



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES  
MAESTRÍA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES**

**“Comparación de la respuesta electrónica y adhesión bacteriana en películas delgadas amorfas y cristalinas de óxidos metálicos”**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES**

**P R E S E N T A:**

**Rey Galicia Palacios**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dra. Sandra Elizabeth Rodil Posada  
del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM**

**México D.F. de julio de 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

A CONACYT-152995 y proyectos DGAPA-PAPIIT (IN118814, IN118914 and IG100113). **Por el apoyo financiero para la realización del proyecto**

A CONACYT por la beca de maestría.

**A la Dra. P. Silva-Bermudez por el apoyo en el desarrollo de la investigación. Al Dr. H. Zarco por su asistencia técnica en el laboratorio. Al Dr. L. Huerta por el apoyo en mediciones de XPS, así como al Dr. A. Tejeda por mediciones de difracción de rayos-X. y al Dr. O. Novelo por imágenes del SEM.**

**A las Dras. Sandra Elizabeth Rodil Posadas, Argelia Almaguer Flores y Phaedra Silva Bermudez, así como al Dr. Stephen Muhl Saunders por su valiosa enseñanza y asesoría durante mi estancia en el instituto de materiales y en el posgrado de odontología de la UNAM.**

**Al Dr. Jónatan Pérez Álvarez por su valiosa ayuda en el análisis de datos electroquímicos.**

## **DEDICATORIAS**

A mi madre Georgina Palacios Vázquez, a mis hermanos Ingrid, Dayam, Emmanuel y a mi tía Beatriz, los cuales sé que pase lo que pase siempre estarán ahí conmigo y yo con ellos.

A mi abuelita, con la que alguna vez volveré a reunirme.

## ÍNDICE GENERAL

### CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Biomateriales .....	2
1.1.1 Requerimientos de un biomaterial .....	3
1.1.2 Óxidos de Titanio como biomaterial .....	4
1.1.3 Óxido de Circonio como biomaterial .....	6
1.2 Corrosión .....	6
1.2.1 Definición .....	6
1.2.2 Clasificación de tipos de Corrosión .....	7
1.2.3 Curvas de polarización, medición de la tasa de corrosión .....	11
1.3 Adhesión bacteriana en dispositivos de uso biomédico .....	16
1.3.1 Características de <i>Escherichia coli</i> .....	20
1.3.2 Características de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN .....	24
OBJETIVOS .....	25
HIPÓTESIS .....	25

### CAPITULO II

2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
2.1 Síntesis de películas de óxidos metálicos .....	26
2.1.1 Preparación de las superficies para pruebas de corrosión .....	26
2.1.2 Preparación de las superficies para pruebas de adhesión bacteriana .....	26
2.1.3 Depósito de películas delgadas de óxidos metálicos sobre superficies de Titanio .....	26
2.2 Caracterización de las películas delgadas de los óxidos metálicos .....	29
2.2.1 Microscópica Electrónica de Barrido (SEM) .....	29
2.2.2 Difracción de Rayos X (XRD) .....	29
2.2.3 Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS) .....	30

2.2.4 Medición del ángulo de contacto .....	30
2.2.5 Perfilometría .....	31
2.3 Ensayos de corrosión .....	31
2.4 Pruebas de adhesión bacteriana.....	32
<i>CAPÍTULO III</i>	
3 RESULTADOS .....	34
3.1 Caracterización de las superficies.....	34
3.1.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	34
3.1.2 Difracción de Rayos X (XRD) y Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS) .....	37
3.1.3 Mojabilidad por medio del ángulo de contacto .....	40
3.1.4 Perfilometría .....	41
3.2 Ensayos de corrosión .....	42
3.3 Pruebas de adhesión bacteriana .....	47
4 DISCUSIÓN .....	53
5 CONCLUSIONES .....	57
6 BIBLIOGRAFÍA .....	59

# ***CAPITULO I***

## **1 INTRODUCCIÓN**

Los implantes ortopédicos son cada vez más utilizados en el área médica y odontológica para reemplazar las funciones normales de huesos o dientes perdidos. Estos dispositivos son generalmente de titanio (Ti) o aleaciones de Ti ya que este material presenta excelentes propiedades mecánicas y biocompatibles en el cuerpo humano, así como un índice de corrosión bajo. Aunque la tasa de éxito de los implantes es alta aún existen problemas asociados a su uso como la presencia de infecciones que pueden ocasionar el retiro del dispositivo.

En esta tesis se trabajó con películas delgadas cristalinas y amorfas de óxido de titanio y óxido de circonio depositadas sobre discos de titanio puro con el objetivo de comparar las respuestas a la adhesión bacteriana y a la corrosión debido al ordenamiento atómico. Estos recubrimientos fueron depositados sobre superficies de titanio con rugosidades diferentes; micrométrica (*rough sandblasted acid-etched, SLA*) y submicrométrica (*smooth pretreatment, PT*). Se hicieron pruebas de adhesión bacteriana usando dos cepas bacterianas distintas: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y se realizaron ensayos de corrosión. Los detalles de los procedimientos se darán más adelante.

Desde el punto de vista de los materiales, se tiene muy claro que las propiedades físicas y químicas de los materiales son una consecuencia de su estructura. En gran medida se han obtenido correlaciones entre la estructura y propiedades funcionales particulares. Gran parte de los materiales metálicos o cerámicos que utilizamos en la vida diaria son cristalinos o poli cristalinos, es decir, estos materiales tienen sus átomos distribuidos de forma periódica en estructuras que se repiten indefinidamente en las tres direcciones. La cristalinidad en la mayor parte de los materiales es el estado de mínima energía y por lo tanto el más estable en condiciones atmosféricas de presión y temperatura. Esta estructura define sus propiedades físicas y el ejemplo clásico de lo drástico que pueden ser las diferencias en la estructura química son el diamante y el grafito. Ambos conformados puramente de átomos de carbono, pero que al tener un ordenamiento atómico diferente, presentan propiedades totalmente opuestas entre sí; aislante a conductor, transparente a opaco, etc. Dentro de los materiales también encontramos aquellos que no presentan un orden atómico, son los materiales amorfos o no cristalinos. En este caso, no hay una estructura base (átomos o moléculas) que se repita ordenadamente en todo el espacio. Existe un orden de corto alcance definido por las moléculas que lo conforman, pero a distancias mayores no puede determinarse como se repetirán dichas estructuras. El ejemplo clásico en este caso es el vidrio, de allí que muchos materiales amorfos también son

clasificados como "vidrios". Como es de esperarse, algunas propiedades físicas de los materiales amorfos serán diferentes a la de sus contrapartes cristalinas. No hay forma de predecir que tan diferentes serán dichas propiedades, ni cuales serán diferentes. Las aleaciones metálicas amorfas conocidas como metales-vidriosos (*metallic glasses*) son una propuesta actual del material del futuro incluso para aplicaciones biomédicas. Su mayor viscosidad y la falta de fronteras de grano les confieren mayor resistencia al desgaste y a la corrosión. Finalmente los óxidos o cerámicos vidriosos mantienen algunas de las propiedades típicas de los cerámicos, como lo es la resistencia química, pero la resistencia a la fractura puede ser mejorada. Los óxidos metálicos propuestos como tema de estudio en éste trabajo pueden depositarse de forma cristalina o amorfa de acuerdo a las condiciones utilizadas durante dicho depósito. En este trabajo se plantea depositarlos en forma de películas delgadas sobre sustratos metálicos (titanio puro), la función de estos recubrimientos es proveer al sustrato de una mayor resistencia a la corrosión siendo a su vez un material biocompatible y posiblemente con propiedades anti-bacteriales.

## 1.1 Biomateriales

Los biomateriales se definen como materiales que son usados para reemplazar o mejorar una parte biológica de un ser vivo, el cual estará en contacto con los tejidos circundantes. Los biomateriales pueden ser colocados en diferentes partes del cuerpo humano; como en válvulas artificiales del corazón, en dispositivos distensores "*stent*" dentro de vasos sanguíneos, implantes de remplazo de hueso o cartílago en hombros, caderas, rodillas, codos, orejas, o estructuras dentales. Actualmente los biomateriales pueden ser metálicos, cerámicos, poliméricos, o una combinación de estos [1-5,11].

La creciente demanda de implantes con mayor durabilidad y compatibilidad eleva la importancia de desarrollar nuevos biomateriales que cumplan con los requisitos y estándares demandados [5].

Para poder crear un biomaterial que aporte soluciones a una persona se deben conocer ciertas características del cuerpo humano. Algunas de las características que nos interesan en esta tesis son las que se mencionan a continuación.

El agua contenida en el cuerpo varía entre un 40 a un 60% del total del peso. Este líquido puede ser entendido de dos formas: como fluido extracelular o como fluido intracelular. Dichos líquidos mantienen cierta cantidad de sustancias. El mecanismo que regula al cuerpo conocido como homeostasis mantiene una cantidad constante y normal de electrolitos, dentro y fuera de las células.

El rango normal de pH del plasma de la sangre está entre 7.35 y 7.45, si la acidez se encuentra por debajo se llama acidosis y por arriba alcalosis. La rápida entrada de sustancias biológicas (e. g., bicarbonato, fosfatos, y proteínas) inmediatamente combinadas con ácidos o álcalis que entran a los fluidos corporales prevén drásticos cambios en el pH. Si no se puede estabilizar de ésta forma, respuestas fisiológicas como la respiración o la respuesta del sistema urinario sirven como segunda defensa en contra de un cambio dañino en el pH, sin embargo cuando se tiene una herida el pH puede bajar a 3.5 o bien subir hasta 9.0 [11, 12]. Los electrolitos juegan un papel muy importante en la funcionalidad del cuerpo, formando parte en el metabolismo, determinando el potencial de membrana y la osmoralidad de los fluidos del cuerpo, por ejemplo. La mayor parte de los cationes son el hidrógeno, sodio, potasio, iones de magnesio y calcio. La mayor cantidad de aniones incluyen hidróxidos, bicarbonatos, cloro, fosfatos e iones sulfatos. Bajo condiciones normales la temperatura de los fluidos es de 37 °C.

### **1.1.1 Requerimientos de un biomaterial**

Los requerimientos de un biomaterial son variados dependiendo del uso que se les quiera dar, además existen diferentes organizaciones que regulan y estandarizan los requerimientos (International Standards Organization (ISO) y The Americans Society for Testing and Materials (ASTM)). La biocompatibilidad a groso modo es la aceptación del material por los tejidos circundantes así como del cuerpo como un todo [11]

Un biomaterial debe ser biocompatible es decir no debe ser rechazado por el organismo, no debe ser tóxico o carcinogénico, debe ser químicamente estable e inerte, no debe alterar las proteínas del plasma (incluyendo enzimas); no debe causar formación de trombosis o una reacción inmune adversa; no debe destruir o dañar los elementos celulares de la sangre, producir respuestas toxicas o alérgicas, o agotar los electrolitos; debe tener buenas propiedades mecánicas tales como dureza, elasticidad, buena resistencia a la fatiga de acuerdo a la duración programada en el cuerpo, tener densidades y pesos adecuados, tener un buen diseño y adaptabilidad [5, 6, 10, 11]

Las propiedades físicas y químicas del biomaterial están relacionadas con el desgaste y la corrosión ya que una resistencia al desgaste y a la corrosión además de alargar el tiempo de vida del biomaterial en el cuerpo reduce el riesgo de reacciones alérgicas y de intoxicación [5] debido a los iones liberados o a las partículas liberadas durante la corrosión y el desgaste, es decir, están relacionados con la reacción inducida en el huésped por el material y la degradación del material en

el lugar trasplantado o colocado, características muy importantes de biocompatibilidad. Una última consideración es la osteointegración y baja adherencia bacteriana. Si el implante no está bien integrado al hueso, entre el implante y el hueso se forma tejido fibroso [6], además una adherencia alta de microorganismos como las bacterias causará una infección y el posterior rechazo del implante. La competencia entre adhesión bacteriana o adhesión celular sobre la superficie del biomaterial puede influir en una buena integración o en el rechazo o infección de la prótesis o implante [8, 9].

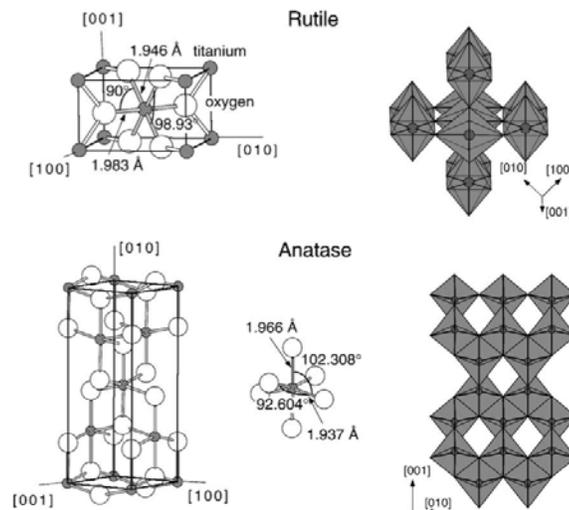
La composición química, la estructura y la morfología o topografía son características importantes de la superficie que define la respuesta de un biomaterial [50-52]. Respecto a la influencia del ordenamiento atómico o a la fase en la respuesta a la adhesión bacteriana de un biomaterial, se sabe poco o bien los resultados no son concluyentes [71-73]

Aunque en la práctica, no existe un material sintético que sea inerte y completamente armonioso con el cuerpo, la respuesta de un biomaterial puede ser mejorada cambiando la química y las propiedades físicas de su superficie [1] adhiriendo grupos químicos específicos para estimular la adhesión ósea o la formación de hueso en implantes ortopédicos, induciendo rugosidad o porosidad para estimular la unión física con el tejido circundante, o usando un componente bioresorbable para permitir un lento remplazo del tejido para así estimular las propiedades naturales de restauración del cuerpo. Algunas propiedades físico-químicas de las superficies que se han determinado afectan la respuesta celular, se encuentran: la mojabilidad (hidrofobicidad o hidrofiliidad de la superficie), energía superficial, rugosidad, textura, composición química, carga superficial y morfología [6].

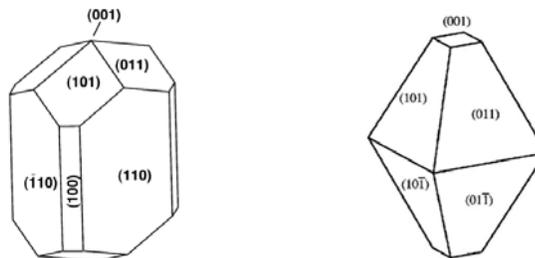
### **1.1.2 Óxidos de Titanio como biomaterial**

Desde los años treinta se comenzó a introducir el titanio y posteriormente sus aleaciones para uso de prótesis [11]. El titanio comercialmente puro (*CP*) (ASTM F67) es uno de los biomateriales más comunes usado en implantes óseos. El óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) es usado como un recubrimiento resistente a la corrosión, y se sabe de su biocompatibilidad debido a que la capa pasiva de los implantes de Titanio está formada por  $\text{TiO}_2$ . Además el  $\text{TiO}_2$  se puede usar como degradador de moléculas orgánicas por procesos de fotocatalisis asistido con luz UV (rayos UV). Por sus propiedades ópticas se usa como pintura, en recubrimientos ópticos (por ejemplo, antireflejante, filtros, espejos dieléctricos para laser, etc.) por último, puede usarse en la industria de la microelectrónica [7, 60].

El óxido de titanio cristaliza principalmente de tres formas: rutilo (tetragonal,  $a = b = 0.4584$  nm,  $c = 0.2953$  nm), anatasa (tetragonal,  $a=b= 0,3782$  nm,  $c=0.9502$  nm) y broquita (rombohédrica,  $a= 0.5436$  nm,  $b= 0.9166$  nm y  $c= 0.5135$  nm). En esta tesis sólo se estudiaron anatasa y rutilo cuyas unidades de empaquetamiento o unidades de celda constan de un átomo de titanio rodeado de 6 átomos de oxígeno, en ambas estructura hay dos enlaces entre el titanio y oxígeno un poco más largos que los enlaces restantes (figura 1). Los radios atómicos del oxígeno y del titanio son respectivamente 0.066nm y de 0.146, sin embargo como iones  $O^{2-}$  y  $Ti^{+4}$  cambian a 0.14 y 0.064 nm respectivamente [60]. La construcción de Wulff de Rutilo y anatasa se muestran en la figura 2.



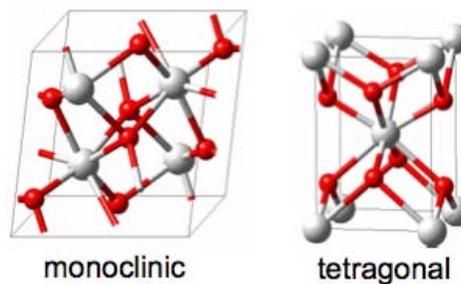
**Figura 1.** Estructuras en bulto de rutilo y anatasa. En ambas estructuras, octaedros ligeramente distorsionadas son las unidades básicas de construcción. Las longitudes y ángulos de enlace de los átomos coordinados octaédricamente Ti se indican y el apilamiento de los octaedros en ambas estructuras se muestra en el lado derecho. Tomado de U. Diebold [60]



**Figura 2.** La forma macroscópica en equilibrio del cristal  $TiO_2$  en su fase rutilo (izquierda) y en fase de anatasa (derecha) usando la construcción de Wulff, tomado de Ramamoorthy y Vanderbilt [61]. 5 1994 *The American Physical Society*.

### 1.1.3 Óxido de Circonio como biomaterial

El circonio (Zr) es un metal muy usado como biomaterial, sobre todo en el campo de la odontología. No se han encontrado efectos toxicológicos adversos, considerándolo un material biocompatible. Una de las formas en las que se le puede encontrar en la naturaleza es como óxido ( $ZrO_2$ ) en un mineral llamado Badeleyita o bien como circón ( $ZrSiO_4$ ) de estos dos minerales se puede extraer el circonio. El óxido de circonio puede presentar tres fases cristalinas: monoclinica, tetragonal o cúbica. La más estable a temperatura ambiente es la monoclinica (por debajo de  $1170\text{ }^\circ\text{C}$ , le sigue la tetragonal a temperaturas de entre  $1170$  y  $2370\text{ }^\circ\text{C}$  y por último la cúbica por encima de los  $2370\text{ }^\circ\text{C}$ ). Las fases que nos interesan son las dos primeras (figura 3). Las dimensiones de las redes y ángulos para la fase monoclinica son  $a = 0.526\text{nm}$ ,  $b = 0.505\text{nm}$ ,  $c = 0.566\text{nm}$ ,  $\alpha = \gamma = 90^\circ$ , y  $\beta = 98.16^\circ$  y para la fase tetragonal tenemos que  $a = b = 0.510\text{nm}$ ,  $c = 0.523\text{nm}$ . En ambas estructuras el circonio está presente como catión ( $Zr^{4+}$ ) [62]



**Figura 3.** Fase monoclinica y tetragonal del óxido de circonio, las esferas pequeñas en color rojo representan a los átomos de circonio, los blancos a los de oxígeno. Con parámetros de red aproximados  $a = b = 0.510\text{nm}$ ,  $c = 0.523\text{nm}$  para la fase tetragonal y para la fase monoclinica  $a = 0.512\text{nm}$ ,  $b = 0.516\text{nm}$ ,  $c = 0.533\text{nm}$ , y  $\theta = 99.6$  grados.

## 1.2 Corrosión

### 1.2.1 Definición

Los materiales, y en especial los metales, son obtenidos a partir de especies minerales estables en las condiciones naturales. Por lo tanto, una vez extraídos y ser expuestos a las condiciones ambientales, con el tiempo tienden a estabilizarse química y energéticamente, es decir, termodinámicamente regresan a su estado de óxidos o hidróxidos [63]. Al paso espontaneo de estos materiales a su estado natural combinado se le llama corrosión la cual se da por reacciones químicas o electroquímicas de un metal o aleación con su medio circundante y el subsiguiente deterioro de las propiedades de dicho metal o aleación [13, 14, 16]. Los materiales no metálicos, como los polímeros o

cerámicos, tienen un mecanismo de deterioro distinto al de los metales y en estos casos se habla de degradación [14].

### 1.2.2 Clasificación de tipos de corrosión

Existen diferentes clasificaciones, dos de ellas son con relación a su morfología y la otra por el medio que lo produce.

- **CORROSIÓN SEGÚN LA MORFOLOGÍA DEL ATAQUE:**

Dada la forma o el área en que empieza o se difunde la corrosión en los metales podemos hablar de diferentes tipos de corrosión dada su morfología:

**a) Morfología uniforme o superficial.** El ataque se extiende de forma homogénea por la superficie del material. Es la forma más benigna o menos peligrosa ya que como se va desgastando gradualmente extendiéndose en forma homogénea sobre toda la superficie metálica es posible evaluar con bastante exactitud la vida de servicio de dicho metal.

**b) Corrosión en lacas o selectiva.** El ataque no es homogéneo sino en ciertas zonas.

**c) Corrosión por picaduras.** El ataque se localiza en zonas aisladas de no más de 1 ó 2 mm<sup>2</sup>. Generalmente la corrosión por picadura ocurre en metales que poseen una capa pasiva, tales como Al, Ti, Zr y sus aleaciones. La corrosión por picadura ataca zonas a un nivel microscópico. Sigue dos pasos, uno es el de iniciación y el segundo de propagación, el segundo ha sido mayormente entendido [15]. El flujo o la rapidez con que un metal pasivo se corroe es del orden de 10<sup>-6</sup> A/cm<sup>2</sup> mientras que en el de corrosión por picadura la corriente llega a ser del orden de 10 A/cm<sup>2</sup>, es decir, un millón de veces más grande. Se asocia con un bajo pH y alta concentración de haluros y cloruros así como precipitación de sales. Un alto potencial entre la picadura y la superficie mantiene el crecimiento acelerado de la picadura. La forma de la picadura puede ser muy variada, dependiendo de la química y de la microestructura del material [1].

**d) Corrosión en resquicio.** Se presenta en uniones, zonas de traslape, zonas roscadas, en general en regiones mal aireadas o en las cuales la renovación del medio corrosivo está condicionada por mecanismos de difusión

**e) Corrosión intergranular.** Se localiza en los límites de grano del material metálico.

**f) Corrosión bajo tensión o fisurante.** Cuando el metal está sometido a tensión mecánica de tracción aplicada o residual. Este tipo de corrosión bien podría estar en la clasificación según el mecanismo, sin embargo se colocó aquí dado que el lugar en que comienza a corroerse es precisamente en el área bajo tensión, señalando un lugar específico.

- CORROSIÓN SEGÚN EL MECANISMO DE ATAQUE:

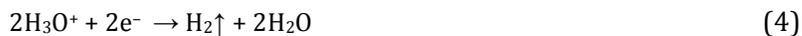
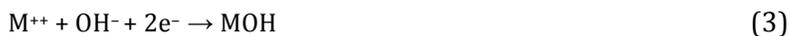
Si ahora nos guiamos por la descripción de cómo sucede y se desarrolla la corrosión podemos resumir que la corrosión se produce por alguno de los tres modos a continuación:

**a) Corrosión electroquímica y galvánica.** La corrosión galvánica se da por el contacto de dos metales uno de los cuales es el ánodo y el otro el cátodo, sin embargo también puede darse en un sólo metal que tenga imperfecciones o no sea homogéneo en su estructura aunque sea a escala nanoscópica o microscópica, como en el caso de un material cristalino, o bien inhomogéneo. En un material granulado, los intersticios, o las fronteras de granos sirven como ánodos. El metal sufre disolución en las regiones anódicas. En las regiones catódicas no hay ataque. Si se tiene una región anódica y otra catódica sumergida en un electrolito la corrosión es conocida como corrosión electroquímica.

Esta corrosión electroquímica se da cuando el metal o los metales están en contacto con medios de conductividad electrolítica: agua, soluciones salinas, humedad de la atmósfera, etc. Al llegar los electrones al cátodo, estos salen del metal uniéndose a unidades oxidantes captadoras de electrones inmersas en la solución que rodea al metal (electrolito), Un ejemplo de reacciones en agua es el siguiente.



Las reacciones catódicas, dadas en la zona negativa, son reacciones de reducción,



Se consideran activos a los metales de baja energía de ionización y nobles a los de alta energía de ionización. Los metales de potencial de reducción mayores (nobles) suelen comportarse como cátodo, los metales con un potencial menor son los activos y se comportan como ánodo, (figura 4).

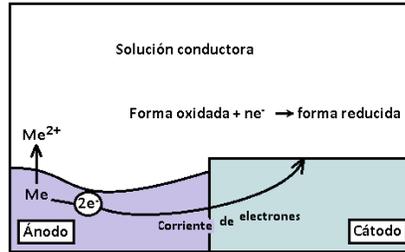


Figura 4. Corrosión galvánica

**b) Corrosión directa.** Se da principalmente cuando el material opera a altas temperaturas y de esta forma no hay humedad en la superficie. Característica a la que se da en los metales expuestos a gases y vapores calientes. Generalmente es  $O_2$  produciendo la siguiente reacción:



La reacción tiene la misma posibilidad de producirse en cualquier punto de la superficie, siendo un proceso homogéneo o generalizado. Se producen generalmente óxidos, que si no se difunden o volatilizan, forman una capa o película pasivante (figura 5) que protege el metal dificultando la corrosión.

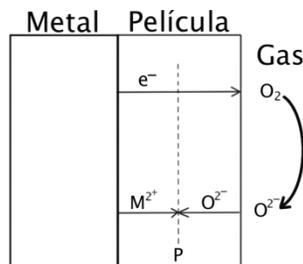
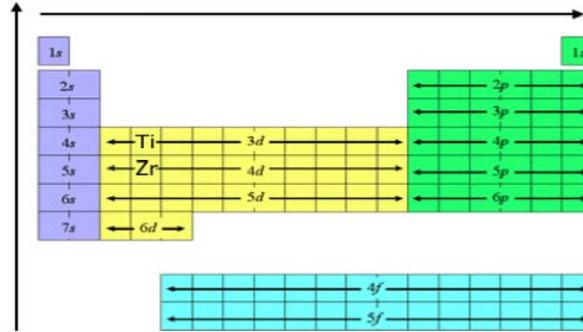


Figura 5. La película pasivante interfiere con la corrosión

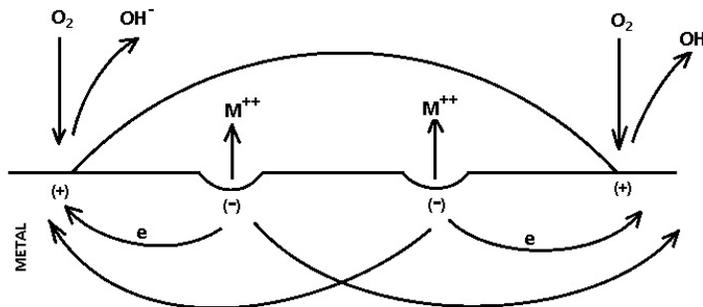
A mayor potencial de ionización mayor nobleza y mayor tendencia a la forma reducida (neutros). A menor potencial de ionización más activo y mayor tendencia a su forma oxidada (figura 6).



**Figura 6.** La energía de ionización aumenta en el sentido de las flechas. Se muestra al titanio y al circonio, ambos en el mismo grupo, perteneciendo a la misma familia de metales, comparten características similares como alta y resistencia a la corrosión

**c) Corrosión Microbiológica** o corrosión inducida por microorganismos (CIM). Se produce en tuberías e instalaciones por la actuación de organismos microbianos (hongos, bacterias, y otros microorganismos), ya sea porque estos fabriquen sustancias agresivas, tales como protones o iones sulfuro o porque actúan como catalizadores de las reacciones de corrosión.

La mayoría de los organismos activos son bacterias que reducen u oxidan compuestos de azufre como parte de su metabolismo. Las bacterias sulfato reductoras permiten que ocurra la corrosión en situaciones en las cuales no es de esperar que ésta ocurra: a un pH neutro y en ausencia virtual de oxígeno. También hay organismos que contribuyen a la corrosión debido a que interfieren en el acceso al oxígeno [14, 65], dando lugar a la corrosión por aireación diferencial (figura 7).



**Figura 7.** El organismo (en el medio) impide un acceso de oxígeno creando una diferencia en el medio circundante al metal, facilitando de esta forma un transporte de iones debido a zonas anódicas por el asentamiento de dicho organismo. Tomado de R. Javaherdashti [65]

### 1.2.3 Curvas de polarización, medición de la tasa de corrosión

El flujo electrónico y la pérdida de metal durante la corrosión sigue las leyes de Faraday por lo que se libera una cantidad equivalente de iones metálicos,  $m$  (en moles) por cada coulomb  $Q$  que circulen por el circuito divididos por el número de electrones,  $n$  intercambiados en la reacción redox y la constante de Faraday  $F$  (96,487 C/mol) que corresponden a la carga creada debido a las reacciones en el metal con el electrolito,

$$m = \frac{Q}{nF} \text{ (segunda ley de Faraday)} \quad (7)$$

La corrosión se da debido a que los metales tienden a regresar a su forma encontrada en la naturaleza, los metales puros más nobles es decir los termodinámicamente más estables serían una excepción ya que algunos se encuentran puros en la naturaleza, sin embargo la mayoría posee una tendencia o fuerza impulsora que corroe al metal. Dicha energía libre asociada a la reacción electroquímica se representa por la ecuación

$$\Delta G = -nFE \text{ (trabajo eléctrico reversible a presión constante)} \quad (8)$$

Donde  $\Delta G$  es el cambio de energía libre de Gibbs,  $n$  es el número de electrones en moles involucrados en la reacción,  $F$  es la constante de Faraday y  $E$  el potencial de la celda para condiciones estándar [16], sin embargo para condiciones no estándares la ecuación cambia a

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln(Q) \quad (9)$$

Como  $\Delta G^\circ = -nFE^\circ$  al sustituir en la ecuación anterior obtenemos la ecuación de Nernst,

$$E = E^\circ + (RT/nF) \ln(Q) \quad (10)$$

Dónde  $R$  es la constante de los gases ( $8.3143 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ),  $E^\circ$  es el potencial electroquímico estándar,  $T$  la temperatura absoluta,  $F$  la constante de Faraday,  $n$  el número de moles del ión y  $Q$  el cociente de concentraciones de los productos con los reactivos. Es decir, el nuevo potencial depende de las concentraciones de los iones metálicos en la disolución.

La ecuación de Nernst es un caso especial de la ecuación de Butler-Volmer, la cual toma la forma,

$$j = j_o e^{\frac{\eta_a}{\beta_a}} - j_o e^{\frac{\eta_c}{\beta_c}} \quad (11)$$

Donde  $\beta_a$  y  $\beta_c$  son los coeficientes de Tafel anódico y catódico respectivamente:

$$\beta_a = \frac{RT}{\alpha nF} \quad \beta_c = \frac{RT}{(1-\alpha)nF} \quad (12) \text{ y } (13)$$

La velocidad de las reacciones electródicas están controladas por el proceso de transferencia de carga en la interfase electrodo/electrolito, a este proceso se le conoce como control de activación o control activacional, y al sobrepotencial correspondiente como sobrepotencial activacional ( $\eta_a$ ). Por otro lado  $\alpha$  y  $1-\alpha$  corresponden a los coeficientes de transferencia y su suma es uno. El mecanismo que se da en los electrodos es complejo sin embargo la ecuación 11 expresa el fenómeno de forma global, de esta forma los coeficientes  $j_o$ ,  $\beta_a$  y  $\beta_c$  son fáciles de medir y a partir de estos parámetros usando logaritmos y aproximando a valores extremos se pueden obtener dos rectas Tafel [63] (figuras 8).

La región, zona o dominio de Tafel anódico, se da cuando el potencial es de la forma  $\eta/\beta_a \gg 1$ . La ecuación que obtenemos es:

$$\eta = \beta_a \ln j_o + \beta_a \ln j \text{ ó bien, tomando logaritmos en base diez} \quad (14)$$

$$\eta = a_a + b_a \log j, \text{ donde} \quad (15)$$

$$a_a = -2.303 \beta_a \ln j_o \text{ y} \quad (16)$$

$$b_a = 2.303 \beta_a \quad (17)$$

Y para el dominio catódico Tafeliano, donde  $\eta/\beta_c \ll 1$ .

$$\eta = \beta_c \ln j_o + \beta_c \ln |j| \quad (18)$$

$$\eta = a_c + b_c \log |j|, \text{ donde} \quad (19)$$

$$a_c = -2.303 \beta_c \ln |j_o| \text{ y} \quad (20)$$

$$b_c = 2.303 \beta_c \quad (21)$$

Cuando se obtiene una curva de polarización experimental, la extrapolación de las rectas que aparecen en el dominio Tafeliano nos dan el potencial de equilibrio y podemos determinar la densidad de corriente de intercambio en donde la corriente catódica se iguala a la corriente anódica, de otra forma no sería posible encontrar dichas corrientes ya que la corriente neta es cero. Al potencial y a la densidad de corriente correspondientes a la intersección de las rectas se les llama

potencial de corrosión y densidad de corriente de corrosión respectivamente ( $E_{corr}$ ,  $J_{corr}$ , figura 8) Por ejemplo si tuviéramos las reacciones parciales

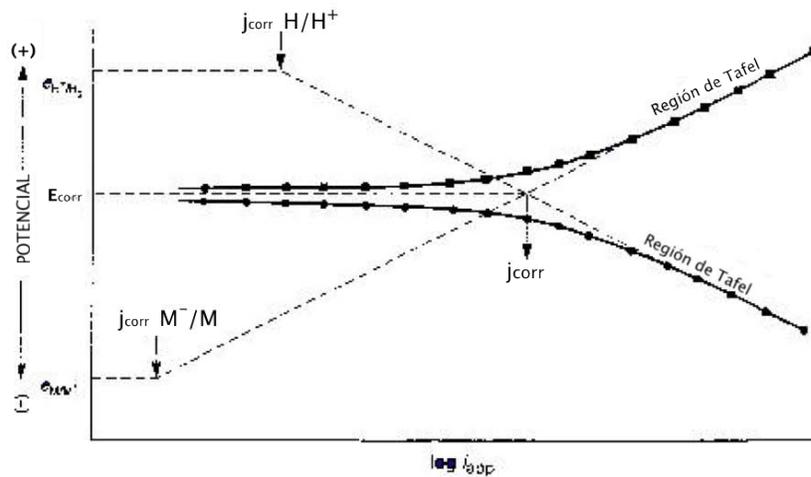


Podemos ajustarlas a las expresiones,

$$j_a = j_{corr} \exp\left(\frac{\alpha n F \eta_a}{RT}\right) \quad (22)$$

$$j_c = j_{corr} \exp\left(\frac{-(1-\alpha)n F \eta_c}{RT}\right) \quad (23)$$

Donde  $F$ ,  $n$ ,  $R$ ,  $T$ ,  $\alpha$  y  $\eta$  son como se han definido renglones arriba y  $j_{corr}$  es la densidad de corriente de corrosión buscada, la cual como ya se dijo se puede transformar en pérdida de peso o de espesor a partir de la segunda ley de Faraday. Estas expresiones se pueden obtener a partir de la ecuación (14)



**Figura 8.** Corrosión de un metal en medio ácido. Se extrapolan las rectas anódicas (metal) y la catódica (hidrógeno) cuya intersección nos da la densidad de corriente relacionada con la corrosión el metal. Tomado de J. Genescá [17]

En el equilibrio eléctrico cuando tenemos el potencial de corrosión las velocidades de corrosión se anulan (la anódica y la catódica)

Pero cuando rompemos dicho equilibrio polarizando de forma externa al electrodo, se aprecia de forma experimental una corriente resultante o total de la suma algebraica de los procesos parciales:

$$j_t = j_a + j_c = j_{corr} \exp\left(\frac{anF\eta_a}{RT}\right) - j_{corr} \exp\left(\frac{-(1-\alpha)nF\eta_c}{RT}\right) \quad (24)$$

En los límites de alto y bajo potencial y extrapolando se puede obtener la velocidad de corrosión [17-19]. O bien podemos escribir el sobrepotencial como:

$$\eta = \frac{-2.3RT}{anF} \log(j_{corr}) + \frac{2.3RT}{anF} \log(j_a) = a + b_a \log j_a \quad (25)$$

Un metal dentro de un electrolito tendrá una  $j_{corr}$  determinada por el primer término, o la constante “a” de la ley de Tafel. Para  $\eta=0$  ó bien, cuando  $E=E_{corr}$ , tenemos,

$$j_a = |j_c| = j_{corr} \quad (25)$$

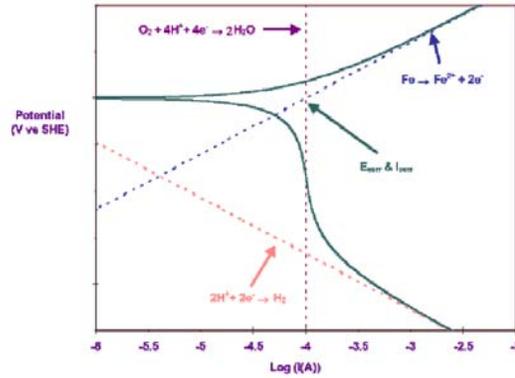
Desafortunadamente en la práctica no siempre se podrá extrapolar por no tener un comportamiento lineal (Tafeliano) en sentido anódico y/o catódico debido, entre otros factores a [17]:

a) La velocidad de la reacción está controlada por la velocidad a la que llegan las especies reactivas a la superficie metálica. A menudo las reacciones catódicas presentan una polarización por concentración para altos valores de corriente, cuando la difusión del  $O_2$  o de los iones  $H^+$  no es lo suficientemente rápida como para mantener un control cinético activacional.

b) Un control mixto del proceso de corrosión cuando más de una reacción, anódica o catódica, pueden ocurrir simultáneamente, puede complicar el modelo. Un ejemplo de control mixto es la reducción simultánea del  $O_2$  y  $H^+$ .

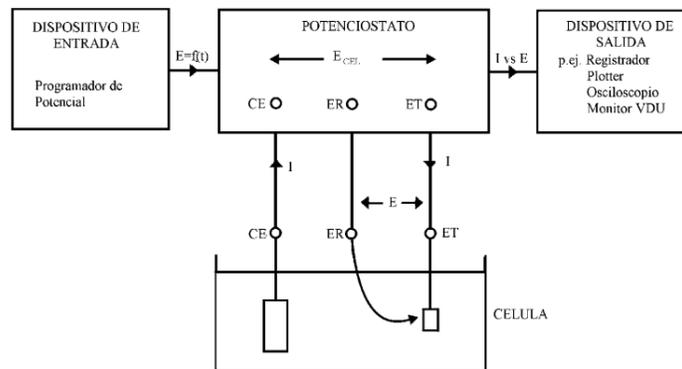
c) Por último, otra causa de error en el modelo cinético controlado únicamente por activación, necesario para la validez de la ecuación de Tafel, es la caída de potencial que tiene lugar como resultado del paso de la corriente que circula por la celda a través de la resistencia eléctrica del electrolito de la misma celda. Si este efecto no es muy severo puede llegar a corregirse (compensarse) con el dispositivo de compensación de IR del propio potencióstato.

Éstos factores dan como resultado graficas no Tafelianas, es decir no lineales (figura 9) y no es posible extrapolar para obtener la velocidad de corrosión, sin embargo es posible describir comportamientos de forma cualitativa, pero teniendo en cuenta que los resultados no son del todo concluyentes [17,18].



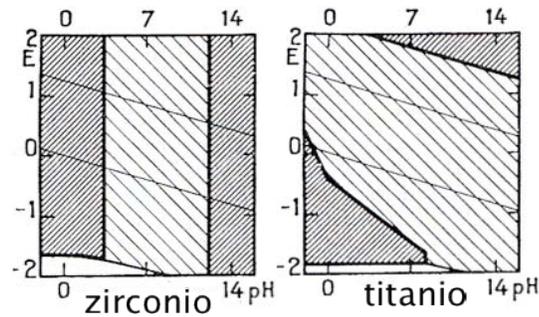
**Figura 9.** Ejemplo de una curva de polarización electrodinámica de la corrosión de acero en un medio ácido con oxígeno disuelto, en el cual el proceso catódico está limitado por la difusión de  $O_2$ . Tomado de J. Genescá [17]

Un montaje habitual [18] para el estudio de corrosión electroquímica de un metal es el que se representa en la figura 10,



**Figura 10.** Montaje de una celda o célula electroquímica para el estudio de corrosión del electrodo de trabajo (ET), el cual se mide la diferencia de potencial entre dicho electrodo y el electrodo de referencia (ER) la medición es asistida por un tercer electrodo, el contra-electrodo (CE). Tomado de W. Frank [18]

En un proceso corrosivo intervienen diferentes factores, como los que ya vimos en las ecuaciones estudiadas, sin embargo existen otros factores como el pH el cual influye ya sea que se dé o no la corrosión para cierto sobrepotencial, se puede encontrar información de dicha influencia con ayuda de los diagramas de Pourbaix [11, 20] (figura 11), sin embargo, en la práctica no se deben tomar al pie de la letra, guiándose más por los resultados experimentales para las condiciones particulares.



**Figura 11.** Diagramas de Pourbaix para circonio y titanio

### 1.3 Adhesión bacteriana en dispositivos de uso biomédico

Las bacterias están asociadas a diferentes enfermedades así como a infecciones debidas a dispositivos de uso biomédico tales como catéteres, stents, fijaciones metálicas en fracturas, implantes dentales, unión de prótesis, válvulas cardiacas, implantes de mama, etc.. Prácticamente cualquier implante es susceptible de ser colonizado por estos microorganismos, por lo que es importante entender el mecanismo de contacto que usan las bacterias para poder adherirse y colonizar diversas superficies.

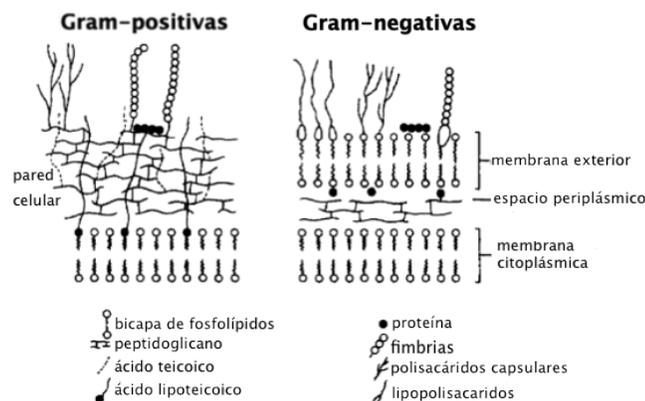
La constitución química de las bacterias es variada, para las Gram positivas se tiene una composición química global en la pared celular de 20 a 60% de azúcares, de 1 a 2.5% de lípidos y de 24 a 35% de aminoácidos, para las Gram negativas de 20 a 60% de azúcares, de 10 a 20% de lípidos y aproximadamente 50% de aminoácidos [68]. La palabra bacteria se implementó para nombrar a todos los microorganismos procariontes unicelulares; sin embargo, la evolución en el estudio molecular ha demostrado que los microorganismos procariontes se pueden agrupar en dos dominios: Bacteria y Archaea [67, 69]

El tamaño promedio de una bacteria es de 0.15 $\mu$ m a 2 $\mu$ m, sin tomar en cuenta los flagelos y otras extensiones. Poseen una carga negativa sobre su superficie en niveles naturales de pH del cuerpo humano. Dependiendo de las sustancias poliméricas secretadas por el microorganismo, la capa externa de la célula puede ser hidrofóbica o hidrofílica [67].

Las bacterias se pueden clasificar según la tinción desarrollada por Hans Christian Gram (1884), en dos tipos de bacterias, las Gram positivas y las Gram negativas. El fundamento de dos tipos de tinción se encuentra en las diferencias en la envoltura celular, principalmente en el grosor de la capa de peptidoglucano de la pared celular [27, 69].

Las bacterias Gram positivas presentan una pared gruesa celular de aproximadamente 15-80 nm de grosor y una membrana citoplasmática de fosfolípidos. La pared celular está formada de peptidoglicano (llamado también mureína o mucopéptido) compuesto por cadenas de polisacárido enlazadas por péptidos que contienen D-aminoácidos. La densidad del peptidoglicano varía a lo largo de toda la capa con una densidad media de 20% (w/v). Por otra parte, las bacterias Gram negativas además de pared celular de 1-2nm de grosor y membrana citoplasmática tienen una membrana externa y lipopolisacáridos (LPSs). Tienen también un espacio llamado periplásmico entre la membrana externa y la membrana citoplasmática abarcando a la capa de peptidoglicano. La membrana externa de las Gram negativas contiene poros, formados por agregados de proteínas, que facilitan el transporte selectivo de moléculas a través de la membrana [27, 33] (figura 12).

Debido a que las moléculas transportadas selectivamente incluyen especies cargadas, se da una diferencia de potencial a través de la membrana. Sin embargo, hasta la fecha no se ha encontrado una diferencia significativa del potencial zeta entre bacterias Gram negativas y Gram positivas[33], dicho potencial, de forma simplificada, es una medida de la interacción electrostáticas entre superficies, en este caso una de las superficie es el de las bacterias (generalmente de carga negativa) también juega un papel el medio iónico en que estén sumergidas las superficies a interactuar. Para concentraciones iónicas altas el potencial zeta ( $\zeta$ ) aumenta volviéndose menos negativo [33, 55, 83].



**Figura 12.** Pared celular de bacterias Gram-negativa y Gram-positivas Tomado de A. T. Poortinga [33]

Las fimbrias o pilis son filamentos finos de proteínas que se distribuyen sobre la superficie de la bacteria, tienen un diámetro de aproximadamente 2 a 10nm y una longitud de 0.2 a 2.0  $\mu\text{m}$ . Sirven como adherencia a receptores específicos y contienen residuos de aminoácidos hidrofóbicos.

Muchas bacterias pueden producir una capsula que las recubre con un grosor de 200nm. Esta cápsula está formada de proteínas, polisacáridos, glicoproteínas, lipopolisacáridos y ácidos urónicos y está implicada en la adherencia superficial y en la formación de biopelículas [21, 33, 34].

En resumen, las superficies de las bacterias es muy compleja comparadas con coloides no biológicos. En agua la mayor parte de las bacterias tienen carga neta en su superficie, debido a la asociación o disociación con protones en un medio con pH entre 5 y 7 ó hasta mayor, la mayoría está cargada negativamente debido a que el número de grupos fosfato y carboxilos es mayor que de aminoácidos así como de grupos básicos [27, 33]. La dependencia del pH en la adhesión bacteriana sobre metales se puede asociar no sólo a la interacción de iones  $H^+$  y  $OH^-$  así como otros iones en la superficie de la bacteria, sino además por las reacciones redox que existen entre el metal y dichos iones [27].

Un biofilm o biopelícula es esencialmente un conjunto de células bacterianas altamente organizadas, que se encuentran adheridas a un sustrato y que están embebidas en una matriz de exopolisacáridos que las mismas producen. La mayor parte de las bacterias permanecen adheridas a la superficie con ayuda de éste ecosistema estructurado llamado biopelícula y no como organismos flotando en un medio acuoso [29]. En el mundo natural, más del 99% de las bacterias existen como una biopelícula y se estima que las bacterias que viven en esta estructura son hasta mil veces más resistentes a los antibióticos y a las defensas del organismo huésped que sus contrapartes que no viven en una biopelícula [31, 47].

A pesar de que la formación de la biopelícula en varios sitios puede ser diferente, todas las biopelículas tienen la misma secuencia de formación. El primer paso es la formación de una capa de moléculas orgánicas adsorbida, generalmente llamada “película de acondicionamiento” o “película condicionante”, que está constituida por los componentes orgánicos del medio acuoso que rodea la superficie en donde se formará la biopelícula (por ejemplo, agua de mar, leche, lágrimas, orina, sangre, saliva etc.) [9]. La absorción de moléculas orgánicas tales como proteínas sobre una superficie puede jugar un papel importante en la adhesión de bacterias, de esta forma un ambiente tal puede alterar las propiedades físico-químicas de la superficie [27,35].

Una vez formada la película condicionante sobre el sustrato las bacterias se acercarán hacia el sustrato por diferentes fuerzas físicas o químicas como: corrientes en los fluidos corporales, quimiotaxis, movimiento de microorganismos en respuesta de un gradiente de ciertas sustancias químicas, movimiento browniano, difusión, convección y fuerzas de gravedad [23, 24, 27, 28].

Las bacterias deben vencer la barrera de Gibbs para llegar a una distancia óptima para lograr el contacto con la superficie, esta energía es la suma de las interacciones de van der Waals, comúnmente atractivas y las electrostáticas, usualmente repulsivas. Sin embargo, por lo general la bacteria y el sustrato tienen carga negativa [27, 35, 66], probablemente debido a la carga no homogénea de la bacteria, las extensiones como los polisacáridos y las fimbrias, un área extensa de contacto, entre otros factores, se puede romper de una forma más fácil esta barrera. Al transporte hacia el sustrato lo suficientemente cerca para permitir la adhesión inicial lo llamaremos primera etapa.

La primera etapa es reversible ya que las bacterias se adhieren sobre el sustrato debido a interacciones débiles (fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, etc.) durante esta etapa las bacterias presentan un movimiento Browniano y pueden ser removidas con fuerzas de cizalla debido a fluidos, por ejemplo por medio de un enjuague. Se estima que la primera etapa puede darse en unos segundos o en algunos minutos volviéndose irreversible [27, 28, 37, 54]. Las fuerzas de Van der Waals y electrostáticas están presentes entre 10 y 100nm de distancia. Estas fuerzas son altamente dinámicas y están influenciadas por los iones contenidos en la saliva, por lo tanto el resultado es reversible. Alrededor de 2nm de distancia, fuerzas tales como puentes de hidrógeno entre grupos hidroxilo (por ejemplo, en la dentina) y grupos fosfato en la pared celular de la bacteria entran en juego. La primera etapa de la adhesión bacteriana es el paso funcional más importante para la formación y desarrollo de una biopelícula [22]. Dicha adhesión está relacionada con la fisicoquímica tanto de la bacteria como de la superficie a la que se adhiere, como la composición química, la energía libre superficial, hidrofobicidad (mojabilidad), la carga superficial de la bacteria y del sustrato, así como de la topografía del material [23-27, 33, 50-52]. La carga superficial y la energía libre del sustrato es modificada cuando es inmersa en un medio con bacterias, facilitando la adsorción bacteriana, además la distribución de la carga superficial de las bacterias suele no ser homogénea, disminuyendo la repulsión de cargas del mismo signo entre el sustrato y la bacteria [33]. La hidrofobicidad del sustrato y de la bacteria juega un papel importante, a pesar de que se asocia una mayor adherencia en superficies hidrofóbicas [28, 44], otros autores reportan justo lo contrario [32], aún no se ha llegado a un consenso. El efecto de la carga es más importante para las células hidrofílicas que para las hidrofóbicas [28]. Estas fuerzas actúan hasta alrededor de 15nm de distancia, y entre 8 a 10nm son 10 a 100 veces mayores que las fuerzas de van der Waals. Las bacterias con altas proporciones de nitrógeno/carbono o mayor cantidad de lipopolisacáridos en su superficie se relacionan con una alta hidrofobicidad. Por otro lado, las

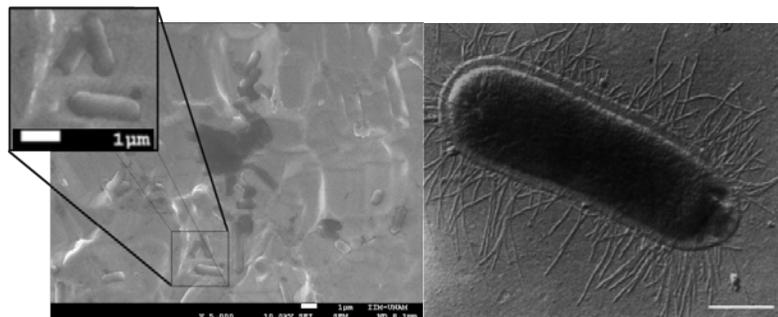
bacterias que contienen altas razones de oxígeno/carbono están relacionadas con una alta hidrofiliicidad [27].

En la segunda etapa intervienen fuerzas de mayor magnitud de tal forma que se crea un micro-ecosistema a su alrededor, en esta segunda etapa la adhesión se vuelve irreversible, se produce un exo-polisacárido, se pueden dar intercambios de electrones y se pueden crear enlaces covalentes, en esta etapa se necesitan fuerzas físicas o químicas relativamente grandes para remover las bacterias, por ejemplo, raspando, o usando limpiadores químicos [27].

Siguiendo a la adhesión inicial están las ocurridas por fuerzas covalentes, iónicas o enlaces electrostáticos (electrostatic bonding), relacionadas a fuerzas irreversibles. En esta etapa también se encuentran las interacciones ácido-base. Esta forma de enlaces entre receptores específicos en la superficie del huésped se llaman ligandos y los componentes en la bacteria se llaman adhesinas.

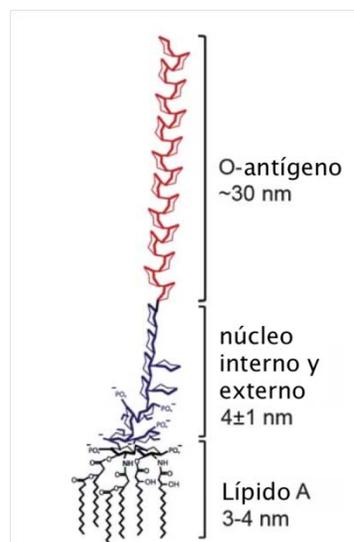
### 1.3.1 Características de *Escherichia coli*

Es una bacteria Gram negativa con motilidad, facultativa anaerobia, con morfología de bacilo (figura 13) y es considerado un microorganismo comensal de la flora humana. Tiene de casi dos micras de largo por una de ancho y un grosor de menos de 0.3 micras [55]. Su pared celular tiene 1 a 2 nm de grosor, una membrana citoplasmática interna y una membrana externa en donde se encuentran los lipopolisacáridos. Tienen fimbrias rígidas con un diámetro de alrededor de 7nm y fimbrias flexibles de entre 2 y 3nm de diámetro (figura 14). Las fimbrias se asocian a la adhesión a células hospederas [33, 38].



**Figura 13.** Micrografías de *Escherichia coli* hechas con microscopio electrónico a 10kv y 5,000 aumentos (izquierda) y de lado derecho se pueden apreciar las fimbrias (la barra corresponde a 0.5 micras), tomada de H. J. Busscher colaboradores [64].

Se cree que las primeras fuerzas de adhesión de este microorganismo en superficies sólidas son fuerzas electrostáticas, de van der Waals, fuerzas hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno que se originan a partir de características superficiales de las bacterias, como las proteínas, las fimbrias, los flagelos, y las sustancias poliméricas extracelulares así como de las características del sustrato. *E. coli* tiene aproximadamente de 1 a 3.5 millones de moléculas de lipopolisacáridos (LPS) fuera de su membrana [39, 59] y no se distribuyen de forma homogénea, más bien forman agregados de entre 600 a 3500 moléculas en pequeñas áreas. Estas moléculas de LPS ocupan un 75% de la superficie en las Gram negativas y están ancladas en la membrana exterior por el llamado lípido A el cual contiene grasas saturadas hidrofóbicas y fosfolípidos cargados negativamente, estas bacterias además poseen diez monosacáridos los cuales transportan fosfatos y grupos ácidos carboxilo, el antígeno-O, porción final del LPS es hidrofóbica y contiene de una a ocho unidades repetidas de monosacáridos (figura 14) [40, 46] debido a estos componentes su superficie es hidrofóbica ( $\theta$  alrededor de  $33^\circ$ ) y tienen un potencial zeta ( $\zeta$ ) negativo sobre su superficie a un pH asociados a fluidos corporales [33, 46, 48, 55, 59]. El potencial  $\zeta$  es menos negativo al aumentar la cantidad de iones en la solución o al aumentar el pH. A pesar de que no se ha entendido cabalmente cómo estas estructuras de LPSs se adhieren a las superficies sólidas, se cree que es una de las extensiones de la bacteria la que tiene un primer contacto con la superficie [22]

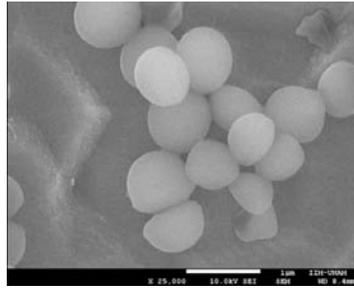


**Figura 14.** Diagrama de Lipopolisacárido (LPS) de una bacteria Gram-negativa. Tomado de Q. Lu y colaboradores [40]

*Escherichia coli* generalmente invade tracto intestinal en las primeras horas de vida. Se relaciona con la infección del tracto urinario, con meningitis y diarrea [35, 41, 53] es por esta razón que tiene una importancia clínica, ya que se asocia a gastroenteritis [69].

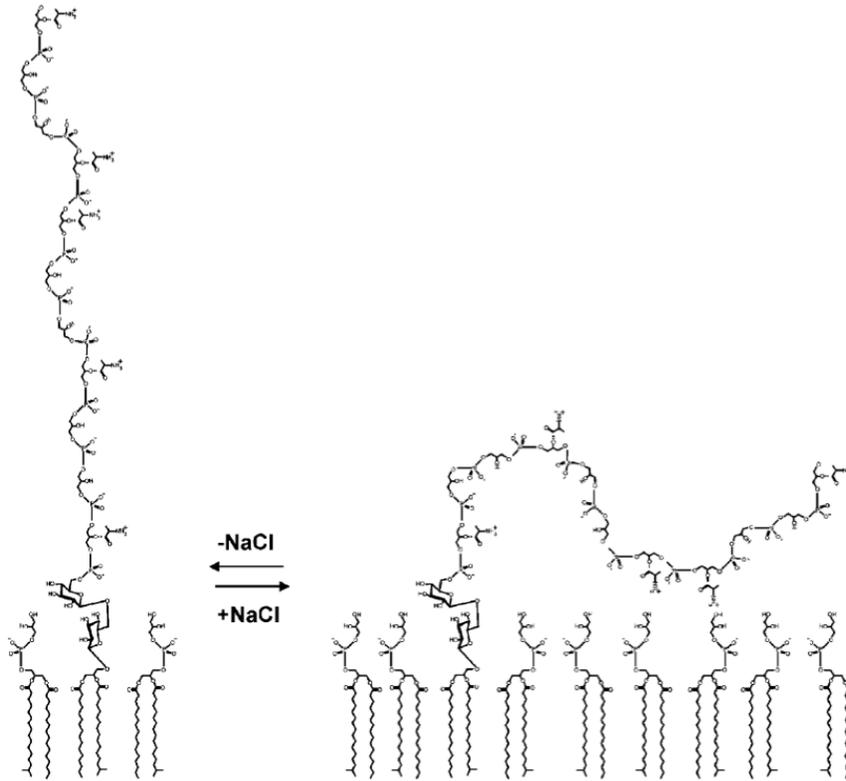
### 1.3.2 Características de *Staphylococcus aureus*

Es una bacteria Gram positiva de forma esférica de aproximadamente una micra de tamaño (figura 15), es facultativa, coagulasa positiva y no presenta motilidad [42, 43].



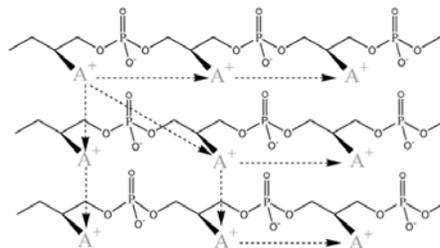
**Figura 15.** Micrografía de *S. aureus* hecha con microscopio electrónico a 10kv y 25,000 aumentos

Además de tener una membrana interna citoplasmática compuesta de fosfolípidos y una capa rígida externa compuesta de peptidoglicano (mureína) de entre 15 a 80 nm de grosor con una densidad media de 20%(w/v). Contiene en su superficie numerosos tipos de macromoléculas, por ejemplo: proteínas, extensiones de polisacáridos, ácidos teicoicos (WTA) anclados a la pared celular externa y por último extensiones de ácido lipoteicoico (LTA) enlazados a la membrana interior. Las WTAs y LTAs están formadas de cadenas poli-aniónicas proporcionando a la bacteria de una carga neta  $\zeta$  negativa superficial, la cual puede cambiar dependiendo de los iones circundantes. La estructura química tanto de las WTAs como de las LTAs es compleja, ambas contienen OH (hidrógeno-oxígeno),  $O^-$  (oxígeno con carga negativa) ó bien O (oxígeno) que se repiten de forma regular a los costados y a lo largo de dichas cadenas. Estas cadenas pueden cambiar la orientación al contacto de ciertos electrolitos, por ejemplo en solución salina (figura 16) otros iones importantes en las funciones de aureus son  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  [37, 45 y 57]. Esta bacteria es hidrofóbica debido a sus ácidos teicoicos y lipoteicoicos [55 y 56].



**Figura 16.** Se muestra la forma extendida en un medio con poca carga iónica (lado izquierdo, -NaCl) o la forma extendida en un medio con alta carga iónica (+NaCl) de un LTA. Tomado de F. C. Neuhaus y J. Baddiley [45]

Los residuos de D-alanina (con carga positiva) se pueden mover entre y/o a través de las cadenas de WTA y LTA (figura 17) este compuesto tiene diferentes funciones fisiológicas en el microorganismo [45, 56]



**Figura 17.** Traslación de D-alanina ester como residuo a lo largo o a través de las cadenas de LTA y WTA. Tomado de F. C. Neuhaus y J. Baddiley [45]

En resumen, LTA y WTA, junto con el peptidoglicano, define las propiedades polielectrónicas de la membrana de las bacterias Gram-positivas y el medio que las rodea, esta carga suele ser aniónica (carga negativa) [48-50, 55, 57], no necesariamente debe ser una carga rígida, ya vimos que estas extensiones celulares tienen movilidad y responden al medio que las rodea, creando una

distribución de carga dinámica, probablemente influyendo de manera positiva en las fuerzas intermoleculares o en la hidrofobicidad implicadas en la adhesión sobre biomateriales [45, 56].

Habita de forma inofensiva (en condiciones normales) la piel humana y la mucosa nasal, sin embargo también está asociada a enfermedades graves y hasta mortales, como la endocarditis, osteomielitis, neumonía y sepsis. Puede infectar implantes ortopédicos, catéteres o bien válvulas artificiales de corazón. Se asocia a formaciones de biopelículas y es uno de los mayores patógenos en biometales [35, 37, 44]. En los últimos años *S. aureus* ha aumentado los casos de infección no sólo nosocomial sino fuera del área clínica. En México se cuenta con la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE), la cual reportó que en el periodo de 1998-2003, *S. aureus* ocupó el tercer lugar en morbilidad y cuarto lugar en mortalidad. Los catéteres intravenosos y sondas son dispositivos susceptibles principalmente de contaminación que facilitan la entrada y colonización de cepas de *S. aureus* a la sangre y tejidos [43] pero además se sabe que es una de las bacterias que más contamina prótesis de titanio [70]

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

Hasta ahora se sabe que el titanio es uno de los mejores y más usados biomateriales para prótesis endoóseas de diferentes tipos debido a sus propiedades mecánicas y a la aceptación que el cuerpo tiene a dicho material. Por otra parte, el circonio es utilizado en prótesis dentales debido a su resistencia mecánica y color estético, entre otras cualidades [63, 64, 65].

Se han hecho estudios de corrosión y de adhesión bacteriana usando ambos materiales pero el trabajo hasta ahora no es concluyente debido a la complejidad y la cantidad de variables implicadas tanto en corrosión como en adhesión bacteriana, además no hay un solo trabajo que compare las diferencias en adhesión bacteriana y corrosión entre superficies amorfas y cristalinas de óxidos de circonio y titanio en dependencia al ordenamiento atómico de dichas superficies que aporte una explicación y entendimiento en ambos fenómenos. Por este motivo se decidió contribuir al estudio tanto de corrosión como adhesión bacteriana dependiente del ordenamiento atómico en óxidos metálicos.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General.**

Determinar la influencia del grado de cristalinidad de las películas delgadas de óxido de titanio y óxido de circonio depositadas sobre superficies de titanio, respecto al grado de corrosión y a la adhesión bacteriana.

### **Objetivos Específicos.**

- Caracterizar las películas delgadas amorfas y cristalinas de óxido de titanio y óxido de circonio.
- Comparar las diferencias de la respuesta a la corrosión entre las diferentes películas utilizando dos fluidos de interés biológico (a 0.89% de NaCl y *PBS: Phosphate Buffer Solution*).
- Comparar la adhesión bacteriana de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en las películas delgadas amorfas y cristalinas de óxido de titanio y óxido de circonio depositadas sobre sustratos de titanio con diferente rugosidad.

## **HIPÓTESIS**

1. La velocidad de corrosión cambiará dependiendo del ordenamiento atómico de la película delgada para una misma química (óxido de circonio u óxido de titanio).
2. La adhesión bacteriana cambiará dependiendo de la rugosidad, del ángulo de contacto (mojabilidad), de la química y/o del ordenamiento atómico de la superficie en contacto.

## ***CAPITULO II***

### **2 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.1 Síntesis de películas de óxidos metálicos**

Los discos de titanio puro para pruebas de corrosión y para ensayos de adhesión bacteriana se recubrieron de películas de óxido de titanio y óxido de circonio amorfo y cristalino.

##### **2.1.1 Preparación de las superficies de Titanio para pruebas de corrosión**

Con el fin de obtener la misma topografía en todas las superficies experimentales, discos de titanio de 15mm de diámetro y 1mm de grosor fueron pulidos con lijas a base de carburo de silicio de diferentes números. Los discos se colocaron sobre una superficie plana de vidrio y se pulieron a mano hasta tener un acabado con lija de número 1000. Durante el procedimiento se utilizó agua para que la superficie no se calentara.

Al terminar el proceso de lijado los discos fueron introducidos cuidadosamente, sin que quedara uno encima de otro, en un vaso de precipitado con acetona y fueron sonicados durante 20 minutos. Posteriormente, se secaron con aire presurizado y después fueron sonicados durante otros 20 minutos con isopropanol, al final se secaron con aire presurizado nuevamente.

##### **2.1.2 Superficies de Titanio utilizadas para pruebas de adhesión bacteriana**

Para las pruebas de adhesión bacteriana se compraron discos de titanio de 15mm de diámetro con dos diferentes topografías: discos PT (*smooth pretreatment*) con una rugosidad media (Ra) de  $<0.3\mu\text{m}$  y discos SLA micrométrica (*rough sandblasted acid-etched*) con una Ra de  $>3.0\mu\text{m}$ .

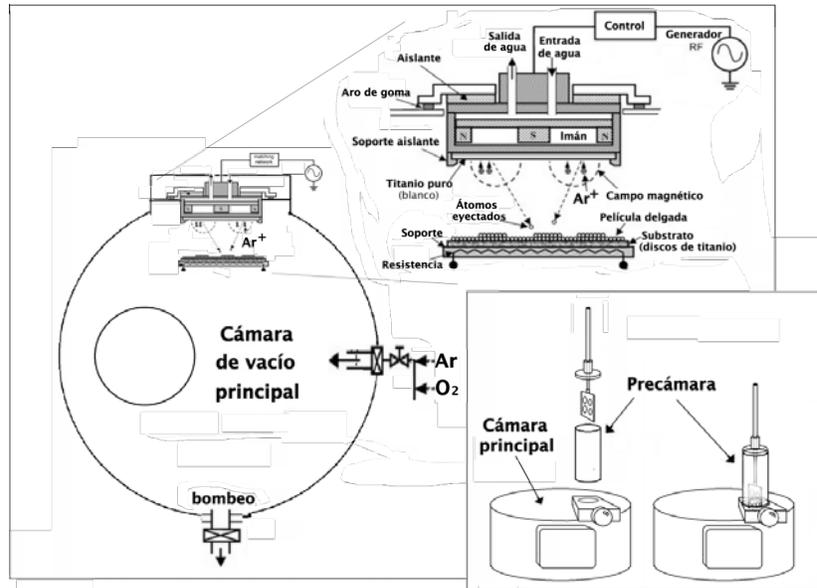
##### **2.1.3 Depósito de películas delgadas de óxidos metálicos sobre superficies de Titanio**

La técnica usada para hacer las películas delgadas de óxidos metálicos fue la de pulverización catódica con magnetron (o en inglés *Magnetron Sputtering*) balanceado con radio frecuencia (RF). El depósito se realizó en una atmósfera mixta de argón con oxígeno, el cual reaccionó con el titanio para hacer las películas delgadas de  $\text{TiO}_x$  o bien con el circonio para obtener las películas de  $\text{ZrO}_x$ . Estrictamente el subíndice de éstas fórmulas químicas es una "x", ya que si bien se espera tener  $\text{TiO}_2$  y

ZrO<sub>2</sub> al terminar los depósitos, en la práctica dichas superficies no son perfectas y la proporción de oxígeno puede variar [60]. Sin embargo, los resultados de espectroscopía de fotoelectrones (XPS) demostraron que se obtuvieron los óxidos de composición  $x=2$ , como se describe más adelante.

Los depósitos de las películas delgadas de óxidos metálicos amorfos y cristalinos se realizaron dentro de una cámara al alto vacío, mayor a  $10^{-6}$  Torr (1mbar=0.75Torr), para esto se usaron dos bombas conectadas a la cámara, la primera, una bomba mecánica y la segunda una bomba turbo molecular. Antes de generar el vacío, los discos de titanio puro se colocaron en un porta-muestras que se ha pulido con una lija de agua y limpiado con acetona, esto para evitar contaminación, por ejemplo, por grasa. También se coloca una pequeña lámina de silicio sobre un disco al cual se le cubre una pequeña área que no será recubierta durante el depósito, esto se hace para posteriormente medir el grosor de la película usando perfilometría.

Los discos fueron adheridos por una de las caras ya sea con cinta de carbono (al hacer películas delgadas amorfas, dicha cinta soporta temperaturas no mayores a 200 °C) o bien con plata coloidal ya que soporta temperaturas mayores a 200 °C (cuando se forman películas cristalinas). Al adherirlos se tuvo cuidado de no colocar más de 9 discos sobre el porta-muestras de manera tal que no se tuviesen cambios drásticos del espesor de la película. Los discos ya colocados en el porta-muestras se introducen en la pre-cámara la cual no tiene comunicación (se ha cerrado la comunicación) con la cámara principal al momento de introducirlos. La pre-cámara está conectada a la bomba mecánica, la cual se enciende una vez que las muestras se introducen y se cierra la entrada al medio ambiente. Al llegar al nivel de presión adecuado dentro de la pre-cámara, se cierra la válvula entre la pre-cámara y la bomba mecánica y se abre la compuerta a la cámara principal. Las muestras fueron introducidas a la cámara principal y después se cerró el paso de la pre-cámara a la cámara principal (figura 18). El porta-muestras y los discos de titanio se colocaron frente al blanco el cual fue de titanio puro (para el caso de películas de óxido de titanio) o bien de circonio puro (para películas de óxido de circonio).



**Figura 18.** Se introducen las muestras a la pre-cámara (recuadro) de ésta pasan a la cámara principal en la cual se hacen los depósitos, el blanco indicado es de titanio puro, pero también se utilizó un blanco de circonio puro.

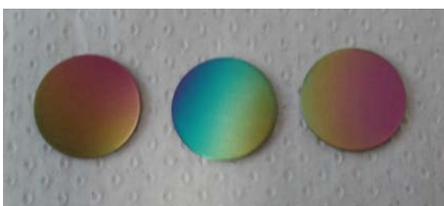
Una vez colocadas las muestras en su lugar y alcanzado un vacío de  $6 \times 10^{-6}$  Torr se procedió a introducir argón (Ar) al 80% y oxígeno ( $O_2$ ) al 20%, estos gases sirvieron para generar un plasma, el cual sirvió para formar las películas de óxido metálico. Al hacer estos depósitos se utilizó una potencia incidente de 200W (RF) con una potencia reflejada no mayor a 18W y blancos de Ti y Zr al 99.95% de pureza y una presión de trabajo de 24mTorr a 30mTorr. Las condiciones de depósito para obtener las películas cristalinas o amorfas, fueron las siguientes (figura 19):

Películas	Calentamiento del Substrato	Tiempo de Depósito
TiOx amorfo	No	30 min
TiOx cristalino	200°C por 30min	45 min a 200°C
ZrOx amorfo	No	30 min
ZrOx cristalino	200°C por 30min	40 min a 200°C

**Figura 19.** Tiempo de depósito y tratamiento térmico previo en cada caso. Las películas delgadas cristalinas necesitan un tratamiento térmico previo para poder “crecer” de forma cristalina. El tiempo de depósito para el titanio es mayor que el de circonio ya que se hicieron pruebas anteriores y se observó una velocidad de crecimiento de la película más lenta comparada con el circonio.

Cuando se terminó el depósito las muestras fueron extraídas de la cámara principal por medio de la pre-cámara, para el caso de las películas cristalinas se esperó más de 40 minutos antes de extraer las muestras para que se enfriara el depósito y no sufriera choque térmico.

Una vez terminado el depósito, las muestras se colocaron sobre papel filtro dentro de cajitas de plástico tapadas (figura 20).



**Figura 20.** Discos de titanio de 15mm de diámetro y un milímetro de grosor recubiertos con una película delgada de óxido de titanio o de óxido de circonio. Las mostradas en la figura son de óxido de titanio.

## 2.2 Caracterización de las películas delgadas amorfas y cristalinas de los óxidos metálicos

Una vez que fueron depositadas las películas delgadas amorfas y cristalinas de óxidos de titanio y de circonio, se les hicieron diferentes caracterizaciones físicas y químicas para obtener información respecto a su topografía, mojabilidad, rugosidad, espesor y ordenamiento atómico. Los métodos de caracterización utilizados fueron: Microscopía Electrónica de Barrido (*SEM*), Difracción de Rayos X (*XRD*), Espectroscopía Fotoelectrónica de rayos X (*XPS*), ángulo de contacto y perfilometría.

### 2.2.1 Microscopía Electrónica de Barrido (*SEM*)

Se utilizó un microscopio JEOL modelo JSM-7600E (*Field Emission Scanning Electron Microscope*) con 5kV de aceleración, electrones secundarios y aumentos desde 2000 a 200000X para observar la morfología de las películas amorfas y cristalinas.

### 2.2.2 Difracción de Rayos X (*XRD*)

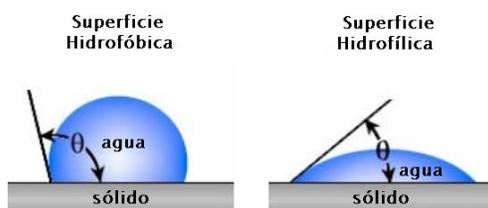
El patrón de difracción de rayos-X fue adquirido utilizando el modo de Bragg-Bretano en la configuración de ángulo de haz rasante, (para películas delgadas). Con un difractómetro marca Siemens modelo D5000, longitud de onda Cu-K $\alpha$  1.5406 Å.

### 2.2.3 Espectroscopía Fotoelectrónica de rayos X (XPS)

Los espectros de XPS fueron adquiridos sin realizar algún proceso de limpieza especial. La verificación de la composición de las películas se realizó mediante la técnica de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (*X-Ray Photoelectron Spectroscopy XPS*) con un sistema de alto vacío marca VG-Scientific Microtech Multilab ESCA2000, con un detector y analizador CLAM4 MCD, fuente de rayos X de Al K $\alpha$  ( $h\nu = 1486.6\text{eV}$ ) a 4.2 A, con una presión de  $3.75 \times 10^{-9}$  Torr. El espectro XPS se obtuvo a  $55^\circ$  respecto de la normal a la superficie con un paso de energía constante  $E_0 = 50\text{ eV}$  para obtener la composición elemental y  $E_0 = 20\text{ eV}$  para espectros de alta resolución.

### 2.2.4 Medición del ángulo de contacto

Con ayuda de un goniómetro se hicieron pruebas a los diferentes recubrimientos sobre titanio puro y sobre el titanio recubierto, también para las superficies SLA y PT. Se colocó una gota de  $5\ \mu\text{l}$  de agua bidestilada en tres o cuatro diferentes regiones para cada superficie, una en el centro y las otras en la periferia, cuidando que la alineación quedara horizontal, se hicieron grabaciones (en formato MPEG) al colocar las gotas usando el programa *Pinnacle STUDIO 11.1*, de las cuales se extrajeron tres imágenes importadas en *Photoshop* en escala de grises a 8 bits, éstas imágenes se analizaron con el programa *Drop Snake* [76] con el cual se analizaron el ángulo de contacto entre la superficie de la gota y la superficie del sustrato usando el borde de la imagen de la gota y la superficie. Se hicieron varias mediciones de dichos ángulos y se promedió el ángulo de contacto. Estos ángulos nos dirán si las superficies son hidrofóbicas o hidrofílicas (figura 21). Dicha característica se tomó en un contexto biológico definido por Vogler [77, 78], el cual define como límite un ángulo de  $65^\circ$  entre las superficies hidrofóbicas y las hidrofílicas; el límite de Berg [79-81].



**Figura 21.** El ángulo de contacto entre una gota de agua y una superficie nos da información de la mojabilidad de la superficie, si el ángulo es pequeño, estamos hablando de una superficie hidrofílica, en cambio para ángulos grandes, hablamos de una superficie hidrofóbica.

### 2.2.5 Perfilometría

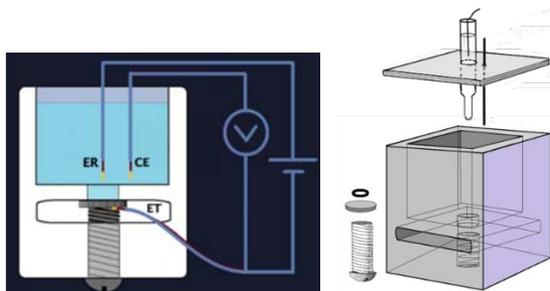
Se midió la rugosidad de todas las muestras usando un perfilómetro DEKTAK 150 en dos áreas diferentes para cada tipo de muestra en un área de 500 micras por 500 micras, donde el radio de la punta fue de 2.5 micras con una fuerza de 1mg en una duración de 30 segundos para cada barrido lineal. Se cuidó de cambiar la orientación por cada área diferente sobre el mismo disco. El grosor de las películas también fue medido por perfilometría en una línea de escaneo de 500µm, usando sustratos de Si(100) a los cuales se les dejó un espacio sin recubrir.

### 2.3 Ensayos de corrosión

Cada disco, uno a la vez, se colocó por debajo de un recipiente cúbico de acrílico (7 cm X 8cm X 5.82cm, de ancho largo y alto respectivamente) con ayuda de un tornillo de acero galvanizado y un *o-ring* de goma (alrededor de 5mm de diámetro interior) para evitar derrame de la solución, como se muestra en la figura 22 y, una vez montado el disco, el recipiente se llena con una solución salina saturada (al 0.89% de NaCl) o bien con la solución de *PBS* (*phosphate-buffered saline*) el cual contiene diferentes compuestos (0.2 g L<sup>-1</sup> KCl, 0.2 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.047 g L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 8 g L<sup>-1</sup> NaCl, y 1.15 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4) simulando los fluidos corporales según sea el caso. Se conecta un electrodo (ánodo) entre el disco y el tornillo, el contra electrodo cátodo (CE, de platino) y el electrodo de referencia (de calomel), con ayuda de una tapa de acrílico, se colocan dentro de la cámara con el líquido y la muestra. Estos electrodos se conectan al potencióstato el cual medirá y graficará los datos de cada muestra usando el programa *Gamry Echem Analyst 5.61*, en cada uno de los ensayos se procura tener los electrodos siempre en la misma posición igual que la altura del líquido que cubrirá a la muestra y a los electrodos (alrededor de 5cm desde la base del cubo). Primero se hicieron pruebas de potencial a circuito abierto (OCP) y después los ensayos potenciodinámicos. Después de estabilizar el OCP los ensayos potenciodinámicos se realizaron desde un potencial de -0.5 volts a 2.5 volts, con una velocidad de barrido del potencial de 2mV/s.

Después de cada ensayo el electrodo de referencia se sumergió en una solución de cloruro de potasio saturado y el electrodo de platino era lijado levemente y lavado con agua destilada además de conectar el electrodo de trabajo a tierra entre cada prueba, por último la celda se lavaba con agua destilada y aire a presión, todo esto fue para evitar impurezas que pudieran ser provocadas por la medición y para evitar cargas estáticas o parásitas acumuladas que alteren la medición aunque la

contaminación debido a la solución interna (Cloruro de potasio) del electrodo de referencia es insignificante y el electrodo de platino lo podemos considerar no reactivo.



**Figura 22.** Celda para ensayos de corrosión. El electrodo de trabajo (ET) es la muestra a medir (discos de titanio) del cual se obtiene la densidad de corriente relacionada con la tasa de corrosión con ayuda de dos electrodos: el electrodo de referencia (ER) y el contra electrodo (CE).

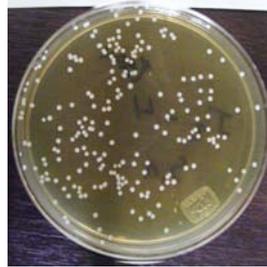
## 2.4 Pruebas de adhesión bacteriana

Los estudios de adhesión bacteriana fueron realizados en el laboratorio de Genética Molecular de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

Se utilizaron las cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Escherichia coli* (ATCC 33780)). Las cepas se rehidrataron en caldo de Soya Tripticaseína (TSB) y cultivaron en agar enriquecido Soya Tripticasa (TSA) suplementado con 5ml de menadione (vitamina K, Sigma-Aldrich Química, S. A. De C. V., Toluca, México), 2 µg/ml de hemina (Sigma) a 35°C durante 24 horas y se transfirieron a placas de agar TSA hasta obtener cultivos puros, los cuales fueron utilizados para los experimentos.

Las superficies experimentales previamente esterilizadas se colocaron individualmente en placas de 24 pozos donde se les adicionó una suspensión de  $10^7$  células/mL de cada bacteria por separado, en un volumen final de 2 mL. Las superficies con las especies bacterianas fueron incubadas durante 24 horas a 35°C en condiciones aerobias. Cabe mencionar que se utilizó un set de tres muestras de cada una de las superficies experimentales para los conteos de las unidades formadoras de colonias (UFCs) y otro set de muestras para procesar las superficies para ser analizadas por medio de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Todos los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado.

Después de la incubación, cada muestra se lavó tres veces con 1 mL de caldo TSB. Después de los lavados, las muestras se transfirieron a una nueva placa de pozos de cultivo y se les colocó 1 mL de TSB enriquecido para sonicarlas durante 5 periodos de 10 segundos cada uno, con el objetivo de despegar las bacterias adheridas sobre las superficies. Hecho lo anterior, se realizaron diluciones seriales del sobrenadante de cada una de las muestras sonicadas y 100  $\mu$ L de cada dilución fueron sembrados por duplicado en placas de TSA enriquecido. Las placas de TSA se incubaron durante 24 horas y posteriormente se realizó el conteo visual de las unidades formadoras de colonias (UFCs) para calcular el número de bacterias adheridas a las muestras (figura 23).



**Figura 23.** Cultivos con unidades formadoras de cultivos (CFUs)

Las muestras reservadas para ser observadas por medio de SEM se colocaron en lacas de 12 pozos y se lavaron con agua bidestilada y se procesaron de la siguiente manera. En breve, las muestras fueron fijadas en glutaraldehído al 2.0% por 24 h a temperatura ambiente. Después fueron lavadas tres veces con un buffer de fosfato (pH 7.4) y deshidratadas con etanol en porcentajes seriados de 20, 40, 60, 80 and 100%. Las muestras posteriormente fueron desecadas y cubiertas con Oro, para ser observadas usando un microscópio electrónico de barrido marca Cambridge – Leica, Stereoscan 440 a 20kV. A través del uso de imágenes de electrones secundarios (SE) se observó la topografía de la superficie y la morfología de los microorganismos adheridos a ellas. Con el uso de imágenes de electrones retro dispersados (BSE) se observó el porcentaje de cobertura de la superficie de las colonias bacterianas.

Se usaron aumentos de entre 250X a 1000X en cinco lugares diferentes sobre cada disco: centro, izquierda, derecha, abajo y arriba. También se analizaron algunas bacterias a aumentos superiores de 5K, 10K y 20K para visualizar la morfología de los microorganismos de forma más clara, en el modo de electrones secundarios.

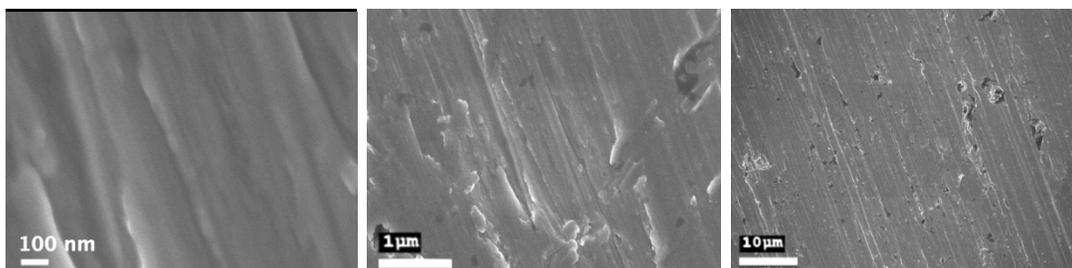
## CAPITULO III

### 3 RESULTADOS

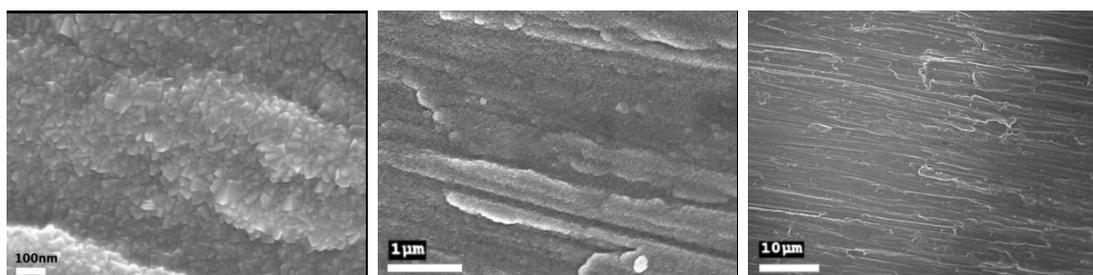
#### 3.1 Caracterización de las Superficies

##### 3.1.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Las siguientes imágenes (Figura 25) muestran el titanio pulido para ensayos de corrosión vista con microscopio electrónico con tres diferentes aumentos. Se observan las líneas dejadas por la lija más fina al terminar el proceso de lijado, todas en una misma dirección como se había decidido hacerlas.

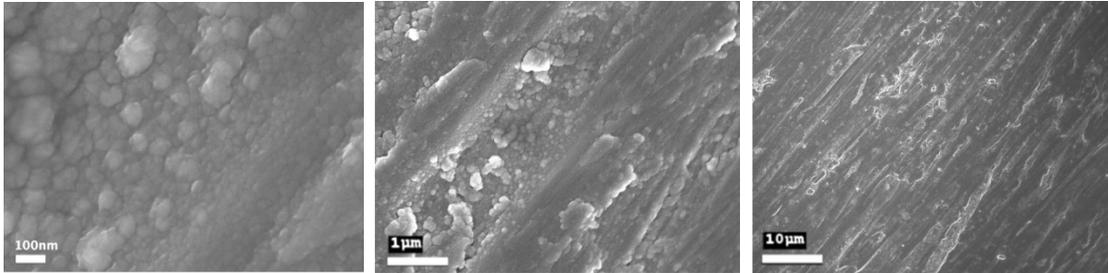


**Figura 25.** De izquierda a derecha: aumentos de 100,000X, de 25,000X y de 2,000X para una misma muestra de titanio después de un proceso de lijado a mano.



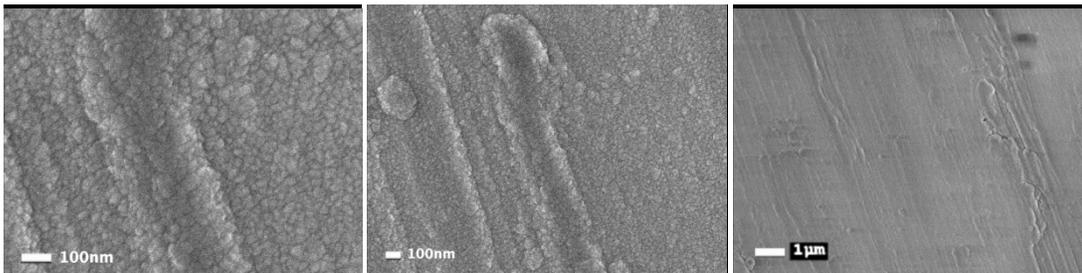
**Figura 26.** De izquierda a derecha: aumentos de 100,000X, de 25,000X y de 2,000X de películas delgadas de óxido de titanio cristalino sobre discos de titanio puro.

En la figura 26 se observa la topografía de las películas de óxido de titanio cristalino sobre una de las superficies de Ti lijadas. Se aprecian formas cristalinas en la primera imagen, los crecimientos más grandes son de 50nm de ancho y los más pequeños aproximadamente de 20nm. Se observan facetas cristalinas de 90 grados, probablemente los planos (001) de rutilo o anatasa [58]. Esta forma cristalina bien definida no se observa en las imágenes obtenidas con las películas de óxido de titanio amorfo (figura 27), pero se observa claramente pequeños cúmulos con límites bien definidos (forma de coliflor).

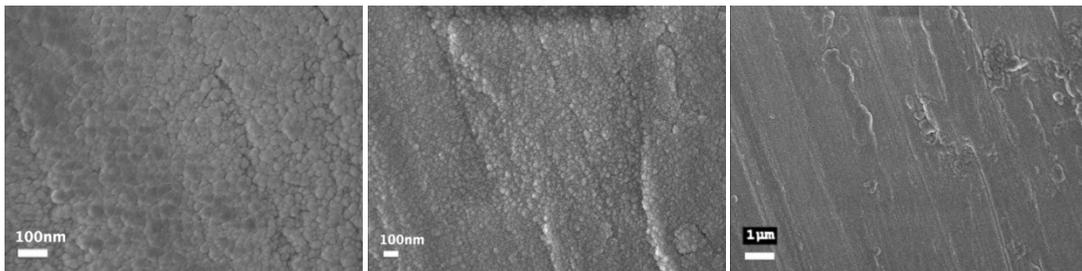


**Figura 27.** Imágenes de películas de óxido de titanio amorfo de 100,000X, de 25,000X y 2,000X en ese orden.

En las imágenes de óxido de circonio cristalino (figura 28) no se pueden distinguir tan claramente los cristales como en el caso del  $\text{TiO}_2$  cristalino, en parte porque son de menor tamaño, pero no nos fue posible lograr imágenes claras con mayor amplificación. Las muestras son aislantes y eso dificulta la obtención de imágenes de alta calidad a amplificaciones mayores.



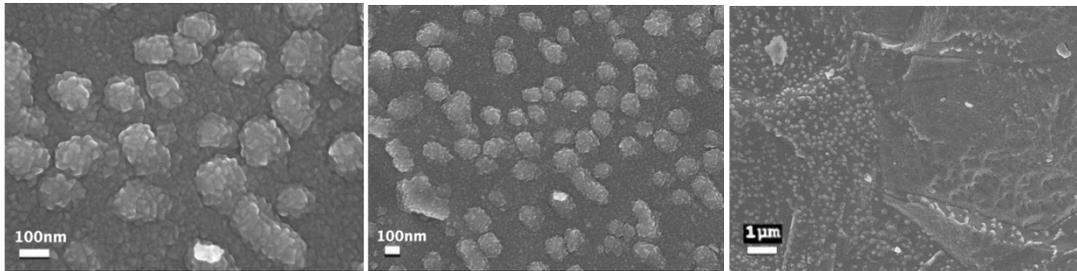
**Figura 28.**  $\text{ZrO}_2$  cristalino 100 mil, 50 mil y 10 mil aumentos.



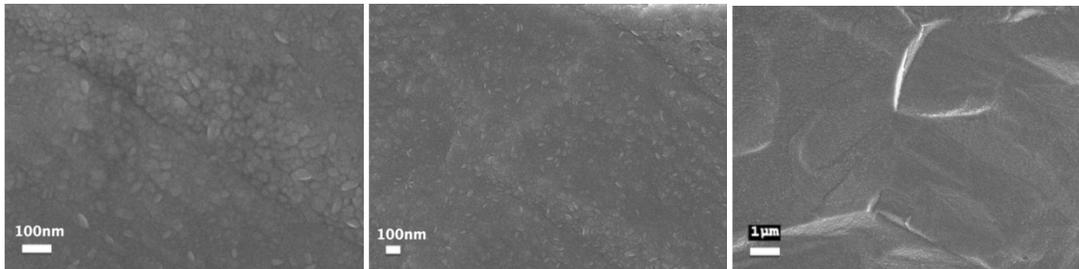
**Figura 29.**  $\text{ZrO}_2$  amorfo 100 mil, 50 mil y 10 mil aumentos.

El óxido de circonio amorfo (Figura 29) muestra cúmulos redondeados similares a los de  $\text{TiO}_2$ .

La topografía de las películas depositadas sobre los sustratos de titanio PT es muy similar a la obtenida sobre las superficies de titanio pulidas, como puede observarse en las Figuras 26, 27, 30 y 31 para el  $\text{TiO}_2$  cristalino y amorfo, respectivamente. El cristalino muestra sobre la topografía del Ti-PT, unos cristales facetados menores a 50nm y en su contraparte amorfa, se logran ver pequeñas aglomeraciones y también pequeños límites entre dichos aglomerados.

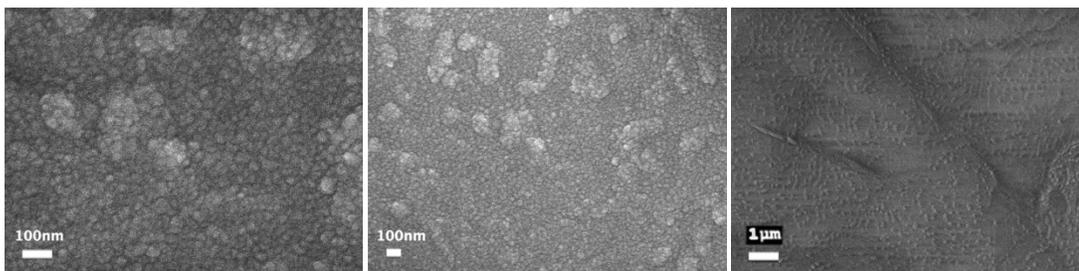


**Figura 30.** TiOx cristalino sobre PT 100 mil, 50 mil y 10 mil aumentos

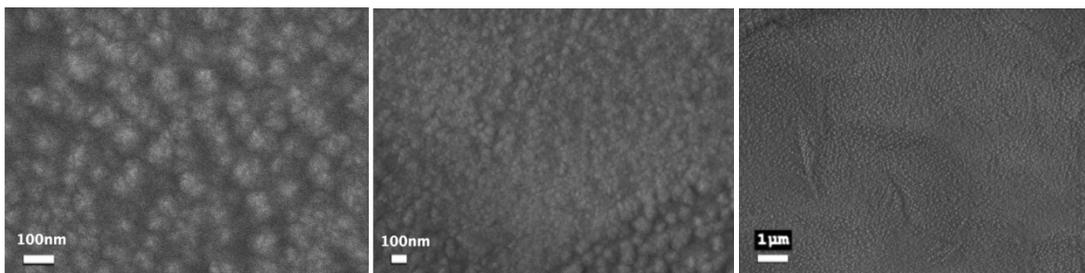


**Figura 31.** TiOx amorfo sobre PT a 100 mil, 50 mil y 10 mil aumentos respectivamente.

La diferencia entre las películas delgadas de óxido de circonio cristalinas y amorfas no es clara, sin embargo se observa la misma forma granulosa (forma de coliflor) parecida a los recubrimientos anteriores (figuras 32 y 33).



**Figura 32.** ZrO<sub>2</sub> cristalino sobre PT a 100 mil, 50 mil y 10 mil aumentos respectivamente.



**Figura 33.** ZrO<sub>2</sub> amorfo sobre PT a 100 mil, 50 mil y 10 mil aumentos respectivamente.

### 3.1.2 Difracción de Rayos X (XRD) y Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS)

La figura 34 muestra los patrones de difracción de las películas de óxido de titanio depositadas sobre los sustratos de cp-Ti (*commercial pure Titanium*). Como puede observarse, las señales que dominan el patrón corresponden al titanio. Alrededor de 20-30 grados pueden detectarse la señal de la película cristalina de  $\text{TiO}_2$  (dos picos marcados como A y R) y un pico ancho en las películas amorfas. Todos los demás picos corresponden al sustrato.

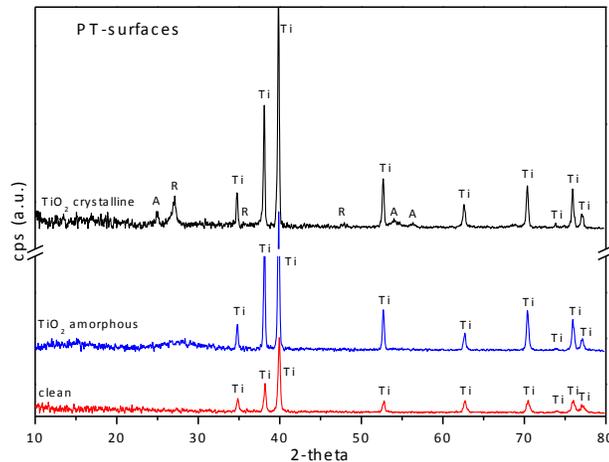


Figura 34. Patrones de difracción de película de óxido de titanio

Con la finalidad de observar con más detalle las diferencias entre la estructura de las películas amorfas y cristalinas, se realizaron análisis de difracción de rayos-X sobre películas depositadas sobre sustratos de silicio. La Figura 35 muestra el resultado para el  $\text{TiO}_2$  donde se identifican claramente los picos correspondientes a las fases anatasa (A) y rutilo (R) en la muestra cristalina, mientras que en la película amorfa no se distinguen dichos picos característicos.

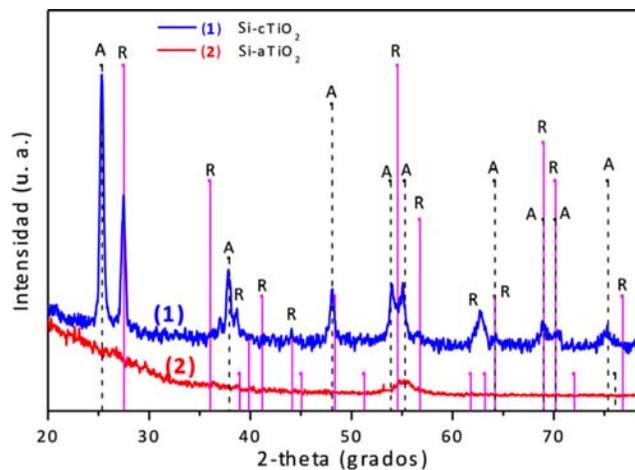
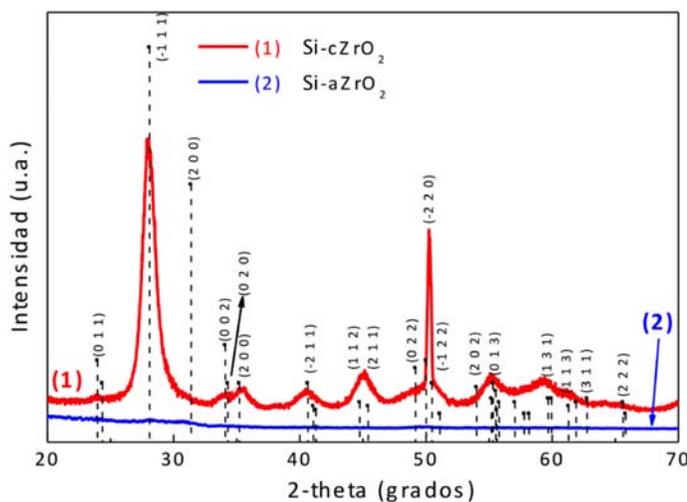


Figura 35. Patrones de difracción de depósitos de óxido de titanio.

De forma similar, la figura 36 presenta los patrones de difracción de las películas de  $ZrO_2$  depositadas sobre titanio. En este caso se obtiene la fase llamada badeleyita y todos sus planos quedan claramente identificados.

Ambas (figura 35 y 36) mediciones fueron realizadas utilizando haz rasante, por lo que no puede hacerse una estimación precisa de los tamaños de grano cristalino. Sin embargo, se puede observar que las señales en el  $ZrO_2$  son más anchas que para el  $TiO_2$ , indicando que los tamaños de grano cristalino son menores en el  $ZrO_2$ . Resultado que concuerda con lo observado en las imágenes del SEM (figura 30 y 32)

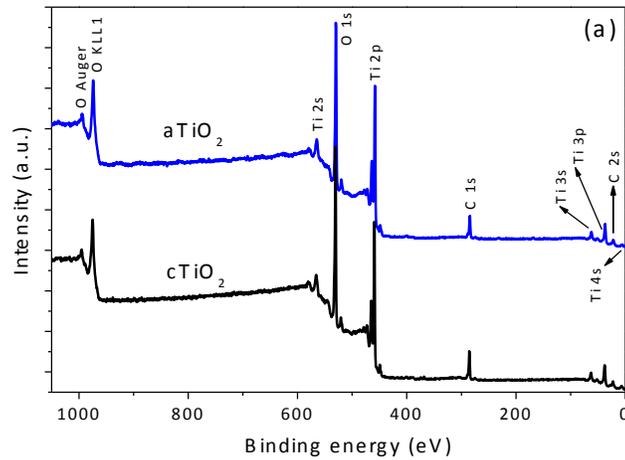
Como se ha planteado y se discutirá más adelante, la cristalinidad puede jugar un papel importante en la adhesión bacteriana, en particular se ha observado experimental y teóricamente que la adsorción de proteínas sobre las superficies de  $TiO_2$  depende de la estructura cristalina y del plano cristalino expuesto [91-95]



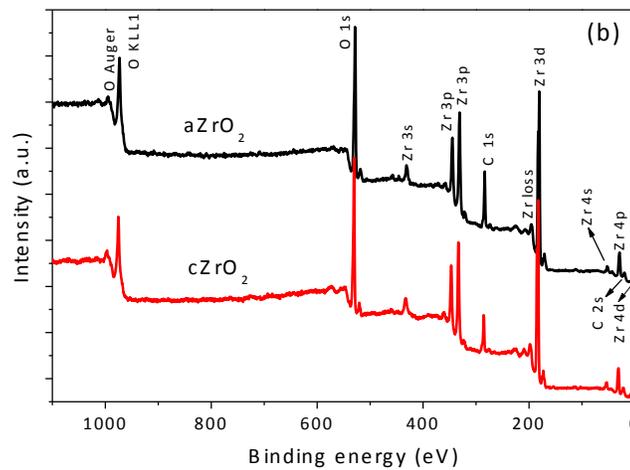
**Figura 36.** Diffractogramas correspondiente a óxido de circonio.

La composición de las películas fue determinada por espectroscopía de fotoelectrones, los espectros de ambos materiales están representados en las figuras 37 y 38. Donde puede observarse que hay una gran similitud entre las amorfas y las cristalinas, indicando que la composición de ambas es la misma.

Para el  $TiO_2$  sólo se observan señales de Ti, O y el carbono, que se ha adherido superficialmente (no se realizó limpieza de la superficie con haz de argón). Similarmente para las películas de  $ZrO_2$ , sólo se observa Zr, O y C.



**Figura 37.** Resultado de XPS para óxido de titanio.



**Figura 38.** Resultados de XPS para óxido de circonio.

La cuantificación elemental se realizó analizando los espectros de alta resolución para cada elemento y distinguiendo el oxígeno enlazado al carbono, del oxígeno enlazado al átomo metálico. Un resumen de dicho análisis se presenta en la figura 39, donde se reporta la razón del metal con el oxígeno (Me/O), incluyendo lo observado para los substratos de Ti.

Muestra	Me/O
PT	0.45
SLA	0.45
Ti-aTiO <sub>2</sub>	0.52
Ti-cTiO <sub>2</sub>	0.51
Ti-aZrO <sub>2</sub>	0.49
Ti-cZrO <sub>2</sub>	0.49

**Figura 39.** Tabla de composición de todas las superficies

De la figura 39 puede observarse que los óxidos nativos formados sobre los sustratos de Ti-PT y Ti-SLA tiene una razón Ti:O ó Zr:O ligeramente menor que la estequiométrica de 1:2 indicando que los óxidos nativos son sub-estequiométricos. En el caso de las películas depositadas, las razones metal/oxígeno son más cercanas a 0.5 es decir las correspondientes a los óxidos más estables.

### 3.1.3 Mojabilidad por medio del ángulo de contacto

Utilizando un goniómetro y el programa de cómputo *Drop Snake* se obtuvo el ángulo de contacto usando gotas de 5µl de agua bidestilada y realizando el promedio de nueve ángulos para las diferentes superficies PT y SLA sin la película delgada y con las películas delgadas de TiO<sub>2</sub> y ZrO<sub>2</sub> amorfa y cristalina.

Las figuras 40 y 41 presenta los valores promedio de los ángulos de contacto para cada superficie. De su análisis, se puede concluir que para las superficies SLA el ángulo de contacto es más grande comparado con las superficies PT (63.4° para PT vs 130° para SLA)

	PT	SLA
Superficie:	ángulo ± SD	ángulo ± SD
Sin película	63.4 ± 7.1	129.9 ± 10.1
a-TiO <sub>2</sub>	102.9 ± 3.4	144.3 ± 2.7
c-TiO <sub>2</sub>	92.7 ± 2.6	141.8 ± 4.6
a-ZrO <sub>2</sub>	88.7 ± 6.5	143.1 ± 2.9
c-ZrO <sub>2</sub>	108.9 ± 2.8	134.3 ± 12.8

Figura 40. Ángulos de contacto para las diferentes superficies

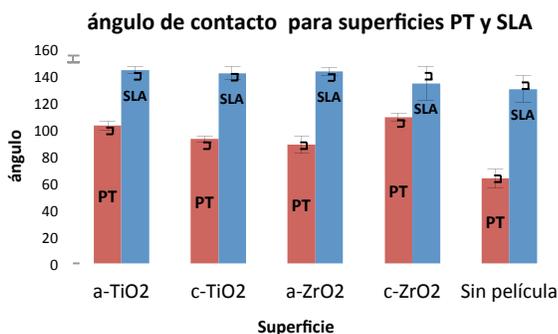


Figura 41. Ángulo de contacto usando agua destilada para superficies PT (izquierda) y SLA (derecha)

Al agregarse las películas, dicho ángulo aumentó en ambos casos. Observándose pequeñas diferencias según la composición y estructura para las películas depositadas sobre el Ti-PT, pero no tanto sobre las depositadas sobre Ti-SLA.

El ángulo de contacto prácticamente no cambió en superficies SLA al agregar el recubrimiento, no así para las superficies PT, el cual mostró un aumento en el ángulo de contacto, esto probablemente sea debido a la composición de los óxidos metálicos y que la rugosidad influye en mayor grado en superficies SLA que en PT, opacando el efecto de la química de las superficies estudiadas en esta tesis.

El ángulo de contacto nos proporciona información de la mojabilidad (menor ángulo de contacto mayor mojabilidad) de una superficie asociándola a superficies hidrofóbicas o hidrofílicas [77, 78-81] que a su vez se relaciona con la adhesión bacteriana [82]. Tomando en cuenta el límite de los  $65^\circ$  definido por Vogler, podemos considerar sólo a la superficie PT sin recubrir como hidrofílica. Diferentes autores asocian mayor adherencia de bacterias en superficies hidrofóbicas [28, 44], considerando esto esperaríamos encontrar un mayor número de bacterias adheridas al aumentar el ángulo de contacto de las superficies. Más adelante se verá que dicha tendencia es posible.

#### **3.1.4 Perfilometría**

Se midió la rugosidad media (Ra) con un perfilómetro VEECO Dektak 150, en un área de  $500\mu\text{m} \times 500\mu\text{m}$ . Como se esperaba no hay una gran diferencia entre las rugosidades del mismo tipo de superficie, es decir sólo para SLA o bien sólo para PT independientemente del recubrimiento, pero sí entre las superficies distintas (figura 42), dando un valor alrededor de cuatro micras para las superficies SLA y menor que una micra para las superficies PT. La rugosidad para las superficies pulidas para ensayos de corrosión quedaron por debajo de las superficies anteriores (alrededor de  $0.3\ \mu\text{m}$ ). El grosor de las películas fue de alrededor de 185 nm para las superficies  $\text{ZrO}_2$  y de alrededor de 68 nm para  $\text{TiO}_2$  (figura 43)

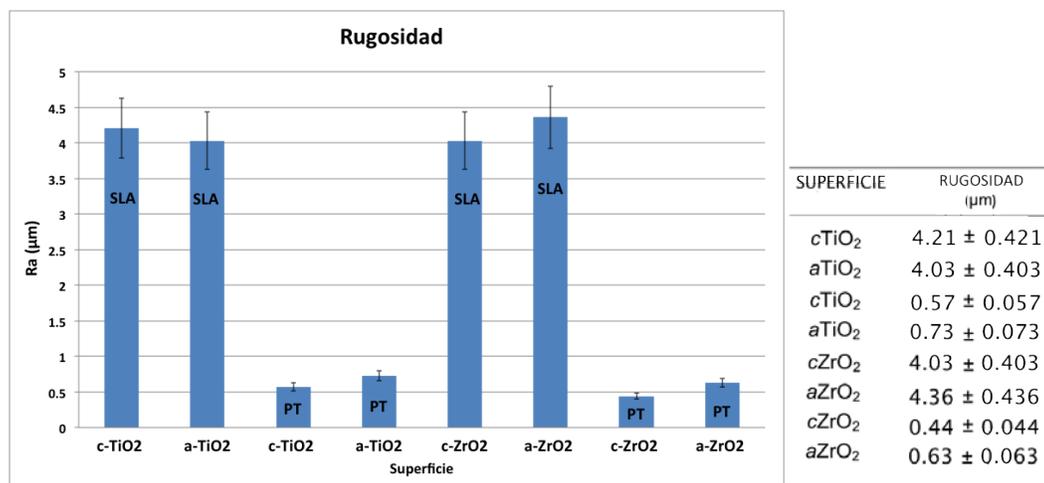


Figura 42. Rugosidades de las diferentes superficies con la tabla de resultados.

Superficie	Grosor de película (nm)
Si-aTiO <sub>2</sub>	64 ± 8
Si-cTiO <sub>2</sub>	72 ± 12
Si-aZrO <sub>2</sub>	194 ± 15
Si-cZrO <sub>2</sub>	175 ± 16

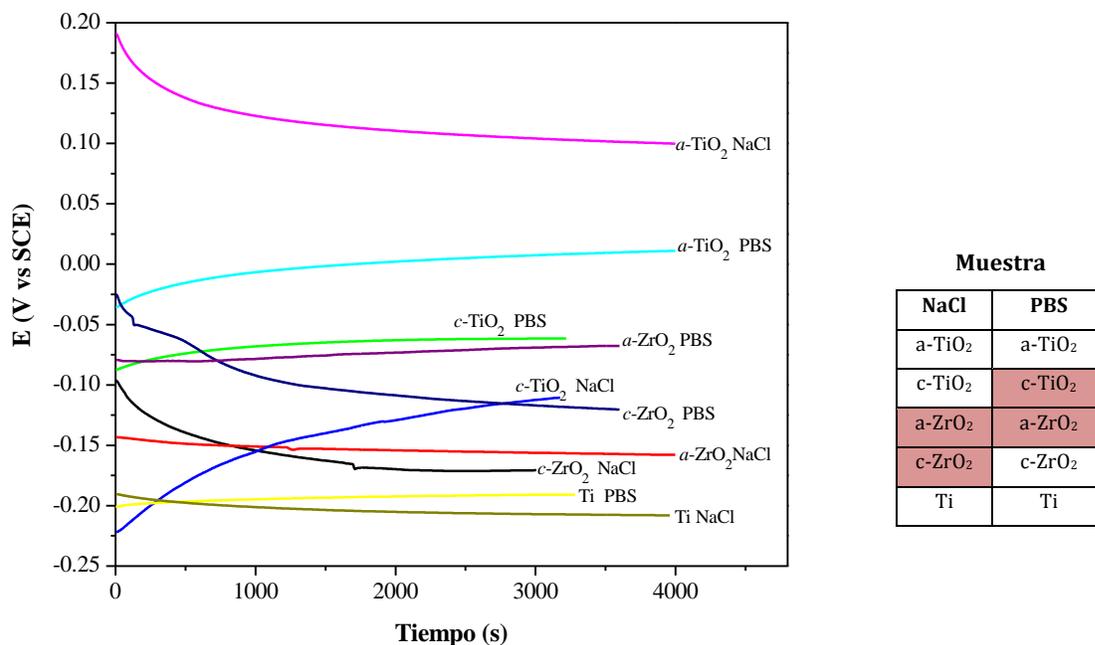
Figura 43. Grosor de las películas, obtenida por perfilometría.

Se observa un pequeño aumento en la rugosidad para superficies PT con recubrimientos amorfos comparados con las superficies cristalinas. Probablemente el ordenamiento en las superficies cristalinas mantenga una superficie más lisa.

La morfología de la superficie es un factor que afecta la adhesión bacteriana [49]. En particular, diferentes autores asocian mayor adhesión a superficies rugosas y menor adhesión a superficies lisas.

### 3.2 Ensayos de Corrosión

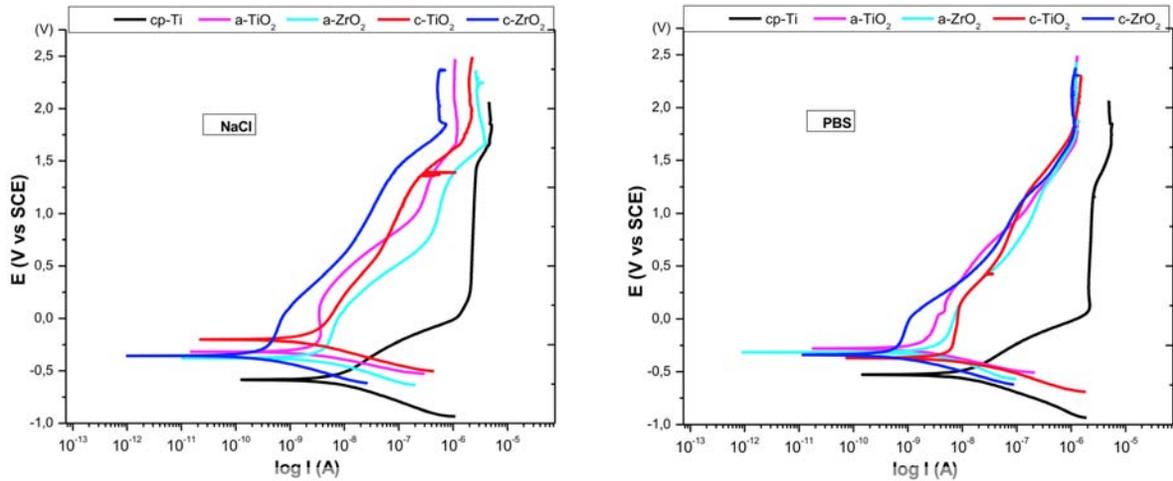
Se presentan las curvas de potencial a circuito abierto (OCP) para las diferentes películas y soluciones (NaCl y PBS) en comparación con el sustrato. Puede observarse un valor estacionario, es decir, un valor de potencial de corrosión que no muestra mayor cambio en el tiempo. Dicho valor alcanzado por el sustrato (titanio sin recubrir) para ambas soluciones es de alrededor de -200mV y con los recubrimientos el potencial de corrosión es menos negativo (más positivo) comparado con el titanio sin recubrir, siendo la de mayor pasividad la película de a-TiO<sub>2</sub> en ambas soluciones, alcanzando un OCP de ~100mV sumergida en NaCl y de ~0mV en PBS.



**Figura 44.** Las muestras fueron sumergidas en un medio salino (NaCl al 0.89%) o bien en una solución PBS durante al menos 3000s. Un aumento de potencial en la dirección positiva indica la formación de una capa pasiva, un potencial sin cambio indica que la capa pasivante permanece sin cambio y una caída de potencial en la dirección negativa indica un rompimiento, disolución de la capa pasiva o bien que no se forma. Para las dos soluciones el orden es el mismo aunque para NaCl las superficies a-ZrO<sub>2</sub> y c-ZrO<sub>2</sub> tienen valores muy cercanos sucediendo lo mismo para c-TiO<sub>2</sub> y a-ZrO<sub>2</sub> en PBS (tabla, lado derecho).

El c-ZrO<sub>2</sub> en ambas soluciones, el Ti, a-TiO<sub>2</sub> y a-ZrO<sub>2</sub> en NaCl, así como c-ZrO<sub>2</sub> en PBS, presentan una caída de potencial hacia la región más negativa, es decir, que la capa pasiva se podría estar diluyendo. Por otro lado para el Ti, a-ZrO<sub>2</sub>, a-TiO<sub>2</sub> y c-TiO<sub>2</sub> en PBS y el c-TiO<sub>2</sub> en NaCl los potenciales aumentan con el tiempo, lo cual indica formación de capa pasiva [74]. También podemos ver las superficies más susceptibles de corroerse dependiendo de la solución en que se encuentren, donde las más nobles tienen un potencial mayor. Se observa que para las dos soluciones el orden es el mismo (figura 44), aunque en NaCl el a-ZrO<sub>2</sub> y c-ZrO<sub>2</sub> sus valores son muy cercanos, así como para c-TiO<sub>2</sub> y a-ZrO<sub>2</sub> en PBS. Podemos concluir atendiendo sólo al OCP realizado que el óxido de titanio amorfo es el más noble de las superficies usadas.

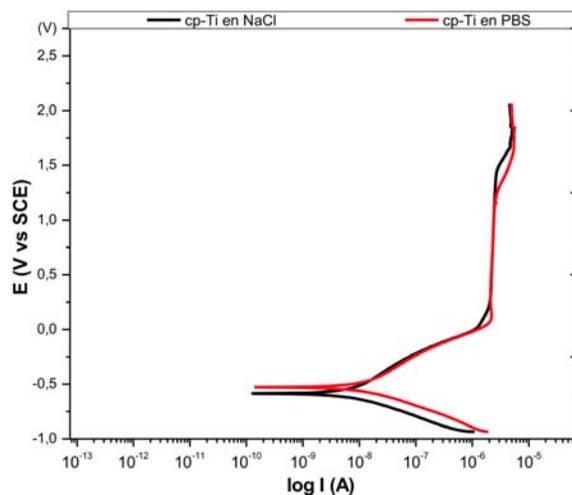
La figura 45 presenta los resultados de polarización potenciodinámica para las cuatro películas en comparación con el sustrato de Ti en solución de PBS y de NaCl.



**Figura 45.** Se muestran las curvas de polarización de las diferentes superficies sumergidas en una solución salina al 0.89% y en solución de PBS (izquierda) durante 24 horas.

Se puede observar que con respecto al Ti, todas las películas se encuentran ligeramente desplazadas hacia potenciales más positivos (menos negativos o mayores) y densidades de corriente menores.

El titanio puro tiene una densidad de corriente mayor comparada con los recubrimientos de óxidos metálicos, además el titanio sin recubrimiento presenta una disolución más o menos continua, con un potencial de corrosión más negativo. Mientras que los recubrimientos presentan una zona de pasivación y menor disolución, comparada con el titanio sin recubrimiento previo. Cabe mencionar que las curvas de polarización del titanio sin recubrir son muy parecidas en ambas soluciones (figura 46),



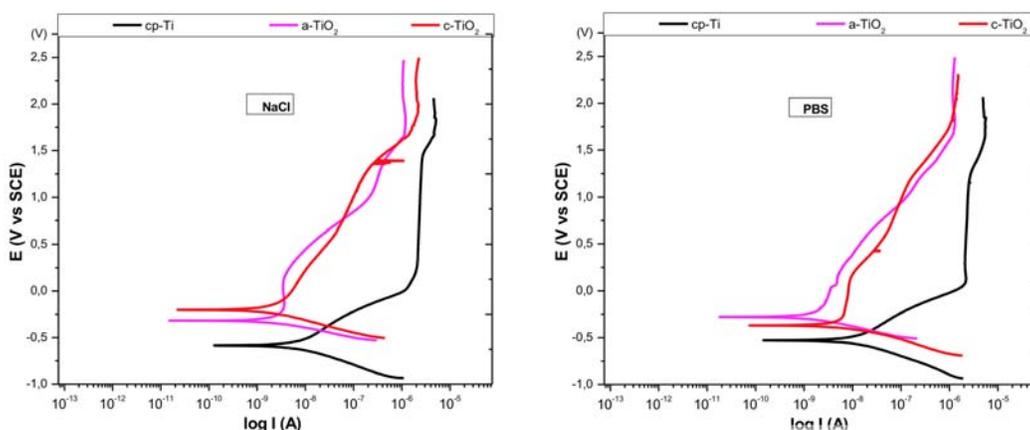
**Figura 46.** Curvas de polarización de Titanio en PBS y NaCl.

Los resultados de medidas con el programa *Gamry Echem Analyst 5.61* de la corriente de corrosión ( $I_{corr}$ ), el potencial de corrosión ( $E_{corr}$ ) y la velocidad de corrosión ( $V_{corr}$ ) se muestran en la siguiente figura 47.

Muestra	NaCl			PBS		
	$I_{corr}$ (nA)	$E_{corr}$ (mV)	$V_{corr}$ (mpy)	$I_{corr}$ (nA)	$E_{corr}$ (mV)	$V_{corr}$ (mpy)
Ti	9.31	-585	$4.254 \times 10^{-3}$	15.1	-529	$6.919 \times 10^{-3}$
c-TiO <sub>2</sub>	2.33	-210	$1.06 \times 10^{-3}$	7.57	-358	$3.458 \times 10^{-3}$
a-TiO <sub>2</sub>	3.04	-319	$1.388 \times 10^{-3}$	2.09	-280	$0.955 \times 10^{-3}$
c-ZrO <sub>2</sub>	0.468	-355	$0.214 \times 10^{-3}$	0.889	-333	$0.406 \times 10^{-3}$
a-ZrO <sub>2</sub>	5.02	-375	$2.296 \times 10^{-3}$	5.87	-311	$2.681 \times 10^{-3}$

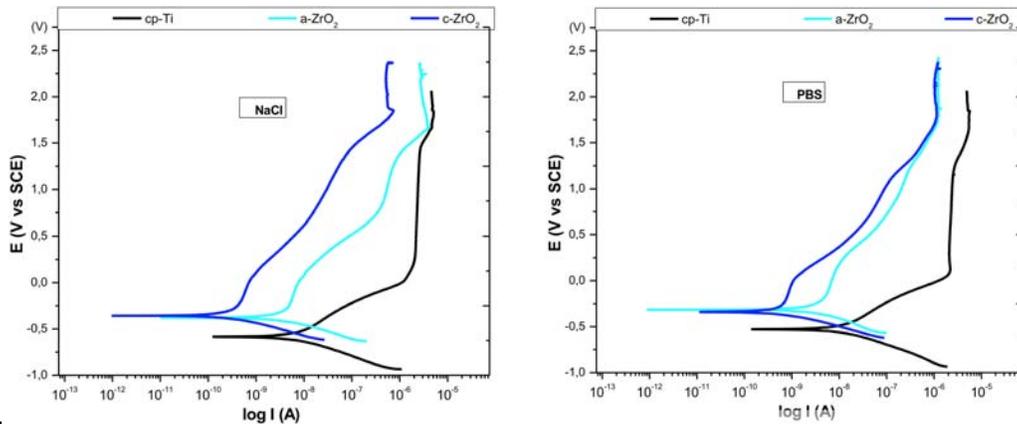
**Figura 47.** Resultados de la corriente de corrosión, potencial de corrosión y velocidad de corrosión usando el programa *Gamry Echem Analyst 5.61*.

Si comparamos los óxidos de titanio amorfo y cristalino en ambas soluciones vemos comportamientos contrarios, en NaCl el óxido cristalino tiene una corriente de corrosión ( $I_{corr}$ ) menor y un potencial de corrosión ( $E_{corr}$ ) mayor comparado con el amorfo, sin embargo en PBS el amorfo tiene una  $I_{corr}$  menor y un  $E_{corr}$  mayor. La velocidad de corrosión es menor para el c-TiO<sub>2</sub> en NaCl y menor para el a-TiO<sub>2</sub> en PBS (figuras 47 y 48)



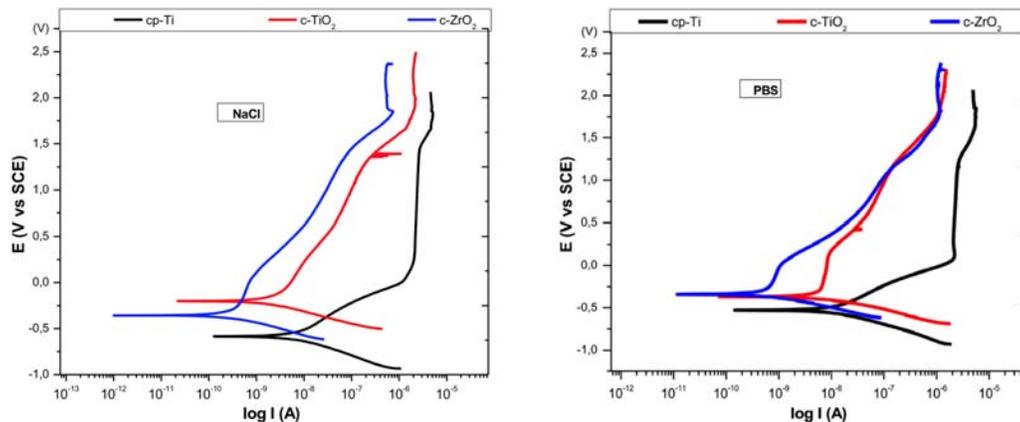
**Figura 48.** Curvas de polarización de óxidos de titanio amorfo y cristalino sumergidos en solución salina (izquierda) y PBS (derecha) durante 24 horas.

Para el óxido de circonio amorfo y cristalino el comportamiento es el mismo para la corriente  $I_{corr}$  en ambas soluciones (mayor para el amorfo), pero un potencial  $E_{corr}$  mayor para el óxido cristalino en NaCl y mayor para el cristalino en PBS sin embargo dichos potenciales son muy cercanos (figuras 47 y 49). La velocidad de corrosión es menor para el c-ZrO<sub>2</sub>.



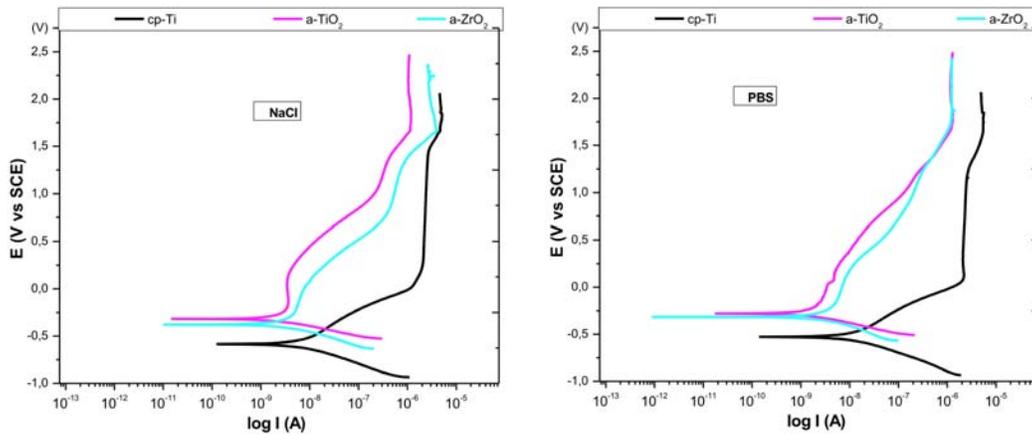
**Figura 49.** Curvas de polarización de óxidos de circonio amorfo y cristalino sumergidos en solución salina (izquierda) y PBS (derecha) durante 24 horas.

Comparando las superficies cristalinas vemos que el c-TiO<sub>2</sub> tiene un potencial de corrosión mayor en NaCl pero menor en PBS comparado con c-ZrO<sub>2</sub> y en ambas soluciones c-ZrO<sub>2</sub> tiene una corriente de corrosión menor, dando así una velocidad de corrosión menor para c-ZrO<sub>2</sub> (figuras 47 y 50)



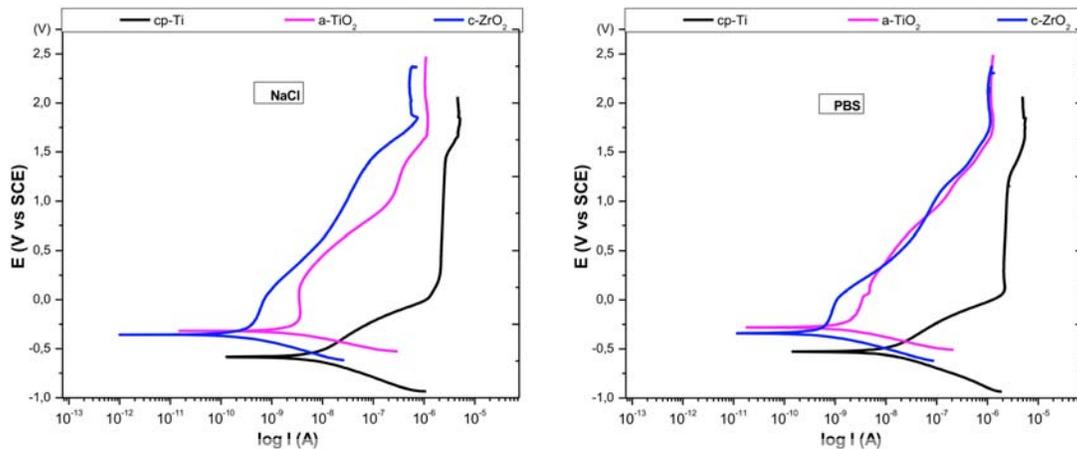
**Figura 50.** Curvas de polarización del óxido de titanio cristalino y de óxido de circonio cristalino, sumergidas en una solución salina (izquierda) y en PBS (derecha) durante 24 horas.

Para el caso de las películas amorfas en solución salina y en PBS el comportamiento es igual, mayor potencial de corrosión, menor corriente y menor velocidad de corrosión para el a-TiO<sub>2</sub> (figuras 47 y 51).



**Figura 51** . Curvas de polarización de óxidos amorfos en solución salina (izquierda) y en PBS (derecha) durante 24 horas.

Por último, tomando en cuenta las curvas de OCP (figura 47), parecen tener mejor respuesta a la corrosión las películas de  $c\text{-ZrO}_2$  y de  $a\text{-TiO}_2$ , comparando sus de curvas de polarización vemos que el potencial de corrosión  $E_{\text{corr}}$  es mayor para  $a\text{-TiO}_2$ , sin embargo la  $I_{\text{corr}}$  es menor para  $c\text{-ZrO}_2$  y esto concuerda midiendo los valores con el programa *Gamry Echem Analyst 5.61* (figuras 47 y 52).



**Figura 52**. Curvas de polarización de óxido de titanio amorfo y óxido de circonio cristalino en NaCl (izquierda) y en PBS (derecha)

### 3.3 Pruebas de adhesión bacteriana

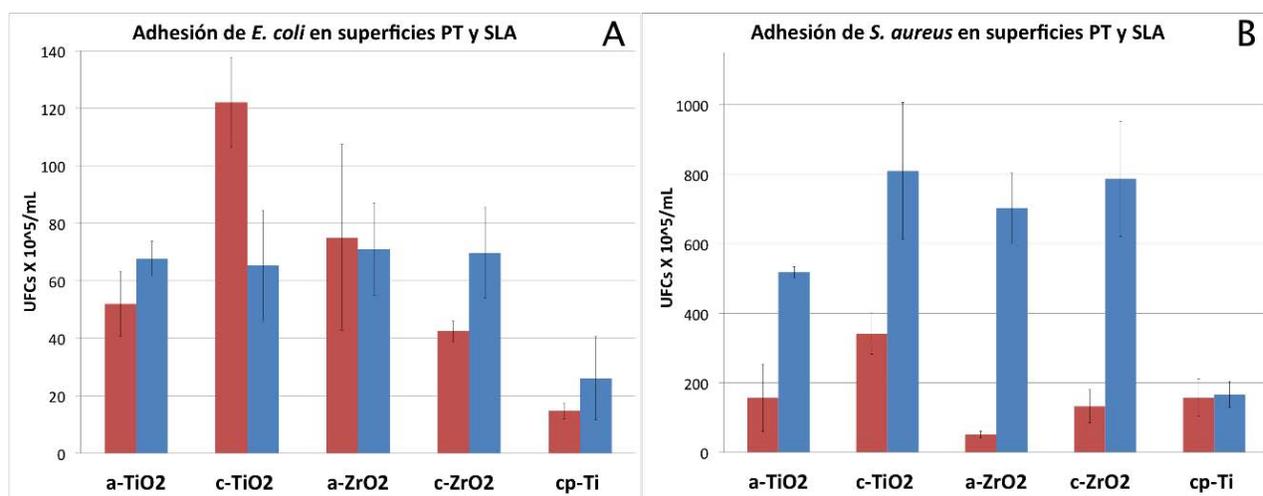
*Resultados por medio del conteo de UFCs.*

Los resultados de adhesión bacteriana por medio del conteo de UFCs se muestran en las figuras 53 y 54.

En general, se observa una mayor adhesión de *S. aureus* que de *E. coli* independientemente del tipo de superficie alcanzando conteos alrededor de  $800 \times 10^5$  UFC/mL para *S. aureus* y para *E. coli* el máximo número fue alrededor de  $120 \times 10^5$  UFC/mL (figura 54). La excepción se da en superficies PT para a-ZrO<sub>2</sub> y la diferencia no es muy significativa (tomando en cuenta las barras de error) en a-TiO<sub>2</sub> también en superficies PT.

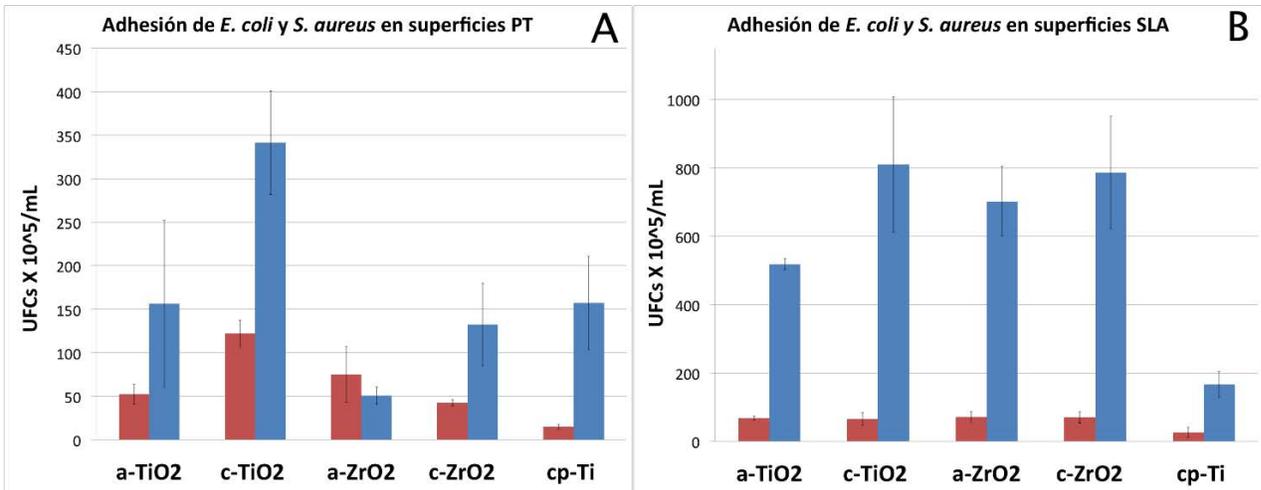
Para *E. coli* sobre superficies PT se presenta mayor adhesión sobre superficies de c-TiO<sub>2</sub> y menor adherencia en la muestra sin recubrimiento. Para *S. aureus* dicha tendencia también en superficies PT es más pronunciada, sólo que la menor adherencia se da en a-ZrO<sub>2</sub> (figura 54-A).

En superficies SLA (figura 54-B) todos los recubrimientos tienen un número de UFCs de *E. coli* similares menor para el titanio sin recubrir, lo mismo sucede con *S. aureus* excepto en el a-TiO<sub>2</sub> cuya adhesión es menor comparada con los demás recubrimientos, pero la adhesión más baja se dio nuevamente en el titanio sin el recubrimiento.



**Figura 53.** Conteo de unidades formadoras de *E. coli* (A) y *S. aureus* (B) sobre las superficies PT (barras izquierdas en rojo) y sobre superficies SLA (barras derechas en azul).

*S. aureus* se adhiere mejor en superficies SLA con recubrimiento que en superficies PT. Sin recubrimiento la adhesión es semejante (figura 53-B).



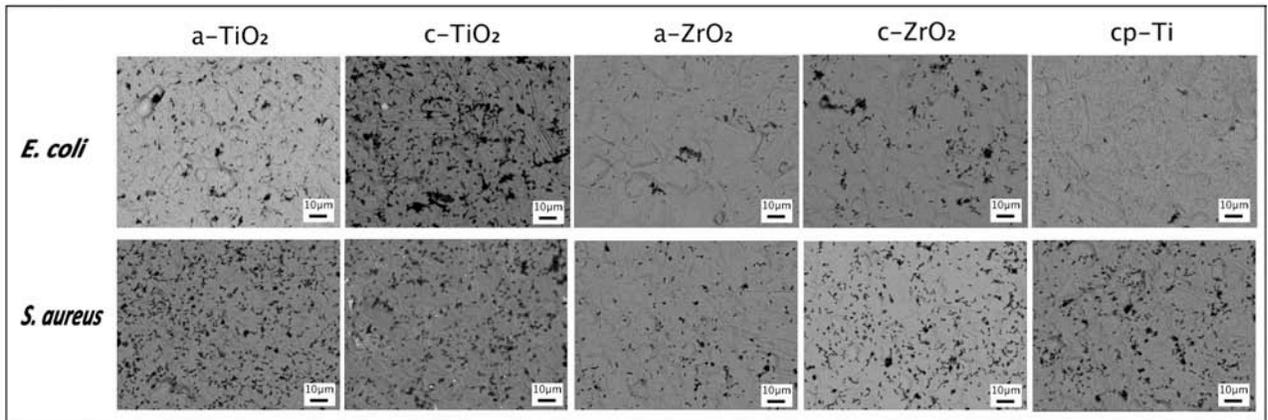
**Figura 54.** Conteo de unidades formadoras de *E. coli* (barras del lado izquierdo de color rojo) y *S. aureus* (barras de color azul, lado derecho) sobre las superficies PT (izquierda) y sobre superficies SLA (derecha).

Se ha propuesto que la química y la topografía de la superficie juega un papel importante en la adhesión bacteriana. Por ejemplo, se ha reportado una adherencia menor en óxido de titanio en comparación con su respectivo sustrato [84] también se ha llegado a resultados experimentales ya sea en vivo o *in vitro* aparentemente contradictorios, es decir, se ha reportado mayor adherencia en sustratos de titanio comparados con sustratos de circonio, o bien mayor adherencia en circonio que en titanio, en otros no se ha reportado diferencias en la adhesión, pero al parecer se coincide en que el óxido de circonio es un buen biomaterial comparándolo con el óxido de titanio, con propiedades incluso mejores hablando de adhesión bacteriana [84-90]. Si bien hay discrepancias y contradicciones en los resultados se debe ser cauteloso en tomar una decisión ya que las condiciones en que se realizaron dichos experimentos y las variables a controlas no fueron las mismas. Más adelante se discute en esta tesis las posibles causas de los resultados en la adhesión.

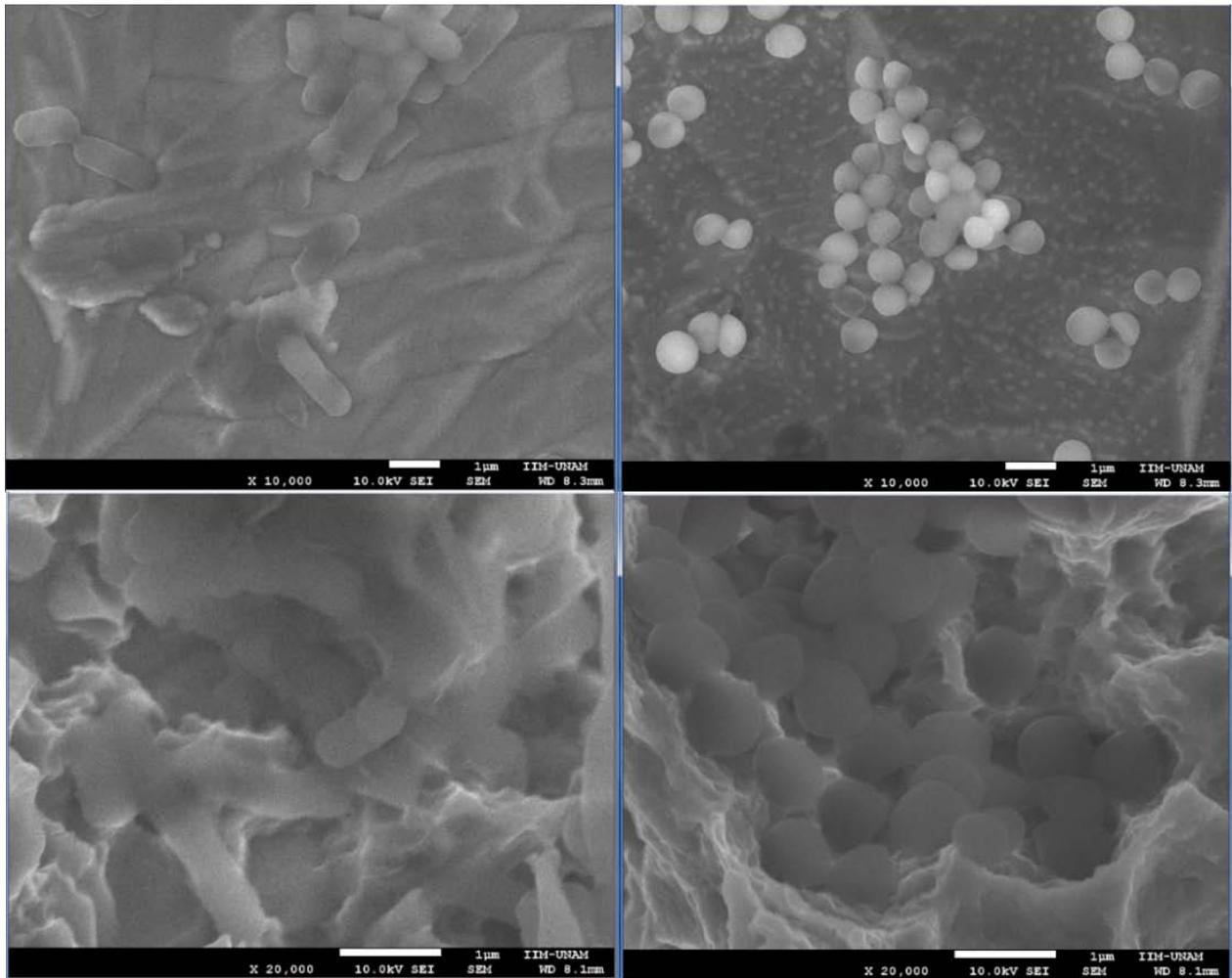
#### *Resultados por medio de SEM.*

En general, se pueden observar comportamientos similares en varias de las superficies de la adhesión bacteriana viendo las micrografías hechas con microscopio electrónico. Por ejemplo en la figura 58 tenemos micrografías en aumento de 10000X usando electrones secundarios y podemos ver que la cantidad de bacterias (manchas negras) es mayor en los sustratos de c-TiO<sub>2</sub> para *E. coli*, también se observa que la adhesión de *S aureus* es menor en la superficie de a-ZrO<sub>2</sub>.

En la figura 59 vemos micrografías de *E. coli* y *S. aureus* adheridas en superficies PT y SLA en aumentos de 20K para entender mejor la morfología de dicha adhesión.



**Figura 55.** Micrografías representativas de la adhesión bacteriana sobre superficies PT sin recubrir (sustrato) y con recubrimiento, las manchas de color negro corresponden a bacterias *E. coli* (izquierda) y *S. aureus*. Las barras blancas corresponden a 10µm.

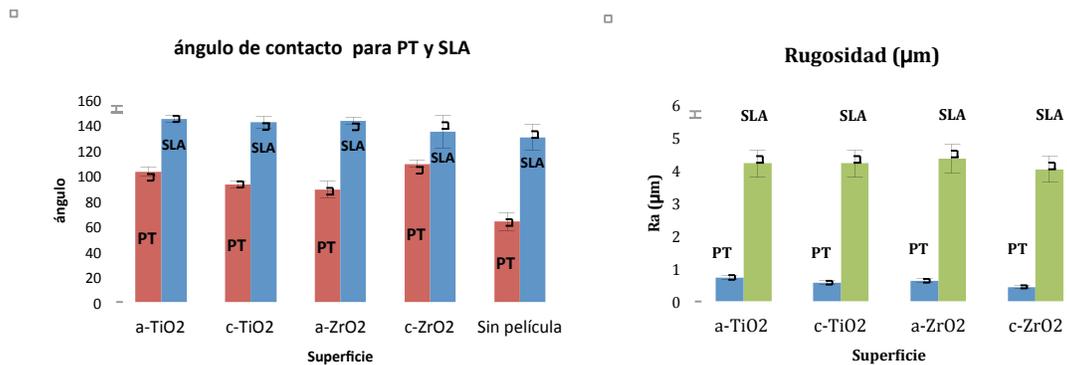


**Figura 56.** Adhesión bacteriana sobre sustratos PT (arriba) y sustratos SLA (abajo) de *E. coli* (izquierda) y de *S. aureus* (derecha, la barra blanca corresponde a una micra).

La figura 56 nos muestra la adhesión de *E. coli* (lado izquierdo) y *S. aureus* (lado derecho) en sustratos PT (arriba) y SLA (abajo), se puede notar que las bacterias *S. aureus* tienden a “acomodarse” en los resquicios de las superficies SLA, ese acomodo no es notable para *E. coli*, probablemente esto facilita la adhesión de *S. aureus* en superficies SLA aumentando así el área de contacto con la superficie.

*Ángulo de contacto y rugosidad versus adhesión bacteriana.*

Si bien podemos hablar de una relación promedio entre el ángulo de contacto y la rugosidad para estas superficies en particular ya que para rugosidades mayores corresponden ángulos mayores independientemente de la química y la fase del recubrimiento usado (figura 57), el panorama no es el mismo para la adhesión comparada con el ángulo de contacto o bien con la rugosidad (figuras 58 y 59) ya que no se observa una tendencia clara para *E. coli*, sin embargo, para *S. aureus* sí podemos observar un aumento en la adhesión al aumentar la rugosidad o el ángulo de contacto.



**Figura 57.** Ángulo de contacto y rugosidad para superficies.

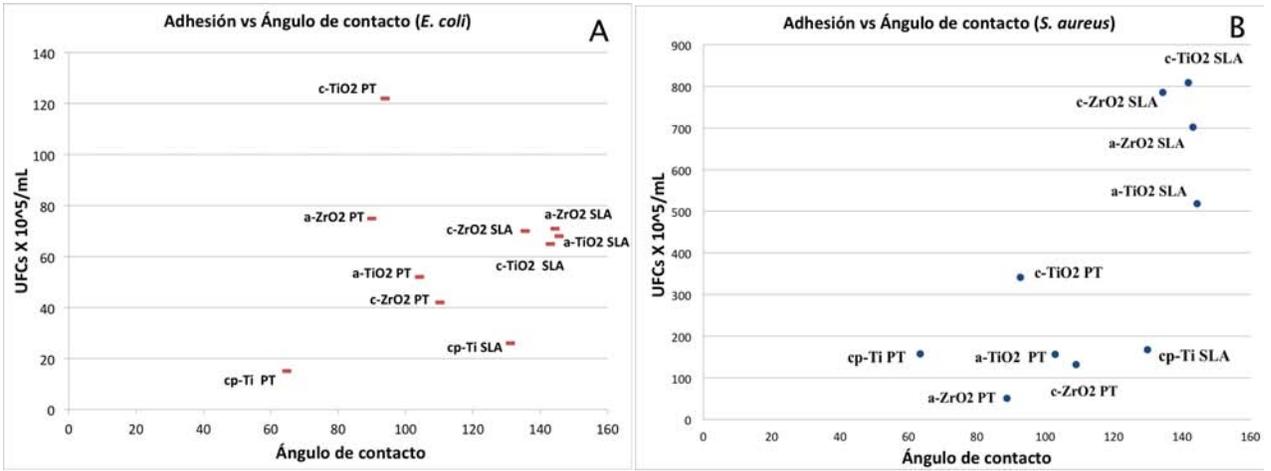


Figura 58. Adhesión bacteriana comparada con el ángulo de contacto para *E. coli* (A) y para *S. aureus* (B).

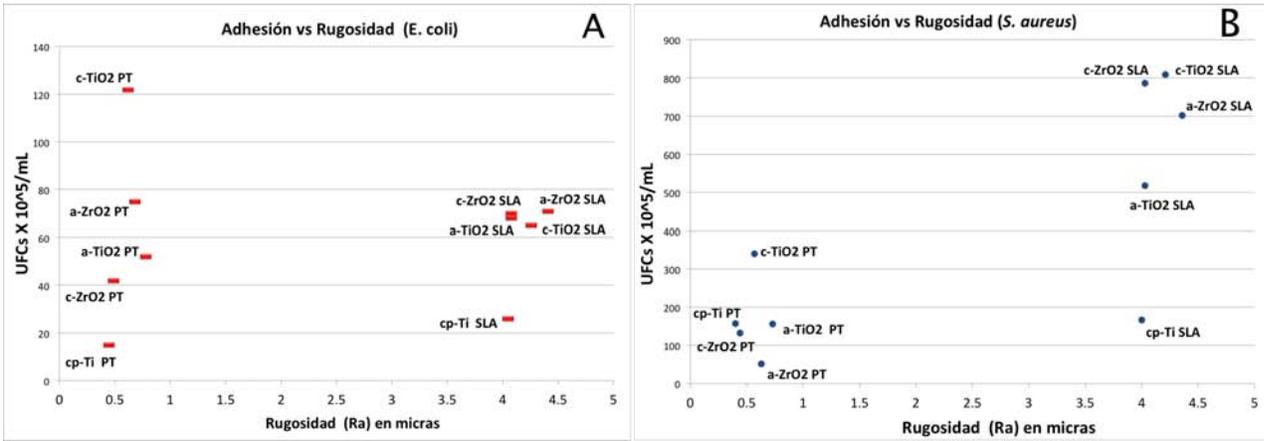


Figura 59. Adhesión bacteriana comparada con la rugosidad para *E. coli* (A) y para *S. aureus* (B).

## CAPÍTULO IV

### 4 DISCUSIÓN

El objetivo de esta tesis fue la de evaluar la respuesta a la corrosión y a la adhesión bacteriana para dos óxidos comúnmente usados en el área clínica y dental,  $ZrO_2$  y  $TiO_2$ . Para las pruebas de corrosión se usaron rugosidades de alrededor de  $0.3\mu m$  y para las pruebas de adhesión bacteriana superficies de PT ( $0.5\mu m$ ) y SLA ( $4\mu m$ ) los cuales fueron comprados. Las películas delgadas fueron realizadas por *magnetron sputtering*.

Era ideal mantener el mismo espesor de todos los depósitos de óxido sobre los sustratos de titanio puro, desafortunadamente el grosor de las películas no fue el mismo (figura 43). Esto pudo ser debido a diferentes factores que influyen durante el depósito, por ejemplo, la dureza de los blancos utilizados.

La composición de las películas fue estequiométrica para los dos óxidos usados. La fase cristalina  $TiO_2$  fue una mezcla de Anatasa y Rutilo mientras que para  $c-ZrO_2$  la estructura fue de Badelleyita. Se midió también el ángulo de contacto con agua bidestilada para las diferentes superficies, obteniendo 63.4 grados para la superficie PT sin recubrimiento y alrededor de 88 a 109 grados para las superficies PT con recubrimiento. Para las superficies SLA se obtuvo un ángulo de contacto de 129.9 grados para la superficie sin recubrir y también se observó un aumento ligero hacia 134-144 grados para las superficies SLA con recubrimiento. El aumento en el ángulo de contacto para los sustratos con los recubrimientos pudo deberse a la contribución de zonas en forma angular debido a los granos cristalinos, como puede observarse en la figura 26. Por otro lado, al hacer los depósitos de las películas amorfas se crean pequeños cúmulos en forma de coliflor, característicos de la técnica usada, figura 27. Los pequeños cambios en el ángulo de contacto con agua bidestilada (mojabilidad) entre los óxidos amorfos y su contraparte cristalina, podría estar relacionado con el ordenamiento en la estructura superficial o bien con las modificaciones a escala nanométrica de la rugosidad, se sabe que la rugosidad influye en el ángulo de contacto medido en las superficies, esta influencia depende del material usado, amplificando el resultado del ángulo de contacto [96-101]. Desafortunadamente no hay mucha información reportada sobre las diferencias en las propiedades superficiales de óxidos metálicos nanocristalinos y amorfos [75].

Para las pruebas de corrosión se usaron dos diferentes soluciones de interés biológico, NaCl y PBS. Primero se hicieron pruebas a circuito abierto (OCP), las cuales nos dieron el mismo orden de potencial en ambas soluciones para las diferentes superficies, siendo el recubrimiento de  $a-TiO_2$  el más positivo seguido por  $c-TiO_2$ ,  $a-ZrO_2$ ,  $c-ZrO_2$  y  $cp-Ti$  respectivamente. De esta forma el  $a-TiO_2$

puede ser menos corrosivo, seguido por los restantes recubrimientos (en dicho orden). Después se realizaron pruebas potenciodinámicas para encontrar la corriente de corrosión ( $I_{\text{corr}}$ ), el potencial de corrosión ( $E_{\text{corr}}$ ), así como la velocidad de corrosión. En este caso se obtuvo una velocidad de corrosión menor para el c-ZrO<sub>2</sub> seguido por el a-TiO<sub>2</sub> y por el c-TiO<sub>2</sub>. Si bien se esperaba una mayor velocidad de corrosión en las superficies cristalinas debido a la presencia de los límites de granos, los resultados indican que dichos límites no contribuyen sustancialmente a la velocidad de corrosión, al menos no a escala nanométrica. Es necesario hacer notar que sólo se tomó en cuenta una pequeña parte de las curvas anódicas y catódicas de las gráficas y no se hizo una interpretación de la forma de las curvas anódicas ya que no se realizó un escaneo de “rebote”, es decir que no se regresó el potencial a valores pequeños después de haber llegado a cierto valor máximo en el potencial aplicado y tampoco se tomó un escaneo adecuado para tener gráficas lo suficientemente confiables en dicha región anódica para hacer una adecuada interpretación (al tener velocidades de escaneo muy grandes la parte anódica de varias gráficas quedó de forma vertical) [92].

Comparando finalmente las superficies cristalinas con las superficies amorfas, podemos ver que para el circonio, el recubrimiento con una mejor respuesta ante la resistencia a la corrosión ( $I_{\text{corr}}$ ,  $E_{\text{corr}}$  y velocidad de corrosión) es el cristalino, sin embargo en las curvas de OCP el resultado parece ser el contrario, pero hay que tomar en cuenta que usando NaCl, las curvas de OCP quedan muy cerca. Para superficies con el óxido de titanio parece ser el recubrimiento amorfo el más resistente ya que a pesar de que presenta un aumento ligero en la velocidad de corrosión en NaCl comparado con el cristalino, su  $E_{\text{corr}}$  en dicho medio es menor, además de que las curvas de OCP también lo ubican como más resistente a la corrosión.

Las pruebas de adhesión bacteriana se realizaron en un tiempo de 24 horas usando bacterias *E. coli* y *S. aureus* y el número de bacterias adheridas en cada superficie fue medido principalmente con el método de conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) pero además se comparó visualmente con imágenes obtenidas por SEM. Si sólo comparamos la adhesión en superficies PT vemos que las bacterias se adhieren mayormente sobre los recubrimientos de c-TiO<sub>2</sub>. Siendo más notable tal tendencia para *S. aureus*.

*S. aureus* se adhiere más que *E. coli* en todas las superficies, excepto para a-ZrO<sub>2</sub> con rugosidad PT y probablemente tampoco para a-TiO<sub>2</sub> con rugosidad PT (las barras de error se traslapan). La bacteria *S. aureus* comparada con *E. coli* presenta una mayor capacidad de adherencia sobre superficies cristalinas, independientemente de la rugosidad y del tipo de material (óxido de circonio ó de titanio)

siendo alrededor del doble (para superficies PT) o hasta alrededor de 100 veces mayor (para superficies SLA).

Las superficies sin recubrir tuvieron en general una menor adhesión bacteriana, lo que nos indica que los sustratos recubiertos son más “biocompatibles” que los metales sin recubrir y por lo tanto tienen más afinidad con las bacterias empleadas. Esto podría estar relacionado con una buena respuesta celular, por que se sabe que existe una “competencia” entre bacterias y células para colonizar o adherirse al biomaterial y aunque ambos procesos de adherencia sean algo diferentes a los dos se les relaciona con atracciones de tipo electrostática [8, 9, 11, 26, 27, 33, 44, 57, 102 ].

Tomando en cuenta únicamente las diferencias en la adhesión entre los sustratos con recubrimiento y el sustrato que no tiene la película, y aunque sabemos que existen varias propiedades físicas y químicas distintas entre éstos, probablemente sean sólo dos factores los principales causantes de alteran la cantidad de bacterias adheridas en uno u otro caso, uno podría ser la presencia de oxígeno de los recubrimientos y el segundo la conductividad eléctrica el cual influye en el acomodo de cargas sobre la superficie. Ambos óxidos son semiconductores y el titanio puro es conductor. Se han hecho varios estudios que relacionan rugosidad o morfología con la adhesión bacteriana [49] los cuales mencionan una preferencia por ciertas configuraciones topográficas, hablando de distancia entre huecos, ondulaciones, o de cierta magnitud en las rugosidades. Otros trabajos proponen de igual forma una preferencia por cierta rugosidad, distancia entre huecos de nanotubos o entre nano-*dots* (por ejemplo, oro) sobre la superficie, que facilita la adhesión de células [103] o bien que hay ciertos planos cristalinos de óxido de titanio preferenciales en la adhesión de proteínas y cuya adhesión es menor sobre tubos de óxido de titanio cristalino [94] o que ciertas moléculas se reacomodan (girando o torciéndose) al interactuar con la superficies [93].

Lo anterior aunado al trabajo de E. Gongadze y su equipo, en el cual proponen concentraciones de cargas negativas en zonas angostas o angulosas de superficies de titanio las cuales facilitan la adhesión de células con carga positiva en dichos lugares negativos. Por todo lo anterior es probable que la adherencia sea mucho mayor en superficies SLA para *S. aureus* comparada con *E. coli* (figuras 54 y 58 ) debido a su forma redonda y relativamente pequeña pudiéndose colocar entre los resquicios de la superficie cuyas curvaturas en las cavidades es similar a la de las bacterias *S. aureus* (del orden de micras, figura 56), y cuya carga podría ser menos negativa (o hasta positiva) debido a que la carga eléctrica de los materiales (mayormente negativa), podría concentrarse principalmente en las zonas más angostas o en las esquinas según Gongadze, facilitando así la adhesión de *S. aureus* (cuya carga neta es negativa para pH fisiológicos) en estas zonas [91]. Sus extensiones con

terminaciones de hidrógeno y oxígeno con carga negativa (figura 16), las cuales son móviles ayudarían después a su adsorción. Pero no sólo tienen cargas negativas la cual se relaciona con el potencial zeta ( $\zeta$ ), sino además poseen iones con carga positiva cuya cantidad puede variar, dependiendo del medio circundante (figura 17). Dichas movilidad de carga puede dar como consecuencia diferencias de carga en la superficie de la bacteria y dicha configuración de carga con las extensiones, podrían interactuar con el ordenamiento atómico de la capa de óxido (enlaces Ti-O o bien Zr-O) incrementando las interacciones de largo alcance, como las fuerzas de Van der Waals o los puentes de hidrógeno (y más aún, si dichas extensiones estuvieran distribuidas en “racimos”, como los lipopolisacáridos (LPS) de las bacterias Gram negativas), haciendo que se adhieran a la superficie de una manera preferencial relacionado con el tipo de ordenamiento de carga tanto en la superficie inerte como en la bacteria [42, 43, 91]. Por último, debido a la conductividad, (en el caso del metal sin recubrir) esta distribución de carga podría ser más pronunciada y como la interacción de los microorganismos podría estar influenciada por la distancia entre las zonas positivas y las negativas (o bien entre zonas con diferencia de carga) dicha distribución mayormente marcada al usar superficies SLA podría afectar la adhesión de ambas cepas que podrían tener menor afinidad por dicha distribución de carga debida influenciada por la escala y forma física del material, aunado a la disminución drástica de oxígeno que facilite la unión la adsorción y a que el titanio sin recubrir resultó hidrofóbico (ángulo de contacto menor a  $65^\circ$ ) y as bacterias son hidrofóbicas la adhesión resultante sería menor que con el recubrimiento.

Ya que la mayor parte de los estudios no llegan a un consenso, es recomendable hacer más estudios. En esta tesis se uso un análisis con un intervalo limitado de alguna de las variables, por ejemplo, en la rugosidad sólo se usaron dos superficies (PT y SLA), además la repeticiones en los experimentos de adhesión fue por triplicado. Si bien por la naturaleza de dichos experimentos y el tiempo que conlleva realizarlos dichos números son adecuados, estadísticamente podría ser una limitante para tener un panorama más amplio.

### 5 CONCLUSIONES

El depósito de las películas amorfas y cristalinas induce un cambio sutil en la nanotopografía de los sustratos. Con microscopía electrónica se apreció que al formarse películas cristalinas, la nanotopografía presentaba formas geométricas indicando las facetas de los cristales; efecto más visible en el caso del óxido de titanio que en el óxido de circonio, cuyo tamaño de grano era menor como pudo constatarse por el mayor ancho de los picos en los patrones de difracción de rayos-X. Las películas amorfas al contrario presentaban una nanotopografía redondeada en ambos casos. Las mediciones de rugosidad no se realizaron a escala nanométrica, de modo que no se pudo constatar a nivel nanométrico dicho cambio.

La adhesión bacteriana es menor en superficies sin recubrir, es decir, en titanio puro sin las películas delgadas. Y la superficie en la que se observa una mayor adherencia es sobre el recubrimiento de óxido de titanio cristalino independientemente del tipo de rugosidad (PT ó SLA), dicha superficie es la única que arroja resultados concluyentes con las bacterianas utilizadas, según los resultados de los conteos obtenidos. Por otra parte con los resultados obtenidos en esta tesis podríamos concluir que el titanio amorfo es mejor material en términos de adhesión bacteriana comparado con su contraparte cristalina., sin embargo no podemos concluir algo similar comparándolo con el circonio..

En términos de corrosión, las gráficas obtenidas para las pruebas de circuito abierto y las curvas de polarización indican de forma cualitativa y cuantitativa que el óxido de titanio amorfo se corroe más lentamente que el óxido de circonio amorfo así como del óxido de titanio cristalino, pero al parecer no es el único que puede mostrar un buen comportamiento ante la corrosión. Tanto en NaCl como en PBS, también el óxido de circonio cristalino como recubrimiento mejora la respuesta ante la corrosión. Lo que queda claro es que las películas presentan velocidades de corrosión menores que el sustrato metálico.

Uniando los resultados de adhesión bacteriana con los de corrosión, esta tesis parece indicar que la mejor superficie sería el óxido de titanio amorfo aunque también el óxido de circonio cristalino podría competir. Sin embargo considerando que durante el proceso de preparación de las películas, el calentamiento implica un proceso energético extra, además del tiempo, los costos de preparación del recubrimiento  $c\text{-ZrO}_2$  sería mayor que el  $a\text{-TiO}_2$ .. Sin embargo sería conveniente hacer más experimentos ya que no hay más trabajos comparando las superficies cristalinas y amorfas en un medio biológico vivo y, como se mostró al principio de la tesis, el organismo humano no sólo consta de dos diferentes bacterias, sino de cientos de ellas y la interacción en realidad no se da sólo entre

bacteria y material, sino que al parecer siempre están otras sustancias como las proteínas jugando un papel de intermediarias por último tenemos la coagregación, la cual también es muy importante.

## CAPÍTULO VI

### 6 BIBLIOGRAFÍA

- [1] U. Kamachi Mudali & Baldev Raj, Corrosion Science and Technology: Mechanism, Mitigation and Monitoring, CRC press, 2009, India, p 598.
- [2] Ramakrishna S, Mayer J, Wintermantel E, Leong Kam W. *Compos Sci Technol* 2001;61:1189–224.
- [3] Wise DL. *Biomaterials engineering and devices*. Berlin: Humana Press; 2000. p. 205–319.
- [4] Park JB, Bronzino JD, editors. *Biomaterials: principles and applications*. Boca Rator, FL: CRC Press; 2003. p. 1–241.
- [5] M. Geetha et al., Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review, *Progress in Materials Science* 54 (2009) 397–425
- [6] Sandra E. Rodil, Modificación Superficial de Biomateriales Metálicos, *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales* 2009; 29 (2): 67-83
- [7] C. Miron et al., Photoinduced bactericidal activity of tio<sub>2</sub> thin films obtained by radiofrequency magnetron sputtering deposition – A review, *Progress in Materials Science* 54 (2009) 397–425
- [8] Yi Wang, Guruprakash Subbiahdoss, Jan Swartjes, Henny C. van der Mei, Henk J. Busscher, and Matthew Libera, Length-Scale Mediated Differential Adhesion of Mammalian Cells and Microbes, *Adv. Funct. Mater.* 2011, 21, 3916–3923
- [9] G. Subbiahdoss et al., Microbial biofilm growth vs. tissue integration: “The race for the surface” experimentally studied, Elsevier, *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 1399-1404.
- [10] D.C. Ludwigson, “Requirements for metallic surgical implants and prosthetic devices,” *Metals Engineering Quarterly*, 5(3) (1965), 1-6.
- [11] J. D. Bronzino (ed.), *The Biomedical Engineering Handbook*, 2nd Ed., Vol. I, CRC Press & IEEE Press (2000)
- [12] G.A. Thibodeau and K.T. Patton, *Anatomy and Physiology*, 4th Ed., Mosby Inc., MO (1999), 851-887.
- [13] Enrique Otero Huerta, *Corrosión y degradación de materiales*, Ed. Síntesis S.A. 1997, pp366

- [14] Francisco J. Pancorbo, Corrosión, degradación y envejecimiento de los materiales empleados en la edificación, Marconbo, España, 2011, pp538
- [15] Strehblow H. H., "Mechanism of pitting corrosion" in Corrosion Mechanism in Theory and Practice, Eds. P. Marcus and J. Oudar Marcel Dekker, New York, p. 2001
- [16] Lopez, G. D., Biodeterioro y Corrosión de Implantes y Prótesis Metálicos, MEDICINA, (Buenos Aires) 53: 260-274 (1993)
- [17] J. Genescá, Técnicas electroquímicas de corriente directa para la determinación de la velocidad de corrosión, Técnicas de Extrapolación de Tafel o de Intersección, Facultad de Química, UNAM, México, D.F.
- [18] W. Frank, Primer Curso de Ingeniería Electroquímica, Editorial ECC, España, 2000, pp420
- [19] C. Wagner y W. Traud, Z. Elektrochem. 44, 391 (1938).
- [20] Diagramas de Pourbaix:  
[http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Diagrama\\_de\\_Pourbaix\\_\(pH\\_vs\\_E\)\\_16685.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Diagrama_de_Pourbaix_(pH_vs_E)_16685.pdf)
- [21] J. M. López et al., Microbiología Bacteriología y Virología, Editorial Mendez, pp. 919, México, 2010
- [22] C. Y. Peter Lau et al., Differential Lipopolysaccharide Core Capping Leads to Quantitative and Correlated Modifications of Mechanical and Structural Properties in Pseudomonas aeruginosa Biofilms, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Vol. 191, No. 21, Nov. 2009, p. 6618–6631
- [23] SW. Borenstein, Microbiologically influenced corrosion handbook, Woodhead Pub. Ltd., Cambridge (1994)
- [24] C.C. Gaylarde and H.A. Videla, Bioextraction and biodeterioration of metals, Cambridge University Press, Cambridge (1995)
- [25] H.A. Videla and L. K. Herrera, Microbiologically influenced corrosion: looking to the future, International Microbiology, 8, pp. 169-180 (2005)
- [26] R. Bos et al., Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions –its mechanisms and methods for study, FEMS Microbiology Reviews 23 (1999) 179-230

- [27] J. Palmer et al., Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm, *J Ind Microbiol Biotechnol* (2007) 34:577–588
- [28] M. Katsikogianni and Y.F. Missirlis, Concise Review of Mechanisms of Bacterial Adhesion to Biomaterials and of Techniques Used in Estimating Bacteria- Material Interactions, *MEu.rKopatessainkoCgeiallnsnainadndMYa.tFe.riMalisssViorli.s8*. 2004 (pages 37-57)
- [29] Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR and Lappin-Scott HM (1995), Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49:711-745.
- [30] Costerton JW, Cheng K-J, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JG, Dasgupta M and Marrie TJ (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 41:435-464.
- [31] Ceri H, Olson M, Stremick C, Read RR, Morck D and Buret A (1999) The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 37:1771-1776.
- [32] Peifu Tang et al., Effect of Superhydrophobic Surface of Titanium on Staphylococcus aureus Adhesion, Hindawi Publishing Corporation, *Journal of Nanomaterials*, Volume (2011), Article ID 178921
- [33] A. T. Poortinga, Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces, *Surface Science Reports* 47 (2002) 1-32
- [34] G. Seltman y O. Holst, *The Bacterial Cell Wall*, Springer-Verlag, Berlin Germany, (2002), pp283
- [35] T. Boland, Molecular Basis of Bacterial Adhesion, *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods, and Applications*, Edited Humana Press Inc., Totowa, NJ, (2000), pp644.
- [36] D. Linke and A. Goldman Editors, *Bacterial Adhesion-Chemistry, Biology and Physics*, Springer, NY, (2011), pp374
- [37] E. Sheehan, Adhesion of Staphylococcus to orthopaedic metals, an in vivo study, *Journal of Orthopaedic Research* 22 (2004) 39–43
- [38] J. P. Narato and J. B. Kaper, Diarrheagenic Escherichia Coli, *Clinical Microbiology Reviews*, Jan. Vol. 11, No. 1, (1998), p. 142–201

- [39] E. S. Taylor and S. K. Lower, Thickness and Surface Density of Extracellular Polymers on *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 74, No. 1, Jan. 2008, p. 309–311
- [40] Q. Lu et al., Understanding The Molecular Interactions Of Lipopolysaccharides During E. Coli Initial Adhesion with a Surface Forces Apparatus, *The Royal Society of Chemistry, Soft Matter*, 2011 p. 1–15
- [41] Dirk Linke · Adrian Goldman Editors, *Bacterial Adhesion Chemistry, Biology and Physics*, Springer, NY, (2011) pp. 390
- [42] M. Fraunholz and B. Sinha, Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 2, art. 43, (2012)
- [43] J. A. Bustos-Martínez et al., *Staphylococcus Aureus: La Reemergencia de un Patógeno en la Comunidad*, *Rev Biomed* 2006; 17:287-305.
- [44] A.G. Gristina, Biomaterial- Centered Infection: Microbial Adhesion Versus Tissue Integration, *Science, New Series*, Vol. 237, No 4822, (1987), pp 1588-1595
- [45] F. C. Neuhaus and J. Baddiley, A Continuum of Anionic Charge: Structures and Functions of D-Alanyl-Teichoic Acids in Gram-Positive Bacteria, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 67, No. 4, ( 2003), pp. 686–723
- [46] B. Li and B. E. Logan, Bacterial Adhesión to Glass and Metal-Oxide Surfaces, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 36 (2004) pp. 81-90
- [47] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections, *Science* 1999;284: 1318–1322.
- [48] G. M. Bruisman et al., Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses, *Biomaterials* 22 (2001) 3217–3224
- [49] Ivanova, E.P. et al., Differential attraction and repulsion of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on molecularly smooth titanium films. *Sci. Rep.* 1, 165; DOI:10.1038/srep00165 (2011)
- [50] Vi K. Truong et al., The influence of nano-scale surface roughness on bacterial adhesion to ultrafine-grained titanium, *Biomaterials* 31 (2010) 3674–3683

- [51] Yong Wu et al., Differential response of Staphylococci and osteoblasts to varying titanium surface roughness, *Biomaterials* 32 (2011) 951e960
- [52] S. D. Puckett et al., The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment, *Biomaterials* 31 (2010) 706–713
- [53] Rabih O. Darouiche, Device-Associated Infections: A Macroproblem that Starts with Microadherence, *Healthcare Epidemiology, Clinical Infectious Diseases* 2001:33 pp. 1567-72
- [54] N. P. Boks et al., Forces involved in bacterial adhesion to hydrophilic and hydrophobic surfaces, *Microbiology* (2008), 154, 3122–3133
- [55] N. Mitik-Dineva et al., Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, and Staphylococcus aureus Attachment Patterns on Glass Surfaces with Nanoscale Roughness, *Curr Microbiol* (2009) 58:268–273
- [56] F. Reifsteck, Hydrophobicity-hydrophilicity of staphylococci, *J. Med. Microbiol.*- Vol. 24 (1987), 65-73
- [57] M. Gross et al., Key Role of Teichoic Acid Net Charge in Staphylococcus aureus Colonization of Artificial Surfaces, *Infection and Immunity*, May. 2001, p. 3423–3426 Vol. 69, No. 5
- [58] R. P. Ellen and R. J. Gibbons, Parameters Affecting the Adherence and Tissue Tropisms of Streptococcus pyogenes, *Infection and Immunity*, Vol. 9, No. 1 Jan. 1974, p. 85-91
- [59] S. L. Walker, Role of Cell Surface Lipopolysaccharides in Escherichia coli K12 Adhesion and Transport, *Langmuir* 2004, 20, 7736-7746
- [60] U. Diebold, The surface science of titanium dioxide, *Surface Science Reports* 48 (2003) 53-229
- [61] M. Ramamoorthy, D. Vanderbilt, *Phys. Rev. B* 49 (1994) 16721. [62] C. Wang, Multiscale Modeling and Simulation of Nanocrystalline Zirconium Oxide, *Engineering Mechanics Dissertations & Theses*, Paper 3, (2009), pp. 184
- [63] E. Vera López, Uso de métodos electroquímicos como herramientas para evaluar parámetros de interfase en sistemas heterogeneos metal/medio acuoso, *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 34 (131): 241-251, 2010. ISSN 0370-3908

- [64] H. J. Busscher, R. Bos, H. C. van der Mei, P. S. Handley, in: A. Baszkin, W. Norde (Eds.), *Physical Chemistry of Biological Interfaces*, Marcel Dekker, New York
- [65] R. Javaherdashti, A review of some characteristics of MIC cause by Sulfate-reducing-bacteria, past, present and future, *Anti-corrosion Methods and Materials*, 46, pp. 173-180 (1999)
- [66] M. Fukuta et al., The adsorption mechanism of titanium-binding ferritin to amphoteric oxide, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 102 (2013) 435–440
- [67] M. T. Madigan, *Brock Biology of Microorganisms*, Pearson Education, INC., US, (2012), pp. 579
- [68] J. C. Senez, *Microbiología General*, Ed. Alhambra, España, (1976), pp. 340
- [69] J. C. Pommerville, *Alcamo's fundamentals of microbiology*, Ed. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, Massachusetts, (2011), pp. 595
- [70] Harris LG, Richards RG. Staphylococcus aureus adhesion to different treated titanium surfaces, *J Mater Sci Mater Med*. 2004 Apr; 15(2): 134-44.
- [71] G. Zhao et al., High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure, *J Biomed Mater Res A*, 74A (2005) 49-58.
- [72] F. Schwarz et al., Potential of Chemically Modified Hydrophilic Surface Characteristics to support Tissue Integration of Titanium Dental Implants, *J Biomed Mater Res B*, 88B (2009) 544-557.
- [73] A. Almaguer-Flores et al., Influence of topography and hydrophobicity on initial oral biofilm formation on microstructured titanium surfaces in vitro, *Clin Oral Implan Res* 23 (2012) 301-307.
- [74] I. Gurappa, Characterization of different materials for corrosion resistance under simulated body fluid conditions, *Materials Characterization* 49 (2002) 73–79.
- [75] U. Diebold, The surface science of titanium dioxide, *Surf Sci Rep*, 48 (2003) 53-229.
- [76] A. F. Stalder et al., A snake-based approach to accurate determination of both contact points and contact angles, *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 286 (2006) 92-103.
- [77] E. A. Vogler, Structure and reactivity of water at biomaterials surfaces, *Advances in colloid and interface science*, 74 (1998) 69 -117.
- [78] E. A. Vogler, *Interfacial Chemistry in Biomaterials Science*, in: J. C. Berg (Ed.) *Wettability*, Marcel Dekker Inc., New York, 1993, pp. 183-250.
- [79] J. M. Berg et al., Three-Component Langmuir-Blodgett Films with a Controllable Degree of Polarity, *Langmuir*, 10 (1994) 1225- 1234.

- [80] R. H. Yoon et al., Hydrophobic Interactions between Dissimilar Surfaces, *Journal of Colloid and interface science*, 185 (1997) 363-370.
- [81] E. A. Vogler, Water and acute biological response to surfaces, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, 10 (1999) 1015-1045.
- [82] Huaiyu Wang and Paul K. Chu, Chapter 4 Surface Characterization of Biomaterials, *Characterization of Biomaterials*, 2013, Elsevier, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-415800-9.00004-8>.
- [83] Abalos C., Adhesion bacteriana a biomateriales, *Av. Odontoestomatol* 2005; 21-1: 347-353.
- [84] F. Varola et al., Oxidative nanopatterning of titanium generates mesoporous surfaces with antimicrobial properties, *int J Nanomed*, 9 (2014) 2319-2325.
- [85] M. Egawa et al., *In vitro* adherence of periodontopathic bacteria to zirconia and titanium surfaces, *Dental Materials Journal*, 32 (2013) 101-106.
- [86] I. S. Yeo et al., Implant surface factors and bacterial adhesion: a review of the literature, *Int J Artif Organs*, 35 (2012) 762-772.
- [87] Z. Ozkurt and E. Kazazoglu, Zirconia Dental Implants: A Literature Review, *Journal of Oral Implantology*, 3 (2010) 367-376.
- [88] K. Nakamura et al., Zirconia as a dental implant abutment material: a systematic review, *The International journal of prosthodontics*, 23 (2010) 299-309.
- [89] K. Yamane et al., Bacterial adhesion affinities of various implant abutment materials, abutment materials. *Clin. Oral Impl. Res.* 24 (2013) 1310-1315.
- [90] Casio do Nascimento et al., Bacterial adhesion on the titanium and zirconia abutment surfaces, *Clin. Oral Impl. Res.* 25 (2014) 337-343.
- [91] E. Gongadze et al., Adhesion of osteoblasts to a nanorough titanium implant surface, *International Journal of Nanomedicine* 2011:6 1801-1816.
- [92] T. F. Keller et al., Facets of protein assembly on nanostructured titanium oxide surfaces, *Acta biomaterialia*, 9 (2003) 5810-5820.
- [93] H. P. Zhang et al., Molecular dynamics simulation of RGD peptide adsorption on titanium oxide surfaces, *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 19 (2008) 3437-3441.
- [94] G. Raffini y F. Ganazzoli, Molecular modelling of protein adsorption on the surface of titanium dioxide polymorphs, *Philos T R Soc A*, 370 (2012) 1444-1462.
- [95] L. De Nardo et al., Titanium oxide modelling and design for innovative biomedical surfaces: a concise review, *Int J Artif Organs*, 35 (2012) 629-641.

- [96] Alexandr Malijevský, Does surface roughness amplify wetting?, *The Journal Of Chemical Physics* 141, 184703 (2014)
- [97] Christian Borgs et al., Does the Roughness of the Substrate Enhance Wetting?, *PHYSICAL REVIEW LETTER*, 74:12 (1995), 2292-2294.
- [98] F. G. Yost, J. R. Michael And E. T. Eisenman, Xtensive Wetting due to Roughness, *Acta metall, mater.* Vol.43, No. 1, pp. 299-305, 1995.
- [99] David Quéré, Rough ideas on wetting, *Physica A* 313 (2002) 32–46
- [100] F. Rupp et al., Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications, *Biomaterials* 25 (2004) 1429–1438
- [101] David Quéré, Wetting and Roughness, *Annu. Rev. Mater. Res.* 2008. 38:71–99.
- [102] S. Galdiero et al., Peptide-Lipid Interactions: Experiments and and Aplicatios, *International Journal of Molecular Science*, 14 (2013) 18758-18789.
- [103] S. Bauer et al., Engineering biocompatible implant surfaces Part I: Materials and surfaces, *Progress in Materials Science* 58 (2013) 261–326.