

2020-2021
ENTREGABLE



Proyecto "MESOGEL"

**RECUBRIMIENTOS ANTIMICROBIANOS NANO Y MESOESTRUCTURADOS
PARA PRÓTESIS BASADOS EN ANODIZADO Y RECUBRIMIENTOS SOL-GEL**

ENTREGABLE: 1.1. Resumen ejecutivo de resultados

Breve descripción: resumen de resultados del proyecto

Número de proyecto: 22000054

Expediente: IMDEEA/2020/33

Duración: Del 01/07/2020 al 30/09/2021

Coordinado en AIDIMME por: MOLINA PUERTO, JAVIER

Línea de I+D: **SUPERFICIES MODIFICADAS**



**GENERALITAT
VALENCIANA**

IVACE
INSTITUTO VALENCIANO DE
COMPETITIVIDAD EMPRESARIAL



UNIÓN EUROPEA
Fondo Europeo de
Desarrollo Regional

Una manera de hacer Europa

"Proyecto cofinanciado por los Fondos FEDER,
dentro del Programa Operativo FEDER
de la Comunitat Valenciana 2014 - 2020"

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

Contenido

1. Objetivos.....	3
2. Tarea 4.1. Estado del arte sobre recubrimientos nano y mesoporosos para recubrimientos antibacterianos	3
3. Tarea 5.1. Fabricación y preparación superficial de muestras	3
4. Tarea 6.1. Anodizado de muestras	8
5. Tarea 7.1. Recubrimientos nano y mesoestructurados obtenidos mediante técnica química sol-gel	12
6. Tarea 8.1. Adsorción y reducción de Ag.....	15
7. Tarea 8.2. Incorporación de agentes bactericidas y sellado de los poros mediante puertas moleculares	23
8. Tarea 9.1. Caracterización físico-química de los recubrimientos.....	26
9. Tarea 9.2. Caracterización morfológica de los recubrimientos	28
10. Tarea 10.1. Determinación de la actividad antimicrobiana de las diferentes aplicaciones	42

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

1. Objetivos

El objetivo del proyecto es desarrollar recubrimientos nano y mesoestructurados con funcionalidad antibacteriana sobre prótesis de TiAl6V4 para reducir la incidencia de la infección de prótesis articular.

El objetivo general se consigue a partir de los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar el mejor tratamiento superficial para que el recubrimiento quede fijado adecuadamente sobre la superficie de las piezas metálicas.
2. Desarrollo de recubrimientos de nanotubos de TiO₂ mediante la técnica de anodizado.
3. Desarrollo de recubrimientos nano y mesoestructurados mediante la técnica de sol-gel.
4. Introducción de agentes bactericidas en los poros generados.
5. Evaluación de la liberación de Ag⁺ (u otros agentes bactericidas) con el tiempo para determinar su posible eficacia bactericida. Se pretende conseguir una liberación progresiva y prolongada de Ag⁺, de tal manera que el efecto bactericida permanezca durante más de 30 días.
6. Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana de los recubrimientos frente a Staphylococcus aureus y Staphylococcus epidermidis.
7. Evaluar el mejor método de síntesis de los recubrimientos entre varias rutas de síntesis sol-gel.

A continuación, se muestra un resumen de las diferentes tareas técnicas desarrolladas durante el desarrollo del proyecto.

2. Tarea 4.1. Estado del arte sobre recubrimientos nano y mesoporosos para recubrimientos antibacterianos

Se ha realizado un estudio del estado del arte sobre la obtención de recubrimientos de nano y mesoporosos para recubrimientos antibacterianos basados en técnicas de anodizado y técnicas sol-gel.

3. Tarea 5.1. Fabricación y preparación superficial de muestras

Se han fabricado **piezas de Ti6Al4V mediante fabricación aditiva**. Para ello se ha empleado la técnica de EBM (electron beam melting; fusión por haz de electrones).

Inicialmente se fabricaron dos tipos de pieza:

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

- Piezas macizas con un cilindro para realizar la conexión eléctrica.
- Piezas con malla porosa y con un cilindro para realizar la conexión eléctrica.

En la Figura 1 se muestra el diseño de las piezas con malla porosa y con un cilindro para realizar la conexión eléctrica durante el anodizado. El diseño de las piezas macizas es igual por lo que respecta a las dimensiones.



Figura 1. Diseño de piezas con malla porosa.

En la Figura 2 se muestran imágenes de las probetas macizas y porosas obtenidas mediante fabricación aditiva.



Figura 2. Detalle de las probetas de Ti6Al4V (macizas y porosas) con cilindro para conexión; probetas obtenidas mediante fabricación aditiva.

Por otra parte se obtuvieron cilindros macizos de Ti6Al4V a partir del corte de barra de Ti. En unos cilindros se aplicó un roscado para realizar la conexión eléctrica y realizar el anodizado. Otros cilindros no fueron roscados y se cortaron para obtener probetas para ser recubiertas mediante las técnicas sol-gel. En la Figura 3 se muestra una fotografía de la operación de corte de la barra de Ti en segmentos más pequeños. Posteriormente estos segmentos más pequeños son mecanizados empleando un torno para hacer la superficie lo más plana posible. En la Figura 4 se muestra una imagen del mecanizado de las piezas obtenidas.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel



Figura 3. Operación de corte de la barra de Ti6Al4V en segmentos más pequeños.



Figura 4. Operación de mecanizado de las barras de Ti empleando un torno.

Finalmente se realizó un roscado en algunas de las piezas para poder llevar a cabo de forma adecuada el proceso de anodizado sobre las piezas de Ti6Al4V. En la Figura 5 se muestra una imagen de la operación de roscado sobre las barras de Ti6Al4V.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

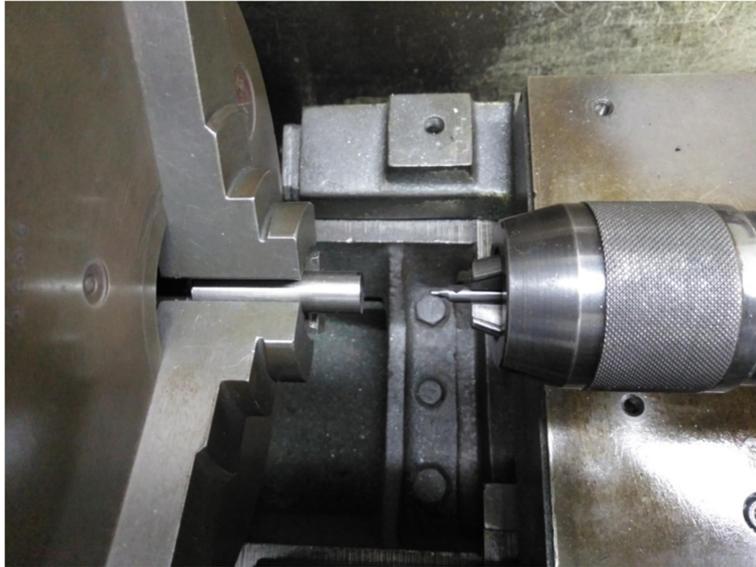


Figura 5. Operación de roscado de las barras de Ti empleando un macho para Ti.

Los cilindros no roscados fueron cortados con una máquina de cortar para obtener probetas. En la Figura 6 se muestra el equipo con el que fueron cortadas las probetas.

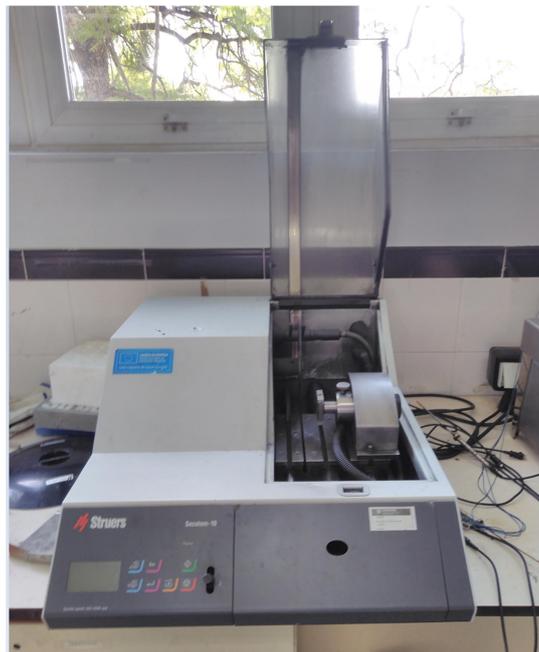


Figura 6. Cortadora empleada para obtener probetas de Ti6Al4V.

En la Figura 7 se muestran las probetas de Ti6Al4V obtenidas mediante el corte de los cilindros de 12 mm de diámetro.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel



Figura 7. Probetas de Ti6Al4V obtenidas tras cortar las muestras y realizar un pulido.

Por lo que respecta a la preparación superficial de muestras se ha realizado un pulido con papel de pulido de diferentes tamaños de grano. Con esta preparación se ha llegado a un pulido espejo de forma que la superficie del metal sea lo más plana posible. En la Figura 8 se muestra una imagen de la pulidora empleada. En la Figura 9 se muestra el pulido a espejo en una de las probetas.



Figura 8. Pulidora empleada para pulir las muestras de Ti6Al4V.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

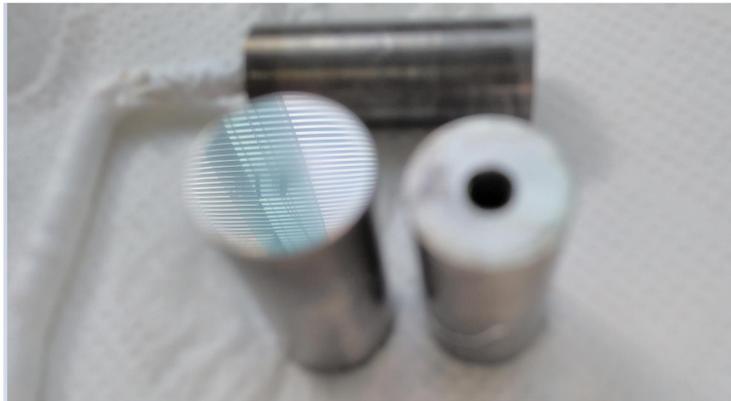


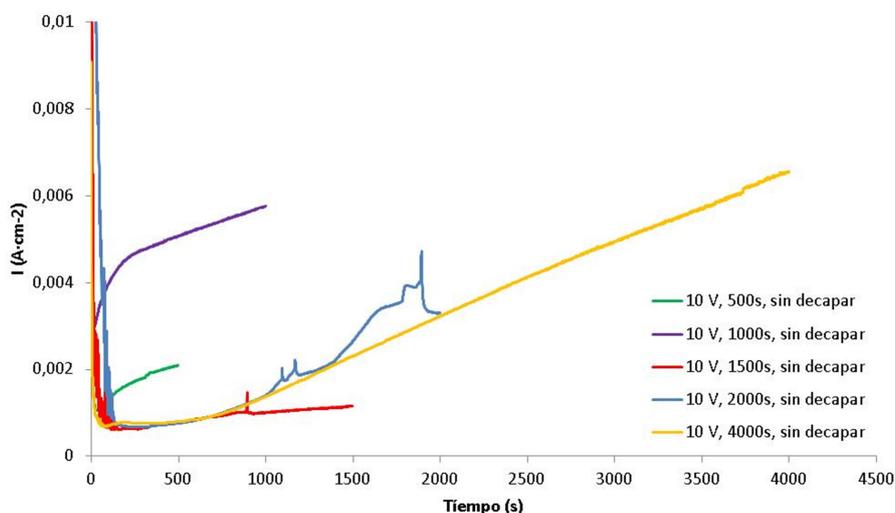
Figura 9. Detalla del pulido a espejo de las probetas, donde se puede observar reflejada la ventana.

4. Tarea 6.1. Anodizado de muestras

Para realizar el anodizado se empleó un potenciostato/galvanostato y un criotermostato con una celda electroquímica encamisada para controlar la temperatura de anodizado que tiene una gran influencia sobre el proceso de anodizado. Se empleó una configuración de 2 electrodos para realizar el anodizado.

A continuación se muestran algunos ejemplos de curvas de anodizado obtenidas.

En la Figura 10 se muestran las curvas cronoamperométricas obtenidas para las piezas macizas de Ti6Al4V. En el gráfico se representan las curvas obtenidas al emplear diferentes tiempos de anodizado. En todos los casos se observa una disminución inicial de la densidad de corriente para posteriormente incrementarse con el tiempo de anodizado. En la Figura 11 se muestran las curvas cronoamperométricas sobre muestras macizas de Ti a las cuales se les ha realizado un decapado previo. Se puede observar un comportamiento similar que en el caso de no realizar el decapado.



“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

Figura 10. Curvas cronoamperométricas de anodizado de piezas macizas de Ti6Al4V sin decapar. Potencial de anodizado de 10 V en disolución de anodizado. Tiempo de anodizado de 500 s, 1000 s, 1500 s, 2000 s y 4000 s.

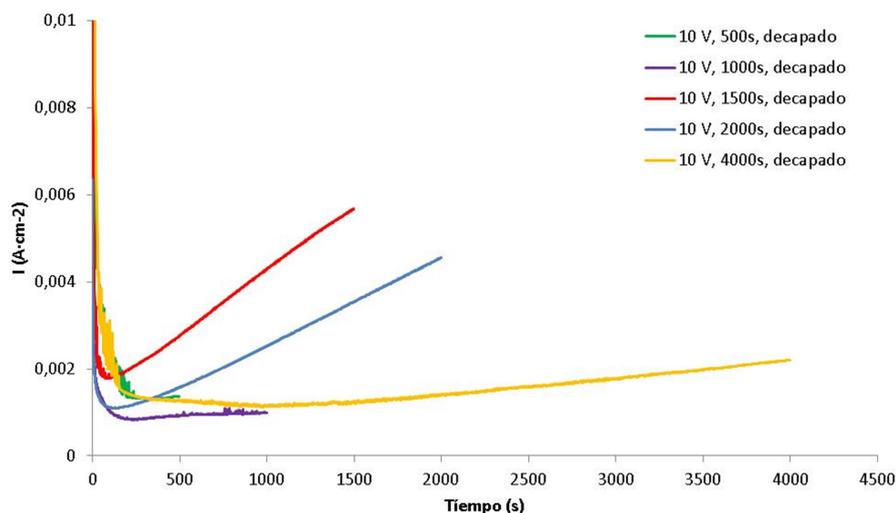


Figura 11. Curvas cronoamperométricas de anodizado de piezas macizas de Ti6Al4V decapadas. Potencial de anodizado de 10 V en disolución de anodizado. Tiempo de anodizado de 500 s, 1000 s, 1500 s, 2000 s y 4000 s.

En las Figuras 12 y 13 se muestran la curvas cronoamperométricas para las piezas macizas y porosas obtenidas mediante fabricación aditiva, respectivamente. Se puede observar el mismo comportamiento que para los casos anteriores.

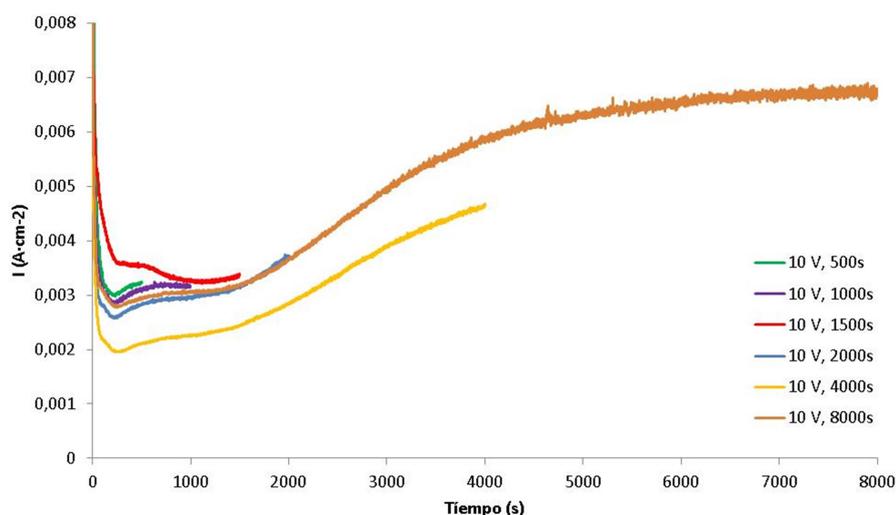


Figura 12. Curvas cronoamperométricas de anodizado de piezas macizas de Ti6Al4V obtenidas mediante FA sin decapar. Potencial de anodizado de 10 V en disolución de anodizado. Tiempo de anodizado de 500 s, 1000 s, 1500 s, 2000 s, 4000 s y 8000 s.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

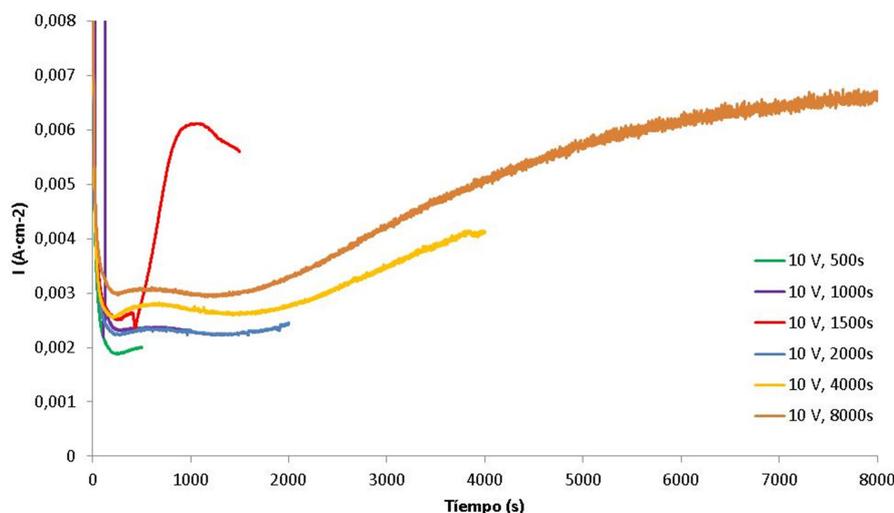


Figura 13. Curvas cronoamperométricas de anodizado de piezas porosas de Ti6Al4V obtenidas mediante FA sin decapar. Potencial de anodizado de 10 V en disolución de anodizado. Tiempo de anodizado de 500 s, 1000 s, 1500 s, 2000 s, 4000 s y 8000 s.

Con el anodizado a 10 V sobre las piezas macizas (tanto decapadas como no decapadas) no se consiguió la formación de los nanotubos de TiO₂ como pudo observarse mediante microscopía electrónica de emisión de campo (FESEM). Por ello se emplearon potenciales mayores de anodizado (20 V y 30 V). En la Figura 14 se muestra el efecto de emplear diferentes potenciales de anodizado (10 V, 20 V y 30 V) y tiempos de anodizado (2000 s y 4000 s) sobre las curvas cronoamperométricas. Se puede observar que cuando se emplea un mayor potencial, la densidad de corriente del proceso de anodizado aumenta.

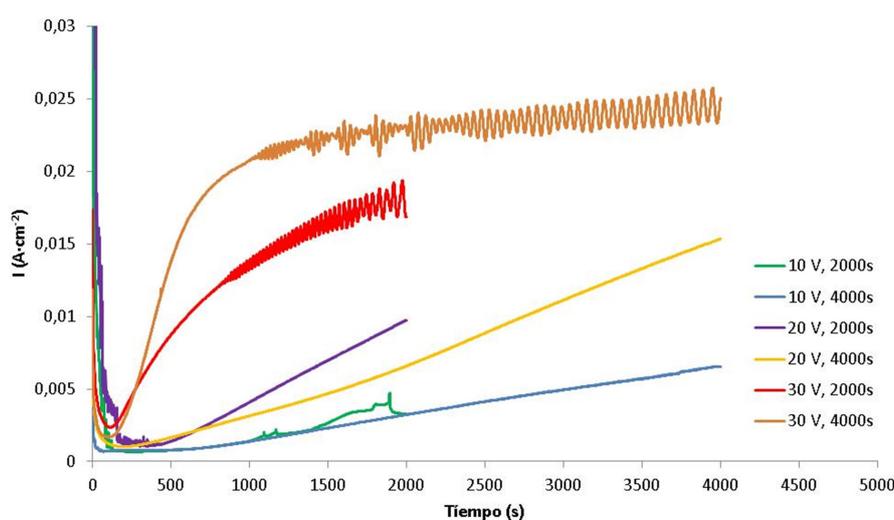


Figura 14. Curvas cronoamperométricas de anodizado de piezas macizas de Ti6Al4V sin decapar. Potencial de anodizado de 10 V, 20 V y 30 V en disolución de anodizado. Tiempo de anodizado de 2000 s y 4000 s.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

Con las piezas macizas obtenidas mediante fabricación aditiva sí que se consiguió la obtención de los nanotubos de TiO_2 con un potencial de anodizado de 10 V. Adicionalmente se probó el efecto de emplear un mayor potencial de anodizado (20 V y 30 V) sobre el proceso de anodizado. En la Figura 15 se muestran las diferentes curvas cronoamperométricas. En general, se observa un aumento de la densidad de corriente del proceso con el potencial de anodizado.

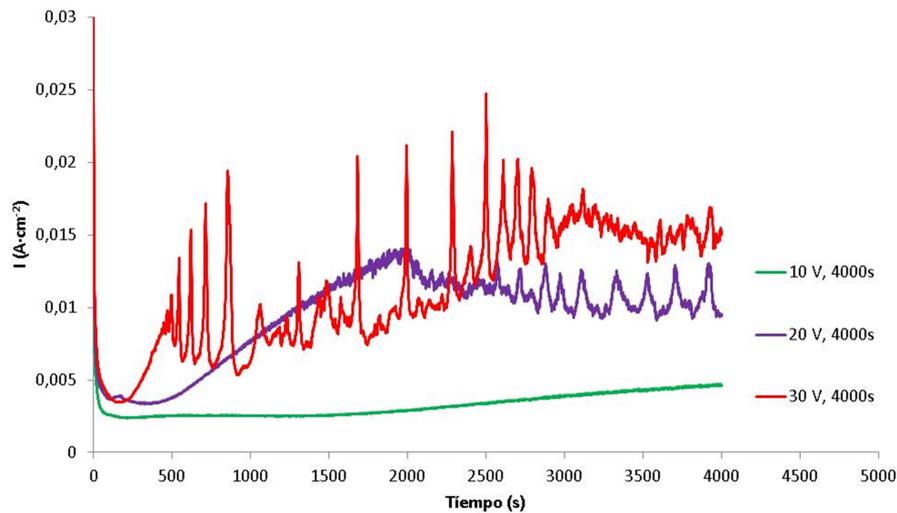


Figura 15. Curvas cronoamperométricas de anodizado de piezas macizas de $Ti6Al4V$ obtenidas mediante FA sin decapar. Potencial de anodizado de 10 V, 20 V y 30 V en disolución de anodizado. Tiempo de anodizado de 4000 s.

En la Figura 16 se muestra una imagen del aspecto de las probetas de $Ti6Al4V$ obtenidas mediante fabricación aditiva (macizas y porosas) y anodizadas con diferentes tiempos, en la imagen se muestra el valor del tiempo de anodizado (de izquierda a derecha 8000 s, 4000 s, 2000 s, 1500 s, 1000 s, 500 s). Se puede observar que a menores tiempos de anodizado el color es más intenso y se va perdiendo a medida que aumenta el tiempo de anodizado. Ello puede ser debido a que inicialmente se produce un crecimiento de la capa de óxidos y posteriormente con el mayor tiempo de anodizado se consigue la nanoestructuración del mismo.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel



Figura 16. Fotos de las probetas de Ti6Al4V obtenidas mediante fabricación aditiva (macizas y porosas) y anodizadas durante 500 s, 1000 s, 1500 s, 2000 s, 4000 s y 8000 s.

Una vez optimizado el proceso de anodizado de las piezas de Ti6Al4V se procedió a realizar un tratamiento térmico para eliminar los productos de oxidación que quedan dentro de los poros, además se produce la cristalización del TiO₂ desde una estructura amorfa a la estructura cristalina anatasa.

5. Tarea 7.1. Recubrimientos nano y mesoestructurados obtenidos mediante técnica química sol-gel

Obtención de recubrimientos mesoestructurados de SiO₂

Para la obtención de recubrimientos mesoestructurados de SiO₂ se emplearon formulaciones sol-gel a partir de precursores organosilánicos y un agente formado de poro que posteriormente es eliminado mediante un tratamiento térmico para generar los mesoporos en los recubrimientos sol-gel.

Tras la etapa de síntesis se realizó una caracterización del tamaño de partícula de la formulación. En la Figura 17 se muestra la distribución en intensidad y en la Figura 18 se muestra la distribución en función del número de partículas. El tamaño promedio en función del número de partículas sería de unos 3.6 nm.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

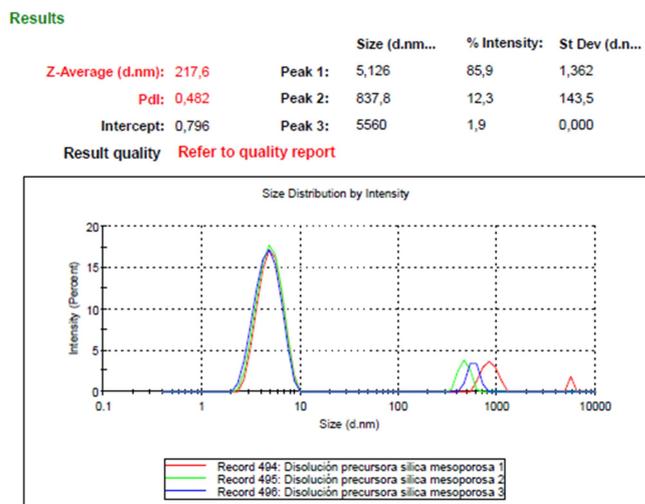


Figura 17. Caracterización mediante DLS de la disolución de síntesis de los recubrimientos mesoestructurados. Distribución de tamaño en función de la intensidad. t=0h tras completar la síntesis.

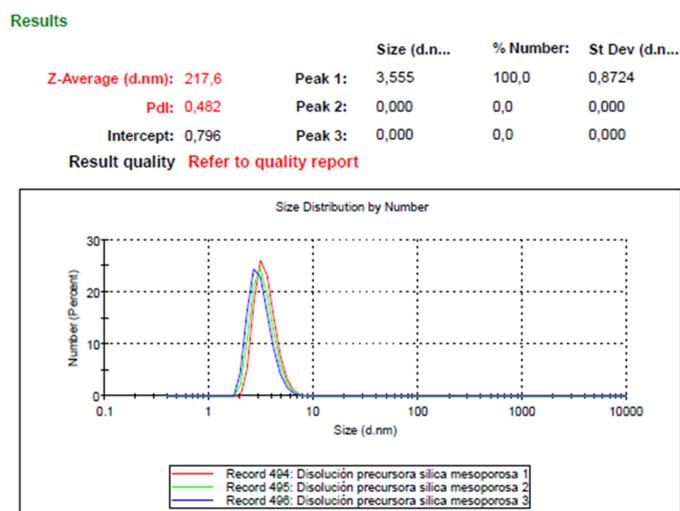


Figura 18. Caracterización mediante DLS de la disolución de síntesis de los recubrimientos mesoestructurados. Distribución de tamaño en función del número de partículas. t=0h tras completar la síntesis.

Una vez obtenida la formulación se obtuvo un recubrimiento mediante dip-coating sobre las piezas de Ti6Al4V mediante tecnología sol-gel. En la Figura 19 se muestra una fotografía de una de las probetas recubiertas con el sol-gel mesoestructurado.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel



Figura 19. Imagen de probetas de Ti6Al4V recubiertas con un recubrimiento mesoestructurado de sol-gel de Si.

Obtención de recubrimientos mesoestructurados de hidroxiapatita

Para la obtención de recubrimientos mesoestructurados de hidroxiapatita se emplearon precursores inorgánicos para generar una disolución sol-gel para generar los recubrimientos.

En la Figura 20 se muestra el proceso de síntesis del sol-gel de hidroxiapatita mesoporosa.

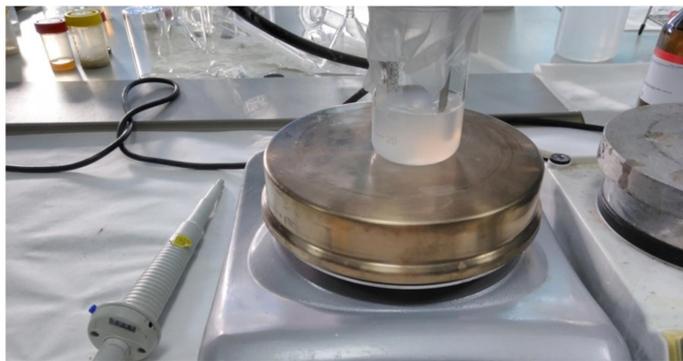


Figura 20. Proceso de obtención de la formulación sol-gel de hidroxiapatita mesoporosa. Temperatura de síntesis: 40°C.

Las muestras fueron recubiertas empleando un dip-coater y el mismo programa de inmersión empleado para recubrir las probetas con sílica mesoporosa (Figura 21).

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

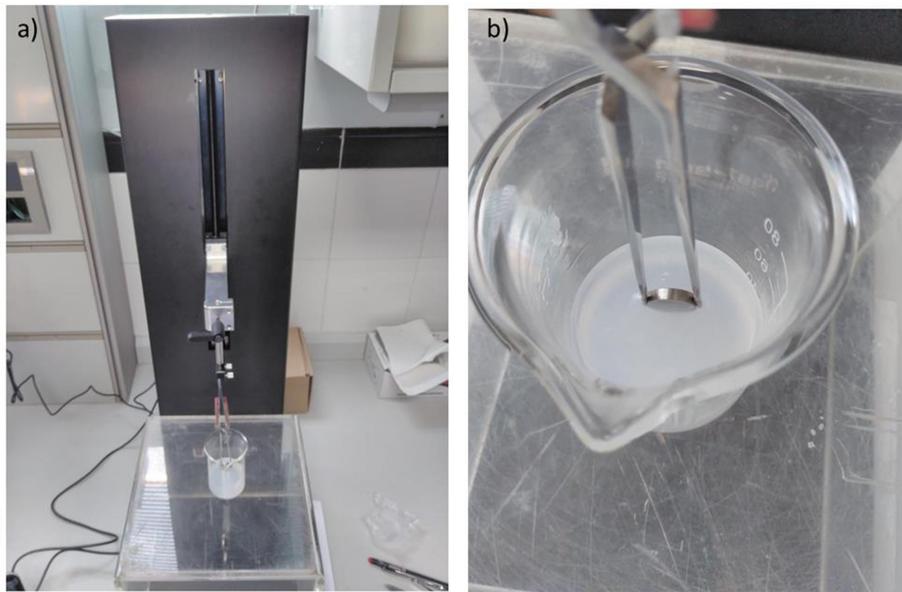


Figura 21. Proceso de recubrimiento de probetas de Ti6Al4V con hidroxiapatita mesoporosa empleando la técnica de dip-coating.

En la Figura 22 se muestra una imagen de las probetas recubiertas con hidroxiapatita mesoporosa.



Figura 22. Imagen de probetas de Ti6Al4V recubiertas con hidroxiapatita mesoporosa.

6. Tarea 8.1. Adsorción y reducción de Ag

Tarea 8.1. Adsorción y reducción de Ag⁺.

Para llevar a cabo la síntesis de las nanopartículas de Ag sobre las muestras nano y mesoestructuradas se emplearon los siguientes métodos de síntesis:

- Métodos químicos.
- Métodos térmicos.
- Métodos electroquímicos.

Métodos químicos de síntesis de nanopartículas de plata

Para llevar a cabo la adsorción de Ag⁺ en los poros de las muestras de Ti6Al4V se empleó una disolución de plata amoniacal.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

Las muestras (tanto de Ti anodizado como de sílica mesoporosa) fueron recubiertas mediante inmersión de las probetas en la disolución precursora de Ag. El tiempo de inmersión empleado fue de 30 minutos.

Posteriormente se realizó un proceso de reducción para convertir el complejo $[Ag(NH_3)_2]^+$ a nanopartículas de plata.



Figura 23. Proceso de recubrimiento con $[Ag(NH_3)_2]^+$ de probetas de Ti6Al4V obtenidas mediante fabricación aditiva.

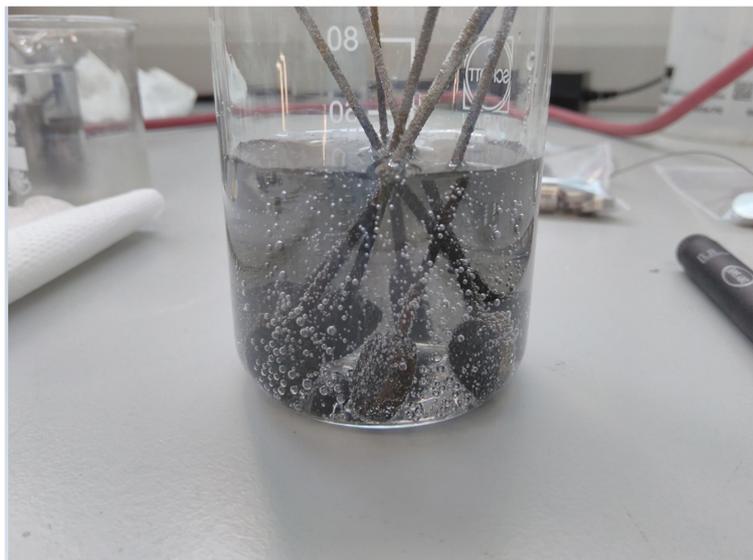


Figura 24. Proceso de reducción de las probetas recubiertas con $[Ag(NH_3)_2]^+$ empleando $NaBH_4$ 0.05 M como reductor.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

En la Figura 25 se muestran las muestras de Ti6Al4V anodizadas y recubiertas con nanopartículas de Ag obtenidas a partir de la reducción de $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ a nanopartículas de Ag mediante la reducción empleando NaBH_4 .



Figura 25. Probetas de Ti6Al4V obtenidas mediante fabricación aditiva y anodizadas con diferentes tiempos de anodizado (500 s, 1000 s, 1500 s, 2000 s, 4000 s, 8000 s, 16000 s) a 10 V y recubiertas con nanopartículas de Ag obtenidas mediante la reducción de $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ empleando NaBH_4 como reductor.

Para asegurar que no existe ninguna especie que pueda quedar retenida en el interior de los nanotubos e impida la penetración de la plata amoniacal $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ se realizó un tratamiento térmico a 450°C para asegurar su eliminación.

Mediante la reducción con NaBH_4 no se consiguió la incorporación de las nanopartículas de Ag en el interior de los nanotubos de TiO_2 ni en el interior de la sílica mesoporosa. Parece ser que el NaBH_4 no es capaz de penetrar en el interior de los nanotubos y en los mesoporos y no se lleva a cabo correctamente la reducción de la Ag^+ a Ag. El NaBH_4 se descompone y forma hidrógeno que es el reductor.

Adicionalmente se realizó otro experimento para corroborar si la reducción con NaBH_4 es adecuada o no. Para ello tras la adsorción de $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ se dejaron secar las muestras del todo, mejorando así la adhesión de $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$. Tras esta etapa se realizó la reducción con NaBH_4 con las mismas condiciones usadas anteriormente.

Métodos térmicos de síntesis de nanopartículas de plata

Como alternativa al método químico de reducción se empleó un método térmico para conseguir la reducción de $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ a Ag. Tras la etapa de adsorción de $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ se realizó

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

un tratamiento térmico a 550°C durante 2h. El tratamiento térmico consigue la descomposición del complejo y que solo quede la Ag en forma de nanopartículas de Ag.

En la Figura 26 se compara la apariencia de las probetas de fabricación aditiva de Ti6Al4V; la probeta de la derecha está anodizada y tratada térmicamente a 450°C durante 2 h. En la probeta central además del tratamiento de anodizado se ha adsorbido $[Ag(NH_3)_2]^+$ durante 30 minutos y se ha realizado un tratamiento de reducción con $NaBH_4$. En la probeta de la izquierda se adsorbió $[Ag(NH_3)_2]^+$ durante 30 min y posteriormente se realizó un tratamiento de reducción térmica a 550°C durante 2h.



Figura 26. Probetas de Ti6Al4V obtenidas mediante fabricación aditiva y anodizadas durante 4000 s a 10 V y tratadas térmicamente a 450°C durante 2h (izquierda); pieza anodizada y recubierta con nanopartículas de Ag obtenidas mediante la adsorción de $[Ag(NH_3)_2]^+$ durante 30 min y posterior reducción mediante $NaBH_4$ (centro); y pieza anodizada y recubierta con nanopartículas de Ag obtenidas mediante la adsorción de $[Ag(NH_3)_2]^+$ durante 30 min y posterior reducción térmica a 550 °C durante 2h (derecha).

En la Figura 27 se muestra una imagen de la apariencia de las probetas de sílica mesoporosa recubiertas con Ag generada mediante un tratamiento térmico.



Figura 27. Probetas de Ti6Al4V recubiertas con sílica mesoporosa (derecha) y recubierta con sílica mesoporosa con nanopartículas de Ag obtenidas mediante la adsorción de $[Ag(NH_3)_2]^+$ durante 30 min y posterior reducción térmica a 550 °C durante 2h.

Métodos electroquímicos de síntesis de nanopartículas de Ag

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

Se emplearon también técnicas electroquímicas para la reducción de Ag^+ a nanopartículas de Ag. Para ello se empleó una disolución de plata amoniacal con la misma composición que la empleada en las otras técnicas. En la Figura 28 se muestra el montaje experimental empleado en los experimentos de síntesis electroquímica de nanopartículas de Ag. Se empleó una caja de Faraday para evitar la interferencia de ruido eléctrico proveniente del exterior. Se empleó una celda troncocónica donde se introduce la disolución. Se empleó una configuración de 3 electrodos, donde el electrodo de trabajo es la muestra de Ti anodizado, un electrodo de Pt se emplea como contraelectrodo y un electrodo de referencia de Ag/AgCl completa el montaje experimental.

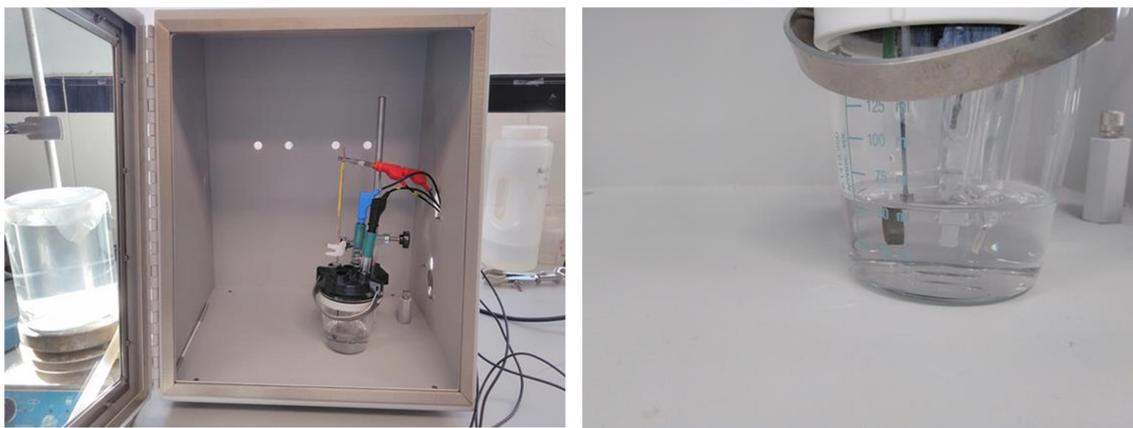


Figura 28. Montaje experimental empleado en los experimentos de síntesis electroquímica.

En los experimentos de síntesis electroquímica, primero se realizó un experimento de voltametría cíclica para determinar los potenciales más adecuados para llevar a cabo las síntesis electroquímica mediante salto potencioestático. Mediante la técnica de voltametría cíclica se varía el potencial entre unos potenciales determinados, el número de barridos deseado. En el caso de la reducción de Ag^+ a Ag interesa sobre todo el proceso de reducción, por lo que el barrido empieza desde potenciales positivos a potenciales negativos.

En la Figura 29 se muestra el primer barrido de síntesis en el sentido catódico. Se puede observar que inicialmente la densidad de corriente a potenciales más altos es muy baja. A partir de 0.1 V empieza a incrementarse la densidad de corriente, lo que puede ser atribuido a la reducción de Ag^+ para formar nanopartículas de Ag. A partir de este voltagrama se eligieron 3 posibles potenciales de síntesis para llevar a cabo la síntesis de nanopartículas de Ag mediante salto potencioestático. Dado que interesa obtener nanopartículas de pequeño tamaño se eligieron potenciales a los cuales la síntesis es más lenta (0.1 V, 0.05 V y 0 V).

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

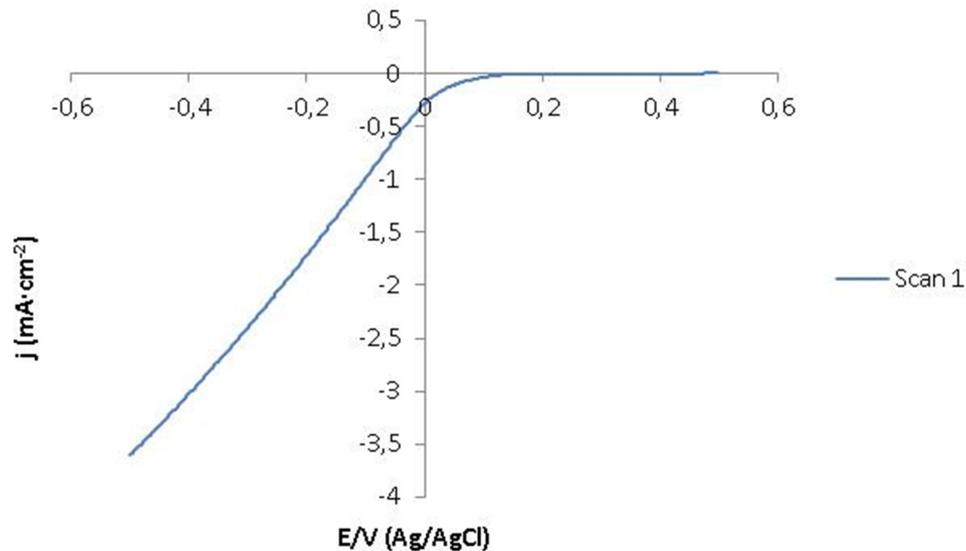


Figura 29. Primer voltograma de síntesis de nanopartículas de Ag sobre probetas de fabricación aditiva macizas anodizadas a 10 V durante 4000 s. Medio de síntesis: 50 mM AgNO_3 + NH_3 .

En la Figura 30 se muestran los 5 primeros voltagramas de síntesis, donde se puede observar una respuesta resistiva del electrodo, causada para la elevada resistencia de la capa anódica de óxidos. Con el aumento del número de barrido se observa un incremento progresivo de la densidad de corriente, debido a la mayor deposición de nanopartículas de Ag y al incremento de área activa electroquímica.

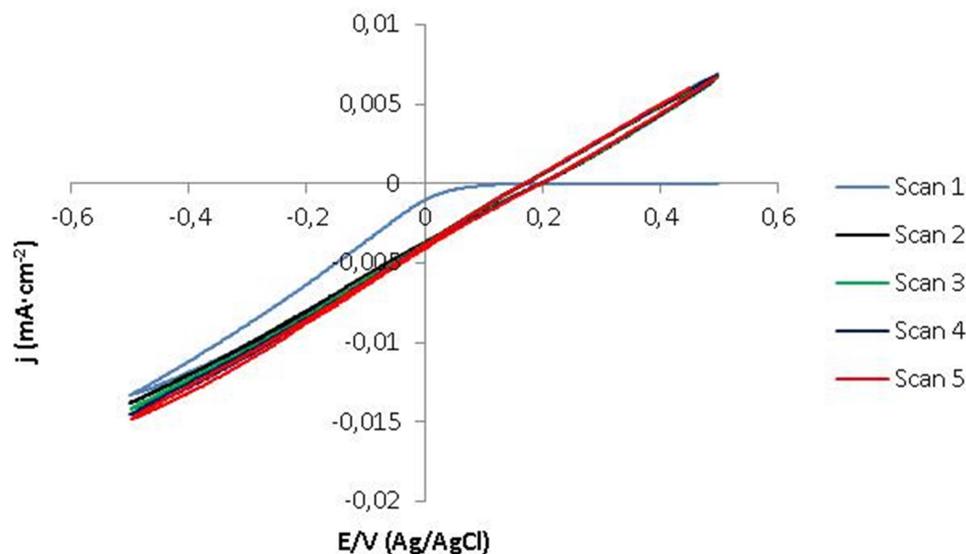


Figura 30. Voltagramas de síntesis de nanopartículas de Ag sobre probetas de fabricación aditiva macizas anodizadas a 10 V durante 4000 s. Medio de síntesis: 50 mM AgNO_3 + NH_3 .

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

En la Figura 31 se muestran los cronoamperogramas de síntesis llevados a cabo a los diferentes potenciales de síntesis (0.1 V, 0.05 V y 0 V). En los tres casos se llevó a cabo la síntesis hasta una carga eléctrica de 0.1 C, que equivaldría a $30 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ de Ag depositada a partir de la ley de Faraday:

$$m_{\text{Ag}} = Q \cdot M_r / n \cdot F$$

Donde:

Q es la carga eléctrica pasada durante la síntesis (0.1 C).

Mr es el peso atómico de la Ag: $107.87 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

n es el número de electrones transferidos en la reacción de reducción de la Ag^+ a Ag, que sería 1 electrón.

F es la constante de Faraday: $96485.3 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Por tanto:

$$m_{\text{Ag}} = 0.1 \text{ C} \cdot 107.87 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} / 1 \cdot 96485.3 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1} = 0.111 \text{ mg Ag}$$

Dividiendo la masa de Ag depositada entre el área de las probetas (3.7 cm^2):

$$\text{Carga Ag/cm}^2 = 0.111 \text{ mg Ag} / 3.7 \text{ cm}^2 = 30 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}.$$

En la Figura 31 se puede observar como a un menor potencial de síntesis se finaliza el proceso de síntesis antes, al obtener una mayor densidad de corriente de síntesis y por tanto llegar antes a la carga de síntesis de 0.1 C. Esto se puede observar mejor en la Figura 32, donde se representa la carga eléctrica en función del tiempo de síntesis.

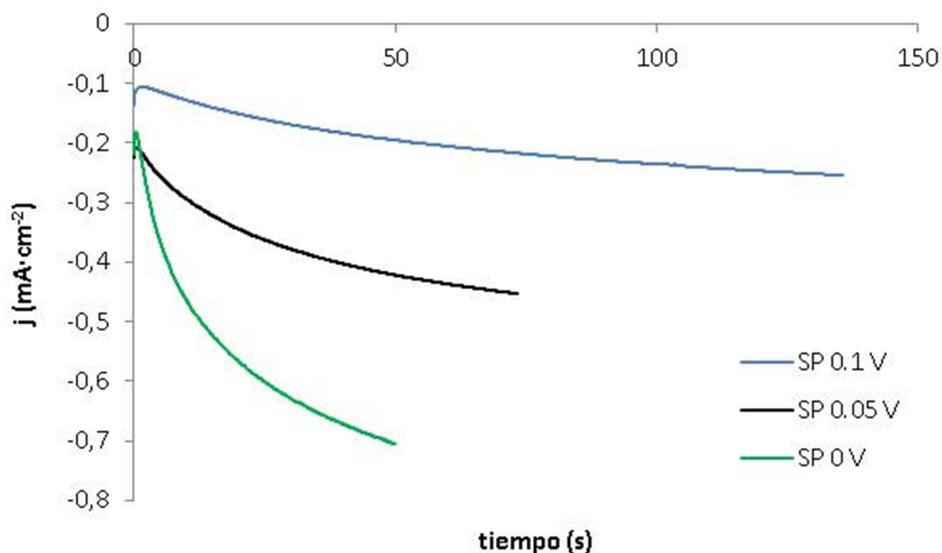


Figura 31. Cronoamperogramas de síntesis de nanopartículas de Ag sobre probetas de fabricación aditiva macizas anodizadas a 10 V durante 4000 s. Potenciales de síntesis: 0.1 V,

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

0.05 V y 0 V. Medio de síntesis: 50 mM AgNO₃ + NH₃. Carga de síntesis: 0.1 C·cm⁻², equivalente a 30 µg·cm⁻².

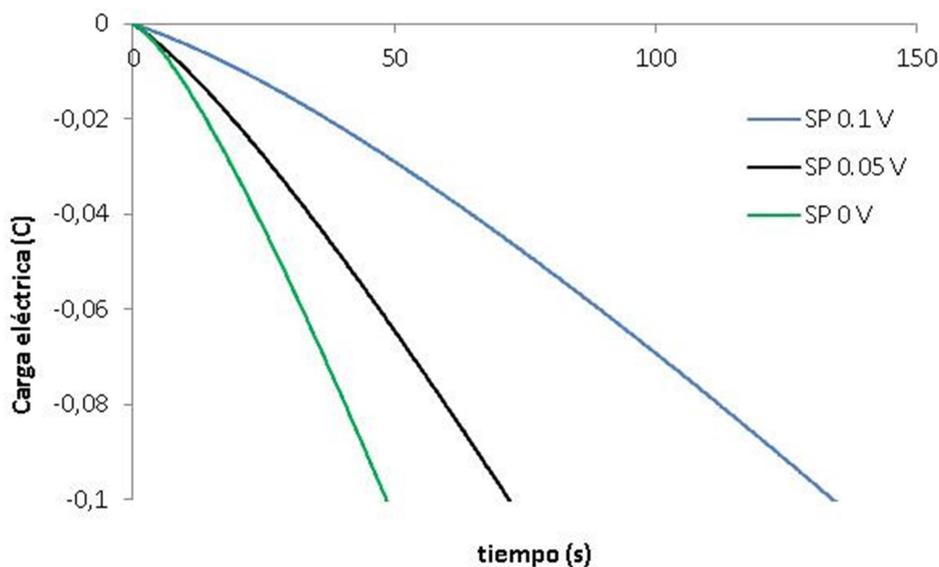


Figura 32. Cronocoulogramas de síntesis de nanopartículas de Ag sobre probetas de fabricación aditiva macizas anodizadas a 10 V durante 4000 s. Potenciales de síntesis: 0.1 V, 0.05 V y 0 V. Medio de síntesis: 50 mM AgNO₃ + NH₃. Carga de síntesis: 0.1 C·cm⁻², equivalente a 30 µg·cm⁻².

En la Figura 33 se muestra el aspecto de las probetas tras realizar la síntesis de las nanopartículas. En general se puede observar que cuando se depositan las nanopartículas de Ag, las probetas adquieren una tonalidad gris debido a la deposición de las nanopartículas de plata. Se puede observar que cuanto mayor es el potencial, mayor es la coloración gris que adquieren las probetas.



Figura 33. De izquierda a derecha; imágenes de probetas de Ti6Al4V: anodizada, anodizada+Ag NPs por voltametría cíclica, síntesis mediante salto potencioestático a 0.1 V, síntesis mediante salto potencioestático a 0.05 V, síntesis mediante salto potencioestático a 0 V.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

Figura 34. Gráfica de liberación del colorante Rh B del soporte de Ti6Al4V de fabricación aditiva y anodizada en ausencia (B) y presencia (E) de enzima proteasa.

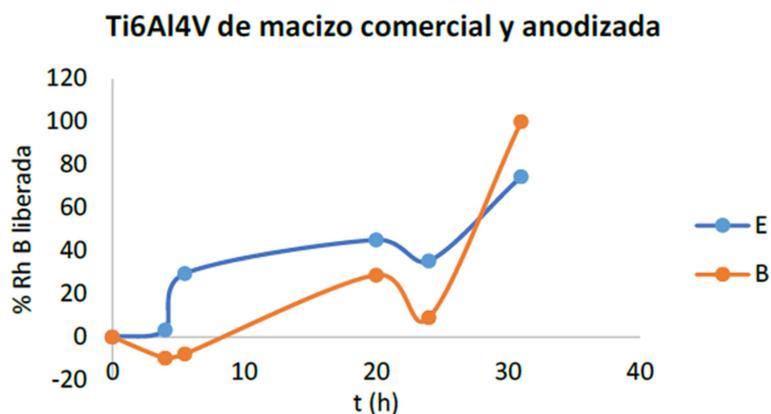


Figura 35. Gráfica de liberación del colorante Rh B del soporte de Ti6Al4V de macizo comercial y anodizada en ausencia (B) y presencia (E) de enzima proteasa.

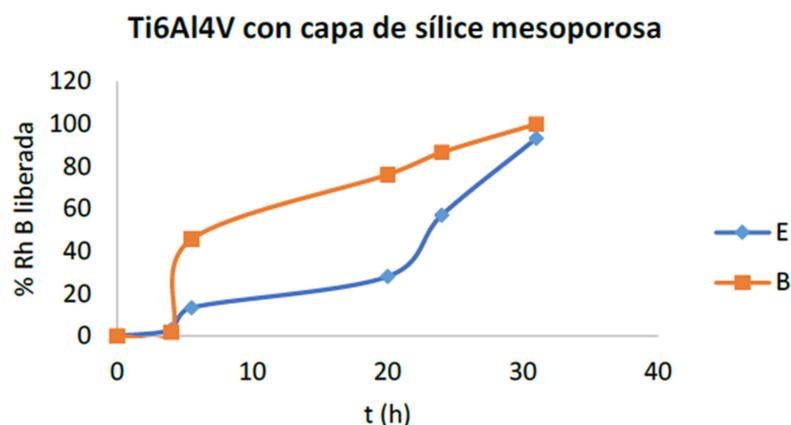


Figura 36. Gráfica de liberación del colorante Rh B del soporte de Ti6Al4V con capa de sílice mesoporosa en ausencia (B) y presencia (E) de enzima proteasa.

- 4- Por último se validó el funcionamiento de las puertas moleculares mediante la liberación controlada de una sal de plata encapsulada en los poros de los soportes de titanio de fabricación aditiva y anodizado y la barra de titanio comercial recubierta de sílice mesoporosa.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

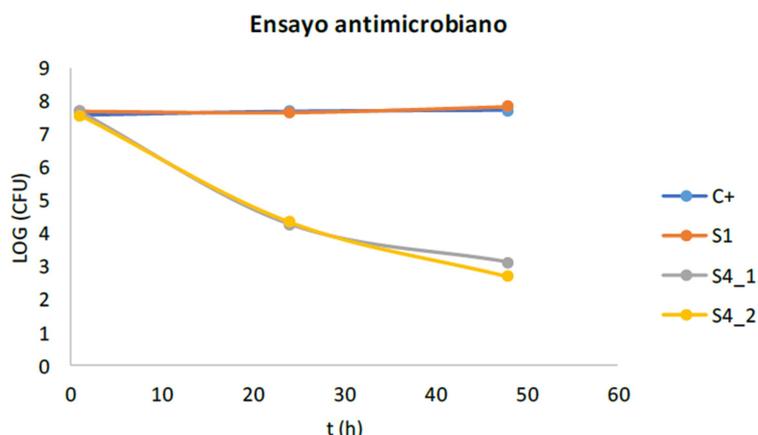


Figura 37. Gráfica de Log (CFU) frente al tiempo para el tratamiento con el soporte de Ti6Al4V fabricación aditiva y anodizado funcionalizado (S4_1 y S4_2). El C+ es el control y el S1 es el soporte de Ti6Al4V fabricación aditiva y anodizado con el colorante y la puerta molecular.

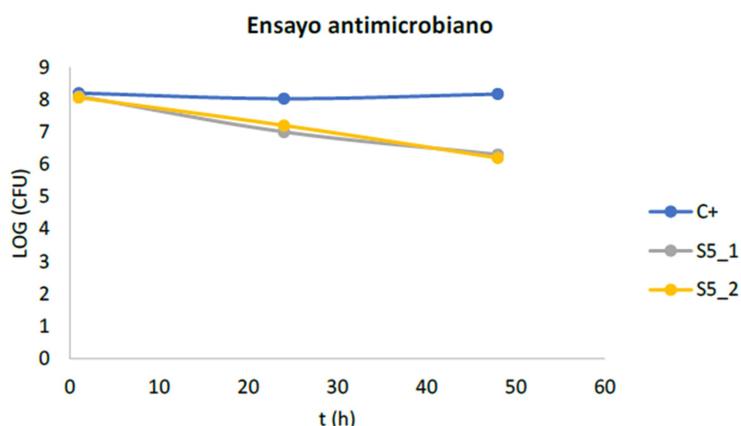


Figura 38. Gráfica de Log (CFU) frente al tiempo para el tratamiento con el soporte de Ti6Al4V con capa de sílice mesoporosa funcionalizada.

A partir del ensayo de validación del funcionamiento de la puerta molecular utilizando el colorante de control como carga y la presencia de proteasas como estímulo de apertura de la puerta se puede concluir (perfiles de liberación de las figuras 34,35 y 36) que el único sistema que presenta una liberación controlada del colorante es el material Ti6Al4V de fabricación aditiva y anodizada (figura 37). Por esta razón, este sistema fue el seleccionado para la evaluación del funcionamiento de la puerta molecular frente al control de la liberación de la sal de plata. Así, se procedió a la síntesis de los soportes S4 (Ti6Al4V de fabricación aditiva anodizado con carga de AgNO_3 y puerta de EPL).

La evaluación del funcionamiento de la puerta molecular con una sal de plata se ha realizado mediante un ensayo antimicrobiano en el que se incluyeron dos controles, un control positivo y un control del Ti6Al4V de fabricación aditiva y anodizada con el colorante y la puerta molecular para poder evaluar a la vez la biocompatibilidad del soporte tras el proceso de anclaje de la puerta molecular.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

8. Tarea 9.1. Caracterización físico-química de los recubrimientos

Se realizó un estudio de liberación de iones de las diferentes probetas recubiertas en un medio fluido corporal simulado (simulated body fluid, SBF) a 37 °C. En estos experimentos se pusieron en contacto dos probetas recubiertas de 12 mm de diámetro (1.13 cm²) con la disolución de fluido corporal simulado.

El fluido corporal simulado fue preparado según la siguiente composición y secuencia de adición que se muestra en la Tabla 1:

Orden	Reactivo	Cantidad
1	NaCl	7.996 g
2	NaHCO ₃	0.350 g
3	KCl	0.224 g
4	K ₂ HPO ₄	0.1740 g
5	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.305 g
6	1M-HCl	40 mL
Se añade el 90% de la cantidad de HCl		
7	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.368 g
8	Na ₂ SO ₄	0.071 g
9	(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	6.057 g

Tabla 1. Composición del fluido corporal simulado.

En la Figura 39 se muestran 3 tipos de probetas diferentes en contacto con 20 mL de SBF, para mantener la temperatura de 37°C se empleó una estufa.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

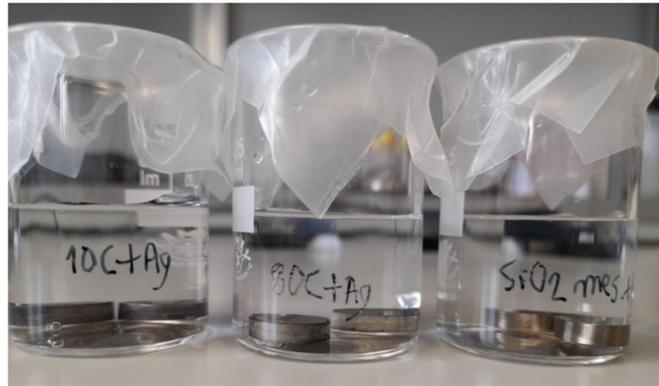


Figura 39. Experimento de liberación de iones (Ag, Si y Ti) en SBF.

Cinéticas de liberación de elementos

Para obtener la cinética de liberación de los diferentes elementos se pusieron en contacto las probetas recubiertas con fluido corporal simulado (simulated body fluid). Para ello se colocaron en contacto 20 mL del fluido corporal simulado con las piezas recubiertas. Posteriormente, las muestras fueron incubadas en el fluido corporal simulado a 37°C (temperatura del cuerpo humano). Tras diferentes días de contacto del fluido corporal simulado con las probetas se extrajeron unos 10 mL para realizar un análisis de la concentración de los diferentes elementos (Ag, Si, Ti, etc.) mediante ICP-MS (inductively coupled plasma-mass spectrometry). Los 10 mL extraídos fueron reemplazados por 10 mL frescos de fluido corporal simulado. El proceso se repitió, realizando extracciones de 10 mL de fluido corporal simulado en contacto con las muestras a diferentes días.

En la Figura 40 se muestran las muestras en contacto con el fluido corporal simulado colocadas en el interior del incubador.

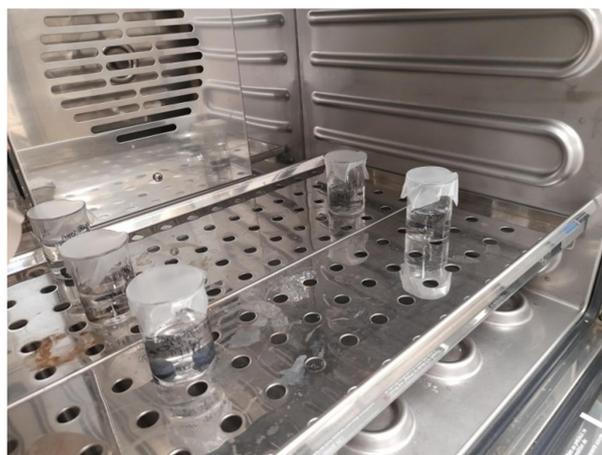


Figura 40. Probetas sumergidas en SBF en 20 mL de fluido corporal simulado e introducidas en el incubador.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

En la Figura 41 se muestran los resultados de la liberación acumulada de Ag. Se puede observar que la mayor liberación se produce durante los primeros días, para luego producirse una estabilización en la cantidad de Ag liberada. El orden de mayor cantidad de Ag liberada sería el siguiente: 10 C + Ag > 80 C + Ag > FA + Ag + TT > FA + TT + Ag > SiO₂ mes + Ag.

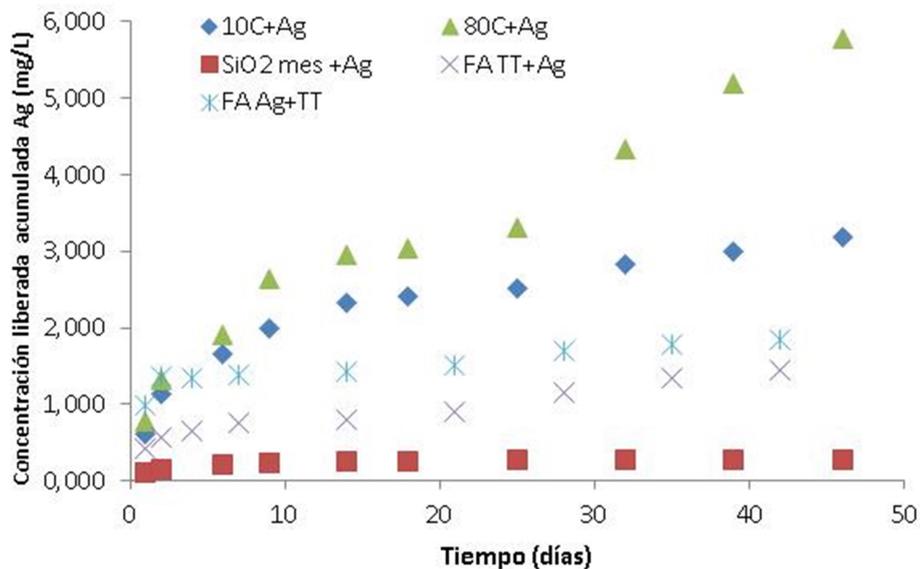


Figura 41. Liberación acumulada de Ag (mg/L) para las muestras de 10 C + Ag, 80 C + Ag, SiO₂ mes + Ag, FA + TT + Ag, FA + Ag + TT.

9. Tarea 9.2. Caracterización morfológica de los recubrimientos

A continuación se muestran algunas de las micrografías más representativas obtenidas para la diferentes muestras obtenidas durante la realización del proyecto.

En la Figura 42 y 43 se muestra una comparativa del efecto del empleo de diferentes potenciales de anodizado (10 V, 20 V, 30 V) sobre la morfología del anodizado de las piezas macizas de fabricación aditiva. Se puede observar que en general, el aumento de potencial produce un aumento del tamaño de los nanotubos. Al emplear el potencial también se puede observar la unión de algunos de estos nanotubos.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

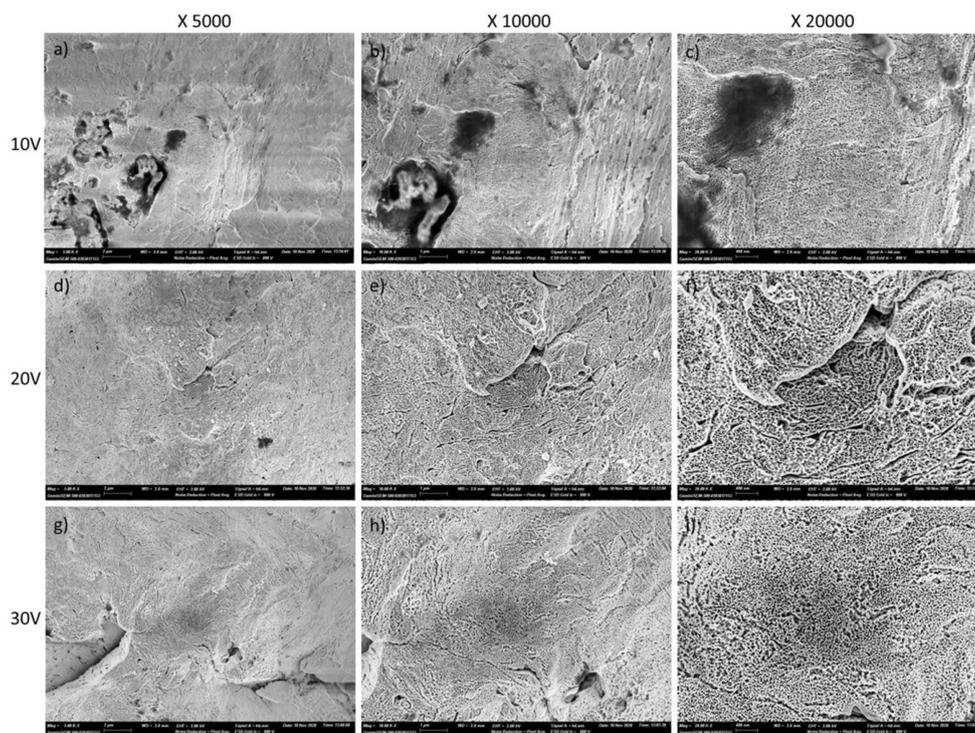
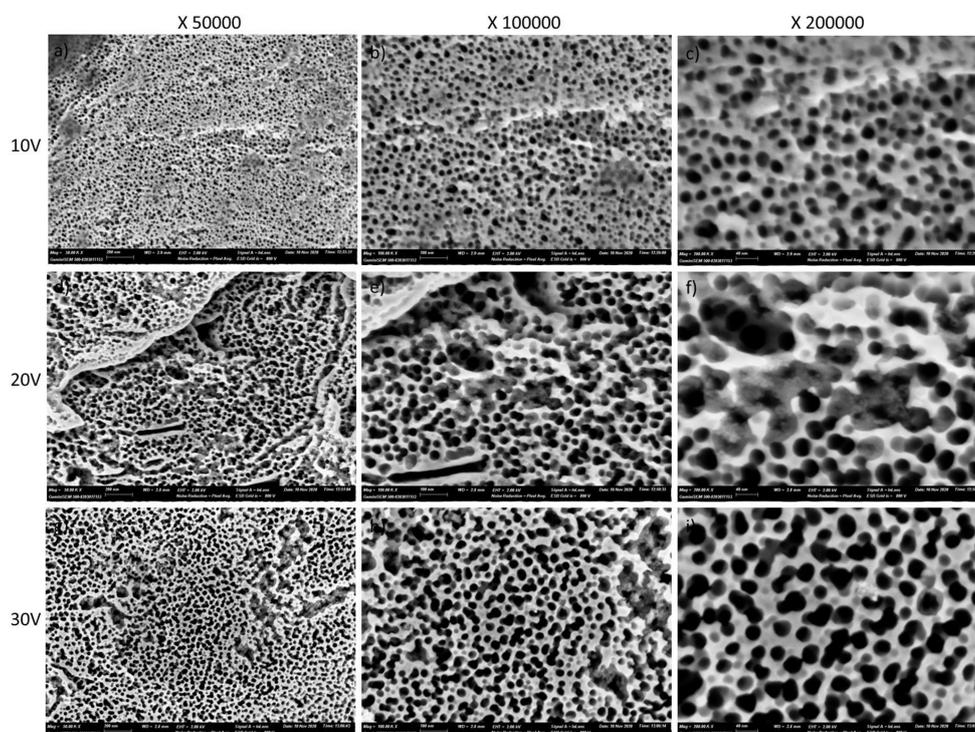


Figura 42. Comparación de micrografías HRFESEM de piezas de fabricación aditiva anodizadas a 10 V, 20 V y 30 V durante 2000 s en una disolución de anodizado. Aumentos: a) x 2000, b) x 10000, c) x 20000.



“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

Figura 43. Comparación de micrografías HRFESEM de piezas de fabricación aditiva anodizadas a 10 V, 20 V y 30 V durante 2000 s en una disolución de anodizado. Aumentos: a) x 50000, b) x 100000, c) x 200000.

Por lo que respecta a las probetas de Ti6Al4V macizas, se necesitó una mayor concentración de NH_4F para conseguir el anodizado. En la Figura 44 se muestran las micrografías de la muestra de Ti6Al4V anodizada a 10 V, parece ser que el potencial aplicado no es suficiente para conseguir la formación de los nanotubos de TiO_2 . Aunque se observa la formación de una capa de óxidos, no se puede observar la formación de los nanotubos de TiO_2 . El potencial aplicado parece no haber sido suficiente, por lo que en posteriores experimentos se incrementó a 20 V y 30 V.

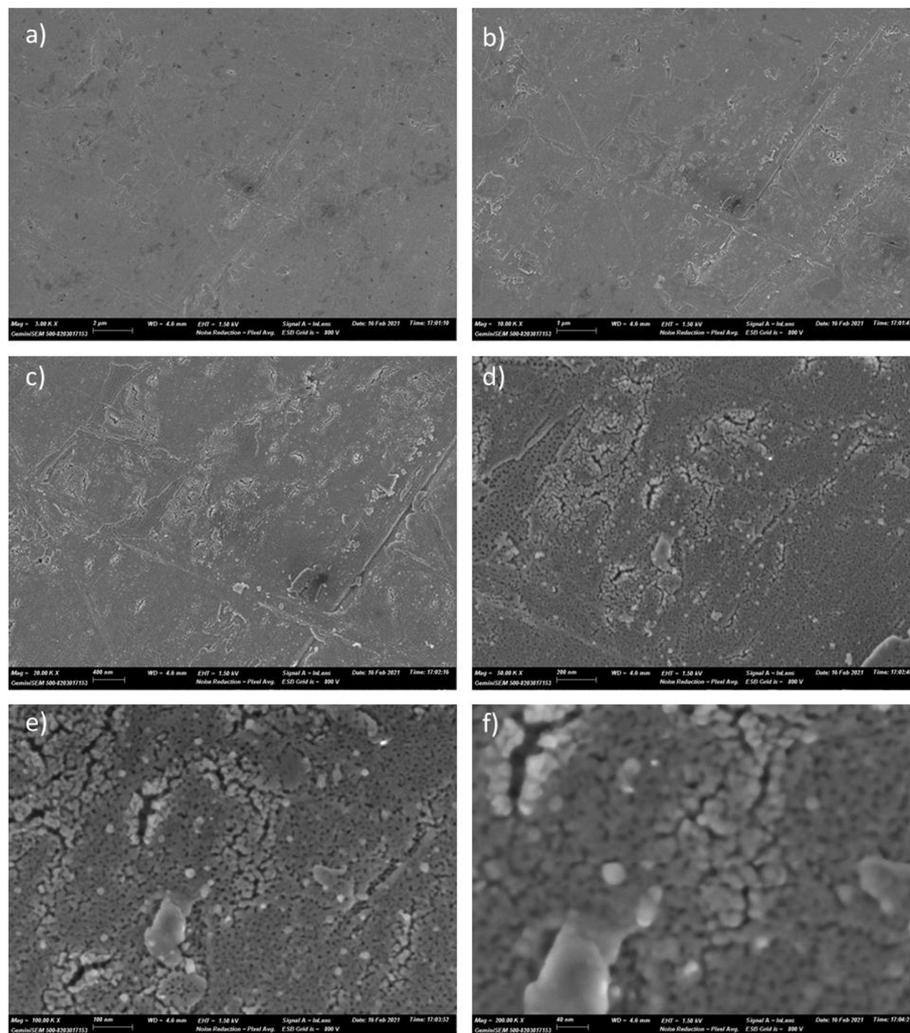


Figura 44. Micrografías HRFESEM de piezas de Ti6Al4V macizo anodizadas a 10 V durante 4000 s en una disolución de anodizado con mayor concentración de NH_4F . a) x 5000, b) x 10000, c) x 20000, d) x 50000, e) x100000, f) x200000.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

En la Figura 45 se muestran las microfografías obtenidas cuando se emplea un potencial de anodizado de 20 V. En este caso sí que se pudo observar la formación de los nanotubos de TiO_2 con una morfología igual a la obtenida para el caso de las probetas de fabricación aditiva.

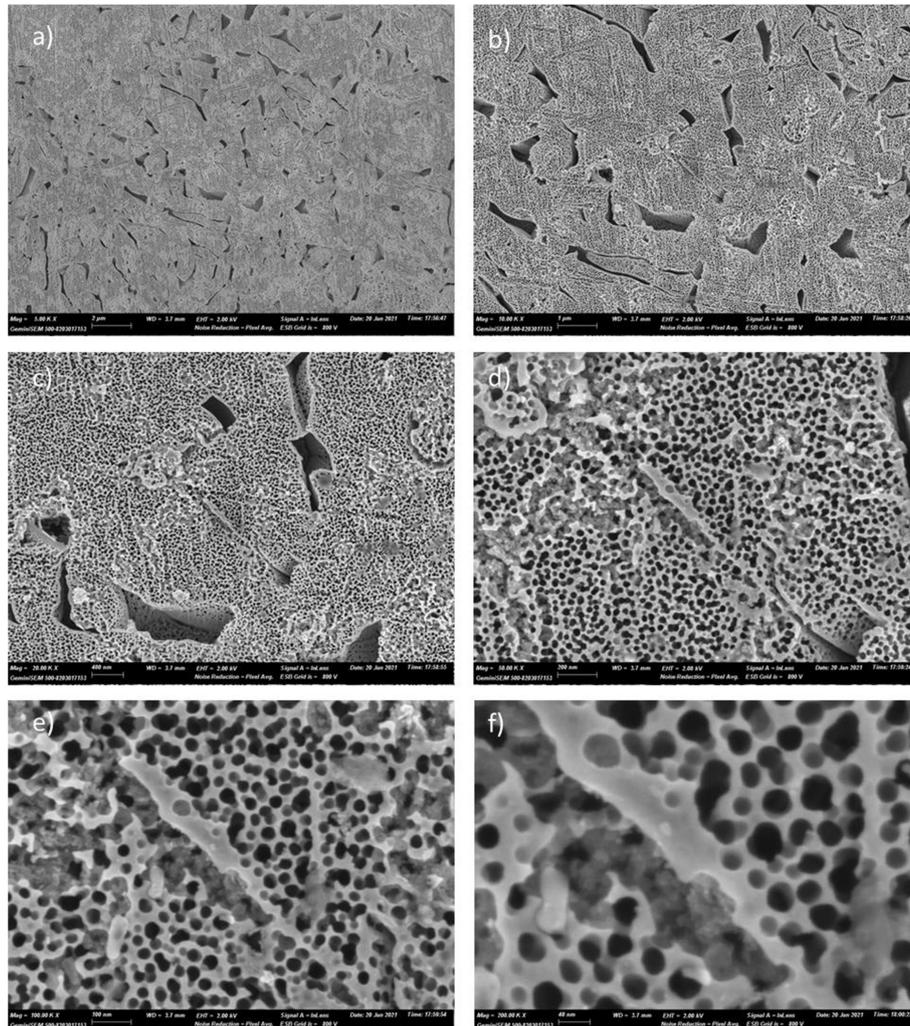


Figura 45. Micrografías HRFESEM de piezas de Ti6Al4V macizo anodizadas a 20 V durante 4000 s en una disolución de anodizado con mayor concentración de NH_4F . a) x 5000, b) x 10000, c) x 20000, d) x 50000, e) x100000, f) x200000.

En la Figura 46 se muestran microfografías HRFESEM en otra zona de la probeta. Se puede observar una buena distribución de los nanotubos de TiO_2 sobre todo la probeta. Además se puede observar que unas zonas han sufrido un mayor ataque que otras zonas; ello puede ser debido a las diferentes fases α y β del Ti6Al4V sufren un ataque diferente durante el proceso de anodizado.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

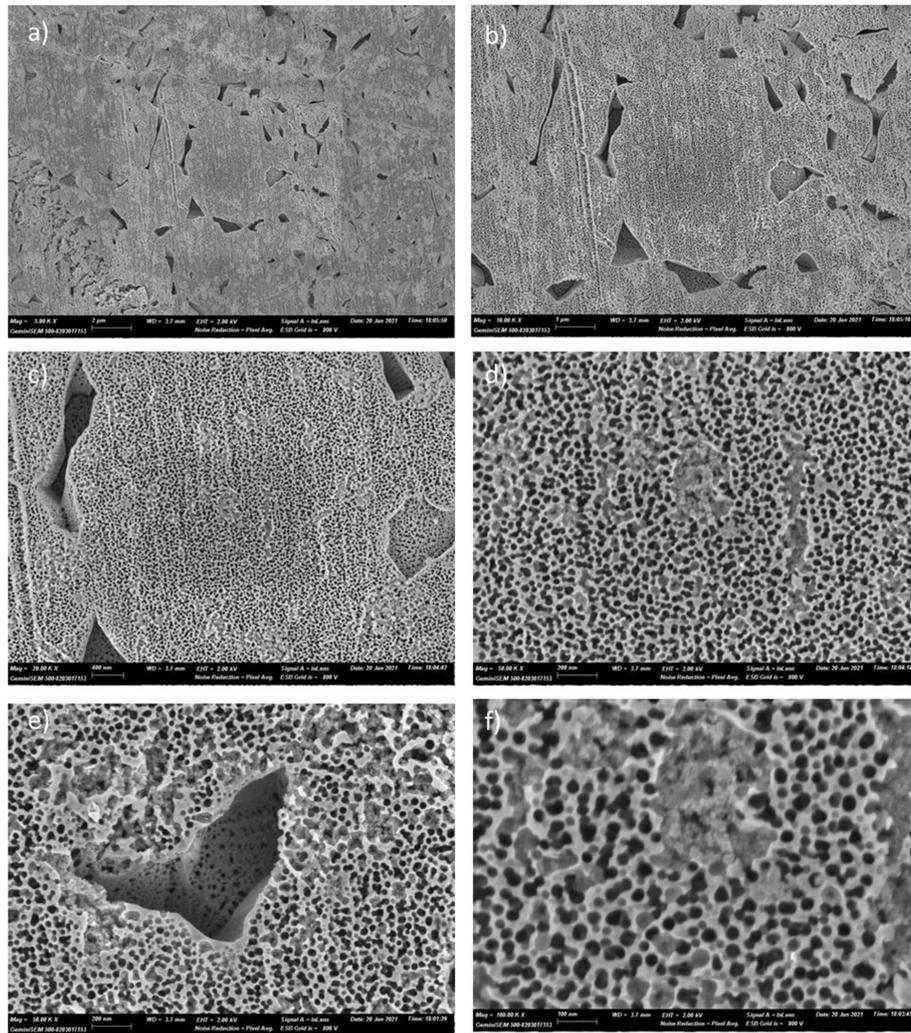


Figura 46. Micrografías HRFESEM de piezas de Ti6Al4V macizo anodizadas a 20 V durante 4000 s en una disolución de anodizado con mayor concentración de NH_4F . a) x 5000, b) x 10000, c) x 20000, d) x 50000, e) x50000, f) x100000.

Sobre las piezas de Ti6Al4V macizas se realizaron experimentos de síntesis con diferentes tiempos para optimizar el tiempo de síntesis. Posteriormente sobre estas muestras se realizó la deposición de las nanopartículas de Ag mediante métodos químicos. En la Figura 47 y 48 se muestran las micrografías de una muestra anodizada durante 4000 s a 30 V y con nanopartículas de Ag depositadas. En la Figura 47 se muestran las micrografías obtenidas mediante electrones In Lens. En la Figura 48 se muestran las micrografías obtenidas mediante electrones retrodispersados.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

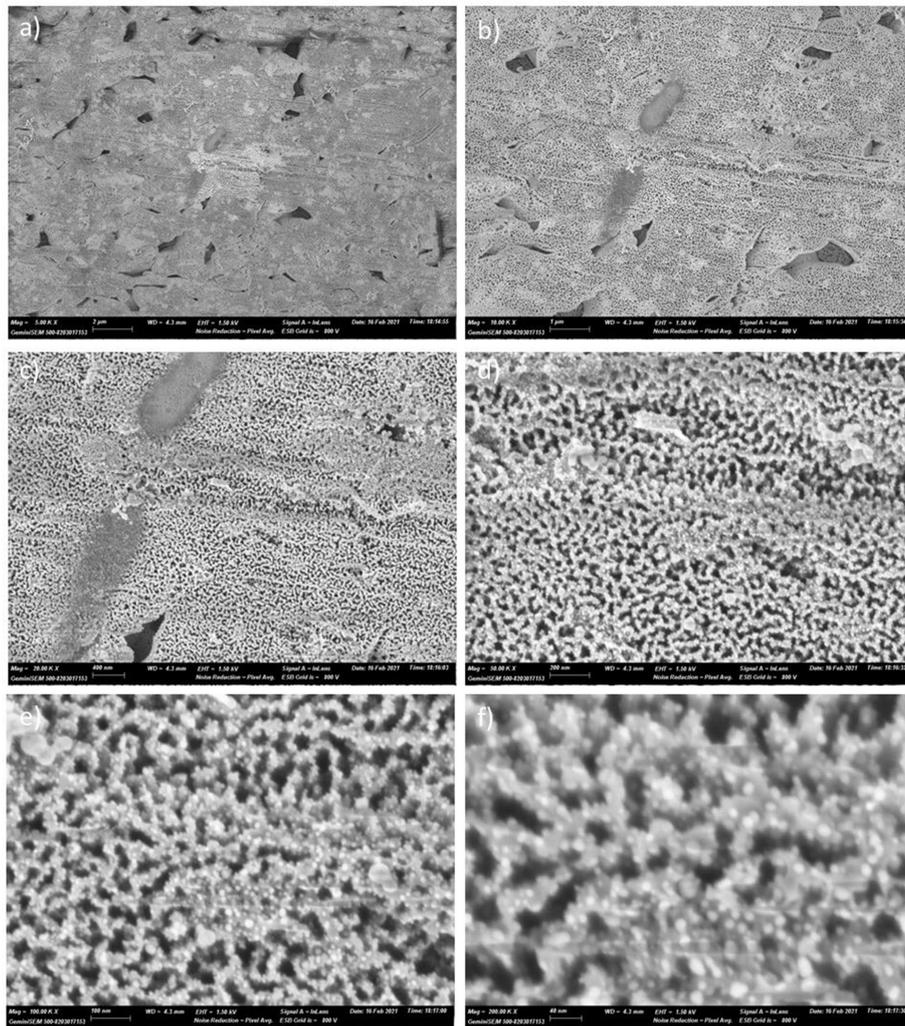


Figura 47. Micrografías HRFESEM de piezas de Ti6Al4V macizas anodizadas a 30 V durante 4000 s en una disolución de anodizado con mayor concentración de NH_4F + nanopartículas obtenidas mediante métodos químicos. Micrografías obtenidas mediante electrones In Lens. a) x 5000, b) x 10000, c) x 20000, d) x 50000, e) x 100000, f) x 200000.

En este caso se puede observar una muy buenas distribución de las nanopartículas de Ag en la superficie del recubrimiento. Las nanopartículas se pueden observar mediante electrones In Lens, aunque su distribución se puede observar mejor con el empleo de electrones retrodispersados. En este caso se puede observar una cubrición total de la superficie por parte de las nanopartículas de Ag. Los nanotubos de TiO_2 parecen haber crecido en exceso y su forma ya no es tan definida.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

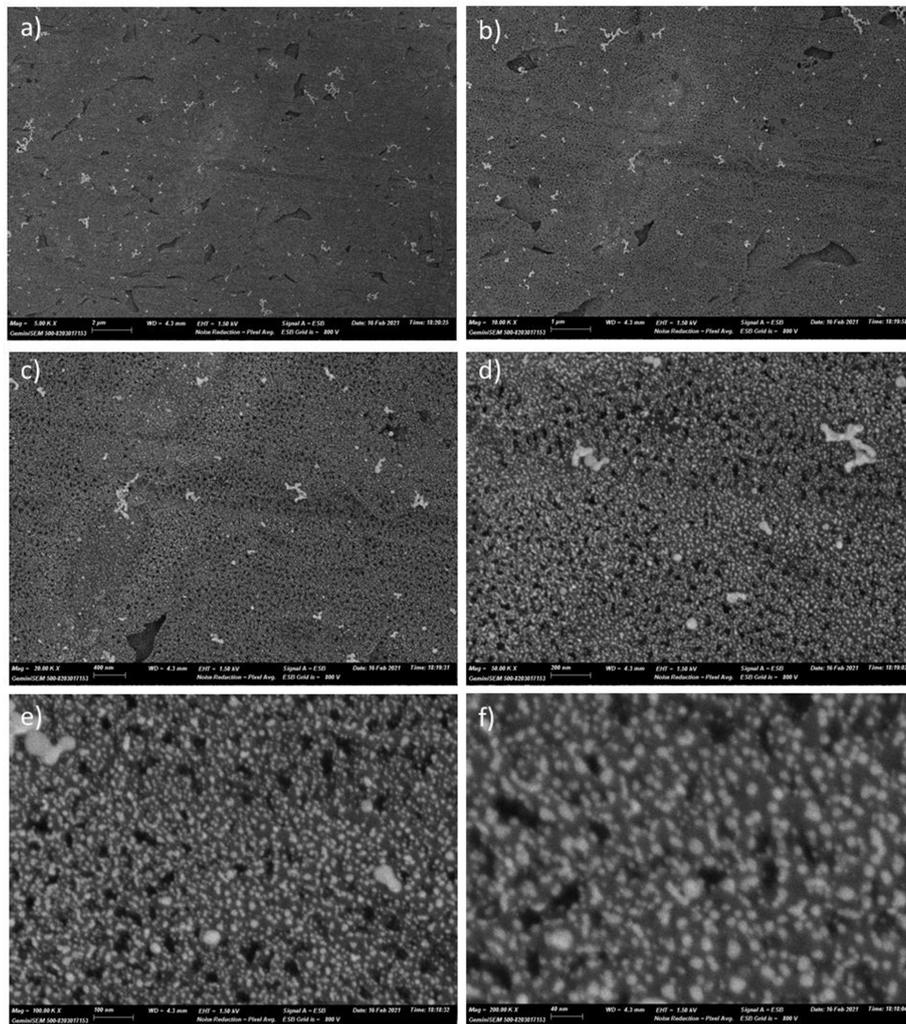


Figura 48. Micrografías HRFESEM de piezas de Ti6Al4V macizas anodizadas a 30 V durante 4000 s en una disolución de anodizado con mayor concentración de NH_4F + nanopartículas obtenidas mediante métodos químicos. Micrografías obtenidas mediante electrones retrodispersados. a) x 5000, b) x 10000, c) x 20000, d) x 50000, e) x 100000, f) x 200000.

En las Figuras 49 y 50 se muestran las micrografías obtenidas para una pieza maciza de Ti6Al4V anodizada durante 1000 s. Sobre las muestras anodizadas se realizó la deposición de las nanopartículas de Ag mediante métodos químicos. En la Figura 49 se muestran las micrografías obtenidas mediante electrones In Lens. En la Figura 50 se muestran las micrografías obtenidas mediante electrones retrodispersados.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

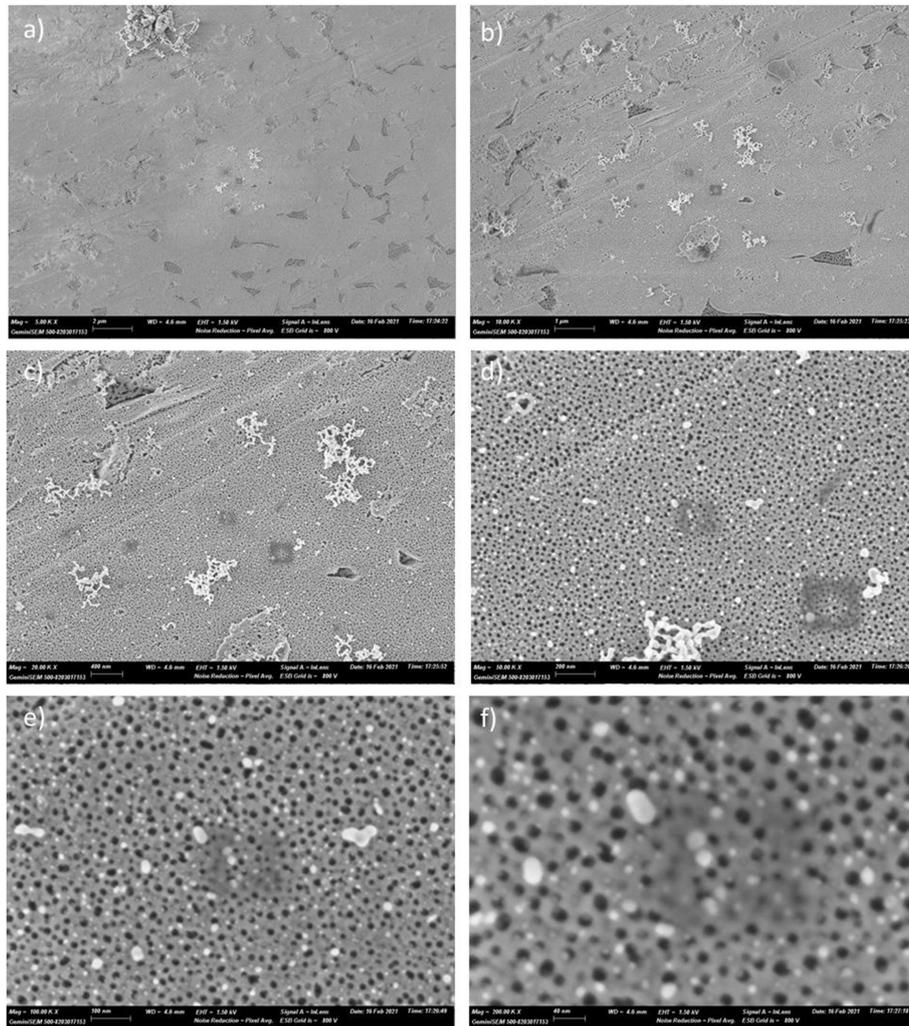


Figura 49. Micrografías HRFESEM de piezas de Ti6Al4V macizas anodizadas a 30 V durante 1000 s en una en una disolución de anodizado con mayor concentración de NH_4F + nanopartículas obtenidas mediante métodos químicos. Micrografías obtenidas mediante electrones In Lens. a) x 5000, b) x 10000, c) x 20000, d) x 50000, e) x 100000, f) x 200000.

En el caso de emplear 1000 s de tiempo de anodizado se observa perfectamente la forma de los nanotubos de TiO_2 , por lo que este parece ser el tiempo adecuado para realizar el anodizado. Las nanopartículas de Ag se encuentran también muy bien distribuidas sobre la superficie del recubrimiento de anodizado.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

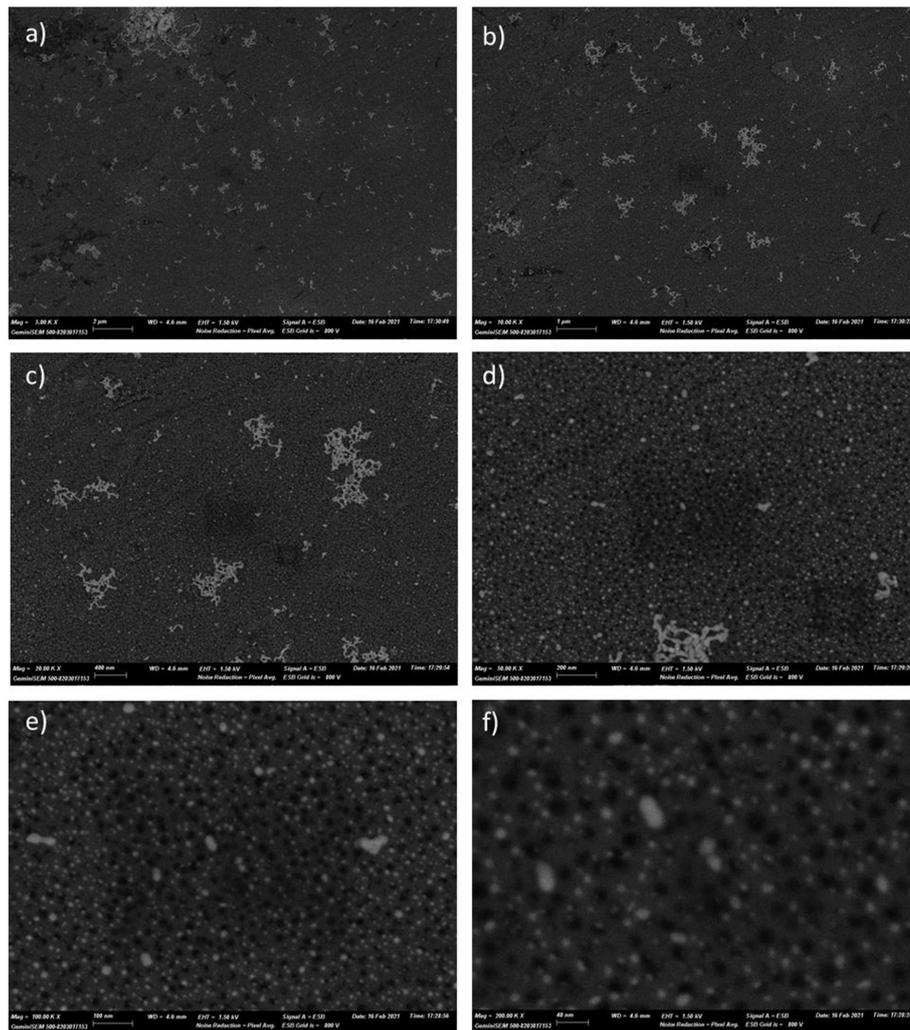


Figura 50. Micrografías HRFESEM de piezas de Ti6Al4V macizas anodizadas a 30 V durante 1000 s en una disolución de anodizado con mayor concentración de NH_4F + nanopartículas obtenidas mediante métodos químicos. Micrografías obtenidas mediante electrones retrodispersados. a) x 5000, b) x 10000, c) x 20000, d) x 50000, e) x 100000, f) x 200000.

En la Figura 51 se muestran las micrografías de probetas de Ti6Al4V macizas (Ti comercial) recubiertas con SiO_2 mesoporosa. En las micrografías se puede observar la aparición de mesoporos, visibles sobre todo con un número alto de aumentos. Sobre la superficie se puede observar además la presencia de algunas nanopartículas de Ag. Las nanopartículas de Ag no parecen penetrar dentro de los mesoporos y su formación es superficial. Ello puede ser debido a que el reductor empleado no es capaz de penetrar dentro de los nanoporos. Por ello se han empleado otras técnicas de reducción como los métodos térmicos.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

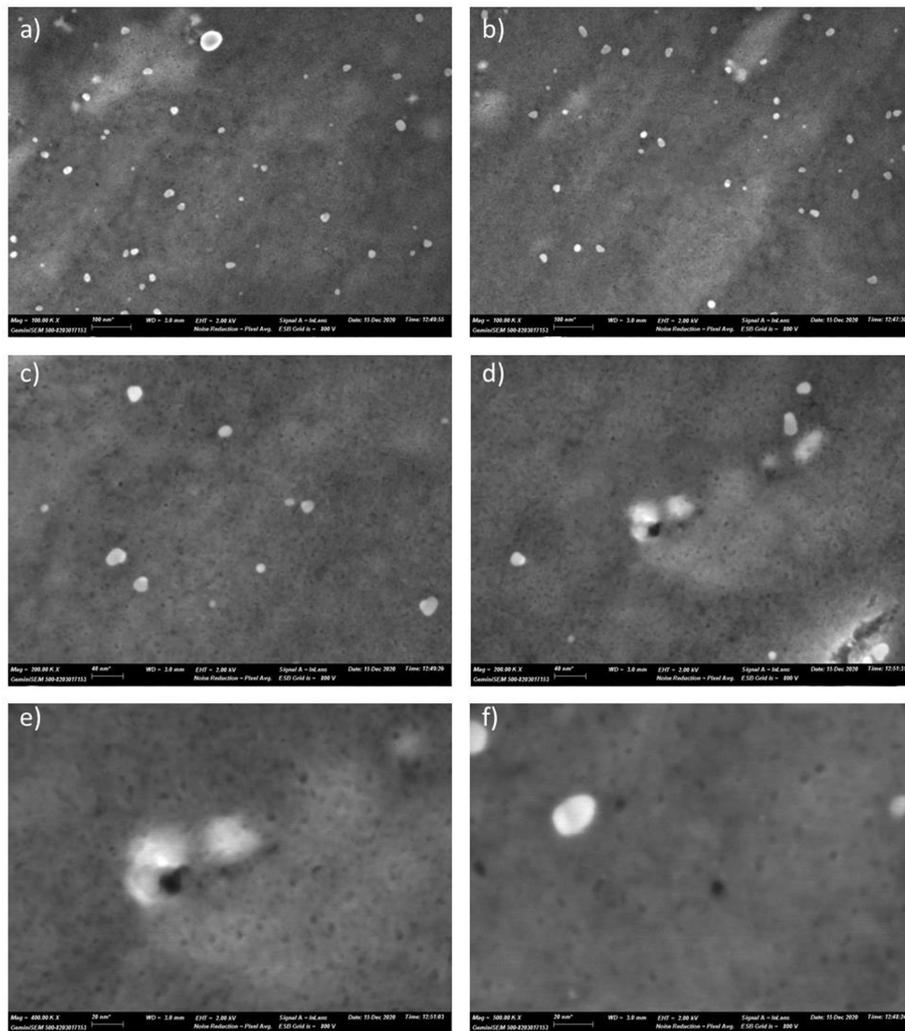


Figura 51. Micrografías HRFESEM de piezas de Ti6Al4V recubierta con sílica mesoporosa + nanopartículas de Ag obtenidas mediante métodos químicos. a) x 100000, b) x 100000, c) x 200000, d) x 200000, e) x 400000, f) x 500000. Contraste y luminosidad ajustado.

En la Figura 52 se muestran las micrografías de los recubrimientos de SiO₂ mesoporosa tras la síntesis de nanopartículas de Ag mediante métodos químicos.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

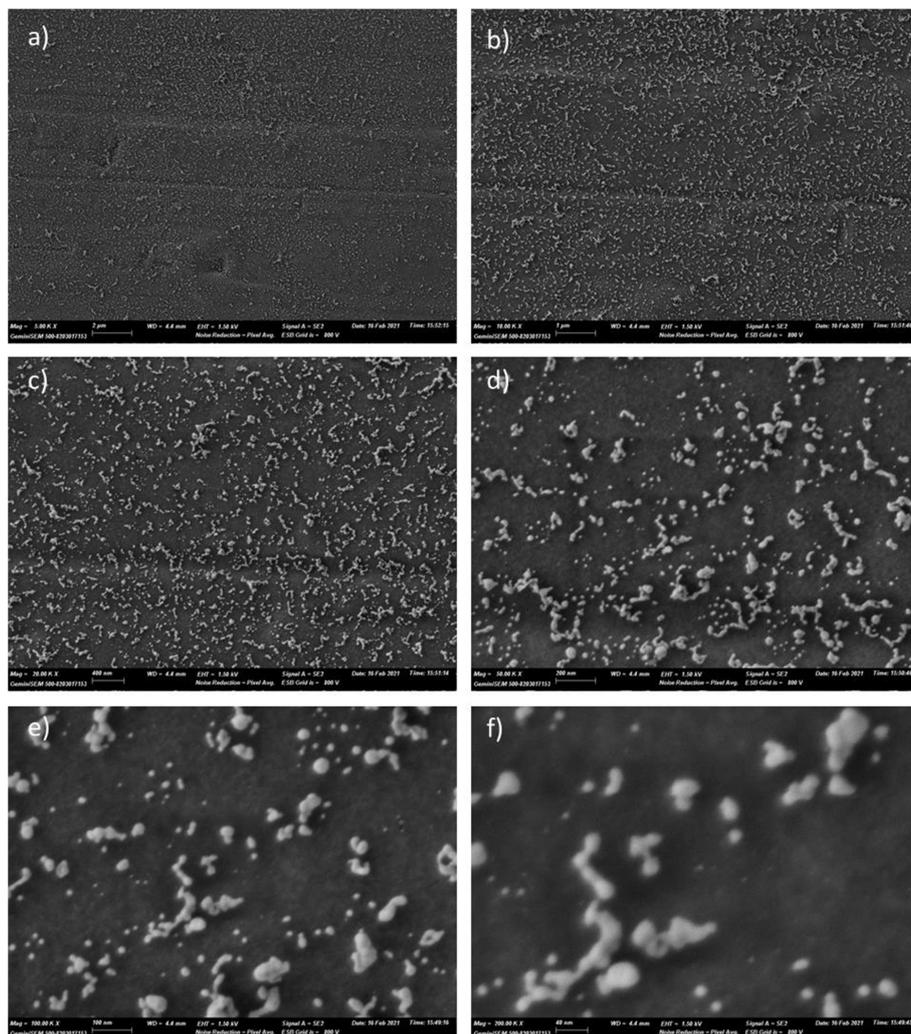


Figura 52. Micrografías HRFSEM de piezas de Ti6Al4V recubierta con sílica mesoporosa + nanopartículas de Ag (3 días de adsorción de $[Ag(NH_3)_2]^+$ y posterior reducción con $NaBH_4$). a) x 5000, b) x 10000, c) x 20000, d) x 50000, e) x 100000, f) x 200000.

En la Figura 53 se muestran las micrografías HRFSEM obtenidas mediante el empleo de electrones retrodispersados y altos aumentos. Con altos aumentos se puede observar la presencia de nanopartículas de Ag de 2-4 nm, estas nanopartículas sí que parecen haber penetrada en el recubrimiento de sílica mesoporosa. Además se pueden observar las nanopartículas superficiales de Ag, que son más grandes.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

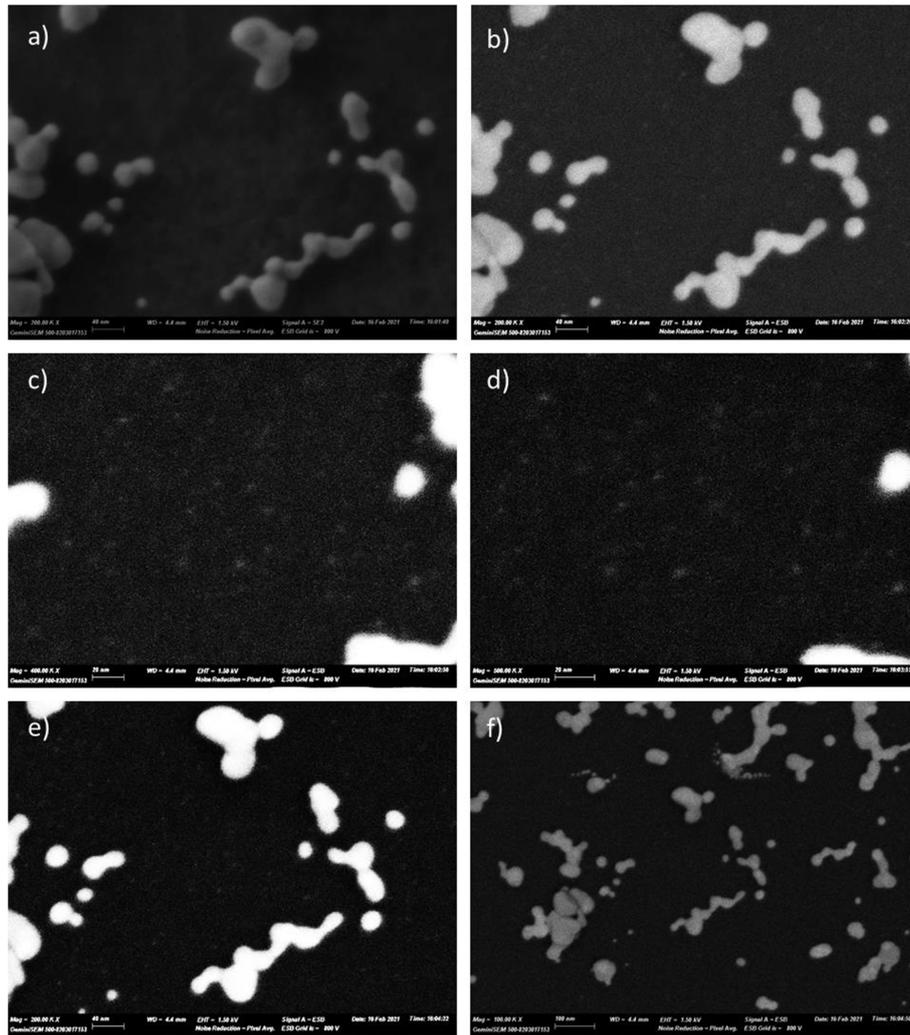


Figura 53. Micrografías HRFESEM de piezas de Ti6Al4V recubierta con sílica mesoporosa + nanopartículas de Ag (3 días de adsorción de $[Ag(NH_3)_2]^+$ y posterior reducción con $NaBH_4$). a) x 200000, b) x 200000, c) x 400000, d) x 500000, e) x 200000, f) x 100000.

Caracterización mediante microscopía de fuerzas atómicas de Ti macizo anodizado a 30 V

Se empleó también la técnica de microscopía de fuerzas atómicas para la caracterización de las muestras obtenidas en el proyecto. En las Figuras 54, 55, 56 y 57 se muestra como ejemplo la caracterización de AFM empleando un cantilever de 1 nm. Con el tamaño de este cantilever se puede observar el tamaño de los nanotubos de TiO_2 obtenidos durante el anodizado.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

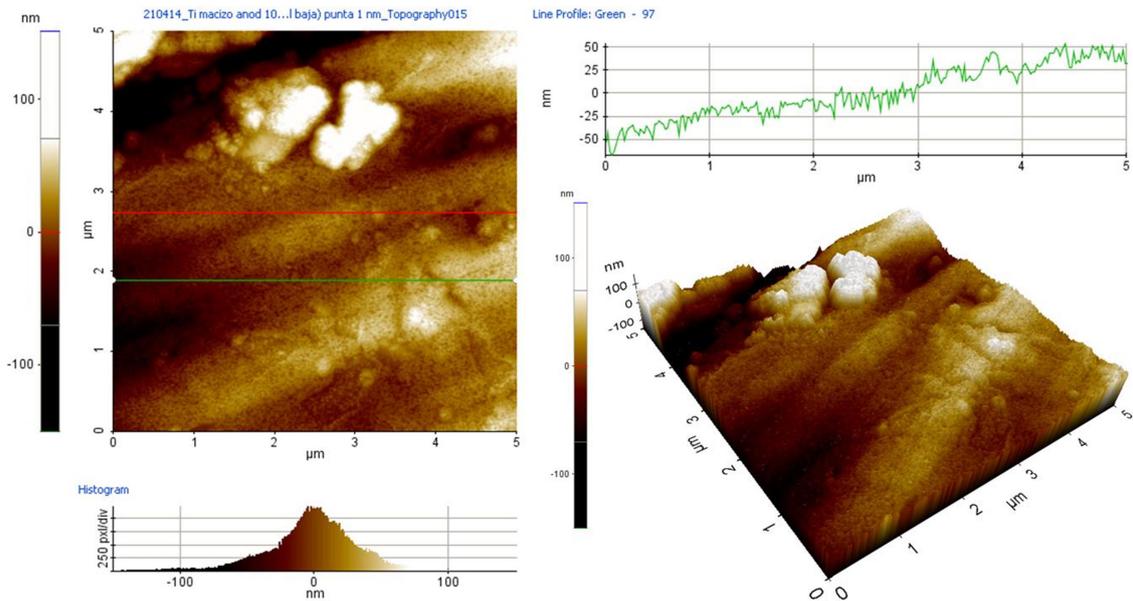


Figura 54. Caracterización AFM de probetas de Ti6Al4V macizas anodizadas a 30 V. Tamaño escaneado: 5 μm x 5 μm.

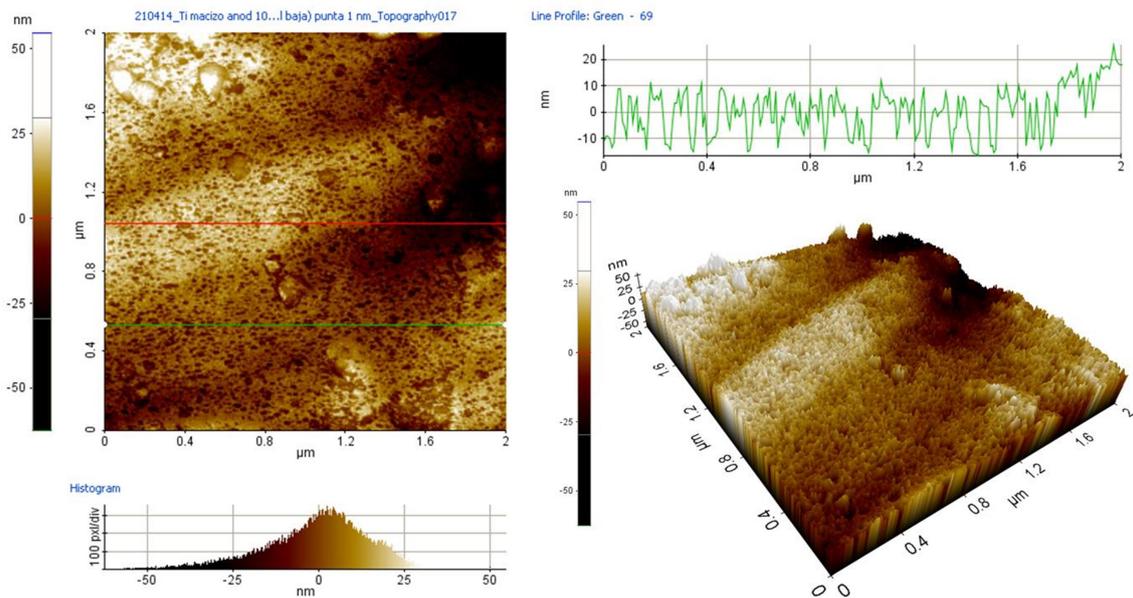


Figura 55. Caracterización AFM de probetas de Ti6Al4V macizas anodizadas a 30 V. Tamaño escaneado: 2 μm x 2 μm.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

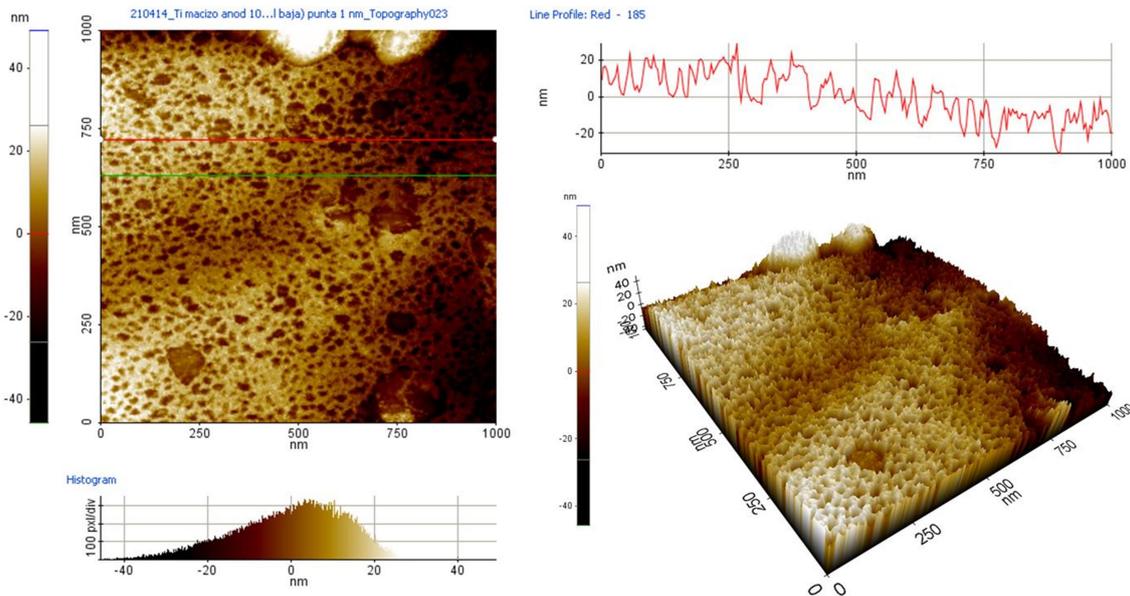


Figura 56. Caracterización AFM de probetas de Ti6Al4V macizas anodizadas a 30 V. Tamaño escaneado: 1 μm x 1 μm .

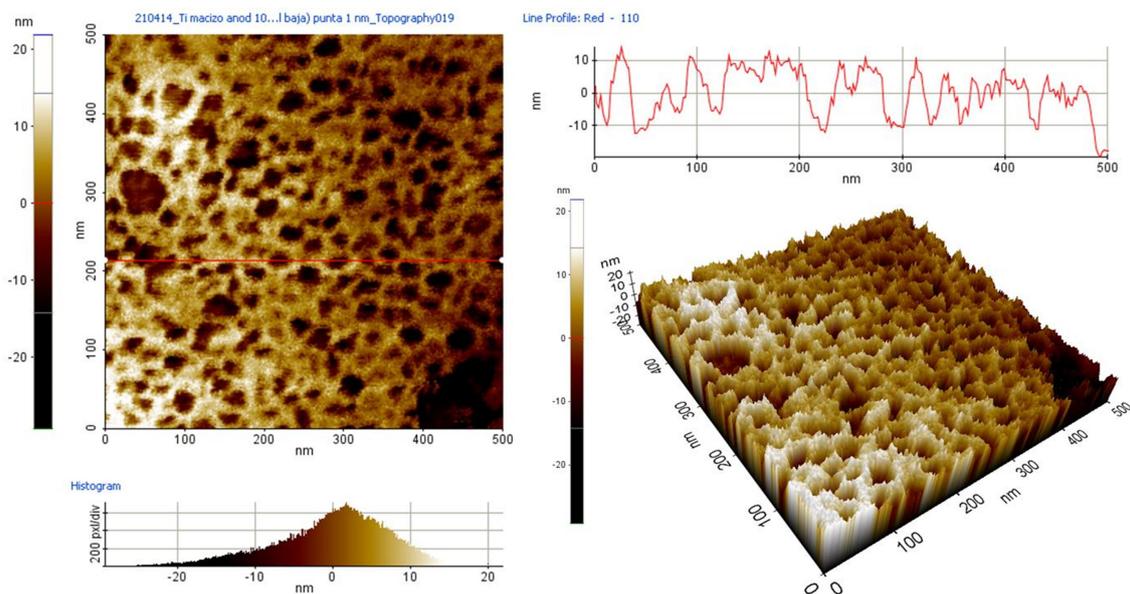


Figura 57. Caracterización AFM de probetas de Ti6Al4V macizas anodizadas a 30 V. Tamaño escaneado: 500 nm x 500 nm.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

10.Tarea 10.1. Determinación de la actividad antimicrobiana de las diferentes aplicaciones

En este proyecto se han realizado diversos ensayos antimicrobianos de los diversos soportes obtenidos. A continuación se muestran las conclusiones más relevantes de cada uno de ellos.

IDM ensayos control de soportes con puertas moleculares

Del informe de resultados obtenidos por el IDM donde se estudiaron tres soportes: Titanio macizo de fabricación aditiva y anodizado, Titanio macizo comercial anodizado y Titanio comercial recubierto de sílice mesoporosa, y se estudió la actividad antimicrobiana de la plata frente a la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*). Estando la plata albergada en los sustratos nano y mesoporosos generados sobre el titanio y sellados mediante puertas moleculares de ϵ -poli-L-lisina (EPL) se extrajeron las siguientes conclusiones:

- Los resultados obtenidos corroboran la biocompatibilidad del soporte inicial como del soporte funcionalizado de Titanio de FA anodizado. Así mismo se observó la disminución del número de CFUs producida por los sistemas S4_1 y S4_2 en presencia del estímulo seleccionado (proteasas). Esto indica que la puerta molecular es capaz de abrirse en presencia de las enzimas exogenadas por la bacteria *E. coli*, permitiendo la liberación de la carga al medio, dando lugar a una disminución de la cantidad de bacterias viables entorno a 10^5 cel/mL. Tras la comprobación del correcto funcionamiento del sistema diseñado basado en el soporte de Ti64(FA) y la puerta de ϵ -polilisina, utilizando la plata como antimicrobiano.
- Por otro lado, los soportes de titanio comercial recubierto de sílica mesoporosa con la puerta molecular frente al control de la liberación de la sal plata escogida no fueron satisfactorios. EL sistema S5_1 se puso en contacto con la bacteria (presencia del estímulo de apertura de la puerta) y el sistema S5_2 se incubó en ausencia de la bacteria (ausencia del estímulo de apertura de la puerta). Ambos sistemas proporcionaron la misma disminución de la cantidad de bacterias viables, 2 unidades logarítmicas. Por lo tanto, en el caso del soporte de Ti64/SiO₂ el sistema de puerta utilizado no ha dado una respuesta satisfactoria.

Instituto de investigación sanitaria La Fe. Grupo de Infección Grave.

El objetivo del estudio fue determinar la capacidad antibacteriana de los distintos discos(probetas) de Titanio que fueron recubiertos con diferentes tratamientos, para ello se estudiaron por una parte la posible capacidad antibiofilm que poseen y por otro la actividad bactericida según norma ISO 22196:2011 “Measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous surfaces”

Muestras:

1. Ti FA
2. Ti Fa anodizado
3. Ti FA anodizado + Ag

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

- 4. SiO₂ mesoporosa
- 5. SiO₂ mesoporosa +Ag
- 6. Ti macizo
- 7. Ti macizo anodizado
- 8. Ti macizo anodizado +Ag

Cepas utilizadas en el estudio: *Staphylococcus aureus* V329 y *Staphylococcus epidermidis* RP62A. Ambas cepas poseen gran capacidad de formar biofilm.

A continuación se muestran los resultados de ambos ensayos para todas las muestras estudiadas respecto a las dos cepas utilizadas.

Resultados de la capacidad de prevenir la formación del biofilm:

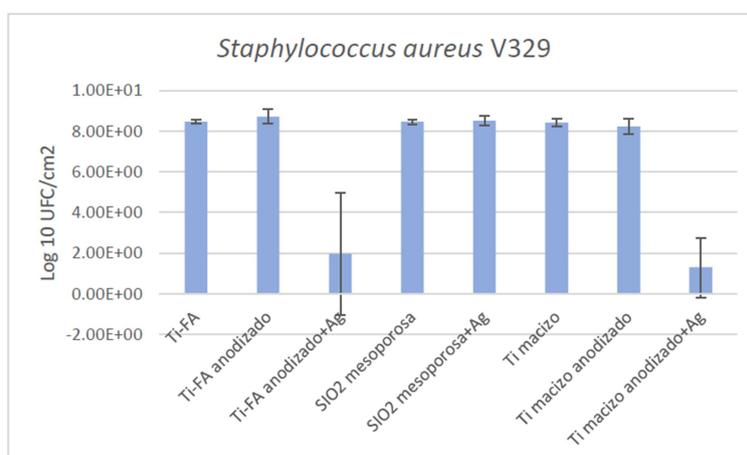


Figura 58. Formación de biofilm de 48 h *S. aureus* sobre los diferentes materiales analizados expresado en Log 10 UFC/cm².

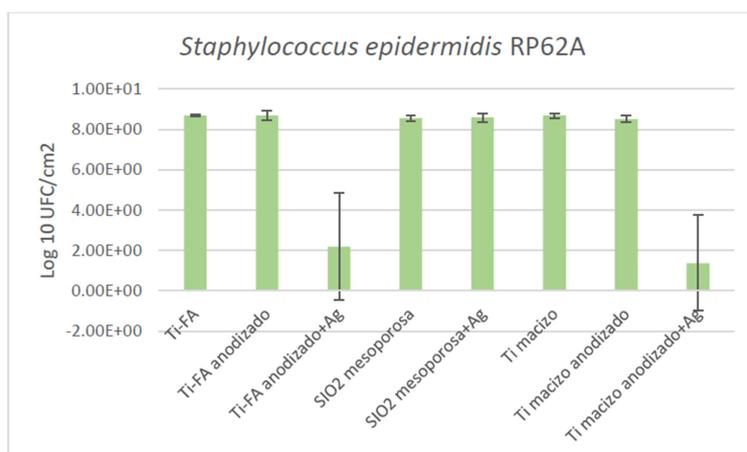


Figura 59. Formación de biofilm de 48 h *S. epidermidis* sobre los diferentes materiales analizados expresado en Log 10 UFC/cm².

Según los resultados obtenidos los materiales que mostraron mayor eficacia en la prevención de la formación del biofilm tanto de *S. aureus* como *S. epidermidis* fueron Ti-FA anodizado-Ag y Ti macizo anodizado-Ag. Con los discos de Ti-FA anodizado-Ag se obtuvo mayor dispersión que

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

con Ti macizo anodizado-Ag, lo que podría indicar una mayor estabilidad en el recubrimiento en el caso de Ti macizo anodizado-Ag. Se obtuvo en ambos casos, con estos dos materiales una reducción de más de tres logaritmos con respecto al control, indicando una gran actividad anti-biofilm.

Con respecto a la letalidad que se obtuvo para cada muestra con Ag los resultados fueron: Para el Ti-FA anonizado-Ag una letalidad del 99,9638% y 99,9779% con respecto al Ti-FA anonizado, para *S. aureus* y *S. epidermidis* respectivamente.

Para el Ti macizo anonizado-Ag una letalidad del 99,9999% y 99,9726% con respecto al Ti macizo anonizado, para *S. aureus* y *S. epidermidis* respectivamente.

Resultados de la capacidad antibacteriana:

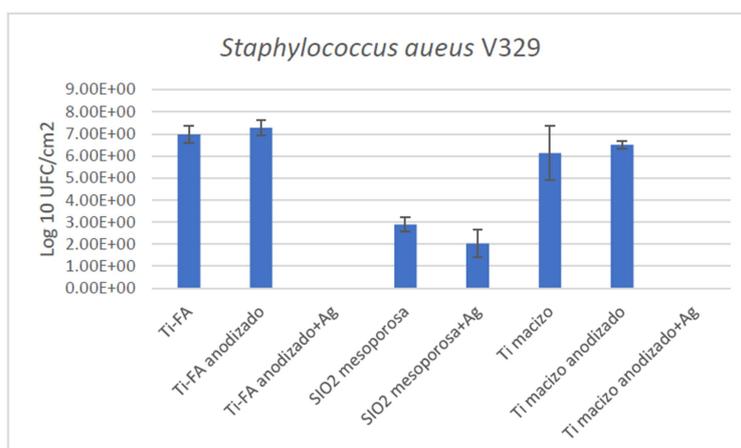


Figura 60. Actividad antibacteriana sobre *S. aureus* de los diferentes materiales analizados expresado en Log 10 UFC/cm².

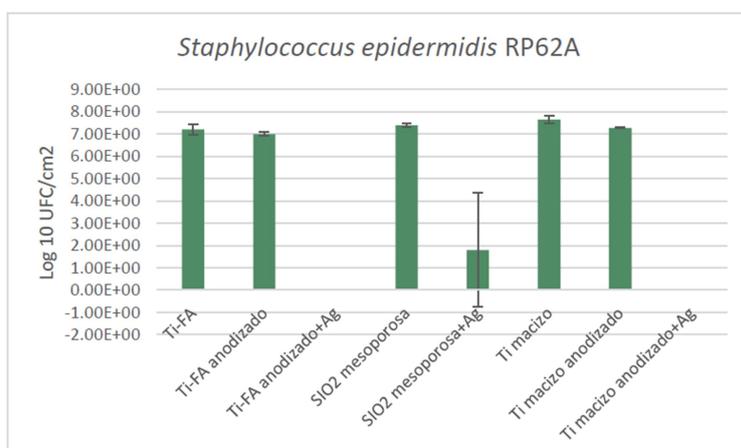


Figura 61. Actividad antibacteriana sobre *S. epidermidis* de los diferentes materiales analizados expresado en Log 10 UFC/cm².

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

Según los resultados obtenidos los materiales que mostraron mayor actividad antibacteriana frente a *S. aureus* y a *S. epidermidis* fueron Ti-FA anodizado-Ag y Ti macizo anodizado-Ag. Se obtuvo en ambos casos, con estos dos materiales una reducción de más de seis logaritmos con respecto al control, indicando una gran actividad antibacteriana.

Con respecto a la letalidad que se obtuvo para cada muestra con Ag los resultados fueron:

Para el Ti-FA anodizado-Ag una letalidad del 100% con respecto al Ti-FA anodizado, tanto para *S. aureus* como para *S. epidermidis*.

Para el Ti macizo anodizado-Ag una letalidad del 99,9999% y 99,9726% con respecto al Ti macizo anodizado, tanto para *S. aureus* como para *S. epidermidis*.

Para el SiO₂ mesoporoso-Ag una letalidad del 77,3810% y 99,9918% con respecto al SiO₂ mesoporoso.

Control antimicrobiano en AIDIMME

Se estudió la actividad antimicrobiana de distintas probetas de Titanio tras los tratamientos realizados en los apartados anteriores. Las bacterias estudiadas fueron: *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

Las probetas estudiadas fueron las siguientes:

FAC	Probetas de Ti6Al4V de Fabricación aditiva utilizadas como control.
FAAC	Probetas de Ti6Al4V de Fabricación aditiva anodizadas.
FAT tt+Ag	Probetas de Ti6Al4V de Fabricación aditiva con tratamiento térmico previo a la adición de nanopartículas de Ag.
FAT Ag+tt	Probetas de Ti6Al4V de Fabricación aditiva con adición de nanopartículas de Ag previa al tratamiento térmico.

MC	Probetas de Ti6Al4V macizas utilizadas como control.
MSC	Probetas de Ti6Al4V macizas cubiertas por Sílica Mesoporosa.
MSAg	Probetas de Ti6Al4V macizas cubiertas por sílica mesoporosa con adición de nanopartículas de Ag.

MC	Probetas de Ti6Al4V macizas utilizadas como control.
MAC10	Probetas de Ti6Al4V macizas anodizadas a 10

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

	Culombios.
MAAg10	Probetas de Ti6Al4V macizas anodizadas a 10 Culombios con adición de nanopartículas Ag.
MAC80	Probetas de Ti6Al4V macizas anodizadas a 80 Culombios.
MAAg80	Probetas de Ti6Al4V macizas anodizadas a 80 Culombios con adición de nanopartículas de Ag.

A continuación, a modo de ejemplo, se muestran los resultados obtenidos para la bacteria de *Staphylococcus epidermidis* para cada uno de los sustratos obtenidos.

Ensayo con *Staphylococcus epidermidis*.

Probetas de Fabricación aditiva (FAC, FAAC, FAT tt+Ag, FAT Ag+tt):

Los ensayos realizados con *S.epidermidis* para las probetas de fabricación aditiva anodizadas con nanopartículas de Ag fueron efectivas como antibacteriano, dándose lugar a porcentajes por encima del 99% de letalidad respecto a FAC y del 97% respecto a FAAC.

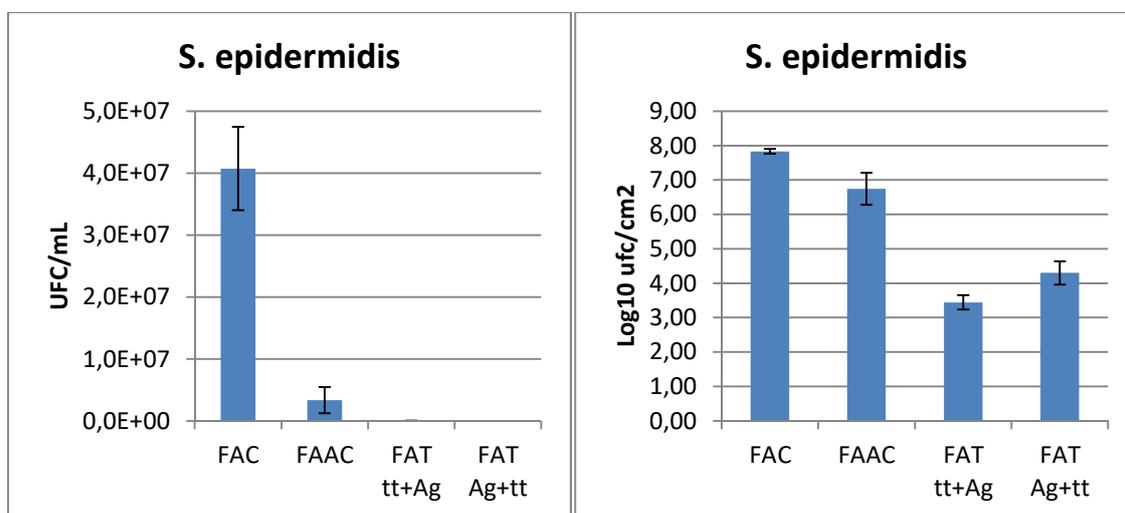


Figura 62. Cantidad de la bacteria *Staphylococcus epidermidis* formando biofilm alrededor de los diferentes tipos de probeta de Fabricación aditiva a las que se les ha aplicado tratamiento térmico previo a la deposición de nanopartículas de Ag y en probetas con deposición de nanopartículas de Ag previa al tratamiento térmico, expresado en UFC/mL y en Log UFC/cm².

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

Actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* en probetas de Fabricación Aditiva a las que se les ha aplicado tratamiento térmico previo a la deposición de nanopartículas de Ag y en probetas con deposición de nanopartículas de Ag previa al tratamiento térmico.

<i>S.epidermidis</i> . FA	-4	-2	UFC/mL	UFC/2mL	UFC/cm2	Log10 ufc/cm2	%Letalidad respecto FAC	%Letalidad respecto FAAC
FAC	4,07E+02		4,1E+07	8,15E+07	6,79E+07	7,83		
FAAC	3,33E+01		3,3E+06	6,67E+06	5,56E+06	6,74		
FAT tt+Ag	1,00E+00	1,67E+00	1,7E+03	3,33E+03	2,78E+03	3,44	100,00	99,95
FAT Ag+tt	3,33E-01	1,20E+01	1,2E+04	2,40E+04	2,00E+04	4,30	99,97	99,64

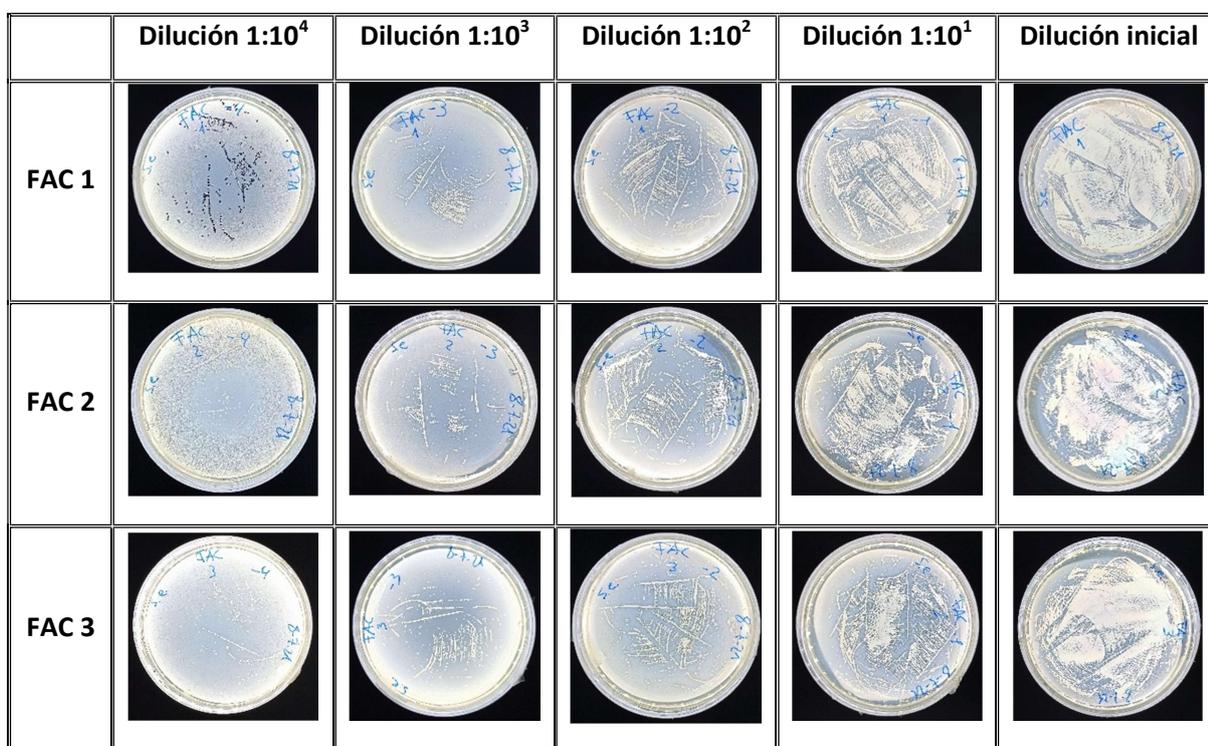


Figura 63. Placas Petri en las que se realizaron siembras de las diluciones 1:10⁰, 1:10¹, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, de *S.epidermidis* obtenido del biofilm formado tras 48 horas de incubación sobre probetas Control de Fabricación Aditiva (FAC).

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

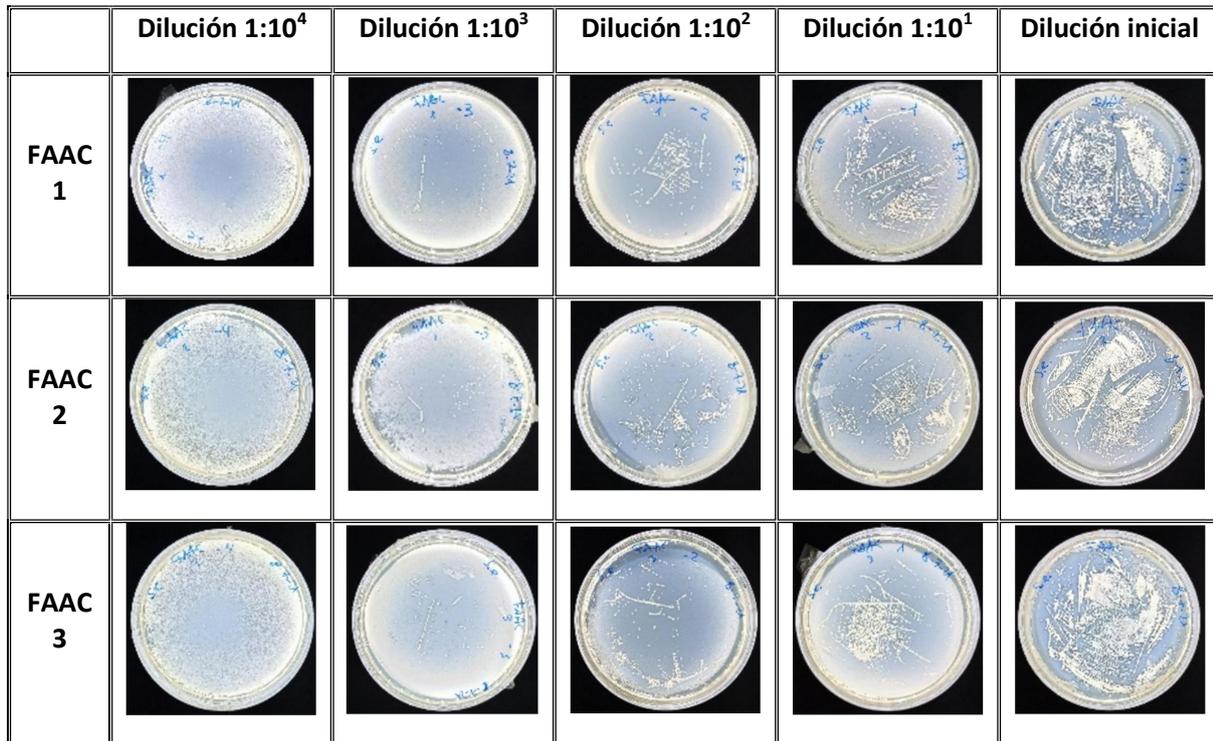


Figura 64. Placas Petri en las que se realizaron siembras de las diluciones 1:10⁰, 1:10¹, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, de *S.epidermidis* obtenido del biofilm formado tras 48 horas de incubación sobre probetas Control de Fabricación aditiva anodizadas (FAAC).

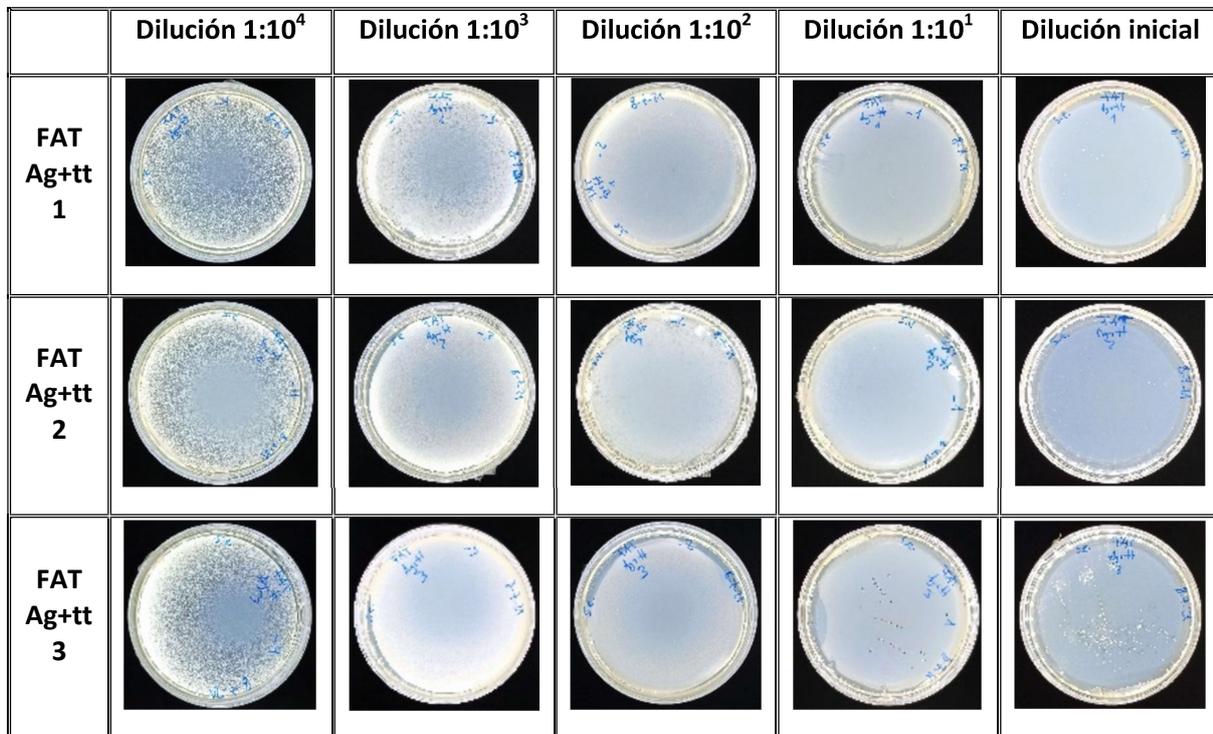


Figura 65. Placas Petri en las que se realizaron siembras de las diluciones 1:10⁰, 1:10¹, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, de *S.epidermidis* obtenido del biofilm formado tras 48 horas de incubación sobre

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

probetas Probetas Anodizadas con adición de nanopartículas de Ag previo al tratamiento térmico (FAT Ag+tt).

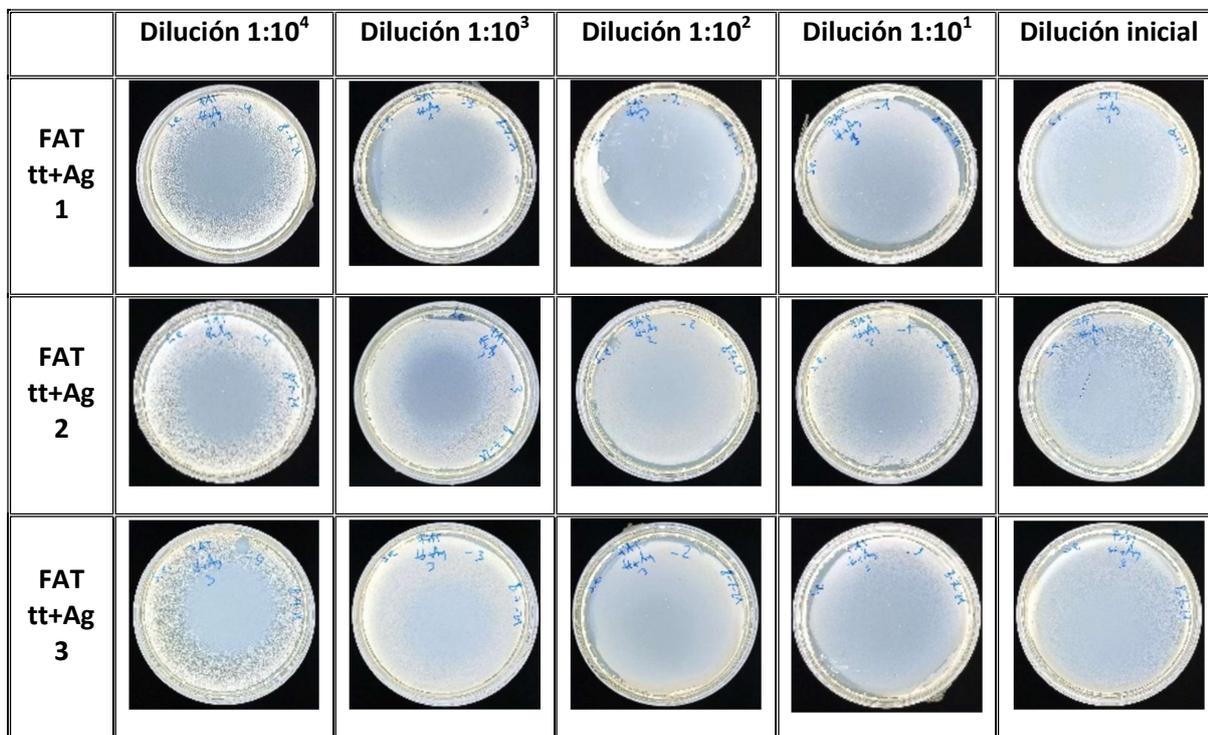


Figura 66. Placas Petri en las que se realizaron siembras de las diluciones $1:10^0$, $1:10^1$, $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, de *S.epidermidis* obtenido del biofilm formado tras 48 horas de incubación sobre probetas Anodizadas con tratamiento térmico previo a la adición de nanopartículas de Ag (FAT tt+Ag).

Probetas macizas recubiertas con sílica mesoporosa.

En el caso de ensayos realizados con *S.epidermidis* en probetas recubiertas por sílica mesoporosa, se obtuvieron mayor número de UFC/mL en probetas con Ag respecto a sus controles MC y MSC. De esta manera dieron lugar a porcentajes de letalidad de -52,59% respecto a MC y -24,44% respecto a MSC, no siendo efectivas sus propiedades antibacterianas.

Actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* por un lado en probetas macizas recubiertas por sílica mesoporosa con deposición de nanopartículas de Ag.

<i>S. epidermidis</i> Macizas	-4	UFC/mL	UFC/2mL	UFC/cm2	Log10 ufc/cm2	%Letalida d respecto MC	%Letalida d respecto MSC
MC	36,7	3,67E+06	7,34E+06	6,12E+06	6,79		
MSC	45,0	4,50E+06	9,00E+06	7,50E+06	6,88		
MSAg	56,0	5,60E+06	1,12E+07	9,33E+06	6,97	-52,59	-24,44

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

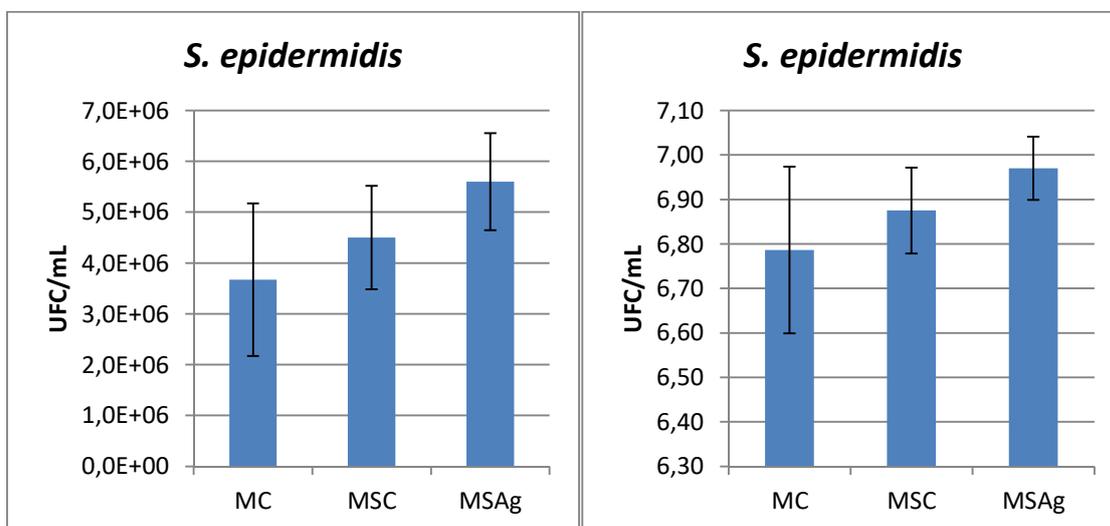


Figura 67. Cantidad de la bacteria *Staphylococcus epidermidis* formando biofilm alrededor de los diferentes tipos de probeta macizas recubiertas por sílica mesoporosa con deposición de nanopartículas de Ag expresado en UFC/mL y en Log UFC/cm².

Probetas macizas anodizadas

Los resultados obtenidos tras el ensayo con *S.epidermidis* para estudiar la actividad antibacteriana de probetas macizas anodizadas con deposición de nanopartículas de Ag mostraban una menor cantidad de UFC/mL en comparación con sus respectivos controles (MC, MAC10, MAC80). Asimismo, se obtuvieron valores elevados de letalidad tanto respecto a MC, 99,73 % en MAAg10 y 95,28% en MAAg80, como respecto a MAC10 y MAC 80; 99,87% y 98,72% respectivamente. Es decir, la Fabricación de biofilm disminuyó respecto a los controles en ambos casos dando lugar a un efecto antimicrobiano.

Actividad antibacteriana contra *Staphylococcus epidermidis* en probetas macizas anodizadas a 10 C y 80 C con deposición de nanopartículas de Ag.

<i>S.epidermidis</i> Macizas	1:10000	1:1000	1:100	UFC/mL	UFC/2mL	UFC/cm ²	Log10 UFC/cm ²	%Letalidad respect o MC	%Letalidad respect o MAC
MC	36			3,6E+06	7,20E+06	6,00E+06	6,78		
MAC10	77			7,7E+06	1,54E+07	1,28E+07	7,11		
MAAg10	0	0	9,7	9,7E+03	1,94E+04	1,62E+04	4,21	99,73	99,87
MAC80	133			1,3E+07	2,66E+07	2,22E+07	7,35		
MAAg80	0	17		1,7E+05	3,40E+05	2,83E+05	5,45	95,28	98,72

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

					5	5			
--	--	--	--	--	---	---	--	--	--

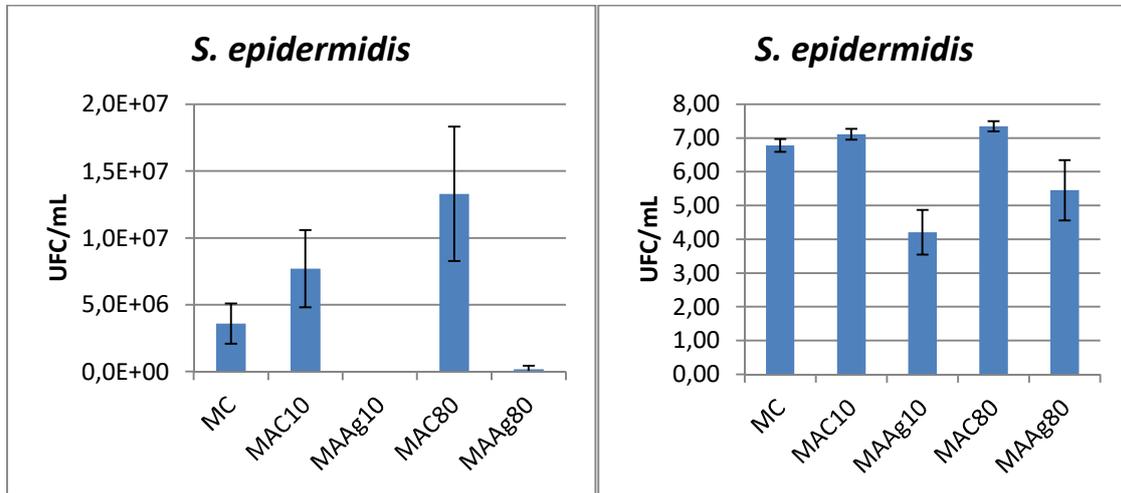


Figura 68. Cantidad de la bacteria *Staphylococcus aureus* formando biofilm alrededor de los diferentes tipos de probeta maciza anodizadas a 10 C y 80 C con deposición de nanopartículas de Ag en UFC/mL y en Log UFC/cm².

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

	Dilución 1:10 ⁴	Dilución 1:10 ³	Dilución 1:10 ²	Dilución 1:10 ¹	Dilución 1:10 ⁰
MAC1 01					
MAC1 02					
MAC1 03					

Figura 69. Placas Petri en las que se realizaron siembras de las diluciones 1:10⁰, 1:10¹, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, de *S.epidermidis* obtenido del biofilm formado tras 48 horas de incubación sobre probetas macizas anodizadas en una corriente de 10 C.

Se	Dilución 1:10 ⁴	Dilución 1:10 ³	Dilución 1:10 ²	Dilución 1:10 ¹	Dilución 1:10 ⁰
MAAg1 01					
MAAg1 02					
MAAg1 03					

Figura 70. Placas Petri en las que se realizaron siembras de las diluciones 1:10⁰, 1:10¹, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, de *S.epidermidis* obtenido del biofilm formado tras 48 horas de incubación sobre probetas macizas anodizadas en una corriente de 10 C con adición de nanopartículas de Ag.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

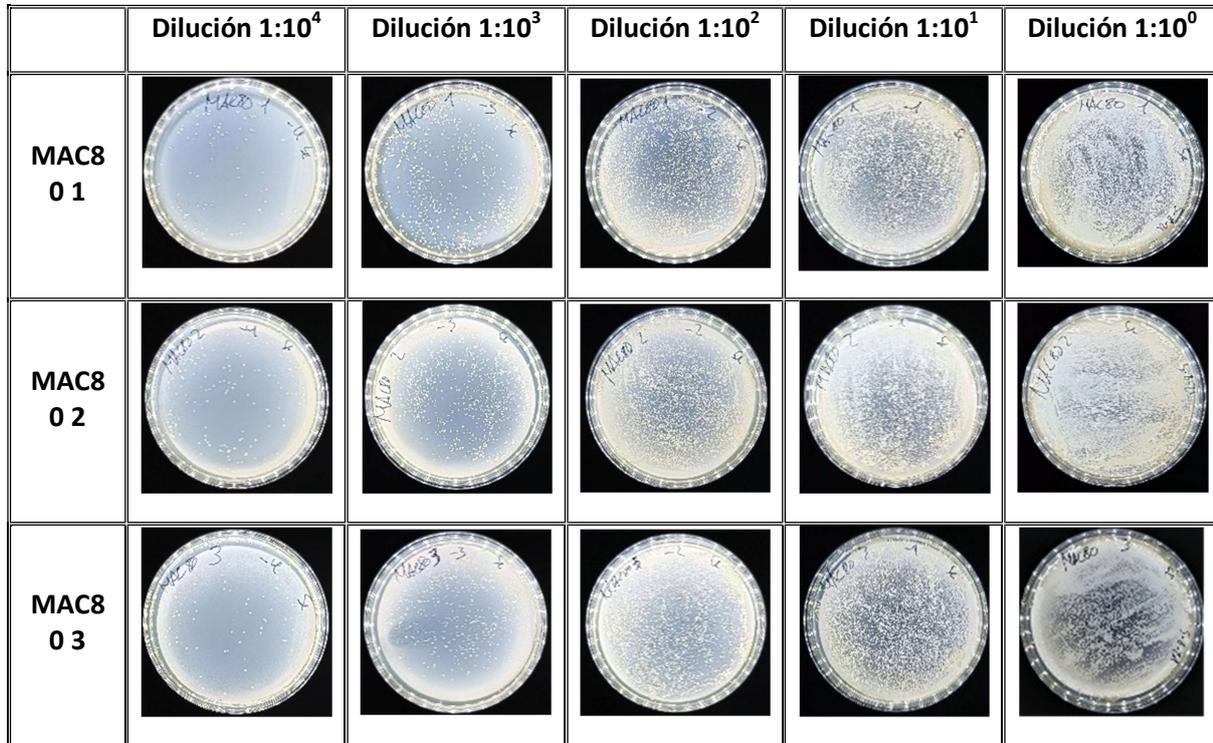


Figura71. Placas Petri en las que se realizaron siembras de las diluciones 1:10⁰, 1:10¹, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, de *S.epidermidis* obtenido del biofilm formado tras 48 horas de incubación sobre probetas macizas anodizadas en una corriente de 80 C.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

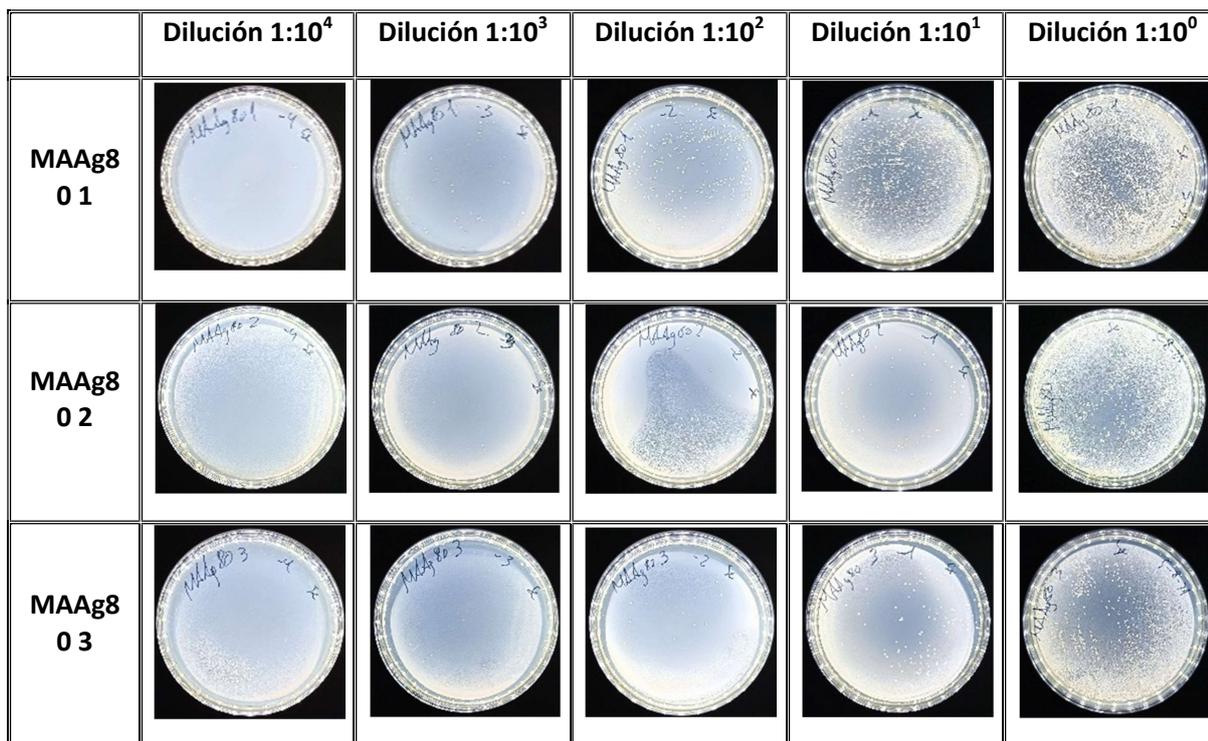


Figura 72. Placas Petri en las que se realizaron siembras de las diluciones $1:10^0$, $1:10^1$, $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, de *S.epidermidis* obtenido del biofilm formado tras 48 horas de incubación sobre probetas macizas anodizadas en una corriente de 80 C con adición de nanopartículas de Ag.

En los ensayos realizados con *S.epidermidis* en probetas FAT tt+Ag, FAT Ag+tt, MAAg10 y MAAg80 se ha comprobado una disminución en la formación del biofilm en comparación a sus respectivos controles.

Tabla resumen del efecto antibacteriano de los distintos tipos de probetas con nanopartículas de Ag al biofilm formado por *S.epidermidis*.

<i>S.epidermidis</i>	FAC	FAAC	MC	MSC	MAC10	MAC80
FAT tt+Ag	99,75	97,00				
FAT Ag+tt	99,92	99,00				
MSAg			0	0		
MAAg10			99,73		99,87	
MAAg80			95,28			98,72

Ensayos con *Escherichia coli* sobre Probetas con Puertas Moleculares

Se obtuvieron valores elevados de letalidad tanto respecto a probetas control (99,987%) como a probetas control anodizadas (99,988%). Es decir, la formación de biofilm disminuyó respecto a los controles dando lugar a un efecto antimicrobiano.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

Pasado el tiempo de incubación de cada siembra incubada 72 horas se contaron las UFC de cada dilución, dándose lugar a los siguientes resultados.

En las siembras realizadas a las 72 horas de incubación, el porcentaje de letalidad de *E.coli* fue muy elevada, dándose lugar a valores por encima el 99,99% y a una actividad antibacteriana efectiva contra *E.coli* en este tipo de probetas.

Actividad contra *Escherichia coli* a las 72 horas de incubación, en probetas de titanio con nanopartículas de Ag y puertas moleculares, respecto a probetas de Titanio controles (TiC) y controles anodizadas (TiA).

	Dilución 1:10000	Dilución 1:1	UFC/mL	UFC/10m L	UFC/cm 2	Log10 ufc/cm 2	%Letalida d respecto TiC	%Letalida d respecto TiA
<i>E.coli</i>								
TiC	2,90E+01		2,9E+07	2,90E+08	2,42E+08	8,38		
TiA	2,70E+01		2,7E+07	2,70E+08	2,25E+08	8,35		
TiPM		1,00E+00	1,0E+01	1,00E+02	8,33E+01	1,92	99,99997	99,99996
C+	2,75E+01		2,8E+07	2,75E+08	2,29E+08	8,36		

En los ensayos realizados con *E.coli* en probetas con puertas moleculares se dio lugar a un menor número de UFC/mL crecido sobre probetas del ensayo respecto a las probetas control, y control anodizadas.

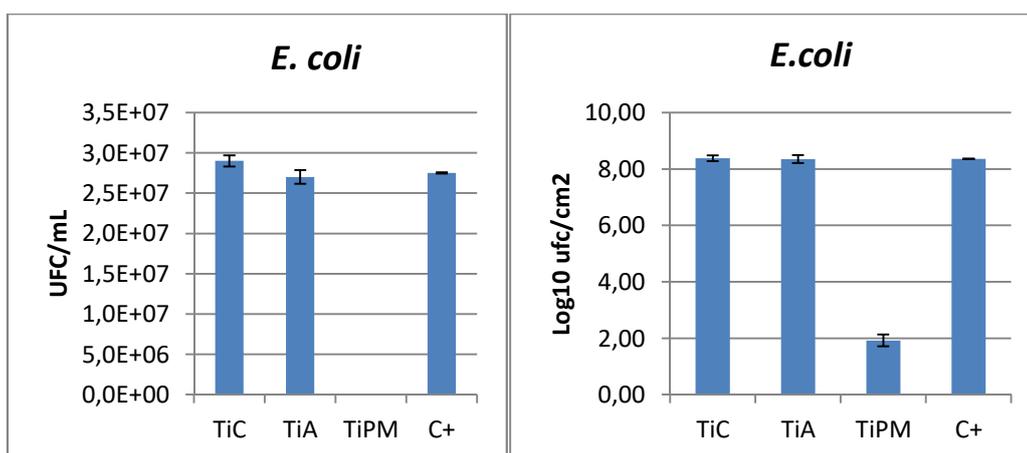


Figura 73. Cantidad de *Escherichia coli* formando biofilm alrededor de probetas con deposición de nanopartículas de Ag y puertas moleculares a las 72 horas de incubación expresado en UFC/mL y en Log UFC/cm².

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

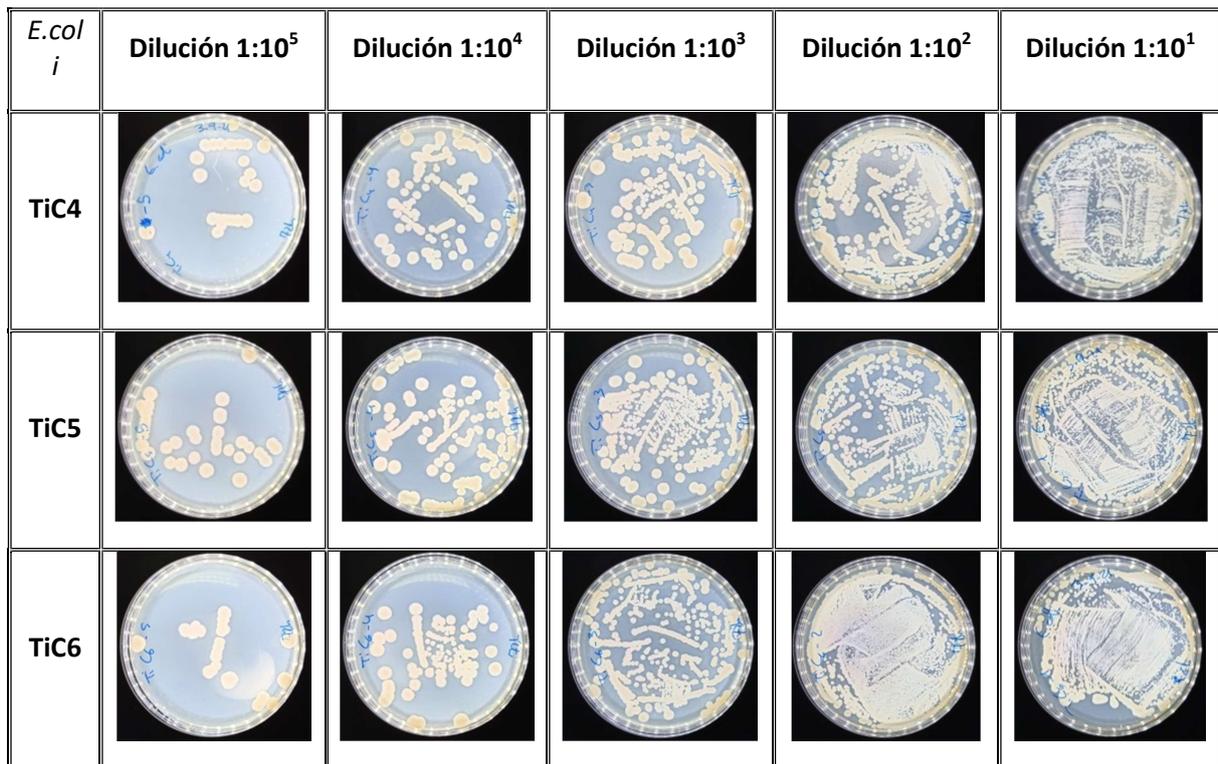


Figura 74. Placas Petri en las que se realizaron siembras de las diluciones 1:10¹, 1:10², 1:10³, 1:10⁴ y 1:10⁵ de *E.coli* obtenido del biofilm formado tras 72 horas de incubación sobre probetas de Titanio Control.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

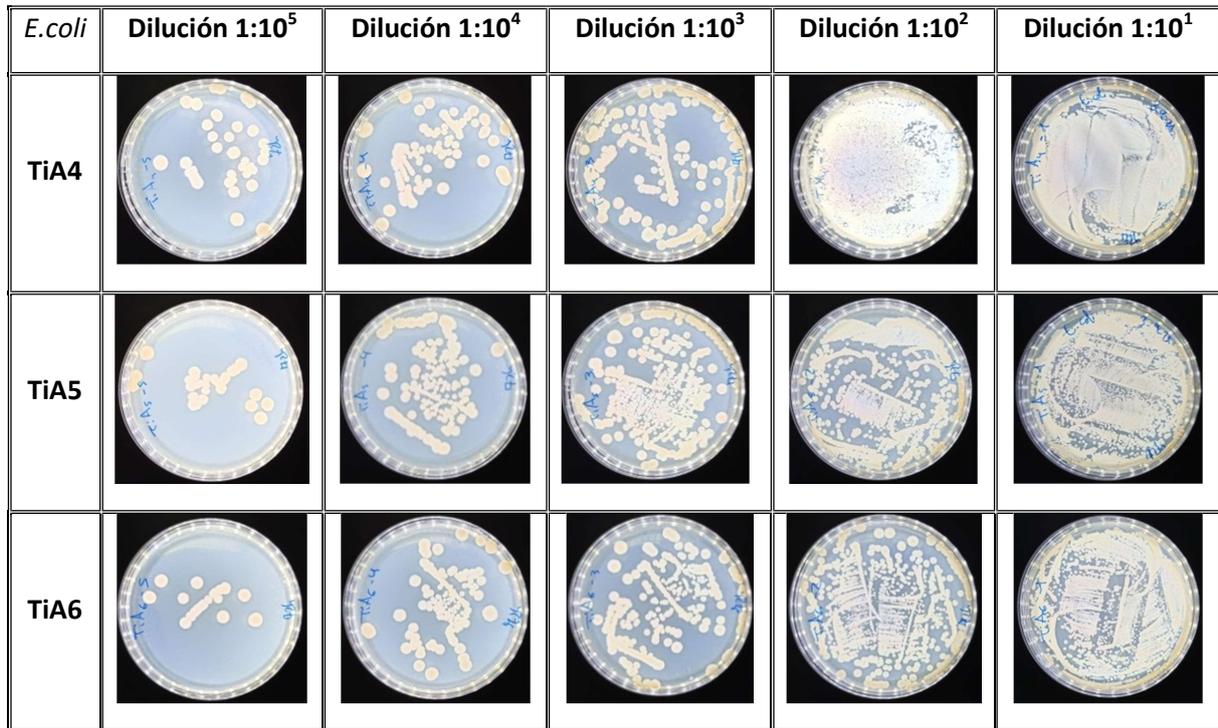


Figura 75. Placas Petri en las que se realizaron siembras de las diluciones 1:10¹, 1:10², 1:10³, 1:10⁴ y 1:10⁵, de *E.coli* obtenido del biofilm formado tras 72 horas de incubación sobre probetas de Titanio Anodizado Control.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

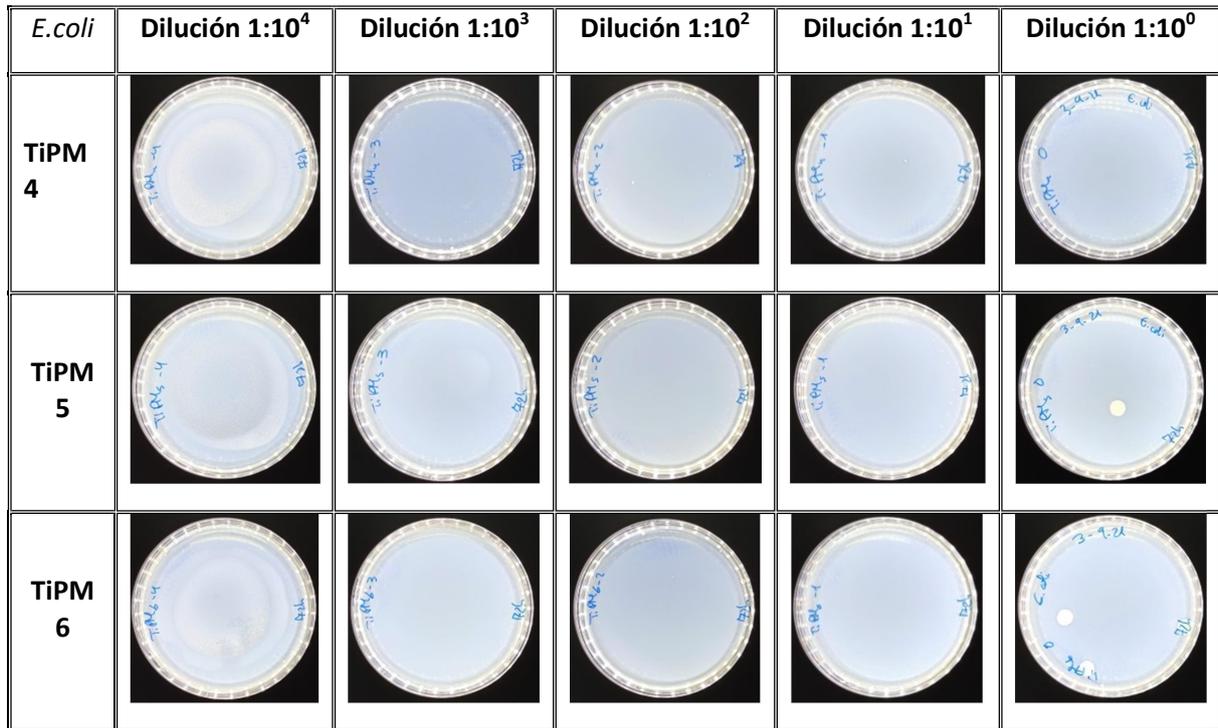


Figura 76. Placas Petri en las que se realizaron siembras de las diluciones 1:10⁰, 1:10¹, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, de *E.coli* obtenido del biofilm formado tras 72 horas de incubación sobre probetas de Titanio con nanopartículas de Ag y Puertas Moleculares.

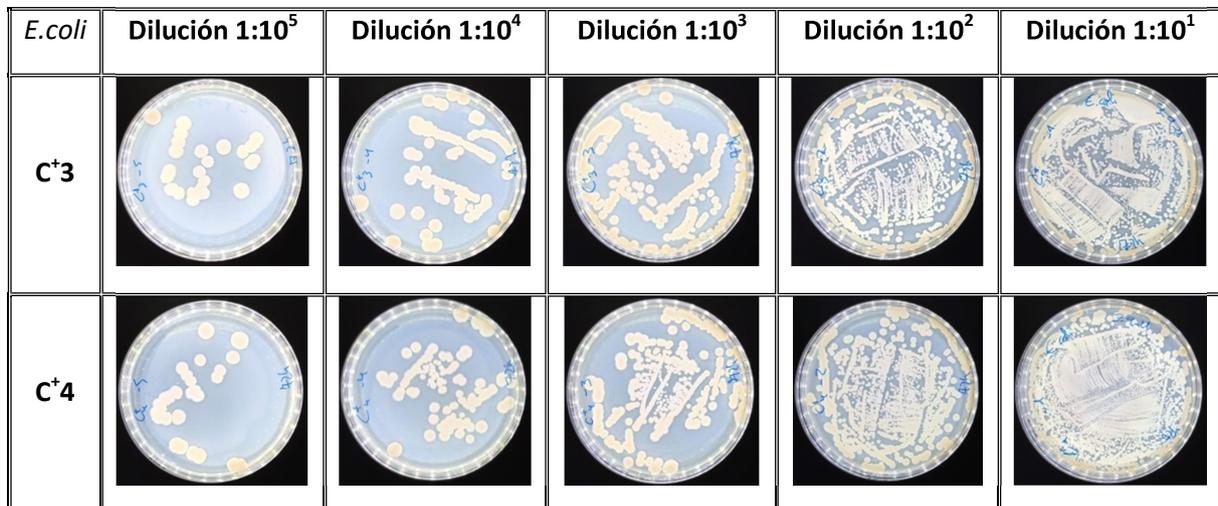


Figura 77. Placas Petri en las que se realizaron siembras de las diluciones 1:10¹, 1:10², 1:10³, 1:10⁴ y 1:10⁵ de *E.coli* obtenido tras 72 horas de incubación del inóculo Control.

“MESOGEL” – Recubrimientos antimicrobianos nano y mesoestructurados para prótesis basados en anodizado y recubrimientos sol-gel

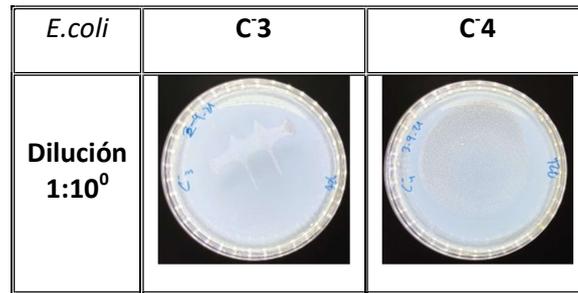


Figura 78. Placas Petri en las que se realizaron siembras de la dilución 1:10⁰ del Control negativo tras 72 horas de incubación.

Tabla resumen del efecto antibacteriano sobre el biofilm formado por *E.coli* en probetas con puertas moleculares a las 24, 48 y 72 horas de incubación.

<i>E.coli</i>	TiC	TiA
Ti PM 24h	99,987	99,988
Ti PM 48h	99,99999	99,99999
Ti PM 72h	99,99997	99,99996

Se puede observar que existe un efecto bacteriano claro para ambas probetas para distintos tiempos de siembra de bacterias *E. coli*.