



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

## TESIS DE MAESTRÍA EN IMPLANTOLOGÍA ORAL

**“ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ADHESIÓN IN VITRO DE BACTERIAS SOBRE SUPERFICIES DE TORNILLOS DE CIERRE DE TITANIO CON Y SIN TRATAMIENTO DE ANODIZADO CON FLÚOR”**

**MAESTRANDO:** Od. Martins, Carlos María Albino

**DIRECTORA:** Prof. Dra. Mónica, Fernández Lorenzo

**CO-DIRECTORA:** Prof. Dra. Alicia, Kitrilakis

**AÑO:** 2018

**DEDICATORIA:**

*A mi familia.*

## **AGRADECIMIENTOS**

### **Prof. Dra. Mónica Fernández Lorenzo**

Por haber confiado en mí, por brindarme todo su conocimiento y experiencia, además del tiempo para el desarrollo de este trabajo.

### **Prof. Dra. Alicia Kitrilakis**

Por haber apoyado el proyecto desde el primer momento, por haberme brindado todo su conocimiento y experiencia para mi formación durante la maestría.

### **Prof. Dra. María Cecilia Cortizo**

Por su colaboración en la puesta a punto de las técnicas.

### **Lic. Marcos Bertuola**

Por su colaboración permanente en la realización de los ensayos, brindándome su conocimiento, experiencia y tiempo en todo momento.

### **Equipo de Investigación IMBioMat de INIFTA y personal técnico de INIFTA**

Dra. Natalia, Fagali; Dra. Noel, Gravina; Dra. Claudia, Grillo; Técnicas de laboratorio Egly Norka Llerena y Claudia Timberi; Dr. Eduardo Prieto; Personal del taller de maquinado; que siempre pusieron todo a mi disposición para la realización de los trabajos, acompañándome en este largo camino recorrido.

### **A la Facultad de Odontología de La Plata y a la Universidad Nacional de La Plata**

Por darme la posibilidad de cursar la Maestría en Implantología oral.

## RESUMEN

El titanio y las aleaciones de titanio son ampliamente utilizados en dispositivos y componentes biomédicos, especialmente como reemplazos de tejidos duros, aunque también se emplean en aplicaciones cardiovasculares. Sus propiedades deseables tales como módulo de elasticidad relativamente bajo y similar al módulo de elasticidad del hueso, buena resistencia a la fatiga, formabilidad, maquinabilidad, y biocompatibilidad les han permitido alcanzar resultados clínicos exitosos en el largo plazo. Sin embargo, estos metales no son bioactivos después de ser implantados en el hueso, es decir, no tienen interacción con los tejidos circundantes. Por otra parte, se sabe que una de las causas del fracaso de la oseointegración de los implantes de titanio es el desarrollo de infecciones bacterianas y que las mismas pueden haberse producido en el mismo momento del acto quirúrgico, en el período de oseointegración o durante su posterior desempeño clínico como soporte protético.

Por los motivos antes expuestos y con el propósito de mejorar la biocompatibilidad de las diversas superficies de los implantes, en los últimos años se están investigando y desarrollando diferentes tratamientos con el objeto de mejorar las propiedades biológicas, químicas y mecánicas de los implantes de titanio y aleaciones. La atención de los investigadores se está enfocando principalmente sobre el estudio de las propiedades superficiales, incluidas la composición y la topografía de la superficie. El propósito de estos estudios es desarrollar superficies modificadas que permitan acortar el período de la oseointegración y favorecer el contacto hueso-implante en ausencia de contaminación microbiana. Si bien se ha logrado disminuir los tiempos de oseointegración aún no se ha tenido éxito en reducir convenientemente la adhesión bacteriana.

En este trabajo se ha investigado el efecto de tratar la superficie del titanio comercialmente puro de Grado II proveniente de biomateriales de uso odontológico mediante un proceso de anodizado a distintos potenciales, utilizando como electrolito una solución que contiene iones fluoruro, de conocidas propiedades antimicrobianas. Se han realizado análisis superficiales mediante medidas de tensión superficial,

microscopía de epifluorescencia, microscopía de fuerza atómica y electrónica de barrido y por espectroscopía de dispersión de rayos X (EDX) de las muestras correspondientes a tornillos de cierre de titanio sometidos a diversos tratamientos electroquímicos. Por otra parte se estudió detalladamente la textura superficial mediante el análisis de distintos parámetros que la caracterizan, tanto en la micro como en la nanoescala, por la altura y espaciado de los picos y valles, por su distribución tanto en sus perfiles como en la superficie total, y por su oblicuidad. Los resultados permitieron comprobar que la composición y topografía superficiales de las muestras cambian con el potencial de anodización y varían con respecto al control. Pudo demostrarse que la adhesión de las bacterias sobre la superficie del metal tratado mediante anodizado a 60V disminuye, con una significancia estadística, con respecto a la superficie del mismo metal no tratada. Sin embargo, la incorporación de flúor en la composición del óxido de titanio formado por anodizado no disminuyó la adhesión microbiana. Dicha disminución estaría asociada principalmente a las características de la topografía superficial.

De los resultados del presente trabajo surge la importancia de realizar un estudio detallado de la textura superficial y su correlación con la adhesión bacteriana con el objeto de diseñar biomateriales con superficies anti-biofilm y oseointegrables. Es decir que el parámetro de rugosidad superficial  $S_a$  (promedio aritmético de los valores absolutos de las alturas de crestas y valles, que caracteriza a los tornillos como lisos, mínimamente rugosos, moderadamente rugosos y rugosos) con que se clasifican los implantes dentales, no es suficiente como para describirlos adecuadamente ya que idénticos valores de  $S_a$  pueden corresponder a superficies cuyas texturas son muy disímiles y pudo constatar que las bacterias interactúan en forma distinta con las mismas.

## INDICE GENERAL

<b>Resumen .....</b>	<b>4</b>
<b>Índice general .....</b>	<b>6</b>
<b>Capítulo 1. Introducción .....</b>	<b>8</b>
<b>Capítulo 2. Marco Teórico .....</b>	<b>11</b>
<u>Sección 2.I.</u> El titanio, su utilización como biomaterial en el campo de la odontología para la fabricación de implantes dentales con forma de raíz. ....	<b>11</b>
<u>Sección 2.II.</u> Fallas de los implantes dentales. Adhesión bacteriana y formación de biofilm. ....	<b>25</b>
<u>Sección 2.III.</u> Fundamentos de las técnicas que se utilizan para realizar análisis superficial. ....	<b>38</b>
<b>Capítulo 3. Objetivos e hipótesis de trabajo. ....</b>	<b>61</b>
<b>Capítulo 4. Materiales y métodos. ....</b>	<b>64</b>
<u>Sección 4.I:</u> Construcción, pulido y anodizado de los electrodos de titanio. ....	<b>65</b>
<u>Sección 4.II:</u> Ensayos de adhesión de bacterias.....	<b>75</b>
<u>Sección 4.III:</u> Metodología utilizada para el análisis superficial. ....	<b>89</b>
<b>Capítulo 5. Resultados .....</b>	<b>93</b>
<u>Sección I.</u> Resultados del anodizado, observaciones microscópicas por SEM y de las mediciones de ángulo de contacto.....	<b>93</b>
<u>Sección II.</u> Resultados de los ensayos de adhesión de bacterias.....	<b>107</b>
<u>Sección III.</u> Resultados del análisis de rugosidad utilizando AFM, cálculo de los parámetros característicos y su relación con la adhesión bacteriana.....	<b>118</b>
<b>Capítulo 6. Discusión.....</b>	<b>127</b>
<b>Capítulo 7. Conclusiones.....</b>	<b>135</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>137</b>

# Capítulo 1. Introducción

## Capítulo 1

### INTRODUCCIÓN

El fenómeno de la integración del tejido óseo a la superficie del titanio observado por Branemark en la década del 60 del siglo XX fue el comienzo de la “era moderna” en el campo de la odontología, permitiendo la sustitución de piezas ausentes y la reconstrucción del sistema esquelético maxilofacial afectado por traumatismos y/o procesos neoplásicos.

Se entiende como oseointegración “la conexión directa, estructural y funcional entre el hueso vivo bien organizado y la superficie del sustituto dental implantado que será capaz de absorber las fuerzas provenientes de las funciones propias del sistema estomatognático, sin interposición de tejido fibroso entre el tejido óseo y la superficie del implante dental.(1) La constante búsqueda por acelerar y mejorar la oseointegración principalmente para la resolución de situaciones clínicas desafiantes donde la calidad y cantidad de hueso han sido comprometidas por procesos de enfermedad o por la edad de los pacientes ha conducido a los investigadores a desarrollar diferentes estrategias. Está demostrado que las características superficiales de los implantes de titanio tienen influencia directa sobre la respuesta tisular, favoreciendo la adsorción de proteínas y modulando la diferenciación y proliferación celular. Características tales como la rugosidad, química y tensión superficial han sido reportadas por influir significativamente en la diferenciación celular, en la producción de factores locales y consecuentemente en el crecimiento óseo y oseointegración.(2-4) Surgen así los implantes con diferentes tipos de superficies rugosas obtenidas a través de una gran variedad de tratamientos físicos y/o químicos, que permiten incrementar además el área de contacto hueso-implante.

Se sabe por el conocimiento aportado de diferentes investigadores que la infección bacteriana es una de las causas de fracaso de los implantes dentales, ya sea que esta infección ocurra en una etapa precoz por contaminación durante la técnica quirúrgica implantológica de colocación del implante, postoperatoria durante la etapa de cicatrización o en una etapa tardía cuando el implante dental se encuentra en función de soporte protético.(5-8) También es conocido que las bacterias que causan estas

infecciones se adhieren a las superficies de los implantes formando biofilms o biopelículas, y que entre los factores que intervienen en el complejo proceso de adhesión de las bacterias se encuentran la rugosidad, la composición química y la energía superficial.(9–11) De esto surge la importancia de investigar modificaciones en la superficie de los implantes de titanio tendientes a inhibir o disminuir la adhesión de bacterias en sus etapas iniciales en la formación del biofilm, que permitan dar oportunidad a la acción de los agentes antimicrobianos y al sistema inmunitario del paciente para prevenir estos procesos infecciosos que ponen en riesgo el éxito de los implantes dentales.

## **Capítulo 2. Marco teórico.**

## Capítulo 2

### MARCO TEÓRICO

En el Capítulo 2 se describen los aspectos teóricos donde se enmarca el presente trabajo de tesis y se divide en tres **Secciones (2.I, 2.II, 2.III)** donde se describirán los siguientes aspectos:

**Sección 2.I. El titanio, su utilización como biomaterial en el campo de la odontología para la fabricación de implantes dentales con forma de raíz.**

**Sección 2.II. Fallas de los implantes dentales. Adhesión bacteriana y formación de biofilm.**

**Sección 2.III. Fundamentos de las técnicas que se utilizan para realizar análisis superficial**

**Sección 2.I: El titanio, su utilización como biomaterial en el campo de la odontología para la fabricación de implantes dentales con forma de raíz.**

#### **2.I.1 Características físicas y químicas del Ti**

El Titanio puro pertenece al grupo de los elementos en transición. Tiene un número atómico de 22 y su peso atómico es 47, 88. Presenta un aspecto plateado grisáceo. Su densidad es de 4,5 g/cm<sup>3</sup>, siendo el más ligero de los metales utilizados hasta ahora en el campo dental. Cristaliza en el sistema hexagonal, característica que le permite tener una relativa resistencia a la deformación plástica, mayor que los materiales que cristalizan en el sistema cúbico. Sin embargo el Titanio presenta un cierto grado de ductilidad.

Pasando los 882° C el titanio cambia su estructura cristalina por transformación alotrópica, y pasa de tener una estructura hexagonal a una estructura cúbica y de ahí a cúbica centrada en el cuerpo. La forma hexagonal recibe el nombre de Titanio alfa, mientras que la cúbica se denomina beta.

Básicamente, el titanio y las aleaciones a base de titanio se pueden clasificar en tipo alfa (estructura cristalina hexagonal), tipo casi alfa, tipo alfa + beta, y tipo beta (estructura cristalina cúbica centrada en el cuerpo).

Los elementos añadidos al titanio se dividen en dos grupos: estabilizadores alfa y estabilizadores beta.(12–15)

### ***Estabilizadores alfa***

Elementos, tales como Al, Sn, Ga, Zr, y elementos intersticiales (C, O y N ya sea solos o en combinación), se disuelven en la matriz de titanio y son reforzadores ya que cuando se calientan producen pequeños cambios que aumentan la temperatura de transformación (beta-trans: 885 ° C para Ti puro) de la estructura cristalina hexagonal alfa a la estructura cristalina cúbica beta de titanio puro, y a la inversa cuando se enfría. Por lo tanto, se conocen como estabilizadores alfa y exhiben un buen comportamiento a altas temperaturas.

### ***Estabilizadores beta***

Se denominan estabilizadores beta a los elementos de aleación que disminuyen esta temperatura de transformación de fase. Generalmente, los elementos de estabilización son los metales de transición, tales como V, Mo, Nb, Ta y Cr, que proporcionan friabilidad.

Además de estos elementos, frecuentemente se añade Fe, Cu, Ni, Si y B a aleaciones a base de Ti para mejorar la resistencia mecánica, estabilidad química, plasticidad y/ o refinación de granos.

Al aumentar la porción fase alfa, generalmente se reconoce que se producen los siguientes cambios:

- aumenta la temperatura de beta – transformación.
- aumenta la resistencia a la fluencia, así como la resistencia mecánica a altas temperaturas.
- mejora la soldabilidad.

Al aumentar la porción fase beta, se sabe que:

- aumenta la tenacidad a la fractura en comparación con las aleaciones tipo  $\alpha$  a la temperatura ambiente.
- aumenta la resistencia al tratamiento térmico, haciendo que las aleaciones beta se puedan emplear en procesos de estampación en frío.
- aumenta la sensibilidad a la deformación, de manera que la formación superplástica es más favorablemente aplicable.

Cuando cualquier material de titanio posee uno de los tipos antes mencionados como una fase constitucional mayor, tal material se nombra después del tipo de fase, por ejemplo  $\beta$ Ti.

### **2.1.2 Titanio y aleaciones de titanio de uso médico y odontológico**

Actualmente, el titanio puro y aleaciones tipo ( $\alpha+\beta$ ) Ti-6Al-4V ELI (Nivel Extra Bajo de contenido intersticial) son ampliamente utilizados como biomateriales, componentes estructurales y/o funcionales para la sustitución de tejidos duros en dispositivos para reemplazos de cadera o rodilla e implantes dentales, ya que exhiben resistencia mecánica, estabilidad química, resistencia a la corrosión y mejor biocompatibilidad que otros materiales metálicos. Cabe destacar que en las normas de ASTM (American Society for Testing and Materials) se incluyen nuevas aleaciones de titanio para aplicaciones biomédicas de menor uso.(16)

#### ***Titanio comercialmente puro (CpTi)***

Bajo la categoría de titanio comercialmente puro (CpTi) como "grados sin alea" de la especificación ASTM, hay cinco materiales clasificados en este grupo; incluyen ASTM grado 1 (99,5% Ti), grado 2 (99,3% de Ti), grado 3 (99,2% de Ti), grado 4 (99,0% de Ti) y grado 7 (99,4% de Ti).

Grado 1: Grado 1 CpTi tiene un contenido residual (0,5%) ligeramente menor que los demás grados. Los residuos oxígeno y hierro mejoran la resistencia al impacto. El oxígeno actúa como un reforzador intersticial, manteniendo una microestructura hexagonal simple alfa. El contenido residual inferior hace que el grado 1 sea el grado

más bajo en resistencia a la tracción del CpTi, pero tiene la mayor ductilidad, con una excelente formabilidad en frío.

Grado 2: El grado 2 es el grado de titanio seleccionado con más frecuencia a nivel industrial, teniendo propiedades bien equilibradas tanto de fuerza como de ductilidad. Los niveles de resistencia son muy similares a los del acero inoxidable común y su ductilidad permite una buena conformabilidad en frío.

Grado 3: CpTi grado 3 posee una resistencia ligeramente superior debido a su mayor contenido residual (principalmente oxígeno, y también nitrógeno) con una ductilidad levemente inferior.

Grado 4: El grado 4 es el grado con resistencia a la tracción más alta de la serie CpTi, por lo que el grado 4 sirve principalmente en la industria aeroespacial y aeronáutica.

### ***Ti-6Al-4V***

Esta aleación pertenece al grupo de aleaciones de fase alfa+beta y es particularmente popular a causa de su alta resistencia a la corrosión y a su baja toxicidad, debido a la escasa liberación de iones de la superficie por el óxido pasivo denso y protector (que es principalmente  $TiO_2$ ). Ti-6Al-4V presenta buenas propiedades mecánicas y excelente compatibilidad con tejidos, que lo hacen muy adecuado para aplicaciones biomédicas donde la integración con el tejido óseo es necesaria, en particular, para aplicaciones de implantes ortopédicos y dentales. Ti-6Al-4V ELI también está disponible para su empleo en el área médica.

### **2.1.3. Óxidos de Ti**

El titanio es un metal altamente reactivo y, cuando se expone a la atmósfera, reaccionará en microsegundos para formar una capa de óxido. La capa de óxido formada se adhiere fuertemente a la superficie del sustrato de titanio (300kcal/mol).

Está bien documentado que la excelente resistencia a la corrosión de los materiales base titanio se debe a la formación de una película de óxido densa, protectora y

fuertemente adherida que se denomina película pasiva, ya que le otorga resistencia a la corrosión.(17)

La composición exacta y la estructura de la película pasiva que cubre al titanio y sus aleaciones es motivo de controversias. Esto ocurre tanto con el óxido que se forma al estar en contacto con el aire, en forma "natural", como también de las películas formadas durante la exposición a diversas soluciones, incluyendo los formados anódicamente. La película de óxido "natural" que se forma sobre el titanio varía en espesor de 2 a 7 nm, dependiendo de parámetros tales como: la composición del metal y del medio circundante, la temperatura máxima alcanzada durante el proceso de trabajo del metal, acabado, etc.

El comportamiento del titanio y de sus aleaciones en aplicaciones de implantes quirúrgicos debe ser evaluado con respecto a su biocompatibilidad, osteointegración, y su capacidad para soportar los ambientes corrosivos y de inhibir la adhesión bacteriana cuando son expuestos a los fluidos biológicos.(18)

#### **2.1.4 Características superficiales y su efecto en la osteointegración**

El titanio tiene la propiedad de permitir la integración del tejido óseo sobre su superficie. Tal como se mencionó previamente, este fenómeno fue observado por primera vez en la década del 60 del siglo XX, por Branemark y fue el inicio de una nueva etapa en el campo de la odontología, permitiendo la sustitución de piezas dentarias ausentes, y la reconstrucción del sistema esquelético maxilofacial afectado por traumatismos y/o procesos neoplásicos.

La osteointegración es la conexión directa, estructural y funcional entre el hueso vivo bien organizado y la superficie del sustituto dental implantado. Dicha conexión debe ser capaz de absorber las fuerzas provenientes de las funciones propias del sistema estomatognático evitando interposición de tejido fibroso entre el tejido óseo y la superficie del implante.(1,19,20)

Estos importantes avances en el conocimiento y en la aplicación de nuevas técnicas, quirúrgico-protéticas posibilitaron restaurar en los pacientes, no solo su contorno

facial, función, comodidad, estética y habla, sino que además resultó ser prometedora para la rehabilitación en muchas situaciones clínicas desafiantes.

El interés por comprender mejor los mecanismos involucrados en el proceso de oseointegración y el propósito de acortar el período del mismo, llevó al estudio y análisis de las propiedades físicas, químicas y la topografía de la superficie de los implantes de titanio, comenzando una etapa que permitió el desarrollo de diferentes tipos de tratamientos de superficie.

### ***Superficies de los implantes de titanio***

Con el descubrimiento del proceso de oseointegración nace la primera generación de implantes mecanizados con una textura de superficie lisa. Desde entonces las superficies han sido reconocidas por cumplir un rol importante en la interacción molecular, la respuesta celular y la oseointegración. El resultado de investigaciones en este campo ha dado lugar a la segunda generación de implantes dentales, con superficies que aceleran y mejoran la oseointegración de los implantes dentales.(21)

### ***Rugosidad de los implantes***

Entre los numerosos parámetros que evalúan la rugosidad unos de los más utilizados en odontología son Ra y Sa:

Ra es el promedio aritmético de los valores absolutos de las alturas  $y(x)$  medidas a partir de la línea central. Este parámetro caracteriza a la desviación en la altura. Ra puede ser definida también como la altura de un rectángulo cuya área sea igual a la suma absoluta de las áreas delimitadas entre el perfil de rugosidad y la línea media, siendo la longitud de la medición  $L_m$  (Fig. N°1).(22)

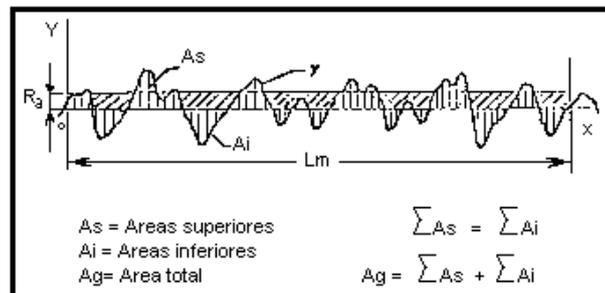


Fig.N° 1. Representa el área que corresponde a Ra.(22)

Sa es la extensión de Ra (media aritmética de la altura de una línea, (ec. [1])) a una superficie. (ec. [2])  $S_a$ , es la rugosidad promedio evaluada en toda la superficie 3D (Fig. N°2). Expresa, como un valor absoluto, la diferencia de altura de cada punto en comparación con el promedio aritmético de la superficie.

$$[1] R_a = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i|$$

$$[2] S_a = \frac{1}{A} \iint_A |Z(x, y)| dx dy$$

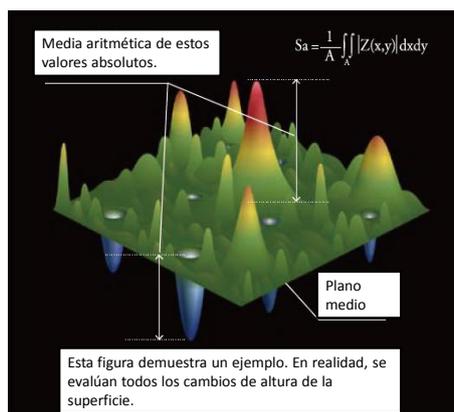


Fig.N° 2. Representa cómo se calcula Sa. (Tomada de Keyence.com)

Sin embargo, como se verá más adelante, estos parámetros son insuficientes para describir adecuadamente la textura y la topografía superficial.

### **Diversos tipos de implantes dentales según las características superficiales**

Los diversos tipos de implantes dentales pueden clasificarse según sus características superficiales en:

### ***a) Implantes maquinados de superficie lisa***

Los implantes osteointegrados, conocidos como implantes mecanizados, son los que registran la documentación clínica más extensa. La respuesta ósea de estas superficies ha sido extensamente evaluada en diferentes modelos animales, así como en ensayos clínicos.

La superficie de los implantes maquinados al ser calculada a través del parámetro Sa (Sa entre 0,3 – 1,0  $\mu\text{m}$ ) se considera que es mínimamente rugosa. Cabe aclarar que esta mínima rugosidad depende del tipo de titanio, la lubricación y velocidad durante el proceso de maquinado.

### ***b) Implantes con superficies rugosa***

Existen numerosos tratamientos superficiales que se incluyen en la fabricación de los implantes dentales de titanio para incrementar la rugosidad superficial de los mismos. Los más utilizados son el maquinado, arenado, grabado ácido, cubiertas bioactivas, oxidación anódica, modificación con láser o combinación entre estas.

Los implantes dentales avalados comercialmente han sido categorizados en cuatro grupos según su valor de rugosidad (23). Se utiliza el parámetro de rugosidad superficial Sa

- Lisos (Sa < 0,5  $\mu\text{m}$ )
- Mínimamente rugosos (Sa = 0,5 – 1,0  $\mu\text{m}$ )
- Moderadamente rugosos (Sa 1,0 – 2,0  $\mu\text{m}$ )
- Rugosos (Sa > 2,0  $\mu\text{m}$ )

Existe actualmente consenso en que la microtopografía del implante que posee un valor Sa de aproximadamente 1,0-2,0  $\mu\text{m}$  presenta mejores respuestas óseas.(24)

La evidencia experimental en modelos animales y la proveniente del desempeño clínico, han conducido a constatar que la mejor respuesta estaría asociada a las superficies moderadamente rugosas. Como resultado, la mayor parte de los implantes comercialmente disponibles poseen, hoy en día, una microtopografía que puede

considerarse como una de las principales características que contribuyen al éxito de los mismos. Asimismo, dentro de dicha microtopografía se define una nanotopografía. La influencia de las mismas aún está en discusión y sobre ellas se investigará en el presente trabajo.(25)

*b i. Implantes dentales de superficie rugosa por arenado*

Los implantes dentales de titanio pueden incrementar la rugosidad de su superficie mediante el impacto de partículas que se desplazan a gran velocidad. Las partículas golpean la superficie creando cráteres. A este procedimiento se lo denomina arenado. La rugosidad de la superficie depende del tipo de titanio así como del material, tamaño, forma, densidad y velocidad de las partículas.

Las superficies de implantes de titanio arenadas tienen valores de  $S_a$  entre 0,5 y 2,0  $\mu\text{m}$  y diferentes investigaciones demostraron una mejor oseointegración en comparación con los implantes maquinados.(26,27)

*b ii. Implantes dentales con superficie rugosa por grabado ácido*

Con el grabado ácido la superficie se corroe y se forman hoyuelos debido a la disolución del metal en los granos y límites de grano. En particular, ciertas fases y zonas con impurezas son más sensibles a la degradación por el ácido, por lo que se produce una eliminación selectiva del material. La rugosidad resultante depende del tipo de titanio, la microestructura superficial, el ácido y el tiempo en inmersión. Las superficies generalmente presentan rugosidades con valores de  $S_a$  entre 0,3 y 1,0  $\mu\text{m}$ . Ensayos en modelo animal demostraron mayor oseointegración que los implantes maquinados pero inferior a los de superficie tratada con plasma spray de titanio u oxidación anódica. (28)

*b iii. Implantes dentales con superficie arenada y grabada con ácido (SLA)*

Se trata de una superficie arenada que posteriormente es sometida a un tratamiento de grabado con ácido. Obteniéndose una rugosidad superficial dual.

Con el grabado ácido se eliminan los residuos de las partículas utilizadas en el arenado, al mismo tiempo que se moderan los picos más altos y los valles más profundos.

Los valores de Sa en estas superficies son de 1- 2  $\mu\text{m}$ .(29) Con esta superficie los investigadores demostraron mejor repuesta ósea, acortamiento del período de oseointegración, mejor estabilidad primaria y mayor contacto implante-hueso.(30,31)

#### *b iv. Implantes dentales con superficie recubierta*

Estos recubrimientos se desarrollaron con el objetivo de obtener mayor área superficial, mayor rugosidad para la estabilidad inicial y un contacto implante- hueso más fuerte. Su principal desventaja es el desprendimiento del recubrimiento por fricción durante la inserción del implante, sumado a una mayor adherencia bacteriana.(32)

Los materiales bioactivos de recubrimiento pueden ser bioestables (hidroxiapatita sintética) o bioreabsorbibles (vidrios bioactivos y vitrocerámicos), las técnicas de recubrimiento pueden ser por procedimientos físicos o por procedimientos químicos. Estos últimos tienen la ventaja de ser más adaptables a la complejidad de las formas de los implantes dentales.

El tratamiento de recubrimiento de superficie de implantes de titanio más difundido es el de Plasma Spray de Hidroxiapatita. Consiste en un proceso de pulverización con plasma a alta temperatura ( $> 1000^\circ \text{C}$ ) mediante el cual se incrementa el área superficial seis veces. El valor de Ra en los recubrimientos por pulverización con plasma es aproximadamente  $5,0 \pm 1,0 \mu\text{m}$ .(33)

#### *b v. Implantes dentales con superficie modificada con láser*

El láser es utilizado como herramienta de micromecanizado para producir una estructura 3D en nivel micrométrico y nanométrico. Es un método de elección para superficies geométricas complejas. Es una técnica rápida, extremadamente limpia, y adecuada para modificar de manera selectiva las superficies, permitiendo generar

complejas microestructuras con alta resolución. Estudios experimentales in vivo a corto plazo demostraron un aumento en la fuerza de unión implante- hueso.(34,35)

*b vi. Implantes dentales con superficie anodizada*

Este tratamiento de la superficie utiliza un proceso de oxidación, que cambia las características de la capa de óxido superficial mejorando la biocompatibilidad de la superficie.

El anodizado u oxidación anódica es un tratamiento electroquímico que se realiza en un electrolito corrosivo que contiene iones fluoruro. El proceso será explicado en detalle en el apartado siguiente. Las propiedades microestructurales y químicas de la superficie pueden ser modificadas variando diferentes parámetros del proceso tales como el potencial anódico, la composición del electrolito, temperatura y corriente. Además, dependiendo de la composición del electrolito, diferentes iones pueden integrarse en la capa de óxido, tales como los iones fosfatos, calcio, magnesio y fluoruro.(36–39)

### **2.1.5. Formación de óxido de titanio mediante anodizado**

Entre las modificaciones superficiales que pueden aplicarse a los implantes se analizará en este trabajo el proceso de anodización.

**Proceso de anodización.** La oxidación anódica es una técnica electroquímica utilizada para modificar la superficie de los metales. El titanio, como también el aluminio, el zirconio, el talio, el magnesio, el zinc y sus aleaciones pueden ser sometidos a este proceso, mediante la elección de condiciones adecuadas de anodizado. Mediante dicho proceso se logra el crecimiento de una capa de óxido de espesor controlado y con mejores propiedades que la capa de óxido formada naturalmente al estar expuesto el metal al aire atmosférico. El anodizado es una de las técnicas más versátiles y económicas para modificar la superficie del titanio y por ese motivo es el procedimiento utilizado en el presente trabajo. Mediante este proceso se modificará la arquitectura de su superficie, al mismo tiempo que se incorporarán otros elementos químicos contenidos en la solución electrolítica. En

este proceso se aplica una diferencia de potencial entre cátodo (platino) y ánodo (titanio) que facilita la formación de una película de óxido de forma controlada sobre la superficie del titanio.

***Características del óxido de titanio formado por anodización.*** La morfología, composición y espesor de la capa de óxido que se forman, dependerán de la naturaleza de la solución electrolítica (orgánica o acuosa), su composición química, la temperatura del baño, el pH, el tiempo empleado y el voltaje utilizado.(25) La morfología típica de la capa de óxido anodizado es una textura rugosa y porosa. El tamaño (longitud y diámetro) de los poros varía de unos pocos cientos de nanómetros a unos cuantos micrómetros dependiendo de los parámetros utilizados. Los poros no son uniformes en la misma superficie anodizada. Además, estos poros pueden o no estar interconectados y tener una estructura estratificada.(40,41) El espesor de la película de óxido aumenta con tiempo de oxidación hasta 10  $\mu\text{m}$ .(25) La capa micro o nano porosa generada presenta propiedades beneficiosas para los implantes como son la limpieza de residuos orgánicos e inorgánicos de la superficie, la mejora de la resistencia a la corrosión, la disminución de la liberación de iones de titanio al medio fisiológico y, en algunos casos, el aumento en la dureza superficial y de la resistencia al desgaste.(42)

***Fenómenos de interferencia: color de la superficie anodizada.*** Como resultado del fenómeno de interferencia de la luz, luego del proceso de anodizado aparecen diferentes colores a niveles específicos de voltaje. El fenómeno de interferencia ocurre entre ciertas longitudes de onda reflejadas por la superficie del metal (y que atraviesan la película de óxido), y las longitudes de onda de luz que son reflejadas directamente sobre la superficie del óxido. Cuando la interferencia es constructiva, la superficie del titanio anodizado presenta un color brillante. Si la interferencia es destructiva, se percibirá un color oscuro.(43) Algunos autores han reportado que el color del titanio anodizado no sólo depende del espesor de la película de óxido formada sobre el metal, sino también de la naturaleza química de este óxido cuya composición puede variar desde  $\text{TiO}$  hasta el  $\text{Ti}_7\text{O}_{12}$ . Cada uno de estos óxidos presenta una superficie coloreada según se muestra en la Fig. N°3.(44–46)

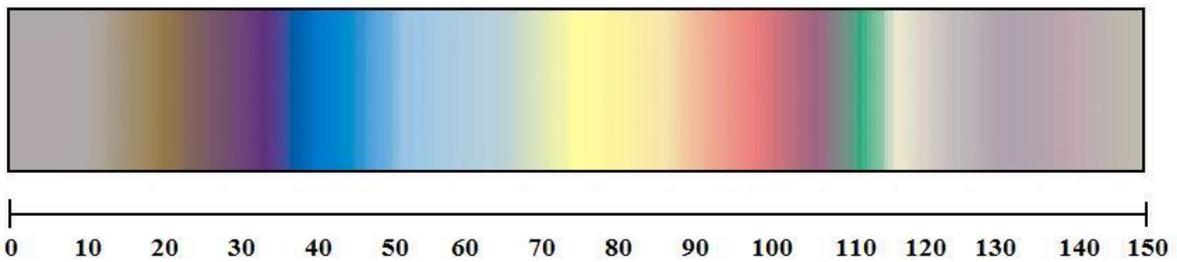


Fig. N° 3. Escala de colores de los óxidos obtenidos por anodización a diferentes voltajes. (Tomado de [www.wolften.pl](http://www.wolften.pl))

La coloración de las películas delgadas puede ser descrita por la teoría de la interferencia de haz múltiple (Fig. N° 4). Cuando la luz blanca (haz 1) hace contacto con la película, el haz reflejado que está formado por los rayos interferentes (2, 5, 8, 11, . . .) será de color (ver rayos en figura N° 4).(47)

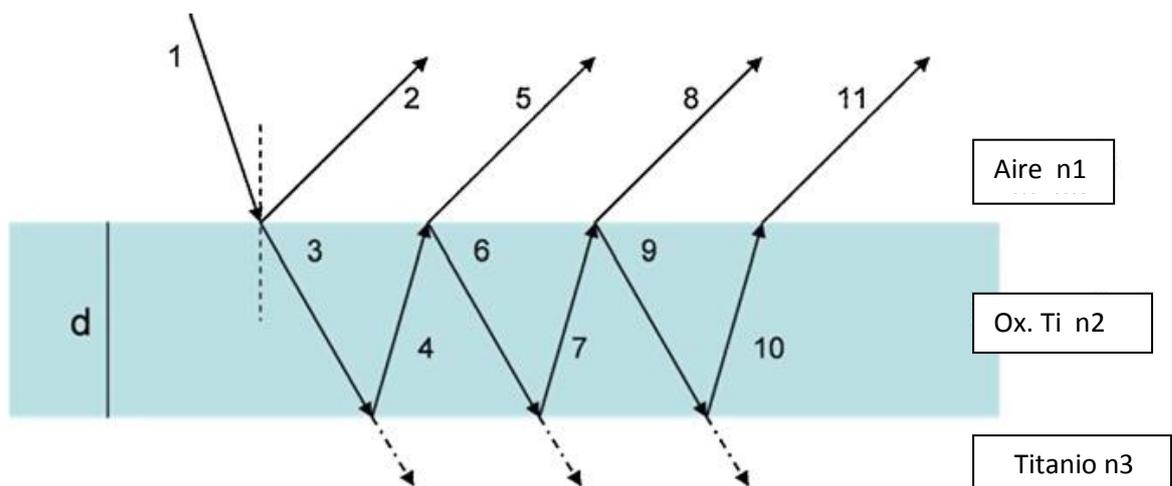


Fig. N° 4. Esquema que describe la teoría de la interferencia de haz múltiple.  $d$ : espesor de la película;  $n_1$ ,  $n_2$  y  $n_3$ : índices de refracción de aire, película de óxido y sustrato metálico respectivamente.(48)

Mientras que los colores de óxido anódico están principalmente relacionados con el espesor de las películas ( $d$ ), hay varios factores que influyen en el color resultante observado en cada condición de anodizado que puede alterar la secuencia de colores respecto a la sucesión teórica. Los principales factores son: rugosidad del sustrato, espesor no uniforme de la película sobre toda la muestra, estequiometría del óxido superficial, defectos o impurezas presentes.(47) Por esta razón los colores reportados

por los diferentes autores son diferentes, incluso cuando se utiliza el mismo potencial que conduciría al mismo grosor. Así, la variación en los colores es notoria cuando se utilizan diferentes electrolitos, o incluso cuando se cambian las concentraciones del mismo electrolito. Estas diferencias son evidentes en los estudios de los óxidos anódicos de titanio, cuando los colores reportados difieren de un autor a otros.(45,49) Sin embargo, cuando se mantienen las condiciones experimentales, es decir las características del sustrato, voltaje y tiempo de anodizado, electrolito y propiedades metalúrgicas de las muestras, los colores del óxido podrían utilizarse con el propósito de una rápida identificación del espesor de la capa óxido en asociación con el voltaje de formación anódica.(49)

***Soluciones electrolíticas utilizadas en el anodizado.*** Existen diferentes tipos de soluciones electrolíticas, a saber: soluciones ácidas acuosas, soluciones tampón (*buffer*) acuosas, y soluciones orgánicas (no acuosas) pero que contienen trazas de agua. El titanio y sus aleaciones, a diferencia del aluminio, generan capas barrera en electrolitos ácidos (fosfórico, sulfúrico, bórico) por lo tanto para generar capas nanoporosas o nanotubulares es necesario que los electrolitos contengan iones fluoruro y/o cloruro, debido a que la solubilidad del óxido de titanio es mayor en ellos.

***Estructuras de óxidos nanoporosos/nanotubulares.*** Grimes y col. propusieron clasificar a las capas nanoporosas/nanotubulares crecidas en titanio y sus aleaciones en cuatro generaciones según el electrolito empleado para fabricarlas.(50) La primera generación es aquella en donde el crecimiento de las capas nanoporosas o nanotubulares crece en soluciones acuosas ácidas con ácido fluorhídrico.(51) La segunda generación utiliza en vez de ácido fluorhídrico, sales de fluoruro, las cuales permiten controlar de manera auto-inducida la acidificación en el fondo del poro y permiten obtener así capas de mayor espesor.(52) La tercera generación, a diferencia de las generaciones anteriores que utilizaban electrolitos acuosos, utiliza electrolitos orgánicos con sales de fluoruro (0,1-0,5 wt%) y pequeñas cantidades de agua (0,1-5 wt%).(53) La cuarta generación se realiza en electrolitos acuosos libres de fluoruro, como ácido oxálico, fórmico, sulfúrico o perclórico.(54)

## **Sección 2.II: Fallas de los implantes dentales. Adhesión bacteriana y formación de biofilm.**

### **2.II.1 Fallas clínicas de los implantes dentales**

Unas de las causas más frecuentes en el fracaso de los implantes dentales son la sobrecarga oclusal y la infección peri-implantaria.(1) Para evitar la sobrecarga oclusal se debe realizar un correcto diagnóstico de la oclusión del paciente con el objetivo de generar, con el tratamiento de rehabilitación protética, una oclusión orgánica mutuamente protegida y compartida.(55) Para evitar la infección peri-implantaria necesitamos de estrategias cuyo propósito primordial sea inhibir la adhesión de microorganismos a la superficie del biomaterial implantológico.

El análisis directo de los implantes y de los tejidos ante estas infecciones muestra claramente que en la mayoría de los casos los microorganismos responsables de la infección crecen adheridos a las superficies formando biofilms.(56)

### **2.II.2. Adhesión bacteriana y formación de biofilms**

#### **2.II.2.1. Bacterias y biofilms bacterianos**

Las bacterias pueden encontrarse en la naturaleza bajo dos formas o estados:

- a) Bacterias planctónicas, suspendidas y flotando libres en un fluido.
- b) Bacterias sésiles (formadoras de biofilms), que crecen formando colonias adheridas a superficies.

El crecimiento de microorganismos se produce naturalmente sobre cualquier superficie sólida en contacto con agua no estéril formando sistemas organizados que se denominan “biofilms”. El descubrimiento y explicación del crecimiento y desarrollo de microorganismos sobre las superficies formando biopelículas o biofilms a fines de los años setenta del siglo XX, ha sido un adelanto importantísimo para la microbiología.(57)

El 99% de todas las células bacterianas existen en calidad de biofilms, mientras que solo el 1% vive en estado planctónico. Excepto en algunas situaciones, las bacterias en forma aislada no producen daños importantes y dicho estado las hace más vulnerables a los factores del medio en que se encuentran. Sin embargo, estas células microscópicas han logrado evolucionar de tal manera, que se organizan y conviven con otras especies diferentes, aprovechando los productos que se ofrecen entre sí, dentro de su comunidad ecológica.

Muchos autores se han ocupado en definir los biofilms, las definiciones que más se destacan son las siguientes:

- i) Comunidades microbianas adheridas a una superficie, rodeadas por una matriz extracelular polimérica de origen microbiano y otros productos del medio.(58)
- ii) Comunidad estructurada de células bacterianas embebidas en una matriz polimérica propia y adheridas a una superficie viva o inerte.(59)
- iii) Consorcio funcional de microorganismos organizados en una extensa matriz polimérica.(60)
- iv) Comunidad compleja de microorganismos, unidos irreversiblemente a una superficie, a una interfase y entre ellos, embebidos en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares, que exhiben una alteración del fenotipo con respecto a su velocidad de crecimiento y transcripción genética.(61)

#### 2.II.2.2. Estructura de los biofilms

Utilizando como medio directo de observación la microscopia laser confocal de barrido (observación directa, hidratada, in vivo y en tiempo real) se ha mostrado claramente que la estructura de los biofilms se compone por microcolonias bacterianas entre un 15-20% de su volumen, envueltas en una densa matriz polimérica extracelular entre un 75-80% de su volumen, con canales de agua bien marcados, que funcionan como un sistema circulatorio primitivo.(59)

En determinados ambientes los biofilms están formados por bacterias, sino que además pueden convivir con hongos, levaduras, algas y protozoos. Por otra parte, las

bacterias no son siempre de una especie única, sino que están formados por diferentes especies que viven en comunidad.

Los microorganismos adoptan diferentes formas de agrupamiento dentro de los biofilms, y dichas formas están condicionadas por el movimiento de los fluidos en los canales de agua, y también por la disponibilidad de nutrientes. Con bajas velocidades y bajo esfuerzo de corte las microcolonias adoptan formas de torres con espacios vacíos alrededor, mientras que con esfuerzos más altos las colonias son de forma elongada y siguen la dirección del flujo.(62)

La matriz polimérica extracelular está formada por un 95% de agua, se compone tanto de productos extracelulares bacterianos como de sustancias que provee el medio ambiente (ácidos nucleicos, proteínas, nutrientes, etc.) y es predominantemente aniónica, de manera que atrapa minerales y nutrientes del medio. Esta matriz mantiene unida a las bacterias y les brinda protección frente a amenazas del medio que rodea al biofilm.(62)

#### 2.II.2.3. Fases en la formación del biofilm

La formación de un biofilm sobre una superficie (Fig.Nº 5) es descrita mediante la sucesión de una serie de fases(59):

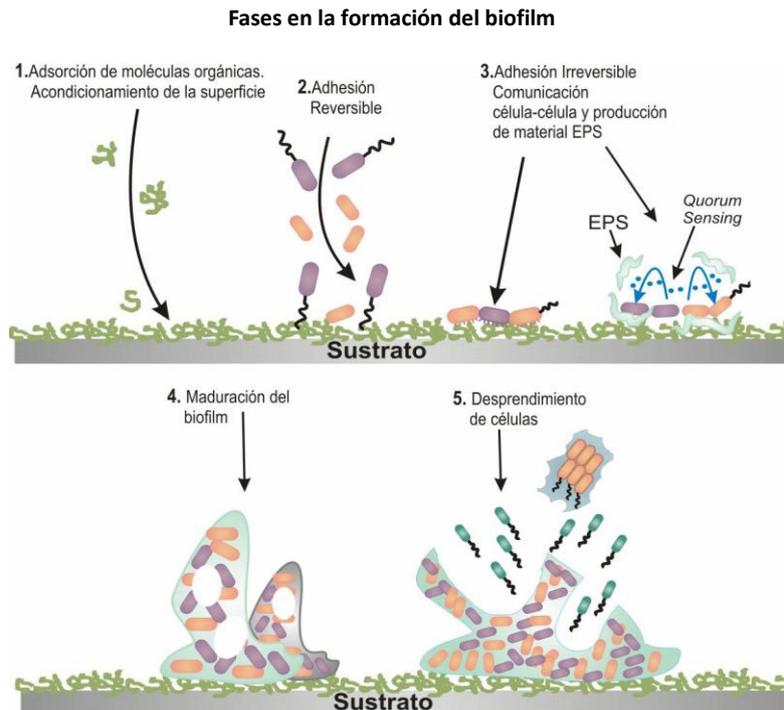


Fig.Nº 5. Fases en la formación del biofilm

### ***Fase 1- Adsorción de moléculas del huésped***

La fase inicial es la adsorción de una fina película orgánica sobre la superficie, dependiendo del tipo de moléculas adsorbidas esta película puede cambiar las propiedades fisicoquímicas de la superficie del sustrato, principalmente la energía superficial y la carga de la superficie. Esta película es denominada “película condicionante o adquirida”, y sobre ella se adhieren las bacterias y colonizan la superficie, el rol de esta película es fundamental ya que no todos los microorganismos poseen mecanismos de adhesión que les permitan colonizar las superficies.(56)

### ***Fase 2- Adhesión bacteriana primaria (reversible)***

La adhesión primaria consiste en el encuentro de una superficie y una bacteria planctónica, esta fase es reversible y está basada en una serie de variables fisicoquímicas que definen la interacción entre la pared bacteriana y la superficie del sustrato. La bacteria se acerca a la superficie por una corriente de flujo, de forma más directa por quimiotaxis o por movilidad de la propia bacteria.(59) En esta fase juegan un rol importante los flagelos, fimbrias, pilis, etc. que pueden vencer fuerzas

de repulsión entre las bacterias y el sustrato. Las bacterias en esta fase pueden rodar, reptar, formar agregados e hileras.(59)

Una vez que está a menos de 1 nm de distancia con respecto a la superficie lo que determina que se produzca la unión es la suma de las fuerzas de atracción y de repulsión entre ambas superficies. Cabe recordar que las fuerzas electrostáticas tienden a favorecer la repulsión ya que tanto las bacterias como las superficies se encuentran cargadas negativamente.(56)

### ***Fase 3- Adhesión bacteriana secundaria (irreversible)***

La unión entre la superficie de la bacteria y la del sustrato se consolida por la producción de polímeros extracelulares por parte de las bacterias, que se van acoplado por ligandos específicos de receptores localizados en los pilis, fimbrias y fibrillas de la bacteria. Esta unión es irreversible y la bacteria queda unida firmemente a la superficie. Las bacterias planctónicas se pueden unir unas a otras por co-agregación, y a diferentes especies que estén ya unidas al material por co-adhesión, formando microcolonias.(63)

### ***Fase 4- Maduración del biofilm***

La maduración del biofilm da como resultado una compleja estructura, con canales, poros y redistribución de las bacterias sobre el sustrato. La densidad global del biofilm aumenta a medida que los organismos adheridos se replican, mueren y los componentes extracelulares de las bacterias interactúan con las moléculas orgánicas e inorgánicas presentes en el medio circundante.

El potencial crecimiento de cualquier biofilm está limitado por la disponibilidad de nutrientes en el ambiente inmediato, la penetración de estos nutrientes dentro del biofilm y la eliminación de residuos. Otros factores que pueden controlar la maduración del biofilm son el pH interno, la penetración de oxígeno y fuentes de carbono y la osmolaridad.(64,65)

### ***Fase 5- Desprendimiento activo***

El equilibrio dinámico de un biofilm se alcanza cuando las capas más externas de éste comienzan a generar células planctónicas metabólicamente activas y capaces de dividirse, las cuales pueden colonizar nuevas superficies.

Esta liberación de bacterias se puede producir mediante tres mecanismos: (a) Erosión: remoción continua de partes del biofilm, (b) Separación: remoción rápida y

masiva y (c) Abrasión: liberación por colisión de partículas suspendidas en el líquido circundante con el biofilm.(66)

#### 2.II.2.4. Factores que intervienen en la formación de un biofilm

##### 2.II.2.4.a *Influencia de las características fisicoquímicas del sustrato en la adhesión microbiana*

Debido a la notable influencia que ejercen las propiedades fisicoquímicas de la superficie del sustrato en las etapas iniciales de la formación de los biofilms es oportuno explicar cómo influye cada una.

Existen dos visiones diferentes con respecto a la influencia de la “película condicionante” que se adsorbe sobre la superficie del sustrato: una sugiere que la película actúa como amortiguador de las propiedades superficiales y que, por lo tanto, las enmascara favoreciendo la adhesión bacteriana. Mientras que la otra considera que es posible que el sustrato transmita sus propiedades fisicoquímicas a la película adquirida.(67)

A continuación se describe cómo influyen la energía superficial, la rugosidad y la carga superficial en la adsorción de compuestos orgánicos sobre la superficie del sustrato y la posterior adhesión bacteriana.

- i) Energía superficial: existen superficies con alta energía superficial como el acero inoxidable, el oro, etc, y también encontramos superficies con baja energía superficial, por ejemplo las resinas. Cuando la energía superficial del sustrato es alta, favorece la hidrofilia, mientras que si la energía superficial es baja, favorece la hidrofobia. Si la energía superficial de la bacteria es superior a la del medio, la adhesión se ve favorecida por la hidrofilia. Por el contrario en condiciones de hidrofobia, la energía superficial de la bacteria debe ser menor que la del medio circundante, para que se vea favorecida la adhesión.
- ii) Rugosidad superficial: algunos autores afirman que las superficies más rugosas tienen la capacidad de retener más microorganismos, porque aumenta el área superficial.(68) Sin embargo, existen controversias

porque algunos investigadores han propuesto que no existe una relación estática entre la rugosidad del sustrato y la adhesión bacteriana sobre superficies.(69–71) Por lo tanto, no se ha elucidado aún, si existe una clara correlación entre la topografía caracterizada por los parámetros de rugosidad y la adhesión bacteriana. Sin embargo diferentes estudios han demostrado cómo sub-micropatrones superficiales influyen en la longitud de las bacterias, su alineación y distribución, en las etapas iniciales de la formación del biofilm, concluyendo que la etapa inicial de la formación de una colonia se ve obstaculizada por el patrón de rugosidad superficial, y que la forma de las colonias (planas o 3D) se ven influenciadas también.(72–74)

También ha sido demostrado como el patrón de rugosidad en sintonía con el tamaño bacteriano influyen en la adhesión bacteriana.(75)

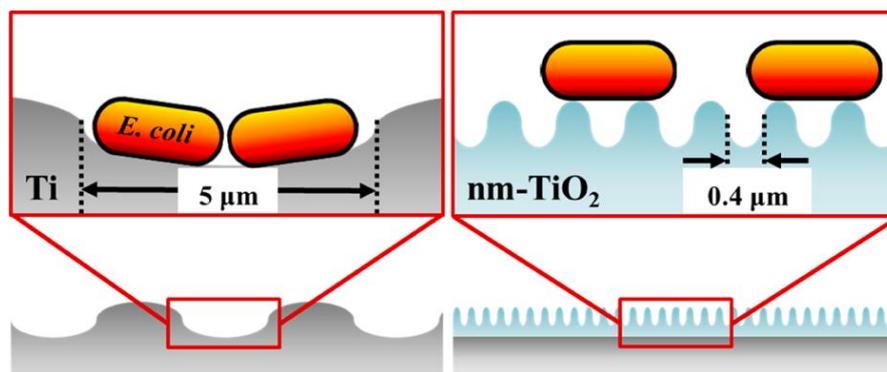


Fig.Nº 6. Muestra la influencia del tamaño de la topografía en relación con el tamaño de los microorganismos y como determinan su ubicación, alineación y distribución.(75)

- iii) Carga superficial: las células bacterianas, por lo general, tienen una carga neta superficial negativa a pH neutro.(76) la magnitud de la carga varía entre especies y está influenciada por las condiciones de cultivo, la fuerza iónica y el pH. (77–80) La mayoría de las bacterias tienen potenciales Z negativos La carga superficial se determina mediante el potencial Z, calculado a partir de la movilidad de la célula bacteriana en presencia de un campo eléctrico bajo concentraciones definidas de sales y pH a un pH fisiológico.(77,81,82) Se han reportado explicaciones disímiles con

respecto a la relación entre la carga superficial del microorganismo y la adherencia a un sustrato. Una justificación para este hecho podría ser que la carga superficial bacteriana viene dada por la disociación de los grupos ácidos como los carboxilos, fosfatos y grupos aminos, como también de los grupos básicos que se encuentran en la membrana celular. En consecuencia, el potencial zeta de la bacteria depende de la fuerza iónica del medio. A mayor fuerza iónica, la disponibilidad de iones para proteger y luego neutralizar la carga superficial es mayor. La carga superficial de los sustratos sobre los que las bacterias se adhieren probablemente tenga también un rol en la adhesión microbiana.(67)

Narendran y colaboradores(83), han reportado que la adhesión bacteriana no puede ser explicada sólo por la influencia de la carga superficial celular y sugieren que la adherencia de microorganismos es un mecanismo complejo con muchos factores involucrados.

La interacción entre una superficie y una célula bacteriana parece estar mediada por un arreglo complejo de interacciones físicas y químicas, y cada una de ellas se encuentra afectada por las características físicas y químicas del ambiente al cual están expuestos tanto el sustrato como la bacteria. Los múltiples factores involucrados en la adhesión celular reversible e irreversible dificultan la caracterización del rol y la importancia que tiene cada factor en el proceso de adhesión.

#### 2.II.2.4.b *Comunicación célula-célula durante la formación del biofilm*

La comunicación entre los microorganismos ejerce una influencia importante en el momento de la formación del biofilm, como así también la comunicación con las células huésped eucariotas en el caso de infecciones.

En algunos casos estas comunicaciones permiten relaciones sociales y hacen posible sincronizaciones de comportamiento de grupo, que les permiten actuar como si fueran organismos multicelulares.(59) Hay diferentes mecanismos de comunicación, los hay de corto y de largo alcance; en un sentido, en ambos sentidos, múltiples sentidos y señalización mediada por contacto.(64)

A continuación se describen brevemente.

a) Quorum sensing (QS)

Ciertas bacterias utilizan la producción, liberación, intercambio y detección de moléculas señalizadoras para medir densidad poblacional, y contralar su comportamiento en respuesta a la variación en el número de microorganismos.

Este proceso conocido como *quorum sensing* es fundamental para la formación, crecimiento y desarrollo del biofilm.(84–86)

b) Comunicación de corto alcance

En el extremo opuesto del *quorum sensing* se encuentra las señales de corto alcance, estas requieren el contacto directo entre células individuales para el intercambio de información. Algunas bacterias a través de estos mecanismos logran un movimiento cooperativo celular para deslizarse sobre las superficies que finalmente termina en un cúmulo de células en el cual se lleva a cabo el proceso de formación de esporas.

Otro mecanismo de comunicación contacto dependiente y uno de los primeros en ser estudiado es la conjugación mediada por pilis sexuales.(87–89)

#### 2.II.2.5 Mecanismo de resistencia de los biofilms

Para desarrollar estrategias de erradicación de un biofilm es necesario conocer previamente los mecanismos de resistencia que los caracteriza.

Se ha podido demostrar que las células bacterianas pueden ser entre 10-1000 veces más resistentes cuando están formando un biofilm que cuando se encuentran en forma planctónica.(61)

Los biofilm presentan diferentes mecanismos de defensa tales como:

i. *Penetración restringida y degradación de antibióticos.*

La penetración de los agentes antimicrobianos en el biofilm está restringida por la presencia de los exopolisacáridos de la matriz que limitan la difusión de sustancias o la unión del antimicrobiano a las bacterias más externas, proporcionando una resistencia efectiva a las bacterias del interior de la biopelícula.

ii. *Baja tasa de crecimiento.*

Generalmente los antibióticos son más efectivos en el ataque rápido, sobre bacterias en etapa de crecimiento. Las bacterias del biofilm al regular la tasa de crecimiento generan este mecanismo de defensa.

iii. *Cambios fenotípicos.*

Las bacterias expresan genes en respuesta de fluctuaciones ambientales, como cambios de temperatura, oxidación, baja disponibilidad de oxígeno, daños de ADN, los cuales se transmiten entre ellas, logrando un mecanismo de defensa específico y la resistencia al ataque de numerosos agentes.

iv. *Persistencia bacteriana.*

Se relaciona con la capacidad de resistir al ambiente agresivo de un cierto número de células bacterianas de la biopelícula (bacterias persistentes).

#### 2.II.2.6 Formación de biopelículas en la cavidad oral.

Tal como se explicó, aunque la composición de los biofilms es variable en función del sistema en estudio, el componente mayoritario de los mismos es el agua, que puede representar hasta un 97% del total. Además del agua y de las células bacterianas, la matriz del biofilm es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos, y en menor proporción proteínas, ADN y productos diversos provenientes de la lisis bacteriana. Las fases de formación del biofilm ya fueron descritas con más detalle, pero es importante recordar que las bacterias se adhieren a las superficies mediante distintos mecanismos, algunas poseen estructuras para la adhesión específicas, como sustancias poliméricas extracelulares (adhesinas) y fimbrias (prolongaciones en forma de bello), que les permiten una adhesión rápida al contacto. Otras especies de bacterias requieren de una exposición prolongada para adherirse, o necesitan que otras bacterias estén adheridas previamente porque poseen receptores específicos en su superficie.(90–92) La masa de microorganismos aumenta debido a la multiplicación de las bacterias adheridas, a la adhesión de nuevas bacterias y a la síntesis de polímeros extracelulares, que actúan como sustrato para la adhesión. Estos polímeros son además utilizados por las bacterias para nutrirse, entre ellos podemos destacar los glucanos.(67,90,91)

### 2.II.2.7 Microorganismos formadores de los biofilms de la cavidad oral

La riqueza de conocimientos sobre el perfil microbiológico de las infecciones de implantes dentales deriva de las investigaciones realizadas sobre la microbiota correspondiente a los sitios de periodontitis. Con el advenimiento de los estudios biomoleculares PCR (Proteína C Reactiva) y PCR rt (Proteína C Reactiva en tiempo real) se confirmó que la microbiota presente en las infecciones de los implantes dentales comparten puntos en su perfil microbiano con las bolsas periodontales.

Los microorganismos asociados a los procesos infecciosos periodontales y a los relacionados con los implantes dentales son muy variables, entre ellos pueden mencionarse *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prebotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Staphylococcus aureus*.(1,56,93,94) El grupo del denominado “complejo rojo” (*Porphyromona gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*) se encontró en los recuentos en valores más elevados en implantes dentales con infección que en implantes dentales sanos. La única diferencia microbiológica del análisis es el recuento más alto de *Staphylococcus aureus* en las infecciones peri-implantarias.(95) Otro estudio también afirma que *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Cándida albicans* se encontraron frecuentemente en las peri-implantitis, lo que sugiere que pueden estar asociados con la falla de los implantes.(96) También existe evidencia de la participación de *Staphylococcus aureus* en infecciones por contaminación quirúrgica, durante procedimientos de cirugía implantológica dental.(97)

Se ha podido constatar que la adhesión bacteriana depende, entre otros factores, de la especie de microorganismo y del sustrato. Wolinsky y col.(98), demostraron que la especie *Actinomyces viscosus* se adhieren en una proporción 5 veces mayor en la superficie del esmalte dental que en la superficie de titanio del implante, en contraste con el *Streptococcus sanguinis* que se adhiere en proporciones similares en ambas situaciones.(99) La interacción de los implantes con los microorganismos ocurre generalmente al ser expuestos al medio bucal, es decir, en la fase de colocación del pilar de cicatrización de los implantes, con las excepciones de los casos de

contaminación bacteriana durante el acto operatorio quirúrgico implantológico, con técnica de colocación en una fase o de la exposición accidental de los tornillos de cierre por fallas en la sutura de los tejidos blandos.(100)

La colonización primaria del esmalte está dominada por cocos Gram positivos anaerobios facultativos, donde el más destacado es el *Streptococcus sanguinis*, el cual pertenece al grupo *viridans*, una vez que este microorganismo prolifera se coagregan bacilos Gram positivos como el *Actinomyces viscosus*, y los receptores de superficie en estos cocos y bacilos recién permiten la adhesión de formas espirilares, y fusiformes Gram negativas. El resultado de esta evolución es un conjunto complejo de especies bacterianas interrelacionadas.(101)

Los tejidos blandos que rodean al implante son un mecanismo de protección y actúan como barrera biológica ante los posibles intentos de colonización por parte de la flora microbiana bucal.(1,102) La pérdida del sellado mucoso peri-implantario, combinado con un control deficiente de la placa bacteriana dental promueven la proliferación de bacterias anaerobias que penetran el surco periimplantario produciendo mucositis. Si esta situación no es controlada adecuadamente pasados 10 o 15 días puede evolucionar a una peri-implantitis con su pérdida ósea característica.(56)

#### **2.II.2.8 Generación de superficies anti-biofilm**

Los estudios clínicos realizados, demuestran que una correcta técnica de higiene bucal, complementada con el uso de antisépticos y la limpieza profesional periódica, contribuyen a controlar y mantener un biofilm compatible con la salud oral.(103) Sin embargo, se sabe, que los dientes una vez erupcionados son rápidamente colonizados por microorganismos bucales. Por lo tanto, es razonable asumir que la colocación de algún dispositivo protético en la cavidad bucal provee un hábitat adicional para la adhesión y colonización microbiana. Por este motivo, la búsqueda de biomateriales que disminuyan la adhesión de microorganismos o que tengan propiedades antimicrobianas sigue siendo el propósito de muchas líneas de investigación cuyo fin es reducir la formación de biofilm sobre los mismos.(99)

Varios trabajos de investigación consultados evidencian que ciertas modificaciones en las propiedades físicas y químicas de la superficie del titanio utilizado en la fabricación de implantes dentales podrían favorecer la oseointegración y disminuir la adhesión de las bacterias.(33,39,104–117)

2.II.2.9 Utilización de la oxidación anódica con electrolitos que contienen iones fluoruro para inhibir la adhesión bacteriana

Arenas et al.(106), desarrollaron una técnica de anodizado de una aleación de Ti (Ti6Al4V) utilizando una solución electrolítica que contenía flúor para tratar la superficie de implantes de cadera. Encontraron una disminución en la adhesión bacteriana y sugirieron que tal efecto podría estar asociado al tratamiento superficial por anodizado del biomaterial, utilizando un electrolito con fluoruros. En el ensayo utilizaron cepas de *Streptococcus dermis* y de *Staphylococcus aureus*.

Los efectos del flúor sobre la salud dental comienzan a investigarse a partir de observaciones realizadas a comienzo del siglo XX. Se ha comprobado que el flúor es efectivo en la prevención de la caries, motivo por el cual está presente en la composición de pastas y geles para la higiene dental y en materiales de restauración. Su acción sobre la microbiota de la cavidad bucal es la siguiente: actúa inhibiendo el metabolismo energético celular. El flúor interviene sobre el Ciclo de Krebs al combinarse con la enolasa y de este modo comienza a alterarse el metabolismo intracelular bacteriano de los hidratos de carbono. Entre otros efectos adicionales, i) produce depresión enzimática y como consecuencia una reducción en la producción de ácido y de la síntesis de polisacáridos; ii) inhibe la adsorción de aminoácidos en la película salival y desadsorción de albúmina y iii) produce inhibición de la adherencia bacteriana por competencia en la captación de  $\text{Ca}^{++}$  con el ácido lipoteicoico de la pared celular de las bacterias Gram positivas.(118,119)

2.II.2.10 Utilización de agentes antimicrobianos para inhibir la adhesión bacteriana.

Algunos polifenoles pueden formar recubrimientos antioxidantes y antimicrobianos que son conocidos por su " efecto antimicrobiano en la superficie", a diferencia de los denominados "con efecto antimicrobiano fuera de la superficie" que liberan los componentes antimicrobianos en el medio. Los polifenoles han atraído la atención de los investigadores de materiales debido a la demanda ambiental para reemplazar los materiales derivados del petróleo con fitocompuestos renovables. Estos compuestos son metabolitos secundarios de las plantas en los que juegan un papel fundamental en la defensa contra la radiación UV, los microorganismos y los insectos.(120,121)

Entre estas sustancias se encuentra el timol (TOH), el cual es un aceite esencial proveniente de especias como el orégano y el tomillo y que tiene un gran poder antimicrobiano. Su mecanismo de acción consiste en cambiar la permeabilidad de la membrana citoplasmática de las bacterias provocando la salida del material intracelular y por consiguiente provocando la lisis bacteriana.(122)

Mediante un procedimiento electroquímico de electropolimerización utilizando una técnica de cronoamperometría, el timol podría ser adsorbido sobre la superficie del titanio, un proceso de similares características ha sido empleado con éxito sobre otras superficies metálicas como el cobre.(123)

### **Sección 2.III: Fundamentos de las técnicas que se utilizan para realizar análisis superficial**

En la Sección 2.II se describió cómo influyen la energía superficial, la rugosidad y topografía superficial en la adsorción de compuestos orgánicos sobre la superficie del sustrato y la posterior adhesión bacteriana. A continuación se describen los fundamentos de las técnicas que se utilizan para realizar el análisis superficial.

#### **2.III.1 Tensión superficial**

La humectación ha recibido un enorme interés, ya que desempeña un papel importante en muchos procesos físicos y químicos de las superficies. En los últimos

años el interés creciente fue en el estudio de superficies superhidrófobas, con aplicación en autolimpieza, nanofluidos y electrohumectación.

Existen diferentes técnicas para medir el ángulo de contacto y de tener datos acerca de la energía superficial, entre ellos podemos mencionar como uno de los más utilizados, el método convencional de medida de ángulo de contacto mediante un goniómetro, aunque también se utilizan el método de equilibrio de Wilhelmy y el análisis de la forma de la gota.

El ángulo de contacto se define como el ángulo formado por la intersección de la interfase sólido-líquido y la interfase vapor-líquido (geométricamente adquirida mediante la aplicación de una línea tangente desde el punto de contacto a lo largo de la interfase líquido-vapor en el perfil de la gota. La interfase donde sólido-líquido-vapor coexisten se llama línea de contacto trifásica. (Fig.Nº 7)

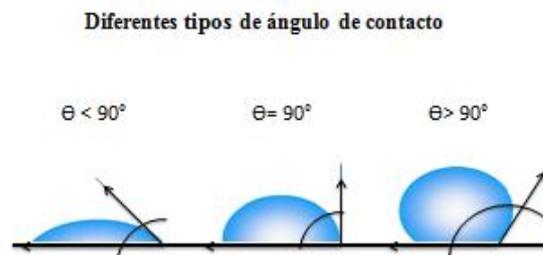


Fig.Nº 7. Muestra cómo se miden los ángulos de contacto.

Los ángulos de contacto menores a  $90^\circ$  corresponden a una alta humectabilidad, mientras que ángulos mayores a  $90^\circ$  corresponden a baja humectabilidad.

La forma de la gota líquida está determinada por la tensión superficial del líquido. Cabe recordar que en un líquido puro cada molécula del interior ejerce fuerzas por

igual en cada dirección hacia las moléculas líquidas vecinas, lo que resulta en una fuerza neta de cero. Esto no ocurre con las moléculas de la superficie, porque no cuentan con moléculas vecinas en todas las direcciones para proporcionar una fuerza neta equilibrada. En consecuencia, en forma simplificada, podemos decir que son empujadas hacia adentro por las moléculas vecinas creando una presión interna. Como consecuencia el líquido contrae su área superficial para mantener su energía libre de superficie más baja. La fuerza intermolecular que contrae la superficie se llama tensión superficial, y es la responsable de la forma de la gota de los líquidos.

En la práctica la forma de la gota está influenciada también por fuerzas externas como la de la gravedad, por lo tanto el ángulo de contacto está determinado por la tensión superficial y por dichas fuerzas externas.(124–126)

Thomas Young en 1805 reportó que el ángulo de contacto  $\theta$  de una gota de un líquido sobre una superficie sólida ideal es definido por el equilibrio mecánico de la gota bajo la acción de tres tensiones interfaciales: entre sólido y vapor  $\gamma_{sv}$ , entre sólido y líquido,  $\gamma_{sl}$  y entre líquido y vapor,  $\gamma_{lv}$  y lo describió matemáticamente

como: 
$$\gamma_{SV} - \gamma_{SL} = \gamma_{LV} \cos \theta$$

### **2.III.2 Topografía**

Desde el punto de vista de la ciencia e ingeniería de los materiales, la topografía se encarga de la descripción del conjunto de particularidades geométricas artificiales o naturales que caracterizan a una superficie. Uno de los conceptos que utiliza la topografía para describir la irregularidad de las superficies es la rugosidad.(127)

A través de los parámetros que caracterizan a la topografía es posible obtener información sobre las particularidades geométricas que caracterizan la superficie. Se sabe que la misma influye no sólo en el proceso de oseointegración, sino también en los procesos de adhesión de las bacterias. Por lo tanto, realizando estudios con superficies caracterizadas por distintos parámetros sería posible analizar cuál sería la más conveniente para reducir los efectos indeseables como la adhesión bacteriana.

La topografía clasifica a las superficies en dos grupos principales, las estocásticas y las determinísticas. Las estocásticas son superficies cuya rugosidad es obtenida de forma aleatoria, un ejemplo de este tipo son las superficies que se forman por rotura, por granallado o por depósitos aleatorios, mientras que las determinísticas son aquellas con un patrón geométrico establecido.(127) Las superficies tratadas mediante anodizado son estocásticas.

### 2.III.2.1. Técnicas para evaluar la topografía superficial

En general los métodos para medir rugosidad se dividen en métodos de contacto y de no contacto de acuerdo a que el instrumento medidor contacta o no la pieza al analizarla. Se puede medir la rugosidad utilizando un perfilómetro, el microscopio de fuerzas atómicas (AFM), o el microscopio electrónico de barrido (SEM).

#### *a) Perfilómetro*

El perfilómetro consta de una punta muy fina, la cual entra en contacto con la superficie a estudiar y mediante un barrido controlado en línea recta identifica diferencias de altura, las cuales se convierten en señales eléctricas que son registradas y convertidas en gráficos. La sensibilidad de este equipo es menor que la que presenta el AFM. (22,127,128)

#### *b) Microscopio de Fuerzas Atómicas (AFM)*

Desde su invención en 1986 por Binnig y colaboradores, el AFM se ha convertido en una herramienta básica en el estudio de la materia a micro y nano escala. Permite medir longitudes de muestreo máximas de 100  $\mu\text{m}$  con resolución nanométrica. (127) Su principio de operación es sumamente sencillo: básicamente se estudia la deflexión de una sonda (constituida por una finísima punta adjunta a una micropalanca) mientras ésta interactúa con la superficie de la muestra. Como consecuencia de esta interacción se puede generar una imagen tridimensional de la topografía de la muestra o de las fuerzas entre la sonda y la superficie de la muestra. Dicho mecanismo permite que unos *scanners* piezoeléctricos mantengan la punta en interacción con la superficie en cuestión a fuerza constante con el objetivo de tener información de alturas, o a altura constante respecto de la superficie con el objetivo

de tener información de las fuerzas. Los sensores piezoeléctricos controlan el movimiento de la punta o de la muestra en los ejes x-z-y.(129)

Las sondas más comunes son los cantilevers, la punta y el voladizo como componente integrado pueden fabricarse a partir de silicio o nitruro de silicio utilizando técnicas fotolitográficas. Existen sondas rígidas y sondas flexibles, la elección de una u otra dependerá por un lado, de en qué modo se utilizará el microscopio con respecto a la muestra, y por otro, del tipo de muestra a analizar.

Sobre la parte posterior del cantilever se localiza un espejo que refleja la luz de un laser que en condiciones de reposo se encuentra centrado. Al realizar el barrido con la punta, el cantilever sufre deformaciones y el ángulo de reflexión de la luz laser cambia, esto es sentido por fotodetectores y estos cambios son traducidos en gráficos construyendo las imágenes.

El AFM puede operar en diferentes modos, en función de la interacción de la punta con la superficie de la muestra, puede hacerlo en modo repulsivo o de contacto, o en modo atractivo o de no contacto.(129)

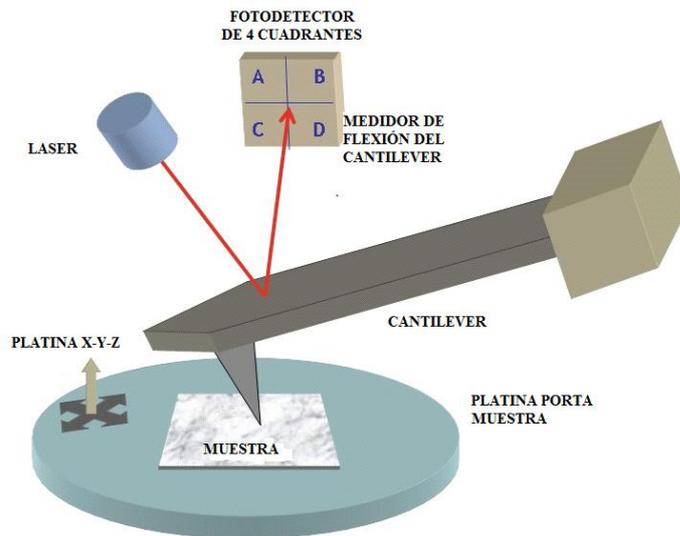


Fig.Nº8. Esquema de las partes que componen un microscopio de fuerza atómica. (Fuente: The Open source Handbook of Nanoscience and Nanotechnology)

### **c) Microscopía Electrónica de barrido (SEM)**

El microscopio electrónico de barrido (SEM, Scanning Electron Microscope) es uno de los instrumentos más versátiles para el examen y análisis de características microestructurales de objetos sólidos. Una de las razones para ello es su alta resolución (de 20 a 50 Å) y otra característica importante es la apariencia tridimensional de las imágenes, producto de su gran profundidad de foco (aproximadamente entre 100 y 1000 veces mayor que la de un microscopio óptico a la misma magnificación).

En general los SEM cuentan con capacidad analítica mediante el agregado de un detector de rayos X dispersivo en energías (EDS, Energy Dispersive Spectrometer también conocido como EDX), que permite obtener información composicional de manera rápida y eficiente.

Los SEM trabajan a un vacío aproximado de  $10^{-6}$  torr. Las muestras conductoras pueden ser examinadas sin ningún tipo de cubierta. Para la adecuada observación de muestras no conductoras (orgánicas, biológicas, vidrios, polímeros, etc.) mediante estos microscopios se necesita una cubierta conductora metálica que evite el daño por radiación. En estos casos se utiliza generalmente un fino depósito de oro por ser buen conductor del calor y la electricidad. Si se quiere realizar el análisis de su composición superficial por EDX frecuentemente se recubren con carbono. Por otro lado, en el caso de las muestras biológicas, éstas deben recibir un tratamiento de secado por punto crítico (CPD, Critical Point Drying) previo al metalizado que se describe en detalle en un apartado posterior. Brevemente, previo al CPD la muestra se fija con glutaraldeído al 2% en solución *buffer* de fosfatos (en frío, 4°C) , posteriormente se las trata utilizando una rampa de deshidratación comenzando con una solución de 30% de etanol absoluto en agua hasta 100% de etanol con inmersiones sucesivas de 20 min. El CPD se basa en el reemplazo de los líquidos (utilizados en la extracción, fijación y conservación iniciales) por CO<sub>2</sub>, que es finalmente evacuado sin dañar los tejidos de la muestra. Los nuevos microscopios electrónicos de barrido (ESEM, Enviromental Scanning Electron Microscope) tienen la capacidad de trabajar con bajo vacío (hasta 20 torr), aumentado notablemente el

campo de aplicación, llegando a extremos de poder estudiar en esas condiciones muestras con un 100% de humedad relativa. (130,131)

### ***Componentes del Microscopio electrónico de barrido***

Las partes esenciales del microscopio electrónico de barrido se muestran en la Fig.Nº 9. Sus componentes esenciales son el sistema de vacío, la columna de electrones, la cámara portamuestras y el sistema de adquisición y procesamiento de imágenes.

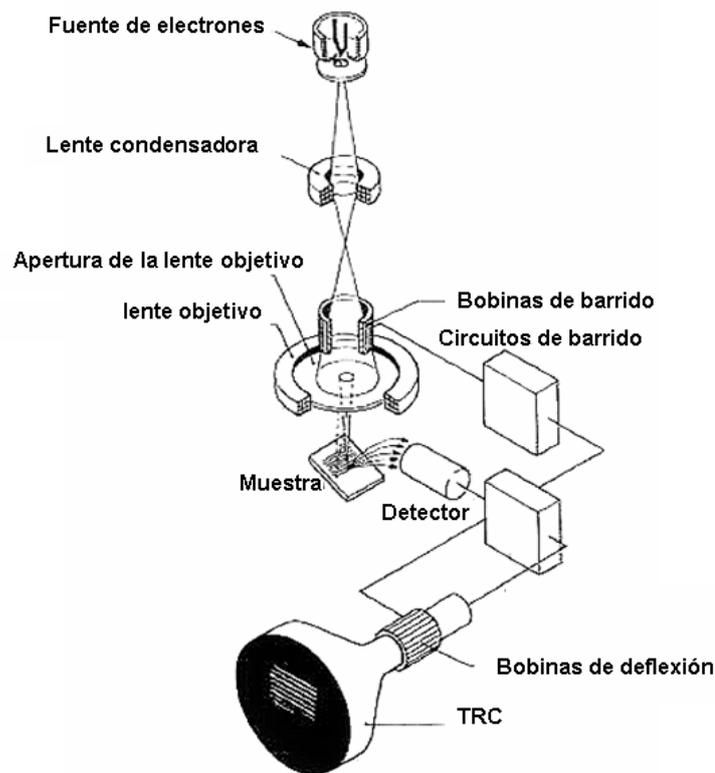


Fig.Nº 9. Se muestra un esquema básico en el que se indican las partes esenciales del SEM.(131)

### ***Características especiales del Microscopio electrónico de barrido utilizado (Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental (ESEM)).***

El ESEM del LIMF cuenta con capacidad analítica por rayos X. Tiene un detector de rayos X dispersivo en energías adosado al microscopio (EDX). Este detector permite obtener imágenes de rayos X, además de los espectros de composición química

elemental. Estos análisis proveen información cualitativa y semicuantitativa de la zona en que se encuentran determinados elementos en forma simultánea.

*i. Sistema de vacío.* En cualquier microscopio electrónico de barrido, la columna de electrones debe estar a un vacío de aproximadamente  $10^{-6}$  torr para evitar la dispersión del haz de electrones y asegurar una mayor duración de la fuente de emisión electrones, entre otros. Las bombas de vacío estándar utilizadas son las difusoras de aceite, que se dañan si trabajan a presiones cercanas a las atmosféricas. Para evitar este daño, se coloca previamente una bomba mecánica para bajar el vacío a un valor aproximado de  $10^{-3}$  torr. Para minimizar la introducción de gotas de aceite en la cámara portamuestras se utilizan, en la actualidad, bombas turbo moleculares en reemplazo de las difusoras de aceite. Estas bombas tienen la ventaja de ser limpias, aunque pueden introducir vibraciones al microscopio y requieren de una bomba mecánica para retirar el aire que se comprime en la base de la bomba turbo molecular.

En los SEM convencionales, tanto la columna de electrones como la cámara portamuestras deben estar a un vacío aproximado de  $10^{-6}$  torr. Sin embargo, en los ESEM la columna de electrones se mantiene a un alto vacío mientras que la cámara portamuestras puede estar a un vacío entre  $10^{-2}$  y 20 torr. En este caso, se utiliza un juego de aperturas múltiples que limitan la presión y separan la cámara portamuestras de la columna de electrones. En consecuencia, los microscopios electrónicos de barrido ambientales (ESEM), pueden trabajar en tres modalidades de vacío: Alto Vacío ( $10^{-6}$  torr), Bajo Vacío ( $10^{-2}$  a 1 torr) y Modo Ambiental (1 a 20 torr). La ventaja de las modalidades Bajo Vacío y Ambiental es que se pueden analizar muestras sin necesidad de preparación previa, como el metalizado o secado por punto crítico, aunque la calidad de resolución es menor que en el modo Alto Vacío.

*ii. Columna de electrones.* La fuente de electrones convencional consta de un filamento de tungsteno (W) de aproximadamente  $100\mu\text{m}$  de diámetro que se calienta produciendo un haz de electrones por emisión termoiónica. El filamento está rodeado por una pieza metálica cilíndrica, denominada cilindro de Wehnelt, que se mantiene a un potencial negativo variable que obliga a los electrones a focalizarse en una

pequeña región de entre 25 y 100 $\mu$ m. Unos pocos milímetros por debajo de esta pieza metálica se encuentra un ánodo que puede polarizarse hasta un potencial de 50kV. Los electrones se aceleran a este potencial mientras que un par de bobinas electromagnéticas denominadas lentes condensadoras, de-magnifican el haz una cierta cantidad. Un segundo par de bobinas, llamadas lentes “objetivo”, concentran el haz hasta una sección mínima, que puede variar de 1nm a 500nm. Asimismo, un par de bobinas de deflexión electromagnéticas permiten realizar el barrido del haz de electrones sobre la muestra en sincronismo con la impresión de la imagen en la pantalla del monitor. Esto implica que a cada punto de la muestra le corresponde un punto de la imagen.

*iii. Interacción de los electrones con la materia.* Cuando un haz de electrones choca con la superficie de una muestra se producen distintos y complejos fenómenos, siendo los más comunes las dispersiones inelásticas (cambios en la energía de los electrones incidentes con cambios despreciables en su dirección) y las dispersiones elásticas (cambios de dirección de los electrones incidentes con pérdida despreciable de energía). La interacción del electrón incidente puede ser con el núcleo o con los electrones atómicos, dando lugar a diferentes señales que pueden ser utilizadas para producir una imagen en el SEM o bien para realizar análisis elemental de la muestra en estudio:

- Cuando la interacción del electrón incidente es con los electrones más periféricos de los átomos de la muestra, muchos de estos electrones de valencia son eyectados fuera de la muestra como *electrones secundarios* de baja energía.

- En la interacción de los electrones incidentes cerca del núcleo de los átomos de la muestra, se produce una gran deflexión en la dirección del electrón. De esta manera, estos electrones son dispersados elásticamente hacia atrás y son eyectados fuera del espécimen (*electrones retrodispersados o “backscattered”*), y la fracción de éstos aumenta con el número atómico de la muestra.

- La interacción inelástica de los electrones incidentes con los electrones de las capas más internas del átomo dan lugar al *espectro de rayos X de líneas características* de los elementos presentes en la muestra.

*iv. Formación de las imágenes en el SEM.* En el SEM, se focalizan electrones de alta energía en un fino haz, el cual barre la superficie de la muestra. Como fuera explicado anteriormente, una amplia variedad de señales son producidas debido a interacciones complejas del haz de electrones con los átomos del espécimen. Estas señales (electrones secundarios y electrones retrodispersados o backscattered) son colectadas por distintos detectores colocados en la cámara portamuestras del microscopio. En el modo Alto Vacío, el detector fotomultiplicador centellador desarrollado por Everhart and Thornley (E-T), genera imágenes topográficas a partir de la detección de electrones secundarios. En el modo Bajo Vacío se utiliza para la generación de estas imágenes el detector Large Field Detector (LFD) de FEI. En las dos modalidades mencionadas, el detector de electrones retrodispersados DualBSD de FEI, permite obtener imágenes con contraste composicional. En la modalidad Ambiental, la imagen se genera a través del detector de electrones secundarios gaseoso (GSED). En esta modalidad, se coloca en la cámara un portamuestras que permite variar la temperatura, de esta manera se puede mantener la muestra dentro de la cámara, con un 100% de humedad relativa. (131)

#### **2.III.2.2 Parámetros que caracterizan la topografía superficial**

Existen distintos niveles para medir la topografía (Forma (*Shape*), Ondulación (*Waviness*) y Rugosidad (*Roughness*), tal como se muestra en la Fig.Nº 10.

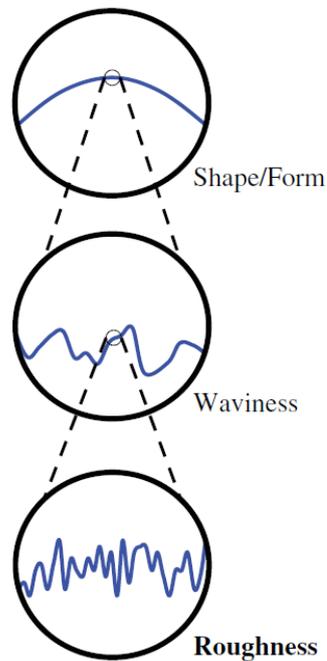


Fig.Nº 10. Distintos niveles para evaluar la topografía.(132)

Los datos de la matriz topográfica deben tratarse en cada línea de perfil (2D, parámetros R y de espaciado S,  $S_m$ ) o sobre todos los perfiles que extienden el análisis de la superficie en las tres dimensiones (3D, parámetros  $S_q$ ,  $S_{ds}$ ,  $S_{dr}$ ,  $S_z$ ,  $S_{sk}$ ,  $S_{tr}$ ). Los parámetros de perfil de superficie suelen estar separados en cuatro categorías: amplitud, espaciado, híbrido y funcional.

**a) Parámetros de amplitud o altura de la Rugosidad**

Los parámetros de altura son los más utilizados para caracterizar la topografía de la superficie. La rugosidad media aritmética ( $R_a$ ) y la raíz cuadrada media de la rugosidad ( $R_q$ ) son los parámetros de altura más empleados.

$R_a$  es el promedio aritmético de los valores absolutos de las alturas  $y(x)$  medidas a partir de la línea central. Da la desviación en la altura.

$R_a$  puede ser definida también como la altura de un rectángulo cuya área sea igual a la suma absoluta de las áreas delimitadas entre el perfil de rugosidad y la línea media, siendo la longitud de la medición  $L_m$ .

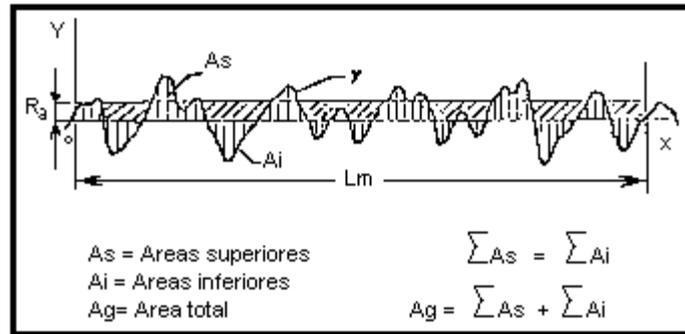


Fig.Nº 11. Representa cómo se obtiene el parámetro Ra. Tomada de guía AFM.(22)

Es interesante destacar que dos superficies de características muy disímiles pueden tener el mismo valor de *Ra*.

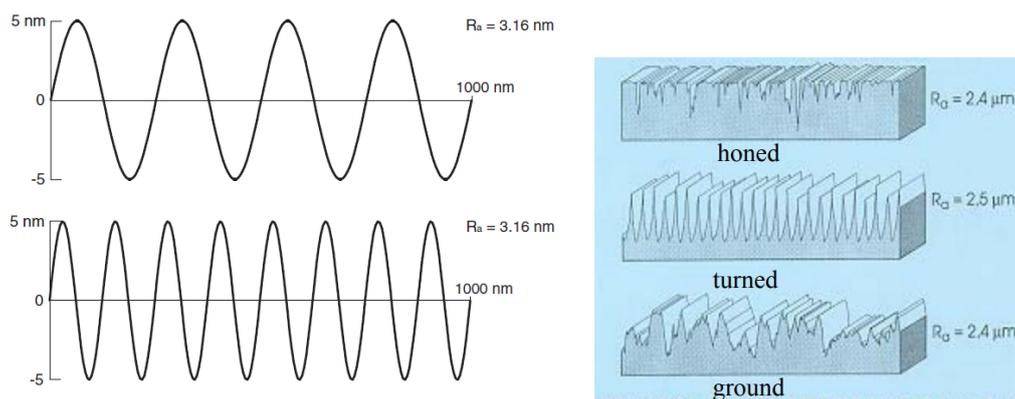


Fig.Nº 12. Perfiles de rugosidad cuyo valor de *Ra* es igual. (Tomado de qualitymag.com)

Un ejemplo de las limitaciones de *Ra* para la caracterización de la rugosidad superficial se puede observar en la Fig.Nº 12. Los dos perfiles sinusoidales presentados anteriormente tienen estructuras claramente diferentes; sin embargo, el valor de *Ra* para cada uno es idéntico.(133)

Matemáticamente *Ra* puede definirse como:

$$Ra = \frac{1}{L} \int_0^L |y(x)| dx$$

Por ejemplo en una imagen obtenida mediante AFM se puede obtener el valor de la siguiente forma.(134)

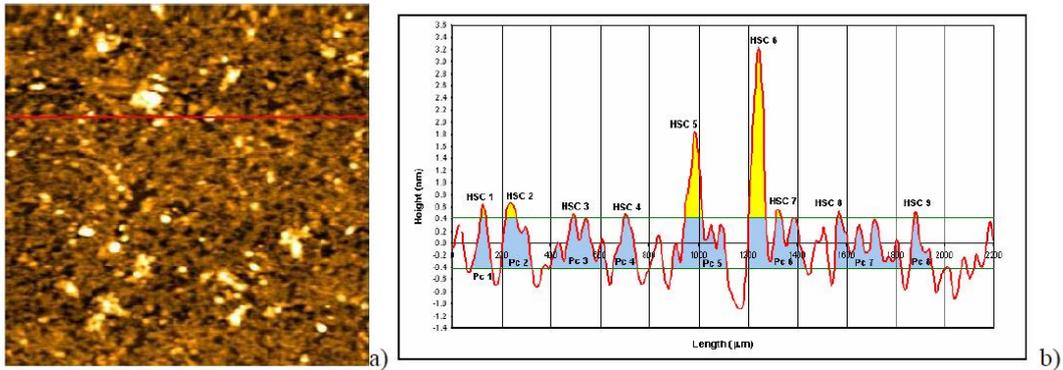


Fig.Nº 13. a) topografía AFM con ventana de área 2 x 2 μm de una bicapa PAH / PAZO y b) alta cantidad de puntos (HSC) y conteo de picos para el perfil marcado en la topografía, en este caso los umbrales superior e inferior determinan valor de Ra.(134)

**Rq**, es la raíz cuadrada media de la rugosidad. Representa la desviación estandar de las alturas de la superficie.

$$Rq = \sqrt{\frac{1}{l} \int_0^l Z^2(x) dx}$$

Rq se usa para estudiar los cambios temporales en la creación de una nueva superficie, así como las diferencias espaciales cuando se estudia la característica de la superficie utilizando diferentes escalas. Para saber si los valores Rq tienen sentido, los puntos de altura deben distribuirse uniformemente según una distribución normal.

También se utiliza Rrms que representa el promedio de las desviaciones cuadráticas respecto a la altura media.

$$R_{rms} = \sqrt{\frac{1}{L} \int_0^L [y(x)]^2 dx}$$

**R<sub>pm</sub>** es el promedio de los picos máximos del perfil

$$R_{pm} = \frac{1}{M} \sum_{j=l}^M R_{pj}$$

***b) Parámetros de espaciado de la rugosidad***

Los parámetros de espaciado se basan en la medición de las características horizontales o laterales de la superficie (Fig.Nº 14). Las características que determinan un parámetro de espaciado generalmente están relacionadas con las regiones de picos y valles.(133)

Espacio medio de picos locales adyacentes en el perfil se lo conoce como S.

$$S = \frac{1}{n} \sum_{i=l}^n S_i$$

El pico local adyacente es la parte más alta del perfil considerado entre dos mínimos adyacentes y sólo se mide la distancia vertical entre los picos adyacentes si ésta es mayor o igual al 10% de la altura máxima del perfil.

Espacio medio en la línea media (S<sub>m</sub>) es el espaciado promedio de picos locales adyacentes en el perfil, donde “n” es el número de picos de perfil a lo largo del mismo.

$$S_m = \frac{1}{N} \sum_{i=l}^n S_i$$

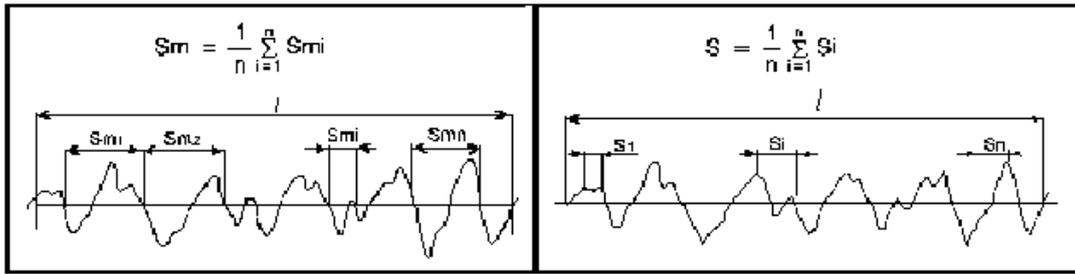


Fig.Nº 14. Izq. Espaciado promedio de picos locales adyacentes en el perfil. Der. Espacio medio de picos locales adyacentes.(22)

**c) Parámetros  $S$  asociados a la naturaleza 3D de la textura (ISO 25178)**

Entre los parámetros que se asocian a la naturaleza 3D de la textura se destacan por su relación con parámetros biológicos los parámetros  $S_q$ ,  $S_{ds}$ ,  $S_{dr}$ ,  $S_z$ ,  $S_{sk}$ ,  $S_{tr}$ .(133). Sin embargo en la norma ISO 25178 se mencionan también otros parámetros, que incluyen también parámetros de ondulación o “waviness” y parámetros híbridos tal como se describe a continuación.

Cabe destacar que el parámetro más usado para definir la rugosidad de los implantes dentales es el parámetro  $S_a$ , asociado a la rugosidad promedio evaluada en toda la superficie en las tres dimensiones, 3D.  $S_a$  es la extensión de  $R_a$  (altura media aritmética de una línea) a una superficie. Expresa, como un valor absoluto, la diferencia de altura de cada punto en comparación con el promedio aritmético de la superficie. Este parámetro, tal como se describió previamente, se describe matemáticamente como:

$$s_a = \iint_a |Z(x,y)| (dx)dy$$

$S_q$ , la extensión de  $R_q$  en 3D (Fig.Nº 15). Se lo define como la raíz cuadrática media de la rugosidad evaluada sobre la superficie 3D completa. Es equivalente a la desviación estándar de las alturas.

$$S_q = \sqrt{\frac{1}{A} \iint_A (Z(x,y))^2 (dx) dy}$$

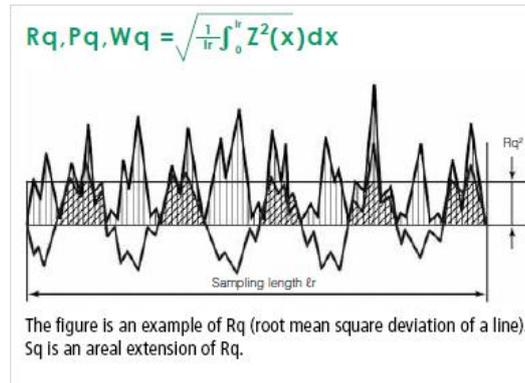


Fig.Nº 15. Representación del parámetro Sq que es una extensión en superficie de Rq. (Toado de Keyence.com)

$S_{dr}$ , la relación de área interfacial desarrollada junto con la rugosidad respecto al área plana ideal y se expresa como el porcentaje de superficie adicional aportada por la textura en comparación con un plano ideal del tamaño de la región de medición.

$$S_{dr} = \frac{(\text{Área de superficie texturada} - \text{Área plano ideal})}{\text{Área plano ideal}}$$

$S_{ds}$ , es la densidad de las cumbres, es decir, la cantidad de cumbres por unidad de área. Se denomina cumbres a los picos que sobresalen del resto. Una cumbre se define como cualquier punto, elevado sobre los 8 picos vecinos más cercanos. Las cumbres deben estar por encima de un umbral que es 5% de Sz por encima del plano medio.

$$S_{ds} = \frac{\text{Número de picos}}{\text{Área}}$$

$S_p$ , la altura máxima del pico, es la altura del punto más alto. Es una extensión de Rp, tal como se muestra en la Fig.Nº 16.

$$S_p = \max_A Z(x, y)$$

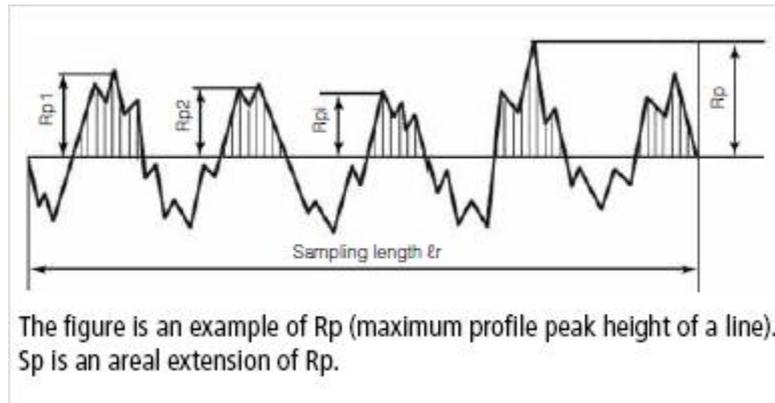


Fig.Nº16. Representación del parámetro Sp que es una extensión en superficie de Rp. (Tomado de Keyence.com)

S<sub>v</sub>, el valor máximo de profundidad, es la profundidad del punto más bajo, dentro del área (x x y) definida.

$$S_v = \left| \min_A Z(x, y) \right|$$

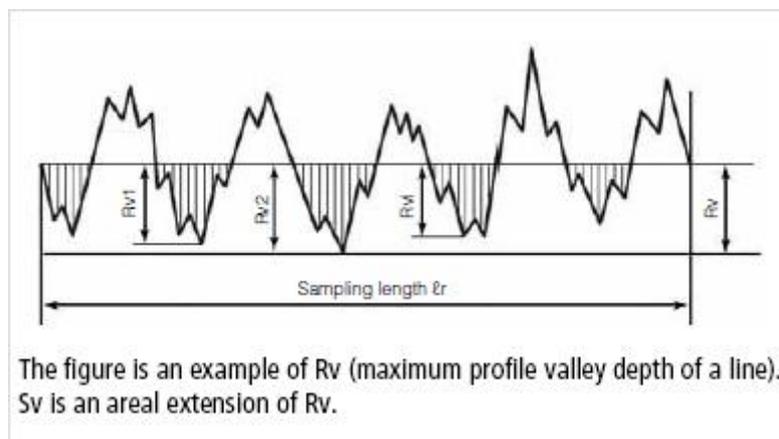


Fig.Nº 17. Representación del parámetro Sv que es una extensión en superficie de Rv. (Tomado de Keyence.com)

S<sub>z</sub>, la máxima altura de la superficie. Es la extensión de Rz, definido como la suma del valor más alto de la altura del pico (Rp, Sp) y el mayor valor de la profundidad del valle (Rv, Sv) dentro del área definida.

$$S_z = S_p + S_v$$

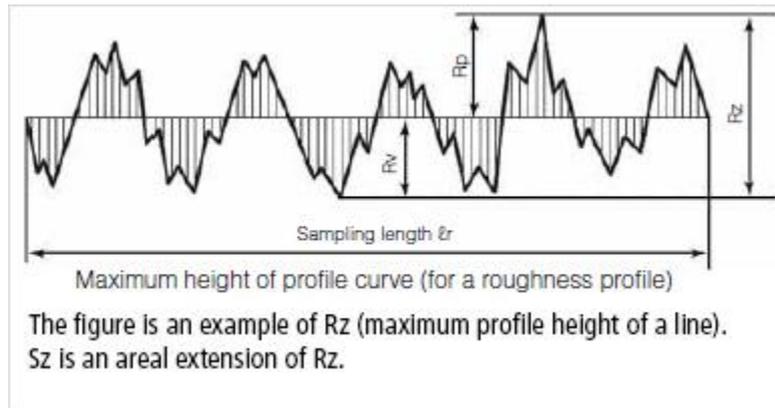


Fig.Nº 18. Representa el parámetro Sz que es una extensión en superficie de Rz.(Tomado de Keyence.com)

**S<sub>sk</sub> (Skewness)**, los valores de Ssk representan el grado de sesgo u oblicuidad de la forma de la rugosidad. Se establece un histograma de las alturas de todos los puntos medidos y la desviación de una distribución Normal ideal se representa con Ssk.

$$S_{sk} = \frac{1}{S_q^3} \iint_a (Z(x, y))^3 (dx)dy$$

$S_{sk} < 0$ : La distribución de altura está sesgada por encima del plano medio

$S_{sk} = 0$ : La distribución de altura (picos y hoyos) es simétrica alrededor del plano medio.

$S_{sk} > 0$ : La distribución de altura está sesgada debajo del plano medio

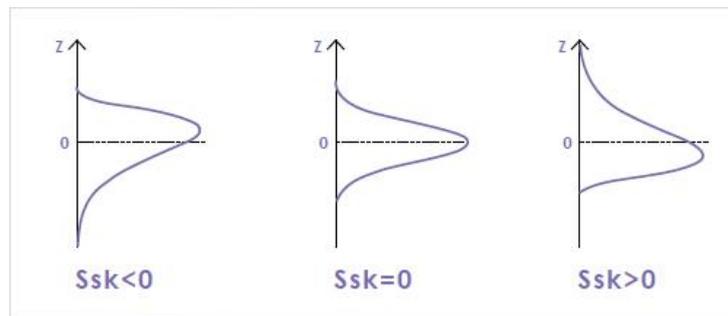


Fig.Nº 19. Representa cómo son las desviaciones de altura de acuerdo al valor del parámetro con respecto al plano medio. (Tomado de Keyence.com)

$S_{ku}$  (Kurtosis), el valor es una medida de la agudeza del perfil de rugosidad (ver Fig.Nº 20)

$$S_{ku} = \frac{1}{S_q^4} \iint_a (Z(x,y))^4 (dx)dy$$

$S_{ku} < 3$ : La distribución de altura está sesgada por encima del plano medio.

$S_{ku} = 3$ : La distribución de altura es normal. (Las porciones agudas y las partes mesetadas coexisten).

$S_{ku} > 3$ : La distribución de altura está marcada.

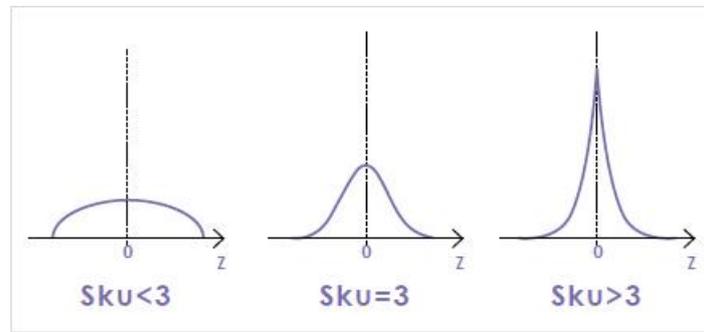


Fig.Nº 20. Representa los valores de agudeza del perfil y cómo se distribuyen. (Tomado de Keyence.com)

$S_{al}$  (**Longitud de autocorrelación más corta**). Esto se define como la longitud horizontal más corta a la que la autocorrelación de la superficie se atenúa al valor de correlación ( $0 \leq s < 1$ ). Es 0.2 a menos que se indique lo contrario

$S_{tr}$  (relación de aspecto de la textura), es una medida de la isotropía espacial o la direccionalidad de la textura de la superficie. El valor se obtiene dividiendo la distancia horizontal en la dirección en que la función de autocorrelación decae al valor [s] (0.2 por defecto) la más rápida (equivalente a  $S_{al}$ ) por la distancia horizontal en la dirección de la disminución más lenta de función de autocorrelación al valor [s]. Es una medida de la uniformidad de la textura de la superficie.

Esto se define como la relación entre  $S_{al}$  y la distancia horizontal más lejana a la que la autocorrelación de la superficie se atenúa al valor de correlación ( $0 \leq s < 1$ ) e indica la fuerza de la anisotropía y la isotropía de la superficie.

Str tiene un rango de 0 a 1, y normalmente  $Str > 0.5$  indica isotropía fuerte, mientras que  $Str < 0.3$  indica anisotropía fuerte

**d) Parámetros híbridos**

Los parámetros híbridos son una combinación de características de amplitud y espaciamiento de superficie, útiles para estudiar propiedades mecánicas y biológicas de las superficies. Así por ejemplo se define el factor de escarpado o inclinación  $S_f$  como la relación entre la media aritmética de la altura ( $R_a$ ) y el espaciado medio del perfil ( $S_m$ ).

$$S_f = \frac{R_a}{S_m}$$

**e) Parámetros funcionales**

Los parámetros funcionales o estadísticos brindan información acerca de la estructura de la superficie. Por ejemplo las funciones de distribución, como función de distribución de amplitud, que permiten los momentos de cálculo Skewness ( $R_{sk}$ ) y Kurtosis ( $R_{ku}$ ) que son parámetros utilizados para medir la asimetría y planitud respectivamente.(134,135) Cuando  $R_{ku}$ , el más utilizado, es 3 indica que hay una distribución gaussiana de amplitud, si es menor que 3 la superficie es plana (Platykurtic) y si es mayor que 3 indica que hay más picos que valles.

$$R_{ku} = \frac{1}{NR_q^4} \sum_{i=1}^N [Z_i - \bar{Z}]^4$$

**2.III.2.3 Parámetros para medir la ondulación o Waviness.**

La ondulación (*waviness*) es la medida del componente más ampliamente espaciado de la textura de la superficie, estrictamente definido como “las irregularidades cuyo espaciado es mayor que la longitud del muestreo de rugosidad”.(136) La siguiente figura (Fig.Nº 21) ilustra la diferencia entre el perfil de rugosidad y el de waviness.

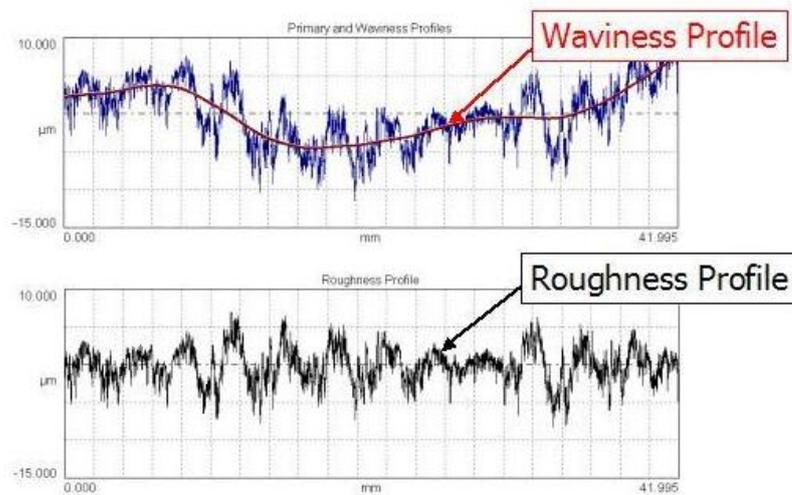


Fig.Nº 21. Representa la diferencia entre perfil de ondulación (Sup.) y perfil de rugosidad (Inf.). (<http://digitalmetrology.com/3-steps-understanding-surface-texture>).

El factor de ondulación (*waviness*) del perfil ( $W_f$ ) es la relación entre el intervalo total del perfil y la altura aritmética media  $R_a$ , siendo  $n$  el número de puntos a lo largo del perfil.

$$W_f = \frac{1}{R_a} \sum_{i=1}^{n-1} l_i$$

Es importante tener en cuenta la longitud de evaluación de la ondulación donde los parámetros de ondulación son evaluados. Dentro de esta longitud se determina el perfil de ondulación. Este es un perfil de textura superficial que tiene la característica de que las rugosidades de menor altura son filtradas o eliminadas, tampoco incluye el cambio de perfil debido a cambios en la geometría de la pieza. A partir de este perfil se determina el espaciado de la ondulación, el espaciado promedio entre picos.

Se define entonces la ondulación promedio  $W_a$  como el promedio de todos los puntos de la ondulación con respecto al plano medio y  $W_{\max}$  es altura máxima de los datos de la ondulación.(132)

De forma similar la raíz media cuadrática de la ondulación, es la varianza de todos los puntos con relación al plano medio de la ondulación ( $W_q$ ). (135)

#### **2.III.2.4 Descripción de la topografía sobre superficies que interaccionan con medios biológicos.**

Debido que, tal como se ha dicho previamente, superficies de topografías distintas pueden tener un mismo parámetro de rugosidad que las describe, tal como se mostró para el caso de  $Ra$  (Fig.N° 12), es necesario utilizar distintos parámetros para describir adecuadamente la topografía de una superficie. Por ese motivo en el presente trabajo se utilizan varios parámetros, tratando de establecer cuál es el que más se relaciona y es más sensible a las variaciones de la adhesión bacteriana.

Por lo antes expuesto una estrategia interesante para reducir o impedir la formación de biopelículas sobre la superficie de los biomateriales es conseguir que dichas superficies tengan propiedades que afecten la adhesión de las bacterias en sus etapas iniciales, dando la oportunidad de actuar a los agentes antimicrobianos, y a los mecanismos de defensa del huésped.

## **Capítulo 3. Objetivos e hipótesis de trabajo.**

### Capítulo 3

#### OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

##### OBJETIVOS

**Objetivo general:** hacer un aporte a la investigación de nuevos métodos para prevenir la formación de biofilms en materiales implantados en la cavidad oral.

**Objetivo específicos:**

- Evaluar la posible inhibición de la adhesión bacteriana sobre la superficie de tornillos de cierre de titanio comercialmente puro Grado II, tratados mediante un proceso de anodización con flúor a distintos potenciales.
- Evaluar la posible inhibición de la adhesión bacteriana sobre la superficie de tornillos de cierre de titanio comercialmente puro Grado II, tratados mediante un proceso de anodización con flúor más una capa de politimol formada sobre la superficie anodizada mediante un proceso de electropolimerización.

Para cumplir dichos objetivos se realizarán análisis superficiales mediante medidas de tensión superficial, microscopía de epifluorescencia, microscopía de fuerzas atómicas y electrónica de barrido y EDX (Espectroscopía de Dispersión de rayos X) de las muestras correspondientes a tornillos de cierre de titanio sometidos a diversos tratamientos electroquímicos. Por otra parte se estudiará detalladamente la topografía superficial mediante el análisis de distintos parámetros que la caracterizan, tanto en la micro como en la nanoescala y se los relacionará con la adhesión bacteriana.

##### HIPÓTESIS DE TRABAJO

Se consideró como hipótesis de trabajo que es posible inhibir la adhesión bacteriana sobre la superficie de biomateriales dentales a través de procesos electroquímicos, como el anodizado, utilizando una solución electrolítica que contenga flúor. Dicha inhibición podría estar relacionada con la presencia de flúor en la película superficial y/o con la rugosidad de la superficie. Se presume además que dicho proceso podría ser mejorado mediante la formación de politimol sobre la superficie anodizada

mediante un proceso de electropolimerización. El procedimiento se aplicará sobre tornillos de cierre de implantes de titanio c.p grado II de la marca B&W.

# **Capítulo 4. Materiales y métodos**

## **Capítulo 4**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **Diseño**

El estudio es de tipo explicativo, cuali-cuantitativo, experimental in vitro.

#### **Población y muestra**

Se desarrolló un método electroquímico, que permitió incorporar el elemento flúor, en la superficie de titanio c.p Grado II de tornillos de cierre de la marca comercial B&W de Ø 4,00 mm, mediante un proceso de anodizado, controlando el voltaje aplicado y el tiempo del tratamiento. Es importante aclarar que en el proyecto de investigación se mencionó que se trabajaría con tornillos de cicatrización pero, siendo ambos tornillos de la misma composición y microestructura y debido a que solamente se expondría al tratamiento la superficie superior y el resto de la pieza quedaría incluida en el interior de un cilindro de polioximetileno (Delrin®) decidimos utilizar, por su mayor disponibilidad, tornillos de cierre, ya que en esas condiciones los resultados serían equivalentes.

Para la primera serie de electrodos anodizados se utilizó una muestra de 10 electrodos uno para cada condición, mientras que para la segunda serie de electrodos anodizados la cantidad fue de 7. Se observó el aspecto de sus superficies tomando 10 campos de observación para las magnificaciones 100X y 400X respectivamente.

En el análisis por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), y análisis de Espectro de Dispersión de Rayos X (EDX) se utilizaron 5 electrodos respectivamente.

Para la medición del ángulo de contacto de las diferentes condiciones se utilizaron 5 electrodos.

En los ensayos de adhesión de bacterias para ser observados por epifluorescencia se utilizaron, en la Experiencia A, 8 electrodos y en la experiencia B, 6 electrodos, tomando 20 campos de observación por cada electrodo. Para la observación de las bacterias adheridas se utilizó microscopía SEM, preparando las muestras (5 electrodos) mediante la técnica de punto crítico.

En el análisis de rugosidad superficial por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), se trabajó preparando 4 electrodos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS: ENSAYOS FISICOQUIMICOS Y BIOLÓGICOS**

El Capítulo 4 referente a **Materiales y Métodos** consta de 3 **Secciones** relacionadas a distintos grupos de metodologías donde se detallan:

**Sección 4.I: Construcción, pulido y anodizado de los electrodos de titanio.**

**Sección 4.II: Ensayos de adhesión de bacterias.**

**Sección 4.III: Metodología utilizada para el análisis superficial.**

**Sección 4.I: Construcción, pulido y anodizado de los electrodos de titanio y análisis superficial de las muestras.**

### **4.I.1 Construcción de los electrodos de trabajo para el proceso de anodizado**

Para poder realizar el proceso de anodizado, los tornillos de cierre, debieron ser preparados de tal manera que pudieran ser utilizados como electrodos de trabajo. Con el propósito de realizar el contacto eléctrico y de evitar realizar un procedimiento de soldadura en el tornillo de titanio, la parte roscada y el cuello fueron incluídas en el interior de una varilla de cobre cilíndrica del mismo diámetro que la cabeza del tornillo. Al extremo libre de esta varilla de cobre se soldó un cable unipolar multifilamento de cobre forrado en plástico de Ø 1,5 mm x 35 cm de longitud, quedando conformado lo que denominamos, módulo tornillo- varilla- cable (Fig. 22 a). Dicho módulo fue alojado en una pieza de “Delrin®” (resina acetálica, provista comercialmente en varillas que, entre otras propiedades, es aislante eléctrica y permite ser mecanizada), especialmente preparada mediante un proceso de mecanizado utilizando un torno de banco, de forma cilíndrica, de Ø 0,8cm x 0,8 cm de altura (Fig.Nº 22 b, c) y luego se cementó el módulo al “Delrin®” con crema

epóxica (Parsecs®) garantizando de esta manera su aislamiento eléctrico (Fig.Nº 22 d) y permitiendo que la cara superior de la cabeza del tornillo sea solamente la que quede expuesta al proceso de anodizado (Fig.Nº 22 e).

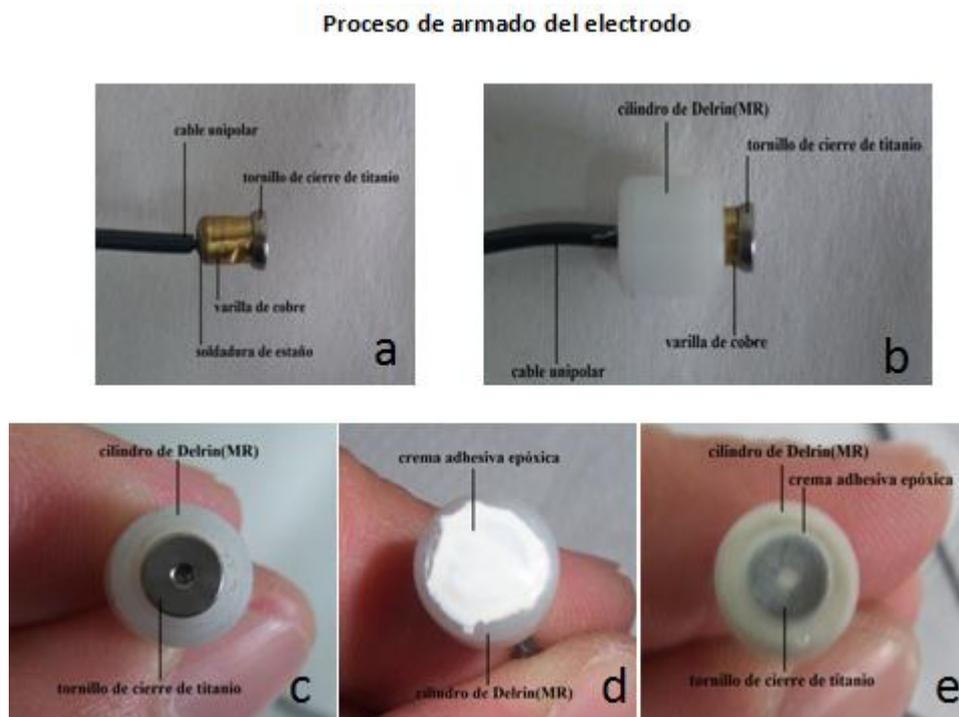


Fig. 22. a. Tornillo y contacto eléctrico de cobre; b. Inclusión en Delrin®; c. Vista superior del tornillo incluido; d. Aislamiento eléctrico con crema epóxica; e. Vista superior del electrodo antes de pulir.

Con los electrodos de trabajo preparados y esperando un tiempo de polimerización y secado de la crema epóxica de veinticuatro horas se inició el procedimiento de pulido de la superficie de titanio.

#### 4.I.2 Pulido de las superficies de titanio de los electrodos

La principal dificultad para realizar el pulido fue el tamaño de los electrodos. Se realizaron pruebas utilizando una pulidora eléctrica pero se obtuvieron como

resultado superficies facetadas, debido a la inestabilidad de la posición de los electrodos durante el procedimiento de pulido. Por ese motivo se optó por una técnica de pulido manual. Para optimizar el proceso y obtener un único plano de pulido resultante se incluyeron los electrodos en resina acrílica de autopolimerización para reparación de prótesis (Fig.Nº 23 izq). De esta forma se consiguió superar los inconvenientes antes descritos. Utilizando una loseta de vidrio como plano, los electrodos se colocaron con la superficie a tratar en contacto con la loseta de vidrio, y uno a uno se fueron uniendo con resina acrílica de autopolimerización para reparación de prótesis, de esta manera se obtuvo una pieza de acrílico de tamaño y estabilidad adecuados para realizar el pulido en forma manual (Fig. 23 der.).

#### Inclusión de los electrodos en resina acrílica



Resina acrílica polimerizando sobre la loseta de vidrio.



Vista de la superficie a pulir.

Fig. 23. Representa la inclusión de los electrodos en resina acrílica.

#### 4.I.3.1 Técnica de pulido

El proceso de pulido se realizó utilizando como plano una placa de acrílico transparente de 50 cm x 20 cm x 1 cm de espesor, sobre ella se montó una lámina de lija al agua de carburo de silicio, sujetada con bandas elásticas de goma, en sus extremos superior e inferior (Fig.Nº 24). El pulido se realizó utilizando la siguiente secuencia de lijas N°320- N°400- N°600- N°1000- N°1500- N°2500. Durante el

proceso de pulido se utilizó agua destilada, para irrigar y lavar las superficies tanto de la lija como del tornillo. Una vez terminada la secuencia de pulido, se lavó con agua destilada, posteriormente con alcohol 96 al 70% y se secó con secador de cabello a temperatura baja.

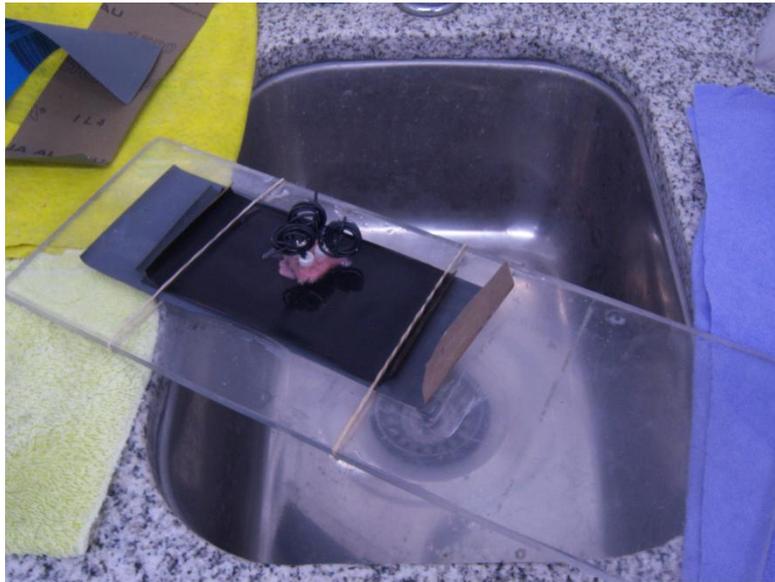


Foto con los electrodos incluidos en resina acrílica en proceso de pulido.

Fig.Nº 24. Muestra la técnica de pulido.

Finalizado el procedimiento de pulido de la superficie del electrodo, la misma fue lavada con agua Milli Q y posteriormente secada y observada en el microscopio óptico OLYMPUS BX51, con objetivo de 10X y de 40X. La Fig.Nº 25 muestra las fotografías de las superficies de titanio pulidas (tamaño de imagen 1360-1024; sensibilidad ISO800; Tiempo de exposición 1/1500)

Titanio pulido. Imágenes de microscopio óptico.

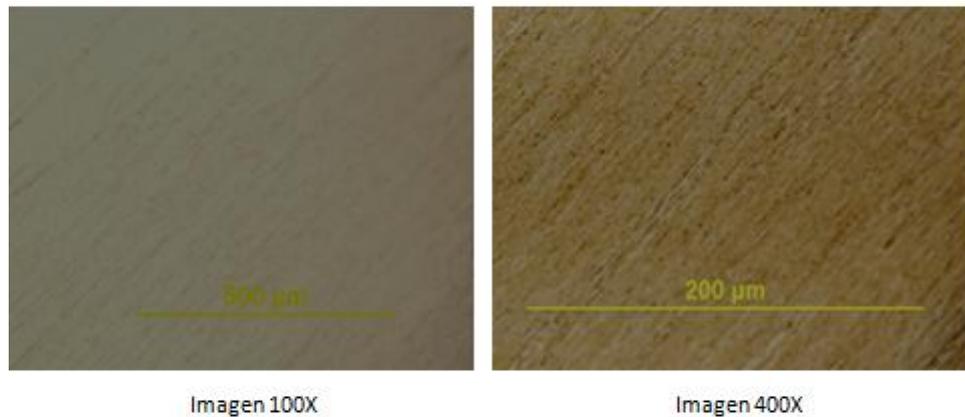


Fig. N° 25. Aspecto de la superficie de titanio pulida.

#### 4.1.4 Procedimiento de anodización de las superficies de titanio

Para este procedimiento se siguió un protocolo similar al reportado por Arenas y otros (2013). (106) Se utilizó para ello una celda electroquímica de vidrio mediana, con capacidad suficiente para contener 80 ml de solución electrolítica. La composición del electrolito fue la siguiente:

$K_2PO_4$  (fosfato diácido de potasio) 1M

$NH_4F$ .HF (Mezcla de fluoruro de amonio, ácido fluorhídrico) 0,08 M

$(NH_4)_2SO_4$  (sulfato de amonio) 0,3 M

El pH de la solución se midió mediante de tiras reactivas (Neutralit® pH 5.0-10.0), y su valor fue cercano a pH=5.

Por el orificio central de la celda electroquímica se colocó el electrodo de trabajo (ánodo, tornillo de titanio) y por otro orificio se colocó una lámina de platino de 1,5

cm x 0,6 cm como cátodo. Ambos electrodos en todos los procedimientos se mantuvieron a una distancia de 2 cm.

Se utilizó una fuente de energía eléctrica de corriente continua (marca HP-modelo 6181 C DC CURRENT SOURCE 0-100V; 0-250mA) y se conectó el polo positivo al electrodo de titanio y el polo negativo a la lámina de platino (Fig.Nº 26).

El período de anodización se estableció para todos los voltajes en 30 minutos y la temperatura ambiente en el laboratorio estuvo controlada en 24° C.

Cuando se cumplió el tiempo establecido para el proceso de anodizado, se desconectó la fuente, se retiró el electrodo de trabajo, se lo lavó primero con agua destilada y posteriormente con agua MilliQ, y finalmente se secaron los excesos de agua utilizando papel tissue con la precaución de no tocar la superficie anodizada de titanio.

**Celda electroquímica con electrodo y contraelectrodo conectados a la fuente.**



Fig.Nº 26. Fuente conectada a los electrodos, en proceso de anodizado.

#### 4.I.4.1 Anodizado de las superficies. Primera Serie de electrodos

En el apartado anterior se describió cómo se preparaban y anodizaban los electrodos, de forma que se obtuvieron superficies con distintas características superficiales de acuerdo al potencial aplicado que varió entre 5V y 90V.

Los electrodos se enumeraron del 1a al 10a y los voltajes aplicados a cada uno fueron los que se detallan a continuación:

Primera Serie	
Electrodo N°	Voltaje/V
1a	5
2a	10
3a	15
4a	20
5a	25
6a	35
7a	45
8a	60
9a	75
10a	90

Tabla N°1. La tabla indica los voltajes aplicados a los electrodos.

#### 4.I.4.2 Anodizado de las superficies y análisis superficial a través de microscopía óptica.

- *Anodizado del electrodo 1a a 5V:*

Con la solución electrolítica y los electrodos conectados y a temperatura ambiente, se comenzó a anodizar la primera muestra utilizando una diferencia de potencial de 5V durante 30 minutos. Al finalizar el proceso, se retiró el electrodo de la celda, se lavó con abundante agua destilada varias veces para retirar los restos de solución de la superficie de la muestra, y se secó con papel tissue. Pudo comprobarse que a simple vista la superficie presentaba un aspecto brillante color dorado. A

continuación se observó la muestra en el microscopio óptico y se tomaron fotografías a 100X y 400X. Una vez terminada la observación se protegió la superficie del electrodo anodizada, confeccionando una pantalla de papel y colocando sobre esta última una cubierta de papel film (Parafilm “M”, Laboratory Film Pechiney Plastic Packaging).

- ***Anodizado del electrodo 2a a 10V:***

Con la solución electrolítica y los electrodos conectados y a temperatura ambiente, se comenzó a anodizar la segunda muestra utilizando una diferencia de potencial de 10V durante 30 minutos y se procedió en forma similar a lo realizado con el electrodo 1. Finalizado el procedimiento a simple vista se observó una superficie de aspecto menos brillante color ocre.

- ***Anodizado del electrodo 3a a 15V:***

Con la solución electrolítica y los electrodos conectados y a temperatura ambiente, se comenzó a anodizar la tercera muestra utilizando una diferencia de potencial de 15V durante 30 minutos y se procedió en forma similar a lo realizado con el electrodo 1. Finalizado el procedimiento a simple vista se observó una superficie de aspecto brillante color violeta.

- ***Anodizado del electrodo 4a a 20V:***

Con la solución electrolítica y los electrodos conectados y a temperatura ambiente, se comenzó a anodizar la cuarta muestra utilizando una diferencia de potencial de 20V durante 30 minutos y se procedió en forma similar a lo realizado con el electrodo 1. Finalizado el procedimiento a simple vista se observó superficie de aspecto brillante color azul.

- ***Anodizado del electrodo 5a a 25V:***

Con la solución electrolítica y los electrodos conectados y a temperatura ambiente, se comenzó a anodizar la quinta muestra utilizando una diferencia de potencial de 25V durante 30 minutos y se procedió en forma similar a lo realizado con el

electrodo 1. Finalizado el procedimiento a simple vista se observó una superficie de aspecto brillante color azul oscuro.

- ***Anodizado del electrodo 6a a 35V:***

Con la solución electrolítica y los electrodos conectados y a temperatura ambiente, se comenzó a anodizar la sexta muestra utilizando una diferencia de potencial de 35V durante 30 minutos y se procedió en forma similar a lo realizado con el electrodo 1. Finalizado el procedimiento a simple vista se observó una superficie de aspecto brillante color marrón claro.

- ***Anodizado del electrodo 7a a 45V:***

Con la solución electrolítica y los electrodos conectados y a temperatura ambiente, se comenzó a anodizar la séptima muestra utilizando una diferencia de potencial de 45V durante 30 minutos y se procedió en forma similar a lo realizado con el electrodo 1. Finalizado el procedimiento a simple vista se observó una superficie de aspecto brillante color fucsia.

- ***Anodizado del electrodo 8a a 60V:***

Con la solución electrolítica y los electrodos conectados y a temperatura ambiente, se comenzó a anodizar la octava muestra utilizando una diferencia de potencial de 60V durante 30 minutos y se procedió en forma similar a lo realizado con el electrodo 1. Finalizado el procedimiento a simple vista se observó una superficie de aspecto brillante marrón con tintes rosados.

- ***Anodizado del electrodo 9a a 75V:***

Con la solución electrolítica y los electrodos conectados y a temperatura ambiente, se comenzó a anodizar la novena muestra utilizando una diferencia de potencial de 75V durante 30 minutos y se procedió en forma similar a lo realizado con el electrodo 1. Finalizado el procedimiento a simple vista se observó una superficie de aspecto brillante color dorado oscuro con tintes rosados.

- **Anodizado del electrodo 10a a 90V:**

Con la solución electrolítica y los electrodos conectados y a temperatura ambiente, se comenzó a anodizar la muestra utilizando una diferencia de potencial de 90V durante 30 minutos y se procedió en forma similar a lo realizado con el electrodo 1. Finalizado el procedimiento a simple vista se observó una superficie de aspecto brillante color amarronado oscuro con tintes rosados.

#### 4.I.4.3. Anodizado de las superficies. Segunda Serie de electrodos.

Se repitieron las experiencias con los voltajes de 10V; 15V; 20V; 35V; 60V; 75V y 90V (Fig.N° 27). En este caso se utilizaron tornillos de la misma marca pero de una partida diferente, provista por el fabricante. Cada una de estas muestras fue observada en el microscopio óptico a 100X y 400X y se tomaron fotografías con idénticas características de definición, tamaño y tiempo de exposición. De las muestras de esta segunda serie (Fig.N°27), se seleccionaron las condiciones tratadas con los voltajes 10V, 20V, 35V, 60V y 75V, ya que representaban características superficiales distintivas.

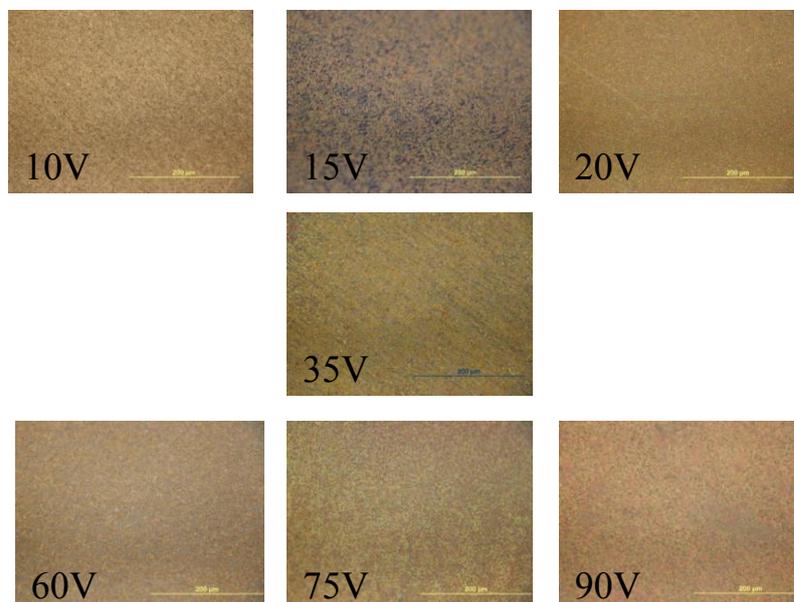


Fig.N°27.Imágenes de microscopio óptico a 400X, de titanio anodizado Serie 2.

## **Sección II: Ensayos de adhesión de bacterias**

### **4.II.1 Cultivos bacterianos**

**Preparación del agar-nutritivo:** el agar se prepara utilizando la proporción que recomienda el fabricante, 31 grs. por litro de agua destilada, se disuelve en un recipiente de vidrio, agitando la solución manualmente de manera suave y circular, luego se coloca en el autoclave para esterilizarlo (121°C- 1,2 atmósferas de presión- 20 minutos). Se utilizó agar nutritivo de Laboratorio Britania®.

**Preparación del caldo nutritivo:** el caldo nutritivo se prepara utilizando la proporción que recomienda el fabricante, 8 grs. por litro de agua destilada, en un recipiente de vidrio. Se diluye el polvo en el agua se agita manualmente de manera suave, se tapa a rosca, se cubre esta tapa con papel film de aluminio, se rotula, y se lleva al autoclave para esterilizarlo (121°C- 1,2 atmósferas de presión- 20 minutos), luego se conserva en la heladera. Se utilizó caldo nutritivo de Laboratorio Britania®.

**Preparación de la placa de Petri:** se empleó una placa de Petri de Ø 10 cm, el llenado de la placa con el agar- nutritivo se realizó en la cabina de flujo laminar, se flameó sobre el mechero Bunsen la boca del frasco con agar –nutritivo, luego se llenó la placa de Petri, esterilizada en autoclave, la cual previamente se desenvolvió y se abrió ya que la placa debe permanecer abierta hasta que gelifique el agar-nutritivo. Este procedimiento se hace bajo la luz ultravioleta de la cabina de flujo laminar.

**Siembra de las bacterias:** se tomó por arrastre una muestra de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de la placa de Petri de Stock, utilizando un ansa, previamente puesta al rojo sobre la llama del mechero Bunsen y se repicó en la placa de Petri preparada con Agar- nutritivo. Este procedimiento también se realizó dentro de la cabina de flujo laminar. Luego se colocó la Placa de Petri sembrada en la estufa de cultivo a una temperatura de 37°C.

**Preparación del inóculo:** Dentro de la cabina de flujo laminar con el vidrio frontal colocado hasta la segunda marca, se flameó la boca de un Erlenmeyer esterilizado, se destapó el frasco que contiene el caldo nutritivo, se flameó en la llama del mechero,

y se pasaron 50 ml de caldo nutritivo al Erlenmeyer. De la placa de Petri con las colonias de *Staphylococcus aureus* se tomó, por arrastre, una muestra, utilizando un ansa previamente puesta al rojo sobre la llama del mechero Bunsen, esta muestra se la diluyó en 50 ml del caldo nutritivo colocado en el Erlenmeyer, inclinándolo y acercando el ansa al caldo, frotando el ansa contra la pared del recipiente. Se colocó en la boca del recipiente una tapa de papel de aluminio y sobre ésta, otra de papel, y ambas se sujetaron con una banda elástica. Se rotuló para identificarla, y luego se colocó en el agitador MaxQ4450® ThermoSCIENTIFIC donde quedó 24 h a una temperatura 37°C.

**Lavado de los portaobjetos:** se lavaron los portaobjetos de vidrio con detergente no iónico y cepillo bajo chorro de agua de la canilla, luego se volvieron a enjuagar con chorro de agua destilada y posteriormente con solución de alcohol 96%.

**Montaje de las muestras en los portaobjetos:** en el extremo inferior de los portaobjetos, se colocó una cinta adhesiva doble faz, del ancho del portaobjetos por 4 cm de largo, sobre esta cinta se fijaron las bases de los electrodos. En los portaobjetos se realizaron previamente dos orificios separados a 1 cm cada uno y a 10 mm del borde inferior, siguiendo el eje mayor del portaobjetos, con el propósito de permitir pasar el cable de cada electrodo por el orificio y así de esta manera poder fijar la base del electrodo a la cinta adhesiva del portaobjeto.

Los portaobjetos, con las muestras montadas, se colocaron dentro de la cabina de flujo laminar, bajo la luz ultravioleta, durante 30 minutos, para esterilizarlos.

Es oportuno mencionar que en el proyecto de investigación se pensó utilizar como método para medir la adhesión bacteriana el número de unidades formadoras de colonias (UFC). Sin embargo durante el desarrollo de las experiencias pudimos constatar que era difícil retirar el tornillo del electrodo sin dañar o contaminar la muestra. Por otra parte se verificó que era también dificultoso desprender las bacterias por ultrasonido debido a la rugosidad de las superficies impidiendo el conteo de UFC. Por estos motivos decidimos utilizar como método de evaluación de las bacterias adheridas el cálculo de superficie cubierta por el biofilm asistidos por el software image-pro 6.2.

## **4.II.2 Metodología experimental utilizada en los ensayos piloto de adhesión de bacterias en electrodos con y sin Delrin®**

### **4.II.2.1 Preparación de muestras para la comparación de la adhesión bacteriana mediante microscopía de epifluorescencia**

Con las muestras anodizadas a 15V y a 90V se llevó a cabo un ensayo piloto de observación y comparación de la adhesión bacteriana. Para ello se prepararon además dos muestras de titanio pulido sin tratamiento de anodizado, y una muestra de Delrin® pulido, con el fin de comparar la adhesión.

#### **4.II.2.2.a. Primer Ensayo piloto de adhesión de bacterias**

En este ensayo se comparó la adhesión de bacterias sobre la superficie de las muestras luego de 2 horas de sumergidas en caldo nutritivo al que se había inoculado con *Staphylococcus aureus* a 37°C en estufa de cultivo en una concentración de  $1 \cdot 10^8$  bacterias/ ml.

Las muestras se montaron en tres portaobjetos de vidrio pegadas a este con resina epoxi transparente. Previo al montaje, los portaobjetos se lavaron y desengrasaron utilizando detergente no iónico, se enjuagaron con abundante agua MilliQ y luego con alcohol 96%.

#### ***Montaje de las muestras***

En el portaobjeto denominado D150, se montó una muestra anodizada a 15V en el extremo inferior, y unos 10 mm más arriba se montó una muestra pulida sin tratamiento de anodizado. Fig.Nº 28 izq.

En el portaobjeto denominado D50, se montó una muestra anodizada a 90V en el extremo inferior, y unos 10 mm más arriba se montó una muestra pulida sin tratamiento de anodizado. Fig.Nº 28 centro.

En el portaobjeto denominado 81 se montó una muestra de Delrin®, pulido con idéntico protocolo de Ø 12mm por 5mm de espesor. Fig.Nº 28 der.

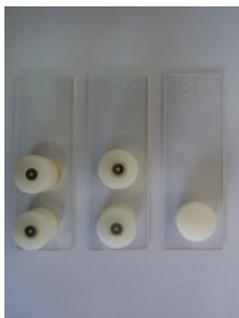


Fig.Nº 28. Muestras montadas en los portaobjetos.

#### 4.II.2.2.b Segundo ensayo piloto de adhesión de bacterias

Cómo en el primer ensayo piloto se observó que la superficie del Delrin® pulido pareció ser más favorable a la adhesión de bacterias, se realizó este segundo ensayo piloto de adhesión de bacterias para investigar si esta condición favorable podría influir sobre la adhesión en las superficies de titanio, tanto en el anodizado como en el pulido. Debe tenerse en cuenta que, tal como se detalló anteriormente en el marco teórico, las bacterias emiten señales químicas, las cuales son recibidas por otras bacterias y esto podría provocar el acercamiento de las bacterias planctónicas y el aumento en el número de bacterias que se adhieren en esa región y, de ese modo ir cubriendo la superficie por invasión desde la zona del Delrin®. Para comprobar si esta posibilidad era cierta se realizó esta experiencia con el propósito de observar si el Delrin® tenía influencia en la adhesión sobre el titanio.

Para esta experiencia se prepararon cuatro muestras en formato de electrodo, incluidas en el Delrin® y pulidas hasta 2500 con la misma técnica utilizada en las experiencias anteriores y dos muestras en las que solamente se utilizó el tornillo, también pulidas hasta 2500. Las muestras se montaron sobre tres portaobjetos (Fig.Nº 29), en el de la izquierda se colocaron dos muestras con formato de electrodo, en el del centro una muestra con tornillo solo y en el de la derecha se colocaron dos muestras con formato de electrodo y una con tornillo solo. El objetivo de esta experiencia fue comparar cómo adherían las bacterias al titanio con presencia o no del Delrin® alrededor.



Fig.Nº 29. Muestras montadas en los portaobjetos

Una vez pegadas las muestras a los portaobjetos, se volvieron a lavar con agua MilliQ, luego con alcohol 96%, se dejaron secar y se colocaron por 30 minutos en luz ultravioleta en la cabina de flujo laminar, para esterilizar las muestras.

En la cabina de flujo laminar, con mechero “Bunsen “, se flameó una pinza metálica en la llama, luego se tomó uno de los portaobjetos y se lo sumergió en forma vertical en el caldo, con el extremo donde se encuentran las muestras hacia abajo y mirando al interior del vaso, apoyándolo en la pared del vaso de precipitado, se repitió la misma operación con los otros dos portaobjetos, se cubrió la boca del vaso de precipitado con papel de aluminio y se llevó así a la estufa de cultivo, donde quedaron durante 2 horas a 37°C.

Cumplido el período de tiempo, se retiró el vaso de precipitado de la estufa, se retiró la cubierta de papel de aluminio, y de a uno se fueron retirando los portaobjetos, lavándolos con agua destilada esterilizada. A continuación, se realizó la tinción con naranja de acridina en solución saturada, durante 60 segundos, se lavó con agua destilada, y posteriormente se observó la muestra en el microscopio óptico por epifluorescencia, se tomaron fotografías de los campos observados a 400X. Se repitió el mismo procedimiento con todas las muestras.

#### **4.II.3 Métodos de observación de bacterias adheridas**

##### **4.II.3.1 Microscopía óptica de epifluorescencia**

La microscopía óptica tradicional emplea luz transmitida es decir, la luz atraviesa la muestra. Por ese motivo, para muestras opacas conviene utilizar la técnica de

epifluorescencia. En este caso, la imagen se forma a partir de la luz emitida de un espécimen fluorescente. Habitualmente los sustratos biológicos no son fluorescentes por lo que, previo a la observación, son teñidos con un colorante que fluoresce luego de haber sido iluminado con luz ultravioleta. Entre las tinciones más utilizadas se encuentra naranja de acridina, pero también se dispone de *kits* comerciales que contienen mezclas de tinciones (Live and Dead BacLight® de Invitrogen).

En nuestros ensayos utilizamos como tinción naranja de acridina, y para la observación un microscopio óptico Olympus BX-51 con filtros U-MWG2 (filtro de excitación 510-550 nm y filtro de emisión 590 nm) y U-MWB2 (filtro de excitación 460-490 nm y filtro de emisión 520 nm).

#### 4.II.3.2 Técnica de tinción con naranja de acridina

El naranja de acridina (N,N,N', N'-tetrametilacridina según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) es un colorante catiónico selectivo para los ácidos nucleicos y útil para realizar determinaciones sobre el ciclo celular. Interacciona con el ADN y ARN por intercalación dentro de la molécula o por atracción electrostática, respectivamente. Cuando se encuentra asociado con el ADN, el naranja de acridina es espectralmente similar a la fluoresceína, presentando un máximo de excitación a 502 nm y una emisión a 525 nm (en el verde). Cuando está asociado al ARN, la excitación máxima es a 460 nm (en el azul) y la emisión máxima a 650 nm (en el rojo). Las células que se encuentran en división activa (ADN muy activado) se tiñen de verde, mientras que las células que están en reposo multiplicativo (señal de ARN exacerbada y proteínas) tendrán fluorescencia naranja o rojo, al estar en contacto con el colorante. Las bacterias y los hongos se tiñen de color naranja brillante, el fondo aparece de color negro a verde amarillento.(137)

#### 4.II.3.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) para observación de muestras biológicas

##### *Protocolo de fijación de bacterias para SEM*

Se compone de dos etapas: Fijación y deshidratación

- 1- Fijación con glutaraldehído 2% en buffer P.B.S (Solución Buffer Fosfato) dos horas a 4° C para realizar enlaces cruzados de las proteínas.

Se enjuaga con solución buffer fosfato y se pasa a la etapa

- 2- Deshidratación en etanol. Consta de siete pasos con diferentes diluciones de etanol y glutaraldehído.

- I- 30% etanol- 20 minutos en la heladera a 4° C
- II- 50% etanol- 20 minutos en la heladera a 4° C
- III- 70% etanol- 20 minutos en la heladera a 4° C
- IV- 90% etanol- 20 minutos en la heladera a 4° C
- V- 95% etanol- 20 minutos en la heladera a 4° C
- VI- 100% etanol- 20 minutos a temperatura ambiente
- VII- 100% etanol- 20 minutos a temperatura ambiente

Las diluciones se prepararon de la siguiente manera, a partir de tomar con una pipeta 1ml de glutaraldehído al 2% y 1ml de etanol absoluto 99,6%.

- I- 30% 300µl de etanol + 700µl de agua estéril
- II- 50% 500µl de etanol + 500µl de agua estéril
- III- 70% 700µl de etanol + 300µl de agua estéril

IV- 90% 900μl de etanol + 100μl de agua estéril

V- 95% 950μl de etanol + 50μl de agua estéril

Cada muestra la colocamos en un tubo de ensayo con tapa con 1ml de glutaraldehído al 2% durante 2 horas, manteniéndolo en la heladera.

Para la etapa de deshidratación, preparamos dos gradillas para tubo eppendorff® con 5 filas (una por cada condición), y 8 tubos eppendorff® por fila (Fig.Nº30). Realizando de izquierda a derecha todas las etapas de la deshidratación en las diferentes diluciones.

10V							
20V							
60V							
60VPT							
Ti C.							

Fig.Nº 30. Esquema de la gradilla donde se colocaron los tubos eppendorff®.

#### 4.II.3.4 Preparación de los sustratos de titanio para ensayos de adhesión bacteriana

##### *Pulido de las muestras*

Los electrodos fueron pulidos hasta 2500 siguiendo la técnica de pulido ya descrita, luego se lavaron y enjuagaron con agua tipo MilliQ y finalmente con alcohol 96%.

##### *Anodizado de las muestras*

Para llevar a cabo este tratamiento usamos una celda electroquímica de vidrio, tal como se describió previamente, y una fuente de energía eléctrica de corriente continua, marca HEWLETT PACKARD 6181C DC.

En el interior de la celda electroquímica colocamos 80 ml de solución electrolítica (para cada procedimiento utilizamos solución nueva), el electrodo de titanio y enfrente a éste, a una distancia de 2 cm, el electrodo de lámina de platino (15mm x 6 mm).

### ***Muestras anodizadas a 10V***

En este caso, se seleccionó en la fuente una tensión de 10V, conectamos el cable del electrodo de titanio al polo positivo de la fuente y el cable del electrodo de platino al polo negativo de la fuente. El proceso de anodizado duró 30 min. Concluido el tiempo se desconectó la fuente, retiramos el electrodo de titanio anodizado a 10V, se lo lavó primero con agua destilada, luego con agua destilada tipo MilliQ. Finalmente se secaron los excesos de agua con papel tissue sin tocar la superficie anodizada y luego se protegió la superficie del electrodo con una pantalla de papel y el PARAFILM® asegurados con cinta adhesiva.

Para el electrodo B se repitió el procedimiento utilizando solución electroquímica nueva.

### ***Muestras anodizadas a 20V***

Las muestras fueron tratadas realizando el mismo proceso de anodizado, pero con una tensión de 20V, el lavado posterior y la protección con pantalla de papel y PARAFILM® de forma similar a lo descripto anteriormente.

### ***Muestras anodizadas a 60V***

Las muestras fueron tratadas realizando el mismo proceso de anodizado, pero con una tensión de 60V, el lavado posterior y la protección con pantalla de papel y PARAFILM® de forma similar a lo descripto previamente.

### ***Muestras titanio control***

Las muestras fueron solamente pulidas, siguiendo la técnica de pulido, se lavó con agua destilada, luego con agua destilada tipo MilliQ y se secaron los excesos con papel tissue sin tocar la superficie de titanio pulida. Se las protegió del ambiente con pantalla de papel y PARAFILM®.

#### 4.II.4 Electropolimerización con timol (técnica de cronoamperometría)

Para obtener la cobertura de timol polimerizado (poliTOH) se utilizó un potenciostato, este dispositivo permite aplicar una diferencia de potencial constante entre los electrodos de trabajo y contraelectrodo, tomando como punto de referencia el voltaje en el electrodo de referencia y corrigiendo las variaciones mediante el control de la corriente en el electrodo auxiliar (contraelectrodo). En forma simplificada puede decirse que el potenciostato tiene la capacidad de medir y controlar el potencial de la celda, detectando cambios en su resistencia, y variando la intensidad de corriente administrada al sistema de acuerdo con estas variaciones, de manera que la diferencia de potencial se mantenga constante. Si la resistencia aumenta, la intensidad de corriente deberá ser disminuida, si se quiere mantener el voltaje constante, y si la resistencia disminuye, el potenciostato deberá aumentar la intensidad de la corriente. Podría interpretarse en forma sencilla mediante la aplicación de la Ley de Ohm:

$R = \frac{E}{I}$  donde R es la resistencia, E es la diferencia de potencial, e I la intensidad de corriente. (138)

El equipo potenciostato que utilizamos es Potenciostato-Galvanostato TEQ-03.

En una celda electroquímica de vidrio, se colocan tres electrodos, el electrodo de calomel saturado denominado electrodo de Referencia, el electrodo de platino denominado contraelectrodo y el electrodo de Ti denominado electrodo de trabajo.

La electropolimerización se logró mediante una técnica de cronamperometría. Se fijó el potencial a 780mV durante 20 minutos, en un electrolito compuesto por 70% de ácido sulfúrico 0,5M + 30% de etanol con 0,1M de timol. Se utilizó el programa Tq3-402, con parámetros fijos de voltaje 780 mV y el tiempo 20 minutos.

Mediante este procedimiento realizado a las muestras anodizadas a 60V individualmente se depositó timol sobre la superficie de titanio y dicho compuesto se polimerizó (poliTOH) a potencial constante de 780mV. Un procedimiento similar había sido aplicado exitosamente a otras superficies metálicas como el cobre.(123)

#### **4.II.5 Metodología experimental utilizada para los ensayos de adhesión a distintos voltajes.**

Concluidas estas experiencias preliminares, se definieron los ensayos definitivos de adhesión bacteriana, los cuales se diseñaron de la siguiente forma:

##### **4.II.5.a Ensayo A de adhesión de bacterias utilizando microscopía de epifluorescencia**

Para el Ensayo A se prepararon en total ocho muestras (electrodos), a los cuales denominamos A, B, C, D, E, F, G y H. Los electrodos A y B representaron la condición 10V, los C y D representaron la condición 20V, los E y F representaron la condición 60V y los G y H representaron la condición titanio pulido control.

Las muestras se dispusieron en los portaobjetos tal como se muestra en la Fig.Nº 31:

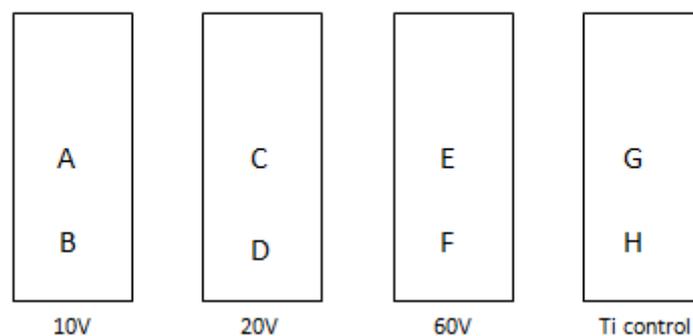


Fig.Nº 31. Esquema que muestra la ubicación de cada electrodo en los portaobjetos para el ensayo A de adhesión bacteriana.

En la cabina de flujo laminar se colocó un vaso de precipitado, con escala, de 250 ml de capacidad, esterilizado, con envoltura de papel. Además, se colocó el Erlenmeyer con el inóculo, y un recipiente retirado de la heladera con el caldo nutritivo preparado. Se desenvolvió el vaso de precipitado, se flameó sobre la llama del mechero la boca del mismo, se destapó el Erlenmeyer también flameando la boca sobre la llama del mechero y se destapó el frasco con caldo nutritivo, flameando la

boca en el mechero. A continuación, se volcaron los 50 ml del inóculo en el vaso de precipitado y seguidamente se completó el volumen con el caldo nutritivo hasta llegar a la marca de 200 ml. Posteriormente se colocaron los portaobjetos adentro, con las muestras mirando al interior del vaso y sujetando cada porta objeto a la pared del vaso de precipitado con cinta adhesiva. La boca del vaso se cubrió con papel film de aluminio y se llevó el vaso de precipitado con su contenido a la estufa de cultivo a 37°C, durante dos horas.

A las dos horas, se retiró el vaso de precipitado de la estufa de cultivo, las muestras se fueron retirando de a una, teniendo cuidado de no rozar la superficie de Ti. Finalmente las mismas se lavaron con agua destilada esterilizada para su posterior observación por el microscopio. Para la técnica de epifluorescencia cada muestra se debe colorear previamente con una gota de naranja de acridina en solución saturada, la cual se coloca sobre la superficie a observar con una pipeta, se la deja actuar durante 60 segundos, y se lava con agua destilada Milli Q.

Se las observó con un microscopio óptico marca OLYMPUS BX51, utilizando luz ultravioleta, el cual tiene incorporada una cámara fotográfica digital OLYMPUS DT73. Con esta técnica las bacterias se visualizan de color amarillo o rojo en un fondo negro. Se fija el campo a observar con objetivo de 10x y luego se cambia a un objetivo de 40X para tomar fotografías de cada campo observado. Sobre estas fotografías, utilizando un software denominado Image-pro 6.2 se hizo el cálculo de % de área cubierta por los microorganismos.

#### **4.II.5.b Ensayo B de adhesión de bacterias utilizando microscopía de epifluorescencia, incluyendo electrodos anodizados y con cobertura polimérica**

Teniendo en cuenta los resultados de la primera experiencia de adhesión de bacterias que permitieron concluir que la condición anodizada a 60V tenía menor porcentaje de superficie de titanio cubierta por las bacterias y dada la limitación de muestras de titanio disponibles provistas por el fabricante, se seleccionó esta condición para repetir junto a muestras de titanio pulido (control).

Por otra parte, y con el fin de incrementar la actividad anti-biofilm de la superficie, se incluyeron también dos muestras con una cobertura antimicrobiana de politimol,

tal como se mencionó previamente. De esta manera este ensayo quedó definitivamente diseñado para comparar tres condiciones, Ti control, Ti anodizado a 60V y Ti anodizado a 60V con cobertura antimicrobiana.

### ***Preparación de las muestras del ensayo B***

Para esta experiencia se prepararon seis muestras (B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>7</sub> y B<sub>8</sub>), siguiendo la misma técnica de pulido hasta 2500 con lija al agua de carburo de silicio, luego de finalizado el pulido se lavaron primero con agua destilada, luego con agua destilada tipo MilliQ y finalmente alcohol 96°.

Las muestras que denominamos B<sub>4</sub> y B<sub>8</sub> se protegieron colocándoles la pantalla de papel y PARAFILM®, para aislar las superficies de titanio de los efectos del ambiente.

Las muestras que denominamos B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub> y B<sub>7</sub> fueron sometidas individualmente a un proceso de anodizado utilizando una diferencia de potencial de 60V, para dicho proceso se siguió el mismo protocolo de anodizado ya descrito, utilizando siempre solución electrolítica nueva. Después de finalizado el anodizado se lavó cada electrodo primero con agua destilada, luego con agua destilada MilliQ y finalmente se secaron los excesos con papel tissue, teniendo la precaución de no tocar la superficie de Ti anodizada. Para terminar, se protegieron las muestras con pantalla de papel y PARAFILM®.

A dos muestras ya anodizadas a 60V, se les realizó un proceso de electropolimerización con timol utilizando la técnica descrita anteriormente.

### ***Ensayo B de adhesión de bacterias utilizando microscopía de epifluorescencia con muestras con y sin cobertura polimérica.***

Siguiendo el mismo protocolo y técnica microbiológica que en el primer ensayo de adhesión de bacterias se montaron las muestras en tres portaobjetos, tal cual muestra el esquema de la Fig.N°32.

Esquema de los portaobjetos con las muestras montadas

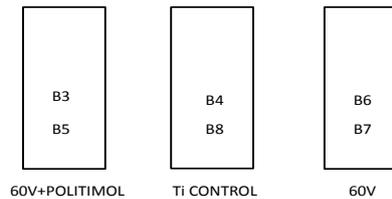


Fig.Nº 32. Esquema que representa la ubicación de las muestras montadas en los portaobjetos.

Los portaobjetos se colocaron dentro de un vaso de precipitado de 250 ml, donde previamente se volcaron 200 ml de caldo con *Staphylococcus aureus*. Cada portaobjeto fue adherido con cinta en forma vertical apoyado a la pared del vaso y con las muestras mirando hacia el centro del vaso. Se colocó una tapa de papel film de aluminio y se llevó durante dos horas a la estufa de cultivo a 37° C. Cumplido el tiempo, se retiró el vaso de la estufa, y dentro de la cabina de flujo laminar, se destapó y se fueron retirando los porta objetos, lavando las muestras con agua destilada esterilizada. Una vez que se lavaron adecuadamente se comenzó con la técnica de tinción con naranja de acridina, de a una muestra por vez, para observarlas por microscopio óptico utilizando técnica de epifluorescencia y tomar las imágenes fotográficas de los campos de observación. Se tomaron 20 campos de observación por muestra.

#### 4.2.5.c Ensayo C de evaluación de la distribución de bacterias adheridas utilizando SEM

Para este ensayo se prepararon cinco muestras (electrodos), siguiendo el mismo protocolo de pulido. Se preparó una muestra control pulida, sin anodizar identificada como Cc, y otras anodizadas con las condiciones de anodizado a 10V, 20V y 60 V siguiendo el mismo protocolo ya descrito, y se la identificó como C<sub>10V</sub>, C<sub>20V</sub> y C<sub>60V</sub>

Se preparó además una muestra con la condición de anodizado a 60V + Politimol siguiendo el protocolo ya descrito identificada como C<sub>60V poli</sub>.

El ensayo de adhesión de bacterias fue con idéntica técnica microbiológica que en los ensayos anteriores. Finalizado el mismo, se retiraron las muestras de la estufa de cultivo, se les realizó triple lavado en agua destilada esterilizada y se procedió a comenzar con el protocolo de fijación de bacterias para realizar la técnica de punto crítico en SEM.

Los resultados se presentan en el capítulo correspondiente.

### **Sección III:**

#### **4.III. Metodología utilizada para el análisis superficial**

##### **4.III.1. Medidas de tensión superficial**

###### ***Medición del ángulo de contacto***

Existen diferentes técnicas para medir el ángulo de contacto y de obtener información acerca de la energía superficial, uno de los más utilizados es el método de medida de ángulo de contacto mediante un goniómetro. También se utilizan el método de equilibrio de Wilhelmy y el análisis de la forma de la gota.

El método empleado en este trabajo es el de medida de ángulo de contacto. Con el propósito de obtener las fotografías de las gotas sobre las distintas superficies se utilizó una cámara fotográfica digital Nikon Power Shot SX530 HS, en modo macro, sobre un soporte fijo y una platina sobre la cual se fijaron las muestras.

Para esta experiencia se prepararon 5 electrodos uno para cada condición, titanio pulido, titanio anodizado a 10V, titanio anodizado a 20V, titanio anodizado a 60V y titanio anodizado a 60V+ politimol. Las muestras ya preparadas se montaron sobre la platina de a una por vez. Con la muestra fijada a la platina utilizando una micropipeta automática p20, se depositó una gota de agua destilada MilliQ de 5 µl sobre la superficie metálica y se midió el ángulo de contacto haciendo una captura digital de la imagen de la gota sobre la superficie de la muestra. Las fotos fueron analizadas con el programa *Fiji plugins: drop analysis* para calcular el ángulo de contacto.

Los resultados se informan en el capítulo correspondiente.

#### **4.III.2 Observaciones por SEM. Análisis de Espectro de Dispersión de rayos X (EDX)**

Para observar las muestras de las experiencias se utilizaron los servicios del Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental (ESEM), marca FEI, modelo Quanta 200 que cuenta con un detector de rayos X para análisis EDX, instalado en el **Laboratorio de Investigaciones de Metalurgia Física (LIMF)**, perteneciente a la Facultad de Ingeniería de las U.N.L.P.

Se prepararon muestras de las condiciones titanio anodizado a 10V, titanio anodizado a 20V, titanio anodizado a 35 V, titanio anodizado a 60V, titanio anodizado a 60V+ politimol y titanio anodizado a 75V siguiendo los protocolos de pulido y anodizado descriptos. Como la pieza de Delrin® que rodea a los tornillos no es conductora se colocó una pequeña cinta adhesiva de carbono que permitió asegurar la conductividad eléctrica desde la superficie del tornillo a la platina del microscopio. Se realizó un análisis cualitativo en relación al aspecto de las superficies en cada condición seleccionada capturando imágenes digitales a diferentes magnificaciones (2.000X, 3.000X, 6.000X y 50.000X), los resultados de estas observaciones se exponen en el capítulo correspondiente.

En estas muestras también se analizó el Espectro de Dispersión de rayos X (EDX), que permite realizar un análisis cuali-cuantitativo de los elementos químicos presentes en la superficie estudiada. El propósito de este análisis fue conocer el porcentaje de átomos de flúor presente en la superficie de cada condición. Las tablas con los resultados se presentan en el capítulo correspondiente.

En la evaluación de la distribución de bacterias adheridas correspondientes al Ensayo C de adhesión bacteriana se evaluaron 5 muestras con las condiciones titanio pulido, titanio anodizado a 10V, titanio anodizado a 20V, titanio anodizado a 60V y titanio anodizado a 60V+ politimol, las mismas se prepararon siguiendo los protocolos de pulido y anodizado ya descriptos y además se acondicionaron para la observación por microscopía electrónica de barrido siguiendo la técnica de secado por punto crítico cuyos fundamentos fueron desarrollados en la sección de materiales y

métodos de los ensayos de adhesión bacteriana. Las muestras se metalizaron con una fina capa de oro para asegurar la conductividad eléctrica. Se capturaron imágenes digitales a diferentes magnificaciones (2.000X, 3.000X, 6.000X y 50.000X) de las bacterias sobre las superficies en cada una de las condiciones, y se evaluó ubicación, distribución y formas de agrupamiento. Los resultados se presentan en el capítulo correspondiente.

#### **4.III.3 Análisis de la rugosidad superficial utilizando AFM, cálculo de los parámetros característicos**

En este trabajo se caracterizaron mediante microscopía de fuerza atómica las superficies de las condiciones de Ti Pulido, Ti anodizado a 10V, Ti anodizado a 20V, y Ti anodizado a 60 V. Se prepararon las muestras siguiendo los protocolos de pulido y anodizado ya descritos y, para poder montar las muestras a analizar en la platina del microscopio, se las redujo en altura a 4 mm evitando así poner en riesgo la punta del microscopio. Con ese fin recurrimos al Servicio de Microscopía de Fuerza Atómica de INIFTA. Las muestras fueron estudiadas en Tapping mode AFM (NanoscopeV, Bruker, Santa Bárbara, CA) se utilizó una punta Arrow® NCR, Nano World, Neuchâtel, Suiza de silicio. Se analizó en cada muestra un campo de  $15\mu\text{m} \times 15\mu\text{m}$  y en dicho campo se evaluaron 10 perfiles siguiendo el sentido de las líneas de pulido, para evitar la influencia de las mismas. Para analizar las imágenes y determinar los parámetros de rugosidad se utilizaron los Software Nanoscope Analysis 1.5 y Gwyddion.

Se seleccionaron para el estudio los parámetros  $R_a$ ,  $R_q$ ,  $R_{\text{max}}$ ;  $W_a$ ,  $W_q$ ,  $W_{\text{max}}$ ;  $S_a$ ,  $S_q$ ,  $S_z$ ,  $S_{\text{sk}}$ ,  $S_{\text{tr}}$ ,  $S_{\text{ds}}$  y  $S_{\text{dr}}$  que se calcularon de acuerdo a las ecuaciones mostradas en la Sección III del marco teórico.

Los resultados se presentan en el capítulo correspondiente.

## **Capítulo 5. Resultados.**

## Capítulo 5

### RESULTADOS

Los resultados están divididos en 3 secciones a saber:

**Sección I.** Resultados del anodizado, observaciones microscópicas por SEM y de las mediciones de ángulo de contacto.

**Sección II.** Resultados de los ensayos de adhesión de bacterias

**Sección III.** Resultados del análisis de rugosidad utilizando AFM, cálculo de los parámetros característicos y su relación con la adhesión bacteriana

**Sección I.** Resultados del anodizado y análisis superficial de los electrodos de titanio

#### 5.1.1 Resultados de la Primera Serie de electrodos anodizados

Como puede observarse en la Fig.Nº 33 se obtuvieron superficies coloreadas que variaron con los diferentes voltajes aplicados en los procesos de anodizado.

Tal como se mencionó en el Capítulo 1 Sección I estos cambios son producidos por fenómenos de interferencia de la luz sobre la superficie anodizada.

#### Escala de colores obtenidos

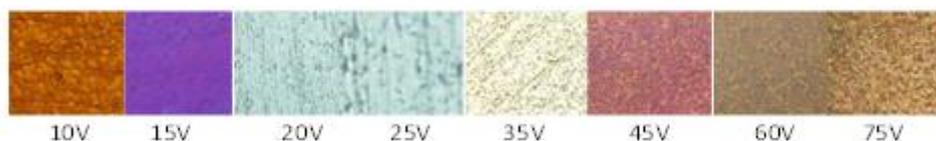


Fig.Nº 33. Colores obtenidos en los electrodos de la Primera Serie sometidos a distintos potenciales de anodización. Imágenes obtenidas por microscopía óptica a 400X.

Finalizado el proceso de anodización con las 10 muestras se compararon las fotos obtenidas en las observaciones con microscopía óptica y los aspectos de las superficies. En la Fig.Nº 34 se muestra imágenes correspondientes a voltajes 45V, 60V y 75V. Se observó que presentaban un patrón similar de rugosidad con hoyos que van de 2 a 5  $\mu\text{m}$  aproximadamente.

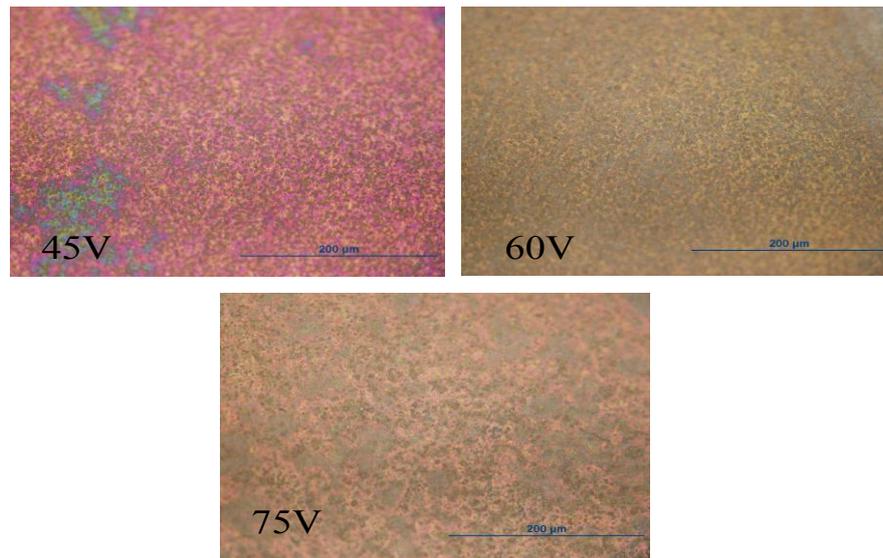


Fig.Nº 34. Muestra imágenes de microscopía óptica a 400X, de titanio anodizado (Primera Serie).

### 5.I.2 Resultados de la Segunda Serie

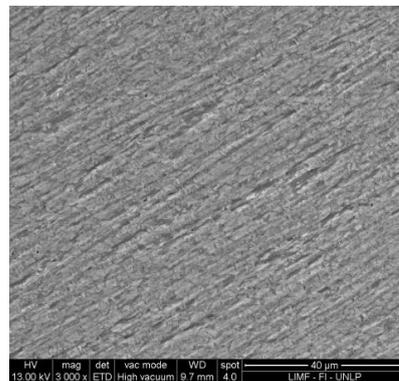
La Segunda Serie de ensayos se realizó con una partida de tornillos provista por el fabricante, si bien se informó que su composición era idéntica los resultados del anodizado fueron distintos a los de la Primera Serie.

A diferencia de las muestras anodizadas de la Primera Serie, a simple vista tuvieron un aspecto mate y color gris oscuro, sin embargo al moverlas, modificando el ángulo de la incidencia de la luz natural, ofrecían un aspecto tornasolado donde predominaba el color rosado. La composición fue analizada por (EDX) y mostró que igualmente correspondían a titanio comercialmente puro tal como la primera serie por lo que se infirió que probablemente diferían en su microestructura metalográfica. Al respecto el fabricante informó que los tornillos de esta segunda serie se

maquinaron especialmente para esta segunda experiencia. Se sabe que los cambios microestructurales producen fragmentaciones del grano, movimientos de átomos y distorsión de la malla y que estos cambios podrían producir variaciones a nivel de la superficie.(139)

### 5.1.3 Resultados del análisis de las superficies de titanio anodizadas mediante SEM y EDX

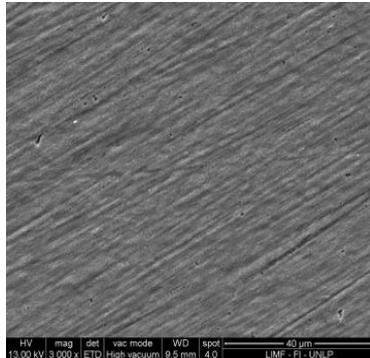
La microscopía SEM permitió analizar la topografía superficial a mayor magnificación (Figs.Nº 35-39). A la derecha de cada figura se analizan comparativamente los cambios superficiales observados por SEM luego de la anodización.



El aspecto de la superficie anodizada a 10V, observada a 3.000X con SEM, es uniforme con surcos deprimidos, separados por elevaciones, que parecen seguir las líneas de pulido, se observan sectores, dónde las depresiones por su color oscuro, parecen más profundas y más anchas, y que varían entre 1 y 4 µm de ancho.

Ti anodizado a 10V

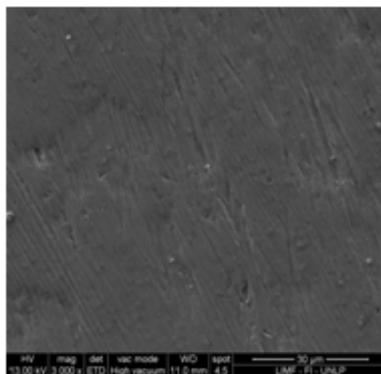
Fig.Nº 35. Microfotografía obtenida mediante SEM. Muestra la superficie de titanio anodizada a 10V. 3.000X (SEM)



El aspecto de la superficie de titanio anodizada a 20V, observada a 3.000X con SEM, no es tan uniforme, conserva el patrón de surcos deprimidos separados por elevaciones, con un ancho entre 1 y 3  $\mu\text{m}$ , y lo diferente con respecto a la condición a 10V es la presencia de hoyos de menos de  $\varnothing$  1  $\mu\text{m}$  distribuidos en la superficie .

Ti anodizado 20V

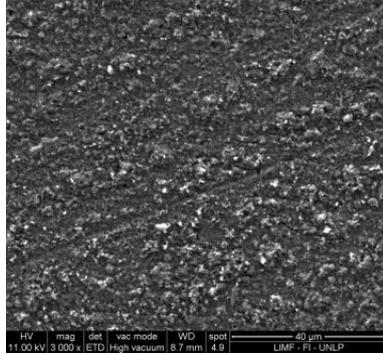
Fig.Nº 36. Microfotografía obtenida mediante SEM. Muestra la superficie de titanio anodizada a 20V. 3.000X (SEM)



El aspecto de la superficie anodizada a 35V, observada a 3.000X con SEM, ya no es uniforme, el patrón de surcos paralelos deprimidos y elevados ya no predomina, se observan hoyos puntiformes similares a los encontrados en la condición a 20V, y la presencia de elevaciones (ampollas) redondeadas de  $\varnothing$  1,25 $\mu\text{m}$ .

Ti anodizado a 35V

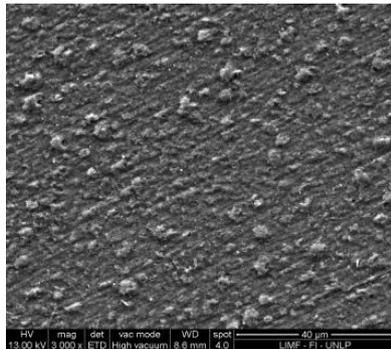
Fig.Nº 37. Microfotografía obtenida mediante SEM. Muestra la superficie de titanio anodizada a 35V. 3.000X (SEM)



El aspecto de la superficie anodizada a 60V, observada a 3.000X con SEM, muestra una superficie completamente diferente a las anteriores donde predominan las elevaciones de forma redondeada, que se ven en color claro con un tamaño que varía entre  $\varnothing$  2 y 4  $\mu$ m y una zona más deprimida que las separa en color gris.

Ti anodizado a 60V

Fig.Nº 38. Microfotografía obtenida mediante SEM. Muestra la superficie anodizada a 60V. 3.000X (SEM)



El aspecto de la superficie anodizada a 75V, observada a 3.000x con SEM, muestra una superficie muy similar a la obtenida con 60V, pero con menor cantidad de elevaciones redondeadas, las cuales parecen más separadas entre sí, y con  $\varnothing$  entre 5 y 7  $\mu$ m.

Ti anodizado a 75V

Fig.Nº 39. Microfotografía obtenida mediante SEM. Muestra la superficie de titanio anodizada a 75V. 3.000X (SEM)

### 5.I.3.1 Detalle de las superficies anodizadas a 60V sin y con cobertura de politimol obtenidas por SEM, Figs. N° 40 y 41

En las figuras N° 40 y 41 se puede observar la transformación de la superficie luego de la electroformación de politimol sobre la misma. A la derecha de cada figura se analizan comparativamente los resultados obtenidos sin (Fig.N° 40) y con (Fig.N° 41) la cobertura de politimol.

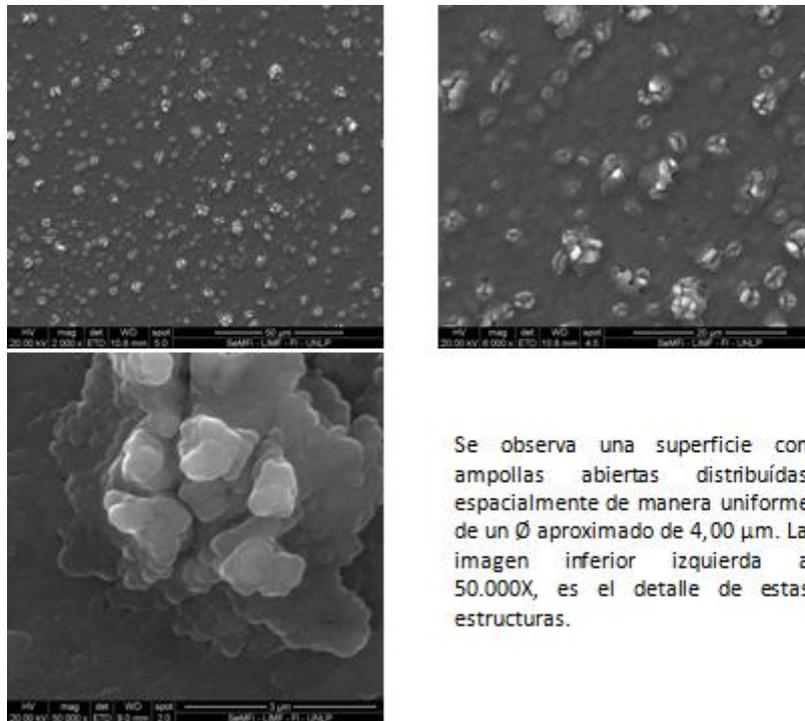


Fig. N° 40. Superficie anodizada a 60V sin cobertura de politimol. Superior izquierda a 2000X, superior derecha a 6000X, inferior izquierda a 50000X

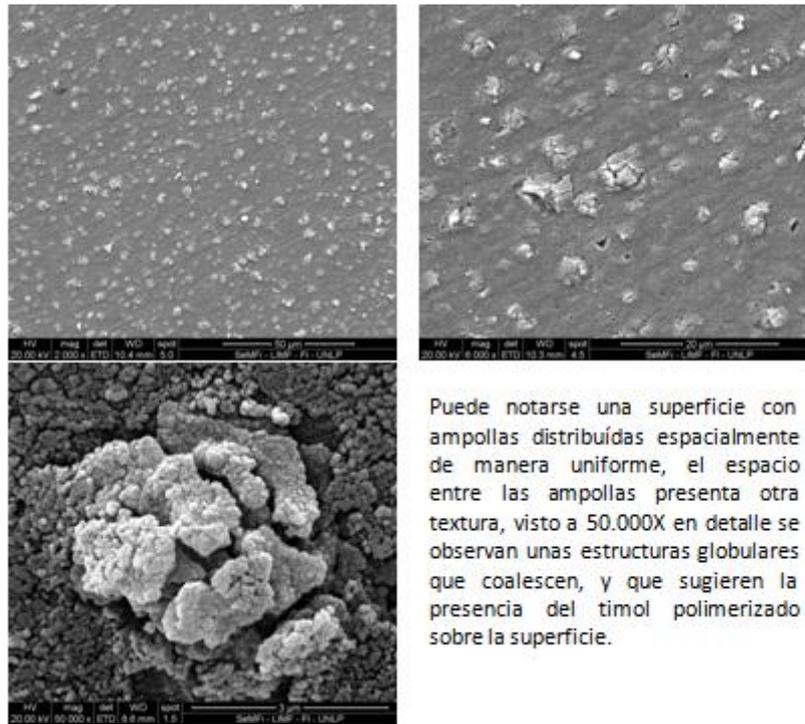


Fig. N°41. Superficie de titanio anodizada a 60V con cobertura de politimol. Superior izquierda 2000X y Superior derecha 6000X, inferior izquierda 50000X

#### 5.1.4 Resultados Análisis de Espectro de Dispersión de Rayos X (EDX)

##### *Muestra 10V*

El análisis EDX de la muestra (Fig.N° 42) anodizada a 10V muestra la presencia de flúor (F) 5,87% sobre la superficie y altas concentraciones de oxígeno atribuidas al óxido de titanio superficial.

Label A:

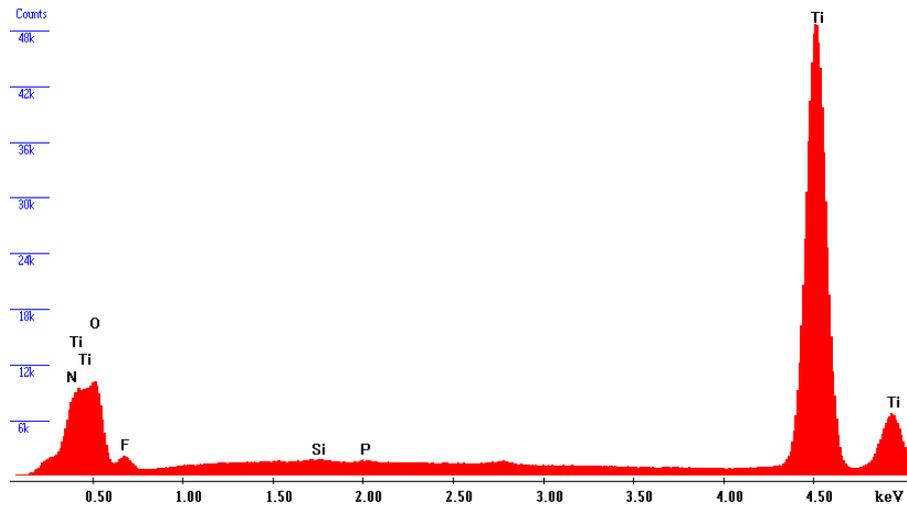


Fig.Nº 42. Gráfico de análisis (EDX) Ti anodizado a 10V.

Elemento	At %
N K	0,00
O K	41,66
F K	5,87
Si K	0,43
P K	0,31
Ti K	51,73
Total	100,00

Tabla Nº 2. Resultado de Porcentaje atómico. Análisis (EDX) Ti anodizado a 10V.

### *Muestra 20V*

Al igual que la muestra anterior, la muestra anodizada a 20V revela la presencia de flúor (F) 5,51% y de oxígeno (O) 38,20%.

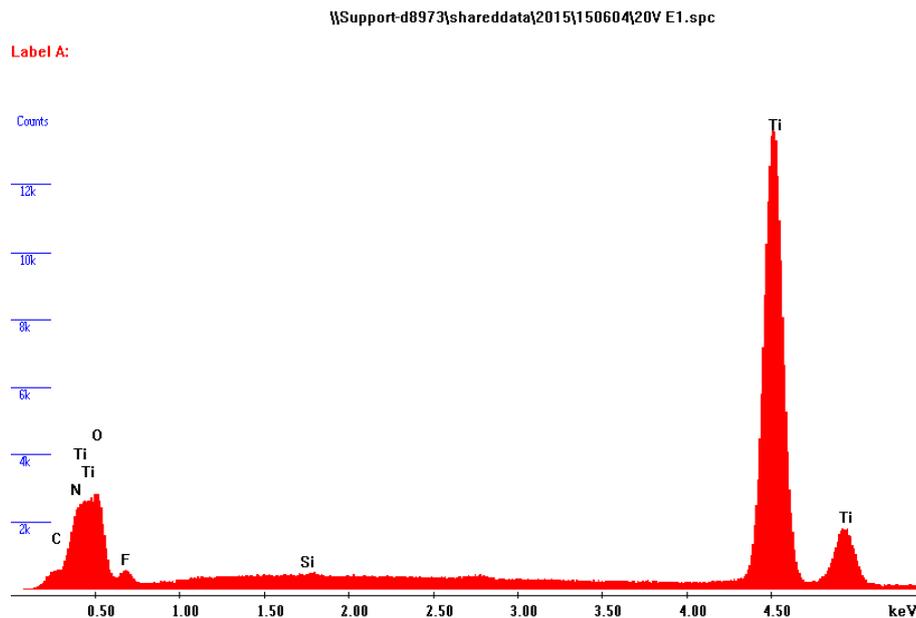


Fig.Nº 43. Gráfico de análisis (EDX) Ti anodizado a 20V.

Elemento	At %
C K	7,19
N K	0,00
O K	38,20
F K	5,51
Si K	0,43
Ti K	48,67
Total	100,00

Tabla Nº 3. Resultado de Porcentaje atómico. Análisis (EDX) Ti anodizado a 20V.

### *Muestra 35V*

En forma similar a las muestras anteriores la muestra anodizada a 35V presenta flúor (F) 3,57% y oxígeno (O) 32,61%.

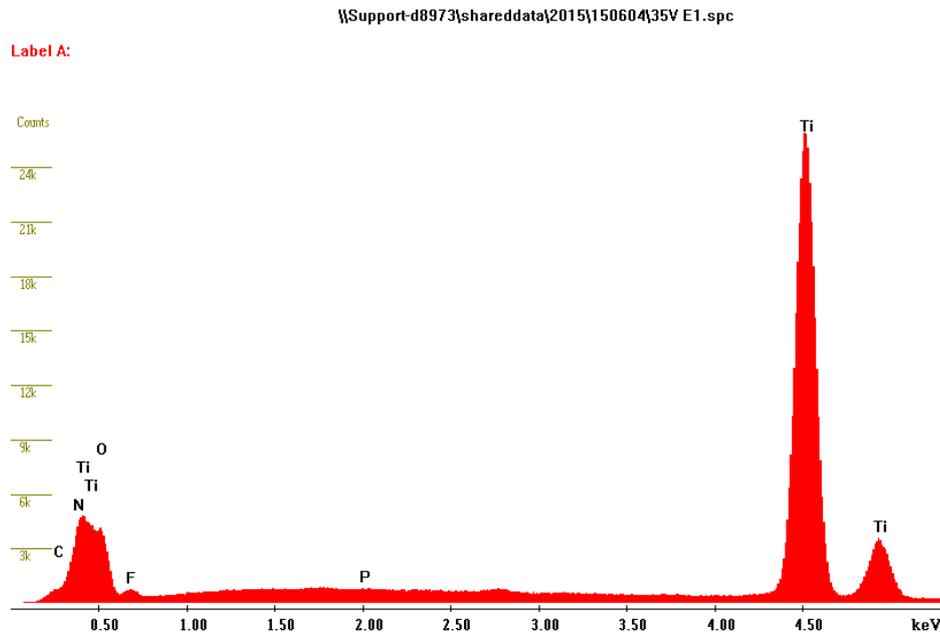


Fig.Nº 44. Gráfico de análisis (EDX) Ti anodizado a 35V.

Elemento	At %
C K	6,11
N K	0,00
O K	32,61
F K	3,57
P K	0,32
Ti K	57,40
Total	100,00

Tabla Nº 4. Resultado de Porcentaje atómico. Análisis (EDX) Ti anodizado a 35V.

### ***Muestra 60V***

También en la muestra anodizada a 60V el análisis EDX indica la presencia de flúor (F) 4,41% y oxígeno (O) 39,20%.

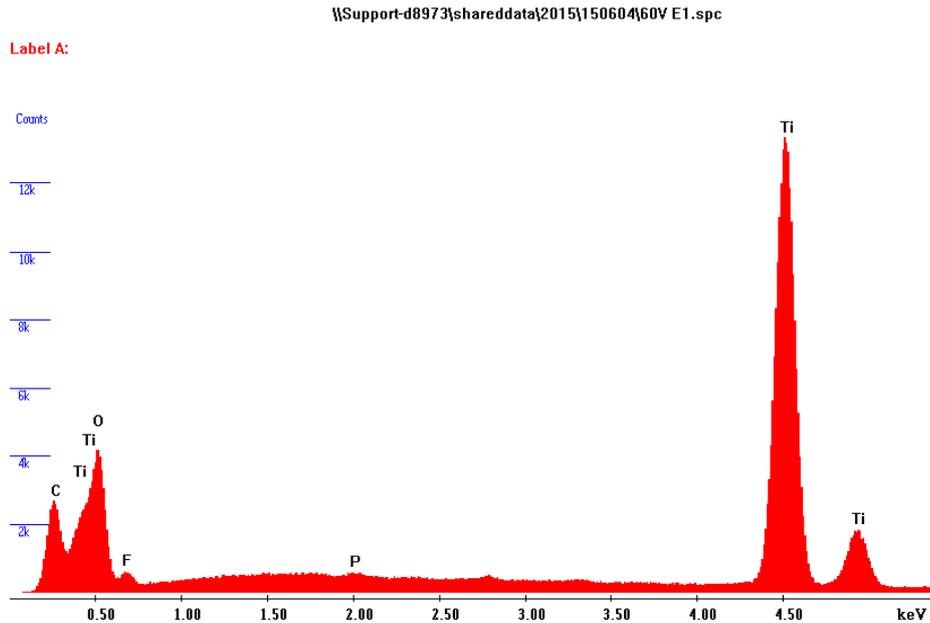


Fig.Nº 45. Gráfico de análisis (EDX) Ti anodizado a 60V.

Elemento	At %
C K	21,36
O K	39,20
F K	4,41
P K	0,26
Ti K	34,76
Total	100,00

Tabla Nº 5. Resultado de Porcentaje atómico. Análisis (EDX) Ti anodizado a 60V.

### Muestra 75V

En forma similar en la muestra anodizada a 75V el análisis EDX indica la presencia de flúor (F) 4,46% y oxígeno (O) 40,12%.

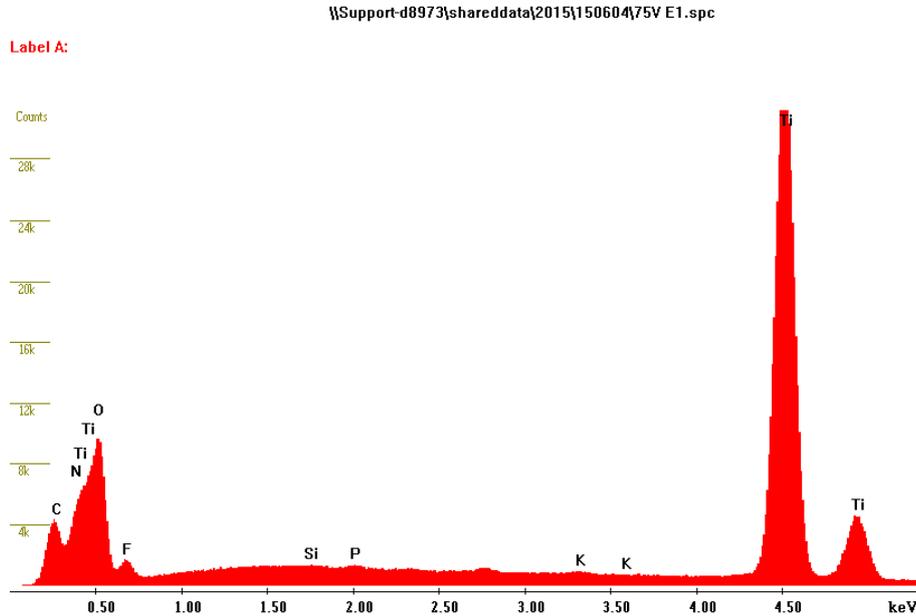


Fig.Nº 46. Gráfico de análisis (EDX) Ti anodizado a 75V.

Elemento	At %
C K	15,39
N K	0,00
O K	40,12
F K	4,46
Si K	0,35
P K	0,30
K K	0,17
Ti K	39,22
Total	100,00

Tabla Nº 6. Resultado de Porcentaje atómico. Análisis (EDX) Ti anodizado a 75V.

### ***Muestra 60V+ politimol***

En el caso de la muestra anodizada a 60V más politimol la presencia de flúor (F) se encontró enmascarada por la interposición de dicha película.

### ***Muestra de Ti pulido***

Para demostrar la ausencia de flúor en el Titanio control pulido se realizó el análisis EDX donde se pudo constatar la ausencia de dicho elemento (Fig.Nº 47)

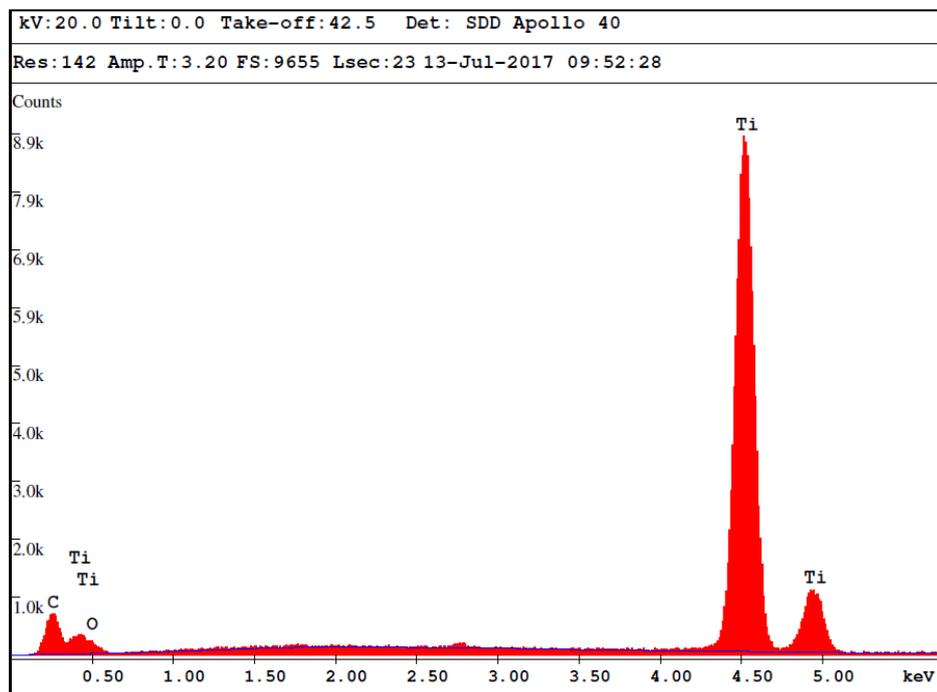


Fig.Nº 47. Gráfico de análisis de (EDX). Titanio pulido

Elemento	At. %
C	17,14
O	13,62
Ti	69,24
Total	100,00

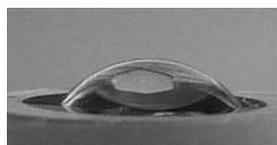
Tabla Nº 7. Porcentaje atómico. Análisis (EDX). Ti pulido.

Concluído este análisis, y teniendo en cuenta como criterio de elección los valores de At. % del elemento flúor, se decidió elegir las condiciones de 10V- 20V- 60V, cuyos valores fueron similares (At. % 5,87- At. % 5,51- At. % 4,41) respectivamente, para realizar los ensayos comparativos de adhesión bacteriana sobre estas superficies y evaluar el impacto de la rugosidad superficial.

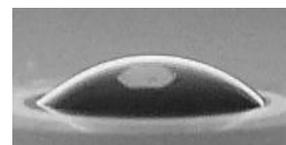
### 5.I.5 Resultados de la medición de ángulo de contacto

Los resultados experimentales para el titanio pulido y los anodizados a 10V, 20V, 60 V y el anodizado a 60 V con película de politimol se muestran en la Fig.Nº 48. En la Tabla Nº 8 se reportan los valores obtenidos. Puede notarse que el menor ángulo de contacto se obtuvo en este último caso mientras que el mayor se midió para el Ti anodizado a 10V.

#### Fotos de ángulos de contacto en todas las condiciones



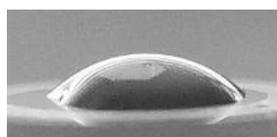
Ti pulido



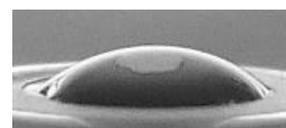
Ti anodizado 20V



Ti anodizado 10V



Ti anodizado 60V



Ti anodizado 60V + Politimol

Fig.Nº 48. Fotos que muestran la forma de las gotas en las diferentes superficies.

Condición de la muestra	Análisis de forma de gota axisimétrico de baja adherencia (LBADSA)
Ti pulido	57,1°
10V	82,2°
20V	38,4°
60V	47,0°
60V+Politimol	37,9°

Tabla N° 8. Valores de ángulos de contacto obtenidos para las diferentes superficies.

Los resultados muestran que no existe una relación directa entre el voltaje aplicado y el ángulo de contacto formado. Dicho ángulo estaría relacionado de una forma compleja, con la textura de la superficie, incluyendo su porosidad, ya que ésta varía significativamente de un potencial a otro, tal como se evaluará en el apartado correspondiente.

## **Sección II. Resultados de los ensayos de adhesión de bacterias**

### **5.II.1 Análisis de la adhesión bacteriana a las muestras de titanio por microscopía de epifluorescencia y por SEM**

#### **5.II.1.1 Resultado del primer ensayo piloto de la adhesión bacteriana**

Las muestras tratadas mediante la tinción con naranja de acridina se observaron a través de microscopía de epifluorescencia. En la Fig.N° 49 se muestran los resultados obtenidos.

## Análisis comparativo de las imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia

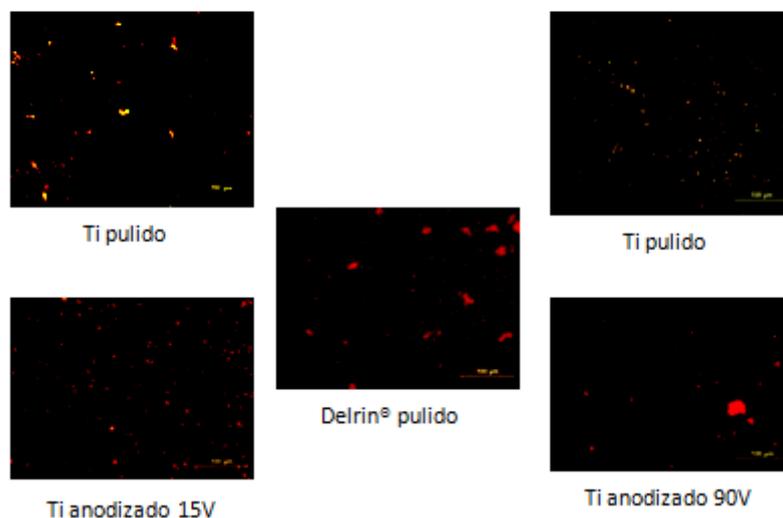


Fig.N° 49. Imágenes obtenidas de muestras anodizadas (15V, 90V), muestras pulidas sin anodizar y muestras de Delrin® pulido, que fueron sumergidas en los cultivos bacterianos y observadas por microscopía de epifluorescencia. Comparación de la adhesión de las bacterias.

Comparando las imágenes de la Fig.N° 49 puede notarse que la que presenta mayor adhesión fue la superficie de Delrin® pulido, con formación de conglomerados de  $\varnothing$  2,6  $\mu\text{m}$ . En las superficies de titanio pulido los conglomerados de bacterias fueron más pequeños y con mayores áreas sin cubrir por las bacterias.

En la superficie anodizada a 15V, la adhesión también fue alta, las bacterias se vieron distribuidas en todo el campo de observación, pero con muy pocos conglomerados y más pequeños que en el titanio pulido.

En la superficie anodizada a 90V las bacterias se adhirieron menos, pero se observó un conglomerado de bacterias grande de  $\varnothing$  4 $\mu\text{m}$ . Estos agregados a menudo dan cuenta de la no uniformidad de la textura superficial.

### 5.II.1.2 Resultado del segundo ensayo piloto de adhesión de muestras con y sin Delrin®

En este ensayo se evaluó el efecto de la presencia del Delrin® sobre la adhesión de las bacterias al titanio.

#### Análisis comparativo de las imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia

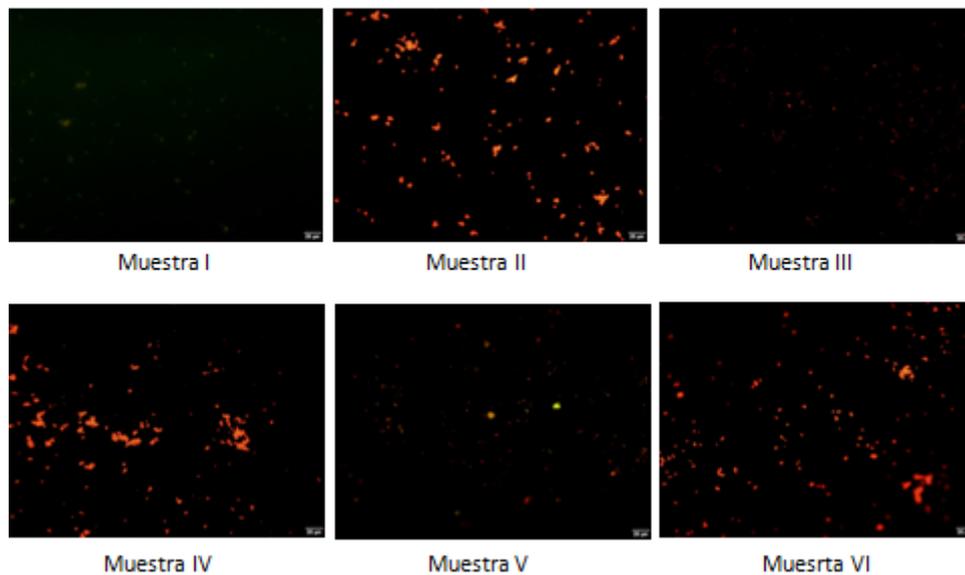


Fig.Nº 50. Muestras I, II, III y IV Ti pulido con formato de electrodo, muestras V y VI Ti pulido tornillo solo sin Delrin®.

En la Fig.Nº 50 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia. Pudo comprobarse que en las diferentes muestras no observamos que el Delrin® presente en el borde de la muestra estuviera favoreciendo la adhesión sobre el titanio. Se comprobó que la adhesión era similar, tanto en las muestras con Delrin® como en las que no lo tenían.

### 5.II.2 Resultados de los ensayos A, B y C de la adhesión de bacterias

### 5.II.2a Resultados del ensayo A de adhesión de bacterias utilizando microscopía de epifluorescencia

En este caso se comparó la adhesión de bacterias sobre electrodos anodizados a 10V, 20V, 60V y se lo comparó con la adhesión sobre el titanio pulido.

Las bacterias formaron cúmulos pequeños tanto en las muestras de Ti solamente pulidas como en las de Ti anodizado a 10V. Las anodizadas a 20V revelaron cúmulos más grandes y las anodizadas a 60V estaban dispersas, aisladas, sin formar cúmulos, tal como puede observarse en la Fig.Nº 51.

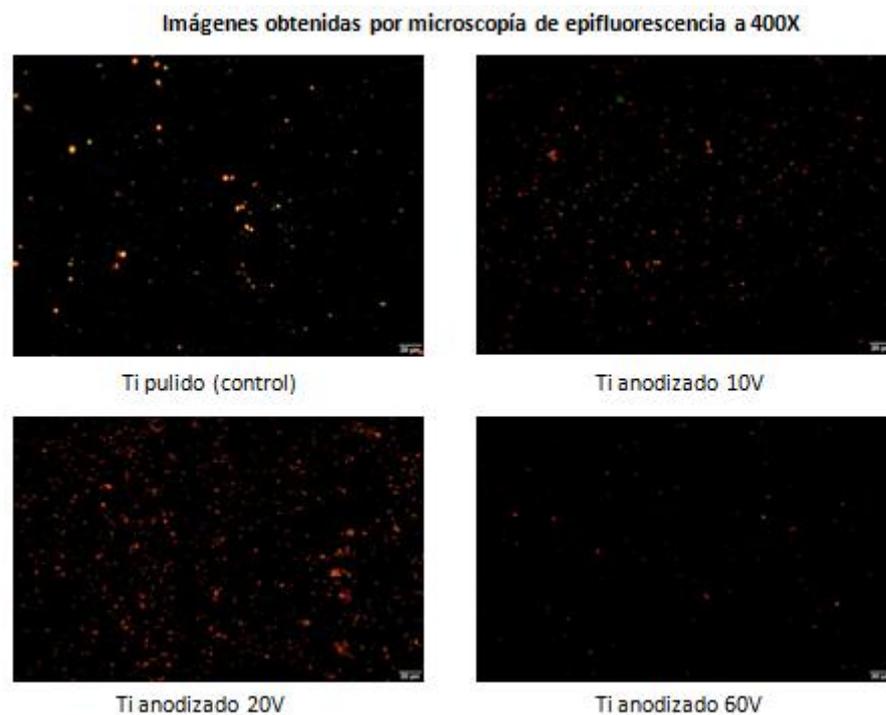


Fig.Nº 51. Imágenes de microscopía óptica por epifluorescencia a 400x, muestran la adhesión de las bacterias en las diferentes condiciones.

### 5.II.2b Resultados del ensayo B de adhesión de bacterias para microscopía de epifluorescencia

En este caso se repitió el ensayo anterior para la condición de titanio anodizado a 60V y se lo comparó con el control de titanio pulido y con la muestra con cobertura de politimol.

La observación al microscopio óptico a 400X mostró gran cantidad de bacterias agrupadas en cúmulos, sobre el titanio control pulido. En total acuerdo con las experiencias previas, para las condiciones de anodizado a 60V se observó menos cantidad de bacterias adheridas sobre la superficie y aisladas entre sí, sugiriendo que la topografía de la superficie del titanio anodizado favorecería el aislamiento de las bacterias. La condición 60V+poliTOH también mostró muy poca adhesión de bacterias sobre la superficie, estando más aisladas que las correspondientes a las muestras de 60V (Fig.Nº 52).

*Análisis comparativo de las imágenes obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia a 400X*

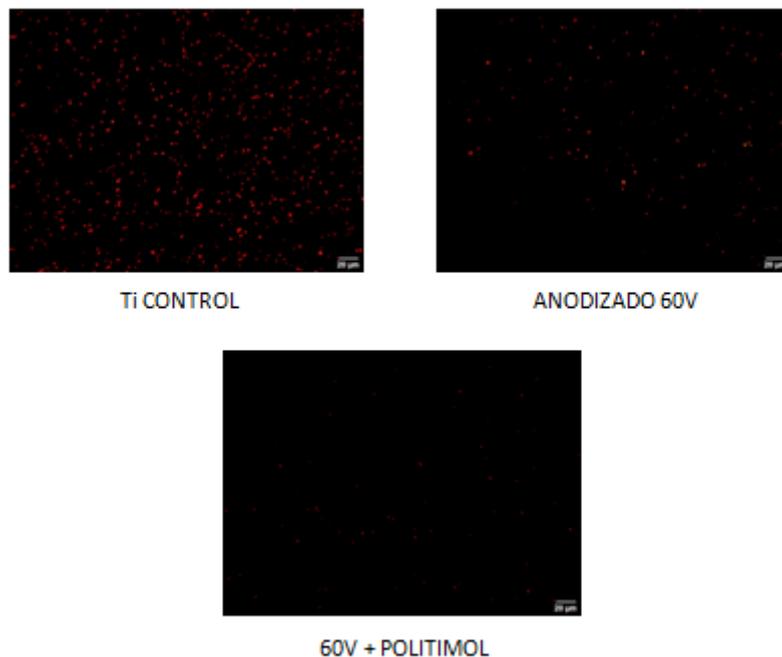


Fig.Nº 52. Imágenes de microscopía óptica por epifluorescencia a 400X, muestran la adhesión de las bacterias en las diferentes condiciones: Ti control pulido, anodizado a 60V y anodizado a 60V+ cobertura de politimol.

La Fig.Nº 52 permitió constatar que en presencia de la cobertura de politimol formada sobre la superficie de titanio anodizada a 60V la adherencia bacteriana decrecía.

La disposición de las bacterias sobre las superficies en las diferentes condiciones, nos motivaron a realizar un nuevo ensayo de adhesión de bacterias (ensayo C), con el propósito de observarlas por SEM a mayor magnificación, utilizando la técnica de punto crítico para preservar la estructura de las bacterias adheridas, la cual nos permitió ver los microorganismos con su forma conservada así como la manera en que se disponían sobre las superficies en las diferentes condiciones.

### **5.II.2c Resultados del ensayo C de evaluación de la distribución de bacterias adheridas utilizando SEM**

Este ensayo permitió observar con mayor magnificación la distribución y disposición de las bacterias sobre las superficies.

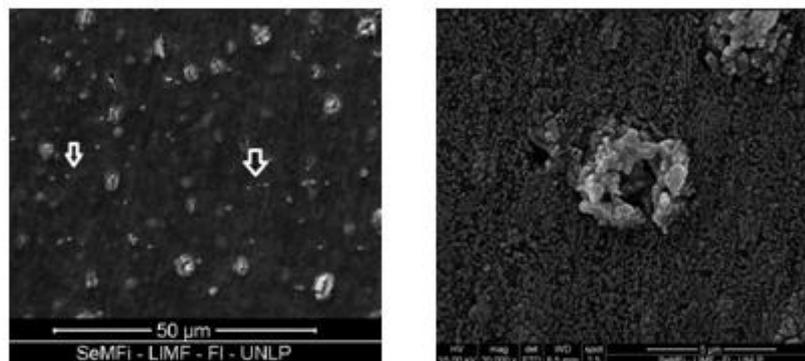


Fig.Nº 53. Microfotografía de titanio anodizado a 60V . Las flechas indican la presencia de bacterias (izq.). Detalle de una ampolla a la derecha

En la Fig.Nº 53. Microfotografía de Ti anodizado a 60V, a la izquierda se observan pocas bacterias adheridas (flechas). A la derecha detalle a 50.000X mostrando una ampolla abierta y ausencia de bacterias.

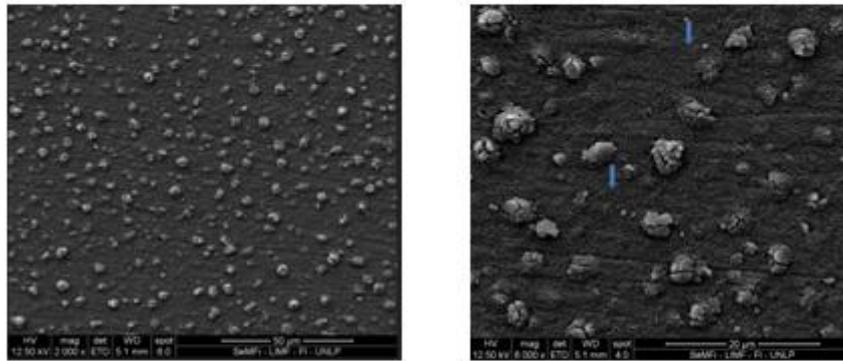


Fig.Nº 54. Microfotografía de Ti anodizado a 60V y cubierto por una película de politimol (izq.), detalle (der.). Se observan muy pocas bacterias adheridas (flechas)

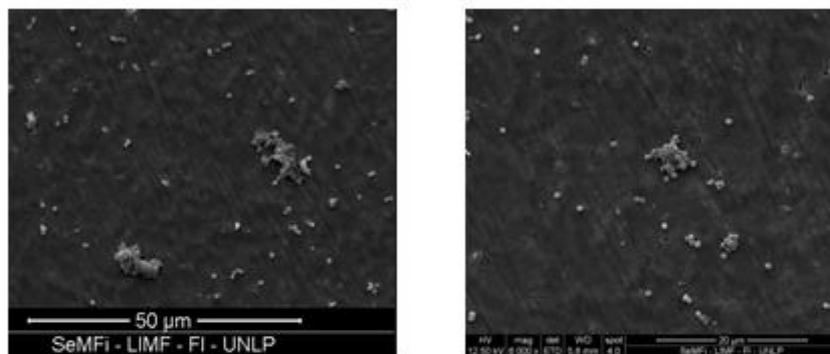


Fig.Nº 55. Distintas zonas de una muestra de Ti anodizado a 20V mostrando la estructura 3D de las colonias.

En la Fig.Nº 53 y Fig.Nº 54 se puede observar que la adhesión de bacterias a las superficies anodizadas con y sin politimol es baja y con bacterias aisladas. En el caso de la Fig.Nº 55 se observa que en la superficie anodizada a 20V las bacterias pueden adherirse con mayor facilidad y generar colonias 3D.

Las muestras de Ti pulido y Ti anodizado a 10V no pudieron observarse por SEM porque se dañaron en el proceso de metalizado previo, realizado en el laboratorio que provee el servicio SEM.

### **5.II.3 Análisis estadístico de los datos correspondientes a las experiencias de adhesión de bacterias A y B**

Como se explicó más arriba se tomaron 20 fotografías (campos de observación) con la cámara del microscopio óptico, por cada electrodo, para todas las condiciones estudiadas. De esta manera utilizando la función de cálculo de porcentaje de superficie cubierta del software ImagePro 6.2 se obtuvo el valor para cada campo de observación. Estos datos son presentados por el programa en una planilla Excel y posteriormente fueron volcados en una tabla encolumnados según la condición ensayada. A los datos de cada columna se le calculó la media aritmética y el desvío estandar.

Para poder expresar gráficamente el resultado de los datos de cada condición con respecto al Ti control pulido (% respecto del control) se relativizaron los datos de la siguiente forma, cada dato fue dividido por la media aritmética de los datos de Ti control pulido correspondiente a cada condición experimental y luego multiplicado por cien para obtener el porcentaje. Los resultados se muestran en la Fig.Nº 56.

Finalmente con los datos de las dos experiencias se realizó un análisis de varianza (ANOVA de una vía) y posteriormente un test de comparaciones múltiples de Bonferroni, utilizando el software Graphpad prism 5.

## Resultados de la experiencia A

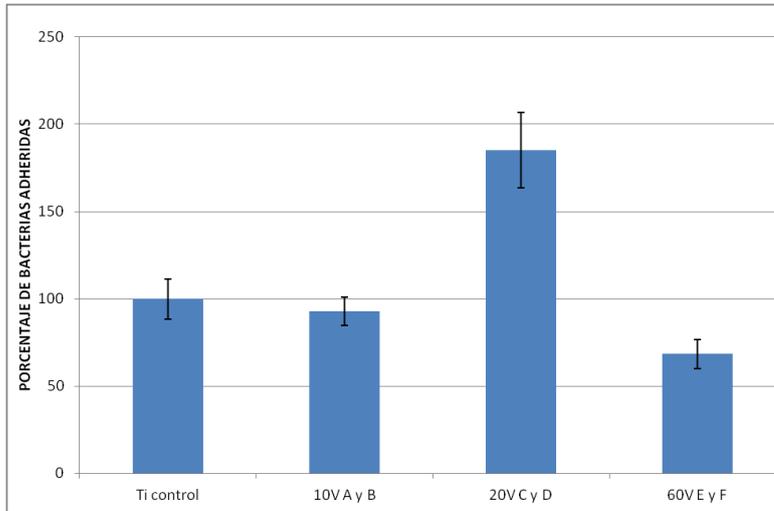


Fig.Nº 56. Gráfico comparativo de la adhesión bacteriana (% respecto del control de adhesión sobre titanio pulido) en las diferentes condiciones en valores relativos (A, B, C, D, E, F son las letras con que se designaron las muestras). El eje de ordenadas corresponde a % de bacterias adheridas respecto al Control.

## Resultados experiencia B

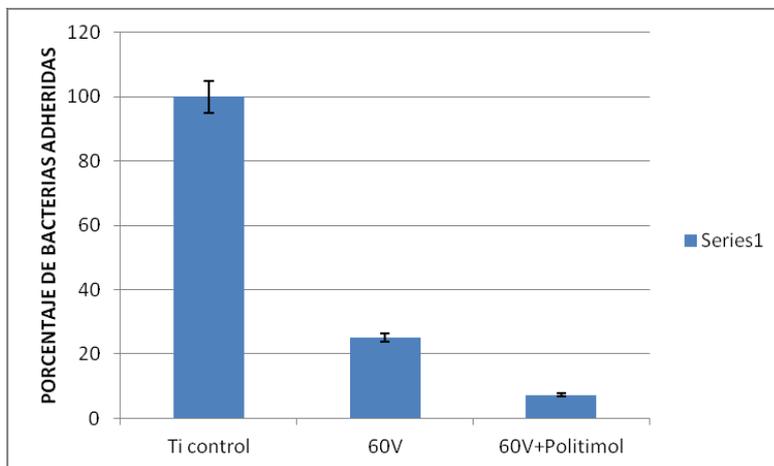


Fig.Nº 57. Gráfico comparativo de la adhesión bacteriana (% respecto del control de adhesión sobre titanio pulido) en las diferentes condiciones (anodizado a 60V y anodizado a 60V y luego cubierto por politimol) en valores relativos al control de titanio. El eje de ordenadas corresponde a % de bacterias adheridas respecto al Control de titanio pulido.

## Resultados de adhesión de bacterias en valores relativos Experiencias A y B

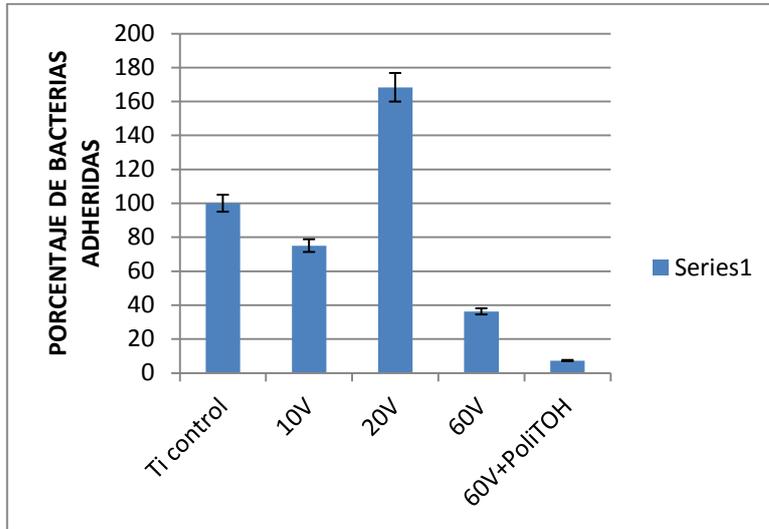


Fig.Nº 58. Gráfico comparativo de la adhesión de las bacterias en las diferentes condiciones ensayadas en las experiencias A y B en forma conjunta en valores relativos. El eje de ordenadas corresponde a % de bacterias adheridas respecto al Control de titanio pulido.

La Fig.Nº 58 y la Tabla Nº 9 nos muestran que las bacterias se adhirieron en la condición 60V un 36,28% y en la condición 60V+PoliTOH un 7,30% del valor del control de titanio pulido con una importante disminución respecto a dicha condición.

### 5.II.4 Test de comparaciones múltiples de Bonferroni para los datos de las experiencias A y B

En la tabla Nº 9 se muestran los resultados del test de comparaciones múltiples de Bonferroni para los datos de las experiencias A y B. En la primera columna de dicha tabla se indican las comparaciones realizadas y en la tercera y cuarta fila la significancia de las diferencias. Así por ejemplo el titanio control pulido se compara con el titanio anodizado a 10V y se indica que la diferencia entre los valores de adhesión de bacterias no es significativa. Por otra parte la comparación de titanio

control pulido con la muestra anodizada a 60V indica una diferencia significativa con un grado de significación de \*\*\*\*  $p < 0,001$ .

Number of families	1		
Number of comparisons per family	10		
Alpha	0,001		
Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff.	Significant?	Summary
Ti control vs. 10V	24,96	No	ns
Ti control vs. 20V	-68,33	Yes	****
Ti control vs. 60V	63,71	Yes	****
Ti control vs. 60V+ poliTOH	92,7	Yes	****
10V vs. 20V	-93,29	Yes	****
10V vs. 60V	38,75	No	ns
10V vs. 60V+ poliTOH	67,74	No	**
20V vs. 60V	132	Yes	****
20V vs. 60V + poliTOH	161	Yes	****
60V vs. 60V + poliTOH	28,99	No	ns

Tabla N° 9 con resultados del test de Bonferroni utilizando Graphpad prism 5.

\*\*\*\* indica un grado de significación  $p < 0.001$  y \*\*  $p < 0.05$  para diferencias entre las condiciones indicadas.

El análisis estadístico muestra que no existe significación en la diferencia de adhesión entre el titanio control y las muestras anodizadas a 10V (Ti10V). Sin embargo, son significativas las correspondientes a la condición de 20V (mayor que el control), 60V y 60V + poliTOH (menor que el control). Cuando se comparan las

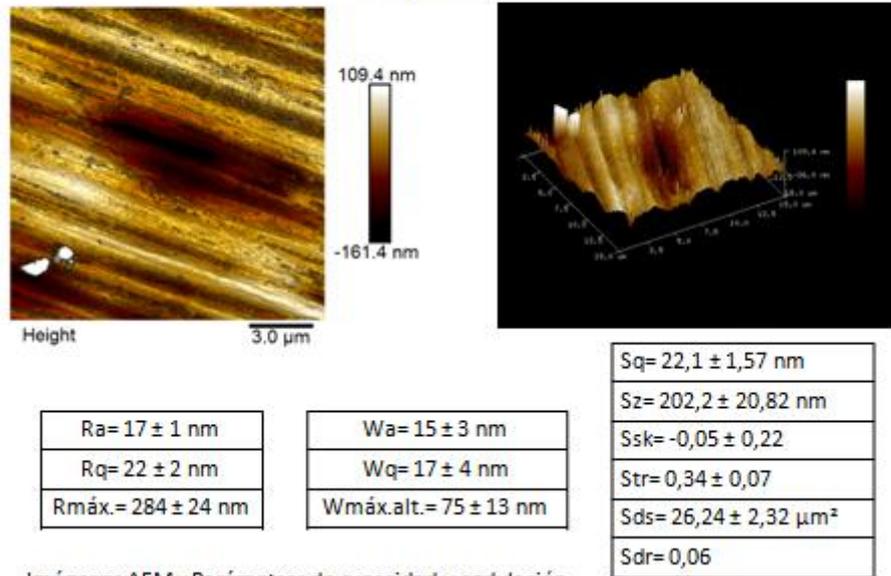
distintas condiciones de polarización puede verse que en los casos de la comparación de condición 20V con respecto a la de 60V, de 10V con respecto a 20V y de 20V con respecto a la condición 60V + poliTOH la diferencia es significativa con un grado de  $p < 0.001$ . Por otra parte, para 10V vs 60V + poliTOH es significativa pero con un grado de significación menor. Consecuentemente las condiciones 60V y 60V + poliTOH son las de menor adhesión bacteriana y por lo tanto más apropiadas para su utilización para implantes, mientras que la de 20V presenta condiciones significativamente más desfavorables respecto a la colonización bacteriana. Si bien la Fig.Nº 58 muestra un menor porcentaje de la superficie cubierta por bacterias sobre la condición de titanio anodizado a 60V + poliTOH respecto a la anodizada a 60V sin dicha película (7,30% vs. 34,28%) la diferencia no resulta ser significativa.

### **Sección III. Resultados del análisis de rugosidad utilizando AFM y su relación con la adhesión bacteriana**

#### **5.III.1 Observaciones por AFM y parámetros de rugosidad**

Las Figs.Nº 59, 60, 61 y 62 muestran las imágenes por AFM de Ti pulido, Ti anodizado a 10V, Ti anodizado a 20V, Ti anodizado a 60V y en la parte inferior de las mismas se muestran las tablas con los correspondientes parámetros ( $R_a$ ,  $R_q$ ,  $R_{máx.}$ ,  $W_a$ ,  $W_q$ ,  $W_{máx.alt.}$ ,  $S_q$ ,  $S_z$ ,  $S_{sk}$ ,  $S_{tr}$ ,  $S_{ds}$  y  $S_{dr}$ ) que caracterizan la rugosidad.

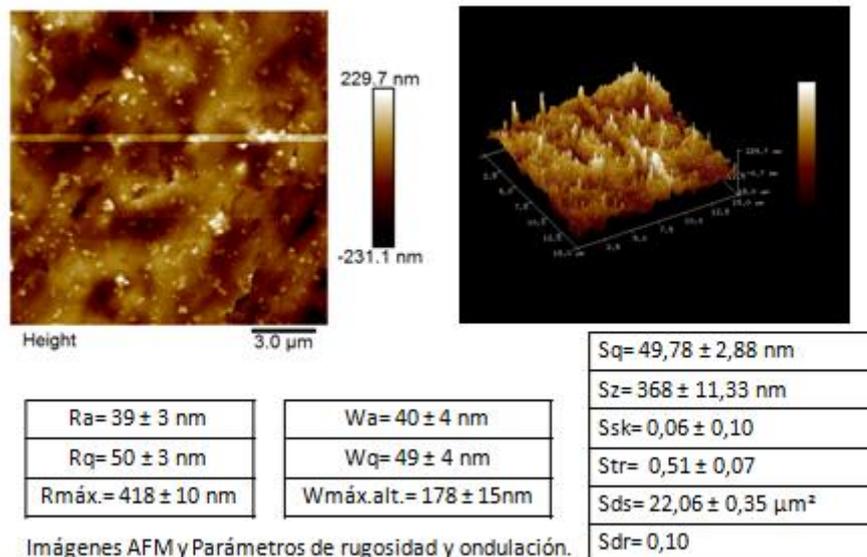
## Ti pulido



Imágenes AFM y Parámetros de rugosidad y ondulación.

Fig.Nº 59. Imagen de AFM y tablas con los valores de los parámetros calculados.

## Ti anodizado a 10V



Imágenes AFM y Parámetros de rugosidad y ondulación.

Fig.Nº 60. Imagen de AFM y tablas con los valores de los parámetros calculados.

## Ti anodizado a 20V

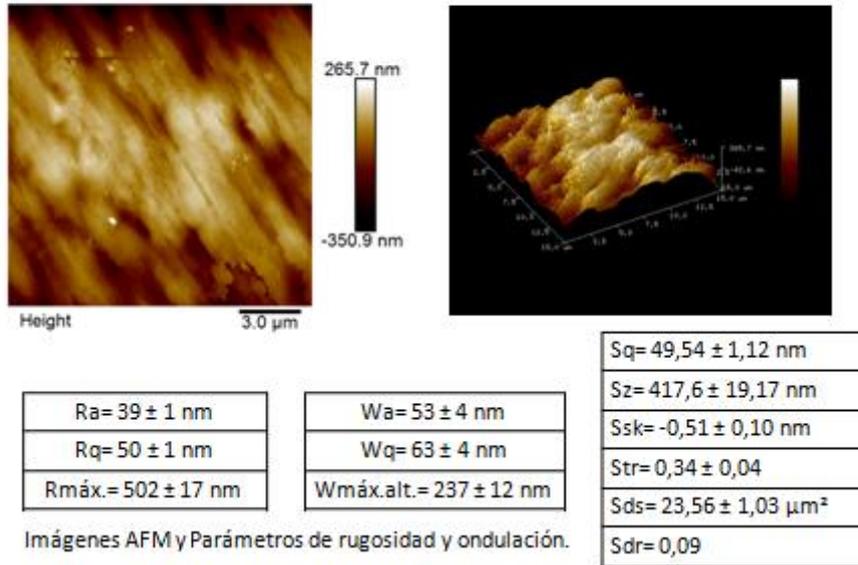


Fig.Nº 61. Imagen de AFM y tablas con los valores de los parámetros calculados.

## Ti anodizado a 60V

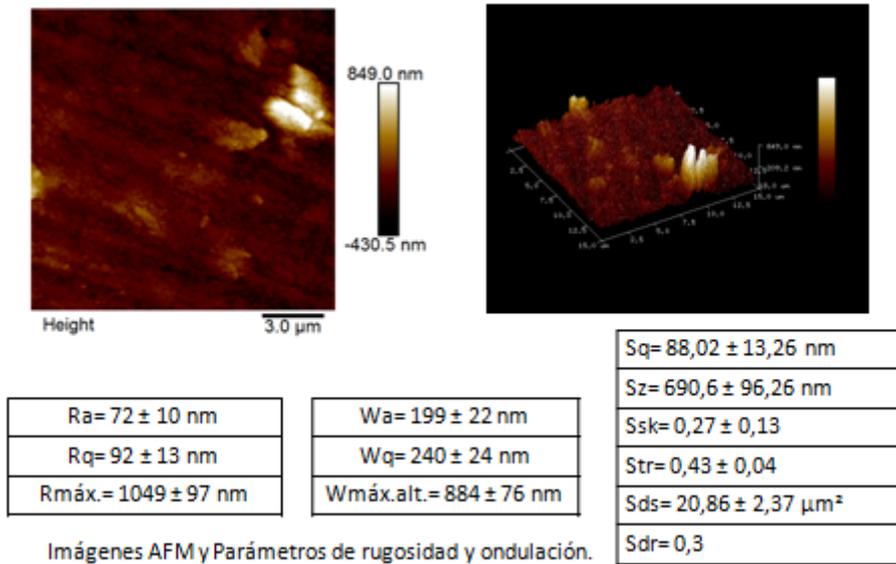


Fig.Nº 62. Imagen de AFM y tabla con los valores de los parámetros calculados.

### 5.III.2. Comparación de los valores de los parámetros de rugosidad obtenidos

En las tablas N° 10, 11 y 12 se comparan los valores de los parámetros Ra, Rq, Rmáx., Wa, Wq, Wmáx.alt., Sa, Sq, Sz, Ssk, Str, Sds y Sdr obtenidos en las distintas condiciones.

#### a) Parámetros R (Ra, Rq, Rmax)

Parámetro	Ti pulido	10V	20V	60V
Ra	17 ± 1 nm	39 ± 3 nm	39 ± 1 nm	72 ± 10 nm
Rq	22 ± 2 nm	50 ± 3 nm	50 ± 1 nm	92 ± 13 nm
<b>Rmax</b>	284 ± 24 nm	418 ± 10 nm	502 ± 17 nm	1049 ± 97 nm

Tabla N° 10. Parámetros del perfil de rugosidad (R) para superficies obtenidas aplicando distintos potenciales.

#### b) Parámetros W (Wa, Wq, Wmax)

Parámetro	Ti pulido	10V	20v	60V
Wa	15 ± 3 nm	40 ± 4 nm	53 ± 4 nm	199 ± 22 nm
W <sub>q</sub>	17 ± 4 nm	49 ± 4 nm	63 ± 4 nm	240 ± 24 nm
W máx. altura	75 ± 13 nm	178 ± 15 nm	237 ± 12 nm	884 ± 76 nm

Tabla N° 11. Parámetros de ondulación (waviness) para superficies obtenidas aplicando distintos potenciales.

**c) Parámetros de superficie S (Sa, Sq, Sz, Ssk, Str, Sds, Sdr)**

Parámetro	Ti pulido	10V	20V	60V
Sa	16,6 ±1.0	38,8±2,4	39,9±1.0	67,5±9,1
Sq	22,1±1,57nm	49,78±2,88nm	49,54±1,12nm	88,02±13,26nm
Sz	202,2±20,82nm	368±11,33nm	417,6±19,17nm	690,6±96,26nm
Ssk	-0,05±0,22	0,06±0,10	-0,51±0,10	0,27±0,13
Str	0,34±0,07	0,51±0,07	0,34±0,04	0,43±0,04
Sds	26,24±2,32μm <sup>2</sup>	22,06±0,35μm <sup>2</sup>	23,56±1,03μm <sup>2</sup>	20,86±2,37μm <sup>2</sup>
Sdr	0,06	0,10	0,09	0,3

Tabla N° 12. Parámetros de rugosidad superficial S para superficies obtenidas aplicando distintos potenciales.

Puede observarse que en la mayoría de los casos de todos los parámetros R, W y S los valores decrecen en el sentido 60V > 20V > 10V > Ti pulido excepto por Ssk y Sdr.

**5.III.3 Comparación del porcentaje de bacterias adheridas en las distintas condiciones de anodizado**

Como puede verse en la Fig.N° 63 los porcentajes de bacterias adheridas no crecen monótonamente con el potencial aplicado, es así como de acuerdo a la figura el porcentaje correspondiente al Ti pulido > Ti anodizado a 10V > Ti anodizado a 60V pero el Ti pulido < Ti anodizado a 20V.

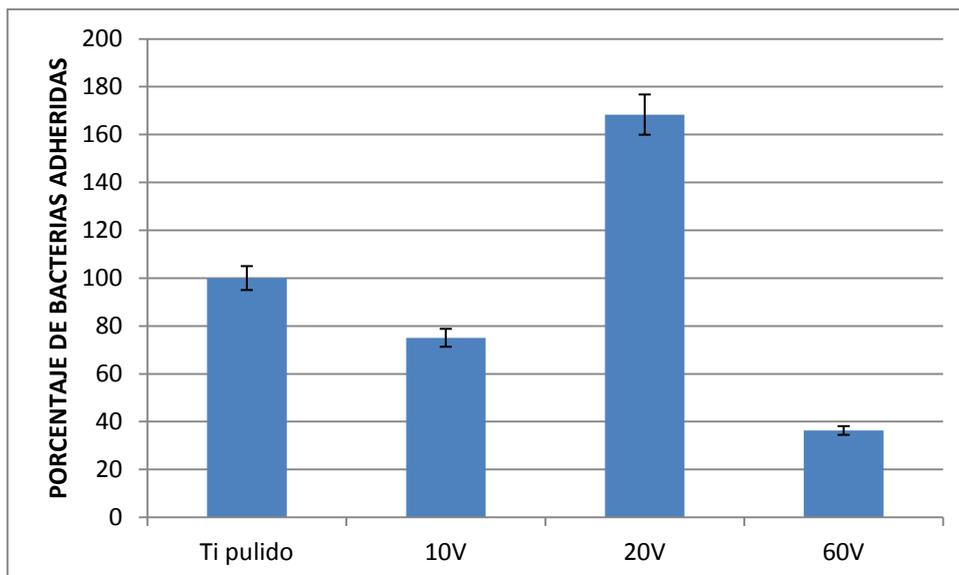


Fig.N° 63. Porcentajes de bacterias adheridas sobre superficies obtenidas aplicando distintos potenciales respecto al control de Ti pulido.

	Ti pulido	10V	20V	60V
1-Ssk	1,05±0,22	0,94±0,10	1,51±0,10	0,73±0,13
1-Str	0,66±0,07	0,49±0,07	0,66±0,04	0,57±0,04
Sds	26,24±2,32µm <sup>2</sup>	22,06±0,35µm <sup>2</sup>	23,56±1,03µm <sup>2</sup>	20,86±2,37µm <sup>2</sup>
Sdr	0,06	0,10	0,09	0,3
% de área cubierta por bacterias	99,9 ± 8,7%	77,9 ± 13,5%	178,3 ± 15,1%	36,9 ± 3,7%

Tabla N° 13. Comparación de los parámetros de rugosidad superficial de 1- Ssk, 1- Str, Sds y Sdr con el porcentaje de bacterias adheridas para superficies obtenidas aplicando distintos potenciales (Fig. N°63).

Las Tablas N° 10, N° 11 y N° 12 muestran los valores de los parámetros relacionados con la rugosidad ( $R_a$ ,  $R_q$ ,  $R_{max}$ ; extendidos en  $S_a$ ,  $S_q$ ,  $S_{max}$ ) y los de ondulación ( $W_a$ ,  $W_q$ ,  $W_{max}$ ) y se puede observar que presentan una variación que mayoritariamente crece con el potencial aplicado y no sigue la variación de la colonización bacteriana para cada condición. Así por ejemplo los valores de  $S_a$  son similares para 20V y 60V y sin embargo la adhesión bacteriana presenta valores máximos y mínimos respectivamente para dichas superficies. Por el contrario, la oblicuidad (1-Ssk), anisotropía (1-Str), densidad de cumbres (Sds) y área desarrollada (Sdr), si bien no muestran diferencias significativas al comparar los distintos potenciales, puede observarse que varían de forma similar que el número de bacterias, siendo menores los correspondientes a la condición 60V y mayores los correspondientes a 20V (Tabla N° 13). Es decir, las bacterias tenderían a adherir sobre superficies más extendidas y anisotrópicas que presenten mesetas en la parte superior. Entre los parámetros mencionados el que mejor se relaciona es 1-Ssk ya que su valores máximo y mínimo coinciden con los máximos y mínimos para la adhesión bacteriana tal como puede verse en las Figs.N° 63 y N° 64.

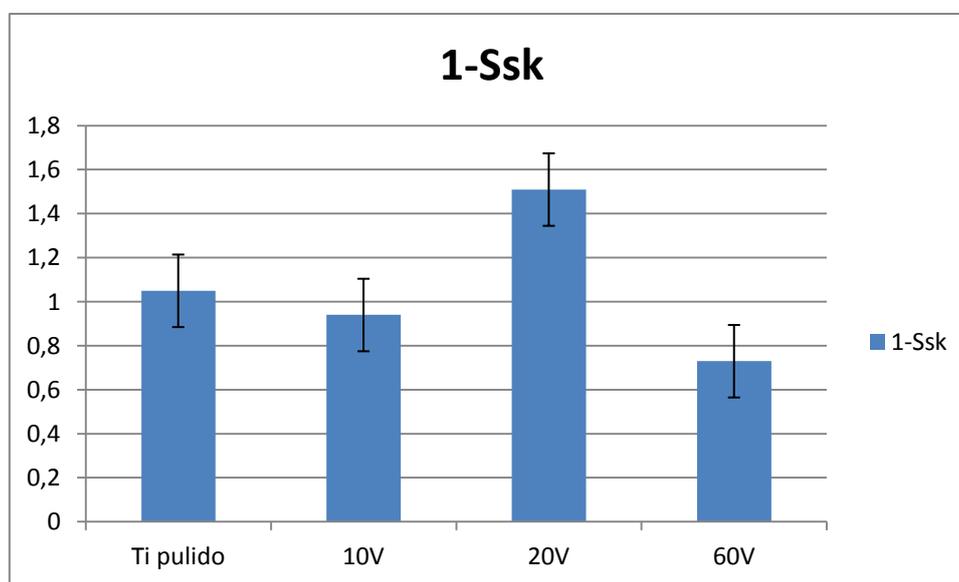


Fig. N° 64. Variación del parámetro de rugosidad para superficies obtenidas aplicando distintos potenciales.

Podemos notar al comparar los dos gráficos (Figs.Nº 63 y 64) que al disminuir el valor del parámetro 1- Ssk, como ocurre en las condiciones 10V y 60V, disminuye el porcentaje de área cubierta por bacterias, mientras que en la condición 20V al aumentar el valor del parámetro 1- Ssk aumenta el porcentaje de área cubierta por bacterias, y las variaciones en los gráficos son similares. Esto nos está indicando que existiría una estrecha relación entre la oblicuidad de los picos y la adhesión de las bacterias. Algo similar ocurre cuando observamos la variación con el potencial de 1- Str, Sds y Sdr si la comparamos con la observada en la Fig.Nº 63.

En un futuro próximo se espera poder repetir los ensayos y obtener, al aumentar el número de muestras, una correlación entre dichos parámetros y la adhesión bacteriana.

# **Capítulo 6. Discusión**

## Capítulo 6

### DISCUSIÓN

En los últimos años diversos grupos de estudio se dedicaron a la investigación de las fallas en la oseointegración de los implantes dentales de titanio por causa de las infecciones bacterianas.(140–143) Se ha observado que las mismas pueden ocurrir por contaminación durante la técnica de colocación quirúrgico-implantológica, en la fase de exposición del implante al medio bucal durante la colocación de los tornillos cicatrizales y durante su desempeño funcional como soporte protético generando mucositis y peri-implantitis.(100) Para encontrar soluciones a estas problemáticas, diferentes investigadores han trabajado en el desarrollo de estrategias que permitan inhibir o disminuir la adhesión inicial de los microorganismos retrasando el proceso de formación del biofilm y dando oportunidad a la acción de los agentes antimicrobianos y al sistema inmune del paciente portador del implante dental.(144–146) Una de estas estrategias es la modificación de las propiedades de la superficie del titanio, como por ejemplo la modificación de la química superficial mediante un proceso electroquímico de anodizado. La utilización de un electrolito que en su composición contenga flúor, de conocidas propiedades antimicrobianas, en dicho proceso de anodización podría ser una estrategia prometedora. Al respecto, las investigaciones realizadas por Arenas y colaboradores(147) se han enfocado sobre una situación similar pero aplicada a los implantes de titanio para uso ortopédico. En el presente trabajo se ha utilizado un protocolo de anodizado basado en el reportado por dichos autores, pero con las modificaciones apropiadas de forma de poder aplicarlo a los tornillos de cierre. Además también se probó una condición en la que se recubrió con timol mediante un proceso de electropolimerización sobre la superficie de titanio previamente anodizada a 60V que condujo a la formación de una película electropolimerizada. Se investigó en ese caso si dicha cobertura sería capaz de inhibir la adhesión de las bacterias. Con ese fin se tomó como base un trabajo similar realizado por Bertuola y colaboradores sobre una superficie de cobre.(123)

Los resultados de la exposición de las muestras anodizadas a los cultivos bacterianos permitieron comprobar que, tal como se describe en la bibliografía, la interacción entre una superficie y una célula bacteriana estaría mediada por un arreglo complejo

de interacciones físicas y químicas, y cada una de ellas se encontraría afectada por las características del ambiente al cual están expuestos, tanto el sustrato de titanio como las bacterias.(83) En particular, en el presente trabajo, dentro de los factores que podrían afectar la adhesión bacteriana se analizaron la tensión superficial, la composición de la superficie (presencia de agentes antimicrobianos) y la topografía superficial.

Considerando que la energía superficial podría condicionar la adhesión bacteriana, ya que su influencia sobre la misma aún se encuentra en discusión en la bibliografía, se realizaron medidas de tensión superficial. El análisis comparativo de la variación de la hidrofiliidad para las distintas condiciones ensayadas, con respecto al porcentaje de superficie cubierta por bacterias adheridas, permitió comprobar que no existe una relación directa entre la hidrofiliidad y la adhesión bacteriana para las situaciones evaluadas. Pudo comprobarse que superficies con similares energías superficiales presentaban distinto grado de adhesión microbiana. Así por ejemplo, la condición de titanio anodizado a 20V con valor de ángulo de contacto de 38,4° fue la superficie en la que más se adhirieron las bacterias mientras que la condición de titanio anodizado a 60V + poliTOH con un valor de ángulo de contacto muy similar de 37,9° fue la superficie con mucho menor adhesión de microorganismos. Nuestros resultados guardan similitud con un trabajo de Díaz y colaboradores que investigaron la organización de *Pseudomonas fluorescens* sobre superficies nano/microestructuradas químicamente diferentes y que concluyeron que la estructura de los agregados de las bacterias estudiadas dependía fuertemente de la topografía de la superficie, mientras que no encontraron un vínculo claro con las propiedades físico-químicas (carga y ángulo de contacto) de la superficie.(74) Los resultados obtenidos en el presente trabajo pueden explicarse considerando que, tal como se mencionó previamente, la adhesión bacteriana es un fenómeno complejo donde intervienen múltiples factores entre ellos las propiedades físico-químicas de la superficie del sustrato, de la superficie del microorganismo, y del medio, todos interrelacionados e incluso algunos enmascarando a otros.(67)

Con respecto al efecto de la composición superficial sobre la colonización microbiana, particularmente de la presencia del flúor en la composición del óxido formado por anodizado, el análisis del Espectro de Dispersión por Rayos X (EDX)

confirmó la presencia del elemento flúor en la superficie de las muestras anodizadas. Las mismas presentaron valores similares de porcentaje atómico en las distintas condiciones, a 10V (5,87%); a 20V (5,51%); a 60V (4,41%). Sin embargo, la presencia de este elemento no garantizó la disminución de la adhesión bacteriana para todas las condiciones analizadas cuyo contenido de flúor era similar respecto al control sin tratar (0%). Por este motivo pudo concluirse que no existía una estrecha relación entre ambos parámetros de análisis (presencia de flúor vs adhesión bacteriana). Esto difiere de la interpretación de los resultados que realizaron Arenas y colaboradores que atribuyeron una significancia estadística en la disminución de la superficie cubierta por las bacterias sobre las superficies tratadas con flúor, y la relacionaron con la presencia de flúor en la capa de óxido formada anódicamente sobre el titanio, sin analizar en detalle el efecto de la rugosidad.

Los múltiples factores involucrados en la adhesión celular reversible e irreversible dificultan la caracterización del rol y la importancia que tiene cada factor individual en el proceso de adhesión, algunos de ellos no detectables por técnicas de análisis de rutina. Así por ejemplo, en los ensayos de anodizado con tornillos de la misma marca comercial pero de partidas de fabricación de distintas fechas, fue interesante constatar que los mismos mostraron resultados distintos con respecto al color y al brillo dependiendo de la partida. Esto permitió comprobar que las distintas partidas pueden presentar pequeñas modificaciones en las impurezas y/o en la microestructura metálica, no detectables a través de microscopías SEM o análisis EDX, pero que alteran significativamente los resultados obtenidos luego de la anodización. Al respecto, se ha reportado que los cambios microestructurales producen fragmentaciones del grano, movimiento de átomos y distorsión en la malla.(139)

Se sabe que la topografía superficial ocupa un lugar preponderante entre las características del sustrato que condicionan notoriamente la adhesión bacteriana. (74) Con el fin de obtener superficies con diferentes texturas superficiales, los protocolos diseñados para su aplicación en el presente trabajo, incluyeron distintos potenciales de anodización que condujeron a distintas texturas superficiales. Así por ejemplo, cuando se analizaron las superficies anodizadas por microscopía electrónica de

barrido (SEM), se pudo observar que en el caso de las anodizadas al potencial de 10V la superficie fue uniforme con elevaciones y depresiones que parecían seguir las líneas de pulido; con el potencial de 20V el patrón fue más heterogéneo, las elevaciones y depresiones fueron más espaciadas y además se observó la presencia de hoyos de menos de  $\text{Ø}=1\mu\text{m}$ . A partir del potencial 35V aparecieron en la superficie algunas elevaciones similares a ampollas de aproximadamente  $\text{Ø} 1,25 \mu\text{m}$ , muy separadas entre sí; con el potencial de 60V la superficie se vio completamente diferente: predominaron las elevaciones similares a ampollas distribuidas uniformemente en toda la superficie con un  $\text{Ø}$  entre 2 y 4  $\mu\text{m}$ . Cuando fueron observadas en detalle a 50.000X parecía, por su aspecto, que las ampollas hubieran explotado.

Una vez obtenidas las distintas topografías superficiales mediante el proceso de anodizado, las diferentes superficies fueron expuestas a los cultivos bacterianos y observadas por microscopía de epifluorescencia, mostrando comportamientos que diferían de acuerdo al potencial aplicado. Así por ejemplo, en el caso del Ti pulido y el anodizado a 10V se observó que las bacterias formaron cúmulos pequeños. Las anodizadas a 20V revelaron agregados más grandes y las anodizadas a 60V estaban dispersas, aisladas, sin formar cúmulos, sugiriendo que, bajo estas condiciones, si bien no había significativas diferencias en la composición superficial, sí existían en la topografía de la superficie obtenida a dicho potencial que generaba esta disposición de aislamiento. Estos resultados permitieron comprobar que existía una importante relación entre la topografía superficial asociada a un determinado potencial y la colonización bacteriana cuando se pudo comprobar que las dimensiones características del relieve son similares a las de las bacterias en diámetro/longitud (aprox. 1  $\mu\text{m}$ ), la adhesión se ve dificultada.

Con el objetivo de evaluar la posibilidad de disminuir aún más la colonización bacteriana se realizaron ensayos en los cuales, mediante la electropolimerización del timol, se formó una cobertura polimérica. Cabe recordar que el timol es un compuesto fenólico de propiedades antimicrobianas que logra electropolimerizarse sobre ciertas superficies metálicas (Bertuola et al, 2017). Mediante dicho proceso se formó una capa adherida sobre la superficie de titanio anodizado a 60V (60V+poliTOH) y se encontró que la adhesión disminuía hasta  $7,3\pm 0,8\%$  bajo estas

condiciones. Las bacterias adheridas eran pocas y más aisladas que en las muestras anodizadas a 60V pero sin la cobertura polimérica.

Al realizarse el estudio comparativo de la superficie cubierta por bacterias sobre las distintas superficies a través de microscopía de epifluorescencia pudo constatar que: en la condición anodizado a 10V se llegó a 75,03% de la superficie correspondiente al control (Ti pulido); en la condición 20V fue 168,32%, es decir, mayor que el valor del control de Ti pulido; en la condición 60V fue de 36,28% (valor mínimo para superficies anodizadas) y en la condición 60V + poliTOH fue de 7,30% con respecto al titanio pulido (menor que la superficie anodizada a 60V que no tiene la capa polimérica). El análisis estadístico a través del test de comparaciones múltiples de Bonferroni permitió concluir que las diferencias eran estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ) para las condiciones 60V y 60V + poliTOH con respecto al control del titanio pulido. Estos resultados concuerdan con lo reportado en literatura donde se informa que texturas diferentes pero de dimensiones características similares han mostrado también la reducción de la adhesión bacteriana.(74,133,148)

Teniendo en cuenta la influencia significativa de la topografía superficial sobre la adhesión microbiana se procedió a evaluar los distintos factores que caracterizan a la rugosidad y textura superficial. Primeramente se estudiaron distintos parámetros que describen la rugosidad tanto respecto a sus alturas en un plano determinado ( $R_a$ ,  $R_q$ ,  $R_{max}$ ) y otros asociados a la estructura 3D de la textura (ondulación o *waveness*:  $W_a$ ,  $W_q$ ,  $W_{max}$  y  $S_{dr}$ ,  $S_a$ ,  $S_z$ ,  $S_{sr}$ ,  $S_{tr}$ ,  $S_{sk}$ ,  $S_q$ ,  $S_{ds}$ ). Luego de un análisis detallado de las relaciones entre el porcentaje de superficie cubierta por bacterias adheridas y dichos parámetros pudo constatar que parámetros de uso frecuente para describir la rugosidad tales como  $S_a$ , presentaban valores que crecían con el potencial, a diferencia del número de bacterias adheridas que no presentaba la misma tendencia, ya que mostraba un máximo en potenciales intermedios (20V) y luego disminuía. Asimismo, se observaron valores máximos para  $R_a$  de 60V, donde la adhesión bacteriana fue mínima. Por otra parte, pudo comprobarse que la oblicuidad ( $1-S_{sk}$ ), anisotropía ( $1-S_{tr}$ ), densidad de cumbres ( $S_{ds}$ ) y área desarrollada ( $S_{dr}$ ), si bien tampoco presentaban diferencias significativas al comparar los valores obtenidos

para los distintos potenciales, siguieron un comportamiento similar al de la adhesión bacteriana. Se notó además que los valores medios obtenidos variaban con el potencial de una forma similar a lo observado en el caso del número de bacterias adheridas, siendo menores los correspondientes a la condición 60V y mayores los correspondientes a 20V. Es decir, la adhesión bacteriana parecía manifestar una preferencia hacia superficies más extendidas y anisotrópicas que presentan mesetas en la parte superior. Entre los parámetros mencionados el que mejor se relaciona es  $1-Ssk$  ya que sus valores máximo y mínimo coinciden con los máximos y mínimos para la adhesión bacteriana. El parámetro  $Ssk$  representa un valor positivo o negativo según sean las características de la topografía. Los valores de  $Ssk$  son negativos ( $1-Ssk$  mayor que 1) cuando en la superficie los picos son amesetados y los valles con fondo agudo, mientras que los valores positivos ( $1-Ssk$  menor que 1) son cuando los picos son agudos y los fondos de los valles son amesetados.(149) La textura con los picos amesetados (Fig.Nº 65, superior) sería, de acuerdo a los resultados del presente trabajo, una condición más favorable para la adhesión bacteriana que la de los valles amesetados. El confinamiento en los valles probablemente dificulta la reproducción bacteriana por el mayor aislamiento y la dificultad de percepción de señales químicas que condicionan el comportamiento colectivo (“quórum sensing”). Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por Truong y colaboradores en un trabajo donde investigaron la influencia de la rugosidad superficial a nanoescala del titanio comercialmente puro grado II sobre la adhesión de diferentes bacterias. Entre ellas se ensayó con cultivos de *Staphylococcus aureus*, y utilizando parámetros de  $Rsk$  y  $Rk$  para caracterizar la topografía superficial, se mostró que la relación entre los valores de  $Rsk$  y la adhesión de las bacterias tiene una tendencia similar a la encontrada en la presente investigación.(150)

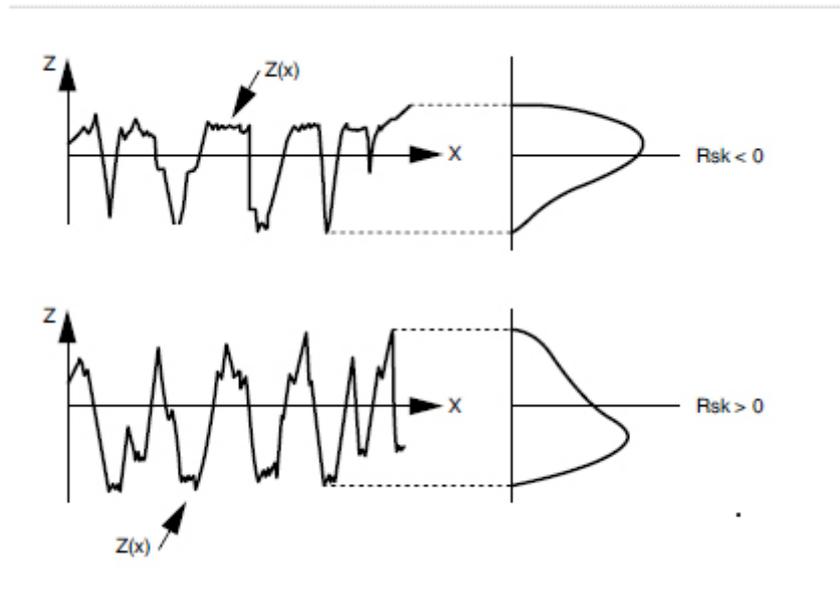


Fig.Nº 65. La figura representa cómo valores de  $R_{sk}$  o  $S_{sk}$  menores a cero (arriba) presentan picos de puntas amesetadas con valles estrechos de fondo agudo, mientras que valores de  $R_{sk}$  o  $S_{sk}$  mayores a cero (abajo) presentan picos de puntas agudas y valles con fondo amesetado.

Se ha podido comprobar entonces que el análisis de los factores que influyen sobre la adhesión es muy complejo e involucra a un número importante de variables. Entre ellos la textura fue el factor que mostró mayor impacto. Para caracterizar una textura superficial es necesario contemplar un gran número de parámetros. Aún cuando ciertos parámetros como  $R_a$  y  $S_a$  son los más utilizados para describir la rugosidad, ellos mostraron que no guardan una relación directa con la adhesión bacteriana por lo que es necesario utilizar otros parámetros conceptualmente más complejos. Esto subraya la necesidad de completar, a nivel comercial, la información acerca de las características de la superficie a la hora de describir las propiedades de un implante incorporando nuevos parámetros ( $S_{sk}$ ,  $S_{dr}$ ,  $S_{ds}$ ) ya que en la actualidad dicha información se limita usualmente a reportar los valores de  $R_a$  o  $S_a$ .

## **Capítulo 7. Conclusiones.**

## Capítulo 7

### CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo mostraron que la adhesión del *Staphylococcus aureus* a la superficie del titanio anodizado alcanzaron valores máximos, superando ampliamente a los del control sin anodizar en el caso de las superficies de Ti anodizadas a 20V, mientras que mostraron valores mínimos para las correspondientes a 60V. Los valores decrecieron aún más para los anodizados a 60V con cobertura de politimol, con diferencias estadísticamente significativas respecto al control Ti pulido. Se analizaron distintos factores que podrían corresponder a esa respuesta: la incorporación de flúor a la composición del óxido obtenido por anodización, la hidrofiliidad, la textura superficial, la cobertura superficial mediante una capa polimérica antibacteriana.

Los resultados de los análisis de Espectro de Dispersión por rayos X (EDX) realizado a las muestras mostraron valores de % atómico del elemento flúor muy cercanos en las diferentes condiciones, sin embargo, la adhesión bacteriana cambiaba significativamente. Esto nos permitió concluir que el flúor no estaría asociado directamente a la disminución en la adhesión de las bacterias.

Se evaluó luego detalladamente la influencia de los parámetros relacionados con la textura de la superficie. El análisis de trece parámetros que describen la textura superficial permitió concluir que la relación de los valores de los mismos no refleja la misma tendencia que la adhesión bacteriana. La oblicuidad (1-Ssk), anisotropía (1-Str), densidad de cumbres (Sds) y área desarrollada (Sdr), presentaban variaciones y tendencias similares a las observadas en el número de bacterias adheridas al variar el potencial de anodización. Es decir, la adhesión bacteriana parecía manifestar preferencia hacia superficies más extendidas y anisotrópicas que presentan mesetas en la parte superior. Entre los parámetros mencionados el que mejor se relaciona es 1-Ssk.

Por otra parte, se comprobó que la menor adherencia se obtenía sobre las superficies anodizadas a 60V con cobertura de politimol. Este tipo de coberturas es promisorias para su utilización tanto en las cabezas de los tornillos de cierre, como en los cuerpos de los implantes dentales, para técnica de colocación inmediata postexodoncia. En

este caso al no existir rozamiento con el tejido óseo, la película no se desprendería de la superficie, lo que permitiría reducir el riesgo de infección por contaminación. Sin embargo, es necesario seguir investigando el comportamiento de estas superficies frente a los procesos de oseointegración para poder definir su aplicabilidad en la clínica odontológica.

De los resultados del presente trabajo surge la importancia de realizar un estudio detallado de la textura superficial y su correlación con la adhesión bacteriana con el objeto de diseñar biomateriales con superficies anti-biofilm y oseointegrables. Es decir que el parámetro de rugosidad superficial  $S_a$  (lisos, mínimamente rugosos, moderadamente rugosos, y rugosos) con que se clasifican los implantes dentales, no es suficiente para describirlos adecuadamente. Se comprobó en este trabajo que idénticos valores de  $S_a$  pueden corresponder a superficies cuyas texturas son muy disímiles y las bacterias interaccionarían en forma distinta con las mismas, lo que implicaría distinta susceptibilidad de adhesión bacteriana para superficies caracterizadas por un mismo valor de  $S_a$ .

## BIBLIOGRAFÍA

1. Misch CECE. *Implantología contemporánea/Contemporary Implant Dentistry*. Elsevier,; 2009.
2. Larsson C, Esposito M, Liao H, Thomsen P. *Titanium in Medicine*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Berlin; 2001.
3. Masaki C, Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Stanford C. Effects of implant surface microtopography on osteoblast gene expression. *Clin Oral Implants Res*. 2005;16(6):650–6.
4. Omar O, Lennerås M, Svensson S, Suska F, Emanuelsson L, Hall J, et al. Integrin and chemokine receptor gene expression in implant-adherent cells during early osseointegration. *J Mater Sci Mater Med*. 2010;21(3):969–80.
5. Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson AR. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. *Int j oral maxillofac Implant*. 1986;1(1):11–25.
6. Becker W, Becker BE, Newman MG, Nyman S. Clinical and microbiologic findings that may contribute to dental implant failure. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1990;5(1).
7. Esposito M, Hirsch J, Lekholm U, Thomsen P. Differential diagnosis and treatment strategies for biologic complications and failing oral implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999;14(4).
8. Pye AD, Lockhart DEA, Dawson MP, Murray CA, Smith AJ. A review of dental implants and infection. *J Hosp Infect*. 2009;72(2):104–10.
9. Bollenl CML, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater*. 1997;13(4):258–69.
10. Ivanova EP, Truong VK, Wang JY, Berndt CC, Jones RT, Yusuf II, et al. Impact of nanoscale roughness of titanium thin film surfaces on bacterial retention. *Langmuir*. 2009;26(3):1973–82.
11. Puckett SD, Taylor E, Raimondo T, Webster TJ. The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment. *Biomaterials*. 2010;31(4):706–13.

12. Oshida Y. *Bioscience and bioengineering of titanium materials*. Elsevier; 2010.
13. Pohler OEM. Unalloyed titanium for implants in bone surgery. *Injury*. 2000;31(SUPPL. 4).
14. Volume ASMH. 2: *Properties and Selection: Nonferrous Alloys and Special-Purpose Materials*. ASM Int. 1990;889–96.
15. ASTM B. 367-93: *Standard Specification for Titanium and Titanium Alloy Castings* ASTM. New York, NY. 1993;
16. Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomsen P. *Titanium in medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications*. Springer Science & Business Media; 2012.
17. Uhlig HH. *Uhlig's corrosion handbook*. Vol. 51. John Wiley & Sons; 2011.
18. Oldani C. El camino del titanio como material de reemplazo óseo. *Rev la Fac Ciencias Exactas, Físicas y Nat*. 2014;1(1):67.
19. Brnemark PI, Adell R, Albrektsson T, Lekholm U, Lundkvist S, Rockler B. Osseointegrated titanium fixtures in the treatment of edentulousness1. *Biomater Silver Jubil Compend*. 2006;4:17–20.
20. Albrektsson T. Direct bone anchorage of dental implants. *J Prosthet Dent*. 1983;50(2):255–61.
21. Bessone L. Tratamiento de superficie de implantes: revisión bibliográfica. *Rev Asoc Odontol Argent*. 2009;97(5):423–9.
22. Tecnología G, Procesos M. *Rugosidad Superficial*. :1–16.
23. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont*. 2004;17(5).
24. Wennerberg A, Albrektsson T. On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2010;25(1).
25. Wennerberg A, Albrektsson T, Jimbo R. *Implant surfaces and their biological and clinical impact*. Springer; 2015.
26. Wennerberg A, Albrektsson T, Johansson C, Andersson B. Experimental study of turned and grit-blasted screw-shaped implants with special emphasis on effects of blasting material and surface topography. *Biomaterials*.

- 1996;17(1):15–22.
27. Wennerberg A, Albrektsson T, Lausmaa J. Torque and histomorphometric evaluation of cp titanium screws blasted with 25- and 75-  $\mu\text{m}$ - sized particles of  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . *J Biomed Mater Res Part A*. 1996;30(2):251–60.
  28. Klokkevold PR, Johnson P, Dadgostari S, Davies JE, Caputo A, Nishimura RD. Early endosseous integration enhanced by dual acid etching of titanium: a torque removal study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res*. 2001;12(4):350–7.
  29. Buser D, Nydegger T, Oxland T, Cochran DL, Schenk RK, Hirt HP, et al. Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: A biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. *J Biomed Mater Res*. 1999;45(2):75–83.
  30. Schwarz F, Herten M, Sager M, Wieland M, Dard M, Becker J. Bone regeneration in dehiscence- type defects at chemically modified (SLActive®) and conventional SLA titanium implants: a pilot study in dogs. *J Clin Periodontol*. 2007;34(1):78–86.
  31. Buser D, Brogini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res*. 2004;83(7):529–33.
  32. Kohri M, Cooper EP, Ferracane JL, Waite DF. Comparative study of hydroxyapatite and titanium dental implants in dogs. *J oral Maxillofac Surg*. 1990;48(12):1265–73.
  33. Ballo AM, Omar O, Xia W, Palmquist A. Dental Implant Surfaces - Physicochemical Properties, Biological Performance, and Trends. *Implant Dent - A rapidly Evol Pract* [Internet]. 2001;19–57. Available from: <http://www.intechopen.com/books/implant-dentistry-a-rapidly-evolving-practice/dental-implant-surfaces- physicochemical-properties-biological-performance-and-trends%5CnInTech Europe University Campus STeP Ri Slavka Krautzeka 83/A 51000 Rijeka, Croatia Phon>
  34. Palmquist A, Lindberg F, Emanuelsson L, Brånemark R, Engqvist H, Thomsen P. Biomechanical, histological, and ultrastructural analyses of laser micro- and nano- structured titanium alloy implants: A study in rabbit. *J Biomed Mater Res Part A*. 2010;92(4):1476–86.

35. Palmquist A, Emanuelsson L, Brånemark R, Thomsen P. Biomechanical, histological and ultrastructural analyses of laser micro- and nano- structured titanium implant after 6 months in rabbit. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.* 2011;97(2):289–98.
36. Hall J. Properties of a new porous oxide surface on titanium implants. *Appl Osseointegr Res.* 2000;1:5–8.
37. Fröjd V, Franke-Stenport V, Meirelles L, Wennerberg A. Increased bone contact to a calcium-incorporated oxidized commercially pure titanium implant: an in-vivo study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008;37(6):561–6.
38. Sul Y-T, Johansson C, Albrektsson T. Which surface properties enhance bone response to implants? Comparison of oxidized magnesium, TiUnite, and Osseotite implant surfaces. *Int J Prosthodont.* 2006;19(4).
39. Matykina E, Hernandez-López JM, Conde a., Domingo C, De Damborenea JJ, Arenas M a. Morphologies of nanostructured TiO<sub>2</sub> doped with F on Ti-6Al-4V alloy. *Electrochim Acta.* 2011;56(5):2221–9.
40. Delplancke J-L, Winand R. Galvanostatic anodization of titanium—I. Structures and compositions of the anodic films. *Electrochim Acta.* 1988;33(11):1539–49.
41. Yang B, Uchida M, Kim H-M, Zhang X, Kokubo T. Preparation of bioactive titanium metal via anodic oxidation treatment. *Biomaterials.* 2004;25(6):1003–10.
42. Rodríguez D, Sevilla P, Gil J. Anodización del titanio para la mejora ante la degradación química de material quirúrgico. *MATERIALES.* 2010;212:212.
43. Pérez Nieto DJ. Influencia de los tratamientos superficiales de ataque ácido y anodizado en el comportamiento a fatiga del ti cp y el ti-6al-4v para implantes dentales. *Maestría en Física Aplicada;* 2013.
44. Langlade C, Vannes AB, Krafft JM, Martin JR. Surface modification and tribological behaviour of titanium and titanium alloys after YAG-laser treatments. *Surf coatings Technol.* 1998;100–101:383–7.
45. Perez del Pino A, Serra P, Morenza JL. Coloring of titanium by pulsed laser processing in air. *Thin Solid Films.* 2002;415:201–5.

46. Arias S. Ensayos biológicos sobre Ti poroso para reemplazo de hueso. Universidad de Antioquia; 2011.
47. Delplancke J-L, Degrez M, Fontana A, Winand R. Self-colour anodizing of titanium. *Surf Technol.* 1982;16(2):153–62.
48. Sanchez AG, Schreiner W, Duffó G, Ceré S. Surface characterization of anodized zirconium for biomedical applications. *Appl Surf Sci.* 2011;257(15):6397–405.
49. Sul Y-T, Johansson CB, Jeong Y, Albrektsson T. The electrochemical oxide growth behaviour on titanium in acid and alkaline electrolytes. *Med Eng Phys.* 2001;23(5):329–46.
50. Grimes CA, Mor GK. *TiO<sub>2</sub> nanotube arrays: synthesis, properties, and applications.* Springer Science & Business Media; 2009.
51. Mor GK, Varghese OK, Paulose M, Mukherjee N, Grimes CA. Fabrication of tapered, conical-shaped titania nanotubes. *J Mater Res.* 2003;18(11):2588–93.
52. Macák JM, Tsuchiya H, Schmuki P. High-aspect-ratio TiO<sub>2</sub> nanotubes by anodization of titanium. *Angew Chemie Int Ed.* 2005;44(14):2100–2.
53. Macak JM, Tsuchiya H, Taveira L, Aldabergerova S, Schmuki P. Smooth anodic TiO<sub>2</sub> nanotubes. *Angew Chemie Int Ed.* 2005;44(45):7463–5.
54. Nakayama K, Kubo T, Tsubokura A, Nishikitani Y, Masuda H. Anodic formation of high-aspect-ratio titania nanotubes. In: *Meeting Abstracts. The Electrochemical Society;* 2006. p. 819.
55. Kitrilakis AE. *Bases para el conocimiento de la oclusión orgánica.* Editorial de la Universidad Nacional de La Plata; 1995.
56. Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Periodontologia clinica e implantologia odontologica/Clinical Periodontology and Implant Dentistry.* Vol. 1. Ed. Médica Panamericana; 2009.
57. Wilderer PA, Characklis WG. Structure and function of biofilms. *Struct Funct biofilms.* 1989;5–17.
58. Lappin-Scott HM, Bass C. Biofilm formation: attachment, growth, and detachment of microbes from surfaces. *Am J Infect Control.* 2001;29(4):250–1.
59. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause

- of persistent infections. *Science* (80- ). 1999;284(5418):1318–22.
60. Elder MJ, Stapleton F, Evans E, Dart JKG. Biofilm-related infections in ophthalmology. *Eye*. 1995;9(1):102–9.
  61. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(2):167–93.
  62. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*. 2002;28(1):12–55.
  63. O’Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm Formation as Microbial Development. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. 2000;54(1):49–79. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.54.1.49>
  64. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW t, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* (80- ). 1998;280(5361):295–8.
  65. Carpentier B, Cerf O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Microbiol*. 1993;75(6):499–511.
  66. Busscher HJ, Van der Mei HC. Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv Dent Res*. 1997;11(1):24–32.
  67. Ábalos C. Adhesión bacteriana a biomateriales. *Av Odontoestomatol* [Internet]. 2005;21(1):347–53. Available from: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0213-12852005000100003&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852005000100003&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
  68. Thomas JG, Nakaishi LA. Managing the complexity of a dynamic biofilm. *J Am Dent Assoc*. 2006;137:S10–5.
  69. Mafu AA, Roy D, Goulet J, Savoie L, Roy R. Efficiency of Sanitizing Agents for Destroying *Listeria monocytogenes* on Contaminated Surfaces. *J Dairy Sci* [Internet]. 1990;73(12):3428–32. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030290790406>
  70. Vanhaecke E, Remon JP, Moors M, Raes F, De Rudder D, Van Peteghem A. Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316-L stainless steel: role of cell surface hydrophobicity. *Appl Environ Microbiol*.

- 1990;56(3):788–95.
71. Flint SH, Brooks JD, Bremer PJ. Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. *J Food Eng.* 2000;43(4):235–42.
  72. Díaz C, Schilardi P, De Mele MFL. Influence of surface sub-micropattern on the adhesion of pioneer bacteria on metals. *Artif Organs.* 2008;32(4):292–8.
  73. Díaz C, Schilardi PL, Dos Santos Claro PC, Salvarezza RC, Fernández Lorenzo De Mele MA. Submicron trenches reduce the *Pseudomonas fluorescens* colonization rate on solid surfaces. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2009;1(1):136–43.
  74. Díaz C, Salvarezza RC, Fernández Lorenzo De Mele MA, Schilardi PL. Organization of *pseudomonas fluorescens* on chemically different nano/microstructured surfaces. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2010;2(9):2530–9.
  75. Lorenzetti M, Dogša I, Stošicki T, Stopar D, Kalin M, Kobe S, et al. The influence of surface modification on bacterial adhesion to titanium-based substrates. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015;7(3):1644–51.
  76. Rijnaarts HHM, Norde W, Lyklema J, Zehnder AJB. DLVO and steric contributions to bacterial deposition in media of different ionic strengths. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 1999;14(1):179–95.
  77. Gilbert P, Evans DJ, Evans E, Duguid IG, Brown MRW. Surface characteristics and adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Appl Microbiol.* 1991;71(1):72–7.
  78. Kim KY, Frank JF. Effect of nutrients on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel. *J Food Prot.* 1995;58(1):24–8.
  79. Husmark U, Rönner U. Forces involved in adhesion of *Bacillus cereus* spores to solid surfaces under different environmental conditions. *J Appl Microbiol.* 1990;69(4):557–62.
  80. Dan N. The effect of charge regulation on cell adhesion to substrates: salt-induced repulsion. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2003;27(1):41–7.
  81. Millsap KW, Reid G, Mei HC van der, Busscher HJ. Cluster analysis of genotypically characterized *Lactobacillus* species based on physicochemical cell surface properties and their relationship with adhesion to hexadecane. *Can*

- J Microbiol. 1997;43(3):284–91.
82. Lerebour G, Cupferman S, Bellon-Fontaine MN. Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to the Episkin® reconstructed epidermis model and to an inert 304 stainless steel substrate. *J Appl Microbiol.* 2004;97(1):7–16.
  83. Narendran V. Bacterial attachment to meat surfaces: a thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Food Technology at Massey University, Palmerston North, New Zealand. 2003;
  84. Tomasz A. Control of the competent state in *Pneumococcus* by a hormone-like cell product: an example for a new type of regulatory mechanism in bacteria. *Nature.* 1965;208(5006):155–9.
  85. Neilson KH, Platt T, Hastings JW. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol.* 1970;104(1):313–22.
  86. Bassler BL, Losick R. Bacterially speaking. *Cell.* 2006;125(2):237–46.
  87. Kim SK, Kaiser D. Cell alignment required in differentiation of *Myxococcus xanthus*. *Science (80- ).* 1990;249(4971):926–9.
  88. Kim SK, Kaiser D. C-factor: a cell-cell signaling protein required for fruiting body morphogenesis of *M. xanthus*. *Cell.* 1990;61(1):19–26.
  89. Reguera G, Pollina RB, Nicoll JS, Lovley DR. Possible nonconductive role of *Geobacter sulfurreducens* pilus nanowires in biofilm formation. *J Bacteriol.* 2007;189(5):2125–7.
  90. Lasa I, Del Pozo JL, Penades JR, Leiva J. Biofilms bacterianos e infección. In: *Anales del Sistema Sanitario de Navarra. SciELO Espana;* 2005. p. 163–75.
  91. Aguado EJM, Fortún J, Manuel J, Jaume R. Guía de recomendaciones para el diagnóstico y tratamiento de las infecciones asociadas a biomateriales. *Guías Clínicas SEIMC.* 2006;
  92. Roncero A. PERIIMPLANTITIS Alejandro Roncero.
  93. Barboza EP, Caúla AL, Carvalho WR. Crestal bone loss around submerged and exposed unloaded dental implants: a radiographic and microbiological descriptive study. *Implant Dent.* 2002;11(2):162–9.
  94. López-Cerero L. Infecciones relacionadas con los implantes dentarios. *Enferm*

- Infec Microbiol Clin. 2008;26(9):589–92.
95. Charalampakis G, Belibasakis GN. Microbiome of peri-implant infections: Lessons from conventional, molecular and metagenomic analyses. *Virulence* [Internet]. 2015;6(3):183–7. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/21505594.2014.980661>
96. Lafaurie GI, Sabogal MA, Castillo DM, Rincón MV, Gómez LA, Lesmes YA, et al. Microbiome and Microbial Biofilm Profiles of Peri-Implantitis: A Systematic Review. *J Periodontol* [Internet]. 2017;1–26. Available from: <http://www.joponline.org/doi/10.1902/jop.2017.170123>
97. Jacobson JJ, Patel B, Asher G, Woolliscroft JO, Schaberg D. Oral staphylococcus in older subjects with rheumatoid arthritis. *J Am Geriatr Soc*. 1997;45(5):590–3.
98. Wolinsky LE, De Camargo PM, Erard JC, Newman MG. A study of in vitro attachment of *Streptococcus sanguis* and *Actinomyces viscosus* to saliva-treated titanium. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1989;4(1).
99. Dinatale E, Guillarte C. Aspectos Microbiológicos En Implantología - Revisión De La Literatura. *Acta Odontol Venez*. 2009;4:1–9.
100. Drake DR, Paul J, Keller JC. Primary bacterial colonization of implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implant*. 1999;14(2):226–32.
101. Haffajee AD, Socransky SS. Introduction to microbial aspects of periodontal biofilm communities, development and treatment. *Periodontol 2000*. 2006;42(1):7–12.
102. Cabarrocas FV. ENFERMEDAD PERIIMPLANTARIA EN PACIENTES CON ANTECEDENTES DE TRATAMIENTO POR ENFERMEDAD PERIODONTAL INFLAMATORIA CRÓNICA.
103. Flemmig TF, Beikler T. Control of oral biofilms. *Periodontol 2000*. 2011;55(1):9–15.
104. Taxt-Lamolle SF, Rubert M, Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, Monjo M. Controlled electro-implementation of fluoride in titanium implant surfaces enhances cortical bone formation and mineralization. *Acta Biomater* [Internet]. 2010;6(3):1025–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2009.09.014>

105. Lamolle SF, Monjo M, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, Haugen HJ. Titanium implant surface modification by cathodic reduction in hydrofluoric acid: Surface characterization and in vivo performance. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2009;88(3):581–8.
106. Arenas M a, Pérez-jorge C, Conde A, Matykina E, Hernández-lópez JM, Pérez-tanoira R, et al. Doped TiO<sub>2</sub> anodic layers of enhanced antibacterial properties. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2013;105:106–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.12.051>
107. Suriyaraj SP, Vijayaraghavan T, Biji P, Selvakumar R. Adsorption of fluoride from aqueous solution using different phases of microbially synthesized TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2014;2(1):444–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2014.01.013>
108. Gittens R a., McLachlan T, Olivares-Navarrete R, Cai Y, Berner S, Tannenbaum R, et al. The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. *Biomaterials* [Internet]. 2011;32(13):3395–403. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.029>
109. Gittens R a., Olivares-Navarrete R, McLachlan T, Cai Y, Hyzy SL, Schneider JM, et al. Differential responses of osteoblast lineage cells to nanotopographically-modified, microroughened titanium-aluminum-vanadium alloy surfaces. *Biomaterials* [Internet]. 2012;33(35):8986–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.08.059>
110. Kim MJ, Choi MU, Kim CW. Activation of phospholipase D1 by surface roughness of titanium in MG63 osteoblast-like cell. *Biomaterials*. 2006;27(32):5502–11.
111. Lamolle SF, Monjo M, Rubert M, Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE. The effect of hydrofluoric acid treatment of titanium surface on nanostructural and chemical changes and the growth of MC3T3-E1 cells. *Biomaterials*. 2009;30(5):736–42.
112. Li Y, Zou S, Wang D, Feng G, Bao C, Hu J. The effect of hydrofluoric acid treatment on titanium implant osseointegration in ovariectomized rats. *Biomaterials* [Internet]. 2010;31(12):3266–73. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.028>
113. Mabileau G, Bourdon S, Joly-Guillou ML, Filmon R, Baslé MF, Chappard D. Influence of fluoride, hydrogen peroxide and lactic acid on the corrosion resistance of commercially pure titanium. *Acta Biomater*. 2006;2(1):121–9.
  114. Minagar S, Berndt CC, Wang J, Ivanova E, Wen C. A review of the application of anodization for the fabrication of nanotubes on metal implant surfaces. *Acta Biomater* [Internet]. 2012;8(8):2875–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.04.005>
  115. Bathomarco R V., Solorzano G, Elias CN, Prioli R. Atomic force microscopy analysis of different surface treatments of Ti dental implant surfaces. *Appl Surf Sci*. 2004;233(1–4):29–34.
  116. Kumar S, Sankara Narayanan TSN, Saravana Kumar S. Influence of fluoride ion on the electrochemical behaviour of  $\beta$ -Ti alloy for dental implant application. *Corros Sci* [Internet]. 2010;52(5):1721–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.corsci.2010.01.008>
  117. Al-Radha ASD, Dymock D, Younes C, O’Sullivan D. Surface properties of titanium and zirconia dental implant materials and their effect on bacterial adhesion. *J Dent* [Internet]. 2012;40(2):146–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2011.12.006>
  118. Negroni M. *Microbiología estomatológica*. Ed. Médica Panamericana; 2000.
  119. Liébana Ureña J. *Microbiología oral*. Madrid: Ed. Mc Graw Hill; 2002.
  120. Muñoz Acevedo A, Castañeda ML, Blanco KM, Cardenas CY, Reyes JA, Kouznetsov V V, et al. Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. *Sci Tech*. 2007;13(33).
  121. García R, Palou E. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol.pdf. Vol. 2, *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 2008. p. 41–51.
  122. Falcone PM, Mastromatteo M, Del Nobile MA, Corbo MR, Sinigaglia M. Evaluating in vitro antimicrobial activity of thymol toward hygiene-indicating and pathogenic bacteria. *J Food Prot*. 2007;70(2):425–31.
  123. Bertuola M, Grillo CA, Pissinis DE, Prieto ED, Fernández Lorenzo de Mele

- M. Is the biocompatibility of copper with polymerized natural coating dependent on the potential selected for the electropolymerization process? *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2017;159:673–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.08.029>
124. ZISMAN WA. Relation of the Equilibrium Contact Angle to Liquid and Solid Constitution. 1964;1–51. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ba-1964-0043.ch001>
  125. Lamour G, Hamraoui A, Buvailo A, Xing Y, Keuleyan S, Prakash V, et al. Contact angle measurements using a simplified experimental setup. *J Chem Educ.* 2010;87(12):1403–7.
  126. Bracco G, Holst B. *Surface science techniques*. Vol. 51, Springer Series in Surface Sciences. 2013.
  127. Rivera MH, Edgar M, Melo R. La rugosidad de las superficies : Topometría. *Ingenierías.* 2001;4(11):27–33.
  128. Science S. *Quick Guide To.* 2015;(April):2–3.
  129. López EA, Solares SD. El microscopio de fuerza atómica: métodos y aplicaciones. *Revista de la Universidad del Valle Guatemala.* 2014. p. 14–28.
  130. Auger E. Interacción de electrones con la materia. *Serv técnicos Investig Univ Alicant.* 2012;1–11.
  131. Limf DEL, Ingeniería FDE, Kyung W, Juan M, Carlos L, Investigaciones L De, et al. Servicio de microscopía electrónica de barrido y microanálisis del limf – facultad de ingeniería – unlp. 2013;660–5.
  132. Zygo Corporation. *MetroPro Surface Texture Parameters.* [WwwZygoCom](http://www.ZygoCom). 2013;1–20.
  133. Crawford RJ, Webb HK, Truong VK, Hasan J, Ivanova EP. Surface topographical factors influencing bacterial attachment. *Adv Colloid Interface Sci.* 2012;179–182:142–9.
  134. Raposo M, Ferreira Q, Ribeiro P a. A Guide for Atomic Force Microscopy Analysis of Soft- Condensed Matter. *Mod Res Educ Top Microsc.* 2007;758–69.
  135. Oliveira RRL De, Albuquerque D a. C, Cruz TGS, Leite FMY and FL. Measurement of the Nanoscale Roughness by Atomic Force Microscopy:

Basic Principles and Applications. At Force Microsc - Imaging, Meas Manip Surfaces At Scale [Internet]. 2012;256. Available from:

<http://www.intechopen.com/books/atomic-force-microscopy- imaging- measuring-and-manipulating-surfaces-at-the-atomic-scale/measurement-of-the-nanoscale- roughness-by-atomic-force-microscopy-basic-principles-and-applications%5Cnhttp://cdn.intechopen.com/pdfs>

136. Oberg E, Jones FD, Horton HL, Ryffel HH. Machinery's handbook, 2000. Ind Press Inc. 2000;26:922.
137. Lewandowski Z, Evans L V. Structure and function of biofilms. Biofilms Recent Adv their study Control. 2000;1:466.
138. García E, Salazar S, Aguilar A, Koo ML. Las pruebas electroquímicas y el potencióstato autónomo programable. Publicación del Inst Inverstigaciones Tecnológicas México. 1997;
139. Motyka M, Kubiak K, Sieniawski J, Ziaja W. Hot Plasticity of Alpha Beta Alloys. In: Titanium Alloys-Towards Achieving Enhanced Properties for Diversified Applications. InTech; 2012.
140. Misch CE, Perel ML, Wang H-L, Sammartino G, Galindo-Moreno P, Trisi P, et al. Implant success, survival, and failure: the International Congress of Oral Implantologists (ICOI) pisa consensus conference. Implant Dent. 2008;17(1):5–15.
141. Medina A, Guzmán Zuluaga IC. Superficie del implante como indicador de riesgo en enfermedades periimplantares. Av en Periodoncia e Implantol Oral. 2012;24(3):139–44.
142. Solano Mendoza P, Ortiz-Vigón A, Bascones Martínez A. Concepto actual de la patogénesis de la periimplantitis y el papel que ocupan las bacterias. Av en Periodoncia e Implantol Oral. 2017;29(1):31–42.
143. Nicoli LG, Oliveira GJPL de, Lopes BMV, Marcantonio C, Zandim-Barcelos DL, Marcantonio Jr E. Survival/Success of Dental Implants with Acid-Etched Surfaces: A Retrospective Evaluation After 8 to 10 Years. Braz Dent J. 2017;28(3):330–6.
144. Kerkouch D. Tratamiento de superficie de titanio con propiedades antibacterianas para aplicaciones biomédicas. 2013;

145. Pérez Tanoira R. Incorporación de plata para incrementar las propiedades antimicrobianas de aleaciones de titanio. 2014;
146. Galeano-Garces C. Control de la adhesión celular y bacteriana en los dispositivos biomédicos implantables. *Biomédica, Mecatrónica y Mecánica*; 2014.
147. Arenas MA, Pérez-Jorge C, Conde A, Matykina E, Hernández-López JM, Pérez-Tanoira R, et al. Doped TiO<sub>2</sub> anodic layers of enhanced antibacterial properties. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2013;105:106–12.
148. Elbourne A, Crawford RJ, Ivanova EP. Nano-structured antimicrobial surfaces: From nature to synthetic analogues. *J Colloid Interface Sci*. 2017;508:603–16.
149. Löberg J, Mattisson I, Hansson S, Ahlberg E. Characterisation of Titanium Dental Implants I: Critical Assessment of Surface Roughness Parameters. *Open Biomater J [Internet]*. 2010;2:18–35. Available from: <http://benthamopen.com/journal/render-fulltext.php?articleID=TOBIOMTJ-2-18>
150. Truong VK, Lapovok R, Estrin YS, Rundell S, Wang JY, Fluke CJ, et al. The influence of nano-scale surface roughness on bacterial adhesion to ultrafine-grained titanium. *Biomaterials [Internet]*. 2010;31(13):3674–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.071>

Autor: Od. Carlos María Albino, Martins

Directora: Prof. Dra. Mónica, Fernández Lorenzo

Co- Directora: Prof. Dra. Alicia, Kitrilakis