spherical salt bead space holders: Characterisation and mechanical properties. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2015;48:229–40.
12. Chino Y, Dunand DC. Directionally freeze-cast titanium foam with aligned, elongated pores. *Acta Mater*. 2008;56(1):105–13.
13. Miao X, Sun D. Graded/gradient porous biomaterials. *Materials (Basel)*. 2010;3(1):26–47.
14. Torres Y, Trueba P, Pavón J, Montealegre I, Rodríguez-Ortiz JA. Designing, processing and characterisation of titanium cylinders with graded porosity: an alternative to stress-shielding solutions. *Mater Des*. 2014;63:316–24.
15. Thieme M, Wieters K-P, Bergner F, Scharnweber D, Worch H, Ndop J, et al. Titanium powder sintering for preparation of a porous functionally graded material destined for orthopaedic implants. *J Mater Sci Mater Med*. 2001;12(3):225–31.
16. Witte F. The history of biodegradable magnesium implants: a review. *Acta Biomater*. 2010;6(5):1680–92.
17. Čapek J, Vojtěch D. Effect of sintering conditions on the microstructural and mechanical characteristics of porous magnesium materials prepared by powder metallurgy. *Mater Sci Eng C*. 2014;35:21–8.
18. Moritz M, Geszke-Moritz M. The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles. *Chem Eng J*. 2013;228:596–613.
19. Zhu X, Chen J, Scheideler L, Reichl R, Geis-Gerstorfer J. Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses. *Biomaterials*. 2004;25(18):4087–103.
20. Eisenbarth E, Meyle J, Nachtigall W, Breme J. Influence of the surface structure of titanium materials on the adhesion of fibroblasts. *Biomaterials*. 1996;17(14):1399–403.
21. Pergueroles M, Menéndez Crespo E, Aparicio C, Planell Estany JA, Gil FX. Influencia del proceso de esterilización en la mojabilidad del titanio modificado superficialmente. *Biomecánica órgano la Soc Ibérica Biomecánica y Biomater* 2004, vol 12, núm 2. 2004;
22. Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomsen P. Titanium in medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications.

Springer Science & Business Media; 2012.

23. Pavón J, Velásquez P, Velásquez S. Modificación superficial del titanio para mejorar su oseointegración. VI Encuentro Nac Mater Módulo Met Univ Antioquia Medellín, Colomb. 2010;
24. Rontescu C, Cicic DT, Amza CG, Chivu OR, Iacobescu G. Comparative Analysis of the Components Obtained by Additive Manufacturing Used for Prosthetics and Medical Instruments. *Eos (Washington DC)*. 2017;13:14.
25. López AA. Estudio del quitosano como biomaterial portador de rhBMP-2: desarrollo, caracterización y aplicabilidad en regeneración de tejido óseo. Universidad Complutense de Madrid; 2008.
26. Ziberi B, Frost F, Höche T, Rauschenbach B. Ripple pattern formation on silicon surfaces by low-energy ion-beam erosion: Experiment and theory. *Phys Rev B*. 2005;72(23):235310.
27. Dalby MJ, Gadegaard N, Tare R, Andar A, Riehle MO, Herzyk P, et al. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nat Mater*. 2007;6(12):997.
28. Geissler U, Hempel U, Wolf C, Scharnweber D, Worch H, Wenzel K. Collagen type I-coating of Ti6Al4V promotes adhesion of osteoblasts. *J Biomed Mater Res*. 2000;51(4):752–60.
29. Groessner-Schreiber B, Neubert A, Müller W, Hopp M, Griepentrog M, Lange K. Fibroblast growth on surface-modified dental implants: An in vitro study. *J Biomed Mater Res Part A An Off J Soc Biomater Japanese Soc Biomater Aust Soc Biomater Korean Soc Biomater*. 2003;64(4):591–9.
30. Ivanova EP, Hasan J, Truong VK, Wang JY, Raveggi M, Fluke C, et al. The influence of nanoscopically thin silver films on bacterial viability and attachment. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;91(4):1149–57.
31. Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv Colloid Interface Sci*. 2009;145(1–2):83–96.
32. Nino-Martinez N, Martinez-Castanon GA, Aragon-Pina A, Martinez-Gutierrez F, Martinez-Mendoza JR, Ruiz F. Characterization of silver nanoparticles synthesized on titanium dioxide fine particles. *Nanotechnology*. 2008;19(6):65711.
33. Shibata Y, Tanimoto Y. A review of improved fixation methods for dental implants. Part I: Surface optimization for rapid osseointegration. *J Prosthodont Res*.

2015;59(1):20–33.

34. Salazar Gutiérrez AS. Efecto antimicrobiano y citotóxico de las nanopartículas de plata depositadas en discos de acero inoxidable. In-vitro. Universidad Autónoma de Nuevo León; 2014.
35. Zhou W, Ma Y, Yang H, Ding Y, Luo X. A label-free biosensor based on silver nanoparticles array for clinical detection of serum p53 in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:381–6.
36. Luo J, Jiang S, Zhang H, Jiang J, Liu X. A novel non-enzymatic glucose sensor based on Cu nanoparticle modified graphene sheets electrode. *Anal Chim Acta*. 2012;709:47–53.
37. Giljohann DA, Seferos DS, Daniel WL, Massich MD, Patel PC, Mirkin CA. Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angew Chemie Int Ed*. 2010;49(19):3280–94.
38. Ping J, Ru S, Fan K, Wu J, Ying Y. Copper oxide nanoparticles and ionic liquid modified carbon electrode for the non-enzymatic electrochemical sensing of hydrogen peroxide. *Microchim Acta*. 2010;171(1–2):117–23.
39. Liu T-Y, Liao H-C, Lin C-C, Hu S-H, Chen S-Y. Biofunctional ZnO nanorod arrays grown on flexible substrates. *Langmuir*. 2006;22(13):5804–9.
40. Wang X, Xu S, Zhou S, Xu W, Leary M, Choong P, et al. Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: a review. *Biomaterials*. 2016;83:127–41.
41. Li H, Oppenheimer SM, Stupp SI, Dunand DC, Brinson LC. Effects of pore morphology and bone ingrowth on mechanical properties of microporous titanium as an orthopaedic implant material. *Mater Trans*. 2004;45(4):1124–31.
42. Benčina M, Mavrič T, Junkar I, Bajt A, Krajnović A, Lakota K, et al. The Importance of Antibacterial Surfaces in Biomedical Applications. 2018;28:1–51. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2451963418300438>
43. Croes M, Bakhshandeh S, van Hengel IAJ, Lietaert K, van Kessel KPM, Pouran B, et al. Antibacterial and immunogenic behavior of silver coatings on additively manufactured porous titanium. *Acta Biomater*. 2018;81:315–27.
44. M croes S Bakhshandeh Antibacterial and immunogenic behavior of silver coatings on additively.

45. Vert M, Doi Y, Hellwich K, Hess M, Hodge P, Kubisa P, et al. Terminology for Biorelated Polymers and Applications. *Chem Int -- Newsmag IUPAC*. 2014;33(2):377–410.
46. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. Elsevier; 2004.
47. Schliephake H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2002;31(5):469–84.
48. Beutner R, Michael J, Schwenzer B, Scharnweber D. Biological nano-functionalization of titanium-based biomaterial surfaces: a flexible toolbox. *J R Soc Interface*. 2009;7(suppl_1):S93–105.
49. De Giglio E, Cafagna D, Cometa S, Allegretta A, Pedico A, Giannossa LC, et al. An innovative, easily fabricated, silver nanoparticle-based titanium implant coating: development and analytical characterization. *Anal Bioanal Chem*. 2013;405(2–3):805–16.
50. Jahangir AA, Nunley RM, Mehta S, Sharan A. Bone-graft substitutes in orthopaedic surgery. *AAos now*. 2008;2(1):35–7.
51. Lyles MB, Hu JC, Varanasi VG, Hollinger JO, Athanasiou KA. Bone tissue engineering. *Regenerative Engineering of Musculoskeletal Tissues and Interfaces*. 2015. 97-134 p.
52. Steele DG, Bramblett CA. *The anatomy and biology of the human skeleton*. Texas A&M University Press; 1988.
53. Rodan GA, Raisz LG, Bilezikian JP. Pathophysiology of osteoporosis. In: *Principles of bone biology*. Elsevier; 2002. p. 1275–89.
54. Urist MR, DeLange RJ, Finerman GA. Bone cell differentiation and growth factors. *Science* (80-). 1983;220(4598):680–6.
55. Hengsberger S, Enstroem J, Peyrin F, Zysset P. How is the indentation modulus of bone tissue related to its macroscopic elastic response? A validation study. *J Biomech*. 2003;36(10):1503–9.
56. Netter FH. *Atlas of Human Anatomy, Professional Edition: including NetterReference.com Access with Full Downloadable Image Bank*. Elsevier Health Sciences; 2017.
57. Betts JG, DeSaix P, Johnson E, Johnson JE, Korol O, Kruse DH, et al. *Anatomy and physiology*. 2014;

58. Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater* [Internet]. 2017;2(4):224–47. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.007>
59. Rodil Posada Sandra Elizabeth. Modificación superficial de biomateriales metálicos. Vol. 29, *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*. scielon; 2009. p. 67–83.
60. Chourifa H, Bouloussa H, Migonney V, Falentin-Daudré C. Review of titanium surface modification techniques and coatings for antibacterial applications. *Acta Biomater*. 2018;
61. Keselowsky BG, Collard DM, García AJ. Integrin binding specificity regulates biomaterial surface chemistry effects on cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102(17):5953–7.
62. Huebsch N, Mooney DJ. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. *Nature*. 2009;462(7272):426.
63. Domínguez A, Tutores R, Yadir :, Hernández T, Trujillo CD. Modificación superficial de Titanio poroso mediante ataque químico para mejorar su oseointegración. 2017;
64. Varanasi VG, Velten MF, Odatsu T, Ilyas A, Iqbal SM, Aswath PB. Surface Modifications and Surface Characterization of Biomaterials Used in Bone Healing [Internet]. *Materials and Devices for Bone Disorders*. Elsevier Inc.; 2016. 405-452 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802792-9.00009-4>
65. González M, Rodríguez D, Gil FJ, Peña J, Manero JM. Estudio de la biocompatibilidad de una nueva aleación beta-titanio de bajo módulo de elasticidad. *Biomecánica {Ó}rgano la Soc Ib{é}rica Biomec{á}nica y Biomater*. 2010;18(1):24–8.
66. Clavijo Grimaldo D, Orjuela A, Edgar J, Cardozo de Martínez CA, Casadiego Torrado CA, Perea Covarrubias Á. Hacia una nueva generación de biomateriales: primera parte. *Rev colomb ortop traumatol*. 2010;24(3).
67. Spriano S, Yamaguchi S, Baino F, Ferraris S. A critical review of multifunctional titanium surfaces: New frontiers for improving osseointegration and host response, avoiding bacteria contamination. *Acta Biomater*. 2018;
68. Warheit DB, Borm PJA, Hennes C, Lademann J. Testing strategies to establish the safety of nanomaterials: conclusions of an ECETOC workshop. *Inhal Toxicol*. 2007;19(8):631–43.

69. Gurunathan S, Kalishwaralal K, Vaidyanathan R, Venkataraman D, Pandian SRK, Muniyandi J, et al. Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli*. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2009;74(1):328–35.
70. Lee J, Kim K-J, Sung WS, Kim JG, Lee DG. The silver nanoparticle (nano-Ag): a new model for antifungal agents. In: *Silver nanoparticles*. InTech; 2010.
71. Kreuter J. Nanoparticles—a historical perspective. *Int J Pharm*. 2007;331(1):1–10.
72. Powers CM, Badireddy AR, Ryde IT, Seidler FJ, Slotkin TA. Silver nanoparticles compromise neurodevelopment in PC12 cells: critical contributions of silver ion, particle size, coating, and composition. *Environ Health Perspect*. 2010;119(1):37–44.
73. Kim S, Choi JE, Choi J, Chung K-H, Park K, Yi J, et al. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol Vitro*. 2009;23(6):1076–84.
74. Misra SK, Dybowska A, Berhanu D, Luoma SN, Valsami-Jones E. The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies. *Sci Total Environ*. 2012;438:225–32.
75. Iravani S, Korbekandi H, Mirmohammadi SV, Zolfaghari B. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Res Pharm Sci*. 2014;9(6):385.
76. Kruszynska M, Borchert H, Parisi J, Kolny-Olesiak J. Synthesis and shape control of CuInS₂ nanoparticles. *J Am Chem Soc*. 2010;132(45):15976–86.
77. Chen C-H, Tsao T-C, Li W-Y, Shen W-C, Cheng C-W, Tang J-L, et al. Novel U-shape gold nanoparticles-modified optical fiber for localized plasmon resonance chemical sensing. *Microsyst Technol*. 2010;16(7):1207–14.
78. Ning J, Men K, Xiao G, Wang L, Dai Q, Zou B, et al. Facile synthesis of IV–VI SnS nanocrystals with shape and size control: nanoparticles, nanoflowers and amorphous nanosheets. *Nanoscale*. 2010;2(9):1699–703.
79. Lee C-M, Jeong H-J, Lim ST, Sohn M-H, Kim DW. Synthesis of iron oxide nanoparticles with control over shape using imidazolium-based ionic liquids. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2010;2(3):756–9.
80. Kanmani SS, Ramachandran K. Synthesis and characterization of TiO₂/ZnO core/shell nanomaterials for solar cell applications. *Renew Energy*. 2012;43:149–56.

81. Kim KM, Kang K-Y, Kim S, Lee Y-G. Electrochemical properties of TiO₂ nanotube-Li₄Ti₅O₁₂ composite anodes for lithium-ion batteries. *Curr Appl Phys.* 2012;12(4):1199–206.
82. Wu X, Xing W, Zhang L, Zhuo S, Zhou J, Wang G, et al. Nickel nanoparticles prepared by hydrazine hydrate reduction and their application in supercapacitor. *Powder Technol.* 2012;224:162–7.
83. Bauer A, Hui R, Ignaszak A, Zhang J, Jones DJ. Application of a composite structure of carbon nanoparticles and Nb–TiO₂ nanofibers as electrocatalyst support for PEM fuel cells. *J Power Sources.* 2012;210:15–20.
84. Gómez GL. Nanopartículas de plata: tecnología para su obtención, caracterización y actividad biológica. *Investig en Discapac.* 2013;2(1):18–22.
85. Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases.* 2007;2(4):MR17-MR71.
86. Kaegi R, Sinnet B, Zuleeg S, Hagendorfer H, Mueller E, Vonbank R, et al. Release of silver nanoparticles from outdoor facades. *Environ Pollut.* 2010;158(9):2900–5.
87. Jadhav S, Gaikwad S, Nimse M, Rajbhoj A. Copper oxide nanoparticles: synthesis, characterization and their antibacterial activity. *J Clust Sci.* 2011;22(2):121–9.
88. Chen R, Cheng G, So MH, Wu J, Lu Z, Che C-M, et al. Bismuth subcarbonate nanoparticles fabricated by water-in-oil microemulsion-assisted hydrothermal process exhibit anti-*Helicobacter pylori* properties. *Mater Res Bull.* 2010;45(5):654–8.
89. Dong C, Cairney J, Sun Q, Maddan OL, He G, Deng Y. Investigation of Mg (OH) ₂ nanoparticles as an antibacterial agent. *J Nanoparticle Res.* 2010;12(6):2101–9.
90. Wang XF, Zhang SL, Zhu LY, Xie SY, Dong Z, Wang Y, et al. Enhancement of antibacterial activity of tilmicosin against *Staphylococcus aureus* by solid lipid nanoparticles in vitro and in vivo. *Vet J.* 2012;191(1):115–20.
91. Abbasi AR, Akhbari K, Morsali A. Dense coating of surface mounted CuBTC metal–organic framework nanostructures on silk fibers, prepared by layer-by-layer method under ultrasound irradiation with antibacterial activity. *Ultrason Sonochem.* 2012;19(4):846–52.
92. Song J, Kang H, Lee C, Hwang SH, Jang J. Aqueous synthesis of silver nanoparticle embedded cationic polymer nanofibers and their antibacterial activity. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2011;4(1):460–5.

93. Shi Q, Vitichuli N, Nowak J, Noar J, Caldwell JM, Breidt F, et al. One-step synthesis of silver nanoparticle-filled nylon 6 nanofibers and their antibacterial properties. *J Mater Chem.* 2011;21(28):10330–5.
94. Yudovin-Farber I, Beyth N, Weiss EI, Domb AJ. Antibacterial effect of composite resins containing quaternary ammonium polyethyleneimine nanoparticles. *J Nanoparticle Res.* 2010;12(2):591–603.
95. Shameli K, Ahmad M Bin, Zamanian A, Sangpour P, Shabanzadeh P, Abdollahi Y, et al. Green biosynthesis of silver nanoparticles using *Curcuma longa* tuber powder. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:5603.
96. Singh S, Patel P, Jaiswal S, Prabhune AA, Ramana C V, Prasad BL V. A direct method for the preparation of glycolipid–metal nanoparticle conjugates: sophorolipids as reducing and capping agents for the synthesis of water re-dispersible silver nanoparticles and their antibacterial activity. *New J Chem.* 2009;33(3):646–52.
97. Rao ML. Screening of traditional medicinal plants for secondary metabolites. *Int J Res Pharm Sci.* 2016;2(4):643–7.
98. Fu X, Cai J, Zhang X, Li W-D, Ge H, Hu Y. Top-down fabrication of shape-controlled, monodisperse nanoparticles for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018;
99. Beyene HD, Werkneh AA, Bezabh HK, Ambaye TG. Synthesis paradigm and applications of silver nanoparticles (AgNPs), a review. *Sustain Mater Technol.* 2017;13:18–23.
100. Ma H, Yin B, Wang S, Jiao Y, Pan W, Huang S, et al. Synthesis of silver and gold nanoparticles by a novel electrochemical method. *ChemPhysChem.* 2004;5(1):68–75.
101. Raveendran P, Fu J, Wallen SL. Completely “green” synthesis and stabilization of metal nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2003;125(46):13940–1.
102. Malinsky MD, Kelly KL, Schatz GC, Van Duyne RP. Chain length dependence and sensing capabilities of the localized surface plasmon resonance of silver nanoparticles chemically modified with alkanethiol self-assembled monolayers. *J Am Chem Soc.* 2001;123(7):1471–82.
103. Zhang W, Qiao X, Chen J, Chen Q. Self-assembly and controlled synthesis of silver nanoparticles in SDS quaternary microemulsion. *Mater Lett.* 2008;62(10–11):1689–92.

104. Chen M, Wang L-Y, Han J-T, Zhang J-Y, Li Z-Y, Qian D-J. Preparation and study of polyacryamide-stabilized silver nanoparticles through a one-pot process. *J Phys Chem B*. 2006;110(23):11224–31.
105. Esumi K, Hosoya T, Suzuki A, Torigoe K. Formation of gold and silver nanoparticles in aqueous solution of sugar-persubstituted poly (amidoamine) dendrimers. *J Colloid Interface Sci*. 2000;226(2):346–52.
106. Crooks RM, Zhao M, Sun L, Chechik V, Yeung LK. Dendrimer-encapsulated metal nanoparticles: synthesis, characterization, and applications to catalysis. *Acc Chem Res*. 2001;34(3):181–90.
107. Murphy CJ, Sau TK, Gole AM, Orendorff CJ, Gao J, Gou L, et al. Anisotropic metal nanoparticles: synthesis, assembly, and optical applications. ACS Publications; 2005.
108. Krutyakov YA, Kudrinskiy AA, Olenin AY, Lisichkin GV. Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects. *Russ Chem Rev*. 2008;77(3):233–57.
109. Burda C, Chen X, Narayanan R, El-Sayed MA. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. *Chem Rev*. 2005;105(4):1025–102.
110. Lee PC, Meisel D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *J Phys Chem*. 1982;86(17):3391–5.
111. Creighton JA, Eadon DG. *J. Chem. Soc. Faraday Trans*. 1991;87:3881–91.
112. Wan Y, Guo Z, Jiang X, Fang K, Lu X, Zhang Y, et al. Quasi-spherical silver nanoparticles: Aqueous synthesis and size control by the seed-mediated Lee–Meisel method. *J Colloid Interface Sci*. 2013;394:263–8.
113. Chauhan BPS, Sardar R. Self-assembled stable silver nanoclusters and nanonecklace formation: poly (methylhydrosiloxane)-mediated one-pot route to organosols. *Macromolecules*. 2004;37(14):5136–9.
114. Zewde B, Ambaye A, Stubbs J. A review of stabilized silver nanoparticles—synthesis, biological properties, characterization, and potential Areas of Applications. *JSM Nanotechnol Nanomedicine*. 2016;4(2):1043.
115. Hassan MM. Antibacterial and Antifungal Thioglycolic Acid-Capped Silver Nanoparticles and Their Application on Wool Fabric as a Durable Antimicrobial Treatment. *ChemistrySelect*. 2017;2(1):504–12.
116. Sambalova O, Thorwarth K, Heeb NV, Bleiner D, Zhang Y, Borgschulte A, et al. Carboxylate Functional Groups Mediate Interaction with Silver Nanoparticles in

- Biofilm Matrix. ACS Omega. 2018;3(1):724–33.
117. Pinter E, Patakfalvi R, Fülei T, Gingl Z, Dekany I, Visy C. Characterization of polypyrrole– silver nanocomposites prepared in the presence of different dopants. *J Phys Chem B*. 2005;109(37):17474–8.
 118. Gutiérrez JC. Síntesis de nanoestructuras metálicas de oro y plata a partir de precursores organometálicos: Propiedades plasmónicas y catalíticas. Universidad de La Rioja; 2014.
 119. Shim I-K, Lee Y Il, Lee KJ, Joung J. An organometallic route to highly monodispersed silver nanoparticles and their application to ink-jet printing. *Mater Chem Phys*. 2008;110(2–3):316–21.
 120. Sánchez M, Álvarez J. Nanopartículas de Plata: Preparación, Caracterización y Propiedades con Aplicación en Inocuidad de los Alimentos. *Lab Complement Quim*. 2012;1–26.
 121. Zhang W, Qiao X, Chen J. Synthesis of silver nanoparticles-Effects of concerned parameters in water/oil microemulsion. *Mater Sci Eng B Solid-State Mater Adv Technol*. 2007;142(1):1–15.
 122. Xu B, Gonella G, DeLacy BG, Dai H-L. Adsorption of anionic thiols on silver nanoparticles. *J Phys Chem C*. 2015;119(10):5454–61.
 123. Yin Y, Li Z-Y, Zhong Z, Gates B, Xia Y, Venkateswaran S. Synthesis and characterization of stable aqueous dispersions of silver nanoparticles through the Tollens process. *J Mater Chem*. 2002;12(3):522–7.
 124. Sun Y, Xia Y. Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. *Science* (80-). 2002;298(5601):2176–9.
 125. Heinz H, Pramanik C, Heinz O, Ding Y, Mishra RK, Marchon D, et al. Nanoparticle decoration with surfactants: Molecular interactions, assembly, and applications. *Surf Sci Rep* [Internet]. 2017;72(1):1–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.surfrep.2017.02.001>
 126. Liu Y-C, Lin L-H. New pathway for the synthesis of ultrafine silver nanoparticles from bulk silver substrates in aqueous solutions by sonoelectrochemical methods. *Electrochem commun*. 2004;6(11):1163–8.
 127. Ledezma A, Romero J, Hernández M, Moggio I, Arias E, Padrón G, et al. Síntesis biomimética de nanopartículas de plata utilizando extracto acuoso de nopal (*Opuntia* sp.) y su electrohilado polimérico. *Superf y vacío*. 2014;27(4):133–40.

128. El-Nour KMMA, Eftaiha A, Al-Warthan A, Ammar RAA. Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arab J Chem*. 2010;3(3):135–40.
129. Kumar CSSR. UV-VIS and photoluminescence spectroscopy for nanomaterials characterization. Springer; 2013.
130. Serra A, Filippo E, Re M, Palmisano M, Vittori-Antisari M, Buccolieri A, et al. Non-functionalized silver nanoparticles for a localized surface plasmon resonance-based glucose sensor. *Nanotechnology*. 2009;20(16).
131. Ipohorski M, Bozzano P b. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM): en la Caracterización de Materiales. *Cienc Invest*. 2013;63(3):43–53.
132. Litman A, Goldenstein A, Rogers SR. System for high resolution imaging and measurement of topographic and material features on a specimen. Google Patents; 1997.
133. Torres Y, Pavón JJ, Nieto I, Rodríguez JA. Conventional powder metallurgy process and characterization of porous titanium for biomedical applications. *Metall Mater Trans B*. 2011;42(4):891–900.
134. Memoria de Tesis presentada por : Nathalia Marín Pareja Para optar por al grado de Doctora en Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica por la Universitat Politècnica de Catalunya Dirigida por : Dra . Maria Pau Ginebra Molins Dr . Emiliano Salvag.
135. Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomaterials* [Internet]. 2013;34(34):8533–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.089>
136. Wang M, Tang T. Surface treatment strategies to combat implant-related infection from the beginning. *J Orthop Transl* [Internet]. 2018;1–13. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jot.2018.09.001>
137. Vlčková B, Moskovits M, Pavel I, Šišková K, Sládková M, Šlouf M. Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy from a molecularly-bridged silver nanoparticle dimer. *Chem Phys Lett*. 2008;455(4–6):131–4.
138. Pavel I, McCarney E, Elkhalel A, Morrill A, Plaxco K, Moskovits M. Label-free SERS detection of small proteins modified to act as bifunctional linkers. *J Phys Chem C*. 2008;112(13):4880–3.
139. Li X, Jiang L, Zhan Q, Qian J, He S. Localized surface plasmon resonance (LSPR) of polyelectrolyte-functionalized gold-nanoparticles for bio-sensing. *Colloids Surfaces*

- A Physicochem Eng Asp. 2009;332(2–3):172–9.
140. González AL, Noguez C, Beránek J, Barnard AS. Size, shape, stability, and color of plasmonic silver nanoparticles. *J Phys Chem C*. 2014;118(17):9128–36.
 141. Hegazy MA, Borham E. Preparation and characterization of silver nanoparticles homogenous thin films. *NRIAG J Astron Geophys* [Internet]. 2018;7(1):27–30. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nrjag.2018.04.002>
 142. Pillai ZS, Kamat P V. What factors control the size and shape of silver nanoparticles in the citrate ion reduction method? *J Phys Chem B*. 2004;108(3):945–51.
 143. Guan Q, Xia C, Li W. Bio-friendly controllable synthesis of silver nanoparticles and their enhanced antibacterial property. *Catal Today* [Internet]. 2019;327:196–202. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2018.05.004>
 144. Sithole ZN. Synthesis of silver nanoparticles and investigating their antimicrobial effects By. 2014;(December).
 145. Chowdhury NR, MacGregor-Ramiasa M, Zilm P, Majewski P, Vasilev K. “Chocolate” silver nanoparticles: Synthesis, antibacterial activity and cytotoxicity. *J Colloid Interface Sci*. 2016;482:151–8.
 146. Drahansky M, Paridah M., Moradbak A, Mohamed A., Owolabi F, Abdulwahab Taiwo, Asniza M, et al. We are IntechOpen, the world’s leading publisher of Open Access books Built by scientists, for scientists TOP 1%. Intech [Internet]. 2016;j(tourism):13. Available from: <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>
 147. Roldán MV, Pellegrini NS, de Sanctis OA. Optical Response of Silver Nanoparticles Stabilized by Amines to LSPR based Sensors. *Procedia Mater Sci*. 2012;1:594–600.
 148. Prathna TC, Chandrasekaran N, Raichur AM, Mukherjee A. Biomimetic synthesis of silver nanoparticles by Citrus limon (lemon) aqueous extract and theoretical prediction of particle size. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2011;82(1):152–9.
 149. Vigneshwaran N, Nachane RP, Balasubramanya RH, Varadarajan P V. A novel one-pot “green” synthesis of stable silver nanoparticles using soluble starch. *Carbohydr Res*. 2006;341(12):2012–8.
 150. El-Sayed IH, Huang X, El-Sayed MA. Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: Applications in oral cancer. *Nano Lett*. 2005;5(5):829–34.
 151. Kumbhar AS, Kinnan MK, Chumanov G. Multipole plasmon resonances of submicron

- silver particles. *J Am Chem Soc.* 2005;127(36):12444–5.
152. Evanoff DD, Chumanov G. Size-controlled synthesis of nanoparticles. 2. Measurement of extinction, scattering, and absorption cross sections. *J Phys Chem B.* 2004;108(37):13957–62.
 153. Bantz C, Koshkina O, Lang T, Galla HJ, Kirkpatrick CJ, Stauber RH, et al. The surface properties of nanoparticles determine the agglomeration state and the size of the particles under physiological conditions. *Beilstein J Nanotechnol.* 2014;5(1):1774–86.
 154. Nur Sholikhah U, Pujiyanto A, Lestari E, Sarmini E, Widyaningrum T, Kadarisman K, et al. Stability of Silver Nanoparticles as Imaging Materials. *J Pure Appl Chem Res.* 2016;5(3):173–7.
 155. Nur SU, Anung P, Enny L, Endang S, Hotman L, Triani W, et al. Critical Parameters of Silver Nanoparticles (AgNPs) synthesized by sodium borohydride reduction. *Res J Chem Environ.* 2018;22(Special issue II):179–83.
 156. Kyaw K, Ichimaru H, Kawagoe T, Terakawa M, Miyazawa Y, Mizoguchi D, et al. Effects of pulsed laser irradiation on gold-coated silver nanoplates and their antibacterial activity. *Nanoscale.* 2017;9(41):16101–5.
 157. Stevanović M, Bračko I, Milenković M, Filipović N, Nunić J, Filipič M, et al. Multifunctional PLGA particles containing poly (l-glutamic acid)-capped silver nanoparticles and ascorbic acid with simultaneous antioxidative and prolonged antimicrobial activity. *Acta Biomater.* 2014;10(1):151–62.
 158. Wu L, Zhang J, Watanabe W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles ☆ . *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2011; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2011.02.001>
 159. Haque MN, Kwon S, Cho D. Formation and stability study of silver nano-particles in aqueous and organic medium. *Korean J Chem Eng.* 2017;34(7):2072–8.
 160. Choi O, Hu Z. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environ Sci Technol.* 2008;42(12):4583–8.
 161. Agnihotri S, Mukherji S, Mukherji S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Adv.* 2014;4(8):3974–83.
 162. Sivera M, Kvitek L, Soukupova J, Panacek A, Pucek R, Vecerova R, et al. Silver nanoparticles modified by gelatin with extraordinary pH stability and long-term antibacterial activity. *PLoS One.* 2014;9(8).

163. Liang M, Su R, Huang R, Qi W, Yu Y, Wang L, et al. Facile in situ synthesis of silver nanoparticles on procyanidin-grafted eggshell membrane and their catalytic properties. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014;6(7):4638–49.
164. Azarkhalil MS, Keyvani B. Synthesis of silver nanoparticles from spent X-ray photographic solution via chemical reduction. *Iran J Chem Chem Eng*. 2016;35(3):1–8.
165. Hani Ramli R, Soon CF, Mohd Rus AZ. Characterisation of silver nanoparticles produced by three different methods based on Borohydride reducing agent. *MATEC Web Conf*. 2016;78:1–7.
166. Gharibshahi L, Saion E, Gharibshahi E, Shaari AH, Matori KA. Structural and optical properties of Ag nanoparticles synthesized by thermal treatment method. *Materials (Basel)*. 2017;10(4):402.
167. Pris M, Krzysztof T. Influence of different parameters on wet synthesis of silver nanoparticles. *Membrane Science & Technology Group. Influ Differ parameters wet Synth silver nanoparticles Membr Sci Technol Gr*. 2008;
168. Nacional C. T e s i s. 2010;
169. Hubenthal F. Noble Metal Nanoparticles: Synthesis and Optical Properties [Internet]. Vols. 1–5, *Comprehensive Nanoscience and Technology*. Elsevier Ltd.; 2010. 375-435 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.00585-3>
170. Goharian A. Porous Osseointegrative Layering for Enhancement of Osseointegration. *Osseointegration Orthop Implant*. 2019;141–62.
171. Ferraris S, Spriano S, Miola M, Bertone E, Allizond V, Cuffini AM, et al. Surface modification of titanium surfaces through a modified oxide layer and embedded silver nanoparticles: Effect of reducing/stabilizing agents on precipitation and properties of the nanoparticles. *Surf Coatings Technol*. 2018;344(November 2017):177–89.
172. Torres Y, Lascano S, Bris J, Pavón J, Rodríguez JA. Development of porous titanium for biomedical applications: A comparison between loose sintering and space-holder techniques. *Mater Sci Eng C*. 2014;37:148–55.
173. Nagasawa M, Cooper LF, Ogino Y, Mendonca D, Liang R, Yang S, et al. Topography influences adherent cell regulation of osteoclastogenesis. *J Dent Res*. 2016;95(3):319–26.

174. Ziebart T, Schnell A, Walter C, Kämmerer PW, Pabst A, Lehmann KM, et al. Interactions between endothelial progenitor cells (EPC) and titanium implant surfaces. *Clin Oral Investig*. 2013;17(1):301–9.
175. Lagonegro P, Trevisi G, Nasi L, Parisi L, Manfredi E, Lumetti S, et al. Osteoblasts preferentially adhere to peaks on micro-structured titanium. *Dent Mater J*. 2018;37(2):278–85.
176. Wang X, Wang Y, Bosshardt DD, Miron RJ, Zhang Y. The role of macrophage polarization on fibroblast behavior-an in vitro investigation on titanium surfaces. *Clin Oral Investig*. 2018;22(2):847–57.
177. Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ*. 2003;67(8):932–49.
178. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur spine J*. 2001;10(2):S96–101.
179. Ogino Y, Liang R, Mendonça DBS, Mendonça G, Nagasawa M, Koyano K, et al. RhoA-Mediated Functions in C3H10T1/2 Osteoprogenitors Are Substrate Topography Dependent. *J Cell Physiol*. 2016;231(3):568–75.
180. Lotz EM, Berger MB, Schwartz Z, Boyan BD. Regulation of osteoclasts by osteoblast lineage cells depends on titanium implant surface properties. *Acta Biomater* [Internet]. 2018;68:296–307. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.12.039>
181. Park JY, Gemmell CH, Davies JE. Platelet interactions with titanium: modulation of platelet activity by surface topography. *Biomaterials*. 2001;22(19):2671–82.
182. Ahamed M, Karns M, Goodson M, Rowe J, Hussain SM, Schlager JJ, et al. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2008;233(3):404–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2008.09.015>
183. Juan L, Zhimin Z, Anchun M, Lei L, Jingchao Z. Deposition of silver nanoparticles on titanium surface for antibacterial effect. *Int J Nanomedicine*. 2010;5(1):261–7.
184. Leonhardt Å, Dahlén G. Effect of titanium on selected oral bacterial species in vitro. *Eur J Oral Sci*. 1995;103(6):382–7.
185. Heydenrijk K, Meijer HJA, van der Reijden WA, Raghoobar GM, Vissink A, Stegenga B. Microbiota around root-form endosseous implants: a review of the literature. *Int*

- J Oral Maxillofac Implants. 2002;17(6).
186. Joshi RI, Eley A. The in-vitro effect of a titanium implant on oral microflora: comparison with other metallic compounds. *J Med Microbiol*. 1988;27(2):105–7.
 187. Ferraris S, Venturello A, Miola M, Cochis A, Rimondini L, Spriano S. Antibacterial and bioactive nanostructured titanium surfaces for bone integration. *Appl Surf Sci* [Internet]. 2014;311:279–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.05.056>
 188. Khodaei M, Fathi M, Meratian M, Savabi O. The effect of porosity on the mechanical properties of porous titanium scaffolds: Comparative study on experimental and analytical values. *Mater Res Express*. 2018;5(5):7–13.
 189. Tengvall P, Hörnsten EG, Elwing H, Lundström I. Bactericidal properties of a titanium-peroxy gel obtained from metallic titanium and hydrogen peroxide. *J Biomed Mater Res*. 1990;24(3):319–30.
 190. Wang X, Wang G, Liang J, Cheng J, Ma W, Zhao Y. Staphylococcus aureus adhesion to different implant surface coatings: An in vitro study. *Surf Coatings Technol*. 2009;203(22):3454–8.
 191. Huang HL, Chang YY, Lai MC, Lin CR, Lai CH, Shieh TM. Antibacterial TaN-Ag coatings on titanium dental implants. *Surf Coatings Technol* [Internet]. 2010;205(5):1636–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.surfcoat.2010.07.096>
 192. Hu C, Ashok D, Nisbet DR, Gautam V. Bioinspired surface modification of orthopedic implants for bone tissue engineering. *Biomaterials* [Internet]. 2019;219(June):119366. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119366>
 193. Mei S, Wang H, Wang W, Tong L, Pan H, Ruan C, et al. Antibacterial effects and biocompatibility of titanium surfaces with graded silver incorporation in titania nanotubes. *Biomaterials*. 2014;35(14):4255–65.
 194. Ermis M, Antmen E, Hasirci V. Micro and Nanofabrication methods to control cell-substrate interactions and cell behavior: A review from the tissue engineering perspective. *Bioact Mater*. 2018;3(3):355–69.
 195. Jo YK, Choi B, Kim CS, Cha HJ. Diatom-inspired silica nanostructure coatings with controllable microroughness using an engineered mussel protein glue to accelerate bone growth on titanium-based implants. *Adv Mater*. 2017;29(46):1704906.
 196. Mas-Moruno C, Su B, Dalby MJ. Multifunctional coatings and nanotopographies: Toward cell instructive and antibacterial implants. *Adv Healthc Mater*.

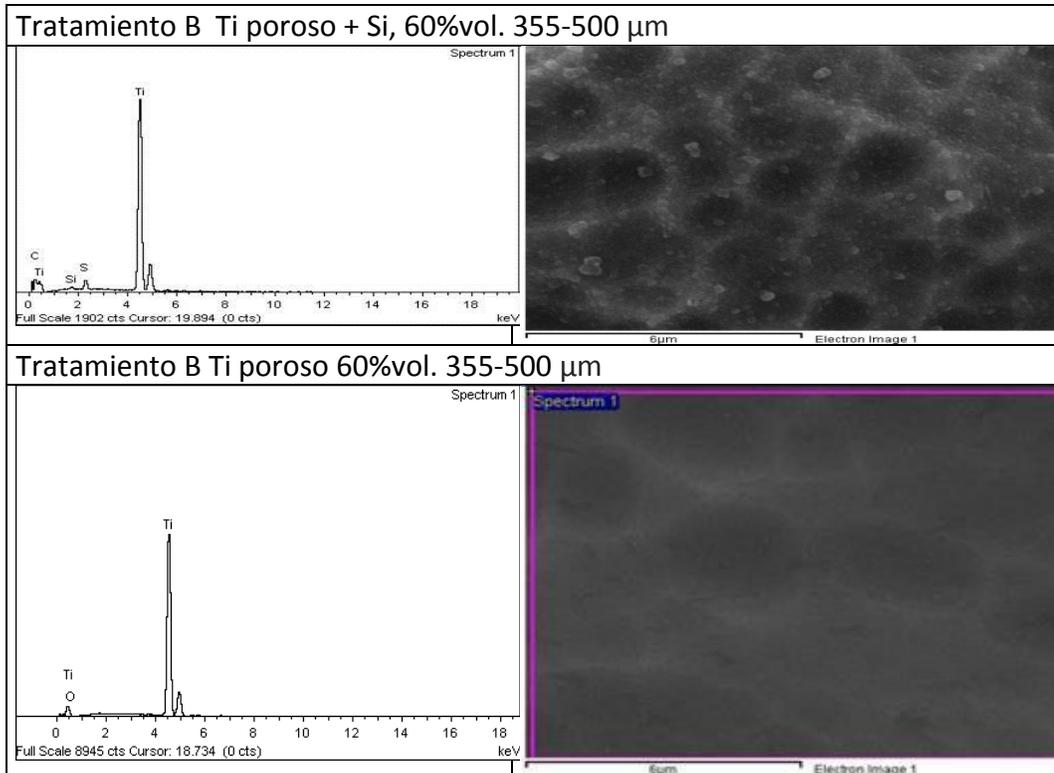
2019;8(1):1801103.

197. Min J, Choi KY, Dreaden EC, Padera RF, Braatz RD, Spector M, et al. Designer dual therapy nanolayered implant coatings eradicate biofilms and accelerate bone tissue repair. *ACS Nano*. 2016;10(4):4441–50.

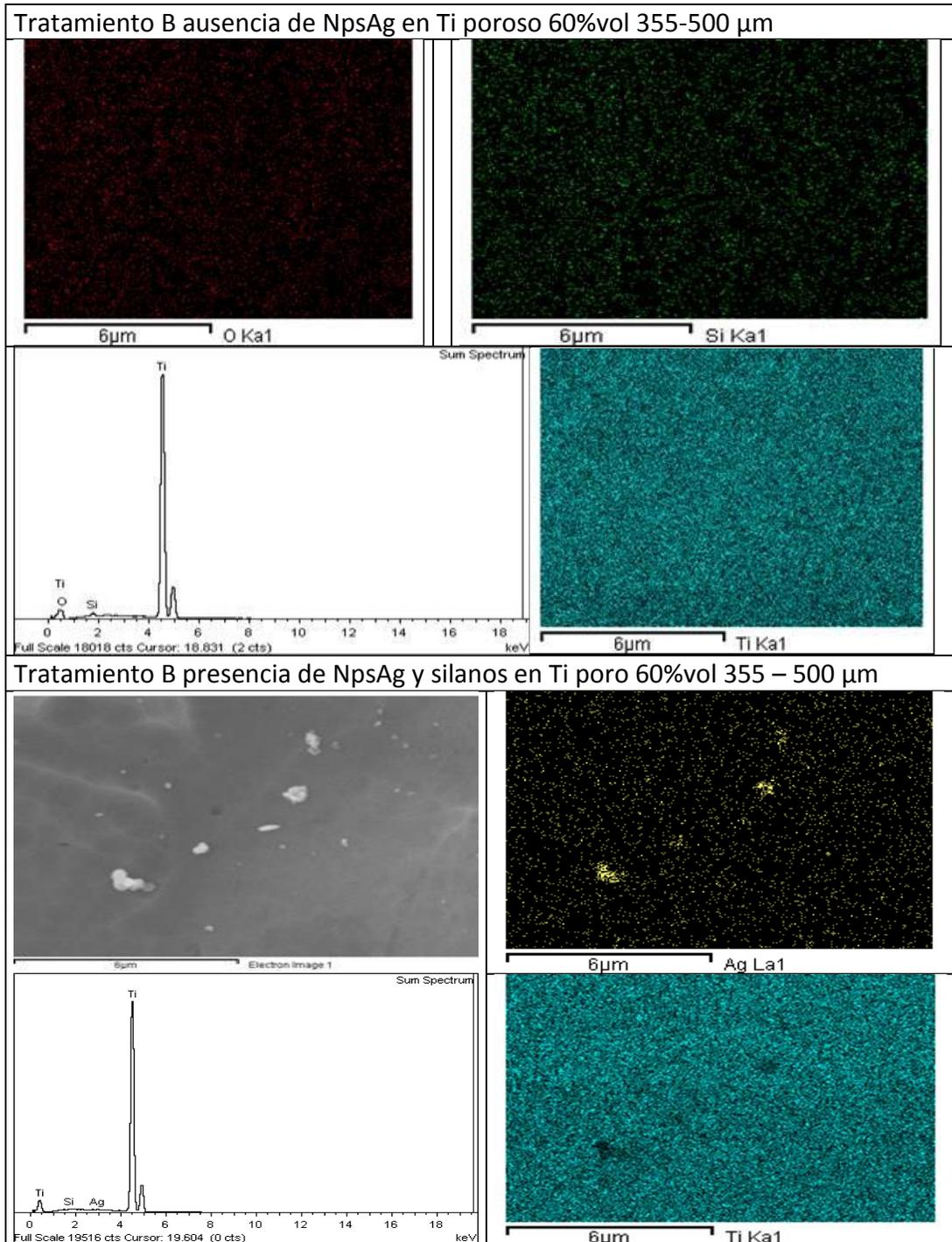
8. ANEXOS

Análisis químico elemental con la ayuda de EDS (puntual, área geometría y mapeo de elementos en línea y en zona).

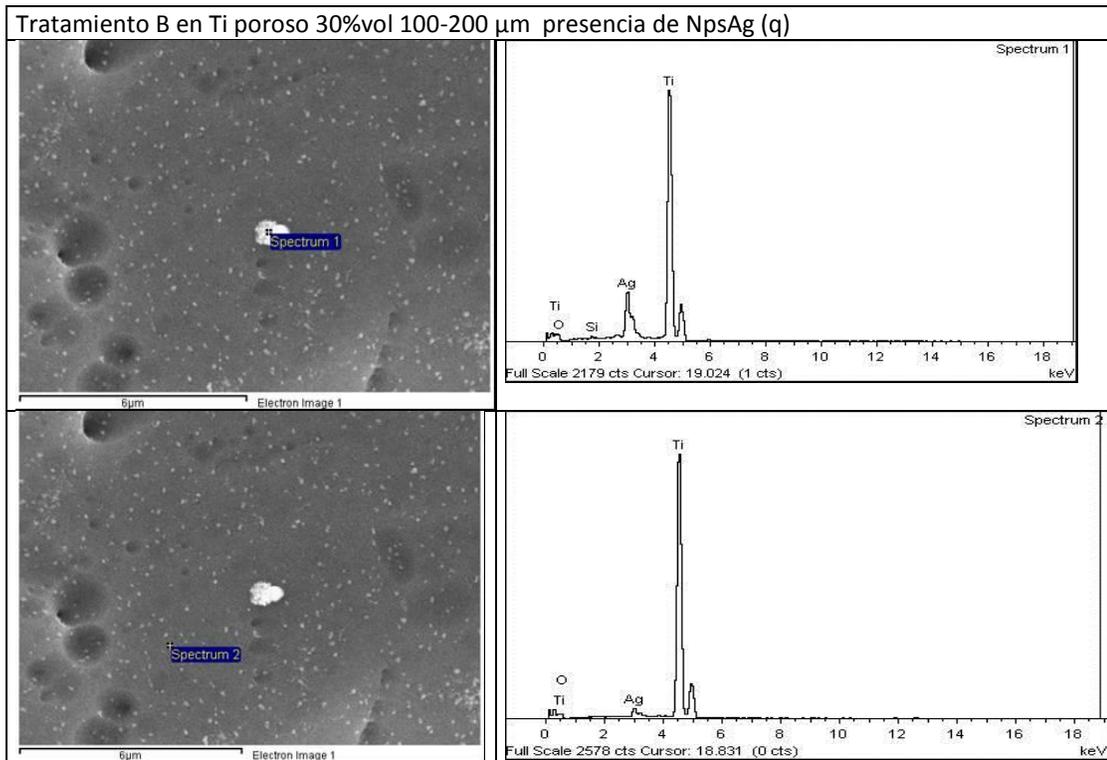
Anexo 1. Micrografías TEM de superficie de titanio grabado con "solución de piraña" tratamiento B, durante 1,5 horas a 75°C. Equivalen a las figuras blanco y negro. Los espectros son el analisis EDS que establece la presencia de Ag y silano y titanio.



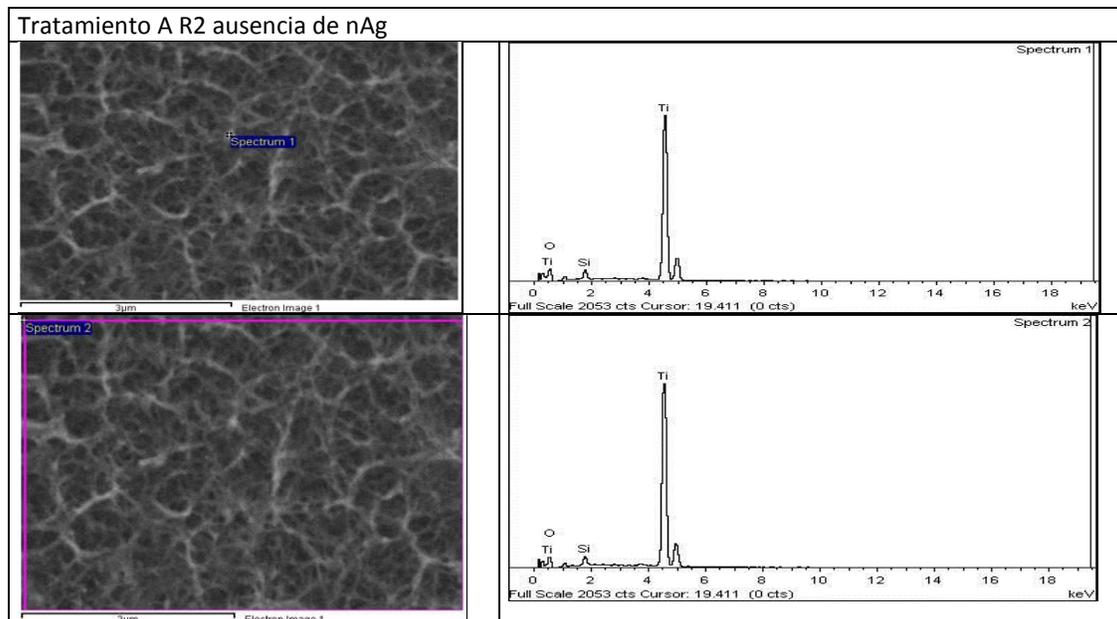
Anexo 2. Micrografías TEM de superficie de titanio grabado con "solución de piraña" tratamiento B, durante 1,5 horas a 75°C. Equivalen a las figuras blanco y negro. Figuras color Rojo (mapeo presencia de Oxígeno), verde (Titanio), amarillo (Ag) que valido presencia de Ag. Los espectros son el análisis EDS que establece la presencia de Ag y silano y titanio.



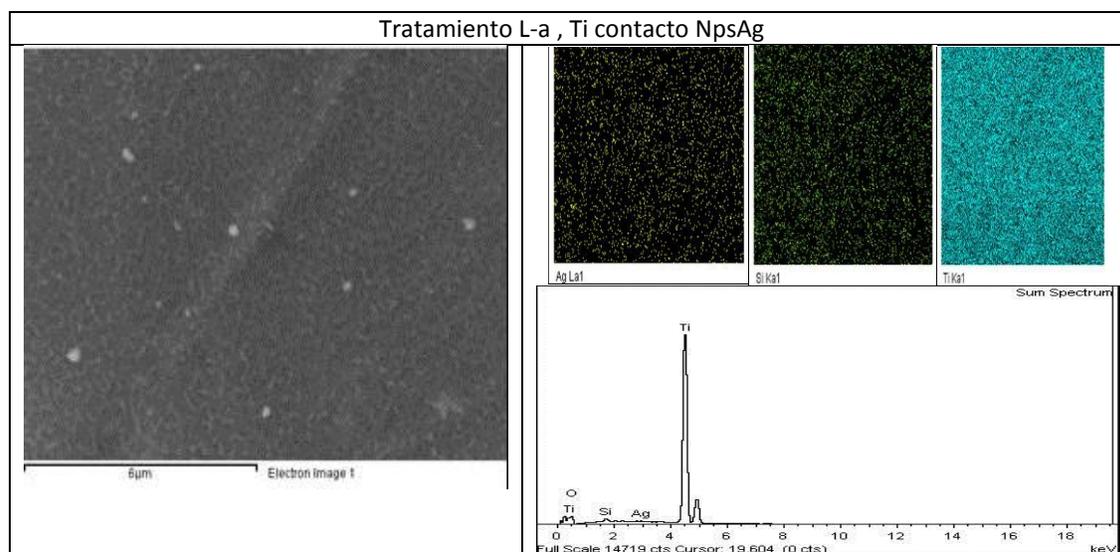
Anexo 3. Micrografías TEM micrografías de superficie de titanio poroso. Figuras izquierda, Ti grabado con "solución de piraña" tratamiento B, durante 1,5 horas a 75°C, solución de piraña: 3:7 peróxido de hidrógeno al 30%; ácido sulfúrico. Y figura de la derecha espectro EDS que establece la presencia de Ag y silanos.



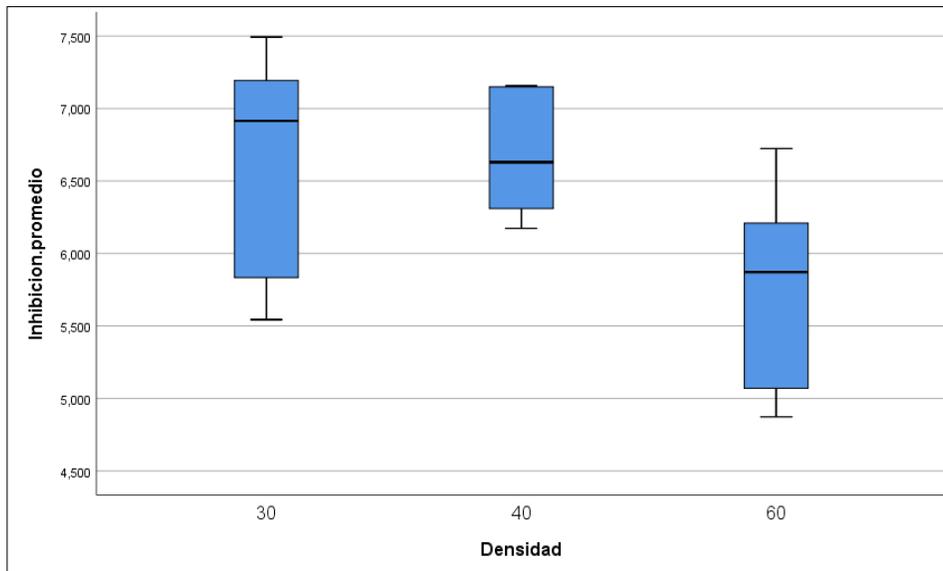
Anexo 4. Micrografías Tratamiento A: En 5M de NaOH a 60°C por 24 h, a la izquierda superficie de Ti atacada con NaOH, formación de nanoporos. Y derecha EDS identificación de presencia de la silanización del substrato de interés.



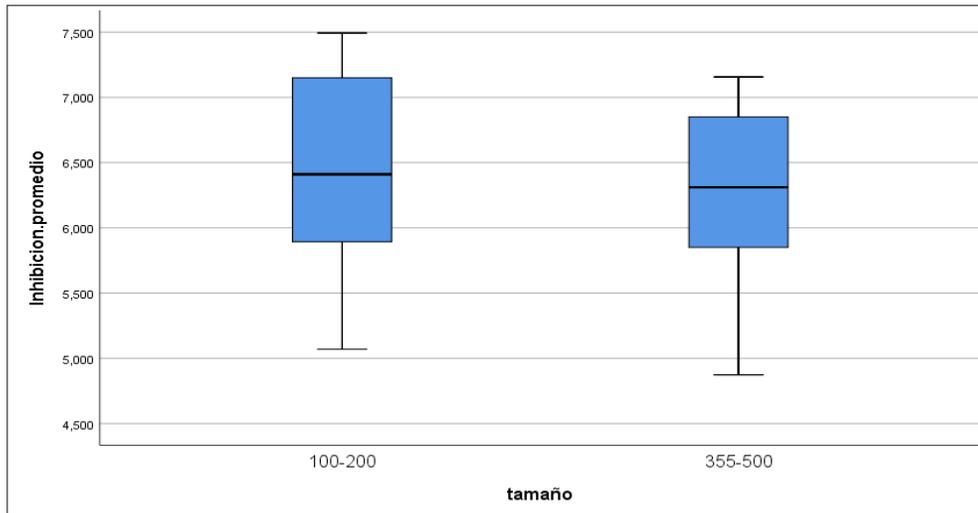
Anexo 5. Micrografías Tratamiento A: En 5M de NaOH a 60°C por 24 h, a la izquierda superficie de Ti atacada con NaOH. Y derecha EDS identificación de presencia de la silanización del substrato de interes e inmovilizacio de NpsAg.



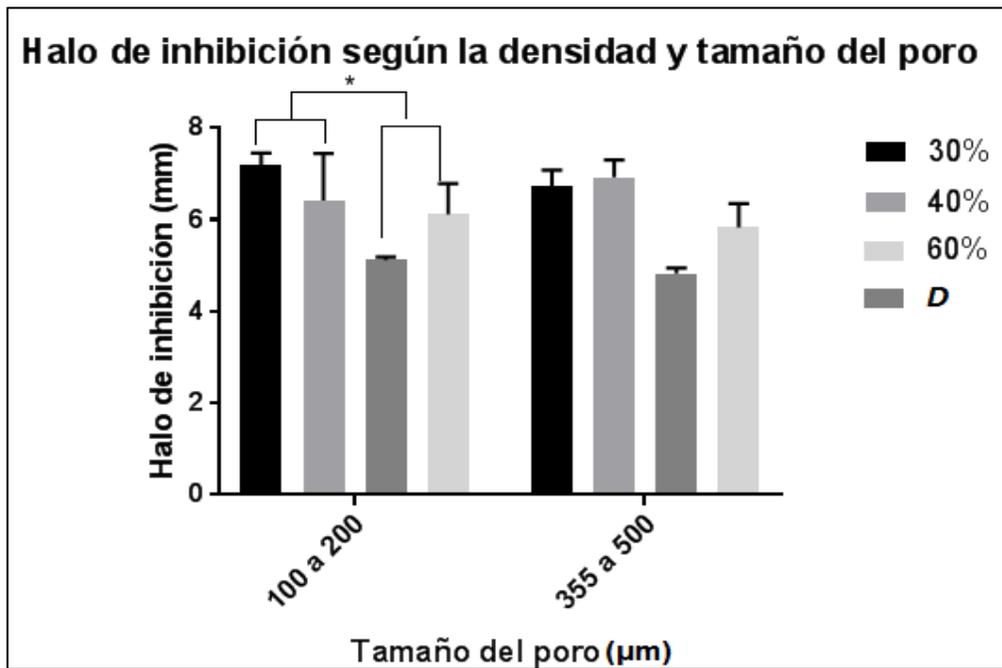
Anexo 6. Formación de Halo de Inhibición vs Porcentaje de densidad de Ti poroso.



Anexo 7. Formación de Halo de Inhibición Vs Tamaño de poro de Ti.



Anexo 8. Formación de Halo de Inhibición según propiedades intrínsecas del material



Anexo 9. Espectro de absorción UV-vis para las semillas de plata. Micrografía TEM para NpsAg

