

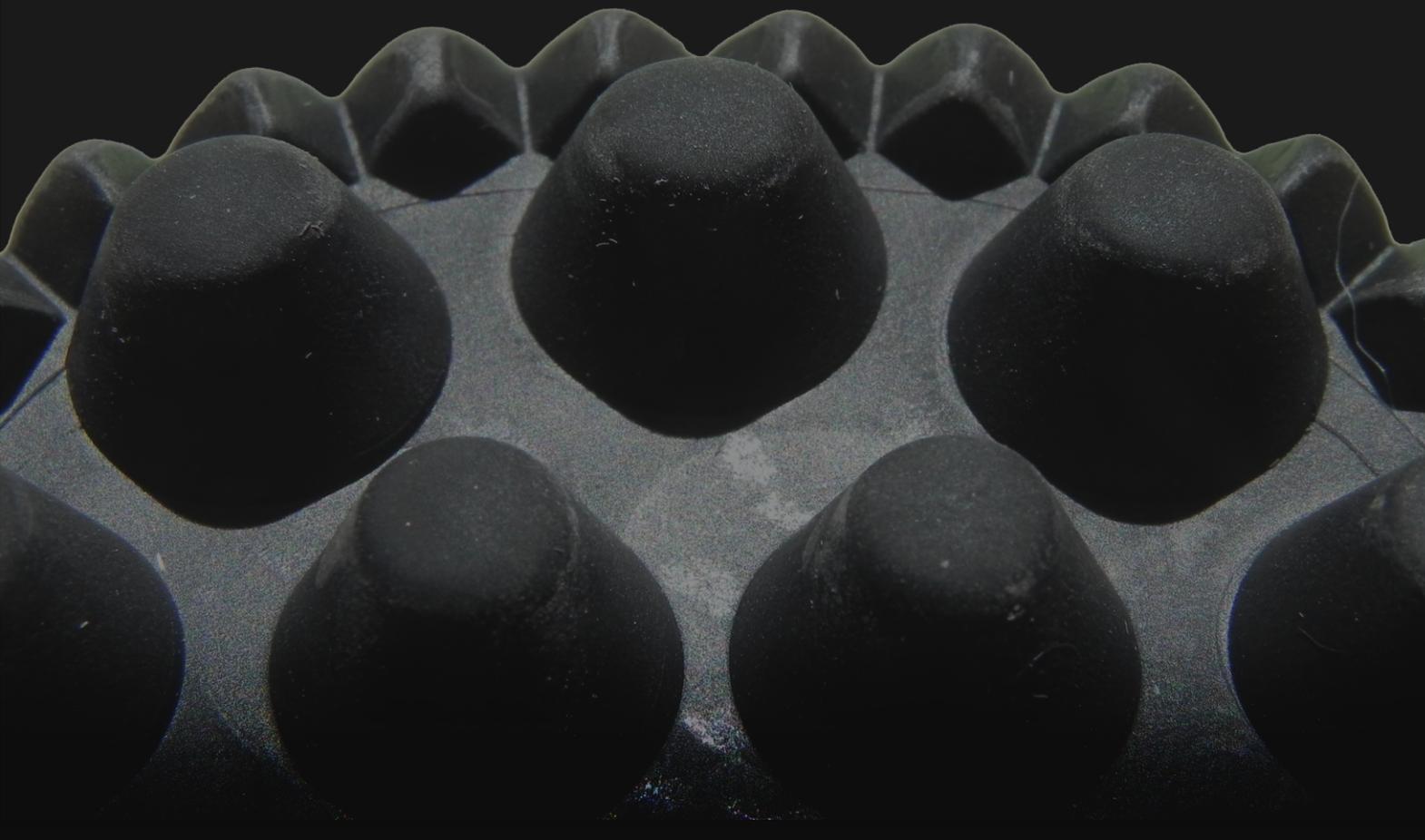


UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**“Mejoramiento de las propiedades de Biomateriales  
Dentales Metálicos mediante el uso de inhibidores  
orgánicos. Análisis de la biocompatibilidad de los  
Biomateriales tratados.”**

Trabajo de Tesis Doctoral  
**Od. María Laura Morales**

**2013**



Directora: Prof. Dra. **María Virginia Mirífico**  
Codirectora: Prof. Dra. **Susana Micinquevich**

Tapa, contratapa, carátulas:  
Fotografías: **María Gabriela Nario**  
Diseño: **Noelia L. Maríngolo y Carla F. Berghoff**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**“Mejoramiento de las propiedades de Biomateriales Dentales Metálicos mediante el uso de inhibidores orgánicos. Análisis de la biocompatibilidad de los Biomateriales tratados.”**

Trabajo de Tesis Doctoral

Od. **MORALES, María Laura**



Directora: Prof. Dra. **Mirífico, María Virginia**  
Codirectora: Prof. Dra. **Micinquevich, Susana**

2013

*A mis papás*

*A Mariano*

*A Paulina*

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de Tesis Doctoral no habría sido posible sin el apoyo de varias personas e instituciones, por lo que aprovecho este espacio para expresarles mi agradecimiento.

En principio, quisiera agradecerle profundamente a mi directora, la Dra. María Virginia Mirífico, por enseñarme todos los días de manera tan apasionada, por su comprensión, paciencia, apoyo, cariño y amistad. Por creer en mí desde el primer momento, por respetarme y dejarme volar.

A mi codirectora de tesis, la Dra. Susana Micinquevich, por sus palabras de aliento, su apoyo y su sonrisa constante.

A mi codirectora de beca, la Dra. Mónica Fernández Lorenzo de Mele, por el gran apoyo, orientación, tiempo, conocimiento y cariño que me ha dado durante todos estos años de formación.

A la Dra. Claudia Grillo, por su valiosa ayuda, predisposición, conocimiento y gran compañerismo.

A la Dra. Cecilia Cortizo y a la Mg. María José Azzari, por despertar en mí el interés por el campo de los biomateriales dentales, por acogerme cálidamente en la Cátedra de Materiales Dentales de la Facultad de Odontología de la UNLP y por haberme presentado en el laboratorio de Biomateriales del INIFTA.

A la Dra. Sandra Gómez de Saravia, por haberme dado la oportunidad, junto con la Dra. Mónica Fernández Lorenzo de Mele, de dar mis primeros pasos en el mundo de la investigación científica en el área de los biomateriales.

A mis grandes compañeros de grupo de trabajo y amigos, la Dra. Esther L. Svartman, el Dr. José A. Caram, la Dra. Ma. Fernanda Rozas, el Dr. Enrique J. Vasini, el Ing. Mauro Banera y el Lic. Nelson Rodríguez Arroyo, por brindarme su apoyo y cariño de manera constante, por todo lo que me han enseñado durante todos estos años, por inyectarme tanta alegría y energía todos los días, por generar un clima tan lindo de trabajo.

A los integrantes del grupo de superficies, la Ing. Ethel Flores, el Ing. Edgardo Fertitta y el Dr. Jorge Llanos, por su apoyo constante, sus palabras de aliento, su buena predisposición y, sobre todo, su linda amistad.

A Carlita Berghoff, por su hermosa amistad, por su gran apoyo, por sostenerme y darme fuerza cuando más lo necesité.

A Jackeline Muñoz Zúñiga, Natalia Fagali, Tamara Oberti, Florencia Álvarez, Silvina Ramos, Mariela Ortiz, Antonieta Daza Millone, Waldemar Marmisollé y Luciano Carlos, por su compañerismo y amistad durante el tiempo que compartimos como becarios.

Quiero agradecer de manera especial a mi mamá Gabriela, mi papá Carlos, mi hermano Juan Pablo y mi cuñada Marina, por estar siempre conmigo, por apoyarme, guiarme y cuidarme con mucho amor. Y a mi pequeña sobrina Paulina, por enseñarme tanto y llenarme de alegría todos los días.

A Mariano, por su comprensión, su compañerismo, su apoyo constante, por creer en mí, por sacarme siempre una sonrisa, por su amor sincero. Y a mi familia política, por su cariño y abrazo permanente.

A mi familia en general y, en especial, a mis abuelos Perla y Hugo, mis tíos Flavia y Pascua, y mis primos Julieta y Santiago, por estar siempre presentes, por sus palabras de aliento, su cariño y confianza.

A mis adoradas amigas, Paula, Marina, Noelia, Patricia, María del Mar, Jorgelina y Micaela, por todo su cariño, por darme tan buenos momentos, por acompañarme permanentemente desde hace muchísimos años, por animarme siempre.

A Valeria V. Tami, Natalia L. Berkovic, Mariana L. Van Konijnenburg, Ma. Virginia Haudemand, Jorgelina A. Sciara y Ma. Belén Ruiz Clavijo, mis grandes amigas de carrera, por su paciencia, su optimismo, sus consejos, su gran apoyo y cariño.

A Cintia V. Flores Izu, Carla Urcola, Evangelina Soria, Virginia Monasterio, Ma. Emilia De Luca, Antonela Parenza y Ezequiel E. Torillo, mis amigos de residencia hospitalaria, por las palabras de aliento, su valiosa ayuda y su compañerismo.

También deseo agradecerles al Lic. Alejandro Muñoz, al Dr. Francisco Pompeo y a la Dra. Esther L. Svartman, por su colaboración con los análisis de CG y CG-EM; al Dr. Guillermo Benítez y al Dr. Aldo Rubert, por los análisis de XPS; al Lic. Mario Sánchez, por los análisis de SEM y EDAX; al Dr. Ricardo Gregorutti y a los Ing. Jorge Grau e Hipólito Toloy, por los cortes de piezas dentarias; al Sr. Raúl Pérez, por los análisis de EAA. A Grimberg Dental

Center S.A. por obsequiarme el enjuague bucal y sus componentes; a Macrodent S.A. por obsequiarme la aleación dental.

A las autoridades del INIFTA, a todo el personal de los talleres Mecánico, Electrónica, Vitroplastía, Departamento de Informática y Biblioteca por su buena predisposición y colaboración constante; y, en general, a todos los integrantes del Instituto por los momentos y experiencias compartidas.

A la Universidad Nacional de La Plata por haberme brindado formación de excelencia en forma gratuita.

Al CONICET por el otorgamiento de las Becas de Postgrado Tipo I y II y a la Facultad de Odontología de la UNLP que hicieron posible, con su apoyo, mi formación doctoral.

*“En algún sitio, algo increíble espera ser descubierto”*

**Carl Sagan**

## RESUMEN

### *Objetivos*

a) **General:** mejorar las propiedades, biocompatibilidad y durabilidad de biomateriales dentales metálicos (BMDM) de modo que una vez instalados en la cavidad oral, beneficien la calidad de vida del ser humano.

b) **Específicos:** estudiar la estabilidad y citotoxicidad de BMDM en medios biológicos simulados, en presencia de nuevos inhibidores orgánicos de la corrosión y comparar los resultados con los obtenidos en su ausencia.

### *Enfoque y planificación del trabajo*

Evaluar el proceso de corrosión de un bronce al aluminio de uso odontológico (ABCu) en comparación con el de su principal componente, cobre, en salivas sintéticas y en medio de cultivo de células. Estudiar el efecto citotóxico de ABCu sobre células osteoblásticas. Determinar la citogenotoxicidad de los compuestos orgánicos a utilizar como inhibidores. Evaluar la capacidad inhibidora de los compuestos orgánicos sobre la corrosión y efecto citotóxico de los materiales metálicos tratados.

### *Datos significativos y resultados más importantes*

La ABCu y el cobre estudiados presentan baja resistencia a la corrosión y efecto citotóxico. La concentración de iones liberados es mucho mayor alrededor del metal que los valores umbrales de citotoxicidad de los iones liberados al medio y no está relacionada con la composición de la aleación. De los inhibidores de la corrosión estudiados, un enjuague bucal a base de digluconato de clorhexidina y xilitol protegió eficientemente a la ABCu del ataque corrosivo, y disminuyó marcadamente la liberación de iones y en consecuencia también su efecto citotóxico.

### *Conclusiones*

Los inhibidores de la corrosión no tóxicos que aumentan la resistencia a la corrosión, disminuyen la liberación de iones hacia el medio oral y tejidos circundantes, y benefician la biocompatibilidad, favorecen el uso de ABCu disminuyendo los riesgos para el paciente odontológico. Se confirma la importancia de definir con exactitud la composición y pH de las soluciones biológicas usadas para evaluar *in vitro* la corrosión y biocompatibilidad de las aleaciones dentales.

## ***Abstract***

### ***Objectives***

**a) General:** to improve properties, biocompatibility and durability of dental metallic biomaterials (DMBM) so once they are in oral environment, will benefit human quality of life.

**b) Specific:** to investigate, in simulated biological media, the stability and cytotoxicity of dental metallic biomaterials in the presence of new organic inhibitors and compare these results to those without inhibitors.

### ***Approach and work planning***

To assess, in simulated biological media (synthetic salivas and culture medium), the corrosion process of aluminum bronze dental alloy (CuBA) in comparison with copper, its principal component. To investigate the CuBA cytotoxic effect on osteoblastic cells. To determine the cytogenotoxicity of the organic compounds to be used as corrosion inhibitors. To investigate organic compounds as inhibitors of CuBA and copper corrosion and cytotoxic effect of DMBM treated.

### ***Significant data and relevant results***

The studied CuBA and copper present low resistance to corrosion and cytotoxic effect. The concentration of released ions is much higher around the metal than the threshold cytotoxicity values of the ions released at the center and it's not related to alloy composition. Among the organic compounds used as corrosion inhibitors, a mouthwash (chlorhexidine gluconate/xylitol) proved to efficiently protect the CuBA from corrosive attack, strongly diminishing the ions release and as a result the cytotoxic effect of the alloy.

### ***Conclusion***

The use of non-toxic corrosion inhibitors that diminish the ions release to the oral medium and surrounding tissues and improve the biocompatibility, favor the use of CuBA diminishing the risks for the odontology patient. It confirmed the importance to exactly define the pH and composition of biologic solutions used to investigate corrosion and biocompatibility of dental alloys *in vitro*.

## **DEDICATORIA**

## **AGRADECIMIENTOS**

## **RESUMEN / ABSTRACT**

## **ÍNDICE DE CONTENIDO**

### **Capítulo I. INTRODUCCIÓN**

#### **SECCIÓN A**

##### **BIOMATERIALES**

- |  |   |
|--|---|
| 1. <i>Generalidades, definiciones y aplicaciones</i>                                     | 1 |
| 2. <i>Sistemas de controles nacionales e internacionales de los dispositivos médicos</i> | 3 |

#### **SECCIÓN B**

##### **BIOMATERIALES METÁLICOS**

- |   |    |
|---|----|
| 1. <i>Generalidades</i>                               | 4  |
| 2. <i>Según pasan los años...</i>                     | 4  |
| 3. <i>Biomateriales metálicos de uso odontológico</i> | 5  |
| 4. <i>Odontovigilancia en Argentina</i>               | 10 |

#### **SECCIÓN C**

##### **FENÓMENO DE CORROSIÓN. SALIVA COMO MEDIO CORROSIVO**

- |   |    |
|---|----|
| 1. <i>Generalidades</i>                       | 13 |
| 2. <i>Saliva</i>                              | 13 |
| 2.1. <i>Salivas sintéticas (artificiales)</i> | 15 |
| 3. <i>Corrosión electroquímica</i>            | 15 |

#### **SECCIÓN D**

##### **BIOCOMPATIBILIDAD**

- |   |    |
|---|----|
| 1. <i>Generalidades</i>   | 20 |
| 2. <i>Biocompatibilidad de biomateriales dentales metálicos</i>   | 20 |
| 3. <i>Reacciones sistémica provocadas por aleaciones dentales</i> | 22 |

4. <i>Reacciones locales provocadas por aleaciones dentales</i>	23
5. <i>Selección clínica de las aleaciones de uso odontológico</i>	25

## **SECCIÓN E**

### **PROTECCIÓN CONTRA LA CORROSIÓN METÁLICA**

1. <i>Inhibidores de la corrosión y formación de películas protectoras</i>	27
2. <i>Compuestos orgánicos a ser probados como inhibidores o protectores de las superficies metálicas contra la corrosión</i>	
2.1. Fenantro[9,10-c]1,2,5- tiadiazol 1,1-dióxido	28
2.2. Dimetilsulfóxido	30
2.3. Enjuague bucal a base de digluconato de clorhexidina y xilitol	31
2.3.1. Clorhexidina	32
2.3.2. Xilitol	33
2.3.3. Cloruro de cetilpiridinio	33

## **SECCIÓN F**

### **FUNDAMENTOS Y DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS**

#### **UTILIZADAS**

1. <i>Técnicas electroquímicas</i>	35
1.1. Voltamperometría cíclica	35
1.2. Medida de potencial a circuito abierto	38
2. <i>Técnicas espectroscópicas</i>	
2.1. Espectrofotometría de absorción atómica	39
2.2. Espectrofotometría ultravioleta-visible	42
3. <i>Técnicas de caracterización de superficies metálicas</i>	43
3.1. Microscopía óptica	45
3.2. Microscopía electrónica de barrido	45
3.3. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos x	46
4. <i>Estudio de la pureza</i>	47
4.1. Cromatografía gaseosa	47
5. <i>Estudios de biocompatibilidad</i>	50
5.1. Ensayos de citotoxicidad	50
5.1.1. Formación de colonias o de sobrevida clonogénico	50
5.1.2. Viabilidad celular	

5.1.2.1. Mediante la metodología fluorescente de naranja de acridina	50
5.1.2.2. Mediante la absorción de rojo neutro	51
5.2. Ensayos de genotoxicidad	51
5.2.1. Índice mitótico	51
5.2.2. Aberraciones cromosómicas estructurales	52

## **Capítulo II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

<b>1. HIPÓTESIS</b>	<b>53</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	
2.1. <i>Objetivo general</i>	53
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	53

## **Capítulo III. EXPERIMENTAL**

### **SECCIÓN A**

#### ***ESTUDIO DE BIOCOMPATIBILIDAD EN BIOMATERIALES DENTALES METÁLICOS***

<b>1. ALEACIÓN BASE COBRE</b>	<b>55</b>
1.1. <i>Ensayos de corrosión</i>	
1.1.1. Curvas de polarización potenciodinámica	58
1.1.2. Análisis superficial	59
1.1.3. Determinación de los iones liberados por ABCu al medio agresivo	59
1.2. <i>Ensayos de citotoxicidad</i>	60
1.2.1. Efecto de los iones metálicos liberados: ensayo de viabilidad	61
1.2.2. Efecto de los iones metálicos liberados: ensayo de formación de colonias celulares	62
1.2.3. Citotoxicidad de los iones metálicos: ensayo de rojo neutro	63
1.2.4. Análisis estadístico de los datos	64

## **SECCIÓN B**

### **CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS ENSAYADOS COMO POTENCIALES PROTECTORES DE BIOMATERIALES DENTALES METÁLICOS CONTRA LA CORROSIÓN**

#### **1. TDZ**

1.1. Determinación de la citotoxicidad y genotoxicidad	65
1.1.1. <i>Ensayos de citotoxicidad</i>	
1.1.1.1. Rojo neutro	66
1.1.1.2. Formación de colonias celulares	67
1.1.1.3. Análisis estadístico de los datos	67
1.1.2. <i>Ensayos de genotoxicidad</i>	
1.1.2.1. Pruebas de aberraciones cromosómicas estructurales e índice mitótico	68
1.1.2.2. Análisis estadístico de los datos	69

## **SECCIÓN C**

### **EFECTO DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS COMO PROTECTORES SUPERFICIALES DE BIOMATERIALES DENTALES METÁLICOS**

#### **1. COBRE**

70

1.1. Efecto de DMSO como protector del cobre frente a la corrosión	
1.1.1. <i>Medidas electroquímicas</i>	
1.1.1.1. Curvas de polarización potenciodinámica lineal y cíclica	73
1.1.1.2. Medida de potencial a circuito abierto	74
1.1.2. <i>Análisis superficial</i>	
1.1.2.1. Microscopía óptica	75
1.1.2.2. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos x	75
1.1.3. <i>Estudio de la pureza de DMSO</i>	
1.1.3.1. Cromatografía gaseosa - espectroscopía de masas	75
1.1.4. <i>Determinación de iones metálicos liberados al medio corrosivo</i>	
1.1.4.1. Espectrofotometría de absorción atómica	76
1.2. Efecto de TDZ como protector del cobre frente a la corrosión	

1.2.1. <i>Medidas electroquímicas</i>	
1.2.1.1. Curvas de polarización potenciodinámica lineal y cíclica	77
1.2.2. <i>Análisis superficial</i>	
1.2.2.1. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos x	77
<b>2. ALEACIÓN BASE COBRE</b>	<b>78</b>
2.1. Efecto del enjuague bucal y de sus principales componentes como protectores de ABCu frente a la corrosión	
2.1.1. <i>Medidas electroquímicas</i>	
2.1.1.1. Curvas de polarización potenciodinámica lineal y cíclica	81
2.1.1.2. Medida de potencial a circuito abierto	81
2.1.2. <i>Análisis superficial</i>	
2.1.2.1. Microscopía electrónica de barrido y espectrometría de energía dispersiva de rayos x	81
2.1.2.2. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos x	82
2.1.2.3. Microscopía óptica	82
2.1.3. <i>Determinación de iones metálicos liberados al medio corrosivo</i>	
2.1.3.1. Espectrofotometría de absorción atómica	83
2.1.4. <i>Ensayo celular</i>	
2.1.4.1. Efecto del tratamiento de la ABCu con el enjuague bucal sobre el número de células vivas	83
2.1.4.2. Análisis estadístico de los datos	84

## **Capítulo IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### ***SECCIÓN A***

#### ***ESTUDIO DE BIOCOMPATIBILIDAD EN BIOMATERIALES DENTALES METÁLICOS***

<b>1. ALEACIÓN BASE COBRE</b>	<b>85</b>
1.1. <i>Corrosión</i>	
1.1.1. Curvas de polarización potenciodinámica	86
1.1.2. Análisis superficial	88
1.1.3. Determinación de los iones liberados al medio corrosivo	89

1.2. Citotoxicidad de los iones metálicos liberados por la ABCu al medio corrosivo	
1.2.1. Efectos sobre el número de células vivas	90
1.2.2. Efecto sobre las unidades de formación de colonias	91
1.2.3. Efecto de los iones de sales metálicas sobre el número de células vivas	92

## **SECCIÓN B**

### **CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS ENSAYADOS COMO PROTECTORES DE LA CORROSIÓN DE LOS BIOMATERIALES DENTALES METÁLICOS**

#### **1. TDZ**

1.1. Determinación de la citotoxicidad y genotoxicidad	
1.1.1. <i>Ensayos de citotoxicidad</i>	
1.1.1.1. Rojo neutro	104
1.1.1.2. Formación de colonias celulares	105
1.1.2. <i>Ensayos de genotoxicidad</i>	
1.1.2.1. Pruebas de aberraciones cromosómicas estructurales e índice mitótico	105
<b>2. DMSO, enjuague bucal y sus principales componentes</b>	<b>109</b>

## **SECCIÓN C**

### **EFFECTO DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS COMO POTENCIALES PROTECTORES SUPERFICIALES DE LA CORROSIÓN DE BIOMATERIALES DENTALES METÁLICOS**

#### **1. COBRE**

1.1. Efecto de DMSO como protector del cobre frente a la corrosión	
1.1.1. <i>Medidas electroquímicas</i>	
1.1.1.1. Curvas de polarización potenciodinámica lineal y cíclica	
1.1.1.1.1. Efecto de la adición de DMSO al medio corrosivo	110
1.1.1.1.2. Efecto del tratamiento superficial de cobre por inmersión en DMSO	111

1.1.1.1.3.	Efecto del tratamiento de la superficie de cobre por inmersión en solución de SDM o DSDM en DMSO (Merck p.a.) de elevada pureza	115
1.1.1.2.	Medida de potencial a circuito abierto	
1.1.1.2.1.	Efecto del tratamiento de cobre por inmersión en DMSO	116
1.1.2.	<i>Análisis superficial</i>	
1.1.2.1.	Microscopía óptica	117
1.1.2.2.	Espectroscopía fotoelectrónica de rayos x	118
1.1.3.	<i>Determinación de iones metálicos en el medio corrosivo</i>	
1.1.3.1.	Concentración de iones cobre en solución: espectrofotometría de absorción atómica	125
1.2.	Efecto del TDZ como protector del cobre frente a la corrosión	
1.2.1.	<i>Medida electroquímica</i>	
1.2.1.1.	Curvas de polarización potenciodinámica	
1.2.1.1.1.	Efecto de la adición de TDZ al medio corrosivo	129
1.2.1.1.2.	Efecto del tratamiento superficial de cobre por inmersión en solución de TDZ en DMSO	130
1.2.2.	<i>Análisis superficial</i>	
1.2.2.1.	Espectroscopía fotoelectrónica de rayos x	131
<b>2.</b>	<b>ALEACIÓN BASE COBRE</b>	
2.1.	Efecto del enjuague bucal y de sus principales componentes como protectores de ABCu frente a la corrosión	
2.1.1.	<i>Medidas electroquímicas</i>	
2.1.1.1.	Curvas de polarización potenciodinámica lineal y cíclica	
2.1.1.1.1.	Efecto del tratamiento superficial de ABCu por inmersión en el enjuague bucal y en sus principales componentes	134
2.1.1.2.	Medida de potencial a circuito abierto	
2.1.1.2.1.	Efecto del tratamiento de ABCu por inmersión en el enjuague bucal sobre el potencial a circuito abierto	140
2.1.2.	<i>Análisis superficial</i>	

2.1.2.1. Microscopía electrónica de barrido y espectrometría de energía dispersiva de rayos x	141
2.1.2.2. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos x	145
2.1.2.3. Microscopía óptica	148
2.1.3. <i>Determinación de iones metálicos liberados al medio corrosivo</i>	
2.1.3.1. Espectrofotometría de absorción atómica	149
2.1.4. <i>Ensayo celular</i>	
2.1.4.1. Efecto del tratamiento de la ABCu con el enjuague bucal sobre el número de células vivas	150

## **Capítulo V. CONCLUSIONES, RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS**

<b>1. CONCLUSIONES</b>	<b>156</b>
<b>2. RECOMENDACIONES</b>	<b>162</b>
<b>3. PERSPECTIVAS</b>	<b>163</b>

## **Capítulo VI. BIBLIOGRAFÍA**

**164**

## **TRABAJOS PUBLICADOS, PRESENTACIONES A CONGRESOS, DISTINCIONES Y CURSOS SEGUIDOS EN EL MARCO DEL TRABAJO DE TESIS**



# Introducción

## **SECCIÓN A**

### **BIOMATERIALES**

#### **1. Generalidades, definiciones y aplicaciones**

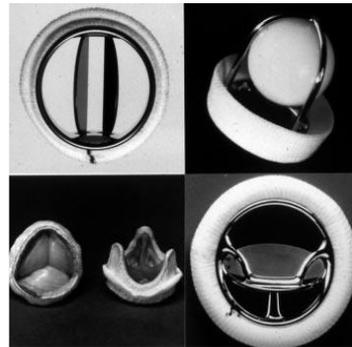
Desde fines del siglo XX, los biomateriales son ampliamente utilizados en el campo de la medicina, la odontología y la biotecnología. Hace cincuenta años atrás los biomateriales como los conocemos actualmente, no existían. La palabra *biomaterial* no se utilizaba y tampoco había una entidad formal que regulara su proceso de fabricación y controlara su calidad. No se conocía el término biocompatibilidad. (Ratner BD y col., 2004) Desde entonces ha ocurrido un gran avance en el campo de los biomateriales, se ha potenciado la investigación en el tema y ha tenido lugar la aparición de una nueva disciplina científico-tecnológica denominada *ciencia de los biomateriales*. Esta ciencia es un campo interdisciplinario que se ocupa de diseñar nuevos materiales y mejorar los ya conocidos para aplicaciones biomédicas. Reúne a investigadores con formaciones académicas diferentes, tales como médicos, odontólogos, biólogos, químicos, físicos, ingenieros, entre otros. La participación de tan variadas disciplinas es necesaria por tratarse de una ciencia que no sólo comprende el desarrollo, sino también la síntesis y el procesamiento de los biomateriales, así como también los procesos de fabricación e implementación de los mismos. (Duffó GS, 2005; Askeland DR y Phulé PP, 2003)

Entre las numerosas definiciones propuestas, Williams DF en el año 2009 definió como *biomaterial* a toda sustancia que por sí misma o formando parte de un sistema complejo, es utilizada para dirigir el curso de cualquier procedimiento diagnóstico o terapéutico, tanto en medicina humana como veterinaria, mediante el control de las interacciones con los componentes de los sistemas vivos. La razón primaria del empleo de biomateriales se encuentra en que reemplazan físicamente a un tejido blando o duro que ha sido dañado o destruido a través de un proceso patológico (enfermedad) o accidente. Frecuentemente, son utilizados en el campo de la ortopedia (**Figura I.1**), la cirugía cardiovascular (**Figura I.2**), la oftalmología (**Figura I.3**), la odontología (**Figura I.4**), la cicatrización y reparación de heridas y fracturas y

en sistemas de distribución de medicamentos en el organismo. (Tathe A y col., 2010; Duffó GS, 2005)



**Figura I.1.** Prótesis de cadera. Tomado de Swanson MA y Huo MH, 2011.



**Figura I.2.** Prótesis valvulares cardíacas. Tomado de Bloomfield P, 2002.



**Figura I.3.** Lentes de contacto. Tomado de Chen Q y col., 2013.



**Figura I.4.** Implante dental. Tomado de Najarro Dearo de Morais JA y col., 2009.

Los biomateriales pueden dividirse en cuatro grandes clases: orgánicos, metálicos, cerámicos y combinados. (Macchi RL, 2000)

Un aspecto fundamental relacionado con las posibilidades de aplicación de los biomateriales es la necesidad de que tanto los componentes del biomaterial, como los productos que se generen en los procesos biodegradativos sean biocompatibles. La *biocompatibilidad* es la habilidad de un material para llevar a cabo su función con fines médicos, sin provocar efectos locales o sistémicos indeseables en el beneficiario de dicha terapéutica, pero generando la respuesta beneficiosa más apropiada sobre las células o tejidos en cada situación específica, optimizando el rendimiento clínico del tratamiento (Williams DF, 2008). Inevitablemente, la colocación de cualquier dispositivo médico origina una respuesta del organismo (*huésped*) característica que no sólo depende de la composición del biomaterial, sino de factores tan específicos como la forma, el tamaño, las propiedades y características superficiales, con respecto a los

materiales y desde un punto de vista de las reacciones que se manifiestan en el organismo receptor, aspectos tan variables como su edad, sensibilidad inmunológica, estado de salud, zona donde se implanta, etc. (*Monteiro FJ y San Román J, 2004*)

## ***2. Sistemas de controles nacionales e internacionales de los dispositivos médico***

Con el objetivo de garantizar que los dispositivos médicos a disposición de la población, posean eficacia (cumplimiento del objetivo terapéutico, nutricional o diagnóstico), seguridad (alto coeficiente beneficio/riesgo) y calidad (respondan a las necesidades y expectativas de la ciudadanía) en Argentina existe un sistema de control regido por la *Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica* (A.N.M.A.T.). A nivel internacional la regulación se rige mediante reglas de control muy estrictas, que emanan predominantemente de las normas establecidas por la *Food and Drug Administration* (FDA) en Estados Unidos y por la *International Organization for Standardization* (ISO) en Europa. No obstante, el desarrollo de los *biomateriales* no está excluido de sorpresas, unas veces muy satisfactorias y otras no tanto, ya que a pesar de los controles de experimentación antes de su aprobación en aplicaciones humanas, los modelos experimentales que se utilizan no suponen más que aproximaciones al comportamiento que se debe esperar en humanos, pero no es hasta que se utiliza en la práctica quirúrgica o en la clínica, cuando se establece una comprobación del verdadero comportamiento de un determinado biomaterial. (*Monteiro FJ y San Román J, 2004*)

## **SECCIÓN B**

### **BIOMATERIALES METÁLICOS**

#### **1. Generalidades**

Dentro de los biomateriales, se encuentra el grupo de los biomateriales metálicos. Éstos se emplean, básicamente, como componentes estructurales a fin de remplazar determinadas partes del cuerpo humano. De forma más precisa, puede afirmarse que actualmente los materiales metálicos son imprescindibles para aquellas aplicaciones clínicas que requieran soportar carga, y eso es debido a las buenas propiedades mecánicas que presentan respecto a otros materiales como son los polímeros y cerámicos. (*Patel NR y Goihl PP, 2012; Duffó GS, 2005; Gil FJ y col., 2004*)

#### **2. Según pasan los años...**

Los intentos más remotos para reparar fracturas óseas, el uso de restauraciones dentarias, de suturas y otras aplicaciones quirúrgicas en el cuerpo humano, datan de mucho antes del siglo XX y muestran importantes avances en la utilización de metales y aleaciones. La odontología fue la disciplina pionera en utilizar metales para la confección de restauraciones dentales, puentes y coronas. La amalgama dental viene utilizándose desde hace 180 años (1833). Investigaciones demuestran que hacia fines del siglo XIX, principios del siglo XX, se utilizaban platino, oro, plata, zinc, plomo, cobre, aluminio y magnesio para la fabricación de dispositivos médicos. En 1920 se emplearon por primera vez implantes de acero inoxidable. En 1936 aparecieron para el mismo uso aleaciones de cobalto/cromo/molibdeno/carbono. El titanio y sus aleaciones comenzaron a utilizarse en la década del '60, aunque la extensión significativa de su uso demora una década más. Más recientemente, otras aleaciones han ido incrementando su uso en la fabricación de biomateriales. Éstas incluyen, entre otras, aleaciones de circonio, tantalio, y niobio. Así como también las aleaciones de memoria de forma, en particular la de níquel-titanio, NiTi. (*Gilbert JL y Mali SA, 2012*)

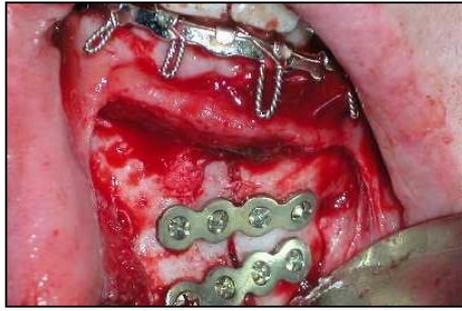
### 3. *Biomateriales metálicos de uso odontológico*

Existen biomateriales metálicos que han sido específicamente concebidos y desarrollados para entrar en contacto con los tejidos y fluidos del medio bucal. En odontología, los biomateriales metálicos utilizados por excelencia son las *aleaciones*. Éstas permiten mejorar determinadas propiedades o alcanzar mejores combinaciones de propiedades que los metales puros que las componen (*Askeland DR y Phulé PP, 2003*). Una aleación está compuesta por dos o más elementos químicos, de los cuales, al menos uno de ellos es un elemento metálico y sus propiedades son metálicas. (*American Society for Metals. Committee on Definitions of Metallurgical Terms, 1977*) El número de los componentes presentes en una aleación es muy variable; así, las aleaciones pueden ser binarias, ternarias, cuaternarias, quinarias, etc. En cuanto a las proporciones (habitualmente dadas en porcentaje peso/peso) la mayoría de las aleaciones están formadas por una gran concentración de unos pocos metales (generalmente de uno a tres) a los que se añaden pequeñas concentraciones de otros muchos (en ocasiones hasta diez o más). A veces, incluso, una pequeña concentración de un elemento (en torno o inferior a 1%) puede resultar crítica para alguna propiedad. (*Vega del Barrio JM, 1996*)

Las aleaciones dentales son ampliamente utilizadas en diferentes disciplinas odontológicas, tales como, ortodoncia, ortopedia, operatoria, para el tratamiento de traumatismos osteoperiodontales y en la realización de implantes y prótesis (**Figuras I.5 – I.11**). Numerosos factores afectan la elección de una aleación, entre otros, razones económicas, propiedades físicas y mecánicas, técnica de fundido, corrosión y biocompatibilidad. (*López-Alías JF y col., 2006*)



**Figura I.5. a.** Incrustaciones metálicas. **b.** Corona metálica. Fotografías tomadas y cedidas por los odontólogos *Arias R* y *Berkovic NL*, con autorización de sus pacientes.



**Figura I.6.** Tratamiento de fractura de sínfisis. Tomado de *Maurette PE y col., 2005.*



**Figura I.7.** Fijación maxilomandibular con arcos peine. Fotografía tomada y cedida por los odontólogos *Arias R y Berkovic NL*, con autorización de su paciente.



**Figura I.8.** Mantenedores de espacio. Fotografía tomada por la autora de este trabajo de Tesis doctoral, con autorización de su paciente.



**Figura I.9.** Tratamiento ortopédico. Fotografía tomada por la autora de este trabajo de Tesis doctoral, con autorización de su paciente.



**Figura I.10.** Tratamiento ortodóncico. Tomado de *Gregoret J y col., 2003.*



**Figura I.11.** Tratamientos ortodóncicos interceptivos. **a.** Separador de espacio de bronce. **b.** Parrilla lingual. Fotografías tomadas por la autora de este trabajo de Tesis doctoral, con autorización de sus pacientes.

El requisito fundamental para la utilización de las aleaciones dentales es que sean toleradas por el organismo (biocompatibles). Por otra parte, deben presentar una buena resistencia a la corrosión (degradación de un material causada por el medio que lo rodea (*McCafferty E, 2010*)). La corrosión es un problema general de los metales, más aún si están inmersos en un medio tan hostil como es el organismo humano, y a temperaturas cercanas a 37 °C. Algunos metales que escapan a este problema, son los preciosos. En otros, a

consecuencia del proceso corrosivo se forma sobre la superficie del metal una capa de óxido protectora, el metal se pasiva y queda protegido frente al ataque del medio agresivo, tal como ocurre con el titanio, el aluminio y los aceros inoxidable. De lo expuesto se desprende que las aleaciones dentales metálicas se pueden agrupar en dos clases: las que contienen metales nobles o preciosos que incluyen al oro y metales del grupo del platino (platino, paladio, rodio, iridio, osmio y rutenio); y aquellas que contienen metales no preciosos, como las aleaciones base cobre, plata, níquel, cobalto, hierro y titanio. Se considera que las aleaciones nobles son los biomateriales ideales debido a su elevada resistencia a la corrosión y por ser sencillas las técnicas de fundición, colado y acabado. Sin embargo, presentan como desventaja su elevado costo y su bajo módulo elástico. (*Duffó GS, 2005; Thomas S, 1984*) Para sustituir a las aleaciones nobles, se han desarrollado aleaciones de metales no preciosos como las de cobre-aluminio (bronces al aluminio), cobalto-cromo, níquel-cromo, hierro-carbono-cromo-níquel (acero inoxidable) y en base a titanio. A diferencia de las aleaciones preciosas, éstas son menos costosas, presentan temperaturas de fusión más elevadas, tienen buena resistencia mecánica y alto módulo elástico, pero son difíciles de terminar superficialmente, sobre todo debido a su dureza; no son termodinámicamente estables y su resistencia a la corrosión depende de la delgada película pasivante formada debido a la presencia de cromo, aluminio o titanio. (*Lucas LC y Lemons JE, 1992; Burrows D, 1986*)

Los bronces al aluminio contienen cobre en concentraciones cercanas a 87% p/p que les confiere buenas propiedades mecánicas por aumentar su resistencia, rigidez y dureza; y diferentes aleantes, siendo el principal el aluminio. En las aleaciones comerciales suele agregarse también hierro, níquel, manganeso y cinc. (*Riesgo O y col., 1992*) El hierro actúa como endurecedor al refinar los granos y producir pequeñas precipitaciones en la microestructura del bronce aluminio. El níquel mejora la resistencia a la corrosión y el manganeso aumenta ligeramente la resistencia a la tracción. (*Thomas S, 1984*) Mientras que el cinc se utiliza en pequeños porcentajes con el objetivo de reducir la oxidación durante los procedimientos de colado, pero si se encuentra presente en cantidades elevadas, aumentan las posibilidades de corrosión de la aleación. (*Coilc M y col., 2010; Macchi RL, 2000*).

Las aleaciones cobre-aluminio (bronces al aluminio) se utilizan desde hace más de veinticinco años en América del Sur, Japón, Estados Unidos y algunos países de Europa Oriental en la confección de prótesis fijas como coronas, puentes y pernos-muñones. (Eschler PY y col., 2003) De acuerdo con mecánicos dentales y proveedores de insumos odontológicos, su popularidad se debe a su buena resistencia mecánica, alto módulo elástico, baja densidad, a su color amarillo brillante con fuerte semejanza al oro y su bajo costo en relación con las aleaciones de metales nobles. (Ardlin BI y col., 2009; Pegoraro LF y col., 2001; McGuinness JW y col., 1987; Arvidson K y col., 1980) A pesar de sus buenas propiedades mecánicas, los bronces al aluminio muestran baja resistencia a la corrosión al ser expuestos tanto a un medio salino como a saliva artificial. Tibballs y Erimescu (Tibballs JE y Erimescu R, 2006) informan como resultado de sus estudios una marcada acción galvánica que causa un ataque localizado llamado picado (*pitting*). Han encontrado orificios, sobre la superficie metálica, con una profundidad y ancho que va desde 0,5 a 1  $\mu\text{m}$ . De acuerdo con ellos, Ardlin y colaboradores (Ardlin BI y col., 2009) obtienen como resultado de sus investigaciones, que las aleaciones cobre-aluminio presentan una alta velocidad de corrosión debido a su inestabilidad para crear una película protectora de la superficie. Además, luego de realizar ensayos de inmersión estática, han observado efectos adversos en la actividad biológica de las células de los tejidos circundantes, como consecuencia de la elevada citotoxicidad de los iones metálicos liberados por la aleación en el proceso de corrosión. Numerosos investigadores de diferentes países, durante los últimos veintisiete años han encontrado que la resistencia a la corrosión de los bronces al aluminio es baja (Lucas LC y Lemons JE, 1992). German (German RM, 1985), al evaluar dos tipos de bronces al aluminio, encuentra que son significativamente menos resistentes a la corrosión y al opacado (*tarnish*) que las aleaciones base oro. Stoffers y colaboradores (Stoffers K y col., 1987), luego de evaluar una aleación base cobre, concluyen que presenta una pobre resistencia a la corrosión y al opacado, siendo cuestionable su uso para la confección de prótesis dentales. Lucas y colaboradores (Lucas LC y col., 1988), al estudiar la corrosión de una serie de aleaciones base cobre en un medio salino y en saliva artificial, afirman que la saliva artificial es el medio menos corrosivo para este grupo de aleaciones. Sin embargo, se observan intensidades

de corriente elevadas a todos los potenciales de oxidación estudiados, resultado que indica que ocurre oxidación aún en este medio menos agresivo. Benatti y colaboradores (*Benatti OFM y col., 2000*) comparan la corrosión de una aleación dental base cobre con una aleación cromo-níquel mediante ensayos *in vivo* e *in vitro*. Observan, luego de uno a tres meses, importante corrosión de la aleación base cobre en las áreas bucales de difícil acceso para la limpieza y una corrosión moderada en las áreas de fácil acceso. Resultados similares alcanzan Nagai (*Nagai K, 1969*), Lucas (*Lucas LC y col., 1988*) y Johansson (*Johansson BI y col., 1989*). En base a las investigaciones realizadas, Benatti y colaboradores (*Benatti OFM y col., 2000*) consideran que las aleaciones estudiadas podrían mostrar una importante corrosión en la cavidad oral. Sin embargo, afirman que los productos de corrosión que pueden ser fácilmente removidos de las áreas de buen acceso para la limpieza, dejan una apariencia clínica con ausencia de corrosión. Eschler y colaboradores (*Eschler PY y col., 2003*) establecen que el brillo de estas aleaciones es preservado en la cavidad oral por sufrir una corrosión uniforme y porque la citotoxicidad que provocan los iones cobre liberados inhibe la proliferación bacteriana. Sin embargo, a nivel microscópico, los autores encuentran una corrosión de tipo selectiva en lugar de uniforme. Indudablemente, las aleaciones dentales base cobre sufren marcada corrosión en la mayor parte de los ensayos de laboratorio en comparación con otras aleaciones dentales pertenecientes al grupo de las aleaciones nobles. La susceptibilidad a la corrosión y a la adherencia de los productos corrosivos sobre la superficie de la aleación, dependen de la composición de la aleación y del medio en el cual están inmersas (*Tibballs JE y Erimescu R, 2006; Soileau RL y col., 1990; Johansson BI y col., 1989*).

Las coronas y puentes confeccionados con bronce al aluminio, además de ser susceptibles a la corrosión, tienen el inconveniente de no presentar una buena adaptación periférica (*Vaz LG, 2007*). Este último aspecto es el gran desafío de la clínica en *prótesis fija*. Álvarez Cantoni (*Álvarez Cantoni HJ, 1999*) ha trabajado junto a sus colaboradores durante muchos años con microscopía electrónica, comparando la precisión de restauraciones dentarias, en función del uso de distintos materiales para impresiones, aleaciones y cementos. Llegan a la conclusión que la adaptación ideal a nivel microscópico, es una fantasía. Los estudios conducen a resultados que no concuerdan con lo

que parece verse a simple vista cuando se controla con los métodos clínicos convencionales. Por ejemplo, la precisión que encontraron en una prótesis fabricada con metales nobles alcanzó un promedio de 27  $\mu\text{m}$  de adaptación en el borde periférico, en comparación con 80  $\mu\text{m}$  que pudieron observar con una aleación no noble. Esta situación explicaría el origen del proceso corrosivo que pueden sufrir los pernos-muñones a pesar de encontrarse, virtualmente, aislados del medio bucal. Por otra parte, Álvarez Cantoni (*Álvarez Cantoni HJ, 1999*) y sus colaboradores investigaron empleando microscopías óptica y electrónica restauraciones que habían sido instaladas en boca, que fueron aceptadas en su momento por considerarse con propiedades convenientes, y que luego debieron ser extraídas por razones periodontales, o fracturas radiculares. Jörgensen (*Jörgensen KD, 1955*), hace más de cincuenta años, ya conocía sobre las fracturas radiculares causadas por la corrosión de pernos confeccionados con aleaciones no nobles. Observaciones similares son informadas por Rud (*Rud J, 1956*), Rud y Omnell (*Rud J y Omnell KA, 1970*) y Petersen (*Petersen KB, 1971*). Según Álvarez Cantoni (*Álvarez Cantoni HJ, 1999*) los errores en el ajuste del límite convierten a las restauraciones en sobrecontorneadas, horizontal o verticalmente, o en subcontorneadas. Las dos posibilidades generan una geometría distinta, pero ambas son malas. El sobrecontorno horizontal y vertical atrapa placa bacteriana y, por lo tanto, favorece el desarrollo de caries y enfermedades periodontales. Y el subcontorno, es decir, la restauración corta, deja la pieza dentaria desgastada expuesta al medio bucal.

#### **4. Odontovigilancia en Argentina**

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (*A.N.M.A.T.*) es un organismo descentralizado de la Administración Pública Nacional, creado mediante decreto 1490/92, en el año 1992. Colabora en la protección de la salud humana, asegurando la calidad de los productos de su competencia: medicamentos, alimentos, productos médicos, reactivos de diagnóstico, cosméticos, suplementos dietarios y productos de uso doméstico. Consta de *Sistemas de Vigilancia*, tanto a nivel farmacológico, tecnológico, alimenticio, y muy recientemente odontológico. Dichos sistemas comprenden un conjunto de métodos, observaciones y disciplinas que permiten, durante la

etapa de comercialización de los productos, detectar reacciones adversas y efectos indeseables imprevistos.

El Programa de Odontovigilancia fue creado, recientemente, mediante la Disposición N° 7485/11, tal como informó la A.N.M.A.T. en el Boletín para Profesionales emitido en diciembre de 2011. Antes de ese Programa, algunos aspectos odontológicos no estaban contemplados en la regulación vigente. Tal es el caso de las aleaciones para colados dentales de origen nacional que se consideraban *insumos de laboratorio* y no productos médicos. Según la A.N.M.A.T., un producto médico invasivo es aquel que penetra total o parcialmente dentro del cuerpo humano, sea a través de un orificio del cuerpo o a través de una superficie corporal. Entendiéndose por orificios naturales al oído, boca, nariz, ojo, ano, uretra y vagina. Por lo tanto, las aleaciones para colados dentales no deberían quedar fuera de esta definición, ya que son utilizadas para la confección de innumerables dispositivos odontológicos que están en íntimo contacto con los tejidos de la cavidad oral, muchos de ellos, por un largo plazo (mayor a treinta días de uso continuo). Schmalz y Garhammer (*Schmalz G y Garhammer P, 2002*) afirman que las aleaciones dentales para colados son, desde el punto de vista legal, productos médicos, porque logran reemplazar la función tisular perdida a través de sus propiedades mecánicas. Por otro lado, la Organización Internacional de Estandarización en 1995 (*ISO/CD 14971*) establece que al considerarse a las aleaciones dentales productos médicos, la posibilidad de daño tisular se debe analizar a través de estudios preclínicos.

La falta de regulación que las aleaciones para colados dentales han tenido en nuestro país, ha conducido al uso indiscriminado de las mismas durante años poniendo en estado indefenso a los pacientes y a los profesionales ante la falta de información existente respecto a las verdaderas propiedades de estos materiales y su real composición (*Quezada Castillo E, 1997*). Al no estar reguladas, las aleaciones pueden no contener los componentes que dicen tener en el rótulo del envase comercializado o estar presentes pero en diferentes porcentajes (*Fernández Lorenzo de Mele M y Cortizo MC, 1999*). Por otra parte, al no ser sometidas a rigurosos ensayos de laboratorio, previamente a su uso en la práctica clínica, pueden resultar muy susceptibles a la corrosión y a la

liberación de iones al medio biológico, ocasionando reacciones adversas en el organismo.

## SECCIÓN C

### *Fenómeno de Corrosión. Saliva como medio corrosivo*

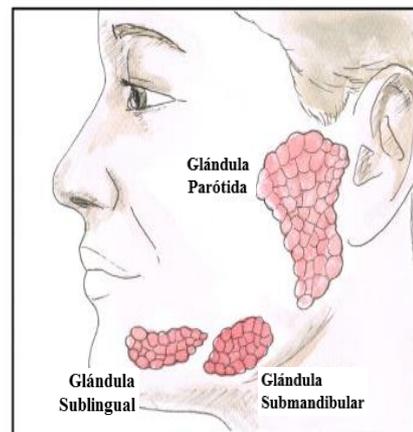
#### 1. Generalidades

La ciencia de la corrosión es un área interdisciplinaria que incluye a la química, la ciencia de los materiales, la ingeniería y la mecánica. El objetivo de involucrar varias disciplinas es comprender el complejo mecanismo del fenómeno de corrosión.

Se entiende por *corrosión* a la degradación que sufre un metal, por reacción química o electroquímica, al interactuar con el medio que lo rodea, y que produce un deterioro del material y de sus propiedades. (McCafferty E, 2010) Cuando el metal está en presencia de un medio acuoso, como ocurre en la cavidad oral, el proceso de corrosión es de tipo electroquímico. En este caso, la saliva actúa como un medio conductor (electrolito). (Hussain S, 2004)

#### 2. Saliva

La saliva es una secreción compleja proveniente de las glándulas salivales mayores en el 93% de su volumen y de las menores en el 7% restante. Las glándulas salivales mayores (**Figura I.12**) son las más voluminosas y constituyen verdaderos órganos secretores. Se trata de tres pares de glándulas localizadas fuera de la cavidad oral, que desembocan en ella por medio de sus conductos principales. Se denominan



**Figura I.12.** Glándulas salivales mayores. Tomado de Schapher M. y col., 2001.

respectivamente: parótidas, submaxilares o submandibulares y sublinguales. Las glándulas salivales menores se encuentran distribuidas en la mucosa y submucosa de los órganos del sistema bucal. Se designan de acuerdo a su ubicación como: labiales, genianas, palatinas y linguales. Son glándulas pequeñas y muy numerosas y se estima que el ser humano posee una cantidad de 450 a 800, todas localizadas muy próximas a la superficie interna de la boca, a la que están conectadas por cortos conductos. La saliva es estéril cuando sale

de las glándulas salivales, pero deja de serlo inmediatamente cuando se mezcla con el fluido crevicular, restos de alimentos, microorganismos y células descamadas de la mucosa oral. (Gómez de Ferraris ME y Campos Muñoz A, 2009; Tenovuo JO, 1997) La secreción diaria oscila entre 500 y 700 mL, con un volumen medio en la boca de 1,1 mL. En reposo, la secreción oscila entre 0,25 y 0,35 mL/min. Ante estímulos sensitivos, eléctricos o mecánicos, el volumen puede llegar hasta 1,5 mL/min. El mayor volumen salival se produce antes, durante y después de las comidas, disminuyendo de forma muy considerable por la noche, durante el sueño. (Nauntofte B y col., 2003) El 99% de la saliva es agua mientras que el 1% restante está constituido por componentes orgánicos tales como, proteínas, glicoproteínas, enzimas, productos nitrogenados como la urea, glucosa e inmunoglobulinas; y por componentes inorgánicos como iones calcio, magnesio, sodio, potasio, hierro, fluoruros, cloruros, bicarbonatos y fosfatos. (Edgar WM, 1992)

Los biomateriales metálicos utilizados en odontología al interactuar con la saliva, particularmente agresiva por la presencia de iones cloruro (Cl<sup>-</sup>), tienden a corroerse y a liberar iones metálicos perjudiciales para el organismo. (Elshahawy W y col., 2009; Fernández Lorenzo de Mele M y Duffó GS, 2002) El medio oral es muy proclive a formar productos de corrosión. La boca es húmeda y continuamente está sujeta a fluctuaciones de temperatura. (Quezada Castillo E y Duffó GS, 2003) Los biomateriales dentales metálicos deben afrontar normalmente condiciones corrosivas adversas que, bajo ciertas circunstancias como la ingesta de alimentos, la higiene bucal, la actividad bacteriana, el uso de medicamentos (Cortizo MC, 2006), la presencia de enfermedades sistémicas (Moreira AR y col., 2009; Zaleski P y col., 2007; Sánchez V y col., 2002), las infecciones, heridas y ulceraciones bucales, las alteraciones periodontales, así como el consumo de tabaco fumado (Vega del Barrio JM, 1996), pueden volverse aún más agresivas dado que el pH de la saliva suele modificarse dentro de un intervalo amplio (pH 2–11) (Sharma M y col., 2008). El pH salival normal oscila entre 6 y 7. Los bicarbonatos, los fosfatos, la urea, las proteínas anfóteras y las enzimas son las especies encargadas de modular el pH y la capacidad buffer de la saliva. (Humphrey SP y Williamson RT, 2001; Edgar WM, 1990)

### 2.1. Salivas sintéticas (artificiales)

Las salivas sintéticas son utilizadas para simular la saliva natural con el objetivo de investigar el comportamiento de los biomateriales de uso odontológico. Reproducir exactamente las propiedades de la saliva humana es imposible debido a la naturaleza inestable de la saliva natural. Esta inestabilidad también hace que la saliva natural sea inapropiada en sí misma para llevar a cabo ensayos *in vitro*. Por lo que el desarrollo de salivas sintéticas es esencial para estudios controlados de experimentación. (*Leung VW y Darvell BW, 1997*) Desde el trabajo pionero de Souder y Sweeney en 1931, en la literatura se han informado no menos de sesenta fórmulas de salivas sintéticas (*Duffó GS y Quezada Castillo E, 2004*), dentro de las cuales, la saliva de Fusayama modificada se usa frecuentemente (*Robin A y Meirelis JP, 2007; Schiff N y col., 2002; Reclaru L y Meyer JM, 1998; Fusayama T y col., 1963*) por generar un comportamiento electroquímico de los materiales metálicos similar al observado en la saliva humana (*Holland RI, 1992; Meyer JM y Nally JK, 1975*). También, suelen emplearse soluciones salinas acuosas de ácido láctico (ej. saliva de Baron (*Baron C y col., 1978*)) en numerosas normativas internacionales como medio de inmersión para ensayos preclínicos sobre la resistencia de las aleaciones dentales a la pérdida de la integridad estructural debido a la corrosión. (*Tibballs JE y Erimescu R, 2006*).

### 3. Corrosión electroquímica

La corrosión electroquímica puede representarse como una combinación de reacciones de oxidación (anódicas) y reacciones de reducción (catódicas) que se dan en forma simultánea en la interfase biomaterial metálico-solución electrolítica, donde no sólo hay una transferencia de carga (electrones) sino también una pérdida de masa del material metálico que se está oxidando (corroyendo). Intervienen tres componentes fundamentales: ánodo, cátodo y electrolito. El ánodo y el cátodo pueden ser dos metales o aleaciones distintas, como sucede con la presencia de restauraciones metálicas diferentes y próximas y en contacto en la cavidad bucal, o pueden ser parte de la misma superficie metálica cuando ésta se presenta con heterogeneidades. (*McCafferty E, 2010*)

Según Vega del Barrio y McCafferty (*McCafferty E, 2010; Vega del Barrio JM, 1996*) la heterogeneidad puede estar producida por diferentes causas, entre las que se pueden destacar, la presencia de impurezas en forma de metales extraños (aun cuando se encuentren en cantidades muy pequeñas). La coexistencia en la masa de una aleación de fases muy heterogéneas entre sí formando zonas muy próximas pero extraordinariamente diferentes. La existencia de soldaduras, donde la adición de pequeñas cantidades de un metal, llamado de aporte, para soldar dos estructuras metálicas, puede crear en la superficie importantes zonas de heterogeneidad. La rugosidad superficial o el inadecuado pulido de una superficie metálica, estructuralmente homogénea, también pueden desencadenar fenómenos de corrosión. Por una parte, se favorece el depósito de placa bacteriana y residuos alimenticios; por otro, la existencia de depresiones, surcos o irregularidades, bañadas por la saliva, origina zonas de composición diferente del electrolito, de tal forma que se establecen diferencias de potencial entre el fondo de las depresiones, y la parte superficial, originando el fenómeno de la corrosión. La heterogeneidad también puede ser derivada del propio electrolito. La existencia de apiñamientos dentarios, anfractuosidades, zonas de estancamiento o de remanso de la saliva, o simplemente, un espacio interdentario algo agrandado, pueden crear zonas muy próximas pero con diferente pH salival, diferente aireación, diferente metabolismo de la placa bacteriana y diferente composición de la saliva. Si todo ello ocurre en una zona en contacto con una superficie metálica de cierta extensión, pueden crearse zonas con diferente capacidad de ataque al mismo metal y producirse diferencias de potencial entre dos zonas próximas de dicho metal.

Cuando existen zonas de diferente actividad en la misma superficie metálica, las áreas más activas son los ánodos donde tiene lugar la oxidación (pérdida de electrones y disolución del metal). Sobre ellas se localiza, por tanto, el ataque electroquímico. Tal como se observa en la **Figura I.13**, los átomos metálicos se disuelven como cationes (iones positivos,  $\text{Metal}^{n+}$ ) al ceder electrones (**ec. I.1**). Los cationes son liberados al medio corrosivo y los electrones ( $e^-$ ) originan una corriente eléctrica que circula dentro del metal (conducción metálica) hasta alcanzar las áreas catódicas donde se produce la reducción (consumo de electrones). Dichas áreas permanecen relativamente



a disolverse. El aumento del contenido de iones metálicos en el medio puede prevenir una futura corrosión. En algunos casos, un material deja de corroerse debido a que sus iones han saturado el medio. Esta situación no suele ocurrir en las restauraciones dentales metálicas porque los iones disueltos son eliminados por la comida, los fluidos y el cepillado. Por lo tanto, la corrosión de las restauraciones continúa. (*Anusavice KJ, 1998*)

La velocidad de corrosión depende de la facilidad con que el metal pierde electrones (se oxida) y del tipo de electrolito con el cual esté en contacto. La producción de iones y electrones en una solución origina un potencial eléctrico, es posible comparar la diferencia de potencial que se genera entre un determinado metal y otro que actúe como referencia (un electrodo de referencia) cuando están sumergidos en una solución conductora y se los conecta entre sí cerrando un circuito. El metal que tiene menor potencial de reducción suministra electrones al circuito, lo que equivale a decir que actúa como ánodo, mientras que el otro metal, el que tiene mayor potencial de reducción, lo hace como cátodo. Como referencia, se puede usar el electrodo normal de hidrógeno (ENH) cuyo potencial arbitrariamente se considera como origen de escala (cero de potencial) y sobre esa base se pueden ordenar los distintos metales según tengan mayor o menor potencial de reducción. También es posible emplear otros electrodos de referencia, porque el ENH casi no se usa ya que su aplicación y mantenimiento son complicados. Las dificultades operativas que se presentan en el manejo de un electrodo de hidrógeno, demasiado frágil para la mayoría de las aplicaciones prácticas, han dado lugar a la utilización de otros electrodos de referencia que lógicamente deben reunir determinadas condiciones. Aparte de ser manejables y de construcción sencilla, la condición fundamental es que el potencial de equilibrio de la reacción de óxido-reducción (redox) que tenga lugar en ellos, permanezca constante respecto al electrodo de hidrógeno. En estas condiciones, toda diferencia de potencial se puede referir al ENH o viceversa. En el **cuadro I.1** hay una lista de metales ordenados de acuerdo a la facilidad de oxidación. Los primeros en la lista son los que menos fácilmente entran en solución (metales más nobles) y los últimos (metales activos), los que menor potencial de reducción tienen, son los que se oxidan con mayor facilidad.

Oro	Catódico (mayor potencial de reducción)
Platino	
Paladio	
Mercurio	
Plata	
Cobre	
<b>HIDRÓGENO</b>	<b>REFERENCIA</b>
Plomo	
Estaño	
Níquel	
Hierro	
Cromo	
Cinc	
Aluminio	
Magnesio	
Manganeso	
Sodio	
Calcio	
Potasio	
Litio	Anódico (menor potencial de reducción)

**Cuadro I.1.** Algunos metales ordenados en forma creciente de facilidad de oxidación según su potencial de reducción estándar.

## **SECCIÓN D**

### **BIOCOMPATIBILIDAD**

#### **1. Generalidades**

La utilización de nuevos materiales en la clínica humana necesita siempre de una evaluación preclínica que incluye diversos niveles de actuación: caracterización fisicoquímica de los materiales y evaluación biológica de dichos materiales (*Morales de Cano JJ y Peraire C, 2004*). Este camino debería llevarse a cabo con el objetivo de informar a los pacientes de los posibles efectos adversos causados por los productos médicos.

#### **2. Biocompatibilidad de biomateriales dentales metálicos**

Todo biomaterial metálico en la cavidad bucal experimenta el fenómeno conocido como *biodegradación*. La biodegradación implica, la corrosión del material metálico, la solubilización en la saliva de los productos provenientes de la corrosión (iones metálicos), y la destrucción fisicoquímica, desgaste y erosión causada por la comida, la masticación y la actividad bacteriana. (*Lygre H, 2002*) La liberación de iones metálicos está estrechamente relacionada con la producción de efectos biológicos adversos (*Geurtsen W, 2002; Wataha JC, 2000*). El efecto biológico de estos elementos liberados puede ser sistémico o local. Sensibilizaciones alérgicas e intoxicaciones son efectos sistémicos susceptibles de ser provocados por los biomateriales metálicos. (*Wataha JC, 2000*) Los efectos locales corresponden no sólo a la agresión sobre las piezas dentarias (tejidos mineralizados y pulpa), sino también sobre las mucosas intraorales y sus componentes celulares. Si bien la liberación de los iones metálicos es necesaria para desarrollar un daño celular, no es garantía de que dicho daño ocurra. La respuesta biológica local dependerá de las propiedades químicas y físicas del elemento liberado, de la cantidad liberada, del tiempo de exposición al tejido y de la sensibilidad específica de las células o tejidos. Para diagnosticar en los pacientes efectos biológicos adversos generados por biomateriales dentales metálicos, es de fundamental importancia conocer la naturaleza de los componentes metálicos y si el paciente es alérgico a algunos de ellos. (*Muris J y Feilzer AJ, 2006*) Las aleaciones dentales se encuentran en

íntimo contacto con los tejidos orales durante largos períodos, y frecuentemente se forman microambientes entre las aleaciones y los tejidos. (*Penn D, 2012; Wataha JC, 2000*) Por ejemplo, la concentración de iones cobre liberados por una corona dental es de aproximadamente 0,2  $\mu\text{g}/\text{día}$  (*Wataha JC, 1998*), valor que se encuentra muy por debajo de los 3,100  $\mu\text{g}$  que se incorporan por día con la alimentación. Sin embargo, en los tejidos circundantes a la corona dental, la concentración de cobre podría llegar a ser mucho mayor. Esto explicaría por qué los iones metálicos liberados por una aleación dental pueden provocar efectos locales adversos, a pesar de encontrarse en concentraciones muy por debajo de las que se encuentran al ingerirse diariamente con la dieta. (*Wataha JC, 2000; Wataha JC y col., 1995*) A medida que aumenta el tiempo de contacto de los iones metálicos con las células, menor es la concentración de iones metálicos necesaria para desencadenar alteraciones celulares. (*Penn D, 2012*) Por otra parte la concentración requerida para generar una reacción adversa sistémica debe ser mucho mayor que la necesaria para desencadenar una reacción adversa local. (*Wataha JC, 2000; Wataha JC y col., 1995*) En estudios de citotoxicidad se han utilizado diferentes fuentes iones metálicos: a) extractos obtenidos de la disolución de muestras metálicas *ex situ* y luego añadidas al medio de cultivo; (*Bumgardner JD y col., 2002; Wataha JC y col., 2001; Granchi DG y col., 1998*) b) la disolución de muestras metálicas *in situ*; (*Kapanen A y col., 2002; Kapanen A y col., 2001; Grill V y col., 2000; Grill V y col., 1997; Bumgardner JD y Lucas CL, 1995; Wataha JC y col., 1992*) y c) las sales metálicas añadidas al medio de cultivo. (*Fleury C y col., 2006; Huk OL y col., 2004; Wataha JC y col., 2002; Schmalz G y col., 1998; Craig RG y Hanks CT, 1990; Merrit K y col., 1984*)

Las aleaciones dentales, sobre todo las de metales no nobles como los bronce al aluminio, liberan cationes debido a la corrosión, tal como se describió arriba. Esos iones pueden ser distribuidos por todo el organismo (*Wataha JC, 2000*) y en la cavidad oral donde han sido encontrados en la saliva, lengua y en la encía de los pacientes. (*Su J y col., 2012; Geurtsen W, 2002; Schmalz GJ y col., 1999; Hensten-Pettersen A, 1992*)

### **3. Reacciones sistémicas provocadas por aleaciones dentales**

La reacción sistémica de un elemento metálico depende de su vía de ingreso al organismo y de la velocidad de su eliminación. Elementos que han sido liberados por una aleación en la cavidad oral pueden ganar acceso al interior del cuerpo a través de la encía u otros tejidos orales, o a través del epitelio intestinal. Una vez en el interior del organismo, los iones metálicos se distribuyen en varios tejidos, pasando por difusión al sistema linfático y sanguíneo. Aquellas partículas metálicas que miden entre 0,5 a 10,0  $\mu\text{m}$ , pueden también ser fagocitadas por células como los macrófagos, para luego ser transportadas a los vasos linfáticos o sanguíneos. (Wataha JC, 2000)

La información sobre efectos sistémicos provocados por biomateriales dentales metálicos, es escasa (Mutter J y col., 2005). Hasta ahora no se ha demostrado que la presencia sistémica de metales, provenientes de aleaciones dentales, causen intoxicación (Penn D, 2013; Schmalz G y Arenholt-Brindslev A, 2009; Wataha JC, 2000). Sin embargo, existen publicaciones que describen efectos sistémicos de alergia a metales. (Mutter J y col., 2005) El níquel es un fuerte alérgeno, y además de los efectos en la piel, fueron reportados efectos sistémicos de tipo renales (Strauss FG y Eggleston DW, 1985). Bass y colaboradores (Bass JK y col., 1993) describieron el riesgo de sensibilización al níquel tras realizar un tratamiento ortodóncico. Desde que una aleación dental es colocada en boca, los pacientes quedan continuamente expuestos a los iones metálicos y dicho fenómeno puede contribuir a inducir o perpetuar la alergia a los metales. (Muris J y Feilzer AJ, 2006) De todos modos, es importante la identificación del verdadero alérgeno, es decir, si la causa reside en la aleación dentaria o en las aleaciones de joyas o hebillas de cinturones (Torres Quintana MA y col., 2003). Es de fundamental importancia que antes de utilizar una aleación dental que contenga níquel, el odontólogo se asegure ante qué tipo de paciente se encuentra y además valore la presencia de antecedentes alérgicos al níquel (Pedemonte S y col., 2006). En el caso del cobre, se ha demostrado en pacientes con Enfermedad de Wilson que la acumulación de este ion puede llegar a ser mortal (Lech T y col., 2007), por lo que debería evitarse el uso de biomateriales dentales metálicos que contengan cobre en su composición.

#### **4. Reacciones locales provocadas por aleaciones dentales**

Las reacciones locales adversas son los aspectos de mayor importancia a tener presente cuando se considera la seguridad que deben presentar las aleaciones dentales al ser utilizadas en la cavidad oral. Desde hace treinta años, numerosas investigaciones se han enfocado en el estudio de las alteraciones locales generadas por dispositivos odontológicos fabricados con aleaciones dentales. Especial énfasis se ha puesto en las aleaciones no nobles como los bronce al aluminio, por ser las que presentan menor estabilidad termodinámica. Varios estudios documentaron al cobre como el elemento más tóxico, siendo generalmente las aleaciones base cobre severamente tóxicas, efecto que se atribuye justamente a la presencia de cobre. (Wataha JC, 1995; Berstein A y col., 1992; Bumgardner JD y col., 1989)

Arvidson y Wroblewski (Arvidson K y Wroblewski R, 1978) estudiaron una serie de piezas dentarias extraídas de pacientes, que fueron rehabilitadas con pernos de aleaciones no nobles. Varias de ellas que se encontraban rodeadas por encía con cambio de coloración, fueron extraídas con parte del tejido blando. Se observó la presencia de iones cobre y cinc en la dentina radicular, como consecuencia de la corrosión de los pernos metálicos. Encontrándose también, iones metálicos en la encía afectada, tales como, cobre, cinc y hierro. Soileau y col. en 1990 (Soileau RM y col., 1990) y Burns y Lucas en 1989 (Burns JK y Lucas LC, 1989), también encontraron cobre en encía gingival adyacente a coronas base cobre. Angmar-Månsson y colaboradores (Angmar-Månsson B y col., 1969) ya consideraban la difusión de productos de corrosión en los túbulos dentinarios radiculares, con la consecuente pigmentación de la raíz de color negro-verdoso. También ha sido documentado que iones metálicos, liberados de restauraciones como consecuencia de procesos corrosivos, han alcanzado a penetrar en los tejidos duros dentarios (Kratzenstein B y col., 1988). Arvidson y colaboradores (Arvidson K y col., 1980), luego de evaluar la tolerancia biológica de fibroblastos gingivales humanos frente a la presencia de pernos confeccionados con aleaciones no nobles, sugieren que estas aleaciones pueden provocar injurias a las células cercanas a la pieza dentaria tratada. Y que al ser la función primaria de los fibroblastos, *in vivo*, la síntesis de colágeno, el efecto citotóxico

de los iones metálicos sobre esas células podría generar un disturbio en la formación y mantenimiento de las matrices de colágeno de la lámina propia de la encía y del ligamento periodontal, pudiendo esta situación provocar la pérdida de los tejidos de soporte. Estudios *in vitro* de cultivos celulares de células epiteliales y gingivales muestran una reducción de su viabilidad y proliferación al ser expuestas a aleaciones base cobre (Bumgardner JD y col., 1989). El mismo comportamiento también lo sufrieron líneas celulares que involucraban linfocitos T y B al ser expuestas, en un estudio *in vitro*, a aleaciones base cobre (Bumgardner JD y col., 1990). Por otra parte, investigaciones *in vitro* presentaron a los cationes metálicos cobre, cinc y níquel, como responsables de alterar la homeostasis inmune de la cavidad oral, desencadenando enfermedad periodontal, enfermedades autoinmunes y disminución de la resistencia a las infecciones. (Bumgardner JD y col., 1993; Warner GL y Lawrence DA, 1988) La salud de la cavidad oral depende de la integridad de la mucosa, y la protección de la mucosa oral depende en parte de la secreción de inmunoglobulinas por parte de las células plasmáticas y de la presencia de células T y B y macrófagos. (Bumgardner JD y col., 1993) Continuando con la línea de investigación, Tibbals y Erimescu (Tibbals JE y Erimescu R, 2006) y Ardlin y colaboradores (Ardlin BI y col., 2009) también encontraron iones metálicos (cobre, níquel, cinc y aluminio) en las células de los tejidos circundantes a aleaciones base cobre.

Así como se observaron efectos sistémicos de alergia al níquel proveniente de aleaciones dentales, también se encuentra la reacción alérgica de contacto en mucosa oral que se denomina estomatitis de contacto y que se diagnostica a través de la prueba de parche. (Pedemonte S y col., 2006) Generalmente la estomatitis de contacto es producida por el níquel, aunque son raros los casos de pacientes que presentan alergia únicamente a este metal. Se trata de una etiología multifactorial y un poder de sensibilización antigénico múltiple y sinérgico de los distintos metales y aleaciones. Ante la sospecha de un caso de alergia al níquel, se debe remitir al paciente al alergólogo. Previamente a cualquier tratamiento, es de vital importancia preguntar en la historia clínica por la presencia de alergias a metales. (Pedemonte S y col., 2006) La incidencia de hipersensibilidad por productos dentales en general suele ser baja. Alrededor del 15% de la población suele ser alérgica al níquel, un 8% es sensible al

cobalto y un 8% al cromo. Aunque recientemente también se han reportado alergias al cobre, mercurio, oro, platino, paladio, estaño y cinc. (*Penn D, 2012*)

En los tejidos de la cavidad oral también se pueden desencadenar efectos carcinogénicos y mutagénicos. Los efectos mutagénicos describen mutación, es decir, una alteración de la secuencia nucleotídica del ADN. Los efectos carcinogénicos corresponden a alteraciones del ADN que implican una multiplicación y un crecimiento celular inadecuado, es el resultado de mutaciones múltiples, que eventualmente alteran la regulación de los procesos de multiplicación celular, terminando en la producción de cáncer. (*Penn D, 2012; Wataha JC, 2000*) Las aleaciones metálicas pueden no tener un efecto directo sobre el ADN para generar mutaciones, pero pueden liberar elementos con efectos mutagénicos o cancerígenos y generar radicales libres que pueden luego alterar el ADN. Existen investigaciones que afirman que varios metales son genotóxicos o carcinógenos. Hay una fuerte evidencia que el níquel, el cobalto, el cromo y el berilio, en particular, incrementan el riesgo de cáncer en humanos. (*Geurtsen W, 2002; Wataha JC, 2000*) Sin embargo, no se han publicado estudios que demuestren que las aleaciones dentales metálicas aumenten el riesgo mutagénico o cancerígeno en humanos. (*Penn D, 2012; Geurtsen W, 2002; Wataha JC, 2000*)

## **5. Selección clínica de las aleaciones dentales**

A pesar de los cuestionamientos planteados acerca de su uso, las aleaciones base cobre continúan siendo una de las aleaciones de elección (*Ardlin BI, 2009; Tibballs JE y Erimescu R, 2006; Eschler PY y col., 2003; Stoffers K y col., 1987*) a la hora de confeccionar una prótesis fija. La selección de la aleación es fundamentalmente responsabilidad ética y legal del odontólogo, pero generalmente esta decisión es tomada por el laboratorista dental. En la mayor parte de los casos, a la hora de seleccionar la aleación dental, los aspectos que más se tienen en cuenta son el costo y el color. Dejando de lado, lo más importante a considerar, las propiedades del biomaterial y la salud del paciente. Los odontólogos deberían llevar registros de las aleaciones que usan y transmitirles esta información a los pacientes. Estos registros son importantes para ayudar en el diagnóstico de futuros

problemas que pudieran ocurrir (reacciones biológicas o fallas mecánicas) y, además, son registros legales importantes para defender al odontólogo frente a una eventual litigación. (*Wataha JC y Messer RL, 2004*)

## **SECCIÓN E**

### **PROTECCIÓN CONTRA LA CORROSIÓN METÁLICA**

#### **1. *Inhibidores de la corrosión y formación de películas protectoras***

Se ha definido más arriba la corrosión como una reacción electroquímica que ocurre en la interfase metal o aleación y el medio acuoso en el cual se encuentra inmerso el material metálico, que produce un deterioro del material y de sus propiedades. Si bien los problemas de corrosión pueden disminuirse mediante una adecuada selección de materiales, diseños y técnicas de fabricación, en numerosas aplicaciones es más económico y con muy buenos resultados, el empleo de inhibidores de la corrosión. (*Kokalj A y col., 2011; De Damborenea J, 1987*)

El inhibidor es una sustancia que agregada al medio en forma y concentración (generalmente baja) adecuadas previene o reduce la corrosión. Los inhibidores de corrosión modifican las reacciones electroquímicas o modifican la velocidad a la cual ocurren actuando desde la solución en la interfase biomaterial metálico-solución. (*Bobina M, 2013; Kesavan D y col., 2012; McCafferty E, 2010; Feliu S y Andrade MC, 1991*)

Los inhibidores pueden clasificarse de varias maneras. Pero existen dos grupos muy importantes, los inhibidores de adsorción y los inhibidores que actúan por formación de películas protectoras. Por inhibidores de adsorción se entiende aquellos que se adsorben sobre la superficie e impiden o dificultan las reacciones de disolución. La mayoría de los inhibidores orgánicos actúan adsorbiéndose sobre el metal. Los inhibidores que forman películas son, a su vez, de dos tipos: pasivantes e inhibidores por precipitación. Los primeros actúan por formación de una película pasivante sobre la superficie. Los inhibidores pasivantes pueden ser tanto los agentes oxidantes como los no oxidantes. En el segundo subgrupo, se sitúa a aquellos que, en su reacción con el metal, son capaces de formar una película tridimensional sobre la superficie del mismo, como por ejemplo, los silicatos y fosfatos. Desde otro punto de vista, los inhibidores pueden clasificarse en anódicos, catódicos o mixtos,

dependiendo sobre cuál reacción electroquímica actúen. Los compuestos orgánicos son en general inhibidores de tipo mixtos. (*McCafferty E, 2010*)

Los primeros inhibidores de corrosión que se desarrollaron fueron de tipo inorgánico. Estos inhibidores por ser altamente tóxicos están siendo reemplazados por compuestos orgánicos. En general, la mayoría de los inhibidores de corrosión orgánicos son compuestos cuyas moléculas están compuestas por dos porciones estructurales esenciales: una nucleofílica que facilita la adsorción del inhibidor por medio de la formación de enlaces de coordinación (quimisorción), y una parte hidrofóbica que actúa como repelente de los agentes corrosivos. (*Olivares Xometl CO, 2005*) Naturalmente, para que un inhibidor pueda ser utilizado, tanto en el campo de la salud como en la industria, debe poseer baja toxicidad, no debe provocar reacciones adversas en el organismo y debe ser ecológicamente benigno. La mayoría de los inhibidores orgánicos eficientes son compuestos que contienen heteroátomos (O, S, N) y enlaces múltiples. (*Junaedi S y col., 2013; Bahrami MJ y col., 2010; Shaker MA y Abdel-Rahman HH, 2007*)

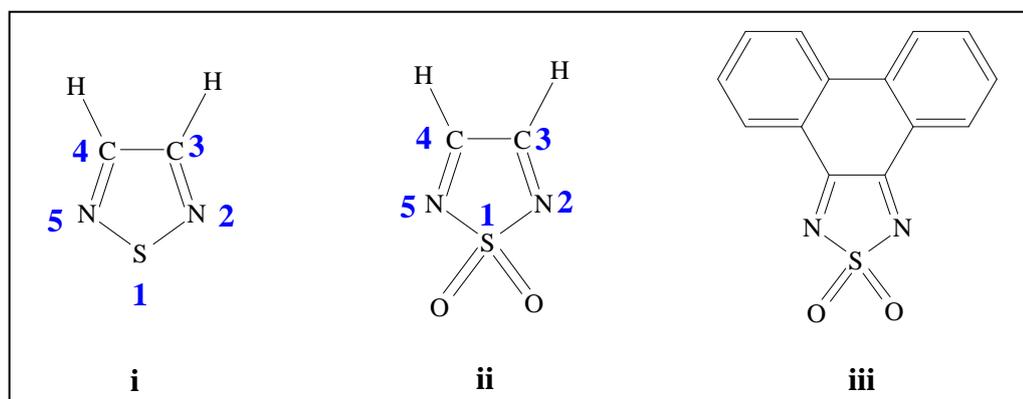
La inhibición de la corrosión puede también alcanzarse modificando la superficie del metal mediante la formación de una película de inhibidor orgánico. Interacciones químicas fuertes entre las moléculas de inhibidor y las superficies metálicas pueden conducir a la formación de una película orgánica firme, de fácil preparación, y con una excelente protección contra la corrosión. (*Appa Rao BV y col., 2009*)

## ***2. Compuestos orgánicos a ser probados como inhibidores o protectores de las superficies metálicas contra la corrosión***

### **2.1. Fenantro[9,10-c]1,2,5-tiadiazol 1,1-dióxido**

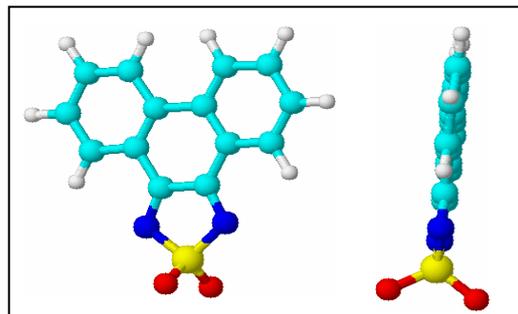
El fenantro[9,10-c]1,2,5-tiadiazol 1,1-dióxido (TDZ) (**Figura I.14a iii**) es un compuesto orgánico heterocíclico sintetizado en nuestro laboratorio (*Svartman EL y col., 2006*) por un nuevo procedimiento que resultó ser más eficiente y económico que el tradicional (*Vorreither HK y Ziegler E, 1965*). Deriva de 1,2,5-tiadiazol 1,1-dióxido (T) (**Figura I.14a ii**). TDZ pertenece al

grupo de derivados de 1,2,5-tiadiazol (**Figura I.14 i**) 3,4-diarildisustituidos con un sistema electrónico-pi extendido y conectado. (*Svartman EL y col., 1999*)



**Figura I.14a.** Fórmulas estructurales: (i) 1,2,5-tiadiazol; (ii) 1,2,5-tiadiazol 1,1-dióxido (T); (iii) fenantro[9,10-c]1,2,5-tiadiazol 1,1-dióxido (TDZ).

La extensión del sistema electrónico-pi le confiere estabilidad química a TDZ resultando químicamente inerte en medio acuoso. (*Svartman EL y col., 2006*) TDZ también es estable en aire y en la mayoría de los solventes orgánicos comunes. (*Aimone SL y col., 2000*) Es prácticamente insoluble en agua, pero parcialmente soluble en dimetilsulfóxido a temperatura ambiente. Es posible suponer que dicho compuesto orgánico, posea baja toxicidad ya que la porción estructural heterocíclica del 1,2,5-tiadiazol se



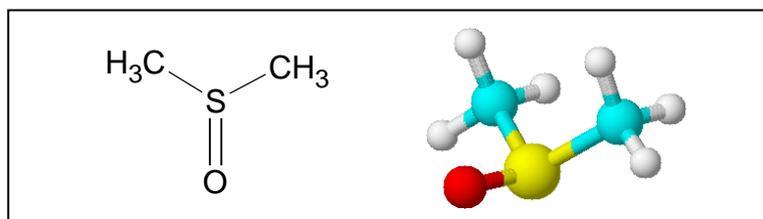
**Figura I.14b.** Fórmula espacial de TDZ.

encuentra formando parte de numerosas moléculas bioactivas que presentan propiedades antihipertensivas y vasodilatadoras (*Stegelmeier H y col., 1985; Gazieva GA y col., 2000*), así como también propiedades terapéuticas con efectos depresores del sistema nervioso central, relajantes musculares y tranquilizantes entre otras. (*Carson J, 1965*) Dadas las características estructurales de la molécula TDZ que contiene heteroátomos (O, N y S) con electrones no compartidos (N y O) y un sistema electrónico-pi conjugado y extendido coplanar con el heterociclo (*Castellano EE y col., 2001*) (**Figura I.14b**), podría presentar utilidad como inhibidor de la corrosión.

## 2.2. Dimetilsulfóxido

El dimetilsulfóxido (DMSO) (**Figura I.15**) es un compuesto orgánico de baja toxicidad (*Pérez-Pastén R y col., 2006*) con una amplia gama de aplicaciones en medicina. (*Borrero R y col., 2006; Ikemiya N y Gewirth AA, 2000; Mestroni G y col., 1993*) Tiene la capacidad de penetrar las membranas biológicas facilitando el transporte químico dentro de los tejidos biológicos y es conocida su función como criopreservante en los sistemas biológicos. También es empleado como agente antiinflamatorio, siendo utilizado para el tratamiento de la artritis (*Jacobs SW y col., 1971*). Además, ha sido empleado como un captador de radicales *in situ* en el tratamiento de varios cánceres (*Salim AS, 1992*). Pero la propiedad del DMSO que más lo caracteriza es su utilidad como solvente orgánico. (*Allen HC y col., 1999*) Shaker y Abdel-

Rahman (*Shaker MA y Abdel-Rahman HH, 2007*) informan que la velocidad de corrosión de



**Figura I.15.** Fórmula estructural (plana y espacial) de DMSO.

cobre desciende cuando dicho metal es sumergido en una solución de ácido fosfórico utilizando como solvente diferentes mezclas binarias de agua y solventes orgánicos próticos y apróticos, entre ellos DMSO. Establecen que la disminución de la disolución del metal está directamente relacionada con el aumento de la concentración del solvente orgánico utilizado. En la literatura (*Madhavan K y col., 2001*) está informada la influencia de DMSO sobre la inhibición de la corrosión de acero al carbono en HCl 1N y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N. El efecto inhibitorio de la corrosión de este compuesto no resulta demasiado alentador, ya que la eficiencia de inhibición es cercana al 50% en ambos ácidos a temperatura cercana a la ambiente (32 °C) para la máxima concentración de DMSO ensayada (0,1 M). Se considera que el DMSO actúa como inhibidor secundario, y que su efecto se debe a la adsorción de sulfuro de dimetilo (SDM) formado por reducción de DMSO sobre el electrodo: se explica que inicialmente el DMSO se adsorbe sobre la superficie del acero desde soluciones ácidas y se establece el equilibrio:



y luego ocurre la reducción a sulfuro:



El SDM con sus dos pares de electrones no compartidos (electrones-n) se adsorbe mucho más fácilmente que el sulfóxido padre formando un enlace quimisorbido más estable.

Si bien, según esta última investigación, el DMSO no presentaría una eficiencia de inhibición óptima, dada su baja toxicidad se considera adecuado continuar estudiando su efecto como inhibidor de la corrosión de los metales y aleaciones en saliva sintética.

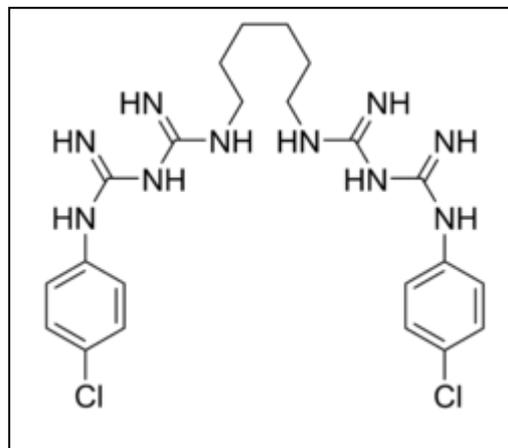
### 2.3. Enjuague bucal a base de digluconato de clorhexidina y xilitol

Los *enjuagues bucales* son soluciones acuosas que contienen en su composición uno o más componentes activos y excipientes. Se utilizan por medio de desplazamientos de líquidos dentro de la cavidad oral. (Gennaro AR, 2003) Los *enjuagues bucales* llamados *antiplaca*, son los que actúan sobre la placa bacteriana debido a la acción de su fórmula antiséptica. Los *antisépticos* son sustancias antimicrobianas que matan o inhiben el crecimiento de microorganismos, no debiendo presentar efectos adversos sistémicos o locales. Los enjuagues bucales más efectivos y aceptables contienen como agente antimicrobiano clorhexidina. (Van Strydonck DA y col., 2012; Zerón A, 2003) La clorhexidina suele asociarse con otras sustancias químicas para mejorar sus propiedades y potenciar su acción, como por ejemplo, xilitol (10% p/v), cloruro de cetilpiridinio (0,05% p/v), etc. (Negroni M, 2009) También suelen agregarse al enjuague bucal, solventes, emulsificantes, colorantes y saborizantes.

La estructura química de su principal componente, el digluconato de clorhexidina y sus principales agentes asociados, el cloruro de cetilpiridinio y el xilitol; así como la baja toxicidad que presentan, hacen pensar en la posibilidad del uso de enjuagues bucales con acción antiplaca como inhibidores de la corrosión de metales

### 2.3.1. Clorhexidina

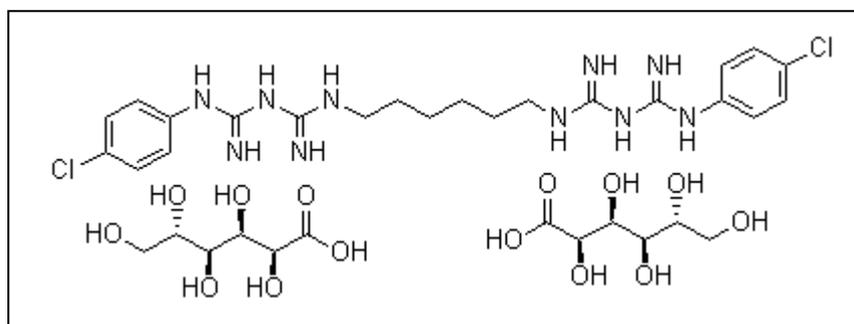
La clorhexidina (CH) (**Figura I.16**) pertenece al grupo de las polibiguanidinas y se emplea como antiséptico de amplio espectro, especialmente contra gérmenes Gram positivos y Gram negativos, desde los años cincuenta (*Lee LW, 1990*). Su mecanismo de acción se basa en la reducción de la formación de la biopelícula dental y en la alteración del desarrollo bacteriano. Aunque es una base, la CH se mantiene más estable en forma de sal (como digluconato de clorhexidina). Se une fuertemente a la membrana celular bacteriana. A bajas concentraciones (0,12 – 0,2%) produce un aumento de la permeabilidad con filtración de



**Figura I.16.** Fórmula estructural de CH.

los componentes intracelulares incluido el potasio (efecto bacteriostático), mientras que en mayores concentraciones (2%) produce la precipitación del citoplasma bacteriano y muerte celular (efecto bactericida). (*Bascones A y Morante S, 2006*) Se une electrostáticamente a las piezas dentarias (hidroxiapatita), biopelícula dental y mucosa bucal, liberándose gradualmente en ocho a doce horas en su forma activa. (*Rölla G y Melse B, 1975*) Tras su uso prolongado pueden presentarse coloraciones pardo-amarillentas sobre la superficie de dientes naturales y restauraciones, que parecen depender de la concentración del producto y de la susceptibilidad individual. Sin embargo, la coloración no penetra la superficie y puede eliminarse efectuando la profilaxis. Las pigmentaciones aumentan cuando se ingieren en forma simultánea ciertos productos como el té, café, vino tinto y también con el uso de tabaco. Puede generar alteraciones transitorias del gusto, descamación de la mucosa oral que cesa al dejar el tratamiento y aumento del cálculo supragingival que parece tener una composición distinta a la habitual. Son escasos los trabajos que relatan alteraciones sistémicas o reacciones alérgicas, incluso si se ingieren grandes cantidades, ya que no se absorbe a nivel gastrointestinal. (*Negroni M, 2009*)

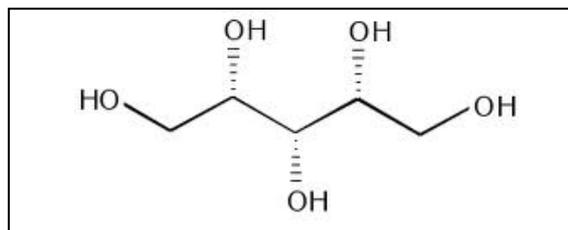
El digluconato de clorhexidina (DHCH) (**Figura I.17**) es la forma salificada de la clorhexidina y ha demostrado presentar beneficios clínicos y microbiológicos, por lo que es la forma que se usa en odontología generalmente en concentraciones de 0,2% p/v y 0,12% p/v (Negroni M., 2009).



**Figura I.17.** Fórmula estructural de DGCH.

### 2.3.2. Xilitol

El xilitol (XL) (**Figura I.18**) es un alcohol pentosa, cuyo potencial endulzante es similar al del azúcar y confiere un efecto refrescante, es estable en solución y a elevadas temperaturas. (Bordoni N y col., 2010) Hasta la actualidad persisten cuestionamientos sobre el efecto activo del XL, se sugiere que inhibe el crecimiento bacteriano y la producción de metabolitos ácidos por parte de las bacterias orales, alterando la flora bucal. (Kakuta H y col., 2003) Este



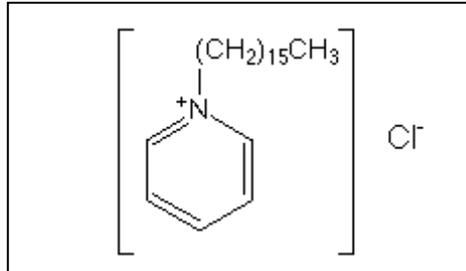
**Figura I.18.** Fórmula estructural espacial de XL.

efecto se consigue porque las bacterias, especialmente los *Streptococcus mutans*, no tienen las enzimas adecuadas para utilizar el XL como fuente de energía.

### 2.3.3. Cloruro de cetilpiridinio

El cloruro de cetilpiridinio (CCP) (**Figura I.19**) es un compuesto de amonio cuaternario. Tiene una moderada actividad inhibitoria de la formación de la biopelícula dental. Se usa generalmente en una concentración de 0,05% p/v. (Negroni M, 2009) Presenta una sustentividad de tres a cuatro horas, y su eficacia puede ser incrementada duplicando la frecuencia del enjuague bucal a cuatro veces por día. (Haps S y col., 2008;

*Roberts WR y Addy M, 1981*) Su mecanismo de acción parece deberse al aumento de la permeabilidad de la pared bacteriana que favorece la lisis y disminuye la capacidad de la bacteria para adherirse a la superficie dentaria. Los efectos colaterales que presenta son la tinción y la sensación de ardor o quemazón de la mucosa. (*Negroni M, 2009*)



**Figura I.19.** Fórmula estructural de CCP.

## SECCIÓN F

### FUNDAMENTOS Y DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS

#### 1. Técnicas electroquímicas

Las técnicas electroquímicas pueden ser utilizadas para estudiar el comportamiento frente a la corrosión de los biomateriales metálicos de uso odontológico, así como también para el estudio del efecto de los inhibidores de corrosión sobre los procesos de corrosión de los mismos. En este trabajo de tesis doctoral se utilizan técnicas electroquímicas simples cuyos resultados permiten el análisis e interpretación por parte de odontólogos, con el objetivo de que las metodologías puedan ser comprendidas y aplicadas por profesionales de la salud que no han sido preparados con conocimientos electroquímicos profundos.

Con el objetivo de simular las condiciones del medio bucal, se utilizan como electrolitos soluciones salinas que simulan la composición de la saliva. (Tibballs JE y Erimescu R, 2006; Quezada Castillo E y Duffó GS, 2003) Entre los métodos electroquímicos existentes, se encuentran la medida de potencial a circuito abierto y las curvas de polarización potenciodinámica lineal y cíclica (voltamperometría cíclica a baja velocidad de barrido de potencial). (Becker MD, 2004; Pourbaix M, 1984) A través de estos estudios *in vitro* se puede estimar el comportamiento de un determinado biometal en la cavidad oral. (Mareci D y col., 2005)

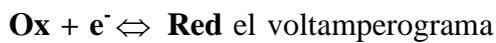
##### 1.1. Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica (VC) es generalmente la primer técnica que se selecciona en cualquier estudio electroquímico. (Skoog DA y col., 2008) Se caracteriza por la aplicación inicial de un potencial al electrodo de trabajo (metal a estudiar) que varía linealmente con el tiempo a una velocidad  $v_b = \frac{dE}{dt}$ , hasta un potencial  $E_\lambda$  durante un tiempo  $t = \lambda$  y luego se invierte la dirección de barrido hasta volver al potencial inicial, conservando la velocidad

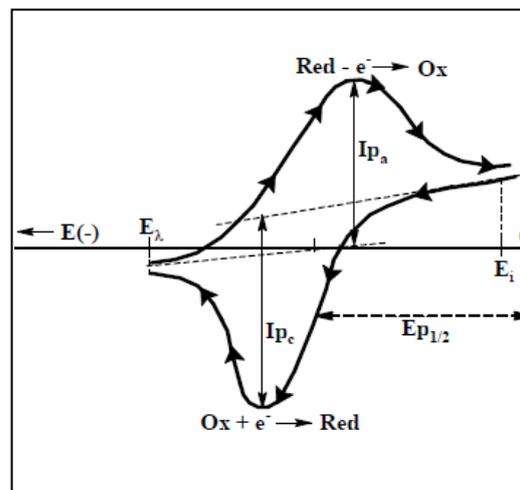
de barrido ( $v_b$ ) constante y el potencial en cada instante de tiempo será (suponiendo que la dirección de barrido es hacia potenciales decrecientes):

para $0 \leq t \leq \lambda$	$E = E_i - v_b t$
para $\lambda \leq t \leq 2\lambda$	$E = E_i - 2v_b \lambda + v_b t$

Las respuestas de corriente eléctrica en función del potencial aplicado al electrodo de trabajo se denominan *voltamperogramas*, y tienen ciertas características cualitativas típicas. Para una sustancia (**Ox**) en solución que puede electroreducirse según



el voltamperograma cíclico cualitativo se presenta en la **Figura I.20**. Al reducirse **Ox** en la interfase electrodo-solución y, consecuentemente, disminuir su concentración, la velocidad de difusión de **Ox** hacia el electrodo aumentará y junto con ella la corriente de reducción. Sin embargo, el aumento de gradiente de



**Figura I.20.** Voltamperograma cíclico.

concentración tiene un límite ya que al mismo tiempo el potencial del electrodo se hace cada vez más negativo y la velocidad de reducción aumenta. En esas condiciones se alcanza un punto en el cual la concentración de **Ox** sobre el electrodo es cero y el gradiente se extiende hacia el seno de la solución disminuyendo su valor así como el flujo de **Ox** hacia el electrodo y el valor de la corriente de reducción. De esta manera la corriente de reducción alcanza un valor máximo (pico catódico,  $p_c$ ) y luego disminuye. Cuando se han alcanzado potenciales más negativos que los del pico catódico, queda adyacente al electrodo una solución diferente de la existente en el seno de la solución. En las cercanías del electrodo la concentración de **Red** es igual a la concentración original de **Ox**. Si ahora se invierte el sentido del barrido de potencial se repetirá lo arriba descrito en sentido inverso y se observará un pico anódico,  $p_a$ , correspondiente a la electrooxidación de **Red** a **Ox**.

La VC es de gran importancia porque da una primera información acerca del proceso de electrodo en estudio, pudiendo conocerse la reversibilidad del mismo. También permite determinar si se produce el proceso de electrodeposición, es decir el crecimiento de una nueva fase sobre el electrodo de trabajo, realizando barridos a diferente potencial de retorno, próximos al potencial en el que se inicia el proceso de reducción. (*Albella JM y CSIC, 2003*)

Los estudios voltamperométricos realizados con electrodos de trabajo de metales activos pueden utilizarse también para explicar algunos fenómenos relacionados con la corrosión. La aplicación de una rampa de potencial a velocidad muy baja puede utilizarse para registrar la curva corriente-potencial del estado estacionario, es decir lo que se denomina curva de polarización potenciodinámica. Cuando la velocidad de barrido es suficientemente baja, se da tiempo a que la disolución y el electrodo alcancen el estado de equilibrio. De estas curvas de polarización se obtienen datos relacionados con la situación de pasividad del electrodo, del potencial de ruptura de la capa pasiva, de la intensidad de corriente de pasividad y del potencial de repasivación, que se define como el potencial al que se reconstruye la capa pasiva. La técnica de polarización cíclica es de utilidad para determinar la susceptibilidad a la corrosión por picado de los metales y aleaciones cuando son colocados en un medio corrosivo.

La disposición de un equipo estándar para VC se muestra en la **Figura I.21**. Para medir las características de corriente-potencial correspondientes a un solo electrodo (electrodo de trabajo, ET), se coloca en la celda un tercer electrodo (electrodo de referencia, ER) ubicado cerca del primero. Existe otro electrodo (contra electrodo o electrodo auxiliar, CE) cuyas características no afectan las mediciones. La celda se conecta a un potencióstato el cual mide el potencial del electrodo de trabajo respecto al de referencia, compara ese potencial con el previamente seleccionado en el potencióstato y cambia la diferencia de potencial entre el CE y el ET hasta que la diferencia entre ET-ER llegue al valor deseado.

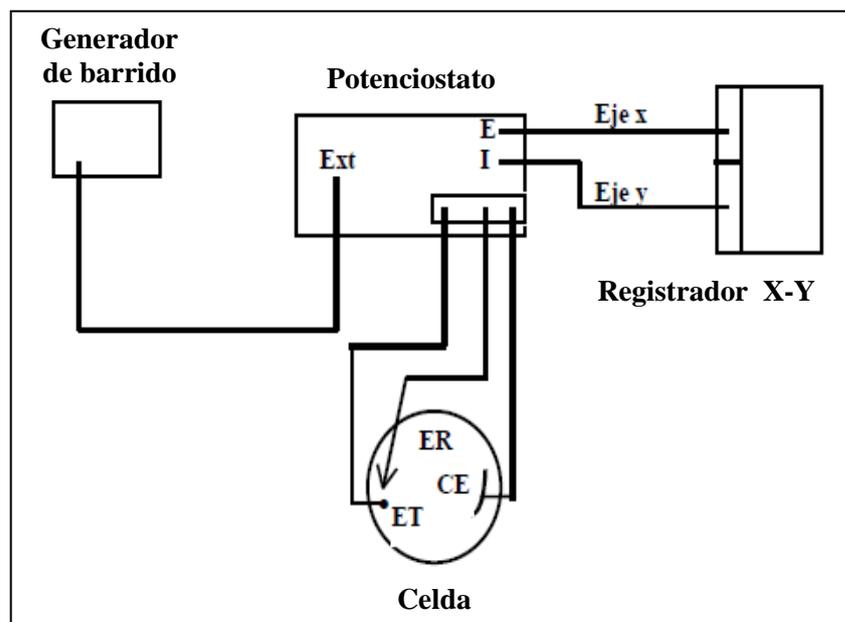


Figura I.21. Esquema de un equipo estándar para VC

## 1.2. Medida de potencial a circuito abierto

El *potencial a circuito abierto* (PCA) es el potencial (vs. ER) que corresponde al estado de equilibrio de un electrodo (metal/solución) en ausencia de flujo externo de corriente hacia o desde el electrodo. (Zelinsky AG y col., 2004; McGraw y col., 2003) La estabilidad de los metales en un medio corrosivo está relacionada con las propiedades termodinámicas y la cinética de las reacciones químicas y/o electroquímicas que ocurren sobre la superficie en contacto con el agente corrosivo. Esta sencilla técnica electroquímica posibilita obtener información acerca del estado activo/pasivo de un metal. La pasivación de un metal se relaciona con la formación de una película (capa) protectora compuesta por productos provenientes de la corrosión insolubles en el medio electrolítico, que dificulta en mayor o menor grado la disolución del metal. Los valores del PCA cambian con el tiempo cuando el metal se expone a la acción del electrolito. El electrolito interacciona con los elementos del material y lo transforma. La transformación que tiene lugar puede ser de tipo protectora (como, por ejemplo, la formación de una capa de pasivación), con lo que el valor del PCA aumenta con el tiempo o, si tiene lugar un proceso de degradación del material (como, por ejemplo, la formación de una capa de óxido porosa), el valor del PCA disminuye con el tiempo. Entonces, el valor

del PCA posibilita conocer la capacidad protectora de una película formada sobre la superficie del sustrato metálico.

La medida de PCA consiste en determinar la diferencia de potencial entre un metal y un electrodo de referencia sumergidos en un determinado medio corrosivo, en ausencia de pasaje de corriente externa. El instrumento usado para medir la diferencia de potencial entre ambos electrodos debe ofrecer alta resistencia a la circulación de corriente. El valor del PCA depende tanto de la naturaleza del metal en estudio como de la composición del electrolito. Los datos de potencial obtenidos deben estar acompañados del signo y del tipo de electrodo de referencia utilizado, como siempre que se exprese un valor de potencial. Dichos datos se expresan a través de diagramas, potencial *versus* tiempo, para luego ser analizados en conjunto con otras técnicas electroquímicas.

## **2. Técnicas espectroscópicas**

### **2.1. Espectrofotometría de absorción atómica**

Los iones metálicos liberados al fluido biológico como consecuencia de la corrosión de un biomaterial metálico al interactuar con el fluido en la cavidad oral (*Fernández Lorenzo de Mele M y Duffó GS, 2002*), pueden identificarse y cuantificarse empleando la técnica de espectrofotometría de absorción atómica (EAA). La EAA es el método más fácil y rápido para la determinación cuali y cuantitativa de metales. Es una técnica muy utilizada en la higiene analítica para la determinación de metales en el ambiente y para el apoyo de la medicina en la determinación de metales en fluidos biológicos.

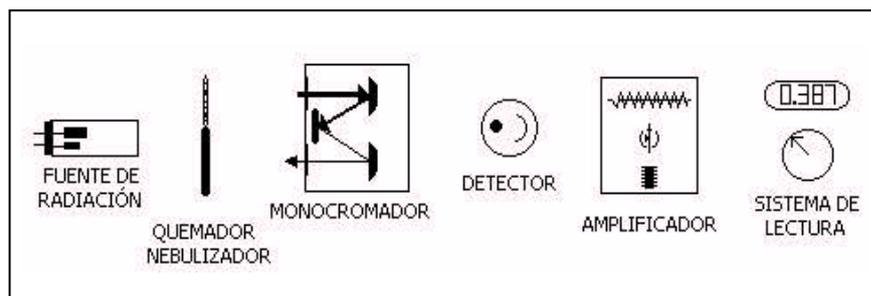
Esta técnica analítica se basa en la absorción y emisión de energía radiante por los átomos en estado fundamental. (*Menéndez Diez F, 2009*) Los átomos absorben y emiten radiación de la misma longitud de onda, ya que absorben radiación al pasar del estado fundamental a un estado excitado y teóricamente emiten radiación de la misma longitud de onda en el proceso inverso; por lo tanto si se tiene una fuente de energía radiante en la cual el elemento excitado es el mismo que se va a analizar, la radiación emitida por el elemento excitado al desprender la energía de excitación va a ser captada únicamente por el elemento que es idéntico al de la fuente luminosa. Por

ejemplo: si se desea cuantificar cinc en una llama, se hace irradiar ésta con radiación emitida por átomos de cinc; esta energía será absorbida únicamente por los átomos de cinc que se encuentran en la llama y no por los átomos de cobre, cadmio, o níquel o algún otro elemento presente, ya que la longitud de onda de la radiación de la fuente luminosa corresponde únicamente a la diferencia de energía de los niveles energéticos del cinc.

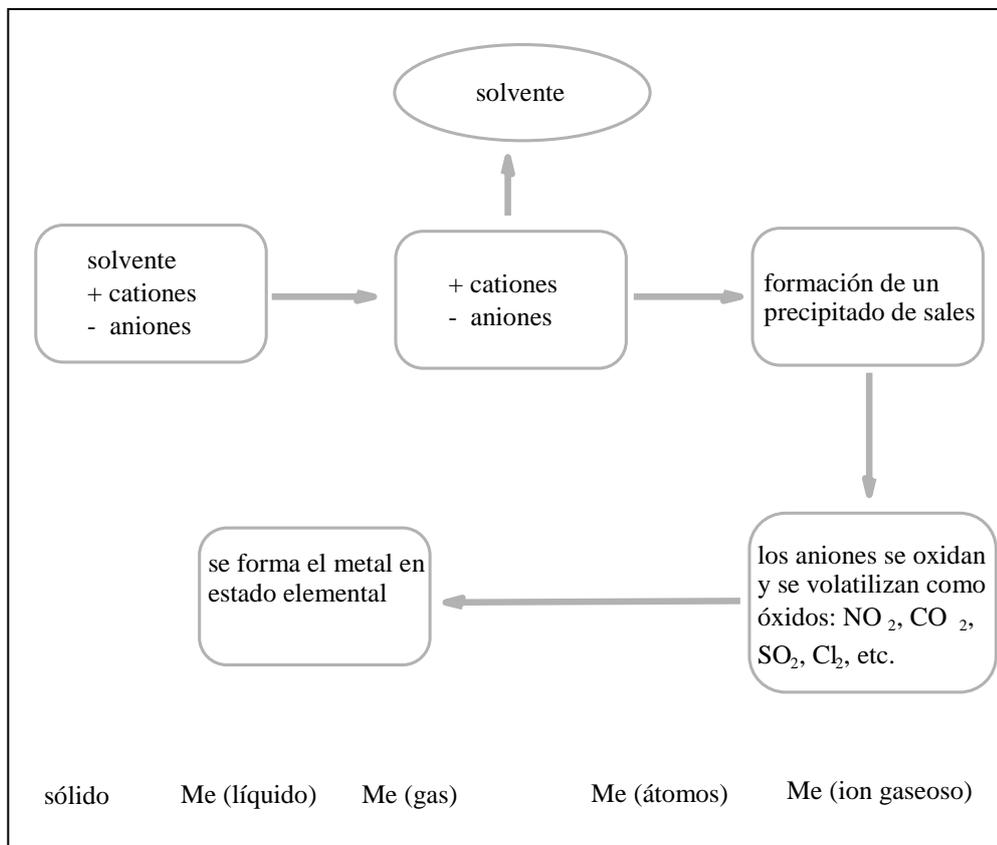
Las sales de diferentes metales, en solución o en estado sólido, cuando son expuestas a una llama producen distintas coloraciones. Así por ejemplo, las sales de cobre un verde azulado, las de calcio dan un color naranja, las de sodio un color amarillo, las de potasio un color violeta, las de estroncio un color verde amarillo, etc. Este comportamiento permite la identificación del metal presente en la composición de la sal. Si la luz colorida producida por el metal expuesto a una llama se hace incidir en un depósito óptico la radiación emitida por el metal, se separa de la luz solar. Cada metal emisor de radiación de distinto color, presenta líneas que aparecen en diferentes posiciones en la pantalla o campo de observación, y esto ocurre independientemente de las condiciones en que se realiza el experimento, de la naturaleza de la sal metálica y únicamente está relacionado con el metal generador del catión que forma parte de la sal. Además, la intensidad de la línea está directamente relacionada a la concentración del elemento en solución. De esta manera se tiene una forma inequívoca para identificar el elemento (*por la posición de sus líneas*), así como para cuantificarlo (*por la intensidad de las líneas producidas*). Cada elemento responde a la excitación de una radiación de longitud de onda muy específica ya que solo este elemento absorbe o emite tal tipo de radiación, porque ésta corresponde a la diferencia en energía entre dos niveles particulares de ese átomo. Brevemente, la técnica de *absorción atómica en llama* consiste en el procedimiento, esquematizado en la **Figuras I.22 y I.23**, la muestra en forma líquida es aspirada a través de un tubo capilar y conducida a un nebulizador donde se forman pequeñas gotas de líquido. Las gotas formadas son conducidas a una llama, donde ocurre una serie de eventos (**Figura I.23**) que culmina con la reducción de los cationes metálicos al estado elemental atómico. (González, Hernández A, 2010) Finalmente se tiene un vapor de átomos que es capaz de absorber radiación de longitudes de onda definidas. La señal de la lámpara una vez que pasa por la llama llega a un monocromador,

que tiene como finalidad discriminar todas las señales que acompañan a la línea de interés. Esta señal de radiación electromagnética llega al detector y pasa al amplificador y por último al sistema de lectura.

Para el análisis cuantitativo por EAA se prepara una serie de soluciones patrones de concentración exactamente conocida y se construye una curva de calibración y en base a esta gráfica se determina la concentración en las soluciones problema.



**Figura I.22.** Componentes de un espectrofotómetro de absorción atómica.

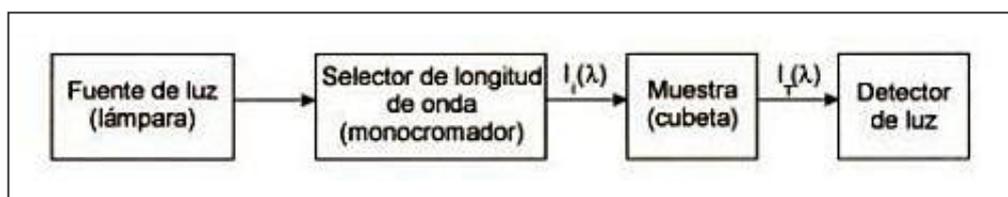


**Figura I.23.** Secuencia de eventos que se llevan a cabo en un quemador.

## 2.2. Espectrofotetría ultravioleta-visible

Es un método óptico de análisis, que tiene como principio de medición la absorción y/o la transmisión de la energía radiante emitida por una fuente de luz, que atraviesa una sustancia. El método es espectroscópico porque existe intercambio de energía entre la radiación electromagnética y la materia. La región del espectro electromagnético que aplica es la ultravioleta-visible (UV-VIS) que va desde 10 nm hasta 780 nm. En cuanto a la región ultravioleta, es necesario indicar que la zona de mayor interés en la práctica analítica ordinaria es la denominada *ultravioleta cercano* (longitud de onda entre 200 y 400 nm), pues el *ultravioleta lejano o ultravioleta de vacío* (de 10 a 200 nm) presenta el inconveniente de que absorbe oxígeno atmosférico en esa región, siendo necesario eliminarlo del instrumento de medida. Debido a ello, la espectrofotetría en esa región espectral no se ha desarrollado suficientemente.

Básicamente un espectrofotómetro UV-VIS tiene una configuración como la que se muestra en la **Figura I.24**.

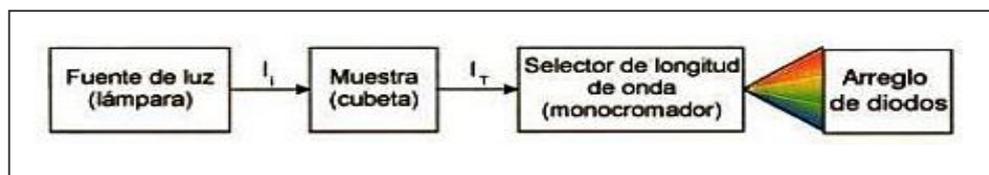


**Figura I.24.** Esquema de bloques de un espectrofotómetro convencional.

La fuente de luz es una lámpara o combinación de lámparas que tienen un espectro de emisión prácticamente continuo entre 190 y 1000 nm. Habitualmente se usa una combinación de lámparas de deuterio y tungsteno. El deuterio permite la excitación en la región del UV y el tungsteno, por encima de 350 nm. El selector de longitudes de onda de excitación se llama monocromador y contiene un elemento que permite separar y direccionar sobre la muestra un intervalo estrecho de longitudes de onda. Se encuentra montado sobre un soporte que se mueve con un motor y al cambiar de orientación cambia la longitud de onda de la luz que emite. Luego del monocromador, la luz incide sobre la muestra. Esta se coloca en un recipiente llamado cubeta que tiene la particularidad de tener al menos dos caras paralelas, de plástico, de vidrio o de cuarzo, pulidas de forma tal que no haya efectos ópticos indeseables. La

intensidad de la luz transmitida se mide con un detector que convierte el número de fotones que inciden sobre él durante un intervalo de tiempo en una señal eléctrica.

Existe otro tipo de espectrofotómetros, los llamados de arreglo de diodos (**Figura I.25**), en los cuales toda la luz (luz policromática) incide sobre la muestra. Luego, un monocromador discrimina la luz transmitida y cada longitud de onda es detectada por un microdetector (diodo) diferente. Estos microdetectores se colocan en un arreglo fijo que habitualmente contiene una línea de 1024 detectores. (Aldabe S. y col., 2004)



**Figura I.25.** Esquema de bloques de un espectrofotómetro de arreglos de diodos.

### 3. Técnicas de caracterización de superficies metálicas

Las superficies desempeñan un papel muy importante en la Ciencia de los Materiales. Dadas las diferencias fundamentales que existen en el comportamiento de los materiales sólidos en volumen respecto de las superficies de los mismos, es necesario estudiar separadamente los materiales en sus superficies. Se denomina *superficie* a la región del sólido cuya estructura y composición, influenciada por la interfase, difieren de la estructura y composición del seno del mismo.

El auge de este tipo de estudios ha dado lugar a la denominada *Ciencia de Superficies*. Las técnicas de caracterización de superficies han tenido en los últimos diez años un desarrollo extraordinario y, de hecho, hay más de medio centenar de diferentes técnicas experimentales para estudiar las características superficiales. Varios de los diferentes métodos de estudio son no destructivos y permiten mantener las superficies intactas después de la medida. (González Viñas W y Mancini HL, 2003) Las superficies pueden ser estudiadas a nivel macro, micro y nanoscópico.

Dentro de las técnicas de caracterización de superficies metálicas, se encuentra la *microscopía*. Se utilizan el *microscopio óptico* y el *electrónico*,

que suelen llevar acoplado un equipo fotográfico, para obtener imágenes de mediana y alta resolución. La *espectroscopía fotoelectrónica de rayos X* también es considerada una técnica de caracterización superficial por proporcionar información de tan sólo a unas pocas capas atómicas de la superficie del material. Esta técnica provee información complementaria a las dos anteriores ya que permite obtener datos sobre la composición química y la estructura de enlaces de la superficie analizada.

La técnica a emplear para analizar una superficie depende de los aspectos que se desean conocer.

¿Qué aspectos se desean conocer?	¿Cómo se encuentran?
<b>Apariencia de la muestra</b>	
• A escala macroscópica	Microscopio óptico
• A escala microscópica	Microscopio electrónico de barrido (SEM scanning electron microscopy)
• A escala nanoscópica	Microscopio de efecto túnel (STM, scanning tunneling microscopy) Microscopio de fuerzas atómicas (AFM, atomic force microscopy)
• Resolución atómica	Microscopio de efecto túnel (STM)

¿Qué aspectos se desean conocer?	¿Cómo se encuentran?
<b>Composición de la muestra</b>	
• Composición elemental	Análisis por energía dispersiva de rayos x (EDAX, energy dispersive analysis of x-rays)
• Impurezas	Espectroscopía de electrones Auger (AES, Auger Electron Spectroscopy)
• Estados químicos	Espectroscopía fotoelectrónica de rayos x (XPS, x-ray photoelectron Spectroscopy)

Método	Principio	Profundidad analizada	Resolución espacial	Sensibilidad analítica
<b>SEM</b>	Emisión de electrones secundarios inducidos por un haz de electrones	100 nm	40 Å	cualitativa
<b>STM</b>	Medida de la corriente túnel entre una punta y una muestra conductora		1 Å	átomos
<b>AFM</b>	Medida de la fuerza de repulsión entre una punta y la muestra			
<b>XPS</b>	Radiación x induce la emisión de electrones de energía característica	10 -250 Å	10 –150 µm	monocapas
<b>AES</b>	Un haz de electrones estimula la emisión de electrones Auger	50 – 100 Å	100 Å	submonocapas

A continuación se describen brevemente las técnicas *microscopía óptica*, *microscopía electrónica de barrido* y *espectroscopía fotoelectrónica de rayos x*, empleadas en este trabajo de tesis doctoral.

### **3.1. Microscopía óptica**

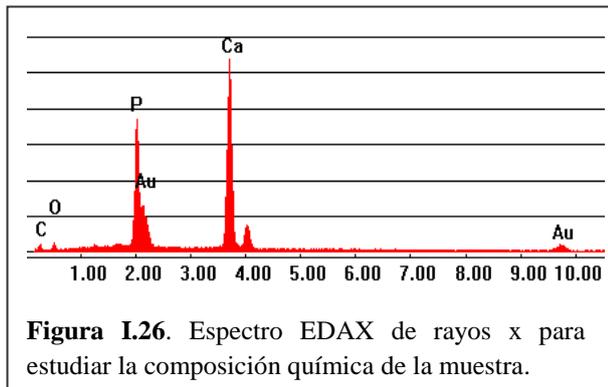
El microscopio óptico (MO) utiliza la luz para estudiar la superficie a escala macroscópica. Los principales elementos del equipamiento son los sistemas ópticos y de iluminación. En aquellos materiales que son opacos a la luz visible, como es el caso de todos los metales, sólo es susceptible de ser observada la superficie, y la luz del microscopio se debe usar en reflexión. El límite de aumentos logrados por el MO es de aproximadamente 2000 veces. Algunos elementos estructurales son demasiados finos o pequeños para su observación mediante microscopía óptica. En estas circunstancias se utiliza el microscopio electrónico, capaz de alcanzar aumentos mucho mayores. (*Callister WD, 1995*)

### **3.2. Microscopía electrónica de barrido**

Con el microscopio electrónico la imagen de la estructura investigada se genera utilizando un haz de electrones en lugar de radiación lumínica. De acuerdo con la mecánica cuántica, un electrón de elevada velocidad actúa como una onda, de longitud de onda inversamente proporcional a su velocidad. Los microscopios electrónicos tienen grandes aumentos y elevado poder resolutivo como consecuencia de la corta longitud de onda del haz de electrones. Lentes magnéticas focalizan el haz de electrones y forman la imagen. El microscopio electrónico de barrido (SEM) es un tipo de microscopio electrónico. (*Callister WD, 1995*) Las principales ventajas del SEM con respecto al MO son, el gran poder resolutivo, la gama de aumentos disponibles que oscilan entre 100 y 450000 y la posibilidad de observar el campo que se ha de estudiar en las tres dimensiones. (*Morral FR y col., 1985*)

Un instrumento que se ha desarrollado para el análisis de muestras a través del SEM es el analizador EDAX (*espectrómetro de energía de dispersión*) de rayos x el cual identifica la distribución cuali y cuantitativa de elementos químicos que se encuentran presentes en la muestra, mostrando

histogramas e imágenes relacionadas con esa distribución (**Figura I.26**). Identifica y evalúa el contenido de elementos químicos desde el carbono al uranio en superficies planas o secciones finas de las muestras en todo tipo de material biológico e inerte. El espectro EDAX se obtiene mediante un software que recoge durante un determinado tiempo

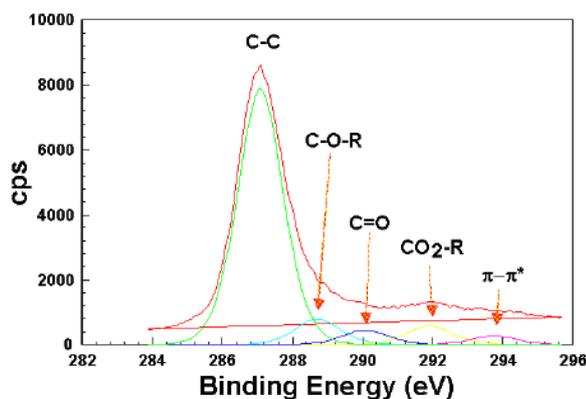


**Figura I.26.** Espectro EDAX de rayos x para estudiar la composición química de la muestra.

(minutos) los fotones emitidos por la muestra, clasificándolos según su energía. El espectro se presenta como un gráfico en el cual la abscisa tiene unidades de energía (Kiloelectrovolt) y la ordenada el número de cuentas o intensidad. En el espectro se realiza de forma automática el análisis cuali y cuantitativo de los diferentes elementos a través de las señales (picos) observadas en el gráfico. En una muestra se eligen varios sitios de interés para ver si toda la muestra contiene los mismos elementos o hay variación de estos en 1 cm<sup>2</sup>. Una vez obtenido el espectro, se identifican los elementos en los picos del histograma espectral de un punto elegido de la muestra. Cada elemento presenta una distribución definida en la que se determina la composición de la superficie de las muestra de forma precisa. (Poblete V y col., 2001)

### 3.3. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos x

La técnica de espectroscopía fotoelectrónica de rayos x (XPS) se basa en la medición de las energías cinéticas de los electrones provenientes de los átomos ubicados en la superficie de las muestras metálicas que han sido eyectados de los mismos



**Figura I.27.** Espectro XPS en la región correspondiente al carbono

por la acción de un haz de rayos x que incidió sobre la muestra. Esta técnica, además de brindar información inmediata sobre la estructura electrónica de los

átomos de la superficie, permite conocer el estado de combinación química de los mismos porque la energía de los fotoelectrones cambia de acuerdo al estado de oxidación del elemento. (Albella JM, 2003) Presenta una elevada sensibilidad química y analítica superficial, por lo que resulta de gran utilidad en la investigación de numerosos fenómenos superficiales como corrosión, adhesión, adsorción, etc. (Vázquez Vaamonde AJ y De Damborenea González JJ, 2001) El resultado de la medida se presenta como un espectro XPS (**Figura I.27**, para la región correspondiente al carbono, (—) : baja resolución; (—, —, —, —, —): alta resolución). Los espectros XPS presentan picos característicos para cada elemento encontrado en la superficie de la muestra metálica. Existen publicadas tablas con los valores de energía de enlace (binding energy, BE) ya asignados a cada elemento en el estado de oxidación en que se encuentre. (Wagner CD y col., 1979)

#### **4. Estudio de la pureza**

Una de las alternativas para reducir la velocidad de corrosión de los biomateriales dentales metálicos es el uso de sustancias orgánicas denominadas inhibidores de corrosión que pueden ser agregados al medio corrosivo o usados para modificar la superficie del biomaterial. Los inhibidores de corrosión orgánicos, como otros compuestos orgánicos pueden presentar diferentes grados de pureza. Una de las técnicas capaces de determinar dicha característica, es la cromatografía en fase gaseosa.

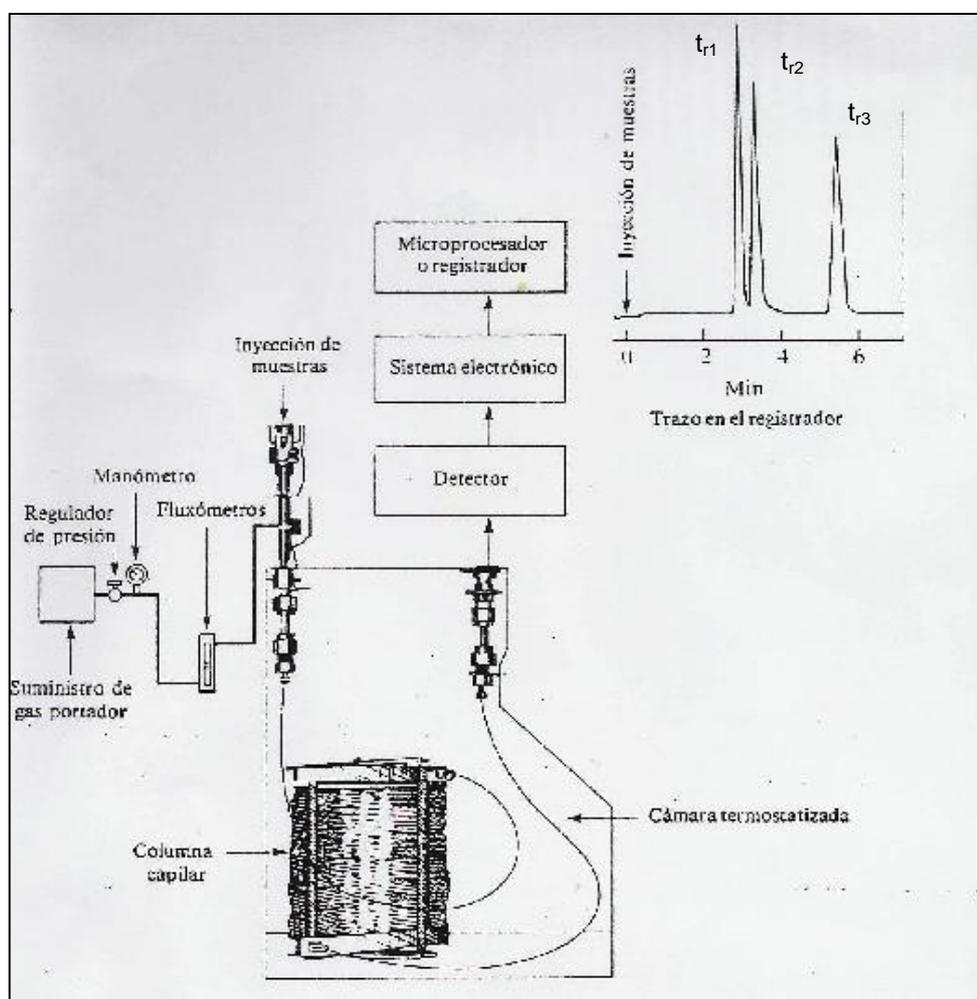
##### **4.1. Cromatografía gaseosa**

La cromatografía es una técnica física de separación de los componentes de una mezcla de compuestos, que también permite identificar y determinar las cantidades en que se encuentran presentes los componentes en la mezcla estudiada. Existen diferentes técnicas cromatográficas, pero en todas ellas hay una fase móvil que consiste en un fluido (gas, líquido o fluido supercrítico) que arrastra a la muestra a través de una fase estacionaria que se trata de un sólido o un líquido fijado sobre un soporte sólido inerte. De acuerdo con su naturaleza, los componentes de la mezcla interaccionan en distinta forma con la fase estacionaria. De este modo, los componentes atraviesan la

fase estacionaria “arrastrados” por la fase móvil a distintas velocidades y se van separando. Después que los componentes han pasado por la fase estacionaria y se separan, pasan por un detector que genera una señal que depende del tipo de compuesto y de su concentración en la mezcla que luego pasa por un sistema electrónico y va a un procesador de datos o registrador (**Figura I.28**). Un *cromatograma* es el registro gráfico del análisis cromatográfico, e indica la respuesta del detector en función del tiempo transcurrido desde la inyección de la muestra ( $t = 0$ ). El análisis del cromatograma permite averiguar el número de componentes de la muestra y la concentración en que estaban presentes. La cromatografía en fase gaseosa (CG) es de utilidad para compuestos termoestables y volátiles. Existen dos tipos de cromatografía gaseosa (CG): la cromatografía gas-sólido (CGS) y la cromatografía gas-líquido (CGL), siendo esta última la que se utiliza más ampliamente, y que se puede llamar simplemente cromatografía gaseosa (CG). La CGL tiene dos importantes campos de aplicación. Por una parte su capacidad *preparativa* para separar los componentes de mezclas, por ejemplo separar las impurezas presentes en una muestra. Su otra aplicación, *analítica*, es como método para determinar cuali y cuantitativamente los componentes de la muestra. Para el análisis cuantitativo, se integran las áreas debajo de la curva (pico o señal) correspondiente a cada uno de los compuestos separados, con las curvas de calibración adecuadas (área bajo el pico vs. concentración de soluciones patrones especialmente preparadas y de concentración exactamente conocida), y se obtiene la concentración o cantidad presente de cada analito. Sin embargo, esta técnica para los fines cualitativos es limitada.

La identificación de los componentes que forman parte de una mezcla compleja, particularmente si se encuentran en muy bajas concentraciones, es una tarea de enorme complejidad. Las técnicas cromatográficas ofrecen excelentes posibilidades de separación, pero tienen la limitación de que no identifican los compuestos que ya han sido separados. Como solución al problema de identificar los diferentes componentes de una mezcla ha adquirido gran importancia el acoplamiento entre un cromatógrafo y una técnica de carácter cualitativo capaz de identificar los compuestos que eluyen de una columna cromatográfica. El acoplamiento de un cromatógrafo gaseoso con un espectrómetro de masas (CG-EM) es, probablemente, la técnica combinada de

más amplia utilización ya que reúne la enorme capacidad de separación que ofrece el cromatógrafo con la sensibilidad y capacidad de aportar información estructural del espectrómetro. La espectrometría de masas se basa en la obtención de iones a partir de las moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo con su relación masa/carga ( $m/z$ ), y finalmente se detectan por medio de un dispositivo adecuado. Los cromatogramas obtenidos de la CG-EM se utilizan a menudo como criterios de pureza de diversos compuestos. Las impurezas presentes, se manifiestan por la aparición de picos adicionales; las áreas de estos picos permiten estimar la pureza del compuesto estudiado.



**Figura I.28.** Diagrama de un cromatógrafo de gases. El gas portador inerte se desplaza a través de la columna cromatográfica. La mezcla de compuestos a separar que se inyecta en la cabeza de la columna, los compuestos se separan en la columna y se detectan a medida que el gas de salida pasa por un detector. (Mirífico MV y col., 2012)

## **5. Estudios de biocompatibilidad**

Todo material metálico que sea colocado en la cavidad bucal debe provocar una apropiada reacción biológica. Previo a los estudios en animales y finalmente en seres humanos, es indispensable la realización de estudios *in vitro*, ya que estos aportan información sobre el tipo de respuesta que se podría esperar al utilizar el biomaterial. Los estudios *in vitro* mediante los cultivos celulares son ideales para la observación y el análisis de la influencia de los biomateriales metálicos en el comportamiento celular respecto a su citotoxicidad y genotoxicidad.

### **5.1. Ensayos de citotoxicidad**

Los ensayos de citotoxicidad de los biomateriales dentales metálicos, así como también, de los compuestos orgánicos utilizados como potenciales inhibidores de corrosión, pueden llevarse a cabo sobre distintas líneas celulares de mamíferos; entre ellas, merece destacarse, la utilización de células osteoblásticas en ensayos de rutina para evaluar la biocompatibilidad de varios materiales dentales. (*García Contreras R y col., 2010*)

Entre los posibles ensayos para evaluar los efectos citotóxicos de distintos biomateriales se encuentran, ensayos de viabilidad celular y de formación de colonias o clonogénico.

#### **5.1.1. Formación de colonias o de sobrevida clonogénico**

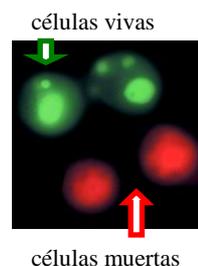
Esta prueba es un ensayo *in vitro* de sobrevida celular basado en la habilidad de las células para dividirse y formar colonias, luego de haber sido expuestas a un determinado tratamiento, compuesto o biomaterial. (*Franken NA y col., 2006*)

#### **5.1.2. Viabilidad celular**

##### **5.1.2.1. Mediante la metodología fluorescente de naranja de acridina**

Este ensayo se basa en la tinción selectiva y diferencial de los ácidos nucleicos por parte del fluorocromo naranja de acridina. Este colorante, capaz de permear las células vivas, se intercala en el ADN generando una

coloración verde fluorescente a nivel de la cromatina, y naranja cuando se intercala en el ARN a nivel citoplasmático. (Escobar Mármol L., 2011) La absorción de luz del naranja de acridina (NA) es máxima a 500 nm y emite una fluorescencia de color verde (520 nm).



### 5.1.2.2. Mediante la absorción de rojo neutro

Este ensayo se basa en la detección de los daños que producen los compuestos tóxicos sobre la integridad del sistema endomembranoso celular. Como respuesta al daño celular se observa una disminución de la capacidad de las células para retener el colorante rojo neutro (RN) en el interior de los lisosomas, la cual es indicadora de la viabilidad celular. Es una de las pruebas citotóxicas más utilizadas para aplicaciones biomédicas y ambientales. (Uribe Hernández R., 2008)

## 5.2. Ensayos de genotoxicidad

Las pruebas de genotoxicidad son aquellas diseñadas para detectar compuestos que induzcan daño directo o indirecto en la molécula de ADN y/o en la maquinaria que interviene en la fidelidad del genoma. Para poder aceptar o rechazar el efecto adverso inducido por un determinado compuesto, se estudian marcadores biológicos o biomarcadores. Entre ellos, se pueden considerar las aberraciones cromosómicas (alteraciones en el número o en la estructura de los cromosomas), el índice mitótico (número de células por unidad (normalmente 1.000) que sufren mitosis durante un determinado período de tiempo), etc.. (Albertini RJ y col., 2000)

### 5.2.2. Índice mitótico

El *índice mitótico* (IM) es una medida para el estado de la proliferación de una población de células. Es definido como el cociente entre el número de núcleos en mitosis y el número total de núcleos (**ec. I.4**).

$$\text{IM\%} = \left[ \frac{\text{N}^\circ \text{ de núcleos en mitosis}}{\text{Total de núcleos observados}} \times 100 \right] \quad (\text{ec. I.4})$$

### 5.2.3. Aberraciones cromosómicas estructurales

Las *aberraciones cromosómicas* son alteraciones en la estructura de los cromosomas resultantes de un cambio o interrupción del material cromosómico. La mayor parte de ellas son letales para las células, y otras pueden causar efectos genéticos, somáticos o hereditarios (*Swierenga SH y col., 1991*); existen dos tipos de aberraciones las de *tipo numérico* y las de *tipo estructural* (*Lloyd D y col., 1975*). Las alteraciones cromosómicas estructurales son aquellas en las que el exceso o déficit de material se debe a reordenamientos de los cromosomas o de alteraciones cromosómicas (*Curtis H y col., 2008*). Existen diferentes tipos de aberraciones cromosómicas estructurales: gap o brecha intersticial (lesión acromátida), fractura monocromátida, fractura isocromátida, dicéntricos, anillos, fragmentos, lesión tipo intercambio, entre otras. (*Swierenga SH y col., 1991*)



# Hipótesis y Objetivos

## 1. HIPÓTESIS

Los inhibidores orgánicos de la corrosión aumentan la estabilidad de los biomateriales dentales metálicos en la cavidad oral.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. *Objetivo general*

Estudiar la estabilidad y citotoxicidad de los biomateriales dentales metálicos, en medio biológicos simulados, en presencia de nuevos inhibidores orgánicos de la corrosión y comparar los resultados con los obtenidos en ausencia de los mismos. Se pretende mejorar las propiedades de los biomateriales dentales metálicos que redundarían en una mayor biocompatibilidad de los materiales y por lo tanto en una mejor calidad de vida del ser humano.

### 2.2. *Objetivos específicos*

- 2.2.1. Evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad de los compuestos orgánicos a ensayar como protectores de los biomateriales dentales metálicos frente a la corrosión en un medio oral simulado.
- 2.2.2. Investigar la corrosión que sufren los biomateriales dentales metálicos en ausencia y en presencia de compuestos orgánicos tales como heterociclos derivados de 1,2,5-tiadiazol, dimetilsulfóxido (DMSO), enjuague bucal a base de digluconato de clorhexidina y xilitol, entre otros, por considerarse con propiedades adecuadas para actuar como inhibidores de la corrosión. Comparar los resultados obtenidos en ambas condiciones experimentales, empleando técnicas electroquímicas y espectroscópicas.
- 2.2.3. Caracterizar física y químicamente la superficie de los biomateriales dentales metálicos, habiendo sido o no tratados con los compuestos orgánicos potenciales inhibidores de la corrosión, utilizando técnicas de microscopía y espectroscopía.

- 2.2.4. Evaluar la respuesta biológica (biocompatibilidad y citotoxicidad) de los biomateriales dentales metálicos con y sin tratamiento con los compuestos orgánicos ensayados, con modelos experimentales *in vitro* utilizando líneas celulares.

La evaluación de las características físicas, químicas y biológicas de los biomateriales dentales metálicos, sin o con tratamiento con los potenciales inhibidores de la corrosión, realizando ensayos de laboratorio previo a su uso en la práctica clínica, permitirá conocer su resistencia a la corrosión y consecuente liberación de iones, así como también su biocompatibilidad. Los potenciales inhibidores de la corrosión podrían utilizarse en un futuro para disminuir o inhibir el biodeterioro de los materiales metálicos de uso odontológico, responsable de generar reacciones adversas en el organismo y fallas en el producto médico.



Experimental

## SECCIÓN A

### **ESTUDIO DE BIOCOMPATIBILIDAD EN BIOMATERIALES DENTALES METÁLICOS**

#### **1. ALEACIÓN BASE COBRE**

Se estudió el proceso de corrosión de una aleación base cobre de uso odontológico y se comparó el comportamiento con el de su principal componente, el cobre. Para la investigación se emplearon técnicas electroquímicas convencionales, técnicas espectroscópicas (microscopía electrónica de barrido, microscopía de energía dispersiva de rayos x, y espectroscopía de absorción atómica) y microscopía óptica. Se investigó el efecto citotóxico de los iones liberados al medio agresivo como consecuencia de la corrosión del metal empleando diferentes ensayos de biocompatibilidad (formación de colonias y de viabilidad celular). Para los ensayos de citotoxicidad, se consideró que el medio altamente tóxico provocado por la liberación de iones metálicos, es un área apropiada para dilucidar las causas de los diferentes comportamientos celulares en relación con *a)* los iones liberados por parte de una muestra metálica inmersa en el medio de cultivo (*in situ*) y *b)* la presencia de sales en concentraciones equivalentes a la de los iones metálicos liberados, *c)* así como también la variación del efecto citotóxico en relación a la distancia entre las células y la fuente de iones.

**Sustratos metálicos. Aleación.** Aleación base cobre Ventura Orcast PLUS<sup>®</sup> (Macrodent S.A., Buenos Aires, Argentina) (ABCu) de composición (% p/p): Cu 81,5; Al 7,0; Ni 4,5; Fe 3,0; Mn 2,0; Zn 2,0. Para los diferentes ensayos se utilizaron muestras de ABCu fundida de distintas formas: lámina, disco, y barra. En todos los casos las muestras se obtuvieron siguiendo la técnica del colado por la cera perdida (Macchi R.L., 2000), para lo cual se realizaron patrones de cera con la forma adecuada para cada propósito. **Cobre.** Cobre electrolítico comercial, de pureza 99,99%.

**Sales metálicas.** Se utilizaron las sales metálicas de los elementos que componen la aleación ABCu: cloruro cuproso hexahidratado ( $\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ), cloruro de níquel II hexahidrato ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), cloruro ferroso hexahidrato ( $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), cloruro de manganeso II tetrahidratado ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) y cloruro de cinc ( $\text{ZnCl}_2$ ), de Merck Chemical Co. (Darmstadt, Alemania). Previo a la preparación de las soluciones de sales, las mismas se secaron siguiendo las instrucciones dadas en el libro de Perrin y Armarego (*Perrin DD y Armarego WLF, 1988*) en estufa (marca Heraeus, modelo RVT 360) a presión reducida hasta peso constante y se almacenaron en un desecador (a presión reducida y temperatura ambiente) hasta su inmediato uso posterior.

**Cultivo celular.** Para los ensayos de citotoxicidad se utilizó la línea celular derivada de osteosarcoma de rata (línea UMR 106) que se obtuvo originalmente del Banco Americano de Células (ATCC, Rockville, MD, USA). Las células se sembraron y crecieron en frascos para cultivo en monocapa (tipo Falcon<sup>®</sup> T-25) conteniendo 10 ml de medio de cultivo D-MEM (MCC) (GIBCO-BRL, Los Ángeles, USA) enriquecido con 10% de suero fetal bovino inactivado (Natocor, Carlos Paz, Córdoba, Argentina), 50 IU/ml de penicilina y 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomina (medio de cultivo completo). Las células se mantuvieron en incubadoras a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5%  $\text{CO}_2$ . Para el recuento de células se utilizó una cámara hemocitométrica de Neubauer y la viabilidad se determinó por la prueba de exclusión del colorante azul tripán (Sigma, St. Louis, MO, USA).

**Medios corrosivos.** Se usó el medio de cultivo celular D-MEM enriquecido (MCC) (pH 7,0) y la saliva sintética de Fusayama modificada III (*Fernández Lorenzo de Mele M y Duffó G, 2002*) (SS) (pH 4,77), compuesta por (g/L): NaCl 0,40; KCl 0,40;  $\text{CaCl}_2$  0,80;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,16; urea 1,00; KSCN 0,16. En este trabajo de tesis doctoral se decidió modificar la concentración de KSCN de la fórmula original (0,3 g/L) por la concentración real presente en la saliva (0,16 g/L) según Tsuge y colaboradores (*Tsuge K y col., 2000*). Los

componentes de la SS fueron Anedra (Research AG, S.A., BA, Argentina) grado analítico. Previo a la preparación de SS, las sales se secaron según *Perrin DD y Armarego WLF, 1988*.

**Técnicas empleadas.** Se evaluó el proceso de corrosión empleando técnicas electroquímicas (curvas de polarización potenciodinámica lineal y cíclica, y medidas de potencial a circuito abierto), microscopía óptica (MO) y análisis de energía dispersiva de rayos x (EDAX), mientras que la concentración de iones liberados se midió por espectrofotometría de absorción atómica (EAA). El efecto citotóxico se estudió sobre células osteoblásticas llevando a cabo ensayos de formación de colonias y de viabilidad celular.

**Preparación de los sustratos metálicos.** Para las experiencias de EAA se usaron láminas de ABCu de 49 cm<sup>2</sup> de área geométrica. Para los ensayos electroquímicos se construyeron electrodos con barras cilíndricas de cobre y de ABCu de 40 mm de largo x 4 mm de diámetro, soldadas a un alambre de cobre y encapsuladas en Teflón dejando un área geométrica circular expuesta de 0,1256 cm<sup>2</sup>. Para los análisis de MO se utilizaron electrodos de ABCu, mientras que para los ensayos EDAX se utilizaron discos de ABCu de 0,5 cm de diámetro x 0,1 cm de altura, con un área de exposición de 0,35 cm<sup>2</sup>. En los ensayos de citotoxicidad se emplearon discos de ABCu de 0,4 cm de diámetro x 0,1 cm de altura, con un área de exposición de 0,28 cm<sup>2</sup>.

Antes de cada ensayo las muestras de ABCu (electrodos, láminas y discos) se desbastaron manualmente con papel de lija de carburo de silicio de granulometría decreciente (electrodos y discos: 600, 1000 y 2500; láminas: 80, 220, 800 y 1200) humedecida con agua. Luego se sometieron a un pulido y limpieza secuencial con el objetivo de obtener una superficie lisa a espejo: pulido con pasta de diamante (electrodos y discos: 3 μm; láminas: 6 μm) y alúmina (electrodos y discos: 1,0 μm; 0,5 μm y 0,3 μm; láminas: 1,0 μm y 0,3 μm), lavado con agua, desengrasado con diclorometano (Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), lavado ultrasónico final con agua y secado (electrodos y discos: con nitrógeno seco;

láminas: con aire tibio). Se usaron inmediatamente después de la preparación de la superficie metálica.

Para la preparación de todas las soluciones, SS, MCC y para limpieza, lavado y otros procedimientos se usó agua bidestilada y desionizada por el sistema Milli Pore-MilliQ.

**Temperatura de trabajo.** Todas las experiencias se llevaron a cabo a  $37 \pm 2$  °C.

## 1.1. Ensayos de corrosión

### 1.1.1. Curvas de polarización potenciodinámica

Se utilizó una celda convencional de vidrio Pyrex, con doble camisa, de un compartimiento con tres electrodos, usando un potencióstato/galvanostato EG&G-PAR modelo 2734A conectado a una computadora personal o a un registrador (Houston X-Y Recorder). La celda electroquímica se termostató empleando un termostato marca Lauda. Como electrodo de trabajo (ET) se usaron las muestras de ABCu o de cobre descritas más arriba. Como contraelectrodo (CE) se utilizó una chapa de platino de gran área superficial ( $2 \text{ cm}^2$ ) y como referencia (ER) un electrodo de calomel saturado (ECS) colocado a través de un capilar Lugging. El ECS se verificó a diario contra un electrodo calomel saturado comercial para asegurar la confiabilidad de los experimentos. En este trabajo todos los potenciales están referidos al ECS.

Las medidas potenciodinámicas se realizaron en los electrolitos SS (20 mL) o en MCC (20 mL), ambos desaireados con nitrógeno inmediatamente antes de las medidas.

Con el objetivo de investigar el proceso de disolución de la ABCu en condiciones similares al medio ambiente bucal, se investigaron regiones de potencial cercanas al potencial a circuito abierto ( $\text{PCA} \pm \text{ca. } 300 \text{ mV}$ ). Las curvas de polarización para los electrodos de cobre y ABCu inmersos en SS o en MCC se midieron siguiendo un procedimiento convencional. Los registros

potenciodinámicos se llevaron a cabo a una velocidad de barrido de potencial (v) de  $5 \text{ mVs}^{-1}$ , comenzando en  $-580 \text{ mV}$  en dirección anódica hasta alcanzar  $+50 \text{ mV}$ . Antes de cada medida, el ET se sometió a una reducción catódica manteniéndose potencioestáticamente a  $-580 \text{ mV}$  durante 60s, para reducir la posible película de óxido formada en el aire durante el manejo del ET. La polarización se inició después de un tiempo (5 min) de inmersión del ET en el medio electrolítico. El límite catódico seleccionado fue también adecuado para detectar el posible efecto de especies conteniendo azufre (*Protopopoff E y Marcus P, 2003*).

Para investigar el efecto del tiempo de inmersión sobre el proceso de disolución, previo a los experimentos potenciodinámicos, los electrodos permanecieron inmersos en el medio electrolítico en reposo (MCC o SS) durante períodos entre 30 min y 1440 min.

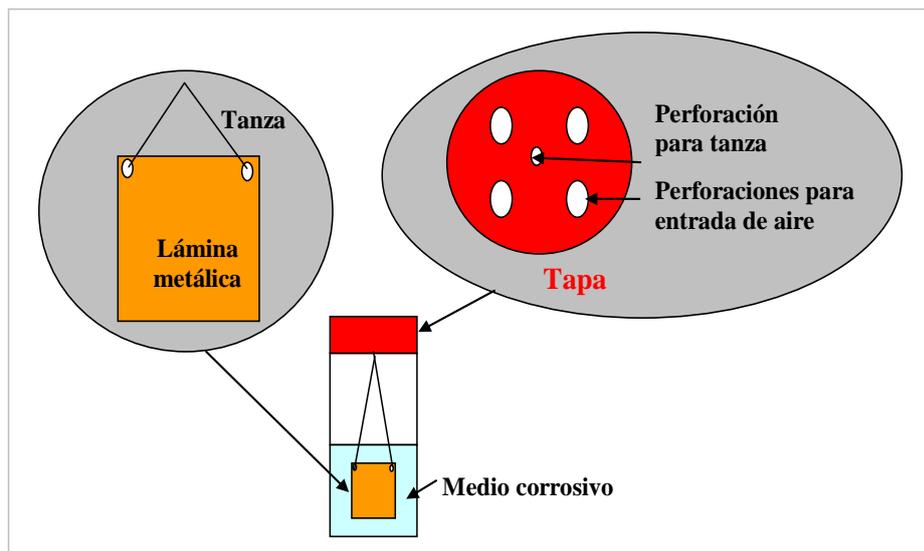
Todos los experimentos electroquímicos se realizaron por triplicado.

### **1.1.2. Análisis superficial**

Para llevar a cabo el análisis superficial se utilizó un microscopio óptico (Olympus Bx51, Olympus Corp., Tokio, Japón) conectado a una cámara digital (Olympus DP71, Olympus Corp., Tokio, Japón) y un espectrómetro de energía dispersiva de rayos x (Philips 505 SEM; Sistema de captura de imagen ADDA II, unidad de detección EDAX, UTW). Los discos de ABCu, una vez preparados como se describió más arriba, se analizaron tanto con el microscopio como con el espectrofotómetro, antes y después de ser inmersos durante 10 días en SS (estéril, en reposo y a  $\text{pH} = 4,7$ ) dentro de una estufa de cultivo a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Pasado este período de inmersión de 10 días, los discos se extrajeron y se lavaron con abundante agua, se secaron con nitrógeno seco y se montaron en el microscopio o espectrómetro sin ningún otro tratamiento.

### **1.1.3. Determinación de los iones liberados por ABCu al medio agresivo**

Las láminas de ABCu fueron inmersas durante 24 h en SS (200 mL), (en reposo y a pH = 4,7) suspendidas con un hilo de nylon sin que toquen las paredes del recipiente contenedor (**Figura III.1**); la temperatura se mantuvo a 37 °C dentro de una estufa de cultivo (marca Faeta S.A). Se eligió una SS con bajo pH con el objetivo de simular la condición de agresividad del pH relacionado con la fermentación de los azúcares de la dieta, productos metabólicos de la placa dental (*Ardlin BI y col., 2009*), etc. Pasado el período de inmersión (24 h), se midió la concentración de los iones metálicos en el medio SS (CP24h) por EAA empleando un espectrofotómetro VARIAN modelo SpectrAA55 (número de serie EL99043438). Las condiciones experimentales (gran área de la lámina de metal, volumen de medio agresivo y largo período de exposición) se seleccionaron con el objetivo de detectar



**Figura III.1.** Esquema del dispositivo usado para el análisis de los iones liberados al medio corrosivo por EAA.

niveles de concentración, de los iones analizados, mayores que sus límites de detección dados por la sensibilidad del equipo usado para las medidas. Cada ensayo se realizó por triplicado en experiencias independientes.

## 1.2. Ensayos de citotoxicidad

Se investigó el efecto citotóxico de los iones liberados por muestras de ABCu y de sales metálicas. La adición de las sales metálicas permitió

estudiar el efecto de los iones individuales, así como también combinaciones de dos iones y la mezcla de todos los iones que componen la aleación con el objetivo de analizar posibles efectos sinérgicos.

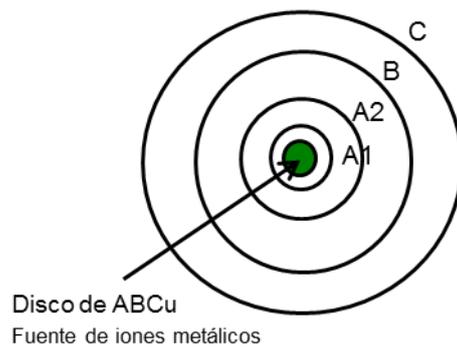
**1.2.1. Efecto de los iones metálicos liberados: ensayo de viabilidad**

El efecto celular de los iones liberados por la ABCu se determinó por tinción con naranja de acridina (NA). Para este análisis se sembraron  $4,5 \times 10^4$  células en cápsulas de Petri de 100 mm de diámetro y se cultivaron en medio D-MEM completo (pH 7). Las células se mantuvieron en incubadora a 37 °C, en una atmósfera húmeda en una estufa de cultivo gaseada (5% de CO<sub>2</sub>), durante 24 h. Al cumplirse este tiempo, se retiró el medio de cultivo, se colocó un disco de ABCu en el centro de cada cápsula e inmediatamente se adicionaron 10 ml de medio de cultivo. Las células crecieron bajo estas condiciones por diversos períodos de tiempo: 3, 24 y 48 h. Como control negativo se usó un cultivo celular sin disco de ABCu. (**Figura III.2**)



**Figura III.2.** Cultivo de células UMR106, expuestas a discos de ABCu durante diferentes tiempos (3 h, 24 h y 48 h), a 37°C.

Para facilitar el análisis del efecto citotóxico en función de la distancia desde la fuente de iones, el área con células se dividió en regiones concéntricas alrededor del disco metálico (**Figura III.3**): Región A, cercana al disco metálico (dividida en Sub-Regiones A1, A2), B y C (la más lejana). Los radios externos ( $r$ )



**Figura III.3.** Regiones alrededor del disco de ABCu.

de las regiones son:  $r_{A1} = 0,9$  cm;  $r_{A2} = 1,4$  cm;  $r_B = 2,4$  cm;  $r_{A2} = 3,4$  cm. Para el control, al considerarse el crecimiento homogéneo en toda la cápsula por

igual, el área con células no se dividió en zonas. Transcurridos los diferentes períodos de exposición, se retiraron los discos de aleación y el medio de cultivo. Posteriormente, los cultivos celulares se lavaron con una solución buffer fosfato (SBP) (Gibco, Gaithersburg, MD, USA), compuesta por (g/L): 8,18 NaCl; 0,22 KCl; 1,06  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$ ; 0,2  $\text{PO}_4\text{KH}_2$ . Luego, las células se tiñeron con 500  $\mu\text{L}$  del colorante NA (Sigma, St Louis, MO, USA) y se observaron con un fotomicroscopio de fluorescencia (*ver* Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1.1.2. *Análisis superficial*), con un aumento de 10x. Las células viables se identificaron por el color verde brillante. A partir de las imágenes fotográficas se realizó el conteo de las células teñidas por regiones (**Figura III.3**), a través del software Image J 1.42. Se contabilizaron un promedio de diez campos por región.

Se realizaron dos ensayos independientes por duplicado para cada punto experimental.

### **1.2.2. Efecto de los iones metálicos liberados: ensayo de formación de colonias celulares**

El efecto de los iones liberados por la ABCu sobre la distribución, número y tamaño de colonias celulares, se estudió mediante ensayos de formación de colonias o ensayo clonogénico. Para este análisis, las células se sembraron en una cápsula de Petri (100 mm de diámetro) en medio de cultivo completo y en presencia de un disco de ABCu en el centro de cada cápsula, en las condiciones detalladas en Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1.2.1. *Efecto de los iones metálicos liberados: ensayo de viabilidad*. Luego de 7 días de incubación, se retiraron los discos de aleación y el medio de cultivo. Posteriormente, los cultivos celulares se lavaron con solución tampón (SBP). Las colonias se fijaron con metanol absoluto:ácido acético glacial (3:1) y tiñeron con naranja de acridina (como se describe en Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1.2.1. *Efecto de los iones metálicos liberados: ensayo de viabilidad*). Posteriormente se llevó a cabo la observación con un fotomicroscopio de fluorescencia y un aumento de 10x. A partir de las imágenes fotográficas se determinó con el software Image J 1.42 el tamaño y número de colonias,

considerando colonias pequeñas (diámetro < 95  $\mu\text{m}$ ) y colonias grandes (diámetro > 95  $\mu\text{m}$ ) en cada una de las regiones concéntricas alrededor del disco.

Se realizaron dos ensayos independientes por duplicado para cada punto experimental.

### 1.2.3. Citotoxicidad de los iones metálicos: ensayo de rojo neutro

El efecto celular de los iones liberados por la ABCu se determinó por el ensayo de rojo neutro utilizando los iones metálicos en forma de sales disueltas en MCC. Los valores de concentración de los iones (valores CP8h) de las sales metálicas se prepararon a partir de los datos obtenidos del análisis de EAA (CP24h) descrito más arriba, asumiendo la disociación total de cada sal. Los valores CP8h se calcularon suponiendo la exposición de una muestra de 3  $\text{cm}^2$  de área geométrica a 1 mL de saliva sintética durante un período de 8 h (horas de sueño) y una relación lineal entre la concentración y el tiempo de inmersión y la concentración y el área expuesta. Se estudió el efecto de los iones individuales, así como también el de la combinación Al-Zn y de la mezcla de todos los iones en un intervalo de concentraciones de CP8h a CP8h x 60.

Para el ensayo de rojo neutro se sembraron en placas de 96 pozos  $2,7 \times 10^3$  células/pocillo y se cultivaron en medio D-MEM completo (pH 7). Las células se mantuvieron en las mismas condiciones que las descritas en Capítulo III, SECCIÓN A, inciso 1.2.1. *Efecto de los iones metálicos liberados: ensayo de viabilidad*, por un tiempo de 4 h. Transcurrido este tiempo, se removió el medio de cultivo por inversión de la placa de cultivo y se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de MCC conteniendo las diferentes concentraciones de iones metálicos. Después de 24 h, se removió el medio de cultivo y se adicionó MCC conteniendo 40  $\mu\text{g/mL}$  de colorante RN (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos). Luego de 3 h de incubación, las células se lavaron con SBP. El colorante se extrajo adicionando 0,1 mL de una solución acuosa de ácido acético 1% v/v en 50% de etanol v/v. Por último, se utilizó un espectrofotómetro para microplacas ELISA ( $\mu\text{Quant}$  BioTek, Estados Unidos)

para la medición de la absorbancia a 540 nm. Como control positivo se usó etanol (7% v/v). El porcentaje de citotoxicidad se calculó según la **ec. III.1**.

$$[(A-B) / A] \times 100 \quad (\text{ec. III.1})$$

donde  $A$  y  $B$  son las absorbancias del control negativo y de las células tratadas, respectivamente.

Cada ensayo se repitió en dos experiencias independientes, cada uno incluyó 16 pocillos (32 pocillos en total para cada concentración analizada).

#### **1.2.4. Análisis estadístico de los datos**

Los datos se analizaron usando la prueba de One-way-ANOVA y la de comparaciones múltiples; esta última se llevó a cabo realizando el ajuste de los valores  $p$  por el método de *Bonferroni*. (*Martín Andrés A y Luna del Castillo JD, 2004*) El análisis estadístico se realizó con el programa *Statistica 7.0*. (Statsoft, Inc., Tulsa, OK) Se consideró diferencia estadísticamente significativa a un  $p < 0,001$ .

## **SECCIÓN B**

# **CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS ENSAYADOS COMO PROTECTORES DE BIOMATERIALES DENTALES METÁLICOS CONTRA LA CORROSIÓN**

## **1. TDZ**

### **1.1. Determinación de la citotoxicidad y genotoxicidad**

Para que un compuesto orgánico pueda ser usado como inhibidor de la corrosión de biomateriales dentales metálicos, debe poseer baja toxicidad y no provocar reacciones adversas en el organismo y debe ser ecológicamente benigno (Capítulo I, *SECCIÓN E*, inciso 1. *Inhibidores de la corrosión y formación de películas protectoras*). Por lo tanto, se determinó el límite de toxicidad de TDZ antes de evaluar su efectividad como inhibidor de la corrosión en medios biológicos simulados (saliva sintética).

*Síntesis de TDZ.* TDZ se sintetizó, purificó e identificó según el procedimiento propuesto por nuestro grupo de trabajo (*Svartman EL y col., 2006*).

*Solventes y soluciones empleadas.* TDZ se solubilizó en DMSO Merck p.a. (Química Argentina SAIC, BA, Argentina), para luego ser diluido en el MCC. El intervalo de concentraciones de TDZ investigado se seleccionó de manera de incluir la concentración (0,65  $\mu\text{M}$ ) a la cual dicho compuesto resultó con poder inhibidor sobre la corrosión de cobre en medio ácido (*Barbosa MR y Mirífico MV, 2006; Becker MD y col., 2004; Jordán Dansilio MA, 2004; Becker MD, 2004; Montaña AN, 2003*); y concentraciones más altas que pudieran ser utilizadas para alcanzar un mayor efecto protector. Las concentraciones de TDZ estudiadas fueron: 0,57; 1,16; 1,72; 2,94; 5,63 y 12,50  $\mu\text{M}$ . La concentración final del solvente DMSO en el medio de cultivo no superó el 1% v/v para todos los tratamientos en los distintos ensayos.

**Cultivo celular.** Para los ensayos de citotoxicidad se utilizó la línea celular CHO-K1 que se obtuvo originalmente del Banco Americano de Células (ATCC, Rockville, MD, USA). Las células se sembraron, crecieron y mantuvieron según lo descrito en Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1. *Aleación base cobre*, con la salvedad de que en este caso se utilizó el medio de cultivo Ham-F10 (GIBCO-BRL, Los Ángeles, Estados Unidos) enriquecido de igual manera que el medio D-MEM (medio de cultivo completo). Simultáneamente a los cultivos en presencia de TDZ se incluyeron los controles negativos (cultivos sin tratamiento y tratados con el solvente DMSO 1% v/v) y positivos (cultivos tratados con etanol 7% v/v).

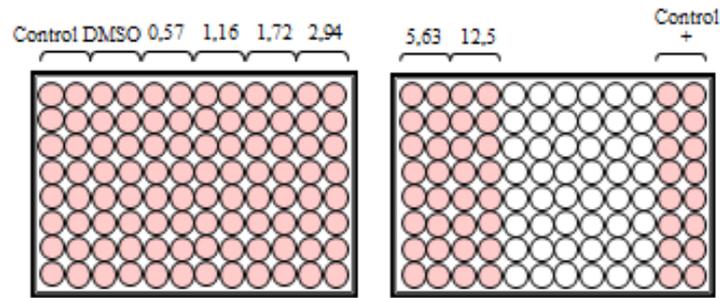
**Técnicas empleadas.** Ensayos de rojo neutro (RN), aberraciones cromosómicas (AC), índice mitótico (IM) y formación de colonias (FC).

El agua empleada para la preparación de todas las soluciones, medios biológicos, limpieza, lavado y otros procedimientos, fue también para esta parte del trabajo de tesis doctoral, agua bidestilada y desionizada por el sistema Milli Pore-MilliQ.

### 1.1.1. Ensayos de citotoxicidad

#### 1.1.1.1. Rojo Neutro

Para este análisis se sembraron en placas de 96 pozos  $2,7 \times 10^3$  células/pocillo y se cultivaron en medio Ham-F10 completo. Las células crecieron, durante 4 h, según lo descrito en Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1.2.3. *Citotoxicidad de los iones metálicos: ensayo de rojo neutro*. Transcurrido este tiempo, se removió el medio de cultivo y se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de MCC conteniendo una concentración conocida de TDZ (**Figura III.4**). Después de 24 h, se continuó con el ensayo tal como se describe Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1.2.3. *Citotoxicidad de los iones metálicos: ensayo de rojo neutro*. El porcentaje de citotoxicidad se calculó según la **ec. III.1**.



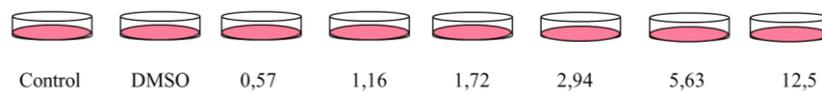
**Figura III.4.** Cultivo de células CHO-K1, expuestas a diferentes concentraciones ( $\mu\text{M}$ ) de TDZ, durante 24 h, a  $37 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**1.1.1.2. Formación de colonias celulares**

Para este análisis se siguieron los mismos pasos y se trabajó en las condiciones detalladas en Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1.2.2. *Efecto de los iones metálicos liberados: ensayo de formación de colonias celulares*; pero se utilizó el medio de cultivo Ham-F10 completo conteniendo diferentes concentraciones de TDZ (**Figura III.5**). Luego de 7 días de incubación, se removió el medio de cultivo y se lavaron las células adheridas con SBP. Las colonias se fijaron según lo descrito en Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1.2.2. *Efecto de los iones metálicos liberados: ensayo de formación de colonias celulares*; y tiñeron con Giemsa. El porcentaje de supervivencia celular se calculó según la **ec. III.2**.

$$[a / b] \times 100 \tag{ec. III.2}$$

donde *a* corresponde al número de células vivas tratadas con TDZ y *b* al de células vivas en el control negativo tratadas con DMSO.



**Figura III.5.** Cultivo de células CHO-K1, expuestas a diferentes concentraciones (0,57 – 12,5  $\mu\text{M}$ ) de TDZ, durante 7 días, a  $37 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**1.1.1.3. Análisis estadístico de los datos**

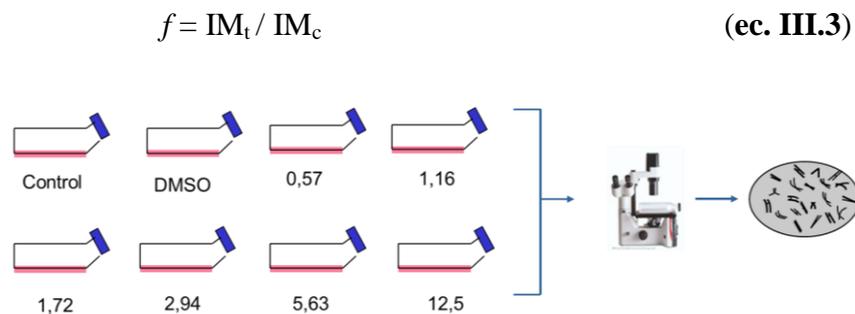
Los datos se analizaron usando la prueba de One-way-ANOVA y la de comparaciones múltiples; esta última se llevó a cabo realizando el ajuste

de los valores  $p$  por el método de *Bonferroni* (*Martín Andrés A y Luna del Castillo JD, 2004*). El análisis estadístico se realizó con el programa *Statistica 7.0* (Statsoft, Inc., Tulsa, OK).

### 1.1.2. Ensayos de genotoxicidad

#### 1.1.2.1. Pruebas de aberraciones cromosómicas estructurales e índice mitótico

Para estos ensayos se sembraron  $3,5 \times 10^3$  células/mL en frascos T-25, en medio de cultivo completo (Ham-F10) conteniendo diferentes concentraciones de TDZ. (**Figura III.6**) Las células se incubaron durante 12 h, y 2 h antes de la fijación se agregó colchicina (Merck) al medio de cultivo (concentración final  $0,1 \mu\text{g/mL}$ ) para detener la división celular en metafase. Las células se fijaron con metanol absoluto:ácido acético glacial (3:1) y se extendieron utilizando la técnica de secado al aire siguiendo protocolos de rutina (*Tjio J y Levan A, 1956*). Posteriormente se llevó a cabo la observación al microscopio (*ver* Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1.1.2) con un objetivo 10x y se evaluaron para aberraciones cromosómicas estructurales un total de 300 metafases por tratamiento (100 por repetición) y para el índice mitótico un total de 3000 células por cada punto experimental. Los cambios en el IM se expresaron como un factor ( $f$ ) (**ec. III.3**) definido como la relación entre el IM de las células tratadas ( $\text{IM}_t$ ) y el IM de las células control tratadas con DMSO ( $\text{IM}_c$ ). (*Miller BM y Adler ID, 1998*)



**Figura III.6.** Cultivo de células CHO-K1, expuestas a diferentes concentraciones de TDZ (0 –  $12,5 \mu\text{M}$ ), durante 12 h, a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ .

**1.1.2.2. Análisis estadístico de los datos**

Los datos se analizaron usando el test de  $\chi^2$ .

## **SECCIÓN C**

### ***EFFECTO DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS COMO PROTECTORES SUPERFICIALES DE BIOMATERIALES DENTALES METÁLICOS***

#### **1. COBRE**

Para proteger el metal frente a la corrosión en un medio agresivo como es la saliva, se probaron TDZ y DMSO. Ambos compuestos han mostrado actuar como inhibidores de la corrosión de cobre y de acero al carbono, respectivamente (*Barbosa MR y Mirífico MV, 2006; Becker MD y col., 2004; Jordán Dansilio MA, 2004; Becker MD, 2004; Montaña AN, 2003; Madhavan K y col., 2001*) y en cuanto a su toxicidad, según resultados obtenidos en este trabajo de Tesis doctoral, TDZ es capaz de garantizar los mínimos efectos adversos utilizándolo por debajo de su límite umbral (1,16  $\mu\text{M}$ ), mientras que la baja toxicidad de DMSO ha sido informada en la literatura (*Pérez-Pastén R y col., 2006*).

***Sustratos metálicos.*** Se utilizaron barras cilíndricas (cobre electrolítico comercial 99,99%) tanto para estudiar el efecto de DMSO como de TDZ y láminas de cobre (99,7%, Merck, Química Argentina SAIC, BA, Argentina) únicamente para el estudio con DMSO.

***Solventes y soluciones empleados para la protección del metal.*** Se prepararon soluciones patrones de TDZ (3,13 mM) en DMSO Merck p.a. (Química Argentina SAIC, BA, Argentina). Se evaluó TDZ en el intervalo de concentración 0,21 – 1,16  $\mu\text{M}$ . Para la investigación del efecto de DMSO como protector de las superficies metálicas frente a la corrosión, se emplearon solventes comerciales de diferentes procedencias: DMSO Anedra r.a. (Research AG, S.A., BA, Argentina), Merck p.a. (Química Argentina SAIC, BA, Argentina), y Fluka p.a. (Sigma-Aldrich Co., Argentina). Además, se emplearon soluciones de sulfuro de dimetilo (160 ppm) (SDM, Merck Química

Argentina SAIC, BA, Argentina) y disulfuro de dimetilo (200 ppm) (DSDM, Sigma-Aldrich Co., Argentina.) en DMSO Merck p.a.. Todos los solventes se utilizaron como se recibieron, sin purificación adicional, pero su pureza se controló por cromatografía gaseosa con detector de espectrometría de masas.

**Medio corrosivo.** Como medio corrosivo (MC) se seleccionó la saliva sintética de Baron (*Baron C y col., 1978*), de composición (g/L): 6,0 NaCl; 0,3 KCl; 0,2 CaCl<sub>2</sub> y 3,1 de ácido láctico. La presencia de este último compuesto le da sus características ácidas (pH = 2,6). Volumen empleado en la celda electroquímica: 20 mL. Los componentes del medio corrosivo fueron Anedra (Research AG, S.A., BA, Argentina) grado analítico. Previo a la preparación de del MC, las sales y el ácido láctico se secaron según Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1. *Aleación base cobre*; hasta su inmediato uso posterior.

**Técnicas empleadas.** Para estudiar el efecto de TDZ como protector de cobre se midieron las curvas de polarización potenciodinámica cíclica y lineal. Para investigar el efecto de DMSO, además, se empleó la medida del potencial a circuito abierto (PCA), la microscopía óptica (MO), y espectroscopía fotoelectrónica de rayos x (XPS) para los análisis superficiales. Por espectrofotometría de absorción atómica (EAA) se midió la concentración de iones cobre liberados al medio corrosivo (cobre soluble) y mediante la cromatografía gaseosa - espectrometría de masa (CG-EM) se controló la pureza de DMSO de diferentes procedencias, empleados para proteger al cobre frente a la corrosión en la saliva sintética.

Los resultados obtenidos para el metal protegido con el inhibidor o en los experimentos realizados en presencia del potencial inhibidor de corrosión en el medio corrosivo se compararon con los obtenidos para el metal sin proteger o en ausencia del potencial inhibidor en el medio corrosivo (ensayos blanco).

Cada experimento electroquímico se realizó al menos por triplicado para verificar su reproducibilidad.

**Preparación de las muestras de cobre.** Para los experimentos electroquímicos y los análisis de MO, los electrodos de trabajo se construyeron a partir de una barra de cobre electrolítico que se cortó en secciones para obtener barras cilíndricas de 40 mm de largo x 4 mm de diámetro. Las barras se soldaron a un alambre de cobre y luego se encapsularon en Teflón dejando un área geométrica circular expuesta de  $0,216 \text{ cm}^2$  (Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1. *Aleación base cobre*).

Para los ensayos de XPS se usaron láminas de cobre de 0,5 cm x 1,0 cm y para las experiencias de EAA se usaron láminas de cobre de 1,8 cm x 3,5 cm (área geométrica expuesta  $12,6 \text{ cm}^2$ ). En cada experimento XPS y EAA se emplearon láminas de cobre nuevas.

Antes de cada medida electroquímica, de XPS y de análisis por MO, y previa inmersión en MC, las muestras de cobre se desbastaron, pulieron, limpiaron y secaron siguiendo el procedimiento descrito para las láminas de ABCu en Capítulo III, *SECCION A*, inciso 1. *Aleación base cobre*. En el caso de las experiencias de EAA, antes de cada ensayo las láminas de cobre se sumergieron en acetona y se sometieron a un proceso de limpieza con ultrasonido (30 s), se enjuagaron con agua, se dejaron inmersas en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5% v/v durante 60 s, y finalmente nuevamente se sonicaron sumergidas en agua y se secaron con aire tibio (*Schwartz M, 2003*).

**Tratamiento de las superficies de las muestras de cobre.** Luego de ser debidamente preparadas, las superficies de las muestras de cobre para el estudio del efecto de DMSO como inhibidor, se trataron por inmersión durante diferentes tiempos (10 - 1260 min) tanto en DMSO de distintas procedencias como en soluciones de sulfuro de dimetilo (SDM) y de disulfuro de dimetilo (DSDM) en DMSO (Merck p.a.) de alta pureza, en reposo y sin desairear.

Las superficies de las muestras de cobre para el estudio del efecto de TDZ como inhibidor, se trataron por inmersión durante 30 y 180 min en la solución de TDZ (3,13 mM) en DMSO (Merck p.a.) de elevada pureza, en reposo y sin desairear. Durante el procedimiento todas las muestras de cobre se dispusieron

de modo tal de evitar que contactaran con las paredes del recipiente que contenía al compuesto orgánico en solución para el tratamiento.

Cumplido el tiempo de tratamiento, las muestras para XPS y MO se lavaron con agua y secaron con aire tibio. Aquellas utilizadas para EAA se sólo se lavaron con abundante agua, y para los experimentos electroquímicos se lavaron con abundante agua y enjuagaron con el medio corrosivo.

El agua empleada para la preparación de todas las soluciones, medios biológicos, limpieza, lavado y otros procedimientos fue bidestilada y desionizada Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1. *Aleación base cobre*.

**Temperatura de trabajo.** Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente ( $25 \pm 3$  °C).

## **1.1. Efecto de DMSO como protector del cobre frente a la corrosión**

### **1.1.1. Medidas electroquímicas**

#### **1.1.1.1. Curvas de polarización potenciodinámica lineal y cíclica**

Las técnicas electroquímicas se llevaron a cabo como se describió en Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1.1.1. *Curvas de polarización potenciodinámica*, pero utilizando como ET la muestra de cobre detallada más arriba.

Las curvas de polarización potenciodinámica (CsPP) para el electrodo de cobre recién pulido (sin tratar) y del electrodo tratado con DMSO, medidos en la solución electrolítica (MC) naturalmente aireada y en reposo (20 mL), en ausencia y en presencia de DMSO, se obtuvieron siguiendo un procedimiento convencional. Los registros potenciodinámicos se llevaron a cabo en las condiciones descritas en Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1.1.1. *Curvas de polarización potenciodinámica*, pero el límite de potencial anódico fue +20 mV. También, antes de cada registro, el ET no tratado con el inhibidor se sometió a una reducción catódica manteniéndose potencioestáticamente a

-580 mV durante 60s, para reducir la posible película de óxido formada en el aire durante la manipulación del electrodo.

Las CsPP se midieron luego de la inmersión en el MC del ET expuesto a diferentes condiciones:

- a) inmediatamente luego de la reducción catódica (-580 mV, 60s) del ET recién pulido y sin ningún tratamiento, inmerso en MC sin y con agregado de DMSO Fluka p.a. (35 a 70 mM);
- b) luego del tratamiento del ET por inmersión (diferentes tiempos) en DMSO de diferentes grados de pureza y en soluciones de SDM o de DSDM en DMSO (Merk, p.a.) de elevada pureza;
- c) luego de la inmersión sucesiva de ET en DMSO Fluka p.a. (60 min.) y en MC (60 min.).

En todos los experimentos, la eficiencia de inhibición se calculó según la ec. **III.4**.

$$EI\% = 100 [(I_{\text{control}} - I_{\text{Inh}}) / I_{\text{control}}] \quad (\text{ec. III.4})$$

donde  $I_{\text{control}}$  es la intensidad de corriente medida para el ET no tratado sumergido en el MC e  $I_{\text{Inh}}$  la intensidad de corriente medida para el ET no tratado sumergido en el MC conteniendo diferentes concentraciones de DMSO o para el ET con su superficie modificada mediante el tratamiento por inmersión en DMSO o por inmersión en soluciones de SDM y de DSDM en DMSO.

#### **1.1.1.2. Medida de potencial a circuito abierto**

El PCA para el ET recién pulido sin y con tratamiento, por inmersión en DMSO durante 60 min, se registró en función del tiempo en el MC (20 mL) y en una solución de NaCl 0,1 M (pH = 2,6; HCl) (ambas soluciones bajo condiciones de reposo y naturalmente aireadas), durante un período de 1100 min. Las medidas se realizaron en la celda electroquímica mencionada arriba (Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1.1.1. *Curvas de polarización potenciodinámica*) y para la medida de potencial se empleó un

multímetro digital (Mastech<sup>®</sup> M-832) de elevada resistencia frente a la circulación de corriente, vs. ECS.

### **1.1.2. *Análisis Superficial***

#### **1.1.2.1. Microscopía óptica**

Para observar las superficies metálicas se utilizó un microscopio óptico (Olympus Bx51, Olympus Corp., Tokio, Japón) conectado a una cámara digital (Olympus DP71, Olympus Corp., Tokio, Japón). Previo al análisis, algunos electrodos (sin tratar y tratados con DMSO Fluka p.a. durante 60 min) fueron sometidos a una polarización anódica desde -580 mV hasta -30 mV (a baja velocidad de barrido de potencial  $5 \text{ mVs}^{-1}$ ) y otros no se sometieron a oxidación electroquímica.

#### **1.1.2.2. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos x**

Las láminas de cobre se trataron por inmersión en DMSO Fluka p.a. (180 min.), DMSO Merck p.a. (180 min.), DMSO Anedra r.a. (180 min.), en una solución en DMSO Merck p.a. conteniendo 160 ppm de SDM (60 min.) y en una solución en DMSO Merck p.a. conteniendo 200 ppm de DSDM (60 min). Los resultados se analizaron y compararon con los de las muestras sin tratar. Los espectros se midieron a temperatura ambiente usando una fuente de  $\text{MgK}\alpha_{1,2}$  (1253,6) XR50, Specs GmbH y un analizador de energía hemisférico PHOIBOS 100, Specs GmbH. Se utilizó un pasaje de energía de 40 eV.

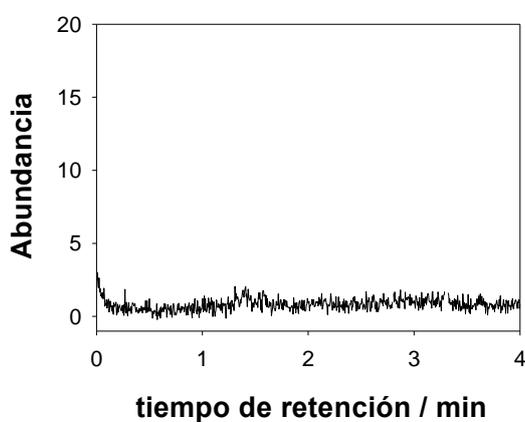
### **1.1.3. *Estudio de la pureza de DMSO***

#### **1.1.3.1. Cromatografía gaseosa – espectroscopía de masas**

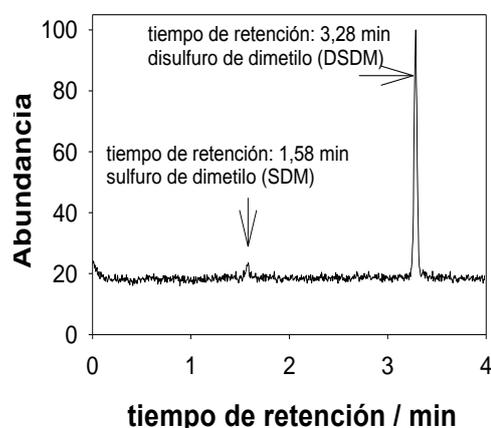
Para este estudio se utilizó un cromatógrafo de gases que tiene acoplado un detector de espectrometría de masas (GC-EM) para separar, identificar y cuantificar las impurezas presentes en los DMSO de diferentes procedencias y en las soluciones de SDM o DSDM en DMSO Merck p.a.. Se analizó DMSO Anedra r.a., DMSO Fluka p.a., DMSO Merck p.a. y soluciones de SDM y DSDM en DMSO (Merck p.a.) (**Figuras III.7 y III.8**).

El análisis se llevó a cabo usando un CG (Perkin Elmer, Clarus 500) acoplado a un EM (Perkin Elmer, Clarus 560D) como detector, equipado con una columna capilar Elite-5MS (30 m; 0,25 mm diámetro interno; 0,25  $\mu$ m espesor). La temperatura del inyector y de la línea de transferencia fue 200 °C y se usó helio como gas portador con un flujo de 1 mL/min – Split: 30; tiempo de corrida: 12 min. La temperatura programada del horno fue: temperatura inicial: 45 °C (7 min), temperatura final: 200 °C (0 min), con una velocidad de calentamiento de 40 °C/min. Las condiciones de trabajo del EM fueron solvent delay: 4-12 min y EM scan: PM: 35-400g/mol.

Las impurezas observadas (SDM y DSDM) se cuantificaron (ver Capítulo IV, SECCIÓN C, inciso 1.1.1.1.2. *Efecto del tratamiento superficial de cobre por inmersión en DMSO*. Tabla IV.3) construyendo las curvas de calibración correspondientes (área bajo la curva de cromatograma correspondiente a cada compuesto vs. concentración del compuesto en soluciones patrones de concentración exactamente conocidas).



**Figura III.7.** Cromatograma de impurezas de DMSO Merck p.a.



**Figura III.8.** Cromatograma de impurezas de DMSO Anedra r.a.

#### 1.1.4. *Determinación de iones metálicos liberados al medio corrosivo*

##### 1.1.4.1. *Espectrofotometría de absorción atómica*

Para llevar a cabo esta investigación se analizaron muestras de cobre recientemente pulidas (no tratadas) y muestras de cobre pulidas y tratadas por inmersión en DMSO (Fluka p.a.), durante 24 h (ver Capítulo III,

*SECCIÓN C*, inciso 1. *Cobre*), para luego ambos tipos de muestras ser inmersas en el MC (70 mL en reposo y naturalmente aireado, a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) suspendidas con un hilo de nylon (**Figura III.1**), durante períodos de exposición comprendidos entre 1440 y 5610 min. Pasados estos períodos de inmersión, se tomaron alícuotas de 50 mL exactamente medidos de la solución, se evaporó el solvente a presión reducida a  $30^\circ\text{C}$  hasta obtener un volumen exactamente conocido de la solución concentrada. Para determinar la concentración de iones cobre liberados por las muestras de cobre sin tratar y tratadas al MC (concentración de cobre soluble), se usó un espectrómetro de absorción atómica con llama (Shimadzu AA-6650, Kyoto, Japan).

## **1.2. Efecto de TDZ como protector del cobre frente a la corrosión**

### **1.2.1. Medidas electroquímicas**

#### **1.2.1. Curvas de polarización potenciodinámica lineal y cíclica**

Las medidas de las CsPP se realizaron como se describe en Capítulo III, *SECCIÓN C*, inciso 1. *Cobre*.

Las CsPP se midieron luego de la inmersión en el MC del ET expuesto a diferentes condiciones:

- a) inmediatamente luego de la reducción catódica ( $-580\text{ mV}$ , 60s) del ET recién pulido y sin ningún tratamiento, inmerso en MC sin y con agregado de TDZ en diferentes concentraciones (0,21; 0,42; 0,63; 0,83; 1,04 y 1,16  $\mu\text{M}$ );
- b) luego del tratamiento del ET por inmersión (30 y 180 min) en solución TDZ (3,13 mM) en DMSO (Merck p.a.) de elevada pureza.

En todos los experimentos, la eficiencia de inhibición se calculó según la **ec. III.4**, donde  $I_{\text{Inh}}$  corresponde a la intensidad de corriente medida para el ET no tratado sumergido en el MC conteniendo diferentes concentraciones de TDZ o para el ET con su superficie modificada mediante el tratamiento por inmersión en solución TDZ en DMSO.

### **1.2.2. Análisis superficial**

### 1.2.2.1. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos x

Las láminas de cobre se trataron por inmersión en solución TDZ (3,13 mM) en DMSO (Merck p.a.) (180 min.). Los resultados se analizaron y compararon con los de las muestras sin tratar. Los espectros se midieron a temperatura ambiente usando una fuente de  $MgK\alpha_{1,2}$  (1253,6) XR50, Specs GmbH y un analizador de energía hemisférico PHOIBOS 100, Specs GmbH. Se utilizó un pasaje de energía de 40 eV.

## 2. ALEACIÓN BASE COBRE

Para proteger la ABCu frente a la corrosión en un medio agresivo como es la saliva, se investigó el enjuague bucal Periodent<sup>®</sup> (*ver* abajo) a base de digluconato de clorhexidina y xilitol. También se estudió el efecto de sus principales componentes: clorhexidina y su forma salificada (digluconato de clorhexidina), xilitol y cloruro de cetilpiridinio. La estructura química de los compuestos y la baja toxicidad que presentan (Capítulo I, *SECCIÓN E*, inciso 2.3. *Enjuague bucal a base de digluconato de clorhexidina y xilitol*) sugieren la posibilidad de ser empleados como inhibidores de corrosión. (*Lee LW, 1990; Negroni M, 2009; Bordoni N y col., 2010*)

***Sustratos metálicos.*** Se utilizó la ABCu, empleándose para los diferentes ensayos muestras de aleación fundida, y con distintas formas: barra, disco, lámina (*ver* Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1. *Aleación base cobre*)

***Soluciones empleadas para la protección del metal.*** Se utilizó el enjuague bucal, de composición (%p/v): digluconato de clorhexidina 0,12%, xilitol 10%, cloruro de cetilpiridinio, sorbitol, propilenglicol, neoesperidina dihidrocalcona, y azul brillante FCF (C.I. 42090).

Se prepararon soluciones acuosas de sus compuestos principales: digluconato de clorhexidina al 0,12% p/v, xilitol al 10% p/v, cloruro de cetilpiridinio al 0,5% p/v y una combinación (p/v) de digluconato de clorhexidina 0,12% junto con xilitol 10% y cloruro de cetilpiridinio 0,5%. El enjuague bucal y sus componentes fueron provistos por Grimberg Dental

Center, S.A. También se evaluó el efecto de la clorhexidina (Sigma Aldrich Chemical Company) al 0,15% p/v empleando una solución de clorhexidina (3,13 mM) disuelta en DMSO (Merck p.a.).

**Cultivo celular.** Para el ensayo celular se utilizó la línea derivada de osteosarcoma de rata (línea UMR 106) que se obtuvo originalmente de la Colección Americana de Cultivos Tipo (CACT) (Rockville, MD, USA). Las células se sembraron, crecieron y se mantuvieron según lo descrito Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1. *Aleación base cobre*.

**Medios corrosivos.** Se usó la saliva sintética de Fusayama modificada III (*Fernández Lorenzo de Mele M y Duffó G, 2002*) (SS) (pH 4,77), cuya composición se describe en Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1. *Aleación base cobre*. Los componentes de la SS fueron Anedra (Research AG, S.A., BA, Argentina) grado analítico; los mismos se secaron y almacenaron previo a la preparación del medio corrosivo, según lo detallado en Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1. *Aleación base cobre*. Para el ensayo celular se usó el MCC D-MEM enriquecido (pH 7,0) (*ver* Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1. *Aleación base cobre*).

**Técnicas empleadas.** Para estudiar el efecto protector del enjuague bucal y de los diferentes compuestos orgánicos, se utilizaron las técnicas electroquímicas: curvas de polarización potencioisotática lineal anódica y cíclica, y medida del potencial a circuito abierto (PCA). Los análisis superficiales se llevaron a cabo a través de la microscopía óptica (MO), microscopía electrónica de barrido (SEM) acoplada a un espectrómetro de energía dispersiva de rayos x (EDAX) y mediante la espectroscopía fotoelectrónica de rayos x (XPS). La concentración de iones liberados al medio corrosivo se midió por EAA. Cada experimento electroquímico se realizó al menos por triplicado para verificar la reproducibilidad de los datos. El ensayo celular se llevó a cabo mediante la metodología fluorescente de naranja de acridina. Los resultados obtenidos para el metal protegido o en presencia del potencial

inhibidor de corrosión en el medio corrosivo se compararon con los ensayos blanco.

**Preparación de los sustratos metálicos.** Para las experiencias de EAA se usaron láminas de ABCu de 49 cm<sup>2</sup> de área geométrica, para los ensayos electroquímicos y de MO se construyeron electrodos con barras cilíndricas de ABCu de 4 mm de largo por 0,4 mm de diámetro, soldadas a un alambre de cobre y encapsuladas en Teflón dejando un área geométrica circular expuesta de 0,1256 cm<sup>2</sup>. Mientras que para los ensayos con células y para el análisis superficial (SEM-EDAX y XPS) se utilizaron discos de ABCu 0,4 cm de diámetro x 0,1 cm de altura, con un área de exposición de 0,28 cm<sup>2</sup>.

Antes de cada ensayo y previa inmersión en SS, las muestras de ABCu se desbastaron mecánicamente según lo descrito en Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1. *Aleación base cobre*.

**Tratamiento de las superficies de las muestras de ABCu.** Luego de ser debidamente preparadas las superficies de las muestras de aleación (*ver* Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1. *Aleación base cobre*) se trataron por inmersión, a temperatura ambiente ( $25 \pm 3$  °C), durante diferentes tiempos, en el enjuague bucal o en soluciones de: digluconato de clorhexidina (DGCH), de clorhexidina (CH), de xilitol (XL), de cloruro de cetilpiridinio (CCP) y en la mezcla de algunos de ellos. Durante el procedimiento las muestras de ABCu se dispusieron de modo tal de evitar que contactarán con las paredes del recipiente que contenía el enjuague bucal o la solución del compuesto orgánico para el tratamiento de la aleación. Cumplido el tiempo de tratamiento, las muestras para XPS y SEM-EDAX se lavaron con agua y secaron con nitrógeno puro y seco. Aquellas utilizadas para EAA sólo se lavaron con agua, mientras que las muestras para los experimentos electroquímicos se lavaron con agua y abundante cantidad de medio corrosivo.

Las características del agua empleada para la preparación de todas las soluciones, medios corrosivos, así como para la limpieza, lavado y otros

procedimientos, fue la indicada en Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1. *Aleación base cobre*. Todos los experimentos se llevaron a cabo a  $37 \pm 2$  °C, a menos que se indique otra temperatura.

## **2.1. Efecto del enjuague bucal y de sus principales componente como protectores de ABCu frente a la corrosión**

### **2.1.2. Medidas electroquímicas**

#### **2.1.2.1. Curvas de polarización potenciodinámica lineal y cíclica**

Estos experimentos se llevaron a cabo en las condiciones detalladas en Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1.1.1. *Curvas de polarización potenciodinámica*. Las medidas se realizaron en SS (20 mL) desaireada por burbujeo de nitrógeno.

Las curvas de polarización potenciodinámica se midieron luego de la inmersión en el MC del ET expuesto a diferentes condiciones:

- a) inmediatamente luego de la reducción catódica (-580 mV, 60s) del ET recién pulido y sin ningún tratamiento, inmerso en MC;
- b) luego del tratamiento del ET por inmersión (diferentes tiempos) en el enjuague bucal o en sus principales componentes en solución.

En todos los experimentos, la eficiencia de inhibición se calculó según la ec. **III.4**.

#### **2.1.2.2. Medida de potencial a circuito abierto**

El PCA para el ET recién pulido sin y con tratamiento por inmersión en el enjuague bucal durante 120 min, se registró en función del tiempo en SS (naturalmente aireado y en reposo), durante un período de 7 días. Las medidas se realizaron en la celda electroquímica mencionada más arriba (ver Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1.1.1. *Curvas de polarización potenciodinámicas*), usando como ER el ECS y empleándose para la medida de potencial el potencióstato EG&G-PAR modelo 2734.

### **2.1.3. Análisis superficial**

### 2.1.3.1. Microscopía electrónica de barrido y espectrometría de energía dispersiva de rayos x

Para tomar las fotografías y para realizar el análisis elemental de la superficie metálica, se utilizó un microscopio electrónico de barrido, acoplado a un espectrómetro de energía dispersiva de rayos x (Philips 505 SEM; Sistema de captura de imagen ADDA II, unidad de detección EDAX, UTW). Los discos de ABCu antes de ser sometidos al análisis superficial, se expusieron a diferentes condiciones:

- a) se pulieron y no recibieron tratamiento;
- b) se pulieron y se trataron durante 120 min con el enjuague bucal;
- c) se pulieron, no se trataron y se sumergieron durante 10 días en SS;
- d) se pulieron, se trataron durante 120 min con el enjuague bucal y se dejaron inmersos en SS, durante 10 días.

La inmersión de las muestras metálicas en SS se llevó a cabo dentro de una estufa de incubación a  $37 \pm 2$  °C, encontrándose la SS estéril, en reposo y a pH 4,77. Pasado este período de inmersión de 10 días, los discos extraídos se lavaron con abundante agua, se secaron con nitrógeno seco y se analizaron sin ningún otro tratamiento.

### 2.1.3.2. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos x

Para llevar a cabo esta experiencia se utilizaron discos de ABCu tratados por inmersión en el enjuague bucal (120 min). Los resultados se analizaron y compararon con los de las muestras sin tratar.

Otros discos se trataron con el enjuague durante 120 min y luego se dejaron en SS, durante 10 días. Estos ensayos se compararon aquellos realizados con discos de ABCu sin tratar inmersos en el medio corrosivo durante el mismo periodo de tiempo. Los espectros se midieron según lo descrito en Capítulo III., SECCIÓN C, inciso 1.1.2.2. *Espectroscopía fotoelectrónica de rayos x* y se utilizó una fuente energía de  $AlK\alpha_1$  (1486,76).

### 2.1.3.3. Microscopia óptica

Para llevar a cabo el análisis superficial se utilizó un microscopio óptico según las características descritas en Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1.1.2.1. *Microscopía óptica*. Las barras de ABCu se trataron por inmersión en el enjuague bucal (120 min) y luego se dejaron inmersas en SS, durante 10 días. Los resultados de estos ensayos se compararon con aquellos obtenidos para barras de ABCu sin tratamiento con el enjuague bucal, inmersas en el medio corrosivo durante el mismo periodo de tiempo (ensayo blanco).

#### **2.1.4. Determinación de iones metálicos liberados al medio corrosivo**

##### **2.1.4.1. Espectrofotometría de absorción atómica**

Para llevar a cabo este ensayo se analizaron muestras de ABCu tratadas por inmersión (120 min) en el enjuague bucal y luego inmersas en SS durante 24 h, tal como se describe en Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1.1.3. *Determinación de los iones liberados al medio corrosivo*. Pasado este período de inmersión de 24 h, se midió la concentración de los iones metálicos en el medio SS (CPCT24h) por EAA empleando un espectrofotómetro VARIAN modelo SpectrAA55 (número de serie EL99043438).

Cada ensayo se realizó por triplicado en experiencias independientes.

#### **2.1.5. Ensayo celular**

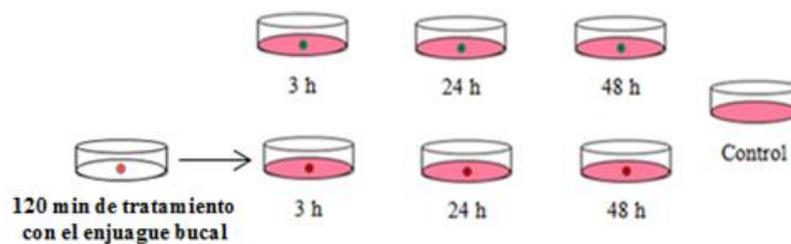
##### **2.1.4.1. Efecto del tratamiento de la ABCu con el enjuague bucal sobre el número de células vivas**

El efecto del tratamiento de la ABCu con el enjuague bucal sobre la línea celular UMR 106, se determinó por tinción con naranja de acridina como se describe en Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1.2.1. *Efecto de los iones metálicos liberados: ensayo de viabilidad*. Pevio a la colocación de los discos de ABCu en el centro de cada cápsula, algunos de ellos se trataron por inmersión en el enjuague bucal (120 min). Las células crecieron por diferente tiempo: 3, 24 y 48 h (*ver* Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1.2.1. *Efecto de los iones metálicos liberados: ensayo de viabilidad*). En este ensayo

también se usó como control negativo un cultivo celular sin disco de ABCu. (Figura III.6)

Para facilitar el análisis del efecto citotóxico en función de la distancia desde la fuente de iones (disco metálico), el área de la cápsula de Petri con células se dividió en regiones concéntricas alrededor del disco metálico (Figura III.2). Transcurridos los diferentes períodos de exposición, se continuó con el ensayo como se detalla en Capítulo III, SECCIÓN A, inciso 1.2.1. *Efecto de los iones metálicos liberados: ensayo de viabilidad.*

Se realizaron dos ensayos independientes por duplicado para cada punto experimental.



**Figura III.6.** Cultivo de células UMR106 expuestas a diferentes tiempos (3, 24 y 48 h) a discos de ABCu sin tratar y tratados durante 120 min con el enjuague bucal, a  $37 \pm 2$  °C.

#### 2.1.4.2. Análisis estadístico de los datos

Los datos se analizaron usando la prueba de One-way-ANOVA y la de comparaciones múltiples; esta última se llevó a cabo realizando el ajuste de los valores  $p$  por el método de *Bonferroni* (Martín Andrés A y Luna del Castillo JD, 2004). El análisis estadístico se realizó con el programa *Statistica 7.0* (Statsoft, Inc., Tulsa, OK). Se consideró diferencia estadísticamente significativa a un  $p < 0,001$ .



## Resultados y Discusión

## **SECCIÓN A**

### **ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD EN BIOMATERIALES DENTALES METÁLICOS**

#### **1. ALEACIÓN BASE COBRE**

Se investigó una aleación base cobre, un bronce al aluminio, comercialmente disponible y de amplio uso odontológico. Si bien las aleaciones base cobre no son las actualmente aconsejadas, en Argentina y en otros países con pueblos de pocos recursos económicos se utilizan frecuentemente por el bajo costo de las mismas (Capítulo I, *SECCIÓN B*, inciso 3. *Biomateriales metálicos de uso odontológico*) (**Figura IV.1 y IV.2.a,b**).



**Figura IV.1.** Perno-muñón colado de aleación base cobre. Fotografía tomada por la autora de este trabajo.

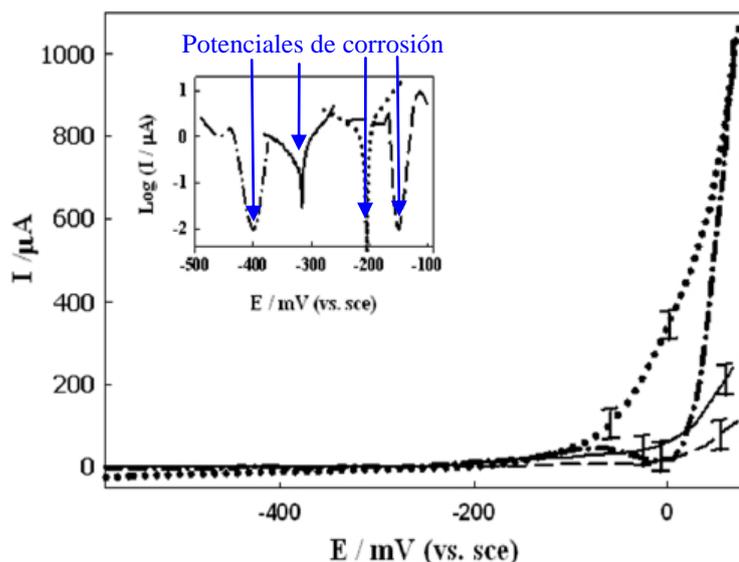


**Figura IV.2. a.** Pieza dentaria extraída de un paciente (cedida por el *Od. Palermo I.*), donde se puede observar parte de la raíz pigmentada de color verde como consecuencia de la corrosión de un perno-muñón colado de aleación base cobre presente en su interior. **b.** Cortes transversales de la porción radicular realizados en este trabajo de Tesis.

## 1.1. Corrosión

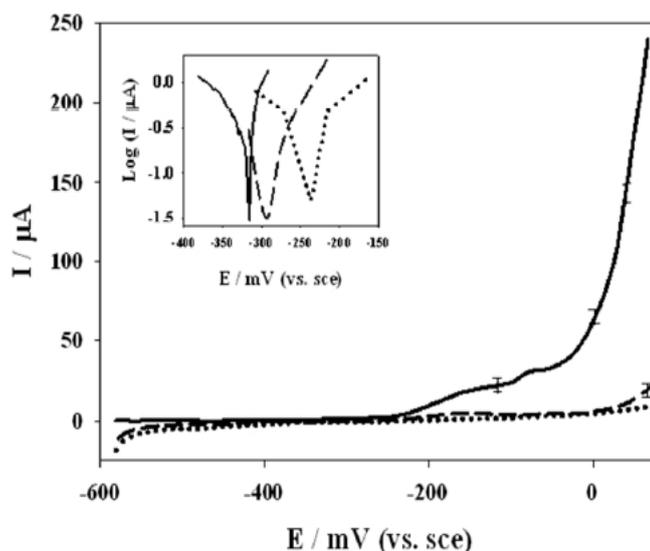
### 1.1.1. Curvas de polarización potenciodinámica

En la **Figura IV.3** se muestran las curvas de polarización potenciodinámica (CsPP) anódica para la ABCu recién pulida registradas en saliva sintética ácida (SS) de pH 4,77 (*línea —*) y en medio de cultivo de células (MCC) de pH 7,0 (*línea - • -*) inmediatamente después de la inmersión. Con fines comparativos, en la figura se incluyen también las CsPP para el metal base cobre puro recién pulido, registradas en SS (*línea - - -*) y en MCC (*línea ••••*) inmediatamente después de la inmersión en los medios corrosivos. En la **Figura IV.3** se observa que en las CsPP registradas inmediatamente después de la inmersión de ABCu en ambos medios corrosivos, los valores de intensidad de corriente ( $I$ ) son similares en la zona de potencial que incluye los potenciales de corrosión (-400 a -150 mV), y hasta aproximadamente -50 mV (*ver figura insertada*). Los datos graficados en la forma  $\text{Log } I$  vs.  $E$  (**Figura IV.3** insertada) muestran un potencial de corrosión menor para ABCu en MCC como electrolito. Además, los valores de intensidad de corriente correspondientes a ambos metales inmersos en SS son menores que aquellos en MCC para potenciales alejados de los potenciales de corrosión, i.e. mayores que +25 mV.

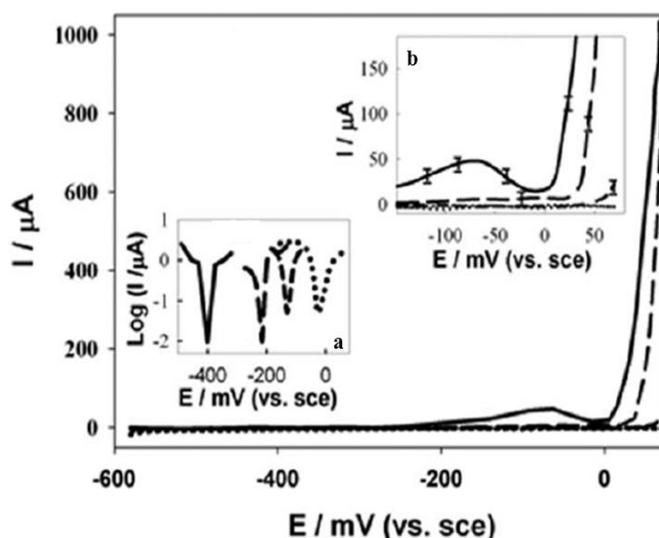


**Figura IV.3.** Curvas de polarización potenciodinámica típicas para ABCu y cobre en SS y MCC ( $37 \pm 2$  °C) medidas inmediatamente después de la inmersión del ET en el medio corrosivo. ABCu en (*—*): SS y (*- • -*): MCC; Cu en (*- - -*): SS y (*••••*): MCC. Figura insertada:  $\text{Log } I$  vs.  $E$ .  $\nu = 5 \text{ mVs}^{-1}$ .

En las **Figuras IV.4** y **IV.5** se muestran las CsPP para la ABCu registradas inmediatamente después de la inmersión de la aleación recién pulida en SS o MCC y luego de haber estado inmersa durante diferentes tiempos. Se observa que cuando los electrodos han sido previamente inmersos en SS o en MCC durante diferentes tiempos, la intensidad de corriente disminuye marcadamente en ambos medios electrolíticos, desplazándose el potencial de corrosión en dirección anódica.



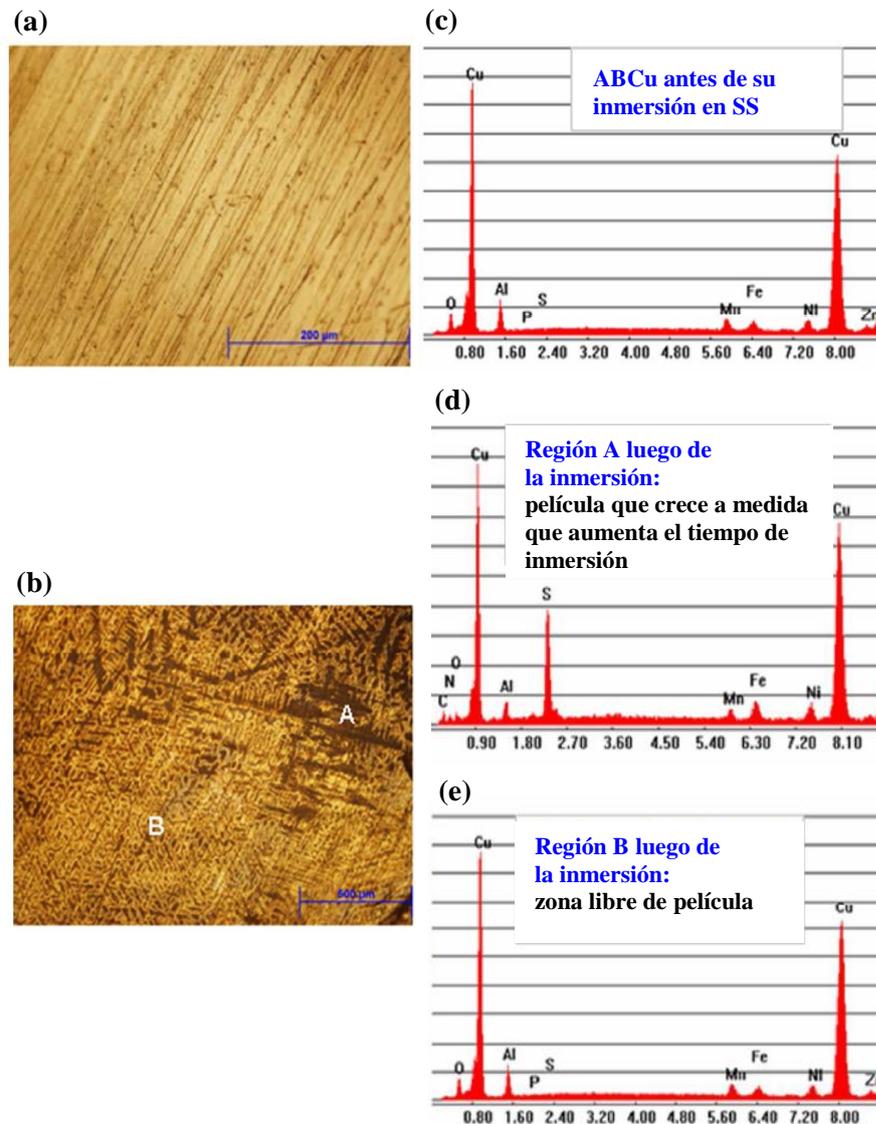
**Figura IV.4.** Curvas de polarización potenciodinámica típicas para ABCu medidas inmediatamente después (—) y luego de diferentes tiempos: 30 min (- - -), 60 y 1080 min (•••) de su inmersión en SS, a  $37 \pm 2$  °C. Figura insertada:  $\text{Log } I$  vs.  $E$ .  $\nu = 5 \text{ mVs}^{-1}$ .



**Figura IV.5.** Curvas de polarización potenciodinámica típicas para ABCu medida inmediatamente después (—) y luego de diferentes tiempos: 60 min (— —), 180 min (- - -) y 1440 min (•••) de su inmersión en MCC, a  $37 \pm 2$  °C. Figuras insertadas: **a.**  $\text{Log } I$  vs.  $E$ . **b.** Detalles de la región de potenciales desde -150 a +75 mV con las barras de errores.  $\nu = 5 \text{ mVs}^{-1}$ .

### 1.1.2. Análisis superficial

La **Figura IV.6a,b** muestra las microfotografías de la superficie de la ABCu recién pulida antes y después de su inmersión en SS durante 10 días, obtenidas por microscopía óptica. Se observan cambios importantes en las características de las superficies debido a un proceso de corrosión no uniforme ocurrido durante el contacto de la aleación con el medio agresivo.



**Figura IV.6.** Microfotografías de la superficie de ABCu obtenidas con un microscopio óptico (magnificación 40x): (a) antes y (b) después de la inmersión en SS durante 10 días, a  $37 \pm 2$  °C. El análisis EDAX de las superficies de los discos de ABCu recién pulidos (c) antes de la inmersión y (d,e) luego de 10 días de inmersión, en diferentes zonas de la superficie [A y B de (b)].

Los resultados del análisis EDAX de la composición de la superficie están también incluidos en la **Figura IV.6c,d,e**. Los análisis EDAX de la superficie recién pulida de ABCu muestran la siguiente composición (% p/p): Al: 8; Mn: 2,04; Fe: 3,15; Ni: 4,41; Cu: 79,4; y Zn: 3. En la **Figura IV.6d,e** se observa que después de la inmersión de ABCu en SS, existen zonas en la superficie con diferentes características y composición: regiones “A” oscuras cubiertas con una película que crece a medida que aumenta el tiempo de inmersión, y regiones “B” claras sin película (*Región A*: C: 4,54; N: 4,14; O: 2,35; Al: 3,86; S: 12,05; Mn: 1,45; Fe: 3,05; Ni: 4,07; Cu: 64,48; *Región B*: O: 5,52; Al: 8,63; P: 0,12; S: 0,33; Mn: 2,24; Fe: 1,8; Ni: 3,74; Cu: 74; Zn: 3,62).

### 1.1.3. Determinación de los iones liberados al medio corrosivo

En la **Tabla IV.1** se presenta la concentración de iones metálicos liberados por la ABCu al medio corrosivo (SS), medidos por EAA para 24 h de exposición (CP24h). La concentración de iones liberados para 8 h de exposición (CP8h) se calculó a partir de los datos obtenidos para CP24h por EAA (*ver* Capítulo III, *SECCIÓN A*, inciso 1.2.3. *Citotoxicidad de los iones metálicos: ensayo de rojo neutro*) que también están incluidos en la **Tabla IV.1**.

Ion Metálico	Composición de ABCu % p/p	Concentración de los metales liberados por ABCu en Saliva Sintética <sup>a</sup>		
		CP24h <sup>b</sup>		CP8h <sup>c</sup>
		mg/L	µg/cm <sup>2</sup>	mg/L
Cobre	81,5	0,041 ± 0,014	0,175 ± 0,068	0,167
Aluminio	7,0	2,384 ± 1,958	9,797 ± 7,923	9,731
Níquel	4,5	0,088 ± 0,015	0,376 ± 0,078	0,359
Hierro	3,0	0,113 ± 0,076	0,493 ± 0,341	0,461
Manganeso	2,0	0,071 ± 0,015	0,306 ± 0,078	0,290
Cinc	1,3	0,102 ± 0,022	0,439 ± 0,112	0,416

<sup>a</sup> Límite de detección (mg/L): Cu = 0,005; Al = 0,025; Ni = 0,006; Fe: 0,006; Mn = 0,008; Zn = 0,007.

<sup>b</sup> CP24h son los valores promedio de concentración de iones medidos por EAA liberados por muestras de ABCu de 49 cm<sup>2</sup> inmersas en 200 mL de SS luego de 24 h de exposición, a 37 °C ± 2 °C.

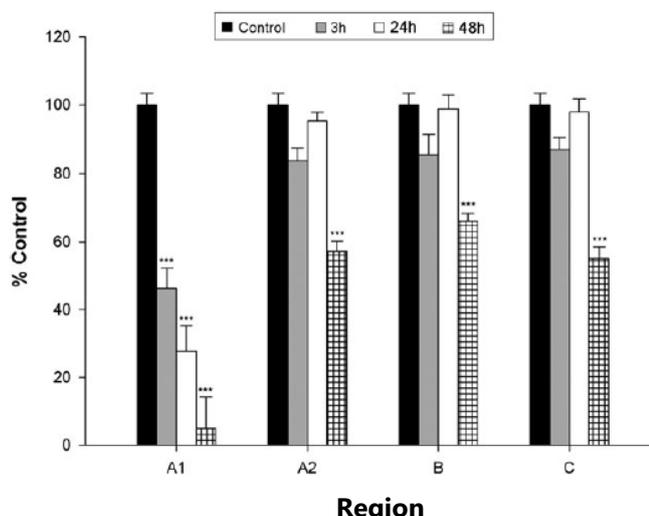
<sup>c</sup> CP8h son valores promedio de concentración calculados a partir de los datos de CP24h, referidos a una muestra de aleación dental de 3 cm<sup>2</sup>, expuesta a 1 mL de SS durante 8 h, calculados a partir de los datos AC24h.

**Tabla IV.1.** Concentración de los iones liberados por la ABCu al medio corrosivo (SS).

## 1.2. Citotoxicidad de los iones metálicos liberados por ABCu al medio agresivo

### 1.2.1. Efecto sobre el número de células vivas

La **Figura IV.7** muestra el efecto de la ABCu sobre el número de células vivas en función de la distancia desde el metal, para 3, 24 y 48 h de exposición, aplicando el ensayo de tinción con naranja de acridina, realizando las mediciones por microscopía de epifluorescencia. La viabilidad celular se calculó a partir del porcentaje de células vivas expuestas al disco de ABCu respecto al control en ausencia de la aleación. Estos resultados muestran (barras grises **Figura IV.7**) que luego de 3 h de exposición aquellas células que estaban cerca de la muestra metálica (región A1) se encontraron severamente alteradas ( $p < 0,001$ ). Para distancias mayores (regiones A2, B y C), se encontró una leve disminución del número de células vivas: 85% respecto del control, valor que indica que las células fueron menos afectadas por los iones liberados por la aleación base cobre.



**Figura IV.7.** Efecto de la ABCu a través de la tinción con naranja de acridina sobre el número de células vivas luego de 3, 24 y 48 h de exposición. Variación con la distancia desde el disco de ABCu. Regiones A1, A2, B y C de acuerdo a la **Figura III.2**. Radio (r) externo de las regiones: rA1= 0,9 cm; rA2 = 1,4 cm; rB = 2,4 cm; y rC = 3,4 cm. \*\*\* Diferencia significativa a  $p < 0,001$ .

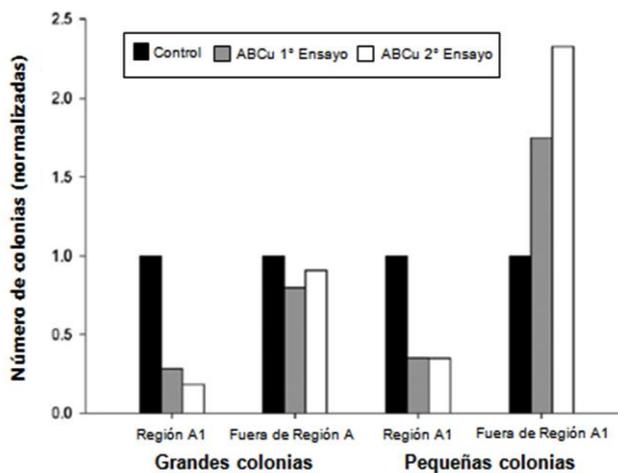
También se investigó el efecto de una posible elevada concentración local de iones en la zona vecina a la aleación metálica luego de exposiciones al metal durante períodos de crecimiento completos. En estas

condiciones, tanto la duplicación de células como la acumulación de iones liberados por el biomaterial ocurren simultáneamente.

Para 24 y 48 h de inmersión, las imágenes tomadas por el microscopio de fluorescencia revelan que el efecto perjudicial sobre las células en crecimiento fue nuevamente más importante en la Región A1 (**Figura IV.7**), donde se detectan reducciones importantes ( $p < 0,001$ ) de 30 (para 24 h) a 5% (para 48 h) en el número de células respecto del valor control. Es interesante resaltar la observación de porcentajes más altos de células vivas, con respecto a los ensayos de 3 h, en las regiones A2, B y C luego de 24 h de exposición (barras blancas **Figura IV.7**); resultado que indica que las células fueron capaces de duplicarse durante este período. Por otra parte, las células más jóvenes fueron severamente alteradas por los iones metálicos durante los períodos posteriores de crecimiento (datos para 48 h, **Figura IV.7**). Además, se observa un marcado descenso ( $p < 0,001$ ; cercano a 60% respecto a las células control) en el número de células en las regiones A2, B y C, para 48 h de exposición.

### 1.2.2. Efecto sobre las unidades de formación de colonias

La **Figura IV.8** muestra el número de colonias pequeñas (diámetro  $< 95\mu\text{m}$ ) y grandes (diámetro  $> 95\mu\text{m}$ ) formadas en presencia de la ABCu respecto del control (en ausencia de la aleación) en la Región A1 y en zonas cercanas al metal.

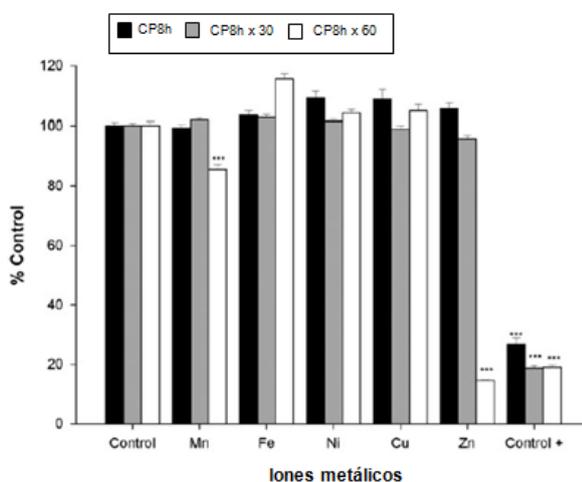


**Figura IV.8.** Número de colonias pequeñas (diámetro  $< 95\mu\text{m}$ ) y grandes (diámetro  $> 95\mu\text{m}$ ) en la Región A1 y fuera de la Región A1, correspondientes a dos ensayos independientes. Los valores están referidos al valor control en ausencia de ABCu. Los radios interno y externo de la Región A1 respecto al borde del disco de ABCu son de 0,5 y 0,9 cm, respectivamente.

En relación con el tamaño, se observan diferencias significativas entre las colonias control,  $112,21 \pm 5,45 \mu\text{m}$  y aquellas que crecieron en presencia del disco de aleación,  $80,83 \pm 4,95 \mu\text{m}$ . El número de células de las colonias formadas se midió para dos ensayos independientes. En la inmediación de la aleación (Región A1, **Figura IV.8**), para 7 días de exposición a la liberación de iones metálicos por los discos de aleación, se observó un drástico descenso en el número de colonias pequeñas y grandes con respecto del experimento control. Curiosamente, también se observó un marcado aumento en el número de las colonias pequeñas fuera de la Región A1 respecto del valor control.

### 1.2.3. Efecto de los iones de sales metálicas sobre el número de células vivas

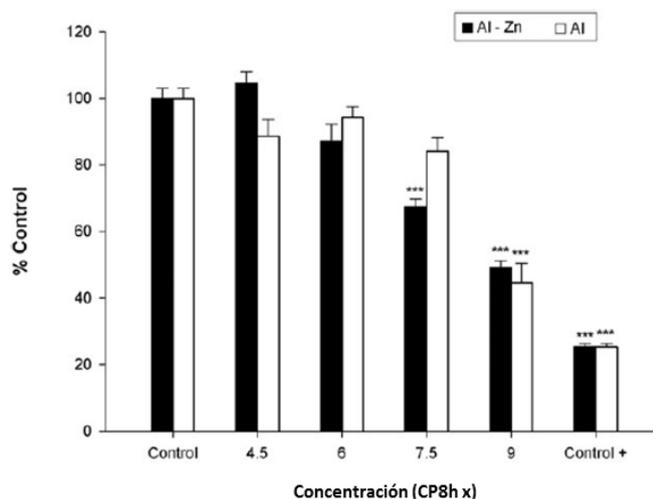
Se investigó la actividad lisosomal (ensayo de rojo neutro) en células UMR-106 después de tratamientos con los iones de cada uno de los componentes de la aleación ABCu. La **Figura IV.9** muestra la viabilidad de las células UMR-106 con respecto al control al ser expuestas a los iones metálicos de los componentes de la aleación en diferentes concentraciones: CP8h, CP8h x 30, y CP8h x 60. En los ensayos en los cuales se evaluó el efecto de los iones por separados a una concentración CP8h no se evidenció disminución de la actividad lisosomal, sin embargo en algunos casos se observó un leve aumento de la actividad (**Figura IV.9**). La mezcla de todos los iones metálicos para CP8h no mostró efecto sobre la actividad celular.



**Figura IV.9.** Citotoxicidad de los iones metálicos mediante el ensayo de rojo neutro a diferentes concentraciones: CP8h, CP8h x 30, y CP8h x 60. \*\*\* Diferencia significativa a  $p < 0,001$ .

En la **Figura IV.9** no se observan efectos significativos de los iones individuales Mn, Fe, Ni, Cu o Zn para CP8h y concentraciones 30 mayores que el promedio (CP8h x 30; CP8h x 60). En el caso del ion Al, la baja solubilidad de la sal impidió el uso de concentraciones mayores que CP8h x 9. Para concentraciones 60 veces mayores que el promedio, sólo los iones Mn y Zn mostraron un leve y un marcado efecto citotóxico, respectivamente ( $p < 0,001$ ) y se observó un suave aumento en la actividad lisosomal para el ion Fe. Concentraciones  $\geq$  CP8h x 36 del ion Zn reducen la actividad lisosomal de las células alrededor de un 30%.

La **Figura IV.10** muestra el efecto del ion Al y de la mezcla de los iones Al y Zn sobre la actividad lisosomal de las células UMR-106 en el intervalo de concentraciones de CP8h x 4,5 a CP8h x 9. En el caso del ion Al (**Figura IV.10**) se observó una reducción cercana al 40% para CP8h x 9. Cuando se usó la combinación de iones Al-Zn (**Figura IV.10**), la actividad metabólica se redujo al 90% para la concentración CP8h x 6 y cerca del 50% para CP8h x 9. Curiosamente, el efecto fue más importante cuando se usó la totalidad de la mezcla (MT) de todos los componentes de la aleación (MT x 9 = CP8h x 9 = 20,69%).



**Figura IV.10.** Efecto del ion Al y de la mezcla de los iones Al y Zn sobre la actividad lisosomal de las células UMR-06 en el intervalo de concentraciones CP8h x 4,5 a CP8h x 9. \*\*\* Diferencia significativa a  $p < 0,001$ .

Los bronce al aluminio aparecieron como una alternativa económica para la fabricación de pernos, coronas y puentes debido al elevado

costo de las aleaciones ricas en oro (*Eschler PY y col., 2003; Carvalho RC y Matson E, 1990*). Sin embargo, estudios previos han mostrado que esas aleaciones presentan una resistencia muy baja a la corrosión y posibles efectos citotóxicos sobre las células cercanas a la aleación. (*Ardlin BI y col., 2009*) En consecuencia, el uso masivo de estas aleaciones dentales es causa de una gran preocupación.

Cuando se analizan la corrosión de los bronce al aluminio en el ambiente bucal y el efecto citotóxico de los iones liberados se originan numerosas preguntas. Entre ellas: (1) ¿la concentración de los iones metálicos liberados está en relación con la composición de la aleación metálica?; (2) ¿la concentración de los iones es uniforme en los alrededores del metal?; (3) ¿las concentraciones medidas son mayores que los valores umbrales de citotoxicidad?; (4) ¿la respuesta de las células próximas al metal es similar a la observada en aquellas células expuestas a una concentración de iones equivalente a las medidas de los iones liberados por la aleación durante ensayos de corrosión?; (5) si no es así, ¿cómo se podría interpretar el comportamiento de las células?; (6) ¿existe efecto citotóxico sinérgico cuando se usa una mezcla de dos o más iones?; y (7) ¿el efecto citotóxico de la mezcla de todos los iones es mayor que el de la mezcla de sólo dos?. El análisis de los resultados obtenidos en los experimentos electroquímicos y citotóxicos permite develar las respuestas a todos estos interrogantes.

**Resultados electroquímicos.** Los resultados electroquímicos muestran que la velocidad de disolución de la ABCu es diferente a la del cobre puro, con valores de potencial de corrosión más catódicos y que dependen del pH y de la composición del medio corrosivo (SS o MCC). El efecto de la composición y del pH del medio (SS o MCC) se observa claramente a través del corrimiento del potencial de corrosión hacia valores más catódicos para la aleación en MCC que en SS (**Figura IV.3**), medidos inmediatamente luego de la inmersión en los medios electrolíticos. Este desplazamiento del potencial podría relacionarse con la acción complejante de algunos de los compuestos orgánicos presentes en el medio de cultivo celular (*Protopopoff E y Marcus P, 2003; Edwards M y Sprague N, 2001*). Por otro parte, los corrimientos del potencial de corrosión hacia una dirección más anódica y la disminución de las

densidades de corriente para tiempos largos de inmersión de la aleación en los medios corrosivos podrían asociarse con una película más protectora de especies que contienen oxígeno formadas durante este período. (Lytle DA y Nadagouda MN, 2010) En concordancia, resultados previos mostraron que la resistencia de polarización ( $R_p$ ) aumenta con el tiempo durante los primeros seis días y alcanza una estabilidad relativa para ocho días de exposición. (Zhang X y col., 2002) Además, es indudable que no puede ser ignorada la acción de otros compuestos orgánicos del medio de cultivo celular, que pueden ser adsorbidos en los sitios activos de ABCu y probablemente inhibir la reacción de disolución (a través de la formación de una película protectora que crece a medida que aumenta el tiempo de exposición). (Scendo M., 2008) En el caso de la SS, los valores de potencial de corrosión (**Figura IV.4**) son menores que aquellos medidos en el MCC (**Figura IV.5**) a medida que aumenta el tiempo de inmersión, probablemente debido a la adsorción de especies que contienen azufre detectadas por EDAX (**Figura IV.6**) (Protopopoff E y Marcus P, 2003). El estudio realizado en esta Tesis doctoral, ratifica lo expresado por otros autores en relación con la importancia de definir con exactitud la composición (incluyendo valores de pH) de las soluciones biológicas usadas para evaluar *in vitro* la corrosión y biocompatibilidad de las aleaciones dentales. (Ardlin BI y col., 2009; Wataha JC y col., 1992)

***Liberación de iones metálicos y composición de la superficie después del período de inmersión.*** En concordancia con resultados previos, (López Alías JF y col., 2006; Tibbals JE y Erimescu R, 2006; Eschler PY y col., 2003) los valores CP24h de la concentración de iones medidos por EAA mostraron una gran susceptibilidad de la ABCu a la corrosión. La comparación de los datos presentados en la **Tabla IV.1** muestra que las concentraciones de los iones liberados no son proporcionales a la composición de la aleación. Se encontró una mayor liberación de iones de aluminio que de cobre. Además, en concordancia con otros estudios anteriores, la corrosión superficial no fue uniforme; en la **Figura IV.6** se observa corrosión localizada de la región interdendrítica de la aleación. (Tibbals JE y Erimescu R, 2006) El análisis del espectro EDAX de la superficie de los discos de ABCu recién pulidos antes y después de su inmersión en SS muestra que la composición de la superficie se

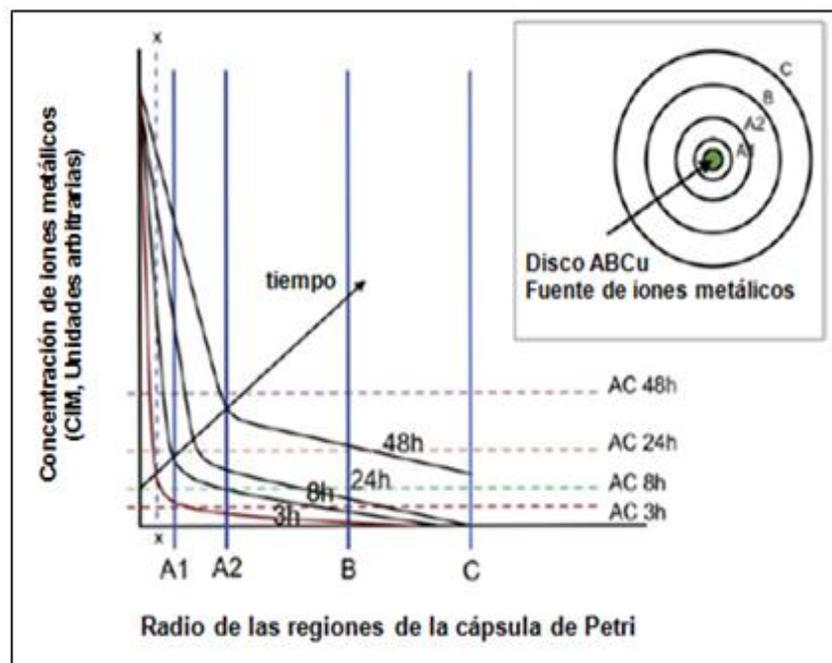
modifica con el tiempo de inmersión en SS. Después de la inmersión en SS (**Figura IV.6b-d**), se detectaron dos zonas con características superficiales diferentes: *regiones A* cubiertas con una película que crece a medida que aumenta el tiempo de inmersión, y *regiones B* sin película. Las zonas A muestran una elevada cantidad de azufre y la presencia de trazas de nitrógeno y carbono que no se identificaron antes de la inmersión (**Figura IV.6c**). En la región B se detectaron oxígeno y trazas de azufre y fósforo (ausentes antes de la inmersión).

La velocidad de disolución de los bronce al aluminio parece depender marcadamente del contenido de hierro de la aleación. Tibbals y Erimescu (*Tibbals JE y Erimescu R, 2006*) encontraron grandes diferencias en el comportamiento electroquímico de las aleaciones con 1,4% (p/p) y 4% (p/p) de Fe. En soluciones ácidas, volúmenes interdendríticos expuestos de la aleación con alto contenido de Fe mostraron disolución tanto de especies precipitadas ricas en Ni como de la matriz rica en cobre. Los resultados de la **Figura IV.6** muestran que el contenido de Ni es mayor en la región A, más corroída que la B.

*Aparente inconsistencia de los resultados de las medidas de concentración y de los efectos citotóxicos.* De acuerdo con los ensayos clínicos, (*Arvidson K y col., 1980; Arvidson K y Wróblewski R, 1978*) la elevada velocidad inicial de liberación de iones metálicos por la ABCu resultó en efectos citotóxicos en las células vecinas a la aleación (**Figura IV.7**). Estos resultados parecen estar en desacuerdo con los datos que muestran que no hay efectos citotóxicos cuando las células son expuestas a los iones individuales (excepto para el Al) o a la MT para concentraciones en el intervalo de CP8h a CP8h x 30. Probablemente, la transferencia de masa de los iones sea un proceso controlado por difusión y que da origen a un gradiente de concentración alrededor del disco metálico. Bajo estas condiciones restringidas, la concentración de los iones en la región A1 podría ser mucho más elevada que que la correspondiente al seno de la solución. (*Pereda MD y col., 2008*) También pueden ocurrir cambios en los valores de pH. Así, los datos pueden interpretarse sobre la base de un proceso controlado por la difusión de los iones.

***Distribución de las concentraciones de los iones metálicos en las diferentes regiones.*** Para describir y simular cualitativamente la variación espacio/tiempo de las concentraciones de los iones, se puede aplicar la ecuación de la segunda ley de Fick. (Stewart PS, 1998) Debido a la complejidad del sistema, se supone que podría ser simulada considerando que los iones metálicos son especies que no interactúan entre sí o con otras y que difunden dentro de la línea celular. En relación con un trabajo previo (Pereda MD y col., 2008) se consideró insignificante el transporte convectivo dentro de la monocapa de células. De acuerdo con este modelo, para cada ion individual se deberían encontrar concentraciones muy elevadas en las proximidades de la superficie del metal que van disminuyendo hacia el borde de la cápsula de Petri, formándose de esta manera, gradientes de concentraciones. La **Figura IV.11** reproduce cualitativamente los resultados del análisis tiempo/espacio de la difusión de los iones metálicos liberados por la aleación. En esta figura se incluyen las concentraciones promedio de iones (CP3h, CP8h, CP24h, CP48h) calculadas para cada perfil. Se puede observar que en la región A1 los valores de concentración para cada perfil son mucho mayores que los valores promedio calculados. De acuerdo con esta figura, la concentración de iones metálicos (CIM) acumulados durante los diferentes tiempos  $t$  (3, 8, 24 y 48 h), disminuye abruptamente desde el borde del disco (región A1) hacia la pared de la cápsula de Petri. Resultados de las simulaciones muestran que los valores de CIM cerca de la superficie del metal son varias veces mayores que los encontrados en el seno de la solución. (Pereda MD y col., 2008) Para facilitar la interpretación del gráfico, se considerará el siguiente ejemplo: a una distancia  $\chi$  (muy cercana al metal), la CIM aumenta con el tiempo (CIM 3 h < 8h < 24 h < 48 h), el valor se incrementa varias veces más que la concentración de iones promedio (CP). Bajo estas condiciones, el valor umbral de citotoxicidad en esta región se alcanza en corto tiempo (3 h de exposición). De acuerdo con este resultado, se informó que en microambientes formados entre las aleaciones y los tejidos existe una concentración local de los iones metálicos relativamente elevada. (Wataha JC y col., 2002) Este comportamiento también explica la marcada disminución del número de colonias (pequeñas y grandes) que crecen cerca del disco de aleación (región A1) (**Figura IV.11**).

Los valores de concentración umbrales de citotoxicidad pueden alcanzarse en las regiones B y C (**Figura IV.7**) para mayores tiempos de exposición (48 h). En la **Figura IV.7** se muestra la disminución del número de células para de un período de exposición de 48 h. Es adecuado mencionar que la disminución también puede relacionarse con la detención de la división celular producida por la disminución en la proliferación celular. De acuerdo con la **Figura IV.11**, los mayores valores de CP deberían encontrarse para los mayores períodos de exposición ( $CP_{3h} < CP_{8h} < CP_{24h} < CP_{48h}$ ). La citotoxicidad fuera de la región A1 también puede inferirse de la **Figura IV.8**, donde se puede observar en presencia de la ABCu un número mayor de colonias pequeñas fuera de la región A1 respecto del control y una reducción en el tamaño promedio de las colonias desde  $121 \pm 5,45 \mu\text{m}$  a  $80,83 \pm 4,95 \mu\text{m}$ . Así es que, se puede observar un efecto importante de la concentración de iones liberados por la ABCu en la distribución, tamaño y número de colonias (**Figura IV.8**).



**Figura IV.11.** Gradientes de concentración en función de las distancias radiales desde los discos de aleación, luego de diferentes tiempos (3, 8, 24 y 48 h), en unidades arbitrarias. Figura insertada: esquema de las regiones de las cápsulas de Petri con el disco de ABCu en el centro. El radio interno de la región A1 es de 0,5 cm (borde del disco de ABCu). Los radios externos ( $r$ ) de las regiones son:  $r_{A1} = 0,9$  cm;  $r_{A2} = 1,4$  cm;  $r_B = 2,4$  cm; y  $r_C = 3,4$  cm.

*Efecto de los iones individuales y efectos citotóxicos sinérgicos de la combinación de iones metálicos.* Los resultados del efecto citotóxico evaluado a través del ensayo de RN están de acuerdo con aquellos ensayos MTT informados previamente. (Ardlin BI y col., 2009) En ambos estudios, se observó para el efecto citotóxico una relación entre la respuesta a la dosis y el valor umbral para el efecto citotóxico, confirmando un mecanismo tóxico. Además, los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis doctoral coinciden con resultados informados previamente que muestran que los iones metálicos (Cu, Fe, Ni y Zn) liberados por las aleaciones también inducen una marcada citotoxicidad. (Riley MR y col., 2003; Schmalz G y col., 1998) Riley y colaboradores (Riley MR y col., 2003) informaron la escala de toxicidad de los metales basada en valores de  $CT_{50}$  (concentración tóxica que permite el 50% del crecimiento celular respecto a un grupo control):  $Zn > Cu > Ni > Fe$ . Estos autores también observaron interacciones para exposiciones a soluciones conteniendo dos iones metálicos diferentes.

La comparación del efecto citotóxico de los iones individuales muestra un elevado efecto citotóxico para cationes Al para niveles de concentración CP8h x 9 (**Figura IV.10**). Un efecto similar se observa en el caso del Zn cuando se usó CP8h x 36. Se informaron anteriormente efectos citotóxicos de los iones Al. (Lima PDL y col., 2007; Eisenbarth E y col., 2004; Kopaci I y col., 2002; Salvarezza RC y col., 1985) Sin embargo, según nuestro mejor saber, no se ha analizado el posible efecto sinérgico de combinaciones de algunos iones metálicos liberados por bronce al aluminio. Los ensayos con combinaciones de Al-Zn, cuando se usó en contracciones entre CP8h x 6 y CP8h x 9, muestran efectos sinérgicos. En relación con esta observación, la captación de cada ion (Al o Zn) puede verse alterada por la presencia del otro ion, generándose un efecto citotóxico significativamente mayor (sinergismo). Urania y colaboradores (Urania C y col., 2001) comparan los resultados obtenidos al usar el ion Zn individual o en combinación con iones Cu (Zn-Cu), y encuentran acumulados en las células concentraciones significativamente mayores del ion Zn al estar combinado con Cu. Además, para la mezcla se halló una marcada disminución de la viabilidad celular y el contenido proteico. Fe y Zn también pueden interferir en otros procesos de captación de iones. (Mantha M y col., 2011; Tang F y col., 2008) Se ha sugerido que el sinergismo

de la mezcla Cu-Zn podría evidenciarse por el aumento de la absorción de Zn potenciado por la actividad redox del metal Cu en los sistemas biológicos. (Stauber JL y Florence TM, 1990; Flemming CA y Trevors JT, 1989) Además, esta combinación de Cu-Zn puede también desempeñar un papel principal en las mezclas con otros iones. Efectos sinérgicos de mezclas de algunos iones (Cu, Fe, Ni, Cr) han sido previamente identificados en daños oxidativos de ADN a través de una reducción tipo Fenton. (Moriwaki H y col., 2008) Xu y colaboradores (Xu X y col., 2011) realizaron ensayos toxicológicos tanto con iones individuales como con mezclas binarias, ternarias y cuaternarias de iones, y muestran que en la mayor parte de las combinaciones binarias las interacciones fueron sinérgicas. En concordancia con los resultados de Xu y colaboradores, los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis revelan que cuando las células osteoblásticas son expuestas a la mezcla completa de iones para CP8h x 9 el efecto citotóxico es mayor (20% de la actividad lisosomal respecto del control) que el observado para la combinación Zn-Al (cerca de 50%). Considerando que los iones individuales (excepto el Al) no presentan efecto citotóxico para valores de concentración de CP8h x 30, estos resultados indican claramente la influencia dramática de la presencia simultánea de varios iones en concentraciones cercanas a CP8h x 9 sobre la viabilidad celular de los osteoblastos.

En consecuencia, los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis doctoral sobre los efectos citotóxicos en las zonas vecinas a los discos de aleación para valores CP menores que los niveles tóxicos pueden interpretarse considerando que las células en esta región están expuestas, como resultado de gradientes de concentración, a una mezcla de iones que, siendo no tóxicos individualmente, son tóxicos en mezclas, debido a los efectos sinérgicos. Las diferentes respuestas de los iones liberados por las aleaciones y de las soluciones de sales metálicas, representando la liberación de iones por las aleaciones informadas por otros autores (Messer RLW y Lucas LC, 1999), también pueden interpretarse siguiendo este esquema.

Los ensayos *in vitro* usados adecuadamente podrían desempeñar un papel importante en la evaluación de riesgos. (Wataha JC, 2012) Si bien estos ensayos no son capaces de reproducir completa y exactamente las condiciones clínicas, permiten obtener información útil relacionada con riesgos clínicos. Es

conocido que, como resultado de la corrosión, los iones provenientes de los dispositivos médicos metálicos implantados pueden penetrar en el medio ambiente biológico. Ensayos *in vitro* informados en la literatura se llevaron a cabo usando una sal del metal correspondiente o extractos obtenidos de la disolución de muestras metálicas *ex situ* (estos extractos contienen los iones metálicos liberados por el biomaterial (puro o una aleación)). Sin embargo, según nuestro mejor saber, no se han informado en la literatura resultados provenientes de estudios comparativos sobre el efecto sinérgico de soluciones de los iones metálicos individuales y de la combinación de dos o más iones liberados. Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis doctoral muestran que mediante el análisis comparativo de resultados obtenidos con soluciones de iones individuales y por combinaciones de dos o más de los iones liberados a consecuencia del fenómeno de corrosión puede obtenerse información de valor en relación con los riesgos clínicos de algunas combinaciones sinérgicas de iones.

*Respuesta celular a los discos metálicos dentro del medio de cultivo y al medio de cultivo con sales metálicas.* En este punto, resulta interesante complementar la interpretación de algunas aparentes inconsistencias informadas previamente por otros autores (Locci P y col., 2000; Messer RLW. y Lucas LC, 1999; Niemi L y HenstenPettersen A, 1985) como resultado de ensayos de biocompatibilidad. Ellos encontraron que las funciones celulares no se alteran de manera similar en respuesta a los iones liberados por las aleaciones y a soluciones de sus sales. Ellos destacan que las sales no son adecuadas para representar la citotoxicidad de la aleación ya que la liberación de los iones es un proceso complejo con una dependencia dosis-tiempo. En este trabajo de Tesis se sugiere que cuando la concentración de los iones liberados se evalúa por espectrofotometría de absorción atómica, la concentración medida de las muestras por este método es la correspondiente al valor promedio de concentración (CP), CP del gradiente de concentración original (variación de concentración con la distancia, **Figura IV.11**). Cuando las sales o los extractos se usan para simular el efecto de los iones liberados a los medios de cultivo, la concentración es uniforme y similar a la correspondiente CP (sin gradientes de concentración). Así, Schmalz y colaboradores (SchmalzG y col.,

1998) demostraron que los resultados de los experimentos con sales y extractos presentan pequeñas diferencias. Sin embargo, en los ensayos con discos, las concentraciones cercanas a los discos son mayores y dependen del tiempo de contacto entre el metal y las células, alcanzando valores marcadamente mayores que los valores CP y sobrepasando los niveles umbrales de citotoxicidad, principalmente en el caso de mezclas con efectos sinérgicos. Por lo tanto, aunque el valor de CP medido por espectrofotometría de absorción atómica resulte menor que el valor umbral de toxicidad, cerca del disco metálico (donde la concentración de iones es elevada, **Figura IV.11**) podrían encontrarse efectos citotóxicos que causarían una disminución en la viabilidad celular.

En el medio ambiente oral, los cambios en la cantidad y calidad de la saliva, dieta, higiene oral, pulido de la aleación, distribución de las fuerzas oclusales y cepillado, pueden influir sobre la velocidad de liberación de iones. Aunque la liberación de cobre, aluminio, níquel, hierro y manganeso por parte de la ABCu se encuentra por debajo de los niveles de ingesta tolerados por el humano, pueden causar efectos citotóxicos e inflamación. Recientemente, varios estudios *in vitro* e *in vivo* informaron la acción de macrófagos en la inmediación de dispositivos médicos implantados, donde podrían estar presentes importantes cantidades de productos de degradación (iones y detritos). (Qu S y col., 2012; Thomas V y col., 2012; Hallab NJ y Jacobs JJ, 2011; Pal N y col., 2011; Vermes C y col., 2001) Lee y colaboradores (Lee S y col., 2011) estudiaron la migración y activación de los macrófagos vivos cerca de los biomateriales de titanio y sus productos de degradación. Encontraron que los macrófagos se hallan en mayor número en la inmediación de la superficie metálica que en áreas más remotas, e insinúan que la concentración de los productos de degradación podría ser inversamente proporcional a la distancia desde el biomaterial. De acuerdo con estos resultados, la investigación realizada en este trabajo de Tesis mostró efectos citotóxicos mayores en las zonas vecinas a la aleación.

Finalmente, para evaluar la citotoxicidad de los iones metálicos se han aplicado diferentes criterios. Algunos autores han sugerido que para evaluar la citotoxicidad de los materiales dentales deberían usarse los materiales completos. Otros consideran que aunque ciertos ensayos permitan

evaluar la citotoxicidad total de una aleación, no posibilitarían el estudio de la toxicidad de los componentes individuales. La existencia de los gradientes de concentración puede contribuir a la interpretación de las aparentes discrepancias informadas por otros autores cuando se usan dos fuentes diferentes de iones metálicos: soluciones de sales metálicas de varios iones y muestras de aleaciones dentales. Se considera importante resaltar que los estudios realizados en este trabajo de tesis demuestran que tanto los ensayos con aleaciones dentales como con la mezcla de los iones son muy convenientes para evaluar los posibles efectos sinérgicos de los iones y también de las variaciones de citotoxicidad espacio/tiempo.

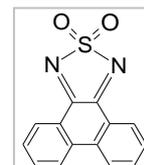
La relevancia clínica de los resultados está en relación con la existencia de gradientes de concentración controlados por difusión que causan que en las zonas cercanas al metal las concentraciones resulten mucho mayores que los valores umbrales de citotoxicidad. Estas elevadas concentraciones de iones pueden explicar el efecto citotóxico significativo en esta región, en concordancia con los ensayos clínicos. (*Issa Y y col., 2008; Geurtsen W, 2003; Arvidson K y col., 1980; Arvidson K y col. 1978*)

## SECCIÓN B

# CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS ENSAYADOS COMO PROTECTORES DE LA CORROSIÓN DE LOS BIOMATERIALES DENTALES METÁLICOS

## 1. TDZ

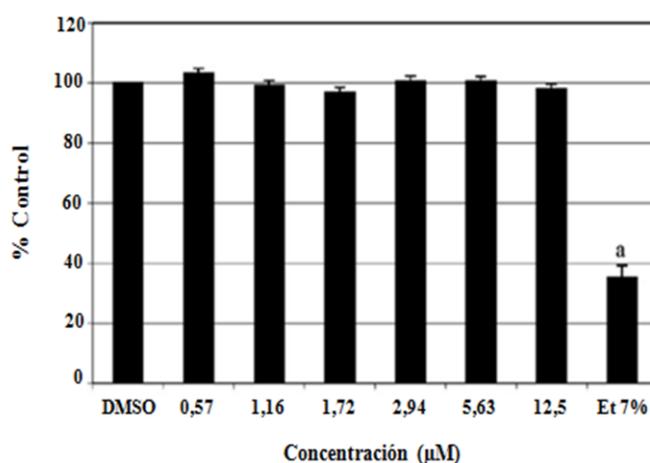
### 1.1. Determinación de la citotoxicidad y genotoxicidad



#### 1.1.1. Ensayos de citotoxicidad

##### 1.1.1.1. Rojo neutro

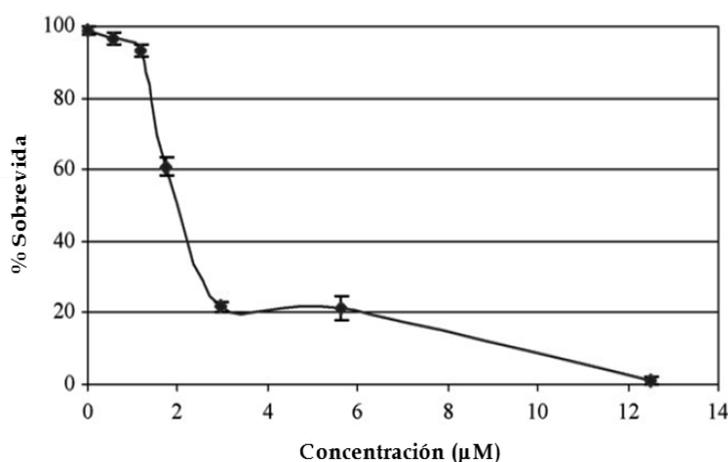
La **Figura IV.12** muestra el efecto de diferentes concentraciones de TDZ sobre las células CHO-K1, para 24 h de exposición. La viabilidad celular se calculó a partir del porcentaje de absorbancia de las células tratadas con TDZ respecto al control con DMSO (**ec. III.1**). El análisis de los resultados experimentales mostrados en la **Figura IV.12** indica que la actividad lisosomal observada en presencia de TDZ en el intervalo de concentraciones 0,57–12,50  $\mu\text{M}$  es significativamente mayor que la del cultivo control positivo ( $p < 0,001$ ), no encontrándose diferencias significativas entre células tratadas con diferentes concentraciones de TDZ con respecto al control negativo en presencia de DMSO. Considerándose estos resultados, los ensayos de *aberraciones cromosómicas estructurales* (ACE), *índice mitótico* (IM) y *formación de colonias* (FC) se llevaron a cabo en presencia de TDZ en el intervalo de concentraciones 0,57 – 12,50  $\mu\text{M}$ .



**Figura IV.12.** Efecto de diferentes concentraciones de TDZ sobre las células CHO-K1 para 24 h de exposición, evaluado por el ensayo de rojo neutro. a. Diferencia significativa a  $p < 0,001$ .

### 1.1.1.2. Formación de colonias celulares

La **Figura IV.13** muestra los datos de supervivencia de las células CHO-K1 para 7 días de incubación, expresados como porcentaje de supervivencia de las células tratadas con TDZ con respecto al control con DMSO. El análisis de los resultados experimentales mostrados en la **Figura IV.13** indica que la tasa de supervivencia celular no cambia significativamente para soluciones de TDZ 0,57 y 1,16  $\mu\text{M}$ . De acuerdo al valor de la diferencia significativa mínima (dsm) (al nivel  $p < 0,001$ ), la menor concentración de TDZ que induce una disminución significativa en la FC es 1,72  $\mu\text{M}$ . Esta disminución representa una reducción del 38% en el número de colonias con respecto a las del experimento control en presencia de DMSO. Sin embargo, para TDZ en concentraciones 2,94 y 5,63  $\mu\text{M}$ , se observó una disminución del 80%, mientras que para TDZ en concentración 12,94  $\mu\text{M}$  se midió una disminución de 100%, con una diferencia significativa al nivel  $p < 0,001$ .



**Figura IV.13.** Tasa de supervivencia de las células CHO-K1 determinada por el ensayo de FC en presencia continua de diferentes concentraciones de TDZ. Los datos indican la supervivencia como porcentaje de las células tratadas con respecto al control con DMSO,

### 1.1.2. Ensayos de genotoxicidad

#### 1.1.2.1. Pruebas de aberraciones cromosómicas estructurales e índice mitótico

En la **Tabla IV.2** se presentan los resultados obtenidos de la observación y análisis de ACE de las células CHO-K1 tratadas con diferentes concentraciones de TDZ. Los resultados muestran que el tratamiento con TDZ induce el incremento de aberraciones tipo cromátida respecto a las células

control en presencia de DMSO (**Figura IV.14**). Sin embargo, solo para la concentración 12,50  $\mu\text{M}$  se observó una diferencia significativa con el correspondiente incremento de metafases anormales ( $p < 0,001$ ).

Tratamiento ( $\mu\text{M}$ )	Metafases anormales (%) <sup>a</sup>	Metafases anormales (%) <sup>b</sup>	Aberraciones cromosómicas por 100 células			
			LA <sup>c</sup>	F <sup>d</sup>	F'' <sup>e</sup>	I <sup>f</sup>
Control	----	0,3	0,3 (0,06)	----	----	----
DMSO	0,3	1,0	1,0 (0,08)	0,3 (0,06)	----	----
0,57	0,6	1,3	0,6 (0,08)	1,0 (0,08)	----	----
1,16	0,6	1,6	1,0 (0,08)	0,6 (0,08)	----	----
1,72	1,3	2,3	1,0 (0,08)	1,3 (0,08)	----	----
2,94	1,3	2,3	1,66 (0,09)	1,0 (0,08)	0,3 (0,06)	----
5,63	0,5	3,0	2,5 (0,15)	----	0,5 (0,07)	----
12,5	2,6	5,0	3,0 (0,17)	3,3 (0,17)	----	0,3 (0,06)

El error estándar se indica entre paréntesis

<sup>a</sup>Metafases anormales: metafases con al menos una aberración cromosómica. Metafases exhibiendo solo lesiones tipo cromátida no son consideradas como anormales

<sup>b</sup>Metafases anormales: metafases con al menos una aberración cromosómica. Metafases exhibiendo solo lesiones tipo cromátida son consideradas como anormales

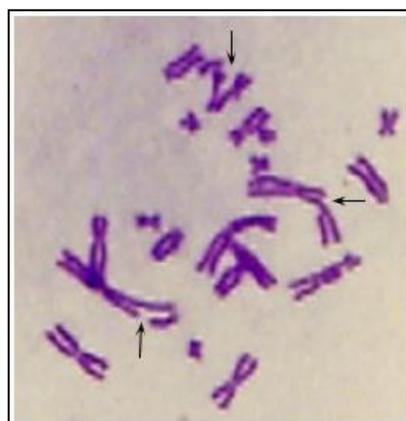
<sup>c</sup>LA: lesión tipo acromátida (gap: brecha intersticial)

<sup>d</sup>F': fractura tipo monocromátida

<sup>e</sup>F'': fractura isocromátida

<sup>f</sup>I: lesión tipo intercambio

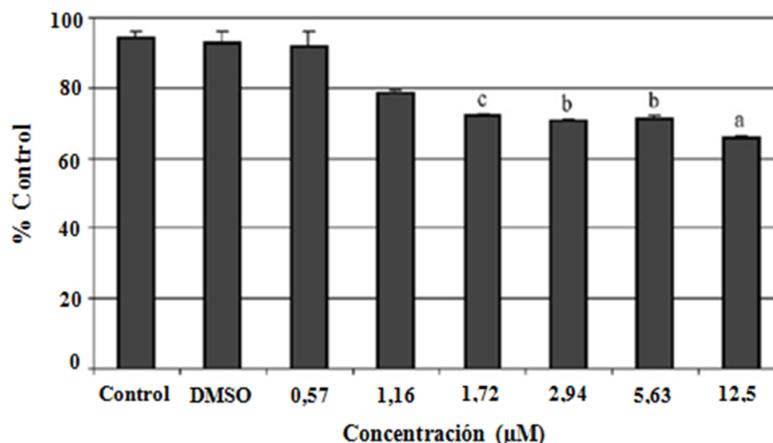
**Tabla IV. 2.** Frecuencia de ACE en células CHO-K1 tratadas con diferentes concentraciones de TDZ ( $\mu\text{M}$ ).



**Figura IV.14.** Microfotografía óptica de metafases de CHO-K1 con aberraciones tipo cromátida (flechas) después del tratamiento con TDZ por cada ciclo celular. Magnificación: 1000x.

En la **Figura IV.15** se presentan los resultados obtenidos de la observación y análisis del IM de las células CHO-K1 tratadas con diferentes concentraciones de TDZ. Se muestra una disminución significativa del IM respecto de las células control en presencia de DMSO, para concentraciones de

TDZ  $\geq 1,72 \mu\text{M}$ . Se observa una marcada reducción frente al tratamiento con TDZ  $12,50 \mu\text{M}$ . Para esta concentración, la actividad mitótica de los cultivos disminuyó a  $f = 0,29$  (ec. III.3) ( $f = 1$  para el control en presencia de DMSO).



**Figura IV.15.** Índice mitótico en células CHO-K1 tratadas con diferentes concentraciones de TDZ ( $\mu\text{M}$ ). Diferencia significativa a: a.  $p < 0,001$ , b.  $p < 0,01$  y c.  $p < 0,05$ .

Los compuestos orgánicos presentan diferentes niveles de toxicidad de acuerdo a su composición, características estructurales, tiempo de exposición y concentración (Fateme P y col., 2009; Padmavathi V y col., 2008; Varvara S y col., 2008). Algunos derivados 1,2,5-tiadiazol no son tóxicos y muestran diversas propiedades farmacológicas. (Ismail ZH y col., 2008; Wright JB, 1964) Sin embargo, otros tiadiazoles isómeros como 1,3,4-tiadiazoles han sido propuestos como eficientes inhibidores de la corrosión pero pueden ser citotóxicos (Padmavathi V y col., 2008). Recientemente, se ha informado el uso de derivados del heterociclo 1,3,4-tiadiazol como inhibidores de corrosión de acero al carbono en medio ácido (Fouda S y col., 2009). Nuestro grupo de trabajo, informó (Svartman EL y col., 2006) sobre una nueva y eficiente síntesis de otro potencial inhibidor de la corrosión de cobre en medio ácido, TDZ (Barbosa MR y Mirífico MV, 2006; Becker MD y col., 2004; Jordán Dansilio MA, 2004; Becker MD, 2004; Montaña AN, 2003); sin embargo, el uso de este compuesto está condicionado en función de la toxicidad sobre el medio ambiente y la salud. Según nuestro mejor saber, no existen referencias previas acerca de la citotoxicidad y genotoxicidad de TDZ por lo que es necesario determinar su límite de toxicidad para evaluar su uso potencial como inhibidor de la corrosión no tóxico.

Los hallazgos reportados en este trabajo de tesis acerca de la citotoxicidad y la genotoxicidad de TDZ permitieron identificar el valor umbral (1,16  $\mu\text{M}$ ) de TDZ capaz de garantizar los mínimos efectos adversos sobre las células de mamífero.

Los ensayos de rojo neutro mostraron que en el intervalo de concentraciones 0,57 – 12,50  $\mu\text{M}$ , TDZ podría ser considerado como no citotóxico. A la luz de estos resultados, para evaluar la genotoxicidad por medio de las pruebas ACE, IM y FC se seleccionó este intervalo de concentraciones de TDZ.

El ensayo de IM reveló que la tasa de sobrevivencia celular no disminuye en los tratamientos con TDZ en el intervalo de concentraciones 0,57 - 1,16  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, en el intervalo de concentraciones 1,72 – 5,63  $\mu\text{M}$  de TDZ, se detectó una disminución moderada, mientras que en los cultivos tratados con 12,5  $\mu\text{M}$  de TDZ se observó una disminución importante cercana al 30% ( $p < 0,001$ ). Además, para esa misma concentración elevada (12,5  $\mu\text{M}$ ) se observó un incremento significativo de las aberraciones tipo cromátida.

Con el objetivo de investigar el efecto de la exposición crónica a TDZ, se seleccionaron los ensayos de FC ya que proporcionan información significativa sobre la capacidad reproductiva de las células luego de la exposición crónica a productos químicos. Para 7 días de tratamiento con 0,57 y 1,16  $\mu\text{M}$  de TDZ, las células no mostraron disminución significativa de la supervivencia. Sin embargo, en el intervalo de concentración 1,72 – 12,50  $\mu\text{M}$  se observó una disminución marcada desde ca. 40 a 100% de la sobrevivencia celular.

En resumen, los resultados que se refieren a un tiempo corto de exposición (ACE, IM) reflejan un efecto clastogénico con una disminución crítica del IM para la mayor concentración de TDZ ensayada (12,50  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, los ensayos de FC que simulan exposiciones crónicas muestran que las concentraciones mayores a 1,16  $\mu\text{M}$  de TDZ presentan una inhibición mayor que el 40% para la proliferación celular y la sobrevivencia.

Del análisis comparativo de los resultados obtenidos se infiere que TDZ induce, al menos en las células CHO-K1, una cito-genotoxicidad en dependencia con el tiempo de exposición y con la dosis. Estos resultados también marcan la necesidad de complementar los ensayos cortos con ensayos

para tiempos de exposición largos a fin de simular exposiciones crónicas, ya que para tiempos cortos se pueden encontrar niveles bajos de toxicidad, que podrían conducir a un intervalo de concentraciones incorrectos.

## **2. DMSO, enjuague bucal y sus principales componentes**

Tanto DMSO como el enjuague bucal y sus principales componentes (clorhexidina, su forma salificada: digluconato de clorhexidina, xilitol y cloruro de cetilpiridinio), son compuestos orgánicos de baja toxicidad y se emplean frecuentemente en el campo de la salud (*Batista Santiesteban N, 2006; Gennaro AR, 2003*) tal como se describió en el Capítulo I, *SECCIÓN E*, inciso 2. *Compuestos orgánicos a ser probados como inhibidores o protectores de las superficies metálicas contra la corrosión*. En consecuencia, se decidió no estudiar su citotoxicidad y su genotoxicidad en este trabajo de Tesis doctoral.

## **SECCIÓN C**

# **EFECTO DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS COMO POTENCIALES PROTECTORES SUPERFICIALES DE LA CORROSIÓN DE LOS BIOMATERIALES DENTALES METÁLICOS**

## **1. COBRE**

### **1.1. Efecto de DMSO como protector del cobre frente a la corrosión**

#### **1.1.1. Medidas electroquímicas**

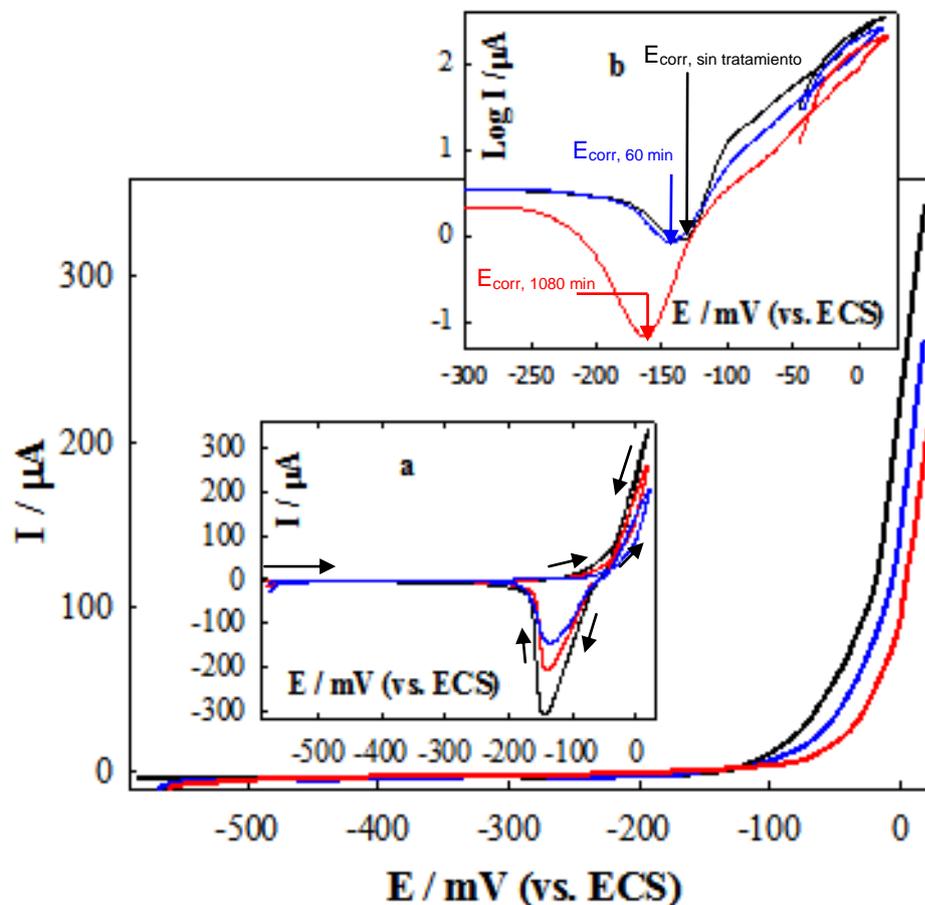
##### **1.1.1.1. Curvas de polarización potenciodinámica lineal y cíclica**

###### **1.1.1.1.1. Efecto de la adición de DMSO al medio corrosivo**

En la **Figura IV.16** (figura insertada a; línea —) se muestra la curva de polarización potenciodinámica cíclica (CPP cíclica) registrada en el medio corrosivo, MC (contiene iones cloruro (Cl<sup>-</sup>), pH = 2,6 con ácido láctico), inmediatamente después de la inmersión del ET de cobre recién pulido. El mismo comportamiento e intensidades de corriente, dentro del error experimental, se observaron para la CPP medida inmediatamente después de la inmersión del electrodo de cobre en el MC al cual se le adicionó en diferentes concentraciones (35 – 70 mM) DMSO de distintos grados de pureza (**Tabla IV.16**: Fluka p.a., Anedra r.a. y Merck p.a.). Las CsPP para cobre en el MC y en el MC + DMSO de las diferentes procedencias, muestran en el barrido anódico (**Figura IV.16**) un aumento de la corriente faradaica debido a la electrodisolución de cobre. El barrido inverso subsiguiente muestra un pico catódico debido a la electroreducción de las especies formadas en el barrido anódico de potencial precedente. El cobre inmerso en MC en ausencia y en presencia de DMSO, presenta cierta susceptibilidad a la corrosión por picadura, al invertir el barrido de potencial (1ro. anódico, 2do. catódico) la curva presenta una histéresis suave, efectuando el retorno con una intensidad de corriente superior a la del primer tramo. (*García OE y col., 1995*)

Los resultados indican que la adición de DMSO de diferente pureza al medio electrolítico MC investigado no interacciona con el cobre y/o

sus iones y no afecta la oxidación de metal en el tiempo de la experiencia electroquímica. Estos experimentos no permiten rechazar la posibilidad que DMSO necesite para interactuar con la superficie del metal inmerso en MC un tiempo mayor que el usado en las experiencias electroquímicas.

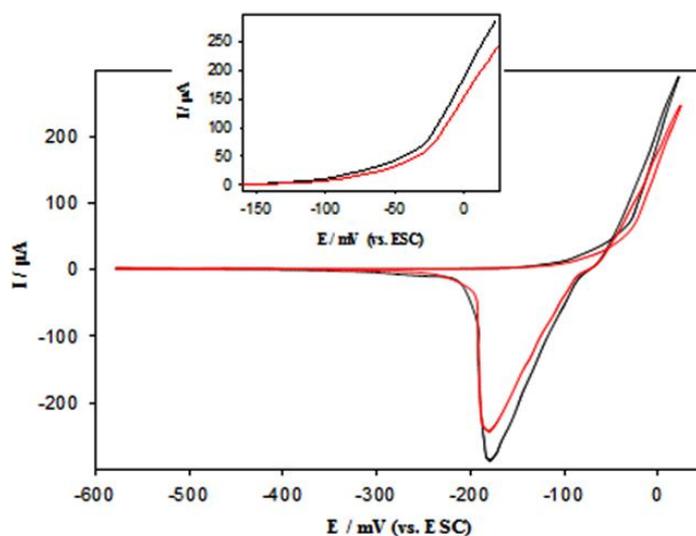


**Figura IV.16.** Curvas de polarización potenciodinámica (CsPP) (figuras insertadas: **a**) CPP cíclica; **b**) gráfico logarítmico) para el ET de cobre en MC, medido inmediatamente después de la inmersión del ET en el medio corrosivo, MC desaireado. (—): sin y con (35 – 70 mM) DMSO agregado en el MC y también para el ET previamente tratado (60 min) por inmersión en DMSO Merck p.a.; (—): ET previamente tratado (60 min) por inmersión en DMSO Fluka p.a.; (—): ET previamente tratado (1080 min) por inmersión en DMSO Fluka p.a..  $\nu = 5$

#### 1.1.1.1.2. Efecto del tratamiento superficial de cobre por inmersión en DMSO

Se modificó la superficie del cobre por inmersión del ET en DMSO durante diferentes tiempos, y se investigó el efecto del tratamiento sobre la corrosión del metal en MC. Se llevó a cabo un estudio electroquímico de las muestras de cobre con la superficie modificada y se compararon los resultados con los obtenidos para cobre sin modificar.

Las CsPP medidas en el MC para el ET de cobre previamente inmerso en DMSO durante un tiempo de 60 y 1080 min muestran un comportamiento similar pero con diferentes intensidades de corriente de oxidación (y reducción) según la pureza del DMSO empleado para el tratamiento. En la **Figura IV.16** (figura insertada **a**); línea —: 60 min y línea —: 1080 min) se muestran las CsPP en el MC inmediatamente después de colocado el ET de cobre tratado en DMSO Fluka p.a.. Se observa disminución de la intensidad de corriente de oxidación y de reducción de las especies generadas durante la oxidación en comparación con los resultados obtenidos para el ET sin tratar **Figura IV.16** (figura insertada **a**); línea —). También se observa (figura insertada **b**); línea —: 60 min y línea —: 1080 min) que el tratamiento causa un desplazamiento del potencial de corrosión hacia la zona catódica. Sin embargo, cuando el ET se trató con DMSO Merck p.a., las CsPP registradas en MC inmediatamente después de colocado el ET tratado fueron similares, dentro del error experimental, a las medidas para el ET sin tratar **Figura IV.16** (línea —). Si el tratamiento con DMSO Merck p.a., que se denominará DMSO de elevada pureza (ver **Tabla IV.3**), se realiza durante un tiempo mayor (1260 min) la CPP para el ET tratado registrado en el MC inmediatamente después de colocado el electrodo (**Figura IV.17**; línea —) muestra una disminución de la intensidad de corriente de oxidación y de reducción de las especies formadas durante la oxidación en comparación con los resultados obtenidos para el ET sin tratar (**Figura IV.17**; línea —).



**Figura IV.17.** Curvas de polarización cíclica del ET de cobre en MC desaireado: (—) medido inmediatamente después de la inmersión del ET limpio en el MC desaireado; (—): ET previamente tratado (1260 min) por inmersión en DMSO Merck p.a..  $\nu = 5 \text{ mVs}^{-1}$ .

En la **Tabla IV.3** se muestra la eficiencia de inhibición porcentual (EI%) calculada con la **ec. III.4** para electrodos de cobre tratados por inmersión en DMSO de distinta pureza, para diferentes tiempos (10 – 1260 min). También se pueden observar en la **Tabla IV.3** las impurezas presentes en DMSO de diferentes procedencias y su concentración (CG/EM), como así también la composición de soluciones testigo de sulfuro de dimetilo (SDM) y de disulfuro de dimetilo (DSDM) preparadas especialmente empleando DMSO Merk p.a. de elevada pureza como solvente, que fueron usadas para comprobar los resultados obtenidos con los ET tratados con DMSO de diferente pureza, durante distintos tiempos.

La pureza del DMSO empleado para el tratamiento de la superficie del electrodo de cobre por inmersión (60 min) influye en el efecto inhibitor de la oxidación del metal. El ET de cobre tratado con DMSO Merk p.a. que no contiene SDM y DSDM como impurezas, no muestra diferencias fuera del error experimental, al compararse con los resultados obtenidos para el cobre sin el tratamiento. Contrariamente, el ET tratado con un DMSO (Anedra r.a. ó Fluka p.a.), que contiene como impurezas trazas de SDM (4,8 ó 43 ppm, respectivamente) y DSDM (66 ó 84 ppm, respectivamente) muestra una disminución de la intensidad de corriente anódica (y catódica) comparada con la correspondiente al ET sin tratar. Este comportamiento se interpreta como una consecuencia del efecto protector de la corrosión del cobre en el medio agresivo causado por el tratamiento del ET con DMSO que contiene trazas de impurezas azufradas, que modifica la superficie del metal.

La protección del metal frente a la corrosión aumenta a medida que se extiende el tiempo de tratamiento por inmersión del electrodo de cobre en DMSO (ver EI%, **Tabla IV.3**, para mayor simplicidad ver **Figura IV.18** para el tratamiento del ET con DMSO Fluka p.a.). Para el tratamiento realizado con DMSO Fluka p.a., se alcanza una eficiencia de inhibición calculada a -100 mV (próximo al potencial de circuito abierto) de 24% para un tiempo de inmersión de 10 min, que aumenta hasta ca. 50% para 60 min, llegando a un 71% para 1080 min de tratamiento.

calidad DMSO	%EI <sup>a</sup>	Tiempo de inmersión (min)	Análisis CG-EM		
			SDM (ppm)	DSDM (ppm)	MeSH (ppm)
Anedra r.a.	51 ± 6 <sup>b</sup>	60	4,8	66	0
	50 ± 4 <sup>b</sup>	270			
Fluka p.a.	24 ± 3 <sup>b</sup>	10	43	84	0
	39 ± 5 <sup>b</sup>	30			
	48 ± 7 <sup>b</sup>	60			
	54 ± 8 <sup>b,c</sup>	60			
	60 ± 5 <sup>b,c,d</sup>	60			
	53 ± 4 <sup>b</sup>	180			
	71 ± 6 <sup>b</sup>	1080			
Merck p.a.	0 ± 0 <sup>b</sup>	60	0	0	0
	38 ± 6 <sup>b</sup>	1260			
DMSO (Merck p.a.) conteniendo SDM 160 ppm	54 ± 5 <sup>b</sup>	60	160	0	0
DMSO (Merck p.a.) conteniendo DSDM 200 ppm	0 <sup>b</sup>	60	0	200	0
	0 <sup>b</sup>	225			

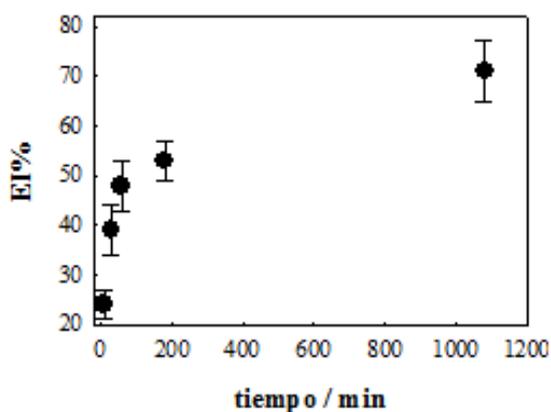
<sup>a</sup> EI% =  $[(I_{\text{blanco}} - I_{\text{DMSO}}) / I_{\text{blanco}}] \times 100$ .

<sup>b</sup> EI% calculado al potencial aplicado  $E_{\text{apl}} = -100$  mV vs ECS.

<sup>c</sup> Previo al registro de la CPP el ET se pretrató por inmersión en DMSO (60 min) y luego en el MC (60 min).

<sup>d</sup> Para el cálculo de EI% se usó como blanco la CPP reistrada para el ET de cobre recién pulido e inmerso (60 min) en MC.

**Tabla IV.3.** Efecto de la pureza de DMSO y del tiempo de inmersión del ET en DMSO sobre EI%. Se incluyen también las impurezas de DMSO y sus concentraciones determinadas por CG-espectroscopía de masas y la composición de soluciones testigo de sulfuro de dimetilo (SDM) y disulfuro de dimetilo (DSDM) preparadas especialmente empleando DMSO Merk p.a. de elevada pureza como solvente.



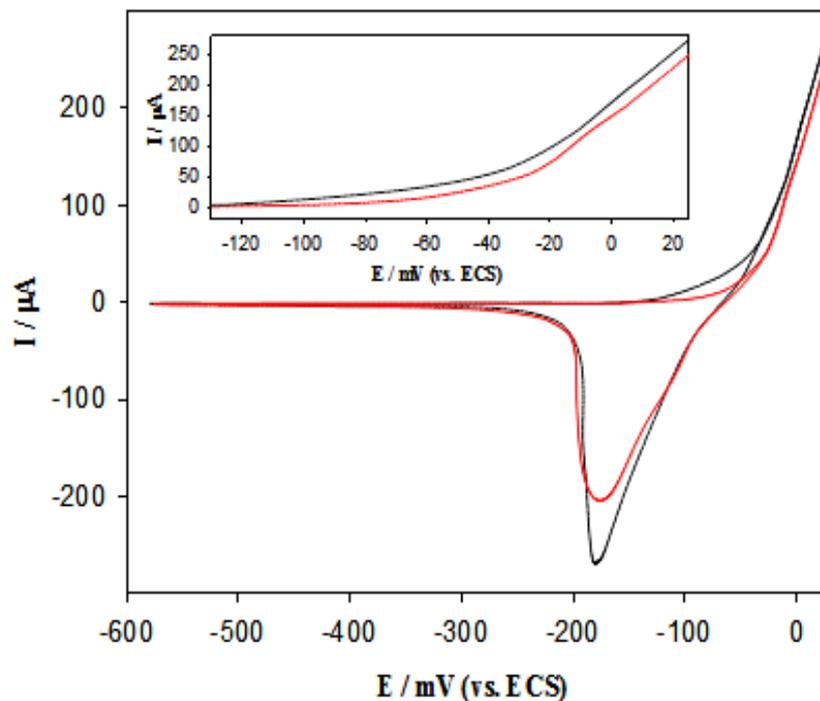
**Figura IV.18.** EI% (con barras de errores) calculado a -100 mV vs. ECS para ET tratado por inmersión durante diferentes tiempos en DMSO Fluka p.a..

#### 1.1.1.1.3. Efecto del tratamiento de la superficie de cobre por inmersión en solución de SDM o de DSDM en DMSO (Merck p.a.) de elevada pureza

Con el objetivo de comprobar los resultados detallados arriba se prepararon soluciones de concentración conocida de SDM y de DSDM en DMSO (Merck p.a.) de elevada pureza (**Tabla IV.3**) y se usaron para modificar la superficie de los electrodos de cobre previo al registro de las CsPP de los mismos en el MC. La CPP del ET de cobre tratado por inmersión (60 min) en una solución de concentración conocida de SDM (160 ppm) en DMSO de alta pureza (Merck p.a.), mostró diferencias con el medido para el ET sin tratar (que es similar el medido con el ET tratado con DMSO Merck p.a., 60 min), mientras que el tratamiento en solución de DSDM (200 ppm) en DMSO de alta pureza (Merck p.a.) resultó similar al del ET sin tratar o el medido con el ET tratado con DMSO Merck p.a., 60 min. (**Figura IV.19**).

Como se muestra en la **Tabla IV.3**, sólo el tratamiento del electrodo de cobre por inmersión en la solución de SDM en el solvente DMSO (Merck p.a.) mostró ser beneficioso para la protección del metal cobre en el MC investigado. También se observa en la **Tabla IV.3** que para un mismo tiempo de tratamiento (60 min) el efecto inhibitorio no cambia apreciablemente con la concentración de SDM contenido en DMSO. La ausencia de efecto de la concentración de SDM podría racionalizarse considerando que durante el tratamiento, el SDM forma sobre la superficie del cobre una capa multimolecular, pero únicamente la primera capa contribuye a la inhibición de la corrosión. Un efecto similar está informado en la literatura (*Ohno N. y col.*,

1993; TrabANELLI G., 1991) para el sulfuro de dibencilo ((PhCH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S) sobre la superficie del hierro en soluciones ácidas.



**Figura IV.19.** Voltametría cíclica del ET de cobre en MC medido inmediatamente después de la inmersión del ET en el MC y ET previamente tratado (60 min) por inmersión en DSDM (200 ppm) en DMSO Merck p.a.: (—); ET previamente tratado (60 min) por inmersión en SDM (160 ppm) en DMSO Merck p.a.: (—), EI% = 54 a -100 mV.

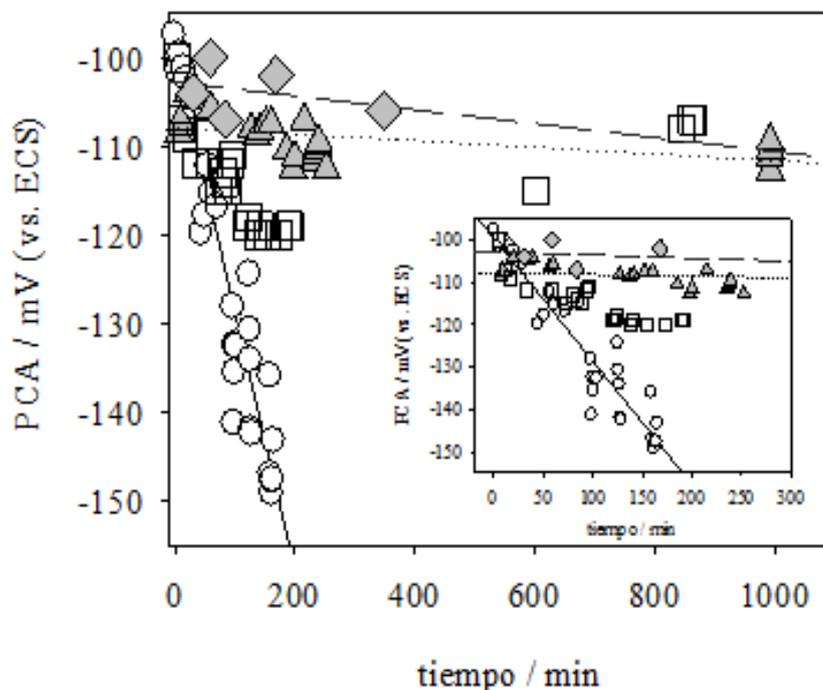
Los comportamientos observados hasta aquí presentados, sugieren una interacción rápida entre cobre y la impureza SDM comúnmente presente en el DMSO, y una interacción lenta del DMSO con el metal. Ambas interacciones causarían una modificación de la superficie de cobre por formación de una película de compuesto orgánico, que conduce a una protección del metal contra la corrosión en el MC investigado.

### 1.1.1.2. Medidas de potencial a circuito abierto

#### 1.1.1.2.1. Efecto del tratamiento de cobre por inmersión en DMSO

La **Figura IV.20** muestra los valores del potencial a circuito abierto (PCA) en función del tiempo para electrodos de cobre sin y con tratamiento en DMSO (Fluka p.a.) medidos en el MC (Cl<sup>-</sup>; con ácido láctico; pH = 2,6) y en una solución de NaCl 0,1 M (pH = 2,6; HCl), ambas soluciones

bajo condiciones de reposo y naturalmente aireadas. En la **Figura IV.20** se observa que el valor inicial del PCA (-99 mV) en el MC del ET de cobre sin tratar es cercano al valor (-108 mV) para el electrodo de cobre tratado con el DMSO (Fluka p.a.) con trazas de impurezas. Sin embargo, el PCA del electrodo de cobre tratado se mantiene constante por 1000 min (**Figura IV.20**, ▲), mientras que, el electrodo sin tratar muestra un continuo descenso del PCA con el tiempo de aproximadamente 0,3 mV/min (**Figura IV.20**, ○), comportamiento que es típico de la corrosión activa. Por otra parte, en el ensayo para el electrodo de cobre limpio inmerso en el medio agresivo 0,1 M NaCl (pH = 2,6; HCl) (**Figura IV.20**, □) se observan potenciales estacionarios. Un comportamiento similar se observa en la misma solución corrosiva 0,1 M NaCl (pH = 2,6, HCl) para el ET tratado (**Figura IV.20**, ◆).



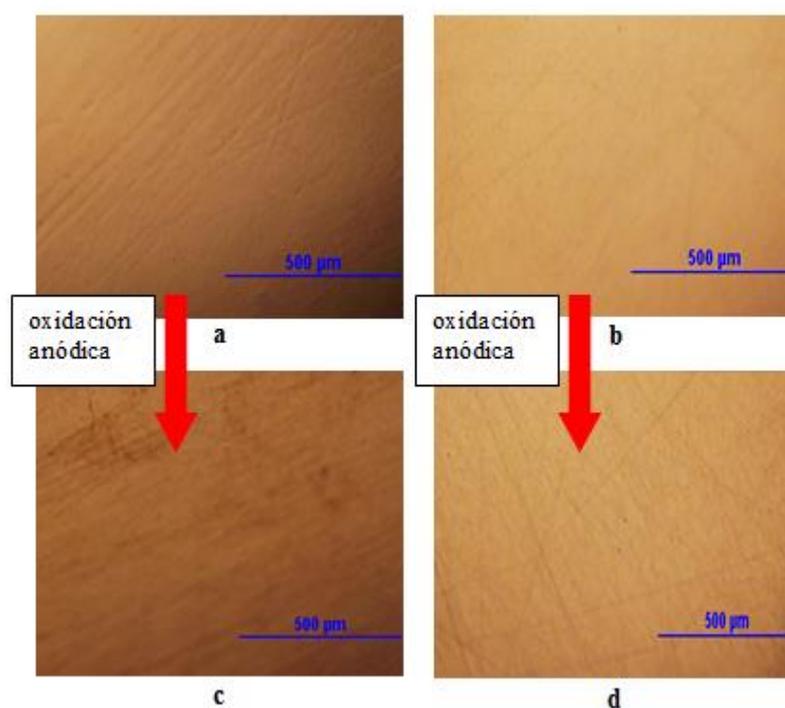
**Figura IV.20.** Medida del potencial a circuito abierto (vs. ECS) del electrodo de cobre en el medio agresivo sin desairear y en reposo, en función del tiempo: a) en MC (○) sin tratamiento; luego de la inmersión en DMSO Fluka p.a. durante 60 min (▲); b) en 0,1M NaCl pH = 2,6 (HCl) (□) sin tratamiento; (◆) luego de la inmersión en DMSO Fluka p.a. durante 60 min.

## 1.1.2. *Análisis superficial*

### 1.1.2.1. Microscopia óptica

Las microfotografías obtenidas mediante microscopia óptica de la superficie de los electrodos de cobre sin y con tratamiento por inmersión en

DMSO Fluka p.a. que contiene trazas de impurezas, durante 60 min, y después de haber sido sometidos a una polarización anódica desde -580 mV hasta -30 mV (a baja velocidad de barrido de potencial  $5 \text{ mVs}^{-1}$ ) se presentan en la **Figura IV.21**. Las observaciones microscópicas de las muestras revelan la formación de una película homogénea sobre los electrodos tratados con DMSO Fluka p.a.. En concordancia con las medidas electroquímicas, a través de la microscopía óptica se concluye que las muestras tratadas (60 min) con DMSO de menor pureza (**Figura IV.21b,d**) presentan una superficie más lisa que aquellos electrodos no tratados (**Figura IV.21a,c**).

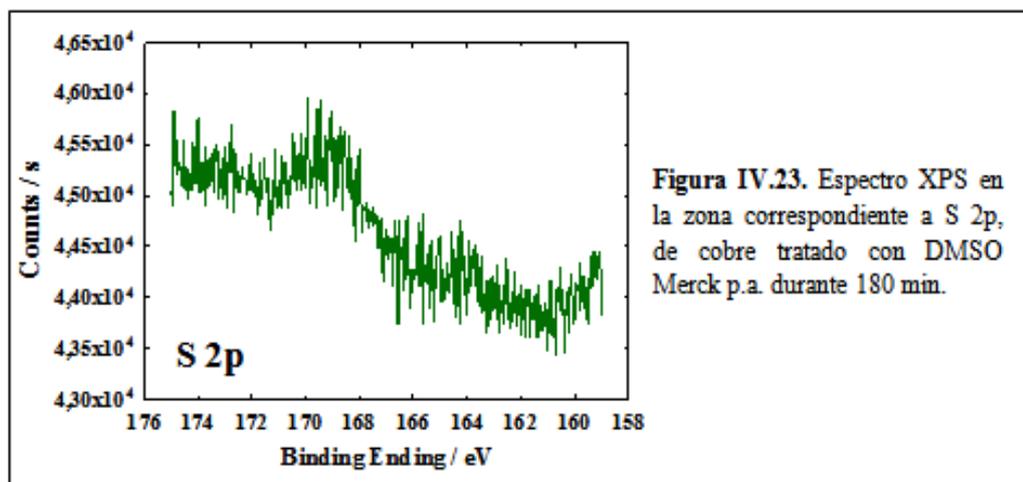
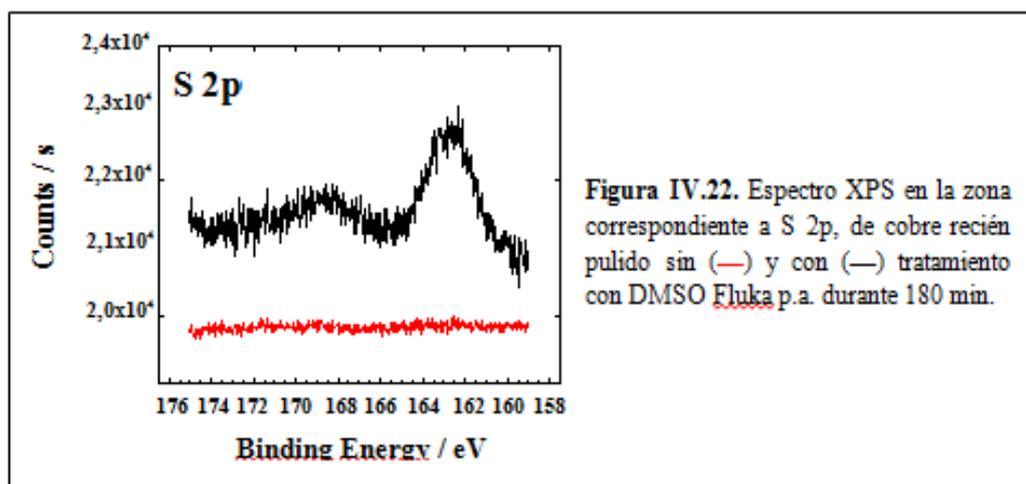


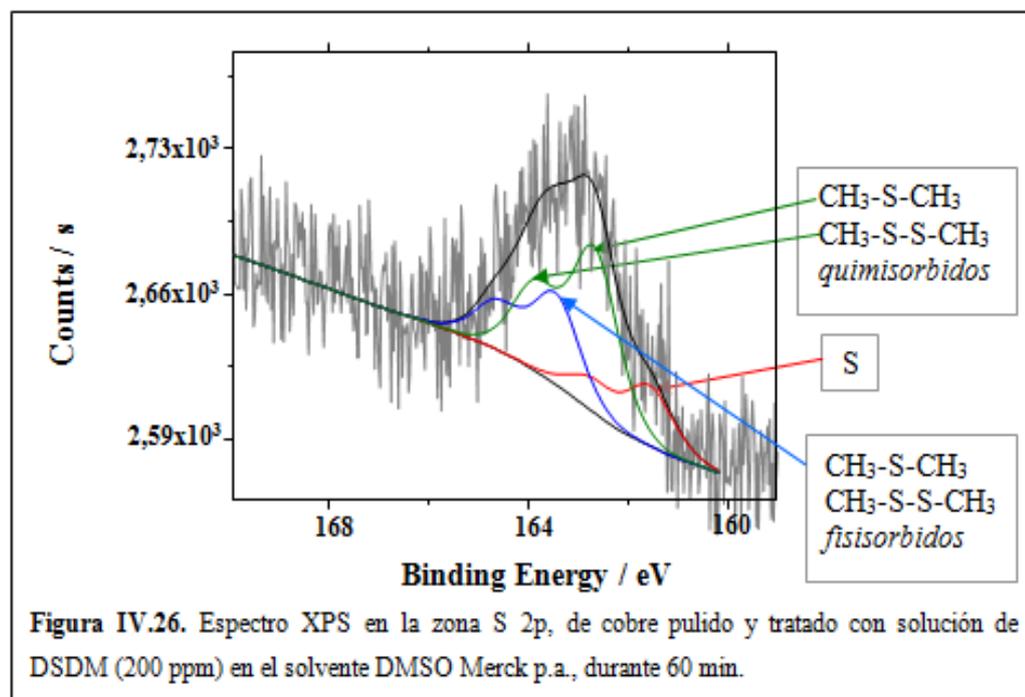
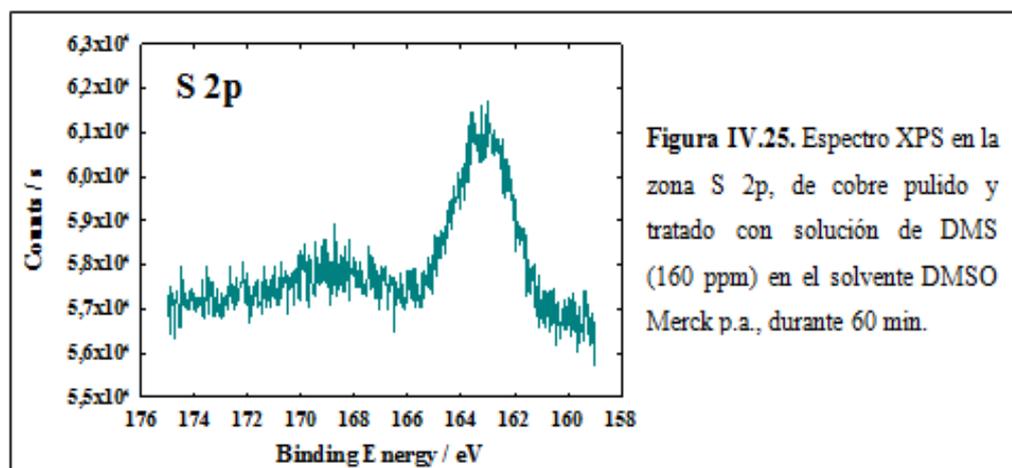
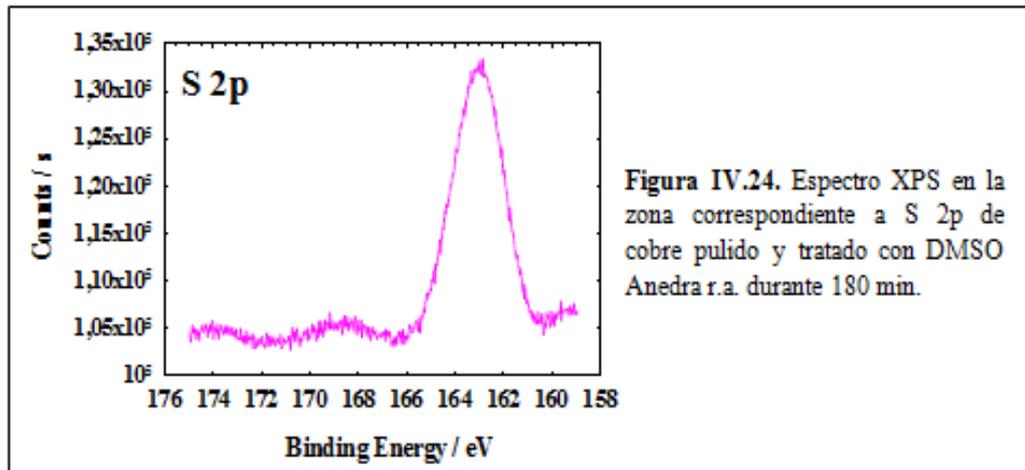
**Figura IV.21.** Microfotografías de la superficie de cobre obtenidas con un microscopio óptico para la muestra de cobre recién pulida y sin tratamiento (**a**); con tratamiento por inmersión en DMSO Fluka p.a. durante 60 min (**b**); después de oxidación anódica hasta -30 mV vs ECS de la muestra de metal no tratada (**c**) y previamente tratada (**d**).

### 1.1.2.2. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos x

Los espectros XPS completos para cobre sin tratamiento y tratado por inmersión en DMSO de diferentes grados de pureza y en soluciones de SDM y/o DSDM en DMSO (Merk p.a.) de elevada pureza mostraron para alguna de las muestras un pico para una energía de enlace 530,0 eV debido a la formación de óxido superficial durante el proceso de pulido e inmersión. En este trabajo se analizó en detalle en especial la zona correspondiente a azufre.

En las **Figuras IV.22 - IV.24** se presentan los espectros XPS en la zona de S 2p de muestras de cobre recién pulidas (sin tratamiento) y tratadas por inmersión en DMSO de diferente pureza, y en las **Figuras IV.25 y IV.26** el espectro de cobre pulido y tratado por inmersión en la solución de SDM (160 ppm) y DSDM (200 ppm) en el solvente DMSO Merck p.a., respectivamente, durante 60 min. En la **Figura IV.22** se presenta el espectro de muestras de cobre recién pulido y sin tratamiento (*línea —*), y tratada por inmersión en DMSO Fluka p.a. que contiene trazas de impurezas, durante 180 min (*línea —*). En la **Figura IV.23** se muestra el espectro XPS de cobre tratado con DMSO Merck p.a. para 180 min de inmersión, en la **Figura IV.24** el medido para cobre pulido y luego tratado con DMSO Anedra r.a. con trazas de impurezas, durante 180 min.





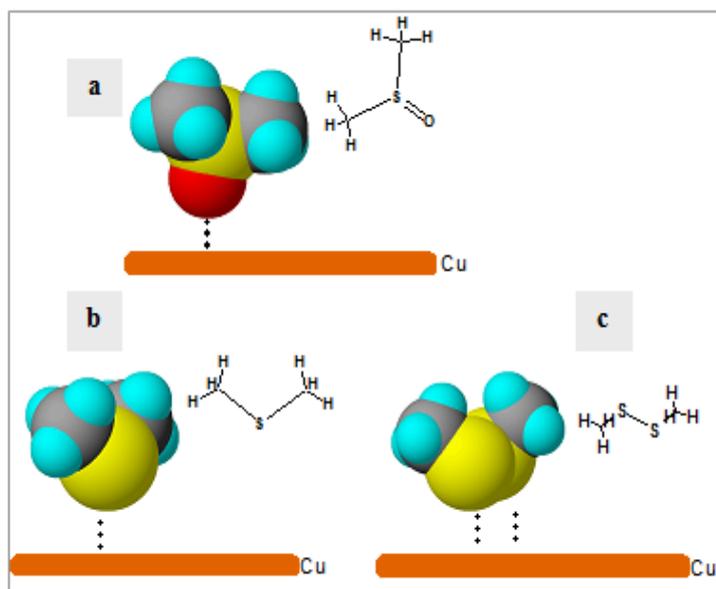
Los espectros XPS presentan picos característicos para cada elemento encontrado en la superficie de la muestra metálica. Existen publicadas tablas con los valores de energía de enlace (*binding energy*, *BE*) ya asignados a cada elemento en el estado de oxidación en que se encuentre. Los espectros XPS de las muestras de cobre tratadas con DMSO de baja pureza (**Figura IV.22**, Fluka p.a., *línea —*; **Figura IV.24**, Anedra r.a.) muestran dos señales envolventes de azufre (168,5 y 162,5 eV), que corresponderían a dos diferentes estados de oxidación del azufre, siendo aquella a 162,5 eV la más importante. Ninguna de ambas señales se observa en el espectro de las muestras de cobre recién pulidas (**Figura IV.22**, *línea —*). Aquéllos medidos para muestras tratadas con DMSO de elevada pureza (Merck p.a.), muestran una sola señal de S (**Figura IV.23**) a 168,5 eV. Las muestras de cobre pulidas y tratadas con la solución de SDM en DMSO Merck p.a. muestran las mismas señales de azufre (**Figura IV.25**) que las pretratadas con DMSO de baja pureza (**Figura IV.22**, Fluka p.a., *línea —*). La señal a 168,5 eV se asigna al enlace S 2p del grupo sulfinilo (>SO) (Tillman N y col., 1990; Wagner CD y col., 1979) presente en la estructura del DMSO, y la señal a 162,5 eV es asignable al S en enlace del SDM (CH<sub>3</sub>-S-CH<sub>3</sub>) (Yagi I S y col., 2005). En la literatura se asigna la energía de enlace 164,1 eV al S 2p de adsorción molecular de DSDM y una menor energía de enlace 161,1 eV a azufre adsorbido sobre la superficie de cobre. (Furlong OJ y col., 2010), mientras que la señal a 162,4 eV es asignada a metiltiolato (MeS<sup>-</sup>) sobre cobre (Furlong OJ y col., 2010; Lai YH y col., 2002). En la **Tabla IV.4** se presentan los valores para la relación  $R1 = S_{total}/Cu_{total}$  calculados desde los espectros XPS.

Ensayo	Cu <sup>0</sup> , solución para el tratamiento (tiempo de inmersión)	EI% (a -100 mV) para 60min de inmersión	R1 = $S_{total} / Cu_{total}$
1	Cu <sup>0</sup> recién pulido	---	0,02
2	Cu <sup>0</sup> , DMSO Merk p.a. (180 min)	0	0,45
3	Cu <sup>0</sup> , DSDM en DMSO Merk p.a. (60 min)	0	0,05
4	Cu <sup>0</sup> , SDM en DMSO Merk p.a. (60 min)	54	0,30
5	Cu <sup>0</sup> , SDM y DSDM en DMSO Merk p.a. (60 min)	51	0,14

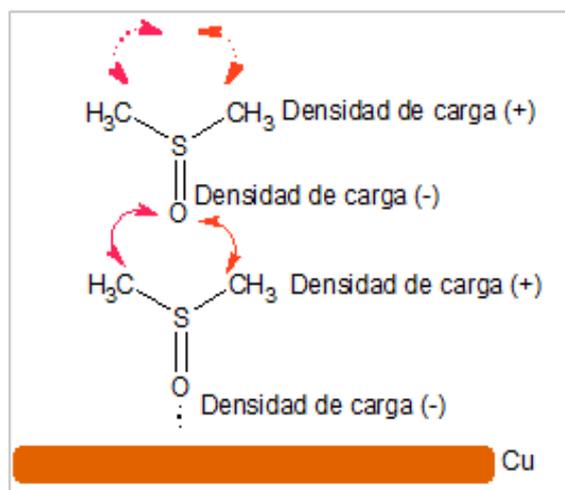
**Tabla IV.4.** Relación  $R1 = S_{total}/Cu_{total}$  calculada a partir de los espectros XPS para las muestras de cobre recién pulido, tratadas con DMSO de elevada pureza, y con SDM y/o DSDM en solución de DMSO de elevada pureza.

Si bien la investigación llevada a cabo en este trabajo de Tesis doctoral no tiene el objetivo de determinar el mecanismo a través del cual ocurre la adsorción molecular y la interacción entre la(s) molécula(s) orgánica(s) y el sustrato metálico, es decir no pretende explorar la química de las moléculas conteniendo azufre sobre la superficie de cobre, es posible realizar algunos comentarios conducentes a la interpretación de los resultados.

El análisis de las muestras por XPS se llevó a cabo después del tratamiento de las muestras del metal por inmersión en DMSO (diferentes grados de pureza) o en soluciones de SDM o DSDM en DMSO de elevada pureza (Merck p.a.) y las muestras tratadas no estuvieron en contacto con el MC previo a la medida del espectro XPS. El valor de la relación  $R1 = 0,45$  calculado para la muestra de cobre tratada con DMSO (Merck p.a.) de elevada pureza indica que el DMSO está adsorbido sobre la superficie metálica y en consecuencia resulta una alta señal de azufre. Sobre la base de la estructura química de DMSO (**Figuras IV.16 y IV.27 a**) la adsorción sería explicable a través del átomo de O con electrones no-compartidos, *electrones-n* (el átomo de S no posee electrones-n). Para efectuar las medidas electroquímicas se sumergió el material tratado y con su superficie modificada en el MC y es posible que los iones cloruro desplacen al DMSO y la respuesta electroquímica muestre un comportamiento como el del metal no tratado. Si el tratamiento se realizó durante un periodo de tiempo mayor (1260 min, **Tabla IV.3**) el DMSO de elevada pureza protegió el metal inmerso en el MC frente a la corrosión del mismo, a diferencia de lo observado para un tratamiento de solamente 60 min. Este comportamiento puede explicarse suponiendo que la superficie del metal se cubre de una película formada por capas polimoleculares (**Figura IV.28**), a mayor tiempo de tratamiento la capa de moléculas de DMSO aumenta su espesor, y cuando se coloca la muestra en el MC en el tiempo de la experiencia electroquímica se alcanzan a reemplazar por iones cloruro algunas moléculas de DMSO adsorbido y no todas. Información de la literatura para el sulfóxido DBSO (dibencilsulfóxido,  $(\text{PhCH}_2)_2\text{SO}$ ) muestra que la adsorción de DBSO vs. tiempo sobre diferentes metales en medios ácidos aumenta en función del tiempo sin alcanzar saturación. (*Trabanelli G, 1991*) Ha sido evidenciada la fácil desorción de DBSO y también la presencia de moléculas residuales de DBSO adsorbidas. (*Trabanelli G, 1991*)



**Figura IV.27.** Modelos moleculares en tres dimensiones con energía optimizada para las moléculas de DMSO, SDM y DSDM y su posible interacción con la superficie de cobre.



**Figura IV.28.** Interacción ( $\leftarrow \cdots \rightarrow$ ) DMSO-DMSO-cobre, empleando fórmulas estructurales planas para la molécula de DMSO.

El SDM (en medio de DMSO) se adsorbe fuertemente y posiblemente alcanza valores de saturación, es decir la cantidad de sustancia adsorbida llega a un valor constante que no aumenta con el tiempo, la fuerte adsorción del SDM debida a la mayor interacción del átomo de S menos electronegativo que el O (**Figura IV. 27 b**), causa el desplazamiento al menos parcialmente del DMSO (**Figuras IV.22, IV.24 y IV.25**) y resulta una relación  $R1 = 0,30$  (**Tabla IV.4**) menor que la observada con DMSO. En la **Tabla IV.3**

se observa que un aumento de la concentración de SDM en la solución de DMSO no afecta la EI%. El ion cloruro del MC no desplaza al SDM y entonces el metal queda protegido. El azufre del SDM con sus dos pares de electrones no-compartidos se adsorbería mucho más fácilmente que el DMSO y puede formar un enlace más estable a consecuencia de quimisorción, dificultándose su reemplazo sobre la superficie del metal por iones cloruro.

No puede dejarse de lado al comparar los valores para R1 medidos para cobre tratado con DMSO elevada pureza (**Tabla IV.4, ensayo 2**, R1 = 0,45) y tratado con SDM en DMSO de elevada pureza (**Tabla IV.4, ensayo 4**, R1 = 0,30) que la diferencia entre ambos podría ser originada en el diferente estado superficial de la muestra de cobre policristalino recién pulida y además por supuesto el diferente tiempo de inmersión ya que se ha dicho que por interacción lenta de DMSO con la superficie de cobre se forma una capa multimolecular cuyo espesor está relacionado directamente con el tiempo del tratamiento por inmersión.

En base a la química sobre hierro (*Kaltchev M y col., 2001; Lara J y col., 1998*) y otras superficies metálicas (*Makysmovych P. y col., 2006; Kang DH y Friend CM, 2004; Rufael TS y col., 1998*) podría anticiparse que al tratar el cobre con DSDM sobre la superficie del metal podrían formarse especies tiolato (metiltiolato:  $\text{CH}_3\text{S}^-$ ). (*Furlong OJ y col., 2010*) Estudios sobre la química de DSDM sobre una superficie de cobre (*Furlong OJ y col., 2010*) indican que DSDM reacciona con la superficie del cobre a  $-193^\circ\text{C}$  formando especies metiltiolato. El calentamiento de la superficie metálica a ca.  $-40^\circ\text{C}$  causa que una porción de las especies tiolato se descompongan generándose grupos metilo adsorbidos sobre la superficie. Calentamientos a mayores temperaturas resultan en la desorción de hidrocarburos (metano y etano) a ca.  $150^\circ\text{C}$ , debido a la reacción de especies metilo adsorbidos, hasta la completa remoción de carbono sobre la superficie y el depósito de azufre atómico. La multicapa de DSDM adsorbida sobre cobre parece estar débilmente adsorbida y se desorbe a ca.  $-114^\circ\text{C}$ . Datos de XPS e IR sugieren que inicialmente una porción del DSDM se disocia sobre la superficie para formar especies metiltiolato mientras que el remanente se adsorbe molecularmente formando una multicapa de DSDM. Por calentamiento a temperaturas superiores que

-113°C se desorbe la multicapa quedando sobre la superficie especies metiltiolato. Un calentamiento posterior a - 43°C muestra que la especie metiltiolato aún se mantiene sobre la superficie. A 117 °C el tiolato descompone sobre la superficie y este proceso se completa a 207 °C quedando finalmente sobre la superficie azufre. La energía de enlace S 2p a 161,1 eV ha sido asignada a azufre quimisorbido sobre cobre (*Lai YH y col., 2002*).

Si bien en los casos que se estudiaron se obtuvo en la zona de S 2p en los espectros XPS un solapamiento de señales asociadas a distintos estados de oxidación de S, en el intento para obtener la contribución individual de cada uno de esos estados se realizó la deconvolución de la señal compuesta, empleando el software XPS peak versión 4.1. En la **Figura IV.26** se presentan los resultados de la deconvolución correspondiente a las señal para S 2p obtenida para cobre tratado con DSDM en solución de DMSO Merk p.a. de elevada pureza. Puede observarse que la superficie ha quedado después del tratamiento cubierta por diferentes especies, sin embargo se observó una baja relación  $R1 = 0,14$  (**Tabla IV.4**), y finalmente no se observó capacidad inhibidora de la corrosión al sumergir el cobre así tratado en el MC para realizar las medidas electroquímicas, pudiéndose entonces considerar que las especies adsorbidas molecularmente han sido desplazadas por el ion cloruro presente en el MC.

### **1.1.3. Determinación de iones metálicos liberados al medio corrosivo**

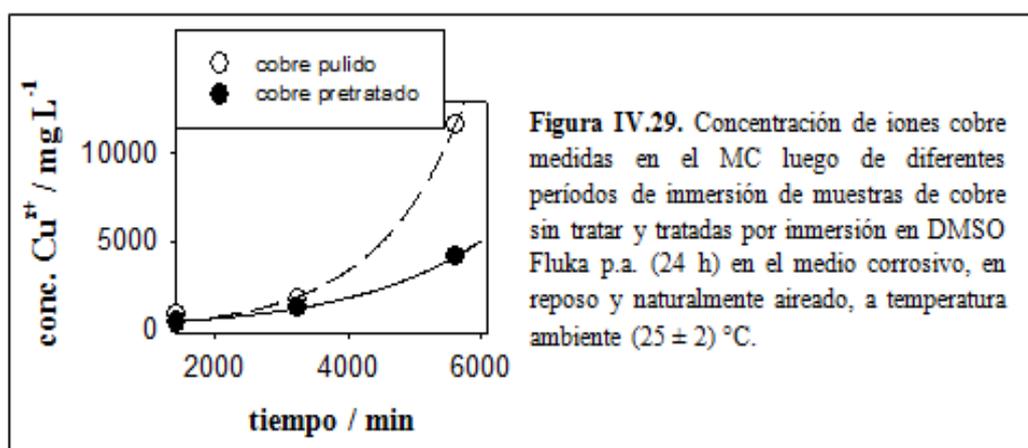
#### **1.1.3.1. Concentración de iones cobre en solución: espectrofotometría de absorción atómica**

En la **Tabla IV.5** se muestra la concentración de iones liberados por las muestras de cobre, sin tratar (ensayo control) y tratadas con DMSO Fluka p.a. que contiene trazas de impurezas azufradas, durante 24 h, para diferentes tiempos de inmersión en el MC. Se observa que la concentración de iones cobre liberados al medio corrosivo por las muestras de cobre tratadas con DMSO Fluka p.a. es menor a aquella obtenida para el control, para todos los períodos de tiempo investigados. La diferencia entre los valores obtenidos con la muestra tratada y sin tratamiento se modifica con el tiempo de inmersión en el MC. A medida que el tiempo de inmersión aumenta,

la diferencia tiende a hacerse mayor (si bien esta conclusión se observa en los datos presentados en la **Tabla IV.5**, en la **Figura IV.29** puede observarse más fácilmente).

Tiempo de inmersión en MC (min)	Concentración de $\text{Cu}^{2+}$ en MC (control) ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Concentración de $\text{Cu}^{2+}$ liberados al MC por la muestra de Cu sin tratar ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Concentración de $\text{Cu}^{2+}$ liberados al MC por la muestra de Cu tratado con DMSO Fluka p.a. por 24 h ( $\text{mg L}^{-1}$ )
1440	0	860	$435 \pm 45$
3240	0	1714	1280
5610	0	11600	4150

**Tabla IV.5.** Concentración de iones cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) medidas en el MC para diferentes tiempos de inmersión de muestras de cobre sin tratar y tratadas con DMSO Fluka p.a. (24 h) en el medio corrosivo, en reposo y naturalmente aireado, a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$ ) °C.



**Figura IV.29.** Concentración de iones cobre medidas en el MC luego de diferentes períodos de inmersión de muestras de cobre sin tratar y tratadas por inmersión en DMSO Fluka p.a. (24 h) en el medio corrosivo, en reposo y naturalmente aireado, a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$ ) °C.

La literatura (*Madhavan K y col., 2001*) informa que el DMSO actúa protegiendo al acero al carbono contra la corrosión en medio ácido. Dado que la toxicidad del DMSO es baja (*Pérez-Pastén R y col., 2006*) y que tiene numerosas y variadas aplicaciones en medicina (*Batista Santiesteban N., 2006; Ikemiya N y Gewirth AA, 2000*), en este trabajo de Tesis doctoral se decidió probarlo como protector del cobre. El cobre es el metal base de aleaciones usadas en odontología en los pueblos con menores recursos económicos (ver Capítulo I, *SECCIÓN B*, inciso 3. *Biomateriales metálicos de uso odontológico*) debido fundamentalmente a su buena resistencia mecánica y bajo costo. Como medio agresivo en este estudio se usó una saliva sintética de agresividad aumentada por la presencia de ácido láctico. En ciertas zonas de la cavidad oral donde se puede desarrollar placa bacteriana, como fosas y fisuras,

el pH salival puede alcanzar valores muy bajos como consecuencia de la presencia de ácido láctico (*Staffolani N y col., 1999*). Soluciones salinas acuosas de ácido láctico son utilizadas en variadas normativas internacionales como medio de inmersión para ensayos preclínicos sobre la resistencia de las aleaciones dentales a la pérdida de la integridad estructural debido a la corrosión (*Tibballs JE y Erimescu R, 2006*). Numerosos estudios fueron llevados a cabo usando ácido láctico para evaluar diferentes materiales incluyendo bronce al aluminio y amalgamas conteniendo cobre (*Tibballs JE y Erimescu R, 2006; Acciari HA y col., 2005*).

El DMSO empleado como inhibidor por los autores Madhavan y col. (*Madhavan K y col., 2001*) es “*dimethylsulfoxide extrapure grade*” proveniente de SISCO Research Laboratories, Mumbai, India, y según las especificaciones de la empresa que lo comercializa tiene una pureza mín. 99% determinada por CG

([http://www.srlchem.com/products/product\\_details/productId/637/treeParentId/40/Dimethyl-Sulphoxide-extrapure](http://www.srlchem.com/products/product_details/productId/637/treeParentId/40/Dimethyl-Sulphoxide-extrapure)), en cambio el DMSO Merck p.a. de elevada pureza empleado en este trabajo de Tesis doctoral en las especificaciones se indica una pureza determinada por  $CG \geq 99,9\%$ , y la misma ha sido corroborada en nuestro laboratorio.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que durante la inmersión de cobre en DMSO que contiene trazas de impurezas y en la solución de SDM en DMSO de elevada pureza, aún para cortos períodos de tiempo, la superficie del metal experimenta algún cambio y queda modificada. Parece formarse sobre la superficie del metal una película que queda fuertemente adsorbida no siendo reemplazada por los iones cloruro del MC. Esta película dificulta el proceso de disolución del metal tanto cuando está en contacto con el MC como con la solución de cloruros al mismo pH de acuerdo con el equilibrio:



El solvente DMSO de elevada pureza que no contiene SDM y DSDM, también protege al cobre frente a la corrosión en el MC investigado cuando los tiempos de tratamiento son largos. Si bien interactúa con la

superficie del metal, aún en cortos tiempos de tratamiento tal como se concluye de las experiencias por XPS, la interacción es débil y las moléculas de DMSO adsorbidas en la superficie son desplazadas por los iones cloruro presentes en el MC. Para tiempos de tratamiento largos se deben formar capas multimoleculares de DMSO y por lo tanto de mayor espesor y cuando el metal así modificado se coloca en contacto con el MC no todas las moléculas de DMSO retenidas sobre la superficie son desplazadas por el ión cloruro del MC en el tiempo de las experiencias electroquímicas.

Se concluye que el grado de pureza del DMSO influye en el efecto inhibitor de la oxidación de cobre. Los resultados obtenidos en los estudios realizados en este trabajo de Tesis doctoral sugieren una interacción rápida entre cobre y las impurezas comúnmente presentes en el DMSO, y una interacción lenta del DMSO con el metal, que conducen a una protección del cobre frente a la corrosión en el MC. Es un hecho informado en la literatura (*Al-Haidary YK y Saleh JM, 1988*) que los metales, entre los que está incluido el cobre, presentan una mayor tendencia para la adsorción de SDM que para DSDM cuando ellos se encuentran en fase gaseosa. La etapa controlante de la velocidad en cada caso es la quimisorción del SDM o DSDM sobre la superficie que luego es seguida por la ruptura de los enlaces S-S, C-S y C-H sobre la superficie de los adsorbatos metálicos.

Existe entonces la posibilidad de que la protección del acero frente a la corrosión del hierro en medio ácido (HCl y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) causada por el DMSO informada en la literatura no sea realmente debida a la reducción del sulfóxido para generar SDM como proponen los autores (*Madhavan K. y col., 2001*) y que en cambio, sea debida a las impurezas (SDM y DSDM) que con frecuencia acompañan al solvente DMSO.

Por otra parte, la literatura (*Sherif E-SM, 2012; Maqsood AM y col., 2011; Sherif E-SM, 2010; Sherif E-SM y Almajid AA, 2010; Antonijevic MM y col., 2009; Milic SM y Antonijevic MM y col., 2009; Sherif E-SM y col., 2008; Sherif E-SM, 2006; Sherif E-SM y Park SM, 2005; El Warraky A y col., 2004; Lee HP y Nobe K, 1986; Bacarella L y Griess JC, 1973*) informa que la disolución anódica de cobre en medio conteniendo iones cloruro está afectada por la concentración de iones cloruro. A bajas concentraciones de cloruro la disolución de cobre ocurre a través de la formación de cloruro cuproso (CuCl)

que se transforma en la especie soluble  $CuCl_2^-$  por reacción con exceso de cloruros. Mientras que con elevadas concentración de iones cloruro se forman complejos de cobre:  $CuCl_3^{-2}$  y  $CuCl_4^{-3}$ , además de  $CuCl$  y  $CuCl_2^-$ .

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el ácido láctico limita la formación de las especies adsorbidas y favorece el proceso de disolución del cobre. Los valores de PCA registrados después del tratamiento con DMSO Fluka p.a. de baja pureza son ligeramente más nobles en el caso de 0,1 M NaCl (pH = 2,6) que en el MC indicando que el ácido láctico está afectando en alguna extensión el proceso de corrosión cuando la superficie del cobre ha sido modificada. La solución de cloruro conteniendo ácido láctico (MC) es más agresiva que la solución de cloruro sin dicho ácido orgánico. Aunque el ion cloruro es una de las especies más agresivas, otros constituyentes presentes en el medio corrosivo, en este caso ácido láctico, también pueden ser determinantes en el comportamiento de la corrosión. El ácido láctico reacciona con los iones cobre para formar lactato de cobre que se solubiliza en el medio acuoso e impide la formación de una película protectora proveniente de la corrosión. En cambio, en la solución agresiva libre del ácido orgánico, en reposo, se forma una barrera protectora de  $ClCu$  que para largos períodos de inmersión en el medio corrosivo hidroliza formado  $Cu_2O$  (*Otmačić H y col., 2004*) que queda sobre la superficie del metal.

## 1.2. Efecto de TDZ como protector del cobre frente a la corrosión

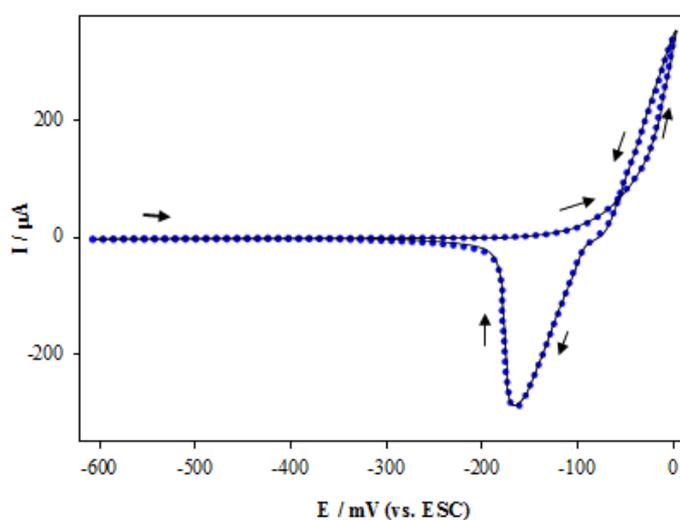
### 1.2.1. Medida electroquímica

#### 1.2.1.1. Curvas de polarización potenciodinámica

##### 1.2.1.1.1. Efecto de la adición de TDZ al medio corrosivo

En la **Figura IV.30** (*línea —*) se muestra la CPP cíclica para el ET de cobre recién pulido registrado en el MC (contiene iones cloruro (Cl<sup>-</sup>), pH = 2,6 con ácido láctico) inmediatamente después de la inmersión en el medio electrolítico corrosivo. También se incluyen en la figura las CsPP cíclicas para cobre recién pulido registrados en el MC conteniendo diferentes concentraciones (0,21 - 1,16  $\mu$ M) del potencial inhibidor en ensayo, TDZ. Las CsPP para cobre en el MC y en MC conteniendo TDZ mostraron el mismo

comportamiento. En el barrido anódico un aumento de la corriente faradaica debido a la electrodisolución de cobre. El barrido inverso subsiguiente muestra un pico catódico debido a la electroreducción de las especies formadas en el barrido anódico de potencial precedente. El cobre inmerso en MC en presencia de TDZ, también presenta cierta susceptibilidad a la corrosión por picadura, al invertir el barrido de potencial (1ro. anódico, 2do. catódico) la curva presenta una histéresis suave. (García OE y col., 1995) Estos resultados indican que la adición de TDZ al medio electrolítico investigado no afecta la oxidación de cobre o que TDZ necesita tiempo para interactuar con la superficie del metal.



**Figura IV.30.** Curvas de polarización potenciodinámica cíclicas para el ET de cobre registrado inmediatamente después de la inmersión del ET en el MC en ausencia y en presencia de TDZ (0,21; 0,42; 0,63; 0,83; 1,04 y 1,16  $\mu\text{M}$ ) agregado en el MC: (—); ET de cobre recién pulido y previamente tratado (30 y 180 min) por inmersión en DMSO Merck p.a.: (.....).  $\nu = 5 \text{ mVs}^{-1}$ .

#### 1.2.1.1.2. Efecto del tratamiento superficial de cobre por inmersión en solución de TDZ en DMSO

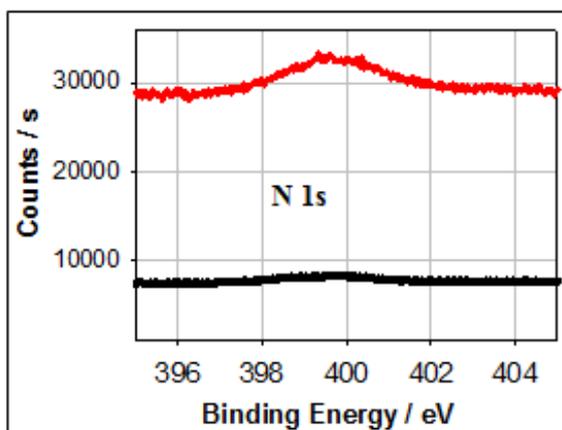
Se intentó modificar la superficie del cobre para protegerla frente a la corrosión por inmersión del ET en una solución 3,13 mM de TDZ en DMSO de elevada pureza (Merck p.a.) durante diferentes tiempos, y se investigó el efecto del tratamiento de la superficie sobre la corrosión del metal en el MC. Se llevó a cabo un estudio electroquímico de las muestras de cobre (ET) previamente tratadas y se compararon los resultados con los obtenidos para el metal tratado con el solvente puro (DMSO Merck p.a.) para los mismos tiempos de inmersión.

Las CsPP cíclicas registradas para el ET de cobre previamente inmerso en la solución de TDZ en DMSO (Merck p.a.) para los tiempos de inmersión 30 y 180 min, inmediatamente de ser inmersos en MC, muestran un comportamiento similar, dentro del error experimental, a los medidos para el ET tratado por inmersión en DMSO puro para los mismos tiempos de tratamiento, inmediatamente de ser inmersos en MC.

## 1.2.2. Análisis superficial

### 1.2.2.1. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos x

Los espectros XPS en la zona correspondiente a N1s para cobre sin tratamiento o tratado por inmersión (180 min) en DMSO de elevada pureza (Merck p.a.) se muestran en la **Figura IV.31** (línea —) y para cobre tratado por inmersión (180 min) en la solución de TDZ en DMSO (Merck p.a.) en la **Figura IV.31** (línea —)



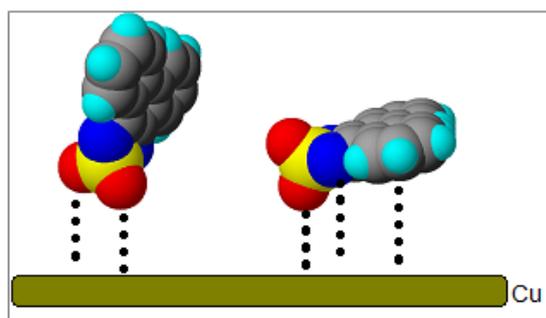
**Figura IV.31.** Espectros XPS en la zona de nitrógeno. (—): cobre recién pulido y (—): inmerso en la solución 3,13 mM de TDZ en DMSO de elevada pureza (Merck p.a.)

A fin de verificar si las moléculas de TDZ interaccionan con cobre y quedan adsorbidas sobre la superficie del metal se midieron los espectros XPS. Espectros típicos presentados en la **Figura IV.31** para la zona de energías de enlace correspondiente a N1s muestran que el cobre tratado por inmersión en solución de TDZ en DMSO previamente al registro del espectro, presenta una señal correspondiente a nitrógeno (elemento presente en la estructura de TDZ (**Figura I.15 aiii**) pero no en DMSO) que está ausente en la muestra de cobre recién pulido y en la de cobre tratado con DMSO de elevada pureza. Estos resultados indican que TDZ se adsorbe sobre cobre.

El estudio XPS indica que TDZ se adsorbe sobre cobre, pero sin embargo los estudios electroquímicos muestran que no existe un efecto inhibitor de la corrosión del cobre causado por MC cuando el metal se trata previamente con TDZ o si el potencial inhibitor es agregado al MC. El metal tratado no estuvo en contacto con el MC antes del registro del espectro XPS, pero para realizar las medidas electroquímicas se sumergió el metal tratado y con su superficie modificada en el MC que contiene iones cloruro, y es probable que estos iones desplacen a TDZ y la respuesta electroquímica sea similar a la medida para el metal no tratado con TDZ, que a la vez es la misma que para el metal tratado por inmersión en DMSO de elevada pureza por un tiempo relativamente corto (180 min).

La composición y estructura electrónica de la molécula orgánica es un factor importante en la determinación de la eficiencia del inhibitor de corrosión que actúa por adsorción sobre la superficie del metal a proteger. La estructura molecular influye sobre la capacidad donora de electrones de la molécula y por lo tanto en su adsorción y efecto inhibitor de la corrosión.

Sobre la base de la estructura química y espacial de TDZ (**Figura I.15 aiii y I.15 b**) su adsorción sobre el metal podría ser explicable a través de la nube electrónica- $\pi$  conjugada, extendida y conectada entre los anillos aromáticos y el heterociclo que favorecería la adsorción sobre el sustrato metálico con una orientación plana de la molécula y paralela a la superficie del metal y/o los átomos de O del grupo  $>SO_2$  y N del heterociclo con electrones no-compartidos (electrones-n) (**Figura IV.32**). Una interacción entre el metal y los electrones no compartidos de los oxígenos favorecería una disposición de la molécula perpendicular a la superficie metálica (**Figura IV.32**).



**Figura IV.32.** Posible interacción (•••) entre TDZ y la superficie de cobre.

Se conoce que la extensión del sistema electrónico- $\pi$  le confiere estabilidad química a TDZ resultando químicamente inerte en medio acuoso, estable en aire y en la mayoría de los solventes orgánicos comunes. (Svartman *EL y col.*, 2006; Aimone *SL y col.*, 2000; Svartman *EL y col.*, 1999) TDZ es protonado sobre uno de los átomos de nitrógeno del heterociclo únicamente por ácidos de minerales fuertes como ácido sulfúrico o ácido clorosulfónico concentrados. (Svartman *EL y col.*, 2006) Por otro lado se conoce que TDZ se reduce electroquímicamente formando el dianión TDZ<sup>2-</sup> (Aimone *SL y col.*, 2000; Svartman *EL y col.*, 1999). En base a los potenciales de reducción se pensó que existía la posibilidad que TDZ<sup>2-</sup> también podría ser generado por reducción de TDZ causada por cobre y que los iones cobre podían formar un aducto con TDZ<sup>2-</sup> que podría quedar sobre la superficie metálica protegiéndola frente al ataque agresivo del medio electrolítico.

Las características del compuesto heterocíclico y los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis sugieren que la adsorción del tiadiazol sobre el metal ocurre directamente como consecuencia de las interacciones donoras-aceptoras entre los electrones- $\pi$  del sistema aromático extendido hacia el heterociclo y/o los electrones- $p$  de los heteroátomos y la orbital  $d$  vacante de los átomos de la superficie del cobre. Así, la interacción entre TDZ y el metal sería de naturaleza física (fisisorción), y fácilmente reemplazable por los iones cloruro del MC.

En nuestros estudios que parecen indicar que TDZ sería un potencial inhibidor de la corrosión de cobre en medio ácido, (Grillo *CA y col.*, 2009) el medio agresivo es ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ). Los iones sulfato/bisulfato ( $SO_4^{2-} / SO_4H^-$ ) poseen menor capacidad que el ión cloruro para desplazar a las moléculas de TDZ adsorbidas en la interfase metal/solución y como resultado en medio acuoso ácido sulfúrico el compuesto TDZ tiene mayor posibilidades de actuar inhibiendo la corrosión de cobre.

## 2. ALEACIÓN BASE COBRE

### 2.1. Efecto del enjuague bucal y de sus principales componentes como protectores de la ABCu frente a la corrosión

#### 2.1.1. *Medidas electroquímicas*

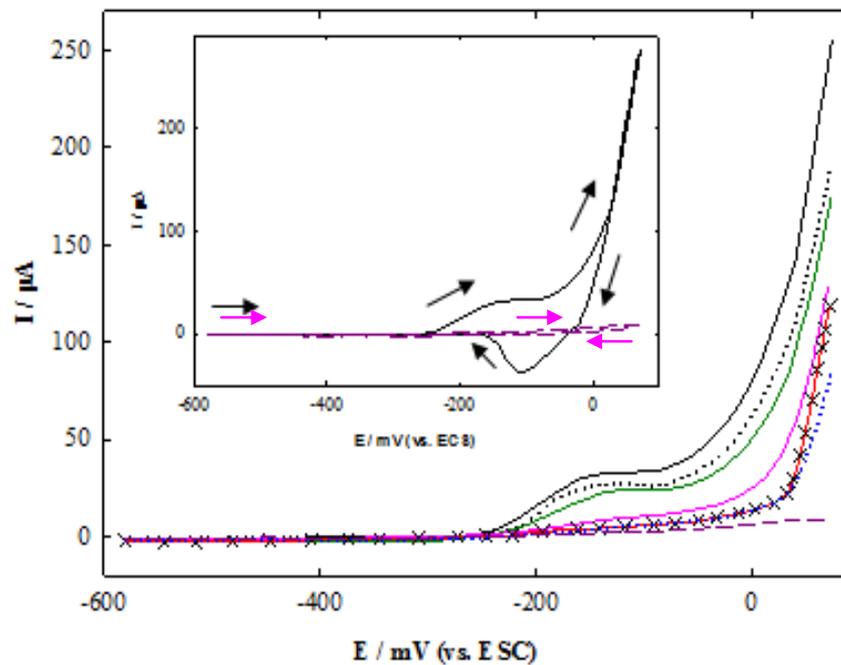
##### 2.1.1.1. Curvas de polarización potenciodinámica lineal y cíclica

##### 1.2.1.2.1. Efecto del tratamiento superficial de ABCu por inmersión en el enjuague bucal y en sus principales componentes

En la **Figura IV.33** se muestran las curvas de polarización potenciodinámica anódicas (CsPP) para la ABCu recién pulida y después del tratamiento por inmersión durante diferentes tiempos (15 a 360 min) en el enjuague bucal, registradas inmediatamente después de la inmersión de los electrodos en SS (pH 4,77). La figura insertada muestra las CsPP cíclicas para la ABCu recién pulida y para la tratada con el enjuague bucal para el mayor tiempo de tratamiento (360 min).

En **Figura IV.33** se observa que los valores de intensidad de corriente de las CsPP registradas inmediatamente después de la inmersión de ABCu en SS para los diferentes tiempos de tratamiento estudiados, resultan menores que las correspondientes al ET recién pulido y sin tratar, para potenciales aplicados mayores que -230 mV. La disminución de las intensidades de corriente respecto a las correspondientes para el ET sin tratar aumenta a medida que crece el tiempo del tratamiento del ET. En la figura insertada en **Figura IV.33** muestra en la CPP cíclica para ABCu recién pulida que la disolución del metal comienza a -230 mV, a ca. -140mV se observa una meseta correspondiente a la formación de una película pasiva sobre la ABCu que se rompe a ca. -60 mV y continúa la disolución de la aleación hasta el límite de potencial del barrido inicial anódico (+30 mV). En el barrido catódico subsiguiente al anódico se observa un pico de reducción a -100 mV correspondiente a la reducción de la(s) especie(s) generadas en el barrido anódico. En la CPP cíclica típica mostrada en la figura insertada (línea - - -) para ABCu tratada (360 min) por inmersión en el enjuague bucal no se

observan disolución anódica de la aleación y el pico de reducción observado para ABCu sin tratar.

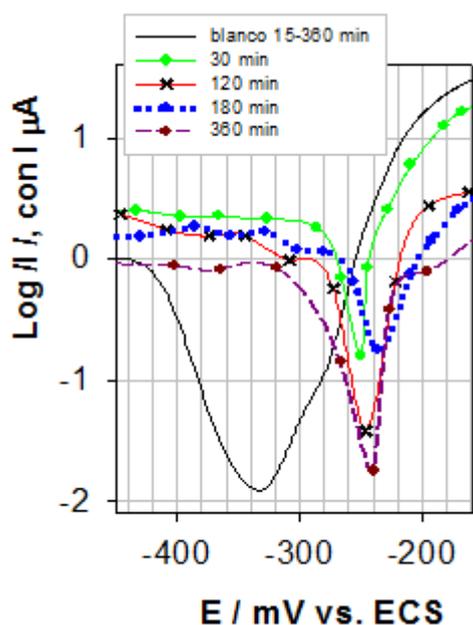


**Figura IV.33** Curvas de polarización potenciodinámica para ABCu en SS ( $37 \pm 2$ )°C medidas inmediatamente después de la inmersión del ET en el medio corrosivo (SS) en diferentes condiciones: recién pulido y recién pulido e inmerso en agua 15-360 min (—), tratado por inmersión en el enjuague bucal durante diferentes tiempos: 15 min (●●●), 30 min (—), 60 min (—), 120 min (-x-), 180 min (●●●) y 360 min (- - -). Figura insertada: curvas de polarización potenciodinámica cíclicas para la ABCu medidas inmediatamente después de la inmersión en SS del ET bajo diferentes condiciones: recién pulido (—), tratado por inmersión durante 360 min en el enjuague bucal (- - -).  $\nu = 5 \text{ mVs}^{-1}$ .

En la **Figura IV.34** se muestran las curvas  $\log |I|$  versus  $E$  correspondientes a las CsPP para ABCu en SS medidas inmediatamente después de la inmersión del ET en el medio electrolítico, en las diferentes condiciones: recién pulido y tratado por inmersión en el enjuague bucal para diferentes tiempos. Se observa un menor potencial de corrosión (-330 mV) para la aleación ABCu recién pulida que para la aleación tratada con el enjuague bucal (ca. -240 mV), una marcada disminución de la corriente anódica y un ligero aumento de la corriente catódica.

El comportamiento para la ABCu tratada con el enjuague bucal, detallado arriba, indica la presencia sobre la superficie de la aleación de una película compacta inhibidora de la corrosión. La ausencia del pico catódico también es atribuida al hecho de que el inhibidor está fuertemente adsorbido sobre la superficie de la ABCu. El efecto protector crece a medida que aumenta

el tiempo del tratamiento del ET con el enjuague bucal. El desplazamiento del potencial de corrosión hacia la dirección anódica para la ABCu tratada con el enjuague bucal también está asociado a la formación sobre la superficie de la aleación de la película protectora por el tratamiento previo a las medidas electroquímicas

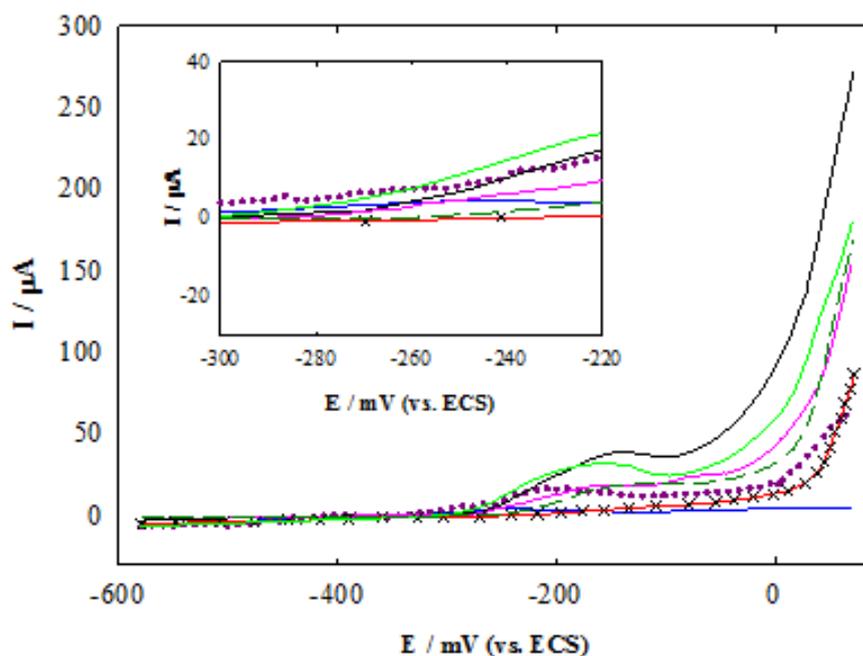


**Figura IV.34.** Gráfico logarítmico de  $I$  vs  $E$  correspondientes a las CsPP para ABCu en SS ( $37 \pm 2$  °C) medidas inmediatamente después de la inmersión del ET en el SS en diferentes condiciones: recién pulido y recién pulido e inmerso en agua 15-360 min (—), tratado por inmersión en el enjuague bucal durante diferentes tiempos.

En la **Figura IV.35** se muestran las CsPP anódicas registradas en SS (pH 4,77) inmediatamente después de la inmersión de la ABCu recién pulida (línea —) y luego de ser tratada durante 120 min en CH y en los principales componentes del enjuague bucal en las mismas concentraciones en que se encuentran en la formulación del enjuague: clorhexidina, CH, (línea —); su forma salificada: digluconato de clorhexidina, DGCH, (línea - - -); xilitol, XL, (línea ●●●) y cloruro de cetilpiridinio, CCP, (línea —); y en la mezcla de DGCH, XL y CCP, (línea —). Para la comparación, se incluyó la CPP registrada para la ABCu tratada durante 120 min con el enjuague bucal inmediatamente después de la inmersión en SS (línea -x-).

En las CsPP de **Figura IV.35** se observa que para todos los tratamientos la intensidad de corriente resulta menor que la correspondiente para el ET sin tratamiento. Las mayores disminuciones de intensidad de corriente se observan para los tratamientos con el enjuague bucal o con CCP. Los tratamientos con el enjuague bucal o DGCH desplazan en sentido anódico

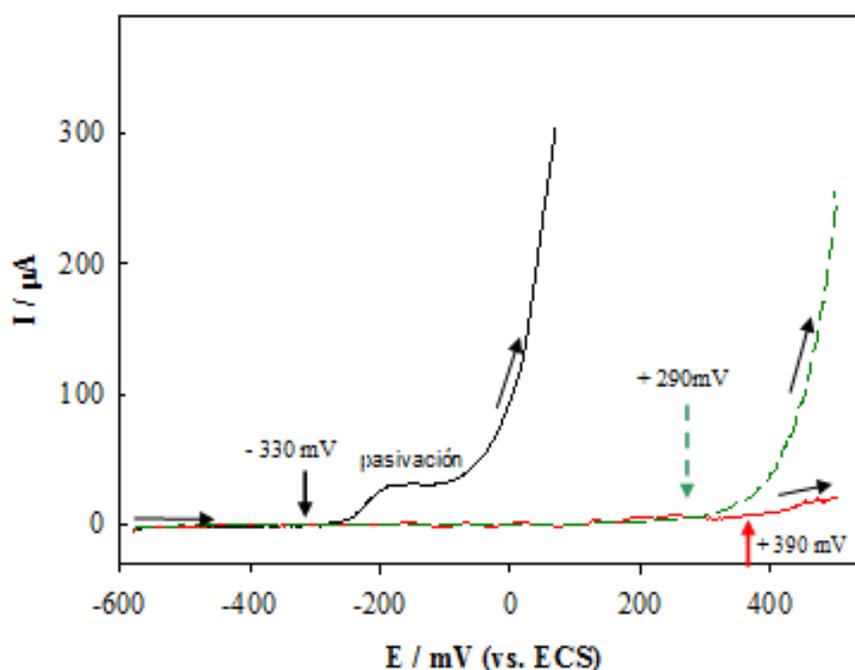
el potencial a circuito abierto respecto de la aleación sin tratar, mientras los tratamientos con los restantes componentes del enjuague bucal lo desplazan en sentido catódico. Los resultados indican que todos los tratamientos protegen la superficie metálica. Sin embargo, la mayor protección se logra con el enjuague bucal. Si bien las intensidades de corriente para el tratamiento con CCP son las menores para potenciales mayores que el PCA, el potencial a circuito abierto resulta ser el más catódico (**Tabla IV.6**), y en esta zona de potenciales las corrientes resultan similares para ambos inhibidores.



**Figura IV.35.** Curvas de polarización potenciodinámica para ABCu en SS ( $37 \pm 2$ )°C medidas inmediatamente después de la inmersión en el medio corrosivo del ET en diferentes condiciones: recién pulido o recién pulido e inmerso en agua 15-360 min o tratado con DMSO Merck p.a. 120 min (—), tratado por inmersión durante 120 min en: enjuague bucal (-x-), DGCH 0,12% (- - -), CH al 0,15% en DMSO Merck p.a. (—), XL al 10% (•••), CCP al 0,5% (—) y la mezcla de DGCH 0,12%, XL 10% y CCP 0,5% (—).  $\nu = 5 \text{ mVs}^{-1}$ .

En la **Figura IV.36** se muestran las curvas CsPP anódicas típicas registradas en SS (pH 4,77) inmediatamente después de la inmersión de la ABCu tratada en diferentes condiciones: recién pulida (*línea —*), tratada en SS durante 1440 min (*línea - - -*), y tratada por inmersión en el enjuague bucal 120 min y luego en SS 1440 min (*línea —*). Se observa que cuando los electrodos han sido previamente inmersos en el enjuague bucal y luego en SS o directamente en SS para luego registrarse las CsPP, la intensidad de corriente disminuye marcadamente en ambos casos desplazándose el potencial de

corrosión en dirección anódica respecto del ensayo control (ET recién pulido) (-330 (control)  $\rightarrow$  +290  $\rightarrow$  +390 mV vs. ECS); siendo mayor el desplazamiento hacia la zona anódica cuando el ET es tratado con el enjuague bucal previo a la inmersión en SS. El desplazamiento del potencial de corrosión en la dirección anódica y la disminución en la intensidad de corriente causado por la inmersión de ABCu en SS estarían asociados a la formación de una capa más protectora de especies conteniendo oxígeno (Lytle DA y Nadagouda MN, 2010) formada durante este periodo.

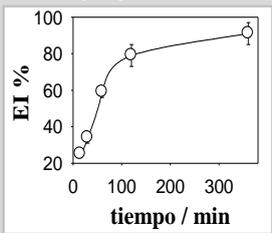


**Figura IV.36.** CsPP anódicas para ABCu en SS ( $37 \pm 2$  °C) medidas inmediatamente después de la inmersión en el medio corrosivo del ET en diferentes condiciones: recién pulido (—), tratado por inmersión durante 1440 min en la SS (- - -), tratado por inmersión durante 120 min en el enjuague bucal y luego durante 1440 min en la SS (—).  $v = 5$  mVs<sup>-1</sup>.

Tratamiento de ABCu (ET)	Potencial de circuito abierto (mV vs. ECS)
DGCH	- 250
Enjuague bucal	- 240
ABCu (sin tratamiento)	- 330
XL	- 341
mezcla	- 359
CCP	- 365

**Tabla IV.6.** Potencial a circuito abierto, para ABCu recién pulida o tratada con el enjuague bucal o algunos de sus componentes medido en SS en reposo y deaireada, para 5 min de inmersión.

La **Tabla IV.7** muestra la eficiencia de inhibición (EI%) calculada con la **ec. III.4** para electrodos de ABCu tratados por inmersión en el enjuague bucal durante diferentes tiempos (15-360 min), así como en sus componentes principales para un tiempo de tratamiento común de 120 min. La protección de la aleación frente a la corrosión aumenta a medida que se extiende el tiempo de inmersión del electrodo de trabajo en el tratamiento. Para el tratamiento realizado con el enjuague bucal, se alcanza una eficiencia de inhibición medida a 0 mV del 25% para un tiempo de inmersión de 15 min, que aumenta marcadamente hasta un 79% para 120 min, llegando a un 91% para 360 min de tratamiento. Al observarse a un tiempo relativamente corto (120 min) un importante efecto inhibitor por parte del enjuague bucal, se decide evaluar el efecto protector de sus principales componentes fijando el tiempo de inmersión en 120 min. Los resultados presentados en las **Tablas IV.6 y 7** evidencian que si bien los componentes principales muestran efecto inhibitor, el mayor efecto protector de la ABCu frente a la corrosión lo evidencia el enjuague bucal, por lo que en los estudios siguientes sólo fue evaluado dicho inhibitor.

Inhibidor	EI% <sup>a,b</sup>	Tiempo de tratamiento (min)
Enjuague bucal 	25 ± 2	15
	34 ± 3	30
	59 ± 3	60
	79 ± 6	120
	99 ± 1 <sup>c</sup>	120
	91 ± 6	360
CH al 0,15%	39 ± 3	120
DGCH al 0,12%	62 ± 5	120
XL al 10%	67 ± 4	120
CCP al 0,5%	99 ± 1	120
Mezcla de DGCH, XL y CCP	43 ± 3	120
<sup>a</sup> EI% = [(I <sub>blanco</sub> - I <sub>Inh</sub> ) / I <sub>blanco</sub> ] x 100). <sup>b</sup> EI% calculado al potencial aplicado E <sub>apl</sub> = 0 mV vs ECS. <sup>c</sup> Previo al registro de la CPP el ET se trató por inmersión en el enjuague bucal (120 min) y luego en el MC (1440 min).		

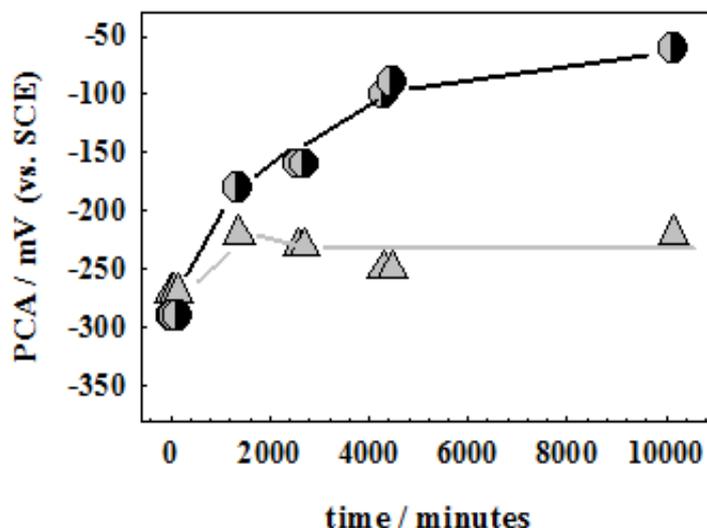
**Tabla IV.7.** Efecto del tiempo de inmersión del ET en el enjuague bucal y sus principales componentes sobre EI%.

Los comportamientos observados hasta aquí presentados sugieren un efecto sinérgico ente los componentes del enjuague bucal, lo que conduce a una mayor protección de la aleación contra la corrosión en el MC investigado. Sin embargo, no puede desestimarse que en la formulación el enjuague bucal existen otros componentes minoritarios como sorbitol, neoesperidina y dihidrocalcona cuya composición y funcionalidad química indicarían que podrían actuar como inhibidores de la corrosión de metales.

### 2.1.1.2. Medidas de potencial a circuito abierto

#### 2.1.1.2.1. Efecto del tratamiento de ABCu por inmersión en el enjuague bucal sobre el potencial a circuito abierto

La **Figura IV.37** muestra la variación del PCA en función del tiempo para las muestras de ABCu, sin tratar y tratadas durante 120 min con el enjuague bucal, inmersas en la SS durante 7 días.



**Figura IV.37** Medida del potencial (vs. ECS) a circuito abierto del electrodo de ABCu en el medio agresivo (SS) sin desairear y en reposo, en función del tiempo: a) ABCu (▲) sin tratamiento; b) ABCu tratada durante 120 min con el enjuague bucal (●).

Se observa que el PCA inicial de la ABCu sin tratar (-270 mV vs. ecs) es ligeramente mayor (ca. 20 mV) que el correspondiente a la aleación tratada con el enjuague bucal (-290 mV vs. ecs). El PCA, en ambos casos, varía con el tiempo hacia valores más positivos, conduciendo a la conclusión que la ABCu en ambas condiciones se pasiva. (Mareci D y col., 2005) Sin embargo, los cambios son más importantes cuando la aleación se

trató con el enjuague bucal. Además, el PCA para la aleación previamente tratada aumenta continuamente con el tiempo de inmersión en el medio agresivo, mientras que para el metal limpio parece alcanzar para tiempos cercanos a 3000 min un valor para el PCA que luego se mantiene sin cambios para mayores tiempos de inmersión. Este comportamiento mostraría que la ABCu tratada con enjuague bucal continua protegiéndose con el tiempo de inmersión en SS y que presenta mayor resistencia frente al ataque agresivo de SS.

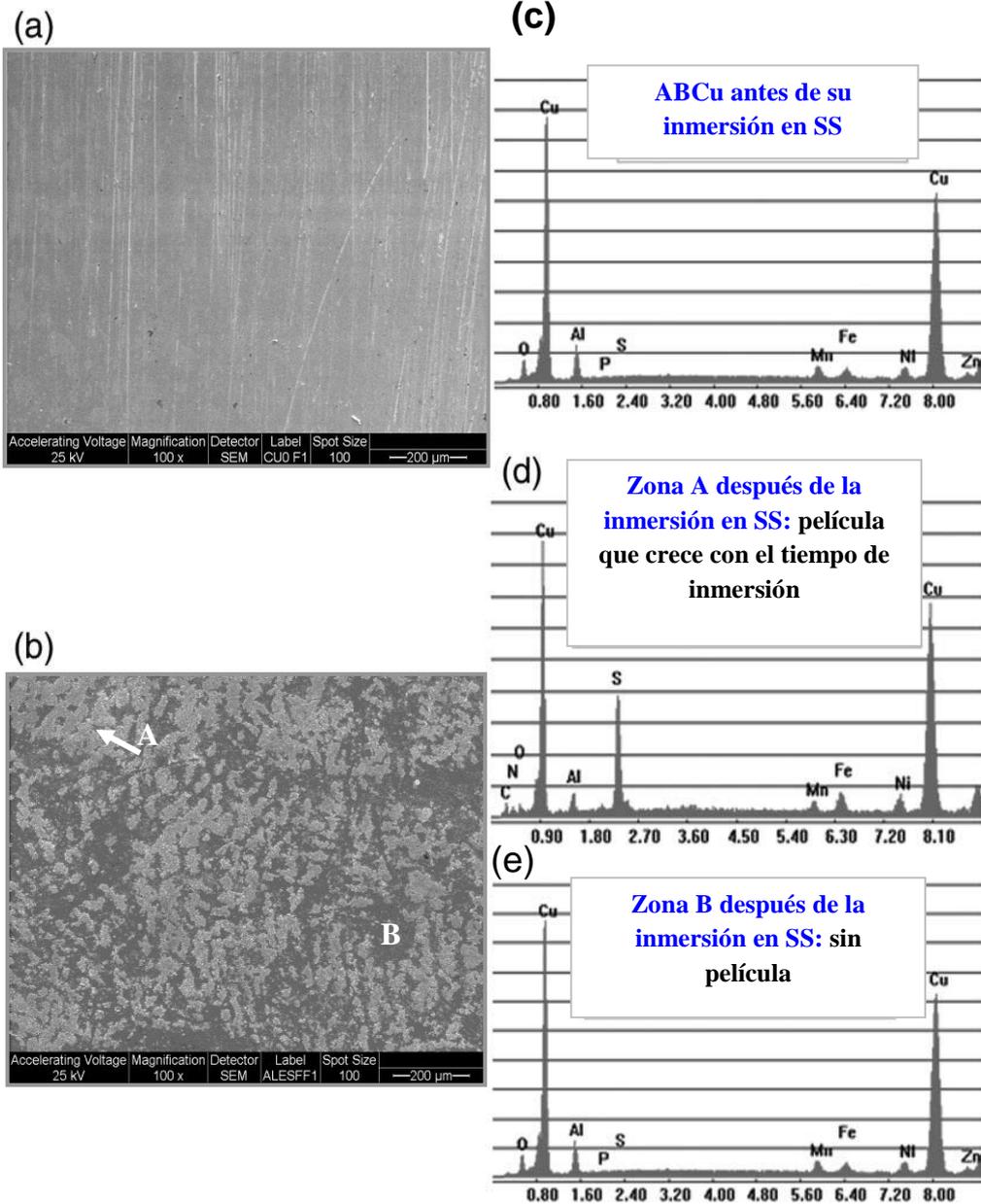
### 2.1.2. *Análisis superficial*

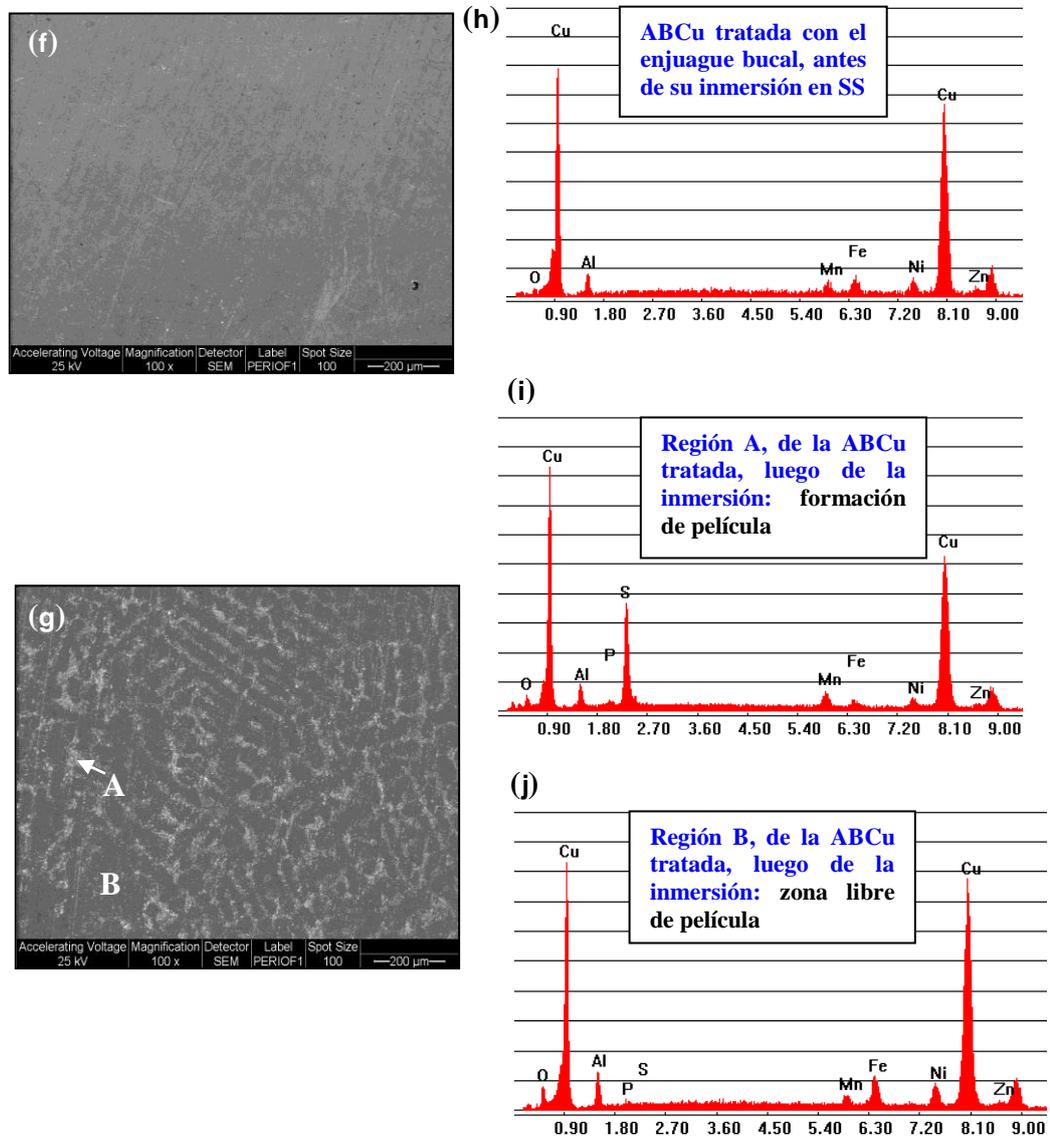
#### 2.1.2.1. **Microscopía electrónica de barrido y espectrometría de energía dispersiva de rayos x**

La **Figura IV.38 a,b,f,g** muestra las microfotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido de la superficie de la ABCu antes y después de su inmersión en SS durante 10 días, habiendo sido previamente sometida a dos condiciones distintas: recién pulida y, pulida y tratada durante 120 min con el enjuague bucal. Se observa que la apariencia microscópica de la superficie de la aleación tratada (**Figura IV.38 f**) es menos rugosa que la sin tratar (**Figura IV.38 a**) que además muestra rayas de pulido. La superficie de la aleación inmersa en el medio corrosivo durante 10 días (**Figura IV.38 b**) revela un daño superficial severo, que disminuye cuando la aleación es tratada con el enjuague bucal antes de su inmersión en el medio corrosivo durante 10 días (**Figura IV.38 g**). En la **Figura IV.38 d,e** se observa, luego de la inmersión de ABCu pulida en SS, zonas en la superficie con diferentes características y composición. También se observan dos zonas en la superficie de la ABCu tratada con enjuague bucal después de la inmersión en SS (**Figura IV.38 i,j**): regiones “A” claras cubiertas con una película, y regiones “B” oscuras sin película.

Los resultados del análisis EDAX de la composición de la superficie de la ABCu pulida y tratada fueron también incluidos en la **Figura IV.38 c,d,e** y **h,i,j**, respectivamente (para el análisis EDAX de la ABCu sin tratar *ver* Capítulo III, *SECCIÓN A, inciso 1.1.2. Análisis superficial*)

En la **Tabla IV.8** se muestran los resultados comparativos del análisis EDAX de la superficie recién pulida, pulida y tratada con el enjuague bucal y después de la inmersión de ambas en SS para las dos zonas (A y B) de diferente apariencia y composición.





**Figura IV.38.** Microfotografías de la superficie de ABCu obtenidas con un microscopio electrónico de barrido (magnificación 100x): (a, f) antes y (b, g) después de la inmersión en SS durante 10 días, a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ , habiendo sido previamente sometida a dos condiciones distintas: (a,b) pulida; (f,g) pulida y tratada durante 120 min con el enjuague bucal. El análisis EDAX de las superficies de los discos de ABCu: (c) recién pulido y antes de la inmersión, (d, e) en diferentes zonas (A y B) de la superficie después de la inmersión del disco pulido, (h) tratado con el enjuague bucal antes de la inmersión y (i,j) en diferentes zonas (A y B) de la superficie después de 10 días de inmersión del disco tratado con el enjuague.

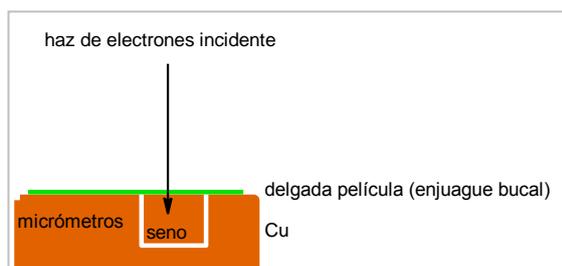
Elemento	ABCu pulida	ABCu pulida y sumergida en SS Zona A (con película y mas corroída)	ABCu pulida y sumergida en SS Zona B (sin película y menos corroída)	ABCu pulida y tratada con enjuague bucal	ABCu pulida tratada con enjuague bucal y sumergida en SS Zona A	ABCu pulida tratada con enjuague bucal y sumergida en SS Zona B
	p/p%	p/p %	p/p%	p/p%	p/p%	p/p%
C	No hay	4,54	No hay	No hay	No hay	No hay
N	No hay	4,14	No hay	No hay	No hay	No hay
O	No hay	2,35	5,52	2,38	3,64	5,00
Al	8,00	3,86	8,63	6,61	5,66	7,99
P	No hay	No hay	0,12	No hay	0,67	0,73
S	No hay	12,05	0,33	No hay	14,97	0,30
Mn	2,04	1,45	2,24	1,57	3,02	1,44
Fe	3,15	3,05	1,80	3,31	1,51	4,79
Ni	4,41	4,07	3,74	4,94	3,29	5,60
Cu	79,4	64,48	74,0	77,82	65,05	71,99
Zn	3,00	No hay	3,62	3,37	2,19	2,16
<b>Total</b>	100	100	100	100	100	100

**Tabla IV.8.** Resultados comparativos del análisis EDAX de la superficie ABCu recién pulida, pulida y tratada con el enjuague bucal y después de la inmersión de ambas en SS, en reposo y sin desairear, a  $37 \pm 2$  °C, para las dos zonas (A y B) de diferente apariencia y composición.

Para las experiencias realizadas antes de la inmersión en SS, el análisis elemental EDAX no muestra que por tratamiento de la ABCu con enjuague bucal hayan quedado sobre la superficie especies con nitrógeno en su composición, solamente se observa oxígeno no presente en la composición original de la ABCu. Tampoco se observa carbono que debería estar presente si alguno de los compuestos presentes en la formulación del enjuague hubiese quedado adherido a la superficie metálica. El contenido superficial de aluminio y manganeso disminuyó ligeramente, resultado que indicaría la disolución de ambos durante el tratamiento de la ABCu con el enjuague bucal. La presencia de oxígeno superficial podría deberse a un proceso de oxidación de la superficie del metal. Sorprende en el análisis EDAX de la ABCu tratada con el enjuague bucal la ausencia de carbono y nitrógeno que deberían provenir de los compuestos orgánicos que constituyen la formulación del enjuague, mientras que los estudios electroquímicos muestran una marcada protección de la superficie metálica por tratamiento con el enjuague. Esta diferencia podría ser atribuida a la técnica SEM-EDAX empleada para el estudio superficial. En esta

técnica, el volumen de interacción entre el haz de electrones incidente y la muestra analizada puede alcanzar varias micras ( $1 \mu\text{m} = 10^{-6} \text{ m}$ ), por lo que puede obtenerse señal de zonas muy profundas de la muestra. Si la película adherida a la superficie del metal es delgada, al promediarse el resultado con el del análisis elemental correspondiente al *seno* de la aleación, puede ser que no se detecten los elementos presentes en la delgada película.

El análisis comparativo de los resultados EDAX para los discos pulido y pulido-tratado con enjuague bucal previamente a su inmersión en SS, medidos después de su inmersión en la saliva sintética (10 días) muestra en ambos casos dos zonas (A y B). Una zona (A) más corroída con formación de una película y otra zona (B)



menos corroída y sin película. La característica más sobresaliente es que en las zonas A más corroídas y con la película creciente con el tiempo de exposición muestran una elevada cantidad de azufre y en la muestra de ABCu pulida, la presencia de trazas de nitrógeno y carbono que no se identificaron antes de la inmersión en SS, que estarían relacionadas con la adsorción de especies que contienen azufre. (Protopopoff E y Marcus P, 2003) En las zonas B se detectaron oxígeno y trazas de azufre y fósforo (ausentes antes de la inmersión).

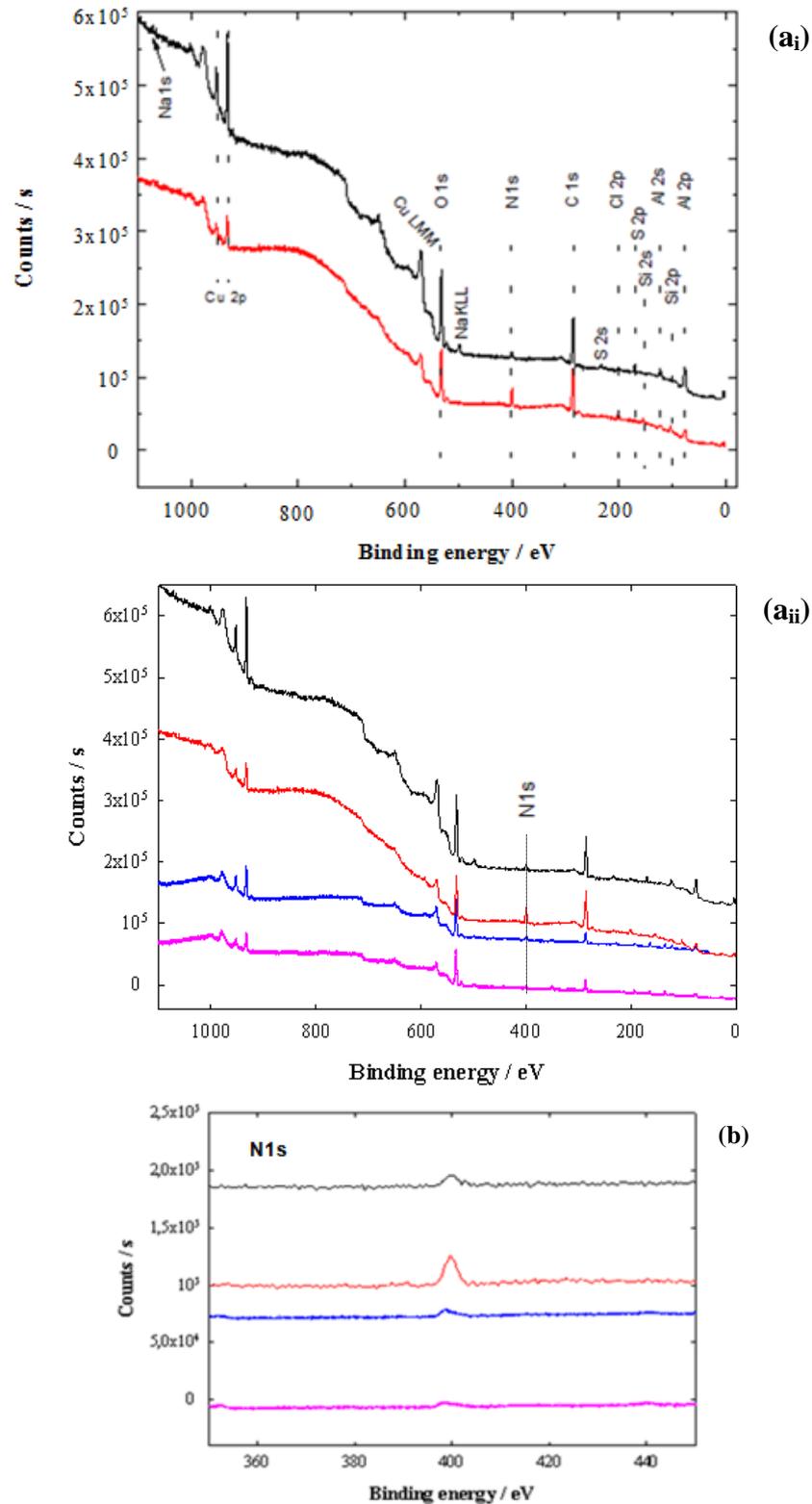
### 2.1.2.2. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos x

En las Figuras IV.38 a<sub>i</sub>, a<sub>ii</sub> se presentan espectros XPS de discos de ABCu expuestos a diferentes condiciones: pulidos, pulidos y después tratados durante 120 min con el enjuague bucal, pulidos e inmersos en SS durante 10 días, y tratados con el enjuague bucal en inmersos durante 10 días en SS. En la Figura IV.38 b se muestra la zona de N1s (400 eV) de los espectros XPS. Para las muestras antes de ser sumergidas en SS, si bien la señal correspondiente a N1s se observa para la muestra sin y con tratamiento, es mayor para la aleación tratada. La pequeña señal correspondiente a N1s de la ABCu sin tratar con el enjuague bucal, se debería a una ocasional

contaminación en el ambiente de trabajo que originó la adsorción de algún compuesto nitrogenado presente en la atmósfera del laboratorio durante el proceso previo de pulido del disco de aleación (observar que en el estudio EDAX no se evidenció nitrógeno en el disco de aleación recién pulido). La señal correspondiente a N1s evidencia una interacción entre el enjuague bucal y la aleación, con la presencia sobre la superficie del (los) componente(s) nitrogenados presentes en la formulación del enjuague bucal (*componentes nitrogenados mayoritarios*: digluconato de clorhexidina, cloruro de cetilpiridinio; *componente nitrogenado minoritario*: neoesperidina). Para los discos de muestra recién pulidos y los tratados con el enjuague bucal y después inmersos en SS, la señal correspondiente a N1s resulta muy pequeña.

La desaparición de la señal de N1s con el tiempo (10 días) de inmersión en SS, y el importante efecto del enjuague bucal como protector de la superficie frente a la corrosión de la ABCu en SS (24 h), resultante de los estudios electroquímicos, parecería indicar que alguno(s) de los componentes presentes en la formulación del enjuague bucal cumple(n) una función en la protección de la superficie de la aleación frente a la corrosión en SS, sin embargo podría ser posible que para tiempos mayores (10 días vs. 24 h) el estado superficial de la ABCu se modifique, de hecho el PCA en tiempos similares (10 días) de control no alcanza un valor estable, sino que continua aumentando (**Figura IV.37**)

Los espectros XPS proporcionan información de la composición de una superficie promediada sobre los 3-5 nm más externos. Para obtener información sobre la variación de la composición con la profundidad se puede recurrir a modificaciones asociadas a esta técnica de estudio, como por ejemplo el empleo de diferentes energías de rayos x: como la energía de los fotoelectrones depende de la energía de los rayos x, si se utiliza radiación x más energética el espesor de muestreo será mayor.



**Figura IV.38(a).** Espectros XPS de discos de ABCu expuestos a distintas condiciones: recién pulidos (—); tratados durante 120 min con el enjuague bucal (—); recién pulidos e inmersos en SS durante 10 días (—); tratados durante 120 min con el enjuague bucal e inmersos en SS durante 10 días (—). **(b).** Espectros XPS en la zona correspondiente a N1s.

### 2.1.3.3. Microscopía óptica

Las microfotografías obtenidas mediante microscopía óptica de la superficie de los electrodos de ABCu pulidos y tratados con el enjuague después de la inmersión (10 días) en SS se presentan en la **Figura IV.39**. Se observa que después de la inmersión prolongada en SS, la superficie del sustrato metálico sin el tratamiento presenta una superficie severamente atacada, mientras que en la muestra tratada las características resultantes del ataque corrosivo son menos notables y aún se observan las rayas de pulido del metal.



**Figura IV.39.** Microfotografías de la superficie de ABCu obtenidas con un microscopio óptico para la muestra de ABCu. (ABCu pulida): recién pulida y sin tratamiento; (ABCu – SS): pulida e inmersa en SS 10 días, a  $37 \pm 2$  °C; (ABCu – enjuague bucal – SS): con tratamiento por inmersión en enjuague bucal 120 min y luego inmersa en SS 10 días, a  $37 \pm 2$  °C

### 2.1.3. Determinación de iones metálicos liberados al medio corrosivo

#### 2.1.3.1. Espectroscopía de absorción atómica

La **Tabla IV.9** muestra la concentración de iones metálicos liberados por láminas de ABCu tratadas durante 120 min con el enjuague bucal y después inmersas en la SS durante 24 h (CPCT24h). Los iones metálicos se midieron por EAA. Los resultados se compararon con aquellos obtenidos (también incluidos para su comparación en la **Tabla IV.9**) para la experiencia descrita en Capítulo IV, *SECCIÓN A, inciso 1.1.3. Determinación de los iones liberados al medio agresivo*; en la cual se estudió la concentración de iones metálicos liberados por láminas de ABCu sin tratar luego de su inmersión en la SS durante 24 h (CP24h). Se observa que la concentración de todos los iones liberados al medio corrosivo por las muestras de aleación tratadas con el enjuague bucal es menor a aquella obtenida para la aleación sin tratar, y principalmente en lo que respecta a los iones Al, Mn y Zn.

Ion Metálico	Composición de ABCu % p/p	Concentración de los metales liberados por ABCu en Saliva Sintética <sup>a</sup>			
		CP24h <sup>b</sup>		CPc/t24h <sup>c</sup>	
		mg/L	µg/cm <sup>2</sup>	mg/L	µg/cm <sup>2</sup>
<b>Cobre</b>	81,5	0,041 ± 0,014	0,175 ± 0,068	0,034 ± 0,007	0,147 ± 0,034
<b>Aluminio</b>	7,0	2,384 ± 1,958	9,797 ± 7,923	0,100 ± 0,100	0,453 ± 0,453
<b>Níquel</b>	4,5	0,088 ± 0,015	0,376 ± 0,078	0,074 ± 0,009	0,324 ± 0,052
<b>Hierro</b>	3,0	0,113 ± 0,076	0,493 ± 0,341	0,098 ± 0,058	0,445 ± 0,276
<b>Manganeso</b>	2,0	0,071 ± 0,015	0,306 ± 0,078	0,042 ± 0,022	0,179 ± 0,089
<b>Cinc</b>	1,3	0,102 ± 0,022	0,439 ± 0,112	0,071 ± 0,018	0,311 ± 0,088

<sup>a</sup> Límite de detección (mg/L): Cu = 0,005; Al = 0,025; Ni = 0,006; Fe: 0,006; Mn = 0,008; Zn = 0,007.

<sup>b</sup> CP24h son los valores promedio de concentración medidos por EAA de los iones liberados por parte de muestras de ABCu de 49 cm<sup>2</sup> inmersas en 200 mL de SS luego de 24 h de exposición, a (37 ± 2) °C.

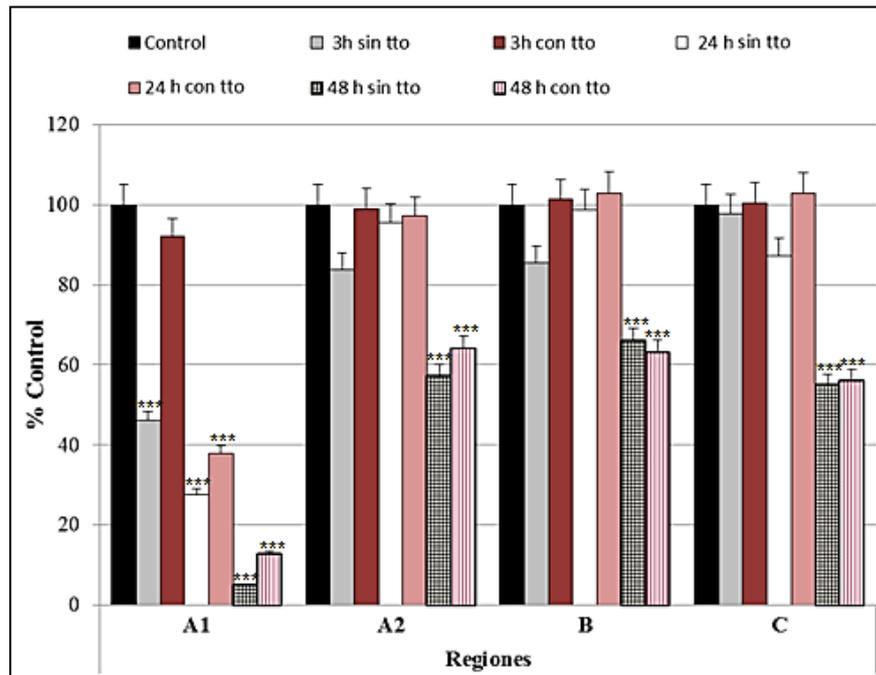
<sup>c</sup> CPCT24h son los valores promedio de concentración medidos por EAA de los iones liberados por parte de muestras de ABCu de 49 cm<sup>2</sup> tratadas durante 120 min con el enjuague bucal e inmersas en 200 mL de SS luego de 24 h de exposición, a (37 ± 2) °C.

**Tabla IV.9.** Concentración en SS de los iones liberados por la ABCu tratada en comparación con la ABCu sin tratar.

## 2.2.4. Ensayo celular

### 2.2.4.1. Efecto del tratamiento con el enjuague bucal de la ABCu sobre el número de células vivas

La **Figura IV.40** muestra el efecto del tratamiento de la ABCu con el enjuague bucal sobre el número de células vivas en función de la distancia desde el metal, luego de 3, 24 y 48 h de exposición. Los resultados se compararon con los obtenidos para la ABCu sin tratar (*ver* Capítulo IV, *SECCIÓN A*, inciso 1.2.1. *Efecto sobre el número de células vivas*). La viabilidad celular se calculó a partir del porcentaje de células vivas expuestas a los discos de ABCu, con y sin tratamiento, respecto al ensayo control llevado a cabo en ausencia de la aleación. Estos resultados muestran (barras rojas **Figura IV.40**) que el tratamiento de la ABCu para 3 h de exposición aumenta un 40% el número de células vivas con respecto a la ABCu sin tratar (región A1), y en comparación con el control se observa un leve descenso en el número de células vivas (90%). El tratamiento con el enjuague bucal para 24 y 48 h de exposición, aumenta un 10% el número de células vivas respecto a la ABCu sin tratar, al compararse con el control se observan marcadas reducciones ( $p < 0,001$ ) de 40 a 10%, respectivamente. Para distancias mayores (regiones A2, B y C), si bien se encontró un leve descenso en el número de células vivas del 85% respecto al control al ser expuestas a la ABCu sin tratar para 3 h de exposición, el tratamiento con el enjuague bucal aumenta entre un 5 a 10% más la viabilidad celular. Para tiempos más largos de exposición (24 h) (barras rosas **Figura IV.40**) el tratamiento de la ABCu no ha generado grandes cambios con respecto al efecto celular de la ABCu sin tratar, sólo en la región C se puede observar que con el tratamiento se aumenta alrededor de un 10% la sobrevivencia celular. Para 48 h de exposición se observa un marcado descenso ( $p < 0,001$ ; cercano a 60% respecto a las células control) en el número de células frente a la ABCu tratada y sin tratar.



**Figura IV.40.** Efecto del tratamiento de la ABCu con el enjuague bucal sobre el número de células vivas luego de 3, 24 y 48 h de exposición. Se incluyeron para su comparación los resultados obtenidos del efecto celular de la ABCu sin tratar. \*\*\* Diferencia significativa a  $p < 0,001$ .

Las aleaciones no preciosas reaccionan fácilmente con el medio bioquímico de la cavidad oral debido a su composición compleja, y son especialmente degradadas por corrosión electroquímica. El comportamiento electroquímico de una aleación dental en saliva sintética permite estimar el comportamiento del material en la cavidad oral. La saliva en la cavidad oral humana generalmente es considerada un medio aireado, sin embargo, un medio desaireado afectará solamente la reacción de reducción, no la reacción de oxidación. Además, ciertas áreas en la cavidad oral, tales como la región subgingival, y áreas bajo la placa están en condición desaireada.

Las modificaciones de las propiedades de las aleaciones dentales pueden determinarse usando ensayos químicos rápidos como criterio cualitativo para estimar la resistencia a la corrosión. Los métodos electroquímicos como son el registro de las curvas de polarización y la medida del potencial a circuito abierto son de interés particular. (*Pourbaix M, 1984*) La polarización anódica es de utilidad para caracterizar el comportamiento corrosivo de un metal y para evaluar si una película pasiva protege efectivamente a un metal frente a la corrosión.

En este trabajo de Tesis doctoral las intensidades de corriente y los potenciales a circuito abierto, como una medida de la velocidad de corrosión (Mareci D y col., 2005), se evaluaron a partir de las curvas de polarización lineal y/o cíclica para la ABCu sin y con tratamiento con enjuague bucal en SS como medio agresivo electrolítico. Para analizar el proceso de disolución de ABCu en condiciones simuladas cercanas a las del medio ambiente oral, se midieron las CsPP lineal y cíclica en la zona de potencial próximas al potencial de circuito abierto.

Los resultados electroquímicos muestran que en el medio corrosivo estudiado (SS) para potenciales aplicados mayores a -150 mV (**Figuras IV.35** y **IV.36**) la disolución de la ABCu tratada con el enjuague bucal y con los principales componentes orgánicos de su formulación disminuye con respecto a la de la ABCu sin tratar. Sin embargo, el efecto inhibitor del enjuague bucal se puede observar incluso a potenciales más negativos (mayores a -230 mV), notándose además un corrimiento del potencial de corrosión hacia valores más anódicos (**Tabla IV.6**) y una disminución de la intensidad de corriente a media que aumenta el tiempo de tratamiento, al registrarse las CsPP inmediatamente luego de la inmersión en la SS (**Figura IV.33**). Las mayores disminuciones de intensidad de corriente se observan para los tratamientos con el enjuague bucal y con uno de sus principales componentes, el CCP. Los tratamientos con el enjuague bucal o DGCH desplazan en sentido anódico el potencial a circuito abierto respecto de la aleación sin tratar, mientras los tratamientos con restantes componentes del enjuague bucal lo desplazan en sentido catódico. Los resultados electroquímicos indican que todos los tratamientos protegen la superficie metálica. Sin embargo la mayor protección se logra con el enjuague bucal. Si bien las intensidades de corriente para el tratamiento con enjuague bucal o CCP son similares en las cercanías del potencial a circuito abierto (potencial de corrosión), el potencial a circuito abierto para el tratamiento con CCP, resulta ser el más catódico.

El tiempo de inmersión de la aleación en el medio corrosivo tiene efecto sobre la velocidad de corrosión, los valores de la densidad de corriente disminuyen con el tiempo de inmersión debido a la protección de la superficie de la aleación en la solución agresiva SS. El valor del potencial a circuito abierto correspondiente a la ABCu en diferentes condiciones (recién pulida y

tratada con el enjuague bucal) aumentó con el tiempo de inmersión de la aleación en el medio agresivo SS, resultado que condujo a la conclusión de que ABCu se pasiva inmersa en SS, pero la pasivación es mayor para la ABCu tratada con el enjuague bucal. En la **Figura IV.36** se puede observar como la aleación sin tratar e inmersa en el medio corrosivo durante 24 h, inicia la corrosión a un potencial  $> -330$  mV, mientras que la película protectora de la aleación tratada e inmersa 24 h en SS continúa inalterable. El mismo comportamiento se observa en las medidas de PCA de la ABCu tratada comparada con el control. Al final de la experiencia (10080 min) el PCA fue de  $-60$  mV para la aleación tratada y de  $-220$  mV para la aleación sin tratar. Esto demuestra que si bien luego de la inmersión en el medio corrosivo de la ABCu sin tratar (*ver* Capítulo IV, *SECCIÓN A*, en el análisis y discusión de los resultados) y de la ABCu tratada con el enjuague bucal, se forman películas protectoras sobre la superficie, aquella formada en presencia del inhibidor es más estable, la ABCu así protegida comienza a oxidarse a ca.  $+400$  mV.

En el espectro XPS (**Figura IV.38**) para las muestras de ABCu antes de de ser sumergidas en SS, la señal correspondiente a N1s es mayor para la muestra con tratamiento, resultado que evidencia una interacción entre el enjuague bucal y la aleación. Esta señal se relacionaría con la presencia sobre la superficie del (los) componente(s) nitrogenados presentes en la formulación del enjuague bucal (*componentes nitrogenados mayoritarios*: digluconato de clohexidina, cloruro de cetilpiridinio; *componente nitrogenado minoritario*: neoesperidina). Para los discos de muestra recién pulidos y los tratados con el enjuague bucal e inmersos en SS, la señal correspondiente a N1s resulta muy pequeña. La desaparición de la señal de N1s con el tiempo de inmersión en SS (10 días), y el importante efecto del enjuague bucal como protector de la superficie frente a la corrosión de la ABCu en SS (24 h), resultante de los estudios electroquímicos, indican que alguno(s) de los componentes presentes en la formulación del enjuague bucal cumple(n) una función en la protección de la superficie de la aleación frente a la corrosión en SS, sin embargo podría ser posible que para tiempos mayores el estado superficial de la ABCu se modifique cubriéndose de compuestos oxigenados.

En los ensayos de inmersión estática para la ABCu no tratada con el enjuague bucal, en el medio agresivo se encontraron (EAA) elevadas

cantidades de aluminio, mientras para la aleación protegida la liberación de este ión fue mucho menor (relación de concentraciones  $Al_{\text{sin tratamiento}}/Al_{\text{con tratamiento}}$  ca. 25), mientras que el contenido de aluminio (EDAX) en las zonas de la superficie metálica medidas después de la exposición a SS (zona A) disminuyó ( $Al_{\text{sin tratamiento}}/Al_{\text{con tratamiento}}$  ca. 0,7). La concentración de todos los iones liberados al medio corrosivo por las muestras de aleación tratadas con el enjuague bucal es menor a aquella medida para la aleación sin tratar, principalmente para los iones Al, Mn y Zn. Los valores CPc/t24h de la concentración de iones medidos por EAA mostraron una disminución con respecto a los valores CP24h, sobre todo de los iones Al, Mn y Zn. El ataque corrosivo sobre la ABCu sin tratar tiene características no uniformes, en cambio la superficie tratada con el enjuague parece haber experimentado una corrosión leve y con características más uniformes. El análisis EDAX de la superficie de los discos de ABCu tratados antes y después de su inmersión en SS muestra que la composición de la superficie se modifica en relación al tiempo de inmersión en SS, al igual que lo que se observa en los discos de ABCu sin tratar. Luego de la inmersión en SS, las dos zonas detectadas (regiones A y B) en la ABCu sin tratar se vuelven a observar cuando la aleación recibe el tratamiento; sin embargo las regiones A disminuyen notablemente en este último caso. En los espectros XPS para la ABCu tratada y después inmersa en SS por largo tiempo (**Figura IV.38**) no se observa señal correspondiente a N1s. Tampoco se observa nitrógeno sobre la superficie de los discos de ABCu tratados y analizados por EDAX, se postula la formación de una película de compuestos oxigenados sobre la generada originalmente por el tratamiento con el enjuague bucal.

Los resultados obtenidos indican la formación sobre la superficie de la ABCu de una película protectora frente a la corrosión en SS. Los iones cobre liberados al medio a consecuencia del proceso corrosivo forman con los iones tiocianato, presentes en la composición de SS, una sal poco soluble. La formación de tiocianato de cobre ( $CuSCN$ ) sobre la superficie de la ABCu podría explicar el aumento de estabilidad de la aleación en SS. En los ensayos en SS sin desairear (EDAX, XPS y EAA) la presencia de oxígeno en la solución podría aumentar la velocidad de corrosión, que podría explicarse por la oxidación de los iones cuprosos ( $Cu^{1+}$ ) en  $CuSCN$  a iones cúpricos ( $Cu^{2+}$ ).

Elevados niveles de elementos tóxicos se encontraron en el medio agresivo por inmersión estática de la ABCu recién pulida en SS. Estos elementos causan efectos tóxicos sobre cultivos celulares (*Kopaič I y col., 2002; Hirata Y, 2002; Riley MR y col., 2003; Wataha JC y col., 1991*). El tratamiento de la aleación con enjuague bucal antes de la inmersión en SS disminuyó marcadamente la liberación de iones al medio.

Los productos de corrosión tienen diferentes efectos sobre sistemas de pruebas biológicos. El tratamiento de la ABCu sobre el número de células vivas expuestas a la aleación durante 3 y 24 h muestra un efecto protector de la aleación y en consecuencia disminuye la liberación de iones metálicos al medio corrosivo, aunque el efecto disminuye marcadamente para tiempos largos (48 h). El número de células vivas se ve favorecido con el tratamiento protector de la superficie metálica con enjuague bucal especialmente en las zonas vecinas al metal, al compararlo con un ensayo control en ausencia del metal.

Es indudable que la aleación ABCu investigada en este estudio se corroe en contacto con SS, que simula la saliva en la cavidad oral. Sin embargo, cuando el tiempo de contacto es prolongado se forma una película superficial que la protege parcialmente. El tratamiento de la ABCu con el enjuague bucal disminuye la velocidad de corrosión de la aleación porque favorece la formación de una película más estable que la preserva del ataque corrosivo de los componentes de SS, resultando a la vez una marcada disminución de la liberación de iones tóxicos al medio agresivo.



Conclusiones, Recomendaciones  
y Perspectivas

## 1. CONCLUSIONES

En este capítulo se presentan las conclusiones correspondientes al presente trabajo y la importancia del estudio desde el punto de vista de la clínica odontológica, se proponen recomendaciones enfocadas hacia la investigación y la clínica y futuras perspectivas.

Se comienza el capítulo con una breve introducción, a continuación se presentan las conclusiones agrupadas siguiendo los lineamientos de la presentación de los temas investigados en los restantes capítulos de este trabajo y finalmente las recomendaciones y perspectivas.

- *Introducción general*

La motivación de este trabajo de tesis doctoral es contribuir al conocimiento del comportamiento de los biomateriales dentales metálicos, con la finalidad de mejorar las propiedades de los mismos, a fin de favorecer su biocompatibilidad y durabilidad una vez instalados en la cavidad oral. Así, y por lo tanto, favorecer una mejor calidad de vida del ser humano.

Se investiga la resistencia a la corrosión y la citotoxicidad de una aleación para uso odontológico, en medios biológicos simulados, en presencia de nuevos inhibidores orgánicos de la corrosión, que no son nocivos para la salud. Se comparan los resultados con los obtenidos en ausencia de los inhibidores y con los provenientes del estudio para el metal base de la aleación. Se estudia el efecto de la composición del medio biológico sobre la corrosión de ambos materiales metálicos.

Los ensayos de laboratorio sobre la evaluación de las características físicoquímicas y biológicas del biomaterial sin o con tratamiento con los inhibidores de la corrosión previos a su uso en la práctica clínica, permiten conocer la susceptibilidad a la corrosión y la liberación de iones al medio oral corrosivo, así como también la biocompatibilidad de los materiales. El análisis de la corrosión de materiales metálicos en el ambiente bucal y el efecto citotóxico de los iones liberados han originado numerosas dudas que el trabajo realizado permite aclarar.

Se estudia un bronce al aluminio (ABCu) utilizado como una alternativa económica para la fabricación de pernos, coronas y puentes en países con

pueblos de bajos recursos económicos y cobre puro por ser el principal componente de la aleación. Como medios agresivos se emplearon dos salivas sintéticas (SS, pH = 4,77 y MC), una de ellas más agresiva (MC, pH = 2,60 con ácido láctico), y un medio de cultivo de células (MCC, pH = 7,00).

Entre los compuestos orgánicos probados como protectores de la aleación contra la corrosión, se determinó el límite de citotoxicidad y genotoxicidad para el derivado de 1,2,5-tiadiazol (TDZ). Los restantes inhibidores estudiados, DMSO, el enjuague bucal y sus principales componentes (clorhexidina en su forma salificada: digluconato de clorhexidina, xilitol y cloruro de cetilpiridinio) y clorhexidina no fueron estudiados por ser utilizados con frecuencia en el campo de la medicina y conocerse su baja toxicidad.

- ***Corrosión de cobre y de ABCu***

La aleación ABCu estudiada presentó una baja resistencia a la corrosión, y su velocidad de disolución resultó diferente a la del cobre puro, con valores de potencial de corrosión más catódicos e intensidades de corriente mayores, que dependen del pH y de la composición del medio corrosivo (SS o MCC).

La corrosión de cobre causada por la acción de los iones cloruro agresivos resultó más importante en la saliva más agresiva que contiene ácido láctico (MC) que en la que no contiene el ácido orgánico (SS). Aunque el ion cloruro (Cl<sup>-</sup>) es uno de los más agresivos, otros constituyentes presentes en el medio corrosivo, en este caso ácido láctico, también pueden ser determinantes en el comportamiento de la corrosión. El ácido láctico impide la formación de una película protectora proveniente de la corrosión. En cambio, en la solución agresiva libre del ácido orgánico, en reposo, se forma una barrera protectora de cloruro cuproso que para largos períodos de inmersión en el medio corrosivo hidroliza formado óxido cuproso.

El corrimiento del potencial de corrosión para ABCu hacia valores más catódicos para la aleación inmersa en MCC que en SS, medidos inmediatamente luego de la inmersión muestra claramente el efecto de la composición y del pH del medio. Este desplazamiento del potencial podría relacionarse con la acción complejante de algunos de los compuestos orgánicos

presentes en MCC. Por otro parte, los desplazamientos del potencial de corrosión hacia una dirección más anódica y la disminución de las densidades de corriente para tiempos largos de inmersión de la aleación en los medios corrosivos podrían asociarse con una película más protectora de especies que contienen oxígeno formadas durante este período. Además, es indudable que debería considerarse la acción de otros compuestos orgánicos del MCC, que pueden ser adsorbidos en los sitios activos de ABCu y probablemente inhibir la reacción de disolución a través de la formación de una película protectora que crece a medida que aumenta el tiempo de exposición. En el caso de la SS, los valores de potencial de corrosión son menores que aquellos medidos en el MCC a medida que aumenta el tiempo de inmersión, probablemente debido a la adsorción de especies que contienen azufre detectadas por EDAX. El estudio realizado en este trabajo, ratifica lo expresado por otros autores en relación con la importancia de definir con exactitud la composición (incluyendo valores de pH) de las soluciones biológicas usadas para evaluar *in vitro* la corrosión y biocompatibilidad de las aleaciones dentales.

La superficie de la ABCu se modifica con el tiempo de inmersión en SS. Después de la inmersión en SS, se descubrieron dos zonas con características superficiales diferentes. Algunas zonas están cubiertas con una película que crece a medida que aumenta el tiempo de inmersión y muestran una elevada cantidad de azufre, la presencia de trazas de nitrógeno y carbono que no se identificaron antes de la inmersión y un contenido de níquel mayor que en otras zonas sin película en las cuales se detectaron oxígeno y trazas de azufre y fósforo ausentes antes de la inmersión y un menor contenido de níquel.

La concentración de los iones liberados por la aleación al medio agresivo como consecuencia de la corrosión no resultó proporcional a la composición de los metales en la aleación. Se encontró una mayor liberación de iones de aluminio que de cobre que es el metal base de la aleación.

- ***Toxicidad de la ABCu. Respuesta celular al metal dentro del medio de cultivo y del medio de cultivo con sales metálicas***

El estudio de la citotoxicidad de los iones liberados al medio agresivo (MCC) como consecuencia del proceso de corrosión y de sales metálicas de los

componentes de la aleación, no mostró efectos citotóxicos de los iones individuales y de sus mezclas cuando las exposiciones se realizaron con concentraciones de iones de sales metálicas correspondientes a 8 h de exposición de la aleación a SS (CP8h). Los valores de concentración umbral citotóxica de los iones individuales o en conjunto (mezcla de iones) se observó para concentraciones mayores que CP8h ( $Al = CP8h \times 9$ ;  $Zn = CP8h \times 36$ ;  $Mn = CP8h \times 60$ ;  $Fe, Ni, \text{ and } Cu > CP8h \times 60$ ). Se observó un efecto citotóxico sinérgico cuando se emplearon mezclas de iones Al-Zn. El efecto resultó más importante cuando se trabajó con la mezcla de sales de todos los componentes metálicos de la aleación.

La concentración de cada ion y el valor de pH probablemente no es uniforme en las cercanías del metal. Se propone la existencia de gradientes de concentración controlados por difusión con valores de concentraciones mayores que los umbrales citotóxicos en las vecindades de la aleación. Los valores de concentración elevados en zonas cercanas al metal pueden explicar el mayor efecto citotóxico observado en estas regiones (menor viabilidad celular, colonias celulares más pequeñas), en concordancia con los resultados de pruebas clínicas.

- ***Toxicidad de los inhibidores de la corrosión***

Previo a ser probados los compuestos orgánicos como protectores de los metales frente a la corrosión, se determinó el límite de citotoxicidad y genotoxicidad para el derivado de 1,2,5-tiadiazol (TDZ). Sobre las células estudiadas CHO-K1 la cito-genotoxicidad de TDZ está en relación con el tiempo de exposición y con la dosis.

Para DMSO, el enjuague bucal y sus principales componentes este aspecto no fue estudiado porque estos compuestos son utilizados con frecuencia en el campo de la medicina y se conoce su baja toxicidad.

- ***Inhibidores como forma de reducir la corrosión***

- ***DMSO como inhibidor de la corrosión de cobre***

Al estudiar el efecto de DMSO como protector del cobre frente a la corrosión, se observó que su grado de pureza influye en el efecto inhibidor de la oxidación de cobre. El DMSO de *baja pureza* (conteniendo trazas de sulfuro

de dimetilo, SDM, y disulfuro de dimetilo, DSDM, como impurezas) y la solución de SDM en DMSO de *elevada pureza* (no contiene SDM y DSDM y otras impurezas), aún en cortos períodos de tiempo, actuaron protegiendo la superficie del cobre. Mientras que el DMSO *de elevada pureza*, protegió al cobre pero para tiempos largos de tratamiento. Ocurre una interacción rápida entre cobre y las impurezas comúnmente presentes en el DMSO, y una interacción lenta del DMSO con el metal.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral indican que existe la posibilidad que la protección del acero frente a la corrosión en medio ácido clorhídrico en ácido sulfúrico causada por DMSO informada en la literatura no ocurra realmente a través del mecanismo para el proceso de inhibición propuesto (reducción del sulfóxido para generar SDM) (*Madhavan K. y col., 2001*) y que en cambio, sea debida a las impurezas (SDM y DSDM) que con frecuencia acompañan al solvente DMSO.

#### ***Enjuague bucal y sus principales componentes***

La aleación mostró un ataque corrosivo por el medio SS que simula la saliva en la cavidad oral, sin embargo es capaz de formar una película relativamente pasiva por contacto prolongado con el medio. El enjuague bucal y todos sus principales componentes actuaron como inhibidores de la corrosión del bronce al aluminio. Sin embargo, el mayor efecto protector se observó con el enjuague bucal y la elevada capacidad inhibidora de la corrosión del enjuague se atribuye a un efecto sinérgico entre sus componentes.

El efecto inhibitor del enjuague bucal aumenta con el tiempo de tratamiento; para un tiempo de 360 min se logra disminuir la corrosión de la aleación casi por completo.

El tratamiento superficial de la ABCu con el enjuague bucal disminuye la velocidad de corrosión de la aleación y favorece la formación de una película más estable que la protege del ataque corrosivo de los componentes de SS. El tratamiento de la aleación con el enjuague bucal disminuyó acentuadamente la liberación de iones metálicos y en consecuencia el efecto citotóxico de la aleación, especialmente en las regiones más cercanas a la aleación. Se sugiere la existencia de gradientes de concentración con valores de concentraciones mayores en las vecindades de la aleación. Los valores de

concentración elevados en zonas cercanas al metal pueden explicar el mayor efecto citotóxico observado en estas regiones (menor viabilidad celular, colonias celulares más pequeñas), en concordancia con los resultados de pruebas clínicas.

#### ***TDZ como inhibidor de la corrosión de cobre. Otros usos de TDZ***

TDZ no protegió al cobre frente a la corrosión en el medio corrosivo investigado (MC). El estudio superficial del metal tratado con TDZ indica que el compuesto orgánico se adsorbe sobre cobre, pero sin embargo los estudios electroquímicos muestran que no existe un efecto inhibidor de la corrosión del cobre causado por MC cuando el metal se trata previamente con TDZ o si el potencial inhibidor es agregado al MC. Se sugiere como explicación a la falta de consistencia entre ambos resultados que los iones cloruro presentes en el MC desplazan a TDZ y la respuesta electroquímica resulta similar a la medida para el metal no tratado con TDZ.

Las características del compuesto heterocíclico y los resultados obtenidos en este trabajo de tesis sugieren que la adsorción del tiadiazol sobre el metal ocurre directamente como consecuencia de las interacciones donoras-aceptoras entre los electrones- $\pi$  del sistema aromático extendido hacia el heterociclo y/o los electrones- $p$  de los heteroátomos y la orbital  $d$  vacante de los átomos de la superficie del cobre. Así, la interacción entre TDZ y el metal sería de naturaleza física (fisisorción), y fácilmente reemplazable por los iones cloruro del MC.

En nuestros estudios que parecen indicar que TDZ sería un potencial inhibidor de la corrosión de cobre en medio ácido, el medio agresivo es ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Los iones sulfato/bisulfato ( $\text{SO}_4^{2-}/\text{SO}_4\text{H}^-$ ) poseen menor capacidad que el ión cloruro para desplazar a las moléculas de TDZ adsorbidas en la interfase metal/solución y como resultado en medio acuoso ácido sulfúrico el compuesto TDZ tiene mayor posibilidades de actuar inhibiendo la corrosión de cobre.

Los estudios sobre genotoxicidad y citotoxicidad de TDZ indican que TDZ debería ser empleado en diferentes medios y aplicaciones (biocida,

decontaminación, anticorrosivo, compuestos farmacéuticos y agronómicos) en concentraciones menores que 1,16  $\mu\text{M}$ .

## 2. RECOMENDACIONES

Para complementar este trabajo se sugiere continuar la investigación en relación con el mecanismo de adsorción del enjuague bucal y sus principales componentes sobre la superficie de la aleación dental estudiada, así como también sobre las modificaciones del mecanismo de corrosión de la aleación. Los resultados a obtener en estas investigaciones permitirían ampliar el conocimiento en el área de investigación y obtener información para mejorar su estabilidad en el medio biológico a lo largo del tiempo.

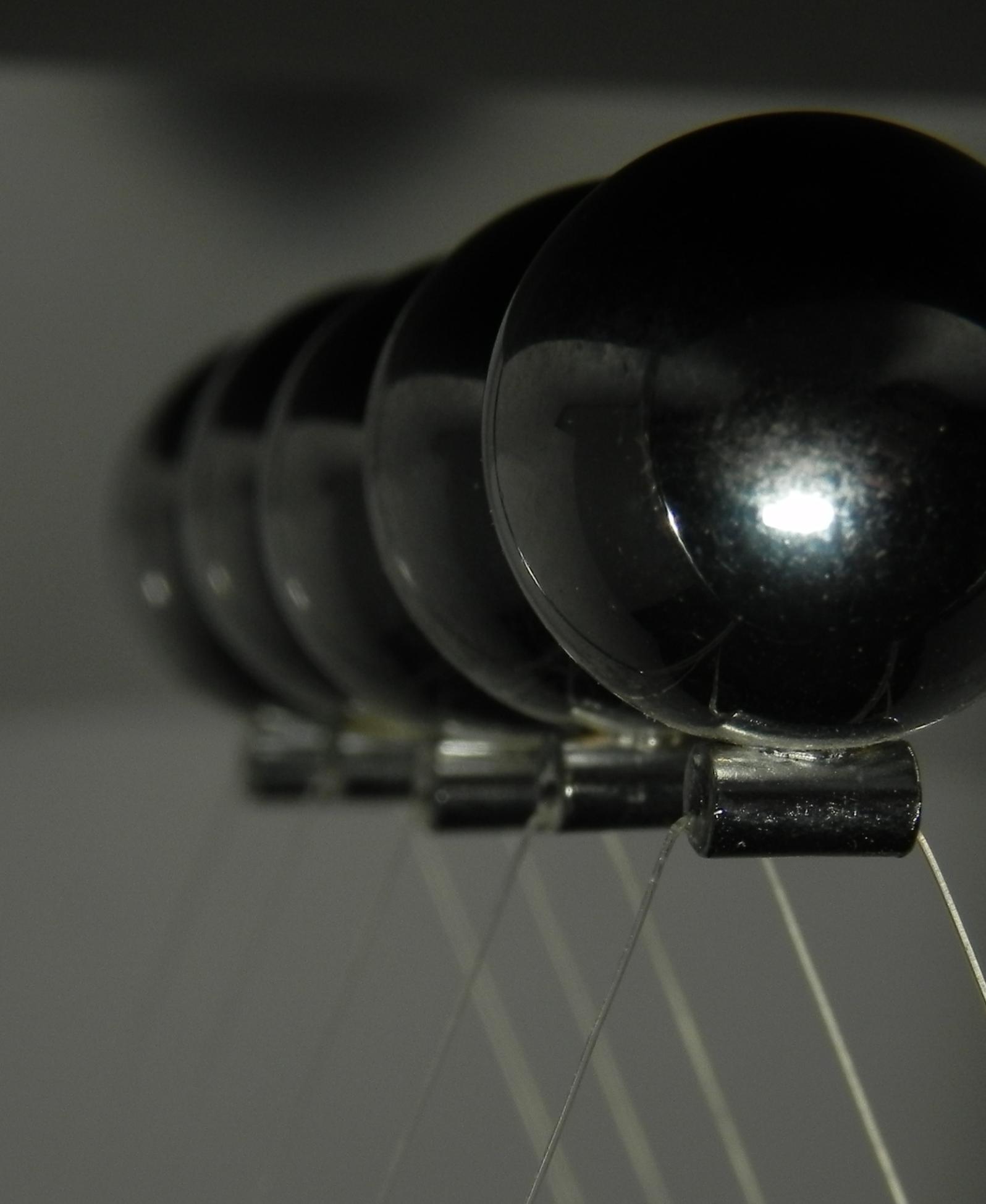
Desde el punto de vista clínico, la protección de pernos, coronas y/o puentes, confeccionados con la aleación dental estudiada, podría llevarse a cabo a través de un tratamiento por inmersión en un enjuague bucal a base de digluconato de clorhexidina previo a su cementación en boca. Entonces, es de fundamental importancia estudiar de qué manera la protección de la aleación con el enjuague bucal repercute en las propiedades del cemento utilizado para la fijación del perno dentro de la raíz dental. Así como también, cuán resistente es la película protectora al desgaste en el caso de proteger coronas y/o puentes. De acuerdo a los resultados de esos estudios, se podría pensar en la posibilidad de complementar el tratamiento con el uso periódico, por parte del paciente, de digluconato de clorhexidina en alguna de sus presentaciones comerciales: gel, barniz, enjuague o spray. El uso periódico del digluconato de clorhexidina no sólo actuaría como refuerzo de la protección contra la corrosión de las prótesis fijas sino que además contribuiría a controlar químicamente la placa bacteriana, generando un doble efecto benéfico en la salud del paciente.

Se podría estudiar el efecto protector del enjuague bucal sobre otras aleaciones de metales no preciosos de uso odontológico, tales como: cobalto-cromo, níquel-cromo, hierro-carbono-cromo-níquel (acero inoxidable) y en base a titanio.

### 3. PERSPECTIVAS

A pesar de la baja resistencia a la corrosión de la aleación ABCu investigada y de los efectos citotóxicos generados sobre las células en las regiones cercanas al metal, los bronces al aluminio se utilizan actualmente en la Argentina y otros países con pueblos de bajos recursos económicos, como una alternativa para la fabricación de coronas y puentes debido al elevado costo de las aleaciones ricas en oro. La existencia de inhibidores de la corrosión no tóxicos y que disminuyen al mismo tiempo la liberación de iones hacia el medio oral y tejidos circundantes permitiría el uso de estas aleaciones dentales bajo condiciones de biocompatibilidad. Esto se traduciría en la posibilidad, por parte de los sectores más vulnerables de la sociedad, de poder acceder a materiales dentales económicos y seguros desde el punto de vista biológico, en ausencia de efectos locales o sistémicos indeseables para la salud.

El campo de la corrosión en los sistemas biológicos es joven y fértil, como el hombre conoce poco sobre su fisiología y sus interacciones con los cuerpos extraños es aún más complicado, el estudio de la corrosión y su prevención tiene un amplio campo de acción.



# Bibliografía

**Acciari HA**, Guastaldi AC, Brett CMA. Corrosion of the component phases presents in high copper dental amalgams. Application of electrochemical impedance spectroscopy and electrochemical noise analysis. *Corros Sci.* 2005; 47 (3): 635-647.

**Aimone SL**, Caram JA, Mirífico MV, Vasini EJ. Electrochemical and spectroscopic study of the addition of several nucleophiles to 1,2,5-thiadiazole 1,1-dioxide derivatives. *J Phys Org Chem.* 2000; 13: 272-282.

**Albella JM**, CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas). Láminas delgadas y recubrimientos: preparación, propiedades y aplicaciones. España, Madrid: CSIC, 2003.

**Albertini RJ**, Anderson D, Douglas GR. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. *Mutat. Res.* 2000; 463: 111-172.

**Aldabe S**, **Bonazzola C**, **Aramendía P**, **Lacreu L**. Química 2. Química en acción. Argentina, Buenos Aires: Colihue; 2004.

**Allen HC**, Gragson DE, Richmond GL. Molecular Structure and Adsorption of Dimethyl Sulfoxide at the Surface of Aqueous Solutions. *J Phys Chem B.* 1999; 103: 600-666.

**Álvarez Cantoni HJ**. Conceptos generales en preparaciones en prótesis parcial fija. En: Fundamentos, técnicas y clínica en rehabilitación bucal. Preparaciones racionales en prótesis parcial fija. Argentina, Buenos Aires: Hacheace; 1999. 26-49.

**Al-Haidary YK**, **Saleh JM**. Adsorption and catalytic decomposition of dimethyl sulphide and dimethyl disulphide on metal films of iron, palladium, nickel, aluminium and copper. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1.* 1988; 84(9): 3043-3057.

**American Society for Metals. Committee on Definitions of Metallurgical Terms.** Definitions of metallurgical terms / by the ASM Committee on Definitions of Metallurgical Terms. USA, Ohio: American Society for Metals; 1977.

**Anusavice KJ**, Phillips. La ciencia de los materiales dentales. 10<sup>ma</sup> ed. México, D.F.: MacGraw Hill, Interamericana; 1998.

**Angmar-Månsson B**, Omnell KA, Rud J. Root fractures due to corrosion. Metallurgical aspects. *Odontologisk revy*. 1969; 20(3): 245-265.

**A.N.M.A.T. (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica)**. Disponible en: [www.anmat.gov.ar](http://www.anmat.gov.ar)

**A.N.M.A.T.** Boletín para Profesionales. 2011; 19 (4): 25-32. Disponible en: [http://www.anmat.gov.ar/webanmat/Publicaciones/Boletines/Profesionales/Bol etin\\_Profesionales\\_diciembre\\_2011.pdf](http://www.anmat.gov.ar/webanmat/Publicaciones/Boletines/Profesionales/Bol etin_Profesionales_diciembre_2011.pdf)

**Antonijevic MM**, Alagic SC, Petrovic MB, Radovanovic MB, Stamenkovic AT. The Influence of pH on Electrochemical Behavior of Copper in Presence of Chloride Ions. *Int. J. Electrochem. Sci*. 2009; 4: 516-524.

**Antonijevic MM**, Milic SM, Dimitrijevic MD, Petrovic MB, Radovanovic MB, Stamenkovic AT. The influence of pH and chlorides on electrochemical behavior of copper in the presence of benzotriazole. *Int. J. Electrochem. Sci*. 2009; 4(7): 962-979.

**Appa Rao BV**, Chaitanya Kumar K, Yakub Iqbal Md, Sreedhar B. Corrosion protection of copper by self assembled monolayers. 2009; *Indian J Chem Technology*. 16: 25-31.

**Ardlin BI**, Lindholm-Sethson B, Dahl JE. Corrosion of dental nickel-aluminum bronze with a minor gold content-mechanism and biological impact. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*. 2009; 88B(2): 465-473.

**Arvidson K**, Cottler-Fox M, Friberg U. Effects of Dental Root Posts on Human Gingival Fibroblast in vitro. *J Dent Res*. 1980; 59(3): 651-656.

**Arvidson K, Wroblewski R**. Migration of metallic ions from screwposts into dentin and surrounding tissues. *Scand J Dent Res*. 1978; 86: 200-205.

**Askeland DR, Pradeep PP**. Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales. *Ciencia e Ingeniería de los Materiales*. 4<sup>ta</sup> ed. México: Thomson; 2003. 4-27.

**Bacarella L, Griess JC.** The Anodic Dissolution of Copper in Flowing Sodium Chloride Solutions Between 25° and 175 °C. *J. Electrochem. Soc.* 1973; 120: 459-465.

**Bahrani MJ, Hosseini SMA, Pilvar P.** Experimental and theoretical investigation of organic compounds as inhibitors for mild steel corrosion in sulfuric acid medium. *Corros Sci.* 2010; 52: 2793-2803.

**Barbosa MR, Mirífico MV.** Estudio electroquímico del comportamiento de fenantro-[9,10-c]-1,2,5 tiadiazol-1,1-dióxido como inhibidor en la corrosión del níquel en medio ácido. En: XXVI Cong Arg de Química. Argentina, San Luis; 2006.

**Baron C, Marschoff CM, Aragon PJ.** Corrosion rates of dental amalgam in Ringer solutions and artificial saliva. *TIT J Life Sci.* 1978; 8: 105-110.

**Barrancos Mooney J, Barrancos PJ.** *Operatoria Dental. Integración Clínica.* 4<sup>ta</sup> ed. España, Madrid: Panamericana; 2006.

**Bascone A, Morante S.** Antisépticos orales. Revisión de la literatura y perspectiva actual. *Avances en Periodoncia.* 2006; 18(1): 31-59.

**Becker MD.** Propiedades de heterociclos derivados del anillo 1,2,5-tiadiazol: 3,4-di (p-metoxifenil)-1,2,5-tiadiazol 1,1-dióxido: 3,4-bis (4-bifenil)-1,2,5-tiadiazol 1,1-dióxido. Trabajo Final para Título de Grado de Ingeniero Químico. Universidad Nacional de La Plata - Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química; 2004.

**Becker MD, Jordán Dansilio MA, Montaña AN, Gassa LM, Vela ME, Mirífico MV.** Nuevo y eficiente inhibidor de la corrosión del cobre. En: XXV Cong. Arg. de Química. Argentina, Jujuy; 2004.

**Berstein A, Bernauer I, Marx R, Geurtsen W.** Human cell culture studies with dental metallic materials. *Biomater.* 1992; 13: 98-100.

**Bloomfield P.** Choice of heart valve prosthesis. *Heart.* 2002; 87: 583-589.

**Bobina M, Kellenberger A, Millet JP, Muntean C, Vaszilcsin N.** Corrosion resistance of carbon steel in weak acid solutions in the presence of L-histidine as corrosion inhibitor. *Corros Sci.* 2013; 69: 389-395.

**Bordoni N**, Escobar A, Castillo Mercado R. Odontología pediátrica. La salud bucal del niño y el adolescente en el mundo actual. Argentina, Buenos Aires: Panamericana; 2010.

**Borenfreud E, Puerner JA**. A simple quantitative procedure using monolayer culture for toxicity assays. *J. Tissue Cult. Methods*. 1984; 9:7-9.

**Borrero Maura R**, González Rodríguez A, del Puerto Sardiñas C, Batista Santiesteban N, Valdés Abreu Y. Conservación de cepas vacunales de *Leptospira* a -70 ° C. *Rev Cubana Med Trop*. 2006; 58(1): 50-55.

**Bumgardner JD**, Gerard PD, Geursten W, Leyhausen G. Citotoxicity of precious and nonprecious alloys-experimental comparison of in vitro data from two laboratories. *J Biomed Mater Res*. 2002; 63: 214-219.

**Bumgardner JD, Lucas LC**. Cellular response to metallic ions released from nickel-chromium dental alloys. *J Dent Res*. 1995; 74: 1521-1527.

**Bumgardner JD**, Lucas LC, Tilden AB. Toxicity of copper-based dental alloys in cell culture. *J Biomed Mater Res*. 1989; 23: 1103-1114.

**Bumgardner JD**, Lucas LC, Tilden AB. The effects of corrosion products from copper dental alloys on lymphocyte proliferation. *J Dent Res*. 1990; 69: 265.

**Bumgardner JD**, Lucas LC; Alverson MW, Tilden AB. Effects of copper-based dental casting alloys on two lymphocyte cell lines and the secretion of Interleukin 2 and IgG. *Dent Mater*. 1993; 9: 85-90.

**Burns JK, Lucas LC**. Atomic absorption analyses in a canine copper dental alloy study (resumen). *J Dent Res*. 1989; 68: 322.

**Burrows D**. Hypersensitivity to mercury, nickel and chromium in relation to dental materials. *Internat Dent Journ*. 1986; 36(1): 30-34.

**Callister WD**. Introducción a la ciencia de los materiales. Vol. 1. España, Barcelona: Reverté, S.A.; 1995.

**Carvalho RC, Matson E.** Stress in teeth restored with gold and copper-aluminum alloys under distributed force. Finite element method. *Rev Odontol Univ Sao Paulo.* 1990; 4: 113-118.

**Carson J,** inventor. Patente Estadounidense. Nro. 3.177.221. CA 63, 611a (1965).

**Castellano EE, Piro OE, Caram JA, Mirífico MV, Aimone SL, Vasini EJ, Márquez-Lucero A, Glossman-Mitnik D.** *J. Mol. Struct.* 2001; 562: 157–166.

**Chen Q, Liang S, Thouas GA.** Elastomeric biomaterials for tissue engineering. *Prog PolyM Sci.* 2013; 38(3-4): 584-671.

**Chung-Chang J, Oshida Y, Gregory RL, Andres CJ, Barco TM, Brown DT.** Electrochemical study on microbiology-related corrosion of metallic dental materials. *Biomed Mater Eng.* 2003; 13: 281-295.

**Cortizo MC.** Biodeterioro de Materiales Dentales Metálicos [tesis doctoral]. Argentina, La Plata: Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Odontología; 2006.

**Craig RG, Hanks CT.** Cytotoxicity of experimental casting alloys evaluated by cell culture tests. *J Dent Res.* 1990; 69: 1539-1542.

**Curtis H, Barnes NS, Schnek A, Massarini A.** *Biología.* 7<sup>ma</sup> ed. Colombia, Bogotá: Panamericana; 2008.

**Colić M, Rudolf R, Stamenković D, Anžel I, Vučević D, Jenko M, Lazić V, Lojen G.** Relationship between microstructure, cytotoxicity and corrosion properties of a Cu–Al–Ni shape memory alloy. *Acta Biomaterialia.* 2010; 6: 308–317.

**Duffó GS.** *Biomateriales. Una mejor calidad de vida.* Argentina: Eudeba, serie Ciencia Jóven; 2005.

**Duffó GS, Quezada Castillo E.** Development of an Artificial Saliva Solution for Studying the Corrosion Behavior of Dental Alloys. *Corros.* 2004; 60(6): 594-602.

**Durrant PJ, Durrant B.** Introduction to Advanced inorganic Chemistry. USA: Longman, London; 1962.

**Edgar WM.** Saliva and dental health. Clinical implications of saliva: report of a consensus meeting. Br Dent J. 1990; 169: 96-98.

**Edgar WM.** Saliva: its secretion, composition and functions. Br Dent J. 1992; 172: 305-312.

**Edwards M, Sprague N.** Organic matter and copper corrosion by product release: A mechanistic study. Corros Sci. 2001; 43: 1-18.

**Eisenbarth E, Velten D, Ullera MM, Thull R, Breme J.** Biocompatibility of b-stabilizing elements of titanium alloys. Biomater. 2004; 25: 5705-5713.

**El Warraky A, El Shayeb HA, Sherif EM.** Pitting corrosion of copper in chloride solutions. Anti-Corros. Methods Mater. 2004; 51 (1): 52-61.

**Elshahawy W, Watanabe I, Koike M.** Elemental ion release from four different fixed prosthodontic materials. Dent Mater. 2009; 25(8): 976-981.

**Eschler PY, Lüthy H, Reclaru L, Blatter A, Loeffel O, Süss C, Boesch J.** Copper-aluminium bronze – A substitute material for gold dental alloys?. Europ Cells Mater. 2003; 5(1): 49-50.

**Escobar Mármol L.** Estudio de la expresión diferencial génica sobre líneas celulares de cáncer de mama en presencia de Withanolido D [tesis de magister]. Colombia, Medellín: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias; 2011.

**FatemehP, Ardestani SK, Foroumadi A, Emami S, Kariminia A, Behrouzi Fardmoghadam M, Shafiee A.** Selective leishmanicidal effect of 1,3,4-thiadiazole derivatives and possible mechanism of action against Leishmania species. Exp. Parasitol. 2009; 121: 323–330.

**Feliu S, Andrade MC,** coordinadores. Corrosión y protección metálicas. Vol 1. España, Madrid: CSCI; 1991.

**Fernández Lorenzo de Mele M, Cortizo MC.** Effect of Biofilms and Agressive ions on the corrosion of Dental Alloys. En: 14<sup>th</sup> International

Corrosion Congress. Sudáfrica, Cape Town; 1999. No. 40, en CD, 8 pp.

**Fernández Lorenzo de Mele M, Duffó GS.** Tarnish and corrosion of silver-based alloys in synthetic salivas of different compositions. *J. Appl. Electrochem.* 2002; 32: 157-164.

**Flemming CA, Trevors JT.** Copper toxicity and chemistry in the environment: A review. *Wat Air Soil Pollut.* 1989; 44:143-158.

**Fleury C, Petit A, Mwale F, Antoniou J, Zukor DJ, Tabrizian M, Huk OL.** Effect of cobalt and chromium ions on M6-63 osteoblasts in vitro: Morphology, cytotoxicity, and oxidative stress. *Biomater.* 2006; 27: 3351-3360.

**Fouda S, Heakal FE, Radwan MS.** Role of some thiadiazole derivatives as inhibitors for the corrosion of C-steel in 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. *J. Appl. Electrochem.* 2009; 39: 391-402.

**Franken P, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C.** Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protocol.* 2006; 1: 2315-2319.

**Furlong OJ, Miller BP, Li Z, Walker J, Burkholder L, Tysoe WT.** The surface chemistry of dimethyl disulfide on copper. *Langmuir.* 2010; 26(21): 16375-16380.

**Fusayama T, Katayori T, Nomoto S.** Corrosion of Gold and Amalgam Placed in Contact with Each other. *J Dent Res.* 1963; 42: 1183-1197.

**García OE, Uruchurtu J, Genescá J.** Efecto de los componentes del agua de mar durante el fenómeno de corrosión por picaduras del cobre. *Rev. Metal. Madrid.* 1995; 31(5): 307-313.

**García Contreras R, Scougall Vilchis JR, Sakagami H, Nakamura Y, Nakamura Y, Hibino Y, Nakajima H, Shimada J.** Type of cell Death Induced by Seven Metals in Cultured Mouse Osteoblastic Cells. *In vivo.* 2010; 24: 507-512.

**Gazieva GA, Kravchenko AN, Lebedev OV.** Sulfamides in the synthesis of heterocyclic compounds. *Russ Chem Rev.* 2000; 69(3): 221-230.

**Gennaro AR.** Remington Farmacia. Tomo 1. 20<sup>a</sup> ed. Argentina, Buenos Aires: Panamericana; 2003.

**German RM.** Evaluation of two aluminum-bronze dental casting alloys. Conferencia de Corrosión. USA, Georgia; 1985.

**Geurtsen W.** Biocompatibility of dental casting alloys. Crit Rev Oral Biol Med. 2002; 13(1): 71-84.

**Gil FJ, Ginebra MP, Lacroix D, Planell JA.** Biometales. En: Biomateriales. Sastre R, de Aza S, San Román J, (eds). Italia, Ravenna: Faenza Editrice Iberica; 2004. 27-41.

**Gil Mur FJ, Manero Planella JM.** Metalografía. España: UPC (Universidad Politécnica de Cataluña); 2005.

**Gilbert JL, Mali SA.** Medical Implant Corrosion: Electrochemistry at Metallic Biomaterial Surface. En: Degradation of Implant Materials. Eliaz N (ed). USA, New York: Springer; 2012. 1-28

**Gómez de Ferraris, ME, Campos Muñoz A.** Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental. 3<sup>era</sup> ed. México, D.F.: Panamericana; 2009.

**González Fernández J, UEI de Corrosión y Protección del Centro Nacional de Investigaciones Metalúrgicas.** Teoría y práctica de la lucha contra la corrosión. España, Madrid: Grafimad, S.A.; 1984.

**González Hernández, A.** Principios de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. España, Barcelona: Elseiver; 2010.

**González Viñas W, Mancini HL.** Ciencia de los materiales. España, Madrid: Ariel, S.A.; 2003.

**Garwood GA, Hubbard AT.** Superlattices formed by interaction of polar solvents with Pt(111) surfaces studied by LEED, Auger spectroscopy and thermal desorption mass spectrometry. Surf. Sci. 1982; 118(1-2): 223-247.

**Granchi DG, Cenni E, Ciapetti G.** Cell death induced by metal ions: Necrosis or apoptosis? J Mater Sci.: Mater Med. 1998; 9: 31-37.

**Gregoret J, Tuber E, Escobar H.** El tratamiento ortodóncico con Arco Recto. Argentina, Rosario: NM.; 2003.

**Grill V, Sandrucci MA, Di Leanarda R, Cadenaro M, Narducci P, Bareggi R, Martelli AM.** Biocompatibility evaluation of dental metal alloys in vitro: Expression of extracellular matrix molecules and its relationship to cell proliferation rates. *J Dent Res.* 2000; 52: 479-487.

**Grill V, Sandrucci M.A, Bassa M, Di Leanarda R, Dorigo E, Narducci P, Martelli AM, Delbello G, Bareggi R.** The influence of dental metal alloys on cell proliferation and fibronectin arrangement in human fibroblast cultures. *Arch Oral Biol.* 1997; 42: 641-647.

**Grillo CA, Mirífico MV, Morales ML, Reigosa MA, Fernández Lorenzo de Mele M.** Assessment of cytotoxic and cytogenetic effects of a 1,2,5-thiadiazole derivative on CHO-K1 cells. Its application as corrosion inhibitor. *J. Hazard. Mater.* 2009; 170 (2-3): 1173-1178.

**Hallab NJ, Jacobs JJ.** Implant debris. Clinical data and relevance. *Compr Biomat.* 2011; 6: 97-107.

**Haps S, Slot DE, Berchier CE, Van der Weijden GA.** The effect of cetylpyridinium chloride-containing mouth rinses as adjuncts to toothbrushing on plaque and parameters of gingival inflammation:a systematic review. *Int J Dent Hygiene.* 2008; 6: 290–303.

**Hensten-Pettersen A.** Casting Alloys: Side-Effects. *Adv Dent Res.* 1992; 6:38-43.

**Hirata Y.** Manganese-induced apoptosis in PC12 cells. *Neurotoxicol Teratol.* 2002; 24: 639-653.

**Holland RI.** Corrosion testing by potentiodynamic polarization in various electrolytes. *Dent Mater.* 1992; 8: 241-245.

**Huk OL, Castelas IC, Mwale F, Antoniou J, Zukor DJ, Petit A.** Induction of apoptosis and necrosis by metal ions in vitro. *J Arthroplast.* 2004; 19: 84-87

**Humphrey SP, Williamson RT.** A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *J Pros Dent.* 2001; 85: 162-169.

**Hussain S.** Textbook of Dental Materials. India: Jayppe Brothers Medical Publishers; 2004.

**Ikemiya N, Gewirth AA.** Structure Sensitive Adsorption of DMSO on Au Surfaces. *J. Phys. Chem. B.* 2000; 104(5): 873-877.

**Ismail ZH, Ghorab MM, Mohamed EMA, Aly HM, El-Gaby MSA.** Antitumor activity of some novel 1,2,5-thiadiazole derivatives. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* 2008; 183: 2541–2554.

**Issa Y, Brunton P, Waters CM, Watts DC.** Cytotoxicity of metal ions to human oligodendroglial cells and human gingival fibroblasts assessed by mitochondrial dehydrogenase activity. *Dent Mater.* 2008; 24: 281-287.

**ISO (International Organization for Standardization).** Disponible en: [www.iso.org](http://www.iso.org)

**ISO/CD 14971.** Medical devices, risk management. Application of risk analysis to medical devices (1995).

**Jacobs SW, Rosenbaum EE, Wood DC.** Dimethyl Sulfoxide, Basic Concepts of DMSO. Vol. 1. USA: Marcel Dekker. 1971; 133-145.

**Johansson BI, Lemons JE, Hao SQ.** Corrosion of dental copper, nickel and gold alloys in artificial saliva and saline solutions. *Dent Mater.* 1989; 5(5): 324-328.

**Johansson BI, Lucas LC, Lemons JE.** Corrosion of copper, nickel, and gold dental casting alloys: An in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res: Appl Biomater.* 1989; 23: 349-361.

**Johnsen R, Bardal E.** Cathodic properties of different stainless steels in natural seawater. *Corros.* 1985; 41: 296-299.

**Jordán Dansilio MA.** Propiedades de heterociclos derivados del anillo 1,2,5-tiadiazol: 3,4-di (p-metoxifenil)-1,2,5-tiadiazol 1,1-dióxido. Trabajo Final para Título de Grado de Ingeniero Químico). Argentina, La Plata. Universidad Nacional de La Plata - Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química; 2004.

**Jørgensen KD.** Korrossionspraengning av rødder. Tandlaegebladet. 1955; 59: 929-930.

**Junaedi S,** Al-Amiery AA, Kadhum A, Kadhum AAH, Mohamad AB. Inhibition Effects of a Synthesized Novel 4-Aminoantipyrine Derivative on the Corrosion of Mild Steel in Hydrochloric Acid Solution together with Quantum Chemical Studies. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14: 11915-11928.

**Kakuta H,** Iwami Y, Mayanagi H, Takahashi N. Xylitol inhibition of acid production and growth of mutans Streptococci in the presence of various dietary sugars under strictly anaerobic conditions. *Caries Res.* 2003; 37(6): 404-409.

**Kaltchev M,** Kotvis PV, Lara J, Blunt TJ, Tysoe WT. A molecular beam study of the tribological chemistry of dialkyl disulfides. *Tribol. Lett.* 2001; 10: 45-50.

**Kang DH,** Friend CM. Sensitivity of methyl thiolate desulfurization selectivity to reaction temperature and hydroxyl coverage. *Langmuir.* 2001; 20(26): 11443-11449.

**Kapanen A,** Ilvesaro J, Danilov A, Ryhänen J, Lehenkari P, Tuukkanen J. Behavior of nitinol in osteoblast-like ROS-17 cell cultures. *Biomater.* 2002; 23: 645-647.

**Kapanen A,** Kinnunen A, Ryhänen J, Tuukkanen J. TGF- $\beta$ 1 secretion of ROS-17/2.8 cultures on NiTi implant material. *Biomater.* 2001; 23: 3341-3346.

**Katekary JK,** Garwood GA, Hershberger JF, Hubbard AT. Structure and composition of adsorbed layers formed by sequential exposure of Pt(100) and Pt(111) to pairs of compounds: Solvents and electrolytic substances. *Surf. Sci.* 1982; 121(3): 396-410.

**Kesavan D,** Gopiraman M, Sulochana N. Green Inhibitors for Corrosion of Metals: A review. *Che Sci Rev Lett.* 2012; 1(1): 1-8.

**Kratzenstein B,** Sauer KH, Weber H. In vivo corrosion phenomena of cast restorations and their interactions with the oral cavity. *Dtsch Zahnärztl Z.* 1988; 43: 343-348.

**Kokalj A**, Kovačević N, Peljhan S, Finšgar M, Lesar A, Milošev I. Triazole, Benzotriazole, and Naphthotriazole as Copper Corrosion Inhibitors: I. Molecular Electronic and Adsorption Properties. *Chem. Phys. Chem.* 2011; 12: 3547 – 3555.

**Kopač I**, Batista U, Cvetko E, Marion L. Viability of fibroblast in cell culture after treatment with different chemical retraction agents. *J Oral Rehabil.* 2002; 29: 98-104.

**Lai YH**, Yeh CT, Liao P, Hung W.H. Adsorption and Thermal Decomposition of Alkanethiols on Cu (110). *J. Phys. Chem. B.* 106: 5438-5446 (2002).

**Lara J**, Blunt TJ, Kotvis P, Riga A, Tysoe W T. Surface chemistry and extreme-pressure lubricant properties of dimethyl disulfide. *J. Phys. Chem. B.* 1998; 102: 1703-1709.

**Lau JC**, Jackson-Boeters L, Daley TD, Wysocki GP, Cherian MC. Metallothionein in human gingival amalgam tattoos. *Arch Oral Biol.* 2001; 46(11): 1015-1020.

**Lech T**, Hydzik P, Kosowski B. Significance of copper determination in late onset of Wilson's disease. *Clin Toxicol (Phila).* 2007; 45(6): 688-94.

**Lee LW**, Lan WH, Wan GY. A evaluation of Chlorhexidine as an endosonic irrigant. *J Formos Med Assoc.* 1990; 89: 491-497.

**Lee HP**, Nobe K. Kinetics and mechanisms of Cu electrodisolution in chloride media. *J. Electrochem. Soc.* 1986; 133: 2035-2043.

**Lee S**, Choi J, Shin S, Im YM, Ssong J, Kang SS, Nam TH, Webster TJ, Kim SH, Khang D. Analysis on migration and activation of the macrophages on transparent flat and nanostructured titanium. *Acta Biomater.* 2011; 7: 2337-2344.

**Leung VW**, Darvell BW. Artificial salivas for in vitro studies of dental materials. *J Dent.* 1997; 25(6): 475-484.

**Lima PDL**, Leite DS, Vasconcellos MC, Cavalcanti BC, Santos RA, Costa-Lotufu LV, Pessoa C, Moraes MD, Burbano RR. Genotoxic effects of

aluminum chloride in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle. *Food Chem Toxicol.* 2007; 45: 1154-1159.

**López-Alías JF**, Martínez-Gomis J, Anglada JM, Peraire M. Ion release from dental casting alloys as assessed by a continuous flow system: nutritional and toxicological implications. *Dent Mater.* 2006; 22: 832-837.

**Lloyd D**, Purrot R, Dolphing G, Bolton D, Eddwards A. The relationship between chromosome aberration and low LET radiation dose to human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 1975; 28: 75-90.

**Locci P**, Lilli C, Marinucci L, Calvitti M, Belcastro S, Bellocchio S, Damiani F, Becchetti E. In vitro cytotoxic effects of orthodontic appliances. *J Biomed Mater Res.* 2000; 53: 560-567.

**Locci P**, Marinucci L, Lilli C, Belcastro S, Staffolani N, Bellocchio S, Damiani F, Becchetti E. Biocompatibility of alloys used in orthodontics evaluated by cell culture tests. *J Biomed Mater Res.* 2000; 51: 561-568.

**Lucas LC**, Lemons **JE**. Biodegradation of restorative metallic systems. *Adv Den Res.* 1992; 6: 32-37.

**Lucas LC**, Lemons JE, O'Neal J, Joshi U. In vitro and in vivo corrosion analysis of copper alloys. *J Dent Res.* 1988; 67: 141.

**Lygre H**. Prosthodontics biomaterials and adverse reactions: a critical review of clinical and research literature. *Acta Odontol Scand.* 2002; 60: 1-9.

**Lytle DA**, Nadagouda **MN**. A comprehensive investigation on copper pitting corrosion in a drinking water distribution system. *Corros Sci.* 2010; 52: 1927-1938.

**Macchi RL**. *Materiales Dentales*. 3<sup>era</sup> ed. Argentina, Buenos Aires: Médica Panamericana; 2000.

**Madhavan K**, Muralidharan S, Iyer SVK. Dimethyl Sulphoxide as an inhibitor for the corrosion and hydrogen permeation through mild steel in acidic solutions. *Bull Electrochem.* 2001; 17(5): 215-220.

**Maksymovych P**, Sorescu DC, Yates JTJr. Methanethiolate adsorption site on Au (111): a combined STM/DFT study at the single-molecule level. *J. Phys. Chem. B*. 2006; 110(42): 21161-21167.

**Maqsood AM**, Mohd AH, Firdosa N, Shaeel AAT, Zaheer K. Anti-corrosion Ability of Surfactants: A Review. *Int. J. Electrochem. Sci*. 2011; 6: 1927-1948.

**Mareci D**, Nemtoi G, Aelenei N, Bocanu C. The electrochemical behaviour of various non-precious Ni and Co based alloys in artificial saliva. *Europ Cells Mater*. 2005; 10: 1-7.

**Martín Andrés A, Luna del Castillo JD**. Bioestadística para las ciencias de la salud. España: Capitel; 2004.

**Maurette PE**, Allais de Maurette M, Pereira Gomes P, Passeri LA. Conceptos actuales en el tratamiento de la fracturas mandibulares: Revisión de la literatura y reporte de casos. *Acta odontol venez*. [revista en Internet]. 2005; 10 (1): 57-60. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0001-63652005000100011&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0001-63652005000100011&script=sci_arttext)

**McCafferty E**. Introduction to Corrosion Science. USA, New York: Springer; 2010.

**McGraw JH**, Hill JA, Parker SP. McGraw-Hill Dictionary of Scientific and Technical Terms. 6<sup>ta</sup> ed. USA: McGraw-Hill Companies, Inc.; 2003.

**McGuinness JW**, McInnes-Ledoux PM, Ferraro EF, Carr JC. Daily release of copper from dental alloy restorations in a patient with Wilson's disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1987; 63:511-514.

**Menéndez Díez F**. Higiene industrial. Manual para la formación del Especialista. 9<sup>na</sup> ed. España: Lex Nova, S.A.; 2009.

**Messer RLW, Lucas LC**. Evaluations of metabolic activities as biocompatibility tools: A study of individual ions' effects on fibroblasts. *Dent Mater*. 1999; 15: 1-6.

**Merrit K**, Brown SA, Shankey NA. The binding of metal salts and corrosion products to cells and proteins in vitro. *J Biomed Mater Res.* 1984; 18: 1005-1015.

**Meyer JM, Nally JK.** Influence of artificial salivas on the corrosion of dental alloys. *J Dent Res.* 1975; 54 (resumen, Nro 76): 678.

**Miller BM, Adler ID.** Suspect spindle poisons: analysis of c-mitotic effects in mouse bone. *Mutagenesis.* 1989; 4: 208–221.

**Milic SM, Antonijevic MM.** Some aspects of copper corrosion in presence of benzotriazole and chloride ions. *Corros. Sci.* 2009; 51: 28-34.

**Mirífico MV**, Martínez OM, Mariani NJ, Alves JA, Barreto G, Bressa SP, Navarro A, Belloni M, Ferretti OA, Lladó M, Siri GJ, Quincoces C, Salvat W, Fernández JP, Ferretti OA, Nichio N, Pompeo F, Bufoni I. Hidrogenación catalítica de piruvato de etilo a lactato de etilo en presencia de un inductor de quiralidad. Guía de trabajos experimentales. Cátedra Laboratorio de Ingeniería Química, Area Departamental Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, UNLP; 2012.

**Molero T**, Molina J, Casassa A. Proceso mitótico en células radicales de *Psidium* spp. tolerantes, susceptibles y resistentes a *Meloidogyne incognita* en el estado Zulia, Venezuela. *Bol. Centro Invest. Biol.* 2006; 40(1): 41-56.

**Montaña AN.** Propiedades de heterociclos derivados del anillo 1,2,5-tiadiazol. (Trabajo Final para Título de Grado de Ingeniero Químico) Universidad Nacional de La Plata - Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química (2003).

**Monteiro FJ, San Román J.** Biomateriales. En: Biomateriales. Sastre R, de Aza S, San Román J, (eds). Italia, Ravenna: Faenza Editrice Iberica; 2004. 17-26.

**Morales de Cano JJ, Peraire C.** En: Biomateriales. Sastre R, de Aza S, San Román J, (eds). Italia, Ravenna: Faenza Editrice Iberica; 2004. 197-218.

**Moreira AR**, Passos IA, Sampaio FC, Soares MSM, Oliveira RJ. Flow rate, pH and calcium concentration of saliva of children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Braz J Med Biol Res.* 2009; 42: 707-711.

**Moriwaki H**, Osborne MR, Phillips DH. Effects of mixing metal ion son oxidative DNA damage mediated by a Fenton type reduction. *Toxicol in Vitro*. 2008; 22: 36-44.

**Morral FR**, Jimeno E, Molera P. *Metalurgia General*. Tomo II. España: Reverté, S.A. (1985).

**Muris J, Feilzer AJ**. Micro-analysis of metals in dental restorations as part of a diagnostic approach in metal allergies. *Neuro Endocrinology Letters*. 2006; 27(1): 49-52.

**Mutter J**, Naumann J, Schneider R, Walach H, Haley B. Mercury and autism: accelerating evidence? *Neuro Endo Lett*. 2005; 26(5): 439:446.

**Nagai K**. Corrosion testing in the mouth. *J Nihon Univ Sch Dent*. 1969; 11: 129-139.

**Najarro Dearo de Morais JA**, del Barrio Landázuri RA, Nunes de Paula W, Margonar R, Marcantonio EJr. Carga inmediata en implante unitario asociado a injerto de conjuntivo. Relato de un caso clínico. *Acta odontol venez*. 2009; 47(2): 369-375.

**Nauntofte B**, Tenevuo JO, Lagerlöf F. Secretion and composition of saliva. En: Fejerskov, O.; Kidd, E (eds). *Dental Caries. The disease and its clinical management*. Singapur: Oxford. Blackwell Munksgard; 2003. 7-29.

**Negroni M**. *Microbiología Estomatológica. Fundamentos y guía práctica*. 2<sup>da</sup> ed. Argentina, Buenos Aires: Panamericana; 2009.

**Niemi L, Hensten Pettersen A**. In vitro cytotoxicity of Ag-Pd-Cu based casting alloys. *J Biomed Mater Res*. 1985; 19: 549-561.

**Ohno N**, Uehara J, Aramaki K. A SERS Study on Adsorption of Dibenzyl Disulfide, Sulfide, and Sulfoxide on an Iron-Deposited Silver Electrode in a Hydrochloric Acid Solution. *J.Electrochem. Soc*. 1993; 140: 2512-2519.

**Olivares Xometl CO**. Desarrollo de inhibidores de corrosión derivados de  $\alpha$ -aminoácidos y  $\beta$ -aminoalcoholes usando simulación molecular y técnicas

electroquímicas [tesis doctoral]. México, D.F. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Superior de Ingeniería Química e Industria Extractivas; 2005.

**Otmačić H**, Telegdi J, Papp K, Stupnišek-Lisac E. Protective Properties of An Inhibitor Layer Formed on Copper in Neutral Chloride Solution. *J.Appl. Electrochem.* 2004; 34: 545-550.

**Padmavathi V**, Sudhakar G, Reddy A, Padmaja P, Kondaiah AS. Synthesis, antimicrobial and cytotoxic activities of 1,3,4-oxidiazoles, 1,3,4-thiadiazoles and 1,2,4-triazoles. *Eur. J. Med. Chem.* 2008; 44: 2106–2112.

**Pal N**, Quah B, Smith PN, Gladkis LL, Timmers H, Li RW. Nano-osteoinmunology as an important consideration in the design of future implants. *Acta Biomater.* 2011; 7: 2926-2934.

**Patel NR, Gohil PP.** A Review on Biomaterials: Scope, Applications & Human Anatomy Significance. *Int J Emerg Tecnology and Advanced Eng.* 2012; 2 (4): 91-101.

**Pedemonte S, Chimenos E, López J.** El níquel en odontología. *Dentum.* 2006; 6(1): 26-34.

**Pegoraro LF**, Lins Do Valle A, Reis P de Araújo C, Bonfante G, Rodrigues Conti PC, Bonachela V. Prótesis Fija. Brasil, São Pablo: Artes Médicas Latinoamerica; 2001.

**Penn D.** Metals in dentistry. *Australasian Dentist Magazine* [revista en Internet]. 2012, 43: 37-40. Disponible en: [http://printgraphics.net.au/myfiles/Australasian\\_Dentist\\_March\\_April\\_2012/files/assets/basic-html/page41.html](http://printgraphics.net.au/myfiles/Australasian_Dentist_March_April_2012/files/assets/basic-html/page41.html)

**Penn D.** The biocompatibility of various dental alloys: 2013 review. *Australasian Dentist Magazine* [revista en Internet]. 2013, 48: 42-43. Disponible en:  
[http://www.printgraphics.net.au/myfiles/Australasian\\_Dentist\\_March\\_April\\_2013/index.html#/42/zoomed](http://www.printgraphics.net.au/myfiles/Australasian_Dentist_March_April_2013/index.html#/42/zoomed)

**Pereda MD**, Reigosa MA, Fernández Lorenzo de Mele M. Relationship between radial difussion of copper ions from a metal disc and cytotoxic effects. Comparison with results using extracts. *Bioelectrochem.* 2008; 72: 91-101.

**Pérez-Pastén R**, Martínez-Galero E, Garduño-Siciliano L, Conde Lara I, Chamorro-Cevallos G. Effects of dimethylsulphoxide on mice arsenite-induced dysmorphogenesis in embryo culture and cytotoxicity in embryo cells. *Toxico Lett.* 2006; 161: 167-173.

**Perrin DD, Armarego WLF.** Purification of Laboratory Chemicals. 3<sup>era</sup> ed. Canadá: Pergamon Press, 1988.

**Petersen KB.** Longitudinal root fracture due to corrosión of an endodontic post. *J Can Dent Assoc.* 1971; 37: 66-68.

**Pino Mínguez J.** Estudio nanométrico de biocompatibilidad y adhesividad celular a biomateriales utilizados en cirugía ortopédica [tesis doctoral]. Santiago de Compostela. Departamento de Cirugía de la Universidad de Santiago de Compostela; 2008.

**Poblete V**, Pilleux MC, Fernández CI, Muñoz Ortúzar R, Ramírez Salgado M. Microscopía electrónica de barrido. Ciencia de los Materiales II. Seminario. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas (IDIEM); 2001.

**Pourbaix M.** Electrochemical corrosion of metallic biomaterials. *Biomater.* 1984; 5: 122-134.

**Pope DH**, Duquette DJ, Wayner PC. Microbiologically influenced corrosion of industrial alloys. *Materials Performance.* 1984; 14: 14-18.

**Protopopoff E, Marcus P.** Potential–pH diagrams for sulfur and hydroxyl adsorbed on copper surfaces in water containing sulfides, sulfites or thiosulfates. *Corros Sci.* 2003; 45: 1191-1201.

**Qu S**, Liu A, Liu X, Bai Y, Weng J. Study on drug release of and biological response to UHMWPE wear debris carrying estradiol. *Appl Surface Sci.* 2012; 262: 168-175.

**Quezada Castillo E.** Determinación de la susceptibilidad a la corrosión de aleaciones de uso odontológico [tesis de maestría]. San Martín, Buenos Aires, Argentina. Universidad Nacional de General San Martín, Instituto de Tecnología “Profesor Jorge A. Sabato”; 1997.

**Quezada Castillo E; Duffó GS.** Desarrollo de una saliva artificial para estudiar el comportamiento corrosivo de aleaciones dentales. San Carlos de Bariloche, Argentina. Jornadas SM / CONAMET / SIMPOSIO MATERIA; 2003.

**Ratner BD,** Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. Biomater Sci. 2<sup>da</sup> ed. China: Elseiver; 2004.

**Reclaru L, Meyer JM.** Effects of fluorides on titanium and other dental alloys in dentistry. Biomater. 1998; 19(1-3): 85-92.

**Riesgo O,** Buanchi GL, Duffó GS. Susceptibilidad a la corrosión de bronce al aluminio para uso odontológico. Revista de metalurgia. 1992; 28(5): 306-312.

**Riley MR,** Boesewetter DE, Kim AM, Sirvent FP. Effects of metals Cu, Fe, Ni, V, and Zn on rat lung epithelial cells. Toxicology. 2003; 190: 171-184 (2003).

**Rölla G, Melsen B.** On the mechanism of the plaque inhibitions by chlorhexidine. J Dent Res. 1975; 54 Spec No B: B57-62.

**Roberts WR, Addy M.** Comparison of in vitro and in vivo antibacterial properties of antiseptic mouthrinses containing chlorexidine, alexidine, CCP, and hexetidine. J Clin Periodontol. 1981; 8: 295-310.

**Robin A, Meirelis JP.** Influence of fluoride concentration and pH on corrosion behavior of Ti-6Al-4V and Ti-23Ta alloys in artificial saliva. 2007; 58(3): 173-180.

**Rud J.** Diagnosticering of rodfrakturer forarasaget av stiftkorrosion. Tandlaegebladet. 1956; 78:176-178.

**Rud J, Omnell KA.** Root fractures due to corrosion. Scand J Dent Res. 1970; 78: 397-403.

**Rufael TS,** Huntley DR, Mullins DR, Gland JL. Adsorption and reaction of dimethyl disulfide on the Ni(111) surface. J. Phys. Chem. B. 1998; 102(18): 3431-3440.

**Saadia M, Ahlin JH.** Atlas de Ortopedia Dentofacial durante el crecimiento. España, Barcelona; Espaxs S.A.; 2003.

**Salim AS.** Removing Oxygen-Derived Free Radicals Delays Hepatic Metastases and Prolongs Survival in Colonic Cancer. *Oncology*. 1992; 49: 58-62.

**Salvarezza RC, de Mele MFL, Videla HA.** Electrochemical behaviour of aluminum in human plasma. *J Biomed Mat Res*. 1985; 19: 1073-1084.

**Sánchez V, Franco M, Pérez R, Corona I, Romo GJ.** Salivary pH determination and culture in patients with oral candidosis with and without HIV/AIDS. *International AIDS Conference*. 2002; 14: 7-12.

**Schapher M, Wendler O, Gröschl W.** Salivary cytokines in cell proliferation and cancer. *Clin Chim Acta*. 2011; 412(19-20): 1740-1748.

**Schiff SN, Grosogeat B, Lissac M, Dalard F.** Influence of fluoride content and pH on the corrosion resistance of titanium and its alloys. *Biomater*. 2002; 23(9): 1995-2002.

**Scendo M.** The influence of adenine on corrosion of copper in chloride solutions. *Corros Sci*. 2008; 50: 2070-2077.

**Schmalz G, Arenholt-Brindslev A.** Biocompatibility of dental materials. España: Springer; 2009.

**Schmalz GJ, Garhammer P.** Biological interactions of dental cast alloys with oral tissues. *Dent Mater*. 2002; 18: 396-406.

**Schmalz GJ, Garhammer P, Hiller KA, Reitinger T.** Metal Content of biopsies from the neighborhood of casting alloys. *J Dent Res*. 1999; 78: 236-242.

**Schmaltz G, Langer H, Scwikt H.** Cytotoxicity of dental alloy extracts and corresponding metal salt solutions. *J Dent Res*. 1998; 77: 1772-1778.

**Schwartz M.** Brazing. 2<sup>da</sup> ed. USA: ASM International; 2003. pág. 304.

**Shaker MA, Abdel-Rahman HH.** Corrosion of copper metal in presence of binary mixtures. *Amer J Appl Sci*. 2007; 4(8): 554-564.

**Sharma M**, Kumar AV, Singh N. Electrochemical corrosion behavior of dental/implant alloys in saline medium. *J Mater Sci. Mater Med.* 2008; 19: 2647-2653.

**Sherif E-SM.** Electrochemical and Gravimetric Study on the Corrosion and Corrosion Inhibition of Pure Copper in Sodium Chloride Solutions by Two Azole Derivatives. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2012; 7: 1482-1495.

**Sherif E-SM.** Corrosion Mitigation of Copper in Acidic Chloride Pickling Solutions by 2-Amino-5-ethyl-1,3,4-thiadiazole. *J. Mater. Eng. Perform.* 2010; 19: 873.

**Sherif E-SM.** Effects of 2-amino-5-(ethylthio)-1,3,4-thiadiazole on copper corrosion as a corrosion inhibitor in 3% NaCl solutions. *J. Appl. Surf. Sci.* 2006; 252: 8615-8623.

**Sherif E-SM, Almajid AA.** Surface protection of copper in aerated 3,5% sodium chloride solutions by 3-amino-5-mercapto-1,2,4-tiazole as a copper corrosion inhibitor. *J. Appl. Electrochem.* 2010; 40: 1555.

**Sherif E-SM, Erasmus RM, Comins JC.** Inhibition of copper corrosion in acidic chloride pickling solutions by 5-(3-aminophenyl)-tetrazole as a corrosion inhibitor. *Corros. Sci.* 2008; 50(12): 3439-3445.

**Si SK, Gewirth AA.** Solvent organization above metal surfaces: ordering of DMSO on Au. *J. Phys. Chem. B.* 2000; 104: 10775 -10782.

**Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR.** Principios de análisis instrumental. 6<sup>ta</sup> ed. México, D.F.: Cengage Learning; 2008.

**Soileau RL, Lucas LC, Gantenburg JB.** Metallic ion release and distribution from copper-based dental alloys. *J Dent Res.* 1990; 68: 264.

**Staffolani N, Damiani F, Lilli C, Guerra M, Staffolani NJ, Belcastro S, Locci P.** Ion release from orthodontic appliances. *J Dent.* 1999; 27(6): 449-454.

**Stauber JL, Florence TM.** Mechanism of toxicity of zinc to the marine diatom *Nitzschia closterium*. *Mar Biol.* 1990; 105: 519-524.

**Stegelmeyer H, Niemers E, Rosentreter U, Knorr A, Garthoff, B, inventores.** Patente Alemana. Nro. 3.309.655. CA 102, 24633 (1985).

**Stewart PS.** A review of experimental measurements in biofilms. *Biotechnol Bioeng.* 1998; 59: 261-272.

**Stoffers K, Strawn S, Asgar K.** Evaluation of properties of MS dental casting alloy. *J Dent Res.* 1987; 66: 205.

**Strauss FG, Eggleston DW.** IgA nephropathy associated with dental nickel alloy sensitization. *Am Journ Nephrol.* 1985; 5: 395-397.

**Su J, Quan Z, Han W, Chen L, Gu J.** The Effect of Epigallocatechin Gallate (EGCG) and Metal Ions Corroded from Dental Casting Alloys on Cell Cycle Progression and Apoptosis in Cells from Oral Tissues. En: *Clinical Flow Cytometry - Emerging Applications.* Schmid I (ed). Croacia, Rikeja: In Tech; 2012.

**Svartman EL, Rozas MF, Piro OE, Castellano E, Mirífico MV.** Efficient Formation of Polycyclic Aromatic Systems Fused to a Thiadiazole Ring Using Strong Lewis or Brønsted Acids, Formation of Polycyclic Aromatic Systems Fused Esthe to a Thiadiazol e Ring. *Synthesis (Stuttgart).* 2006; 14: 2313–2318.

**Svartman EL, Caram JA, Mirífico MV, Vasini EJ.** Electrochemistry of 1,2,5-thiadiazole 1,1-dioxide derivatives with 3,4-substituents presenting separated, connected and fused pi-systems. *Can J Chem.* 1999; 77:511-517.

**Swanson MA, Huo MH.** Total Hip Arthroplasty in the Ankylosed Hip. Review Article. *J Am Acad Ortho Surg.* 2011; 19(12):737-745 (2011).

**Swierenga SH, Heddle JA, Sigal EA, Gilman JP, Brillinger RL, Douglas GR, Nestmann ER.** Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories. IV. Chromosome aberrations and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and human lymphocyte cultures. *Mutat Res.* 1991; 246: 301–322.

**Tenovuo JO.** Salivary parameters of relevance for assessing caries activity in individuals and population. *Community Dentistry and Oral Epidemiology.* 25: 82-86 (1997).

**Tathe A**, Ghodke M, Nikalje AP. A brief review: biomaterials and their application. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2010; 2 (4): 19-23.

**Thomas S**, editor. Casting copper-base Alloys. 2<sup>da</sup> ed. USA: American Foundrymen's Society; 1984.

**Thomas V**, Halloran BA, Ambalavanan N, Catledge SA, Vohra YK. In vitro studies on the effect of particle size on macrophage responses to nanodiamond wear debris. *Acta Biomater*. 2012; 8: 1939-1947.

**Tibballs JE, Erimescu R**. Corrosion of dental aluminum bronze in neutral saline and saline lactic acid. *Dent Mater*. 2006; 22: 793-798.

**Tillman N**, Ulman A, Elman JF. A Novel Self-Assembled Monolayer Film Containing a Sulfone-Substituted Aromatic Group. *Langmuir*. 1990; 6: 1512 – 1518.

**Tjio J, Levan A**. The chromosome number of man. *Hereditas*. 1956; 42: 1–6.

**Torres Quintana MA**, Romo F, Seguel F, Covo R, Irribarra R, Gaete M, Campos FO. Riesgos de Intoxicación con Biomateriales en Odontología – II Parte. *Revista Dental de Chile*. 2003; 94(3): 30-36.

**Trabanelli G**. Inhibitors. An old remedy for a new challenge. *Corros*. 1991; 47(6): 410-419.

**Tsuge K**, Kataoka M, Seto Y. Cyanide and thiocyanate in blood and saliva of healthy adult volunteers. *J Health Sci*. 2000; 46(5):343-350.

**Urani C**, Melchiorretto P, Morazzonib F, Canevalib C, Camatinia M. Copper and zinc uptake and hsp70 expression in HepG2 cells. *Toxicol in Vitro*. 2001; 15: 497-502.

**Uribe Hernández R**. En: Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: la experiencia en México. Ramírez Romero P. y Mendoza Cantú A (eds). México, D.F.: Instituto Nacional de Ecología (2008). 225-231.

**Van Strydonck DA**, Slot DE, Van der Velden U, Van der Weijden F. Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in

gingivitis patients: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2012; 39(11): 1042-55.

**Varvara S**, Muresan LM, Rahmouni K, Takenouti H. Evaluation of some nontoxic thiadiazole derivatives as bronze corrosion inhibitors in aqueous solution. *Corros. Sci.* 2008; 50: 2596–2604.

**Vaz LG**, Guastaldi AG, de Brito AM. Corrosión en medio ácido cítrico de una aleación metálica de cobre aplicada en odontología. *Acta Odontológica Venezolana.* 2007; 43(3): 1-8.

**Vázquez Vaamonde AJ**, **De Damborenea González JJ**. Ciencia e ingeniería de la superficie de los materiales metálicos. España, Madrid: CSIC; 2001.

**Vega del Barrio JM**. Materiales en Odontología. Fundamentos biológicos, clínicos, biofísicos y físico-químicos. España, Madrid: Ediciones Avances Médico-Dentales, S.L.; 1996.

**Vermes C**, Glant TT, Hallab NJ, Fritz EA, Roebuck KA, Jacobs JJ. The potential role of the osteoblast in the development of periprosthetic osteolysis: Review of in vitro osteoblast responses to wear debris, corrosion products, and cytokines and growth factors. *J Arthroplasty.* 2001; 16: 95-100.

**Vorreither HK**, **Ziegler E**. **Synthesen von Heterocyclen, 64. Mitt.**: Über Reaktionen mit Schwefelsäurediamid. *Monatsh Chem.* 1965; 96: 216-219.

**Wagner CD**, Riggs WM, Davis LE, Moulder JF, Muilenberg GE (ed). Handbook of x-ray photoelectron spectroscopy. USA: Perkin-Elmer Corp., Physical Electronics Division; Eden Prairie, MN; 1979.

**Walton HF**, **Reyes J**. Análisis Químico e Instrumental moderno. España, Barcelona: Reverté S.A.; 1983.

**Warner GL**, **Lawrence DA**. The effect of metals on IL-2-related lymphocyte proliferation. *Int J Immunopharm.* 1988; 10: 629-637.

**Wataha JC**. Predicting clinical biological responses to dental materials. *Dent Mater.* 2012; 28: 23-40.

**Wataha JC.** Biocompatibility of dental casting alloys: A review. *J Prosth Dent.* 2000; 83: 223-234.

**Wataha JC, Hanks CT, Craig RG.** The in vitro effects of metal cations on eukaryotic cell metabolism. *J Biomed Mater Res.* 1991; 25: 1133-1149.

**Wataha JC, Hanks CT, Craig RG.** Precision and new methods for testing in vitro alloy cytotoxicity. *Dent Mater.* 1992; 8: 65-70.

**Wataha JC, Lewis JB, Lockwood PE, Rakic DR.** Effect of dental metal ions on glutathione levels in THP-1 human monocytes. *J Oral Rehabil.* 2000; 27: 508-516.

**Wataha JC, Lockwood PE.** Release of elements from dental casting alloys into cell-culture medium over 10 months. *Dent Mater.* 1998; 14: 158-163.

**Wataha JC, Lockwood PE, Schedle A, Noda M, Bouillaguet S.** Ag, Cu, Hg and Ni ions alter the metabolism of human monocytes during extended low-dose exposure. *J Oral Rehab.* 2002; 29(3): 133-139.

**Wataha JC, Malcolm CT, Hanks CT.** Correlation between cytotoxicity and the elements released by dental casting alloys. *Int J Prosth.* 1995; 8: 9-14.

**Wataha JC, Messer RL.** Casting alloys. *Dent Clin North Am.* 2004; 48: 499-512.

**Wataha JC, Nelson SK, Lockwood PE.** Elemental release from dental casting alloys into biological media with and without protein. *Dent Mater.* 2001; 17: 409-441.

**Williams DF.** On the mechanisms of biocompatibility. *Biomater.* 2008; 29(20): 2941:2953.

**Williams DF.** On the Nature of Biomaterials. *Biomater.* 2009; 30(30): 5897:5909.

**Wright JB, inventor.** Certain 3,4-disubstituted - 1,2,5 - thiazole - 1,1-dioxides and their preparation. Patente U.S. 3,115,496. CA 60, 5512c (1963).

**Xu X**, Li Y, Wang Y, Wang Y. Assessment of toxic interactions of heavy metals in multi-component mixtures using sea urchin embryo-larval bioassay. *Toxicol in Vitro*. 2011; 25:294-300.

**Yagi S**, Nakano Y, Ikenaga E, Kutluk G, Sardar SA, Syed JA, Tanaka K, Hashimoto E, Soda K, Taniguchi M. Adsorption of  $(\text{CH}_3)_2\text{S}$  on  $\text{c}(10\times 2)\text{Ag}/\text{Cu}(100)$  Studied by S K-edge NEXAFS and XPS. *J Surf Anal*. 2005; 12 (2): 232 - 237.

**Yokel RA, McNamara PJ**. Aluminum toxicokinetics: an updated mini review. *Pharm and Toxicology*. 2001; 88: 159:167.

**Zaleski P**, Szyszkowska AM, Orzedala-Koszel U. Saliva secretion in patients with arterial hypertension in the course of beta-blocker therapy. *Annales Univeristatis Mariae Curie. Sklodowska; Sectio D*. 2007; 62(1): 210-215.

**Zelinsky AG**, Pirogov B, Yurjev OA. Open circuit potential transients and electrochemical quartz crystal microgravimetry measurements of dissolution of copper in acidic sulfate solutions. *Corros Scie*. 2004; 46: 1083-1093.

**Zerón A**. Cómo conservar sus dientes y encías toda la vida. *Odontología para pacientes*. México, D.F.: UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México); 2003.

**Zhang X**, Pehkonen S, Kocherginsky N, Ellis G. Copper corrosion in mildly alkaline water with the disinfectant monochloramine. *Corros Scie*. 2002; 2507-2528.

**Zucchi F**, Trabanelli G, Gullini G. Tetrazoles derivatives as corrosion inhibitors for copper in chloride solutions. *Electrochem Metal*. 1968; 3: 407.



Trabajos publicados, presentaciones a  
congresos, distinciones y cursos seguidos  
en el marco del Trabajo de Tesis

## **Publicaciones en revistas periódicas y actas de Congresos**

### ***En Revistas Científicas:***

*“Synergistic cytotoxic effects of ions released by zinc-aluminum bronze and the metallic salts on osteoblastic cells”*. C. Grillo<sup>o</sup>, **M.L. Morales**<sup>o</sup>, M.V. Mirífico\*, M. Fernández Lorenzo de Mele\*. *J Biomed Mater Res A*. 2013, 101(7): 2129-40. Revista científica de nivel interaccional, con referato. Factor de impacto: 3.044. <sup>o</sup>: primer autor; \*: autores de contacto.

*“Assessment of cytotoxic and cytogenetic effects of a 1,2,5-thiadiazole derivative on CHO-K1 cells. Its application as corrosion inhibitor.”* C.A. Grillo, M.V. Mirífico, **M.L. Morales**, M.A. Reigosa and M. Fernández Lorenzo de Mele\*. *J. Hazard. Mater.* 2009, 170 (2-3), 1173-1178. Revista científica de nivel internacional con referato. Factor de impacto: 2.975 ISSN: 0304-3894. Editorial: Elsevier. \*: autor de contacto.

### ***En Actas De Congresos:***

*“Cytotoxicity of metal ions released by an aluminium bronze dental material. Synergic effect of the mixture of ions”*. **Morales, M.L.**; Grillo, C.A.; Mirífico, M.; Fernández Lorenzo de Mele, M. 7° COLAOB-Congreso Latino Americano de Órganos Artificiales y Biomateriales. 22 al 25 de Agosto de 2012. Natal, Brasil (póster-con referato).

*“Corrosión y citotoxicidad de una aleación dental base cobre pretratada con un antiséptico bucodental”*. **M.L. Morales**, C.A. Grillo; M. Fernández Lorenzo, M.V. Mirífico. Congreso Internacional 50 Aniversario. Facultad de Odontología, Universidad Nacional de La Plata. 19 al 24 de Septiembre de 2011. La Plata, Argentina (póster-con referato).

*“Importancia de la pureza del dimetilsulfóxido en la inhibición de la corrosión de cobre”*. **María Laura Morales**, José Alberto Caram, María Virginia Mirífico. XXIX Congreso Latinoamericano de Química. 27 de Septiembre al 01 de Octubre de 2010. Cartagena de Indias, Colombia (póster - con referato).

“*Utilización de un colutorio a base de digluconato de clorhexidina y xilitol como inhibidor de la corrosión de aleaciones dentales ricas en cobre*”. **M.L. Morales**, M. Fernández Lorenzo, M.V. Mirífico. XLII Reunión Anual 2009. Sociedad Argentina de Investigación Odontológica. 9, 10 y 11 de octubre de 2009. Potrero de los Funes, Argentina (póster - con referato).

“*Corrosión de aleaciones a base de cobre utilizadas en la confección de pernos radiculares. Efecto citotóxico.*” **M.L. Morales**, C.A. Grillo, M. Reigosa, M. Fernández Lorenzo, M.V. Mirífico. XLI Reunión Anual 2008. Sociedad Argentina de Investigación Odontológica. 16, 17 y 18 de octubre de 2008. Rosario, Argentina (póster - con referato).

“*TDZ como inhibidor de corrosión: evaluación cito-genotóxica en la línea celular CHO-K1*”. C.A. Grillo, **M.L. Morales**, M. Reigosa, M.V. Mirífico. XXXVII Congreso Argentino de Genética. 21 al 24 de Septiembre de 2008. Tandil, Argentina (póster - con referato).

“*Dimetilsulfóxido como inhibidor de la corrosión de cobre*”. **María Laura Morales**, María Virginia Mirífico. XXVII Congreso Argentino de Química. 17 al 19 de Septiembre de 2008. San Miguel de Tucumán, Argentina (póster - con referato).

## **Distinciones**

Primer premio posters categoría Investigación: “*Corrosión y citotoxicidad de una aleación dental base cobre pretratada con un antiséptico bucodental*”. **M.L. Morales**, C.A. Grillo; M. Fernández Lorenzo, M.V. Mirífico. Congreso Internacional 50 Aniversario. Facultad de Odontología, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina. 19 al 24 de Septiembre de 2011.

## **Cursos de Postgrado**

“*Idioma Inglés*”. Prof. Teresa Marino. Facultad de Odontología UNLP. La Plata, Argentina. 2º Semestre de 2008. Carga horaria: 80 horas. Calificación: 10 (diez).

“*Estadística aplicada al área de salud*”. Dr. Ricardo L. Macchi. Facultad de Odontología UNLP. La Plata, Argentina. 2º Semestre de 2008. Carga horaria: 80 horas. Calificación: 9 (nueve).

“*Proyecto de Investigación II*”. Dr. Alberto Carli. Facultad de Odontología UNLP. La Plata, Argentina. 2º Semestre de 2008. Carga horaria: 128 horas. Calificación: 9 (nueve).

“*Proyecto de Investigación I*”. Dr. Alberto Carli. Facultad de Odontología UNLP. La Plata, Argentina. 1º Semestre de 2008. Carga horaria: 128 horas. Calificación: 9 (nueve).

“*Informática educativa e informática aplicada a la profesión odontológica*”. Lic. Ivana Harari y Lic. Viviana Harari. Facultad de Odontología UNLP. La Plata, Argentina. 2º Semestre de 2007. Carga horaria: 128 horas. Calificación: 10 (diez).

“*Idioma Portugués*”. Prof. Alejandro M. Olavarriaga. Facultad de Odontología UNLP. La Plata, Argentina. 2º Semestre de 2007. Carga horaria: 80 horas. Calificación: 10 (diez).

“*Biomateriales para uso médico y odontológico*”. Dra. Mónica Fernández Lorenzo, Dra. Ma. Cecilia Cortizo, Dra. Patricia Schilardi, Dra. Susana Cortizo, Dra. Cristina Volzone, Dr. Pablo Bilmes, Ing. Carlos Llorente, Ing. Cristina Cordero y otros. Facultad de Ingeniería UNLP. La Plata, Argentina. 2º Semestre de 2007. Carga horaria: 45 horas. Calificación: 9 (nueve).

“*Metodología de la Investigación*”. Dr. Ricardo L. Macchi. Facultad de Odontología UNLP. La Plata, Argentina. 1º Semestre de 2007. Carga horaria: 112 horas. Calificación: 10 (diez).

“*Aspectos básicos de la electroquímica. Economización de recursos y protección ambiental. Desafíos y oportunidades. (Teórico – práctico)*”.

Responsable, coordinadora y profesora: Dra. Ma. Virginia Mirífico; profesores colaboradores: Dr. Enrique J. Vasini, Dr. José A. Caram. Facultad de Ingeniería UNLP. 1º Semestre de 2007. La Plata, Argentina. Carga horaria: 60 horas. Calificación: Aprobado (sin nota).

### **Participación en Congresos, Encuentros, Jornadas y Simposios**

*“Cytotoxicity of metal ions released by an aluminium bronze dental material. Synergic effect of the mixture of ions”*. **Morales, M.L.**; Grillo, C.A.; Mirífico, M.; Fernández Lorenzo de Mele, M. 7º COLAOB-Congreso Latino Americano de Órganos Artificiales y Biomateriales. 22 al 25 de Agosto de 2012. Natal, Brasil (póster-con referato).

*“Corrosión y citotoxicidad de una aleación dental base cobre pretratada con un antiséptico bucodental”*. **M.L. Morales**, C.A. Grillo; M. Fernández Lorenzo, M.V. Mirífico. Congreso Internacional 50 Aniversario. Facultad de Odontología, Universidad Nacional de La Plata. 19 al 24 de Septiembre de 2011. La Plata, Argentina (póster-con referato).

*“Importancia de la pureza del dimetilsulfóxido en la inhibición de la corrosión de cobre”*. **María Laura Morales**, José Alberto Caram, María Virginia Mirífico. XXIX Congreso Latinoamericano de Química. 27 de Septiembre al 01 de Octubre de 2010. Cartagena de Indias, Colombia (póster - con referato).

*“Utilización de un colutorio a base de digluconato de clorhexidina y xilitol como inhibidor de la corrosión de aleaciones dentales ricas en cobre”*. **M.L. Morales**, M. Fernández Lorenzo, M.V. Mirífico. XLII Reunión Anual 2009. Sociedad Argentina de Investigación Odontológica. 9, 10 y 11 de octubre de 2009. Potrero de los Funes, Argentina (póster - con referato).

*“Degradación de aleaciones a base de cobre de uso odontológico. Efecto citotóxico”*. **María Laura Morales**. 60º Aniversario – INIFTA. 24 al 28 de Noviembre de 2008. La Plata, Argentina (póster - sin referato).

“*Corrosión de aleaciones a base de cobre utilizadas en la confección de pernos radiculares. Efecto citotóxico*”. **M.L. Morales**, C.A. Grillo, M. Reigosa, M. Fernández Lorenzo, M.V. Mirífico. XLI Reunión Anual 2008. Sociedad Argentina de Investigación Odontológica. 16, 17 y 18 de octubre de 2008. Rosario, Argentina (póster - con referato).

“*Compuestos orgánicos como inhibidores de la corrosión de cobre*”. **María Laura Morales**. XVI Jornadas de jóvenes investigadores. 27 al 29 de octubre de 2008. Montevideo, Uruguay (con referato pero sin subsidio).

“*Corrosión de aleaciones a base de cobre utilizadas en odontología*”. **María Laura Morales**. Jornadas de Becarios del INIFTA 2008. 6 al 10 de Octubre de 2008. La Plata, Argentina (exposición oral - sin referato).

“*TDZ como inhibidor de corrosión: evaluación cito-genotóxica en la línea celular CHO-K1*”. C.A. Grillo, **M.L. Morales**, M. Reigosa, M.V. Mirífico. XXXVII Congreso Argentino de Genética. 21 al 24 de Septiembre de 2008. Tandil, Argentina (póster - con referato).

“*Dimetilsulfóxido como inhibidor de la corrosión de cobre*”. **María Laura Morales**, María Virginia Mirífico. XXVII Congreso Argentino de Química. 17 al 19 de Septiembre de 2008. San Miguel de Tucumán, Argentina (póster - con referato).

“*Los heterociclos orgánicos en la protección de los biomateriales dentales metálicos*”. **María Laura Morales**, Mónica Fernández Lorenzo, María Virginia Mirífico. Semana de divulgación del conocimiento científico: Jornadas de Ciencia y tecnología de la Facultad de Cs. Exactas. La Plata, Argentina. 10 al 14 de Diciembre 2007 (póster - sin referato).

“*Aplicación en ciencias de la salud de nuevos compuestos preparados en nuestro laboratorio: Inhibición de la corrosión de biomateriales dentales*”

*metálicos*". **María Laura Morales**. Jornadas de Becarios del INIFTA 2007. 23  
al 26 de Octubre de 2007 (exposición oral - sin referato).

