

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INGENIERÍA
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



**EVALUACIÓN DEL PROCESO DE CORROSIÓN INDUCIDA POR
MICROORGANISMOS EN SOLUCIÓN SIMULADA DE SALIVA
SOBRE SUPERFICIES NANOESTRUCTURADAS DE TITANIO**

TESIS

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

ARMANDO FRANCISCO RAMÍREZ RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. BENJAMÍN VALDEZ SALAS

CO-DIRECTOR DE TESIS:

DR. ERNESTO ALONSO BELTRÁN PARTIDA

Mexicali, Baja California, México

Junio de 202

AGRADECIMIENTOS

A Dr. Benjamín Valdez por haberme aceptado en el programa de posgrado de MyDCI, por compartir sus puntuales observaciones durante las revisiones de avances, sus valiosos conocimientos y orientación para mi formación profesional y realización de mi investigación.

A Dr. Ernesto Beltrán por recibirme para entrevista y aceptarme en el programa, por sus enseñanzas, su accesibilidad, paciencia y observaciones en cualquier momento, aprecio mucho su aportación doctor.

A Dr. Nicola Radnev Nedev, a Dr. Mario Alberto Curiel Álvarez, a Dra. Mayra Cecilia Ramírez Camacho, a Dr. Óscar Pérez Landeros y a Dr. Nabor Rosas por su apoyo y experiencia que ayudaron en mi formación.

Al Ing. Jorge Salvador por su colaboración y acompañamiento en la elaboración del presente trabajo, al Ing. Jonathan Beltrán, a la M.C. Sandra Castillo, al M.I. Ramiro Vázquez y al Dr. Ricardo Salinas por sus consejos, por su tiempo y por su sincera amistad.

A la Universidad Autónoma de Baja California y al Instituto de Ingeniería por facilitar el uso de sus instalaciones, materiales de referencia y equipo especializado requerido para la investigación así como a todo su personal quienes siempre estaban dispuestos a ayudar.

Al Centro Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado el apoyo económico para realizar mis estudios de posgrado (CVU 901117) y el financiamiento del proyecto que impulsa el desarrollo científico de México.

DEDICATORIA

A mis padres, Martha y Armando, por su tiempo, dedicación, sacrificios y sobre todo por mostrarme el camino que debo seguir para llegar a ser un poco como ustedes, este trabajo es para ustedes.

A mis hermanos, Dulce y Emanuel, por estar presentes en cualquier situación, por apoyarme y ser parte importante de mi vida.

A mis abuelos paternos, Joaquina y José, que a pesar de la distancia están siempre al pendiente y dispuestos a ayudar.

A Fernanda quien me ha enseñado a ser la mejor versión de mí mismo y con quien he compartido de los mejores momentos y experiencias. Tienes un lugar especial en mi corazón.

Finalmente a mi abuela Angelina, la mujer más fuerte que he conocido y por quien decidí estudiar mi profesión. Te mando un abrazo donde quiera que estés.

“We are survival machines — robot vehicles blindly programmed to preserve the selfish molecules known as genes. This is a truth which still fills me with astonishment.”

Richard Dawkins (The Selfish Gene, 1976).

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	ii
DEDICATORIA	iii
CONTENIDO	v
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS	xii
CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	4
1.1.1 GENERAL	4
1.1.2 ESPECÍFICOS.....	4
1.1.3 HIPÓTESIS.	4
CAPÍTULO 2.....	5
2. MARCO TEÓRICO	6
2.1 CORROSIÓN.....	6
2.1.1 CLASIFICACIÓN DEL PROCESO DE CORROSIÓN.	7
2.1.1.1 CLASIFICACIÓN POR SU MECANISMO.....	7
2.1.1.2 CLASIFICACION TIPO DE DETERIORO.....	7
2.1.2 CORROSIÓN ELECTROQUÍMICA.....	10
2.1.3 TERMODINÁMICA DE CORROSIÓN.....	11
2.1.3.1 ENERGÍA LIBRE DE GIBBS (ΔG).....	12
2.1.4 CINÉTICA DE CORROSIÓN.....	13
2.1.5 POLARIZACIÓN.....	15
2.1.5.1 POLARIZACIÓN ANÓDICA.....	15
2.1.5.2 POLARIZACIÓN CATÓDICA.....	17

2.1.6	EVALUACIÓN DE LA CORROSIÓN.....	17
2.1.6.1	OBJETIVOS DE LA EVALUACIÓN.	18
2.2	CORROSIÓN INDUCIDA POR MICROORGANISMOS.....	19
2.2.1	FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA.....	20
2.2.2	IMPACTO DE <i>C. albicans</i> EN CIM.....	22
2.3	SÍNTESIS DE NANOTUBOS EN SUPERFICIE DE TITANIO.	23
2.4	DENSIDAD MICROBIOLÓGICA.....	26
2.5	CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES.	27
2.5.1	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	27
2.5.2	ESPECTROSCOPIA DE DISPERSIÓN DE ENERGÍA DE RAYOS X.....	28
CAPÍTULO 3.....		30
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
3.1	OBTENCIÓN DE MODELO MICROBIOLÓGICO.....	30
3.1.1	AISLAMIENTO DE <i>C. albicans</i>	30
3.1.2	MANTENIMIENTO DE LA CEPA.....	31
3.2	PREPARACIÓN DE SUPERFICIES DE Ti.	32
3.2.1	ANODIZADO ELECTROQUÍMICO.	32
3.3	PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN SIMULADA DE SALIVA.	34
3.4	ACONDICIONAMIENTO DE INÓCULO INICIAL PARA LOS ENSAYOS.....	35
3.4.1	ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS.	35
3.4.2	ENSAYOS ELECTROQUÍMICOS.....	36
3.5	ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS.	37
3.5.1	VIABILIDAD MICROBIANA.....	37
3.6	ENSAYOS ELECTROQUÍMICOS.....	39
3.6.1	POTENCIAL DE CIRCUITO ABIERTO (OCP).....	41
3.6.2	VOLTAMPEROMETRÍA DE BARRIDO LINEAL (LSV).	42
3.6.3	ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA (EIS).....	43

3.7	CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES.	46
3.7.1	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM).	46
3.7.2	ESPECTROSCOPIA DE ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X (EDS).....	47
3.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	47
CAPÍTULO 4.....		48
4.	RESULTADOS.....	49
4.1	ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS.	49
4.2	ENSAYOS ELECTROQUÍMICOS.....	53
4.2.1	POTENCIAL DE CIRCUITO ABIERTO (OCP).....	53
4.2.2	VOLTAMPEROMETRÍA DE BARRIDO LINEAL (LSV).	56
4.2.3	ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA (EIS).	59
4.3	CARACTERIZACIÓN DE SUPERFICIES.	63
4.3.1	ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELÉCTRICA DE BARRIDO.....	63
4.3.2	ESPECTROSCOPIA DE ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X (EDS).....	66
CAPÍTULO 5.....		73
5.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	74
5.1	ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS.	74
5.2	ENSAYOS ELECTROQUÍMICOS.....	74
5.3	CARACTERIZACIÓN DE SUPERFICIE.....	77
CAPÍTULO 6.....		78
6.	CONCLUSIONES.....	79
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los diferentes tipos de corrosión. Grupo I: Identificable de manera visual, corrosión uniforme, picadura, hendidura y galvánica; Grupo II: Identificables con herramientas de inspección, corrosión por erosión, por cavitación, por desgaste e intergranular; Grupo III: Identificable por examinación microscópica, corrosión por exfoliación, desaleación, bajo tensión y fatiga	8
Figura 2. Corrosión de hierro en contacto con electrolito con zonas anódicas y catódicas	10
Figura 3. Curva de Tafel con parte anódica y catódica	15
Figura 4. Curva anódica con sus 3 zonas características	16
Figura 5. Polarización catódica en líneas punteadas 1, 2 y 3 que pueden ocurrir en función del potencial	17
Figura 6. Condiciones presentes en la CIM	19
Figura 7. Etapas de la formación de biopelícula sobre una superficie	21
Figura 8. Modelo de biopelícula fúngica de <i>C. albicans</i>	23
Figura 9. Diagrama esquemático de la celda electroquímica para el proceso de anodizado electroquímico. A) Contra-electrodo de platino, B) Contenedor para solución electrolítica, C) Base, D) Lámina de aluminio y E) Electrodo de trabajo.	24
Figura 10. Diagrama esquemático de la evolución de nanotubos durante el proceso de anodizado electroquímico. (a) Formación de capa de óxido; (b) Formación de poros en la capa de óxido; (c) Escalamiento, formación entre los poros; (d) Crecimiento de los poros y escalamiento; (e) Matriz de nanotubos (Ti ₂ O) desarrollados	25
Figura 11. Equipo SEM marca Hitachi modelo S5200	28
Figura 12. Condiciones de trabajo asépticas para microbiología. a) El mechero de Bunsen esteriliza el ambiente que se muestra en zona amarilla y se vierte medio sobre caja Petri, b) Con flama de mechero se esteriliza asa microbiológica y c) Se visualiza crecimiento microbiológico	31
Figura 13. Muestra de Ti recibida con dimensiones de 300x100x0.1 mm con acabado desincrustado estandarizado por ASTM B265-17.	32
Figura 14. Imagen esquemática de celda electroquímica para anodizado electroquímico. A) Contra-electrodo de platino, B) Contenedor para solución electrolítica, C) Electrodo de trabajo, muestra de Ti sobre E) lámina de aluminio, D) Base, F) Fuente de corriente directa.....	34
Figura 15. Diagrama de paso final para preparación de inóculo inicial de <i>C. albicans</i> en solución FM.	36
Figura 16. Imagen esquemática de una caja de 12 pocillos con muestras de Ti con un volumen de solución FM inoculada con <i>C. albicans</i> sobre su superficie.....	37

Figura 17. Ilustración esquemática de cajas de APD inoculadas con diluciones 10^4 y 10^6 estriadas en 4 direcciones de cada muestra de Ti.....	39
Figura 18. Ilustración esquemática de una celda electroquímica de 3 electrodos. A) Electrodo de referencia de SCE, B) Contra-electrodo de malla de platino, C) Columna contenedora de solución electrolítica, D) Base de celda electroquímica, E) Lámina de aluminio que funciona como conductor eléctrico, F) Electrodo de trabajo, muestras de Ti	40
Figura 19. Ilustración esquemática de celda electroquímica para ensayos de corrosión. A) Potenciostato, B) Caja de poliestireno, C) Celda electroquímica de 3 electrodos, D) Fuente de luz...	41
Figura 20. Gráfico de LSV, inicia en E_i y termina en E_f después de un tiempo determinado.....	42
Figura 21. Gráfico de Nyquist y circuito de Randles que simula respuesta del espectro de EIS.....	46
Figura 22. Muestras de Ti 2 NTs y controles en caja de 12 pocillos con 70 μ l de solución FM inoculadas con <i>C. albicans</i> depositados en su superficie.....	49
Figura 23. Muestras de Ti6Al4V NTs y controles en caja de 12 pocillos con 70 μ l de solución FM inoculadas con <i>C. albicans</i> depositados en su superficie.....	50
Figura 24. Diluciones 10^0 , 10^2 , 10^4 y 10^6 de <i>C. albicans</i> en solución PBS.....	50
Figura 25. Crecimiento de diluciones de <i>C. albicans</i> en cajas Petri de APD de Ti NTs y control: a) 1 día Ti 2, b) 1 día Ti 2 NTs, c) 5 días Ti 2, d) 5 días Ti 2 NTs, e) 7 días Ti 2 y f) 7 días Ti 2 NTs..	51
Figura 27. Evaluación de la viabilidad de <i>C. albicans</i> inoculada sobre superficies de Ti6Al4V y Ti6Al4V NTs a distintos tiempos de incubación. Las barras muestran la media más menos la desviación estándar, n=3. *Indica diferencia significativa entre Ti6Al4V a 5 y 14 días de incubación. **Indica mayor diferencia significativa entre Ti6Al4V NTs a 5 y 14 días de incubación.	53
Figura 28. OCP de muestra de Ti después de 21 días en solución FM inoculada con <i>C. albicans</i>	54
Figura 29. OCP de muestra de Ti NTs después de 21 días en solución FM con <i>C. albicans</i>	54
Figura 30. OCP de muestra de Ti6Al4V después de 21 días en solución FM inoculada con <i>C. albicans</i>	55
Figura 31. OCP de muestra de Ti6Al4V NTs después de 21 días en solución FM inoculada con <i>C. albicans</i>	56
Figura 32. LSV de muestra de Ti después de 21 días en solución FM inoculada con <i>C. albicans</i>	57
Figura 33. LSV de muestra de Ti NTs después de 21 días en solución FM inoculada con <i>C. albicans</i>	57
Figura 34. LSV de muestra de Ti6Al4V después de 21 días en solución FM inoculada con <i>C. albicans</i>	58
Figura 35. LSV de muestra de Ti6Al4V NTs después de 21 días en solución FM inoculada con <i>C. albicans</i>	59
Figura 36. Diagrama de Nyquist de muestra de Ti durante 21 días en solución FM inoculada con <i>C. albicans</i>	60

Figura 37. Diagrama de Nyquist de muestra de Ti NTs durante 21 días en solución FM inoculada con C. albicans.	61
Figura 38. Diagrama de Nyquist de muestra de Ti6Al4V durante 21 días en solución FM inoculada con C. albicans.	62
Figura 39. Diagrama de Nyquist de muestra de Ti6Al4V con NTs durante 21 días en solución FM inoculada con C. albicans.	63
Figura 40. Micrografías SEM de muestras de Ti como fue recibida, a-c), y con NTs, d-f).....	64
Figura 41. Micrografías SEM de Ti después de 21 días en solución FM inoculada con C. albicans con biopelícula, a-c), y sin biopelícula, d-e).	65
Figura 42. Micrografías SEM de Ti NTs después de 21 días en solución FM inoculada con C. albicans con biopelícula, a-c), y sin biopelícula, d-f).....	66
Figura 43. Espectro de muestra de Ti 2 control.	66
Figura 44. Espectro de muestra de Ti 2 después de proceso de anodizado electroquímico.....	67
Figura 45. Espectro de muestra de Ti 2 recubierta con biopelícula después de 21 días en contacto con solución FM y C. albicans.....	68
Figura 46. Espectro de muestra de Ti sin biopelícula después de 21 días en contacto con solución FM y C. albicans.	69
Figura 47. Espectro de muestra de Ti NTs con biopelícula después de 21 días en contacto con solución FM y C. albicans.	71
Figura 48. Espectro de muestra de Ti NTs sin biopelícula después de 21 días en contacto con solución FM y C. albicans.	72

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Potencial Estándar, $E_p^0_M$, vs SHE de metales en soluciones acuosas a 25 °C	12
Tabla 2. Nivel de energía de metales después de su extracción de minerales respecto al valor de $E_p^0_{ME}$ vs SHE a 25 °C	13
Tabla 3. Clasificación de microorganismos según el tipo de energía, fuente de carbono, donador y acceptor de electrones.	19
Tabla 4. Composición de solución electrolítica para anodizado electroquímico.	33
Tabla 5. Parámetros de anodizado electroquímico.	34
Tabla 6. Composición de Solución Simulada de Saliva.	34
Tabla 7. Parámetros para prueba OCP.	42
Tabla 8. Parámetros para prueba LSV.	43
Tabla 9. Elementos utilizados en circuitos de EIS.....	45
Tabla 10. Parámetros para prueba de EIS.....	46
Tabla 11. OCP (V vs SCE) de las muestras en solución FM inoculada con <i>C. albicans</i> durante 21 días.....	56
Tabla 12. E_{corr} (V) de las muestras Ti6Al4V NTs y control en solución FM inoculada con <i>C. albicans</i> durante 21 días.....	58
Tabla 13. Composición química de muestras de Ti control con NTs.....	67
Tabla 14. Composición química de Ti con biopelícula después de 21 días en contacto con solución FM y <i>C. albicans</i>	69
Tabla 15. Composición química de Ti sin biopelícula después de 21 días en contacto con solución FM y <i>C. albicans</i>	70
Tabla 16. Composición química de Ti NTs y biopelícula después de 21 días en contacto con solución FM y <i>C. albicans</i>	71
Tabla 17. Composición química de Ti grado 2 con NTs y sin biopelícula después de 21 días en contacto con solución FM y <i>C. albicans</i>	72

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Amper
APD	Agar Papa-Dextrosa
Ag	Plata
AgCl	Cloruro de Plata
ASO	Agua Súper Oxidada
ASTM	Sociedad Americana para Pruebas y Materiales por sus siglas en inglés
CA	Corriente Alterna
CaCl ₂ ·H ₂ O	Cloruro de Calcio Hidratado
CD	Corriente Directa
CSD	Caldo Sabouraud-Dextrosa
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CIM	Corrosión Influenciada por Microorganismos
cm ²	Centímetros Cuadrados
CO ₂	Dióxido de Carbono
E_{corr}	Potencial de Corrosión
EDX	Espectroscopía de Dispersión de Energía de Rayos X por siglas en inglés
EG	Etilenglicol
EIS	Espectroscopía de Impedancia electroquímica por sus siglas en inglés
(Ep) ⁰ _{ME}	Potencial Estándar de un Metal
EPS	Sustancias Poliméricas Extracelulares
fem	Fuerza Electromotriz
FM	Fusayama-Meyer
°C	Grados Celsius
<i>I, i</i>	Corriente
KCl	Cloruro de Potasio
LSV	Voltamperometría de Barrido Lineal por siglas en inglés
ml	Mililitros
mV	milivolts
NaCl	Cloruro de Sodio
NH ₄ F	Fluoruro de Amonio
nm	Nanómetros
NO ₂ ⁻	Dióxido de Nitrógeno
NO ₃ ⁻	Ion Nitrato

NTs	Nanotubos
Na ₂ S	Sulfuro de Sodio
OCP	Potencial de Circuito Abierto por sus siglas en inglés
OD	Densidad Óptica por sus siglas en ingles
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos por sus siglas en inglés.
pH	Potencial de hidrógeno.
R	Resistencia, Ω
redox	Reacciones de óxido reducción
Rx	Reacción
SCE	Electrodo Saturado de Calomelanos por sus siglas en inglés
SHE	Electrodo Estándar de Hidrógeno por sus siglas en ingles
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido por sus siglas en inglés
SO ₄ ²⁻	Anión Sulfato
Ti	Titanio puro comercial o titanio grado 2 (99% pureza)
Ti ₆ Al ₄ V	Aleación de titanio, aluminio y vanadio.
Ti ₂ O	Dióxido de titanio.
V	Voltaje
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
QS	Quorum Sensing

CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

La corrosión es un problema que afecta inexorablemente a todo material metálico y sus aleaciones [1] ya sea por su exposición atmosférica o por encontrarse sumergidos en un medio acuoso, en una solución electrolítica, como lo es la saliva humana. Los efectos nocivos de la corrosión elevan los costos de mantenimiento y de producción en toda clase de industrias, llámese alimenticia, farmacéutica, aeronáutica, marítima, agrícola, por lo que el área médica y odontológica no son la excepción. La boca y su fisiología, al ser la entrada al cuerpo humano se encuentra expuesta a cambios extremos durante el día, como son de temperatura, de pH, a estímulos químicos en los alimentos y bebidas, a la entrada de polvo y a una gran cantidad de bacterias, hongos, virus aunado a la microbiota existente en la saliva [2-3]. Todos estos factores afectan a los biomateriales que se encuentran en ella, tanto en sus propiedades mecánicas y biológicas, aumenta la probabilidad de liberación de iones metálicos, de productos de corrosión que al interactuar con el ambiente y tejidos bucales impacta directamente sobre la estabilidad del implante o prótesis [4]. Debido a lo mencionado siguen siendo objeto de investigación en la búsqueda de la mejora continua de su biocompatibilidad, bioactividad, osteointegración y actividad antimicrobiana [5-7].

Si bien existen en el mercado una enorme cantidad de biomateriales metálicos con recubrimientos protectores y aleaciones resistentes a la CIM, es necesario continuar con su estudio ampliando el enfoque para lograr una prolongación en su vida útil dentro de la cavidad bucal. Existen estrategias que se enfocan en la modificación superficial con nanoestructuras y/o nanopartículas que los vuelven menos propensos a ser colonizados por microorganismos [8-9]; en promover su oxidación controlada para la formación de una película insoluble de óxido que eleve la resistencia a la corrosión o bien modificando los métodos de síntesis para que contengan ciertos elementos que alteren su microestructura volviéndolos aún más resistentes [10-11].

La resistencia a la corrosión en medio simulado de saliva en presencia de *C. albicans* ha sido caracterizado en una gran cantidad de aleaciones de uso dental [12-16]. Estos análisis han sugerido que la velocidad de corrosión puede disminuir al inhibirse la formación de una biopelícula que actúa como barrera física generado ataques superficiales junto con los iones del ambiente fisiológico.

Existe una falta de estudios y experimentos que involucren la implicación de hongos del género *Candida*, en especial la especie *C. albicans*, en el efecto de CIM en Ti y sus aleaciones lo cual es una ventana de oportunidad que se buscará aprovechar para la generación de conocimiento sobre dicho efecto al ser un microorganismo con una capacidad de adaptación muy elevada, infeccioso con un fuerte impacto en la salud humana [17]. Por otra parte, es importante resaltar que estudios previos no han previsto ni valorado el papel de *C. albicans* una vez que se encuentre en la cavidad bucal del paciente. Lo anterior será evaluado mediante distintas técnicas electroquímicas con tiempos variables de exposición del metal a una solución de saliva artificial inoculada con dicho hongo.

Si bien es cierto que una infección oportunista, como la candidiasis, requiere de una serie de circunstancias que afecten la salud y el sistema inmune del paciente, no hay datos estadísticos regionales en relación al número de sujetos con un tratamiento dental que hayan sufrido candidiasis. Sin embargo, Buchacz et al. (2006) [18] estima en su estudio que entre los años 2000 y 2010, un número de 208,913 personas infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en Estados Unidos y Canadá presentaron candidiasis bucal y en el esófago, demostrando que es un problema real que debe ser atendido y estudiado a fondo.

Lo anterior es prueba de la problemática actual y de la necesidad de soluciones que exige el mercado, es por ello que se caracterizó un material de Ti6Al4V recubierto con una capa homogénea de NTs de TiO₂ sintetizados mediante un proceso controlado de anodización oxidativa que proveen resistencia a la corrosión microbiológica, capacidad de inhibición de anclaje fúngico temprano y un menor impacto nocivo en la salud [19-20]. Los NTs de TiO₂ pueden llegar a presentar una alternativa que tenga impacto en la producción a escala de materiales con mejores propiedades físicas, mecánicas y químicas al ser un proceso de bajo costo así como en la economía de las personas que se ven en la necesidad de un tratamiento odontológico.

1.1 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.

1.1.1 GENERAL.

- Evaluar el proceso de corrosión inducida por *C. albicans* en solución simulada de saliva en superficies con NTs de Ti y Ti6Al4V.

1.1.2 ESPECÍFICOS.

- Obtener cepa de *C. albicans* como modelo microbiológico.
- Realizar la síntesis de NTs de TiO₂ en superficies de Ti6Al4V y Ti.
- Cultivar el modelo microbiológico en superficies con NTs de TiO₂ de Ti y Ti6Al4V así como sus respectivos controles para los ensayos microbiológicos.
- Cultivar el modelo microbiológico en superficies con NTs de TiO₂ de Ti y Ti6Al4V en celda electroquímica para realizar el seguimiento a la evaluación del proceso corrosivo mediante pruebas electroquímicas.
- Realizar los ensayos microbiológicos y electroquímicos a 1, 5, 7, 14 y 21 días de incubación.
- Caracterizar las muestras del estudio previo y posterior a los ensayos electroquímicos.

1.1.3 HIPÓTESIS.

- La adhesión y formación de una biopelícula de *C. albicans* sobre la capa de TiO₂ de los NTs de Ti y Ti6Al4V tendrá un menor efecto corrosivo que sobre las muestras sin modificación superficial.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2. MARCO TEÓRICO.

La utilización de implantes dentales ha estado presente en la historia de la humanidad desde hace más de 4,500 años con evidencia antropológica que demuestra la utilización de alambres de oro en el antiguo Egipto, sin embargo la primer evidencia real de un implante exitoso es atribuida a los mayas quienes lograron reemplazar dientes con piezas de concha [21]. Con el avance de la tecnología, el uso de materiales con distintas propiedades comenzó a cambiar el panorama y los requisitos se fueron volviendo más amplios y exigentes [22] siendo uno de ellos la resistencia a la corrosión.

La búsqueda de estrategias para la mitigación de la corrosión no se ha detenido hasta la fecha con innovaciones que van de la protección catódica, anódica, recubrimientos, inhibidores de corrosión y modificación superficial con nanoestructuras [23-29].

2.1 CORROSIÓN.

El proceso de corrosión se debe a la interacción fisicoquímica entre un metal y el ambiente que lo rodea donde se expone a sustancias agresivas que lo deterioran y transforman química irreversible por su inestabilidad termodinámica y la tendencia molecular de volver a su estado termodinámicamente más estable ya que gran parte de los materiales metálicos sufren transformaciones al pasar de su estado natural en minerales al estado sólido como son comercializados y son expuestos a ambientes y sustancias agresivas que lo van deteriorando [30].

La capacidad de resistir la acción corrosiva del ambiente se denomina resistividad corrosiva o resistencia a la corrosión en ciertas condiciones pues en función de las condiciones un mismo metal puede ser resistente y en otras vulnerable por lo que no solo depende de las propiedades fisicoquímicas del metal sino de las propiedades del ambiente: temperatura, humedad relativa, velocidad de flujo, precipitación pluvial y de los agentes corrosivos.

El impacto de la corrosión en la economía de cada país es importante debido a que abarca un alto porcentaje del PIB, en Estados Unidos para el año 2016 se destinaron más de

\$1.1 mil billones de dólares [31], China más de \$310 billones para el 2015 [32] y Arabia Saudita \$900 millones para el 2003 [33] sin contar la terrible pérdida de vidas en accidentes causados por un mal control de la corrosión. Por lo anterior es fundamental la búsqueda de estrategias que reduzcan costos de producción y mantenimiento.

2.1.1 CLASIFICACIÓN DEL PROCESO DE CORROSIÓN.

La corrosión se puede clasificar de acuerdo al mecanismo y condiciones en las que ocurre así como por el tipo de deterioro que sufre el metal [34].

2.1.1.1 CLASIFICACIÓN POR SU MECANISMO.

- a. Corrosión química: Proceso espontaneo por la interacción del metal con el ambiente durante el cual la oxidación y reducción del agente oxidante se realizan en paralelo obedeciendo las leyes de cinética de reacciones heterogéneas, ocurre a altas temperaturas en atmósferas secas y en presencia de gases, oxígeno, amoníaco, cloro o productos de combustión y en líquidos no electrolitos como petróleo, gasolina, etc.
- b. Corrosión electroquímica: Interacción del metal en un medio electrolítico que es capaz de transportar masa y transferencia de carga, iones y electrones, obedeciendo las leyes de reacciones heterogéneas electroquímicas. La velocidad de corrosión es variable en función de la acidez, temperatura, presencia de oxígeno, bacteria, entre otros factores [35].

2.1.1.2 CLASIFICACION TIPO DE DETERIORO.

Los tipos de corrosión pueden clasificarse de acuerdo a su mecanismo de acción y evaluación visual con microscopio por sus respectivas y reconocibles características físicas. En la **Figura 2** se presenta dicha clasificación.

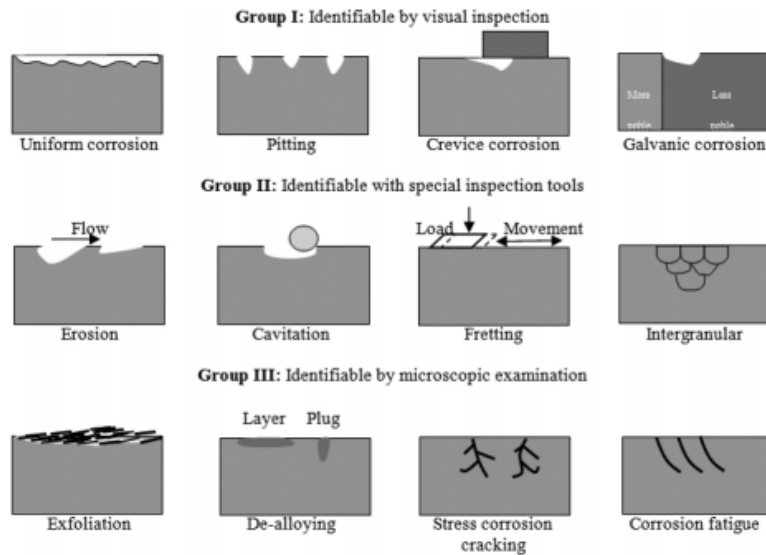


Figura 1. Clasificación de los diferentes tipos de corrosión. **Grupo I:** Identificable de manera visual, corrosión uniforme, picadura, hendidura y galvánica; **Grupo II:** Identificables con herramientas de inspección, corrosión por erosión, por cavitación, por desgaste e intergranular; **Grupo III:** Identificable por examen microscópico, corrosión por exfoliación, desaleación, bajo tensión y fatiga [35].

- **Corrosión uniforme:** se caracteriza por presentar un ataque homogéneo sobre la superficie metálica expuesta al ambiente agresivo y se presenta una reducción en su grosor.
- **Corrosión por picadura:** mecanismo de corrosión localizada que se asocia a diversos fenómenos como la CIM, corrosión bajo tensión y se caracteriza por la pérdida de metal en ciertas zonas del sustrato. Las picaduras suelen encontrarse cubiertas por los productos de corrosión y/o biopelícula por lo que es complicada su detección temprana lo que genera grandes costos para la industria. Las particularidades de su desarrollo suelen ser:
 - El ataque es sobre zonas discretas y se encuentran aisladas muy cerca de ellas dando apariencia de rugosidad.
 - Normalmente ocurren en la superficie superior y crecen orientadas a la fuerza de gravedad.
 - En el mayor de los casos requieren de un tiempo de crecimiento previo antes de ser visibles.
 - Soluciones electrolíticas estancadas favorecen su aparición.
 - Se da en prácticamente en cualquier tipo de solución electrolítica sin embargo en soluciones con iones haluros e hipocloritos el ataque es más agresivo.

- **Corrosión por hendidura:** ocurre en pequeños huecos que se originan por la unión de metal-no metal donde se puede depositar el electrolito pero el flujo del mismo no ocurre y una vez que inicia el ataque se desarrolla a gran velocidad.
- **Corrosión galvánica:** se presenta por el contacto de metales disimilares siendo uno más noble que el otro en presencia de un electrolito donde hay un proceso de oxidación reducción.
- **Corrosión por erosión:** las fuerzas mecánicas que ejerce el electrolito, velocidad, turbulencia, solidos suspendidos, temperatura, lo deterioran al remover las capas superficiales y exponer zonas anódicas del metal ante la solución por lo que la formación de surcos, de ligeras depresiones donde se promueve la acumulación de especies agresivas que aumentan la velocidad de corrosión al formar otros tipos como picaduras, fricción o fatiga.
- **Corrosión por cavitación:** ocurre cuando burbujas de vapor colapsan sobre la superficie metálica, aumenta la presión y en presencia de especies agresivas se daña la superficie.
- **Corrosión por desgaste:** se presenta en uniones, coyunturas donde hay un ligero movimiento, de nanómetros a micrómetros, y se somete a una carga la cual oxida las superficies para después desprenderse manteniendo activa la zona promoviendo el desgaste.
- **Corrosión intergranular:** tipo de corrosión localizada en los límites de grano por lo que la dureza y ductilidad se ve comprometida al ser un ataque rápido causando fallas.
- **Corrosión selectiva:** ocurre en aleaciones donde un metal es más noble que el otro y al momento del ataque se comienza a desprender promoviendo la formación de poros con baja resistencia y ductilidad.
- **Corrosión bajo tensión:** la aparición de grietas por fuerzas de tensión y cargas tanto internas como externas genera zonas frágiles, capas de óxido más opacas y oscuras que la recubren hasta que se fractura el material.
- **Corrosión por fatiga:** se combinan las grietas en un ángulo cerca de los 45° de la tensión ejercida sobre el metal lo que genera picaduras y surcos donde el deterioro aumenta hasta el punto en el que la adsorción y deposición de especies agresivas terminan por fragilizar el material.

2.1.2 CORROSIÓN ELECTROQUÍMICA.

De la interacción entre metal/ambiente ocurren dos tipos de reacciones: **Rx anódica** y **catódica**. La Rx anódica es una Rx de oxidación que disuelve al metal liberando electrones transformándolo en productos de corrosión disueltos o insolubles (óxidos, hidróxidos, sulfatos, etc.) en áreas llamadas ánodos, ecuación (1), mientras que en la Rx catódica las especies oxidantes reciben los electrones de la Rx anódica, ecuación (2), en áreas llamadas cátodos. En la **Figura 1** se presenta un ejemplo de corrosión en una superficie de hierro con las zonas anódicas y catódicas del metal, la especie oxidante, oxígeno, y la formación de óxido de hierro conocido como herrumbre.

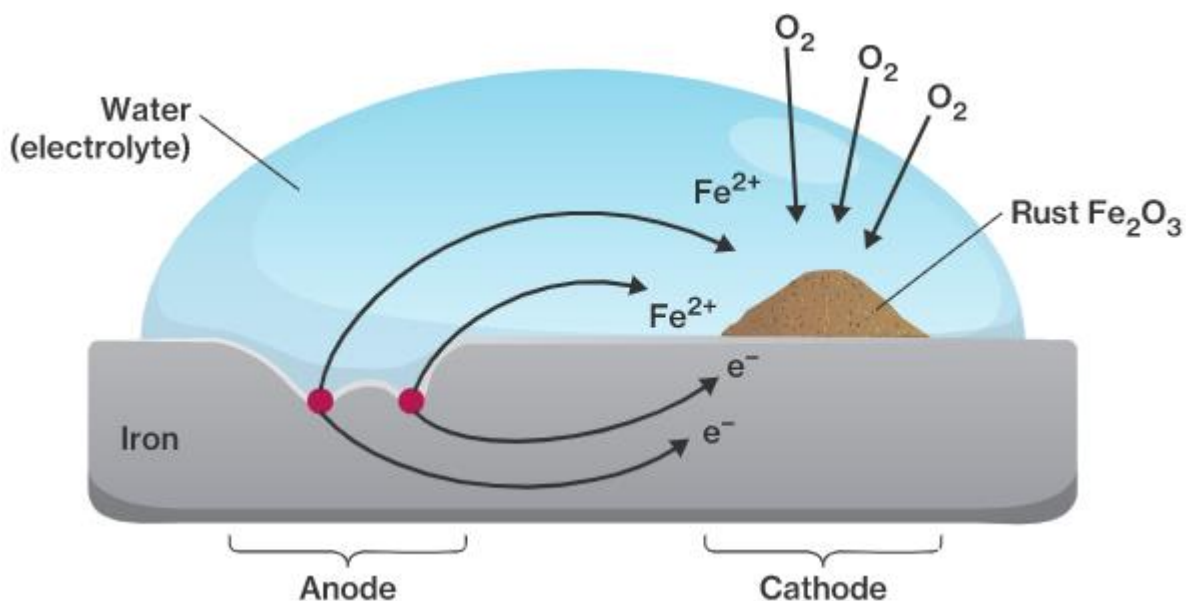


Figura 2. Corrosión de hierro en contacto con electrolito con zonas anódicas y catódicas [36].

La formación de una capa de óxido sobre la superficie de los metales puede retardar la corrosión al ser productos de corrosión insolubles que protegen al sustrato de ser atacado, tal como el Ti que tiene la capacidad de formar una barrera densa de TiO_2 en cuanto la superficie entra en contacto con oxígeno es por ello que cuando se llega a remover por algún

tipo de ataque se vuelve a formar inmediatamente mientras haya presencia de oxígeno en el ambiente.

En la mayoría de los procesos de corrosión electroquímica solo ocurre una Rx anódica, la disolución del metal, sin embargo se pueden presentar más de una Rx catódica y las más importantes se expresan a continuación.

- Reducción de oxígeno en soluciones neutrales o alcalinas.



- Reducción de oxígeno en soluciones ácidas.



- Evolución de hidrógeno.



- Reducción de hidrógeno en soluciones ácidas.



2.1.3 TERMODINÁMICA DE CORROSIÓN.

Uno de los parámetros termodinámicos que ayudan a predecir la tendencia a regresar a su estado energético más estable es la fuerza electromotriz de cada metal la cual se obtiene al sumergir en una solución que contiene sus mismas sales tomando mediciones del potencial en equilibrio en condiciones de temperatura, presión y concentraciones de electrolito estrictas. A este conjunto de condiciones se les denomina estándar y se toma como punto de referencia el valor del electrodo estándar de hidrógeno, SHE, donde en un electrodo de platino se obtiene el equilibrio. La **Tabla 1** presenta los Potenciales Estándar, $E_p^0_M$, de diversos metales en soluciones acuosas a 25 °C con respecto a SHE.

Otro parámetro son las series de fem que incluyen el potencial de reducción de electrodo de los metales los cuales se clasifican de acuerdo a su tendencia a la corrosión cuando se encuentran en contacto con otro metal sin embargo la información no es sobre el proceso ni las reacciones que se llevarán a cabo entre ambos metales. Si se quiere determinar la espontaneidad de una Rx es necesario obtener el valor de la energía libre de Gibbs (ΔG).

Tabla 1. Potencial Estándar, $E_p^0_M$, vs SHE de metales en soluciones acuosas a 25 °C [1].

Metal	$E_p^0_M$	Metal	$E_p^0_M$	Metal	$E_p^0_M$
Eu/Eu ²⁺	-3.4	Pu/Pu ³⁺	-2.27	Ti/Ti ⁺	-0.336
Li/Li ⁺	-3.045	Be/Be ²⁺	-1.85	Co/Co ²⁺	-0.277
Rb/Rb ⁺	-2.925	U/U ³⁺	-1.8	Sn/Sn ²⁺	-0.136
K/K ⁺	-2.925	Al/Al ³⁺	-1.66	Fe/Fe ³⁺	-0.036
Ca/Ca ⁺	-2.87	Zr/Zr ³⁺	-1.53	H ₂ /H ⁺	0
La/La ³⁺	-2.52	Ti/Ti ³⁺	-1.21	Sb/Sb ³⁺	0.24
Tb/Tb ³⁺	-2.39	Cr/Cr ²⁺	-0.913	Cu/Cu ⁺	0.521
Y/Y ³⁺	-2.37	Fe/Fe ²⁺	-0.44	Ag/Ag ⁺	0.799

2.1.3.1 ENERGÍA LIBRE DE GIBBS (ΔG).

$$\Delta G = -nFE \quad (7)$$

Donde n es el número de moles de e^- que fluyen en el proceso de corrosión, F es la constante de Faraday que equivale a la carga de 1 mol de e^- , 96.494 Coulomb, y E es la fem de la celda de corrosión que puede ser calculada con la ecuación de Nernst.

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_O}{C_R} \quad (8)$$

R es la constante de gases, $8.314 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$, T es la temperatura en Kelvin, E^0 es la fem en condiciones estándar, C_O es la actividad de producto y C_R es la actividad de reactante que se calculan mediante la fórmula 9:

$$a = \gamma \cdot c \quad (9)$$

Donde a es la actividad, c es la concentración real y γ es el coeficiente de actividad. Dicho coeficiente de actividad es igual 1 mientras no cambie la concentración para sólidos, especies y electrones. Para gases se utilizan valores de presión parcial en lugar de

coeficiente de actividad y se convierte $-\frac{RT}{nF}$ por $0.0592 \frac{L \cdot atm}{mol \cdot K}$ en condiciones estándar. La

Tabla 2 contiene los una serie de fem con la energía libre de Gibbs.

Tabla 2. Nivel de energía de metales después de su extracción de minerales respecto al valor de $E_{p_{ME}}^0$ vs SHE a 25 °C [1].

Nivel de energía del metal	Metal	$E_{p_M}^0$
Alto nivel de energía libre de Gibbs (alta tendencia a la corrosión)	Potasio (K)	-2.92
	Magnesio (Mg)	-2.34
	Berilio (Be)	-1.70
	Aluminio (Al)	-1.67
	Manganeso (Mn)	-1.05
	Zinc (Zn)	-0.76
	Cromo (Cr)	-0.71
	Hierro (Fe)	-0.44
	Cadmio (Cd)	-0.40
	Cobalto (Co)	-0.34
	Níquel (Ni)	-0.27
	Estaño (Sn)	-0.25
	Bajo nivel de energía libre de Gibbs (baja tendencia a la corrosión)	$2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2 \uparrow$
Cobre (Cu)		0.34
Plata (Ag)		0.80
Paladio (Pd)		0.83
Platino (Pt)		1.2
Oro (Au)		1.42

2.1.4 CINÉTICA DE CORROSIÓN.

La velocidad o cinética de corrosión indica la tasa de pérdida del metal por unidad de tiempo ante ciertas condiciones. Cuando un metal se encuentra en una solución con sus mismos iones se encuentra equilibrio y el potencial estándar es $E_{p_{M/M^2}}^0$ por lo que no hay transformación química.



Sin embargo ocurren reacciones continuas y simultáneas de oxidación y reducción que disuelven y depositan el metal sobre sí mismo. El flujo de electrones generados y consumidos en las reacciones de oxidación reducción se encuentran en equilibrio y se denomina densidad de corriente de intercambio, i_0 , y es una característica de un metal en

equilibrio. En la ecuación 11 se tiene que la velocidad de oxidación, \vec{i} , y de reducción, \hat{i} , poseen la misma magnitud con sentido opuesto.

$$\vec{i} = \hat{i} = i_0 \quad (11)$$

En caso de una perturbación en el equilibrio las velocidades se verían modificadas produciendo un movimiento de electrones donde la magnitud de la corriente indicará el grado en que la velocidad de oxidación excede la de reducción. La velocidad del proceso se señala en la ecuación 12.

$$i_a = \vec{i} - \hat{i} \quad (12)$$

De acuerdo a la ecuación que postuló el científico suizo Julius Tafel [37] el flujo neto de corriente varía con la desviación del potencial de equilibrio,

$$\eta = a + b \log i_{neto} \quad (13)$$

Donde η es el sobrepotencial que se define según la ecuación 14.

$$\eta = E_{aplicado} - E_{equilibrio} \quad (14)$$

De esta forma queda definido η como la magnitud de la desviación del potencial del sistema a partir de su valor de equilibrio, i_{neto} como la densidad de corriente neta anódica o catódica según sea el caso, a y b son constantes. Con la información anterior se obtienen las siguientes relaciones

- Para una Rx anódica donde $i > 0$.

$$\eta_a = a + b \log i, (b > 0) \quad (15)$$

- Para una reducción catódica donde $i < 0$.

$$\eta_c = a' + b' \log|i|, (b' > 0) \quad (16)$$

La relación de Tafel [37] aporta información cuantitativa del proceso de corrosión con la extrapolación de las pendientes a y b donde se observa la magnitud de la corriente anódica y catódica de cada metal en ciertas condiciones del medio electrolítico.

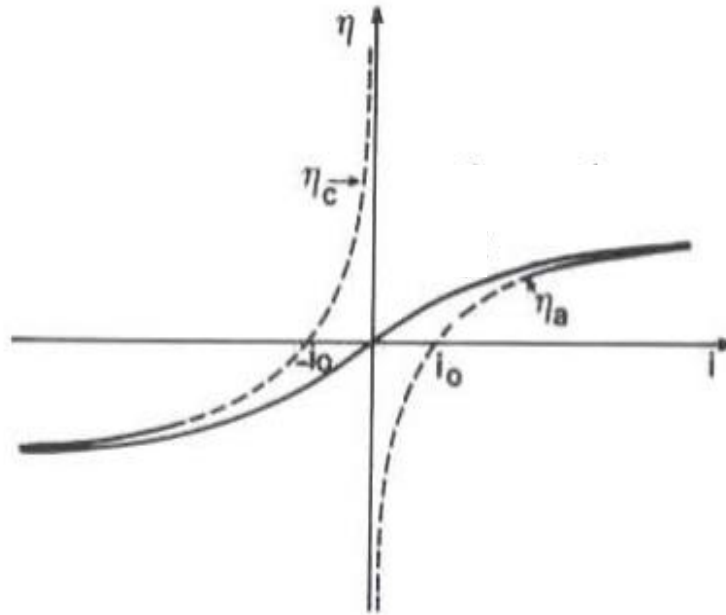


Figura 3. Curva de Tafel con parte anódica y catódica [37].

2.1.5 POLARIZACIÓN.

La polarización es el cambio en el potencial de electrodo por las reacciones de oxidación reducción que tienen lugar cuando el metal no se encuentra en equilibrio en una solución electrolítica que incluye varias etapas: transporte de agentes hacia la interfase metal-electrolito, transporte de cargas en la superficie del metal, conducción de los productos de las reacciones desde la interfase a la solución. La etapa más lenta del proceso es la que define la velocidad del proceso.

2.1.5.1 POLARIZACIÓN ANÓDICA.

La **Figura 4** muestra un gráfico de una curva de polarización anódica que se presenta en soluciones con un pH bajo y si el metal es capaz de formar películas de óxido en su superficie. Se observan 3 zonas muy características con comportamientos distintos entre ellas.

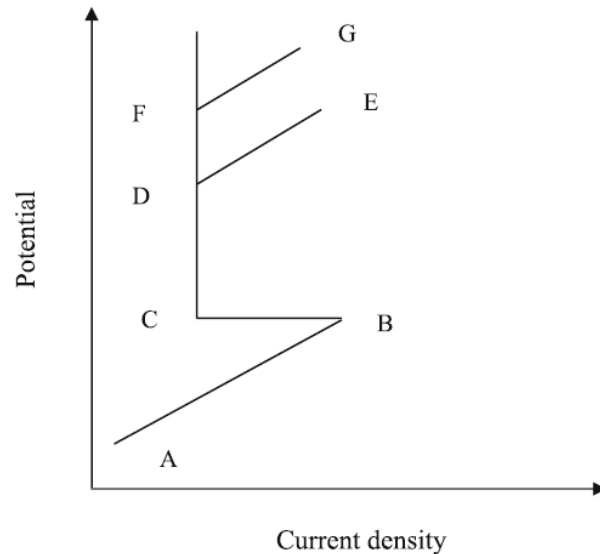


Figura 4. Curva anódica con sus 3 zonas características [38].

- A → B: Hay un aumento positivo en la magnitud de la densidad de corriente anódica que libera iones del metal a la solución.
- B → C: Hay una formación de óxido en la superficie que evita la continua disolución del metal y este se pasiva, la corriente disminuye.
- C → D: Ocurre un aumento en el potencial debido al estado pasivo del metal.
- D: A potenciales altos hay 3 posibilidades que dependen de la conductividad de la capa de productos de corrosión.
 - D → E: Si tiene buena conductividad eléctrica puede oxidarse a especies solubles, la disolución se reinicia y el metal entra a un estado trans-pasivo. Un ejemplo de este comportamiento se presenta en la continua disolución de la película pasiva de cromo, $Cr_2O_3[Cr(III)]$, a cromato, $CrO_4^{2-}[Cr(VI)]$
 - F → G: Si es buen conductor electrónico puede ocurrir la Rx de evolución de oxígeno.

- F → H: Si es un débil conductor se llegará a un alto potencial anódico con alta densidad de corriente lo que puede ser aprovechado para el proceso de anodizado electroquímico para proteger ciertos metales.

Como se observó el potencial se vuelve positivo favoreciendo las reacciones de disolución del metal al medio electrolítico.

2.1.5.2 POLARIZACIÓN CATÓDICA.

Previamente se mencionó que contrario a la Rx anódica existen un número considerable de reacciones catódicas que dependen de las condiciones del electrolito y a pesar que en la **Figura 5** se representan como líneas punteadas sino ligeramente curvas en función de si sea evolución de oxígeno, de hidrógeno u otra Rx. En Figura 5 la Rx número 2 cuenta con una tasa mayor que la número 1, $I_2 > I_1$ y en la Rx catódica 3 se llega a la pasivación del metal.

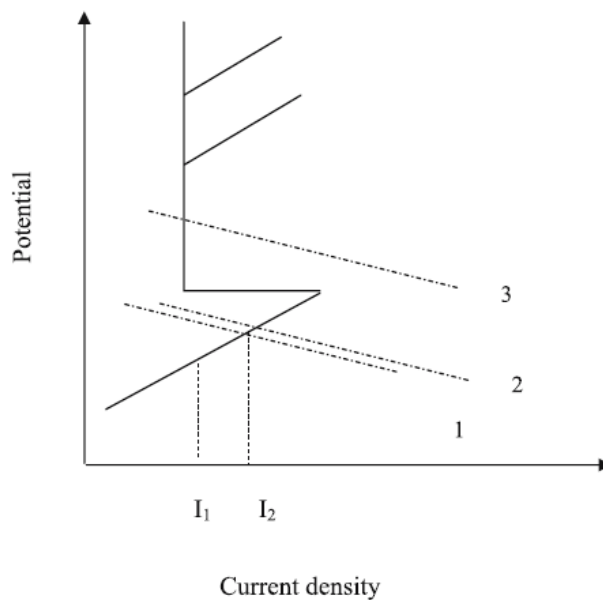


Figura 5. Polarización catódica en líneas punteadas 1, 2 y 3 que pueden ocurrir en función del potencial [38].

2.1.6 EVALUACIÓN DE LA CORROSIÓN.

La evaluación permite la determinar la resistencia a la corrosión de metales, la eficiencia de sistemas de protección contra la corrosión, agresividad del medio y formación de productos de corrosión a ambientes específicos. Dicha evaluación se divide en 3 grupos en función del tipo de ambiente a estudiar.

- I. De exposición prolongada: se realizan en condiciones naturales donde el metal se ve expuesto a cierto ambiente corrosivo, puede durar años y es un método confiable debido a que la influencia directa del ambiente tuvo su influencia sin alteración. Este método está regulado por estándares internacionales de ISO, ASTM y NACE.
- II. En atmósfera artificial o de laboratorio: son ensayos acelerados donde la muestra se somete a condiciones severas con la finalidad de obtener resultados en un tiempo menor comparado con los de exposición prolongada, es por ello que la temperatura y concentración del agente corrosivo se modifica para lograrlo. Los resultados deben ser tomados con precaución para evitar que el proceso no se haya visto alterado.
- III. En condiciones de operación: se llevan a cabo en equipos, piezas y maquinas en condiciones de servicio reales. Arroja resultados muy confiables sin embargo requieren de un tiempo prolongado para obtenerlos.

2.1.6.1 OBJETIVOS DE LA EVALUACIÓN.

Los propósitos que se buscan al realizar una evaluación de corrosión son los siguientes.

- 1) Determinar el mecanismo y carácter del proceso de corrosión.
- 2) Determinar la agresividad del ambiente, tipo de despolarizador que facilita el proceso de corrosión.
- 3) Determinar la influencia de las propiedades físicas de la muestra y externos sobre el proceso de corrosión
- 4) Selección del material con las mejores propiedades de resistencia a la corrosión.
- 5) Control de calidad de materiales que tuvieron fallas.
- 6) Pronóstico de vida útil de instalaciones, equipos, estructuras, etc.

2.2 CORROSIÓN INDUCIDA POR MICROORGANISMOS.

El fenómeno de biocorrosión, corrosión biológica o CIM es un tipo de corrosión localizada donde el metabolismo de los microorganismos tiene influencia sobre la cinética del deterioro del metal al encontrarse adheridos a su superficie en forma de biopelícula promoviendo condiciones corrosivas al formar parte de reacciones anódicas y catódicas al ser capaces de generar gradientes de concentración, transferencia de masa, de iones, de electrones y disminución localizada de pH por producción de ácidos por catabolismo de azúcares [39-41].

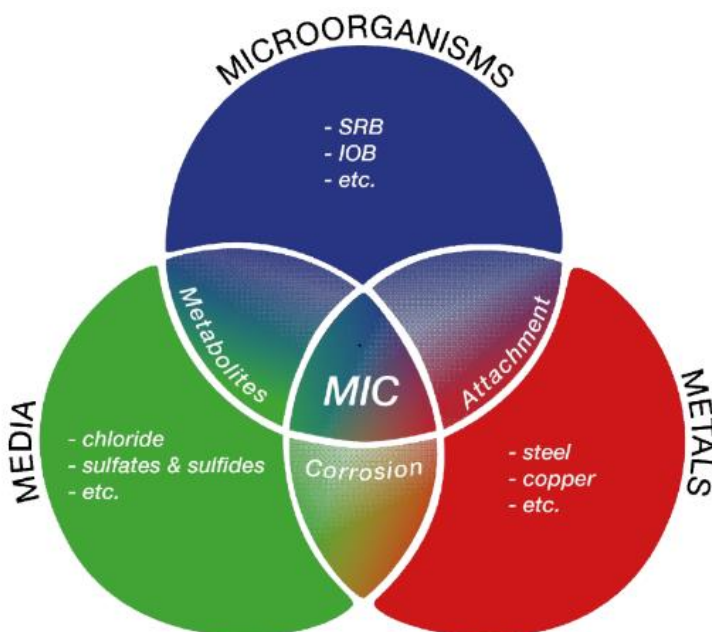


Figura 6. Condiciones presentes en la CIM [41].

Los microorganismos pueden afectar directa o indirectamente la corrosión prácticamente en cualquier ambiente ya sea suelo, agua de mar, urbano, sin embargo al ser organismos vivos cuentan con mayores requerimientos: presencia o ausencia de oxígeno, fuente de energía, fuente de carbono, donadores y aceptores de electrones y agua [35,42]. En la **Tabla 3** se presenta una clasificación de los microorganismos.

Tabla 3. Clasificación de microorganismos según el tipo de energía, fuente de carbono, donador y aceptor de electrones [38].

Si su...	La provee...	Se denomina
----------	--------------	-------------

Fuente de Energía	Luz	Fotótrofo
	Sustancias Químicas	Quimiótrofo
Fuente de Carbono	CO ₂	Autótrofo
	Sustancias Orgánicas	Heterótrofo
Donador de electrones (que se oxida)	Sustancias Inorgánicas	Litótrofo
	Sustancias Orgánicas	Organótrofo
Aceptor de electrones (que se reduce)	Oxígeno	Aerobio
	SO ₄ ²⁻ , CO ₂	Anaerobio
	NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻	Anóxico

La formación de una biopelícula es un proceso de crecimiento de microorganismos sobre una superficie con características distintas a su crecimiento sésil o planctónico, de acuerdo Shukla, S. *et al.* (2017) “Las biopelículas constituyen un consorcio de elementos bióticos como bacterias, cianobacterias y algas adheridas a un sustrato mediante una matriz de polisacáridos extracelulares que atrapan materia soluble, inmoviliza enzimas extracelulares y actúa como un depósito de nutrientes y elementos inorgánicos”. Las células sésiles y de biopelículas se diferencian fenotípicamente por la estructura mucilaginososa que las protege de perturbaciones externas como agentes antimicrobianos por la limitada capacidad de difusión que existe a través de la matriz de EPS (exopolisacáridos, proteínas, lípidos, ADN extracelular), coordinación de actividad comunitaria mediante señalización química, QS, para mantener su homeostasis y aumentan sus factores de virulencia [12, 43-49].

2.2.1 FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA.

El desarrollo de una biopelícula cuenta con ciertas diferencias en función de la membrana celular de las bacterias y hongos pero hay consenso en 4 fases principales que se muestran en la **Figura 7** [50-51]:

- I. *Adhesión reversible*: La fase inicial puede ser pasiva o activa si los microorganismos cuentan con motiles o transportados por el medio y las propiedades fisicoquímica de la célula definirán si se unirá o no mediante las interacciones dipolares y las fuerzas de Van der Waals. Las bacterias en soluciones coloidales poseen carga negativa lo cual

crea un problema en el proceso de adsorción por la carga negativa del sustrato sin embargo no hay contacto directo con la célula sino un acercamiento donde las proteínas de superficie, fimbria, en condiciones de humedad juegan un papel importante al extenderse del cuerpo microbiológico y adherirse al sustrato.

- II. *Adsorción irreversible:* Se ha demostrado que fimbria tipo I tiene un papel importante en la adsorción irreversible venciendo las fuerzas electroestáticas de repulsión al vencer la barrera de energía necesaria y que las células entren al mínimo primario. Con interacciones dipolo-dipolo e hidrofóbicas entre las células, flagelos refuerzan una asociación irreversible. En este punto hay una mayor secreción de EPS que comienza a estabilizar las células en una estructura de marco de referencia para la biopelícula.
- III. *Formación de la biopelícula:* Mediante la acumulación intercelular dentro de la matriz de EPS desarrollándose en tres dimensiones, señalización química por QS, acumulación de proteínas específicas como las asociadas pared-anclada celular (CWA), adhesina polisacárida intercelular (PIA) y avance de las fases previas promueven la maduración de la biopelícula.
- IV. *Dispersión y desprendimiento de la biopelícula:* Una vez que se encuentra madura hay desprendimiento de microorganismos para su dispersión y colonización de otros nichos donde ocurrirá un proceso similar.

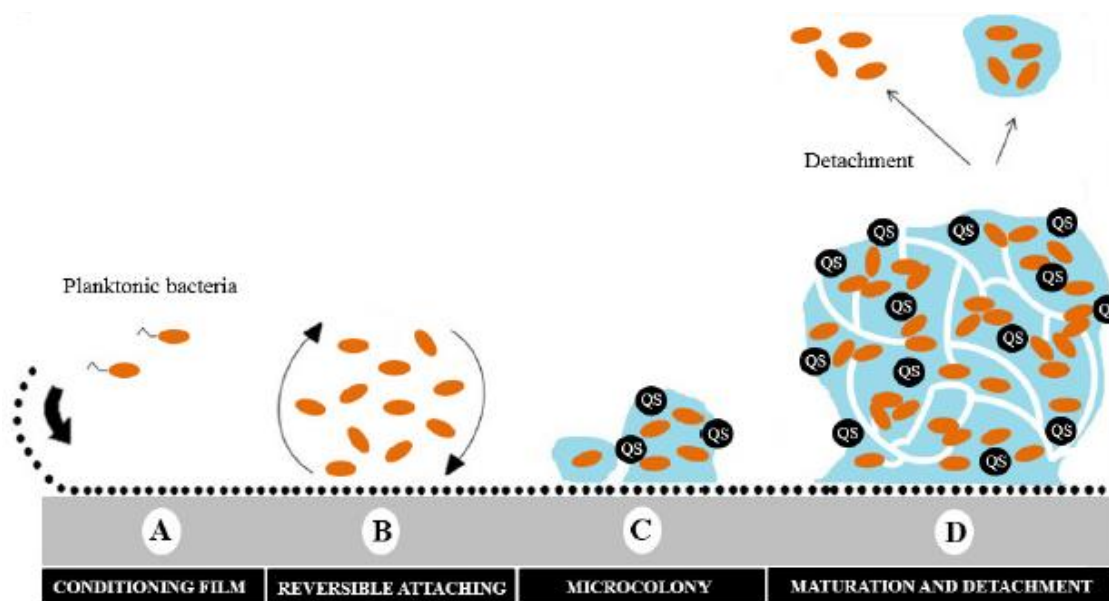


Figura 7. Etapas de la formación de biopelícula sobre una superficie [47].

La compleja estructura de la matriz de EPS genera microambientes con distintos valores de pH, concentración de oxígeno y nutrientes que generan una heterogeneidad metabólica de cada población microbiológica en distintas regiones de la biopelícula.

2.2.2 IMPACTO DE *C. albicans* EN CIM.

El estudio de especies fúngicas que influyen en la CIM ha sido opacado por las abundantes investigaciones y descripciones de los procesos de adherencia y formación de biopelícula de las bacterias reductoras de sulfato, reductoras de hierro, reductoras de nitratos, oxidantes de hierro y sulfuro [52-54], no obstante la influencia de hongos en el deterioro de superficies metálicas es sobresaliente y un área de oportunidad para futuras investigaciones [55-57].

C. albicans es un microorganismo que se encuentra en el cuerpo humano en personas completamente sanas sin causarles ningún tipo de patología empero su impacto en biomateriales es causante de pérdida de implantes y de vidas en el peor de los casos [58-60].

La formación de biopelícula por hongos sigue un comportamiento similar a las bacterianas, inician por la adhesión de células a un sustrato al interactuar las levaduras o conidios con adhesinas específicas de superficie y una vez que inicia la proliferación celular ocurre un cambio de morfología a hifas que le dan un aumento en la cohesión y uniformidad en comparación con la estructura similar a un hongo de las bacterias. El modelo de estudio de la dispersión de la biopelícula es *C. albicans* y se ha descrito que ocurre durante el ciclo de crecimiento y suelen liberarse levaduras que se encuentran libres en la EPS [51]. La **Figura 8** muestra un modelo de biopelícula de *C. albicans* que en su mayoría se compone de hifas productoras de levaduras las cuales se encuentran en los costados siendo las que se ven favorecidas en su dispersión.

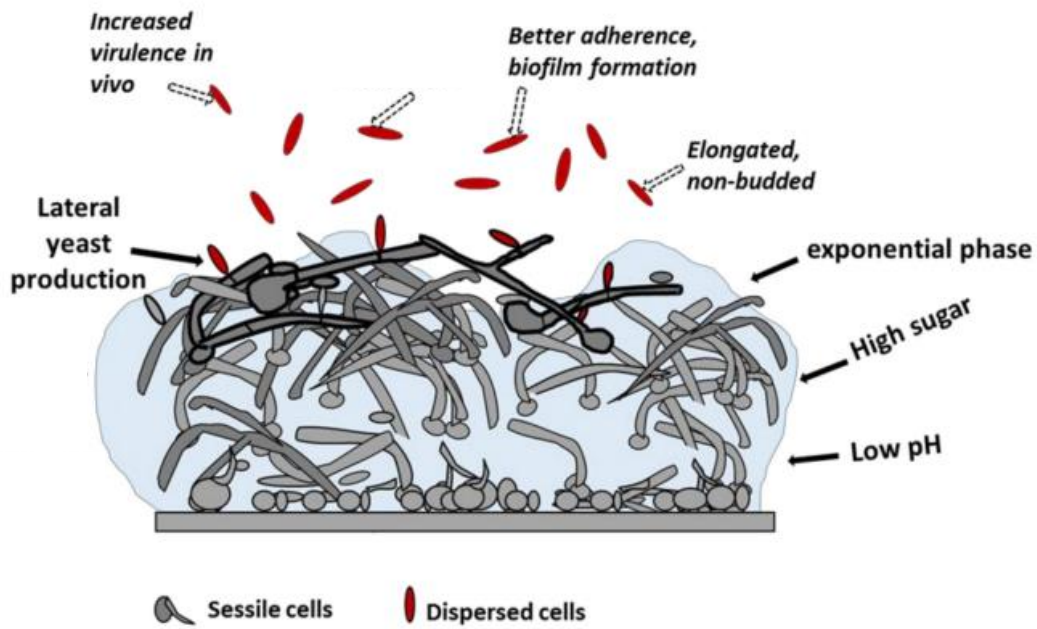


Figura 8. Modelo de biopelícula fúngica de *C. albicans* [51].

De acuerdo a Uppuluri, P. *et al.* factores medioambientales modulan la dispersión de la biopelícula fúngica por variaciones en la fuente de carbono donde presenta comportamiento distinto con glucosa, maltosa, galactosa y PBS donde se ve reducida drásticamente así como de un balance entre la cantidad de hifas y levaduras.[61].

2.3 SÍNTESIS DE NANOTUBOS EN SUPERFICIE DE TITANIO.

Las propiedades físicas, químicas, ópticas, eléctricas, magnéticas y biológicas de compuestos o elementos en su nanoescala han dado paso a la innovación en el diseño de nuevas tecnologías en los últimos veinte años [62]. Existen diversas técnicas para las síntesis tanto químicas como físicas, una de ellas anodizado electroquímico dado que es una técnica controlable, con resultados reproducibles en un proceso sencillo que proporciona la ventaja de permitir diseñar las propiedades de los NTs como su morfología y distribución espacial al cuidar los parámetros del procedimiento: composición del electrolito, tiempo de anodizado, voltaje, temperatura, espacio entre el electrodo y la muestra [63-65].

La modificación superficial de materiales metálicos con nanoestructuras ha demostrado aumentar la proliferación de células precursoras de hueso en estudios *in vitro* [5-7, 68-69] así como una disminución en la adherencia de *C. albicans* a los nanotubos en

superficies de titanio provocando malformaciones morfológicas en sus protuberancias al igual que con bacterias patógenas [70-71].

El fundamento del anodizado electroquímico es el paso de corriente mediante un voltaje aplicado a una celda electroquímica, la cual contendrá el metal sustrato o muestra a modificar su morfología superficial que se denominará electrodo de trabajo, un electrolito, un contra-electrodo de material inerte como platino y una conexión física entre el electrodo de trabajo, muestra, y el contra-electrodo. En la **Figura 9** se muestra diagrama esquemático de la celda electroquímica con los elementos para el proceso de anodizado electroquímico y la **Figura 10** muestra un diagrama esquemático de la formación de NTs conforme transcurre el proceso.

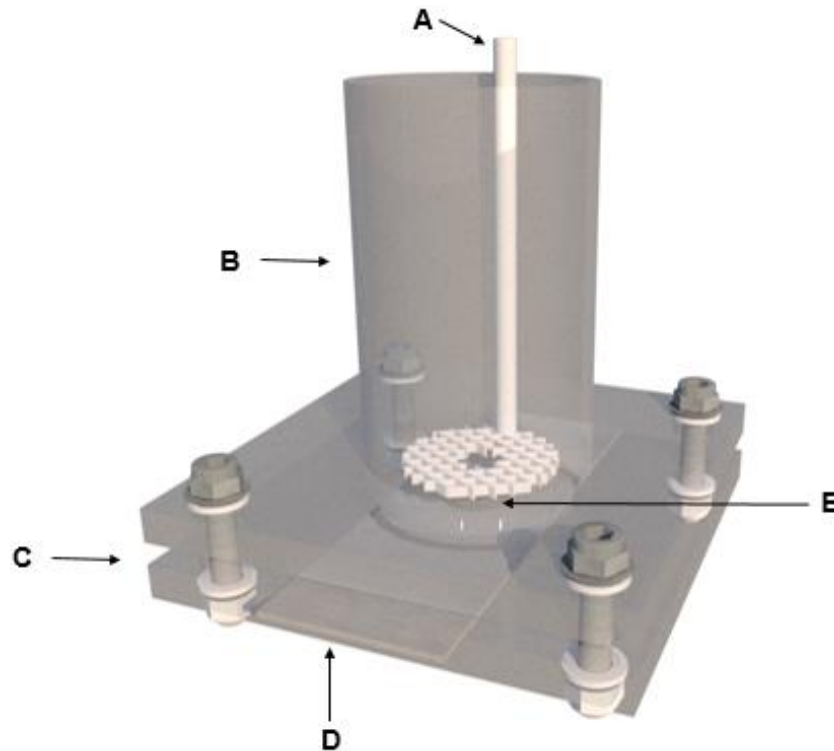


Figura 9. Diagrama esquemático de la celda electroquímica para el proceso de anodizado electroquímico. A) Contra-electrodo de platino, B) Contenedor para solución electrolítica, C) Base, D) Lámina de aluminio y E) Electrodo de trabajo.

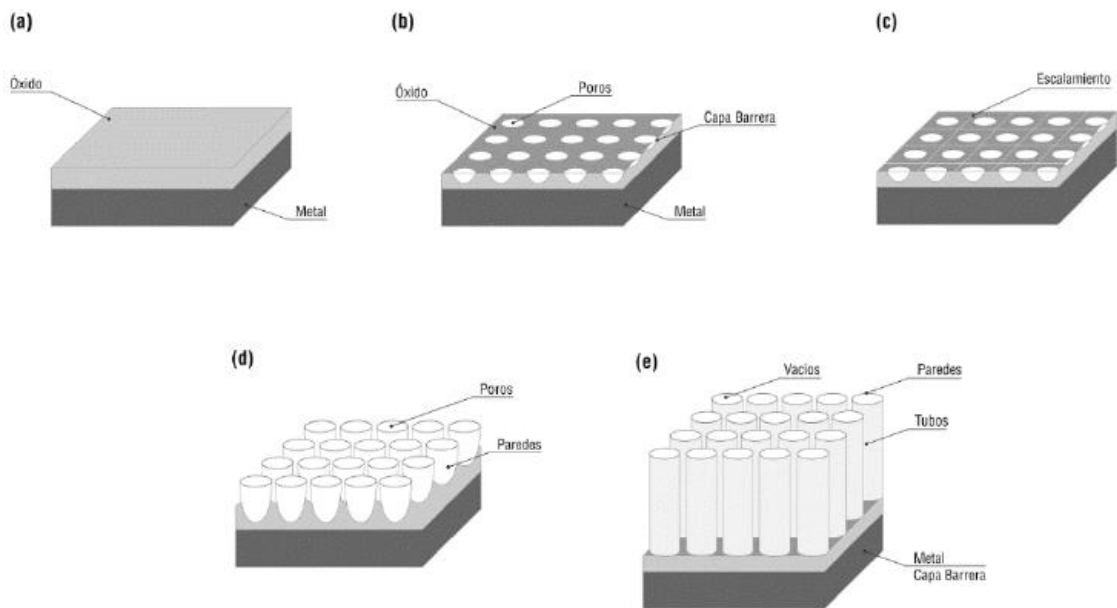
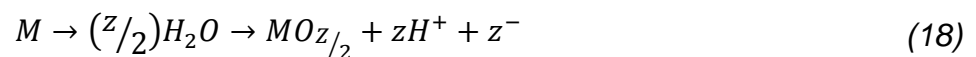
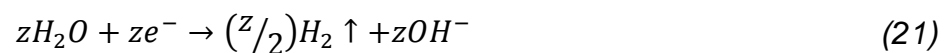


Figura 10. Diagrama esquemático de la evolución de nanotubos durante el proceso de anodizado electroquímico. (a) Formación de capa de óxido; (b) Formación de poros en la capa de óxido; (c) Escalamiento, formación entre los poros; (d) Crecimiento de los poros y escalamiento; (e) Matriz de nanotubos (Ti₂O) desarrollados [72].

El primer paso importante es la formación de la capa de óxido sobre la superficie del sustrato mediante la aplicación de un voltaje constante. Al contener iones de fluoruro en la solución electrolítica la capa formada obedecerá las reacciones siguientes:

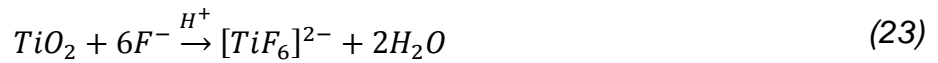


A la par ocurre la Rx de evolución de hidrógeno en el cátodo.



Al someter a la técnica superficies de Ti estarán involucrados la formación de cationes Ti⁴⁺ que reaccionarán con iones O²⁻ que se crearán por el campo asistido de H₂O de manera que los cationes y iones migrarán a la superficie del sustrato [19].

La solución que se utilizará para anodizar las muestras de Ti cuenta con fluoruros de manera que se formarán especies solubles en agua, $[TiF_6]^{2-}$, por lo que los cationes serán expulsados hacia la interface óxido-electrolito posterior a su migración a través de la capa de óxido mientras que el ataque electroquímico sobre la recién formada capa de TiO_2 .



El papel de los iones de fluoruro es mantener la capa de óxido delgada [73] al irse modificando la morfología superficial dejando poros en la capa de óxido debido a la inmediata solvatación de los cationes Ti^{4+} .

2.4 DENSIDAD MICROBIOLÓGICA.

La obtención de la densidad celular del medio de cultivo de cada uno de los microorganismos se obtendrá utilizando una técnica accesible, sencilla y económica la cual tiene se fundamenta en la medición de la densidad óptica (OD por sus siglas en inglés) de una muestra representativa del cultivo a 600 nanómetros mediante un espectrofotómetro [74].

El número de células presentes, N , en un volumen representativo del medio de cultivo (alícuota), V , nos da la densidad celular del microorganismo de interés.

$$\frac{N_{muestra}}{V_{muestra}} = Densidad\ celular \quad (24)$$

La ecuación (8) nos muestra que existe una relación proporcional entre la luz que dispersan las células microbianas a 600 nm en el volumen representativo del medio de cultivo y la densidad celular.

$$\frac{N_{muestra}}{V_{muestra}} \sim OD \quad (25)$$

De esta manera se puede decir que el valor de la densidad óptica en la alícuota del medio de cultivo nos dará un valor aproximado al número de microorganismos que contiene al multiplicarlo por el factor de dilución del volumen.

Para realizar la prueba se debe obtener una curva calibrada que se obtiene al agregar el volumen a trabajar del medio de cultivo estéril de cada microorganismo de interés al tubo del espectrofotómetro, se realiza la prueba y se registra el valor de absorbancia como el valor estándar a partir del cual se van a comparar los valores de los medios con crecimiento microbiano. Posteriormente, se agrega el medio con crecimiento al tubo del espectrofotómetro, se realiza la prueba y el valor obtenido se multiplica por el factor de dilución y así se obtiene la densidad óptica corregida del microorganismo a trabajar. Dicho valor deberá ser comparado con una base de datos de acuerdo al medio de cultivo y microorganismo para obtener el valor de la densidad celular en ese momento dado.

2.5 CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES.

La Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) brinda la capacidad de permitir una resolución mucho mayor comparada con la microscopía óptica, y es por esa razón, es una herramienta ampliamente utilizada para la caracterización de biomateriales y nanomateriales [75-76]. El funcionamiento de la microscopía electrónica se basa en un haz de electrones que choca o pasa a través de la muestra, requiere de un alto vacío y de ciertas características para su visualización las cuales se explicarán con mayor detalle en las siguientes secciones.

2.5.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.

El principio físico del SEM es la incidencia de un haz de electrones sobre la muestra dando información sobre su morfología de superficie con una muy alta resolución (~5 nm) al reflejar una variedad de electrones, secundarios, retrodispersados y rayos X. El microscopio cuenta con detectores específicos para cada uno de ellos los cuales proporcionan información distinta lo que permite una caracterización específica de la muestra más amplia.

Los electrones secundarios se producen por la dispersión inelástica y proveen las características topográficas de la superficie. Los electrones retrodispersados se dan por la dispersión elástica de los electrones y proporcionan información complementaria sobre la composición elemental de la muestra.



Figura 11. Equipo SEM marca Hitachi modelo S5200 [77].

Este tipo de microscopía requiere una preparación de muestra menos complicada que la requerida por el TEM (Microscopía Electrónica de Transmisión) de manera que puede utilizarse para evaluar y caracterizar el proceso de adhesión celular y microbiana así como su proliferación sobre las superficies de la aleación de Ti.

2.5.2 ESPECTROSCOPIA DE DISPERSION DE ENERGIA DE RAYOS X.

El equipo de SEM suele contar con un detector de energía dispersa de rayos X (EDS) para un análisis elemental de la superficie de la muestra. El fenómeno ocurre de forma paralela a la liberación de electrones secundarios y retrodispersados al incidir el haz de electrones sobre la muestra, sin embargo es ligeramente más profunda la interacción que se genera. Los electrones liberados son de las capas más internas de los átomos, pues dejan un espacio vacío que será ocupado por un electrón del mismo haz que penetrará y ocupará dicho espacio. Lo que existirá una diferencia de energía que será liberada en forma de rayos X la cual es característica de la mayoría de los elementos químicos que la componen.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

En este capítulo se describe detalladamente la metodología utilizada durante la presente investigación.

3.1 OBTENCIÓN DE MODELO MICROBIOLÓGICO.

Para obtener el modelo microbiológico de interés, *C. albicans*, se utilizó un medio de cultivo selectivo y diferencial de hongos patógenos con un sustrato cromogénico, β -glucosaminidasa [78-79], el cual al ser degradado por enzimas específicas de cada especie fúngica liberan compuestos que dan a las colonias distintos colores para su fácil diferenciación e identificación.

3.1.1 AISLAMIENTO DE *C. albicans*.

La cepa de *C. albicans* se obtuvo de una muestra clínica de paciente en tratamiento odontológico al cual se le realizó un frotis en la zona afectada con un aplicador de madera con punta de algodón estéril, se almacenó en tubo de 15 ml con CSD y en condiciones asépticas, se sembró en agar cromogénico e incubó a 37 °C por 24 horas en condiciones aerobias. Pasado el tiempo de incubación se aislaron con asa microbiológica esterilizada a fuego en mechero de Bunsen 2 colonias que presentaron una coloración azul-verde, se transfirió a tubo de 1.5 ml con 1 ml de CSD y se incubó a 37 °C por 24 horas para el desarrollo de la biomasa deseada. Posteriormente, se tomaron 20 µl, se vertieron en agar papa-dextrosa y se realizó un estriado en 3 cuadrantes para la obtención de un cultivo axénico con colonias aisladas. El proceso anterior se visualiza con la **Figura 12** [80].

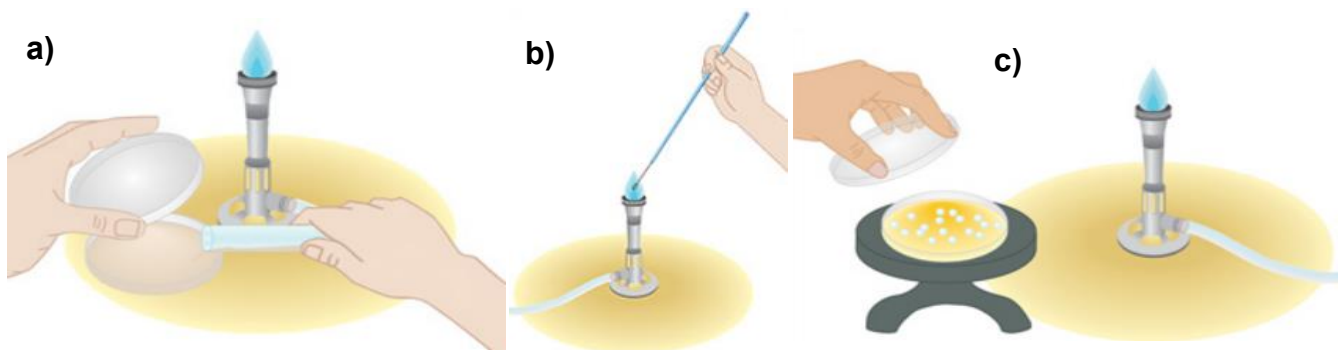


Figura 12. Condiciones de trabajo asépticas para microbiología. a) El mechero de Bunsen esteriliza el ambiente que se muestra en zona amarilla y se vierte medio sobre caja Petri, b) Con flama de mechero se esteriliza asa microbiológica y c) Se visualiza crecimiento microbológico [80].

3.1.2 MANTENIMIENTO DE LA CEPA.

Una vez obtenido el cultivo axénico de *C. albicans* en APD, la cepa es estuvo resemebrando cada 72 horas e incubando a 37 °C en condiciones aerobias manteniendo sumo cuidado en su tasa de crecimiento, tamaño de las colonias, su coloración y morfología para evitar una posible contaminación.

Como parte del cepario del laboratorio de Biología Molecular y Cáncer, la cepa aislada de *C. albicans* fue sembrada con hisopo estéril en tubo con agar papa-dextrosa inclinado

para preservarla por un periodo de tiempo mayor, 6 meses, a temperatura ambiente una vez haya proliferado en incubación a 37 °C.

3.2 PREPARACIÓN DE SUPERFICIES DE Ti.

Las muestras recibidas de Ti, **Figura 13**, y Ti6Al4V fueron láminas con dimensiones de 300 mm de largo, 100 mm de ancho y espesor de 0.1 mm con un acabado sin incrustaciones no deseadas, desincrustado, de acuerdo al estándar ASTM B265-17 [81]. Dichas láminas se cortaron en cuadrados con dimensiones de **118 mm** y **área de 139.24 cm²** con el fin de utilizar cajas de 12 pocillos para los ensayos microbiológicos y para la celda electroquímica donde se realizó la modificación de las superficies de los especímenes de Ti.

Las muestras de Ti cortadas fueron tratadas de acuerdo al estándar ASTM G1 [82] siendo sumergidas en alcohol isopropílico por 5 minutos para eliminar restos de suciedad y partículas orgánicas por su manipulación, posteriormente se enjuagó en 3 ocasiones con abundante agua destilada para eliminar trazas de alcohol isopropílico y partículas indeseadas y finalmente se enjuagaron con alcohol isopropílico limpio y se dejaron secar a temperatura ambiente por 1 hora previo a su modificación por anodizado electroquímico.

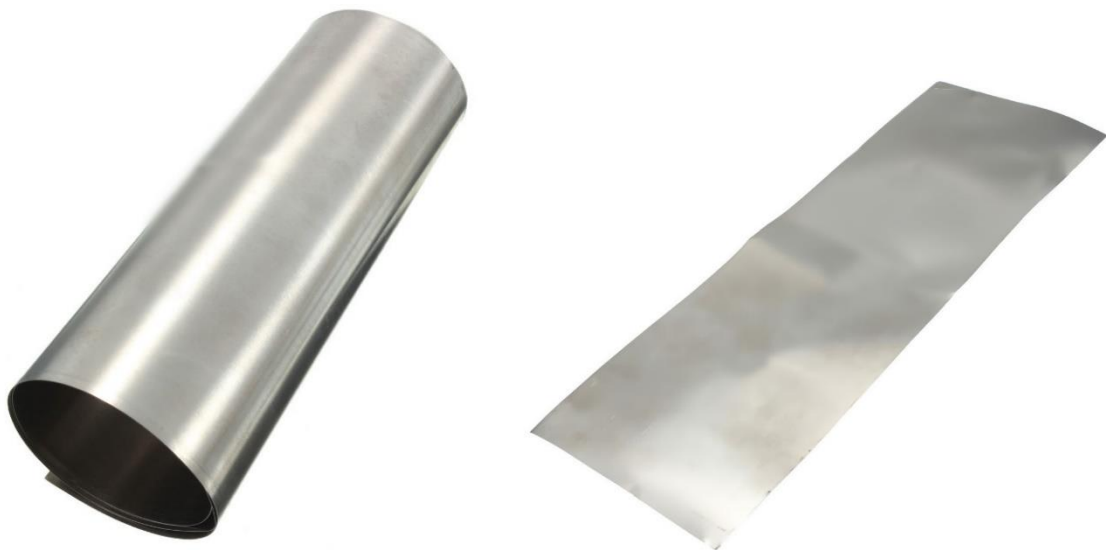


Figura 13. Muestra de Ti recibida con dimensiones de 300x100x0.1 mm con acabado desincrustado estandarizado por ASTM B265-17.

3.2.1 ANODIZADO ELECTROQUÍMICO.

La composición de la solución electrolítica utilizada para la obtención de nanotubos mediante anodizado electroquímico se muestra en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Composición de solución electrolítica para anodizado electroquímico.

Reactivos	Composición
NH ₄ F	0.50 g
EG	25 ml
Agua superoxidada	75 ml

Los componentes de la celda electroquímica que se muestran en la **Figura 14** fueron lavados con abundante agua de grifo y jabón para instrumental de laboratorio marca Despro®, se enjuagaron con agua destilada y con alcohol isopropílico, se dejaron secar durante 30 minutos antes de ensamblarla como se muestra en la figura 2. El electrodo de trabajo, la muestra de titanio a modificar, es depositada en la lámina de aluminio la cual se conecta a la terminal positiva de la fuente de poder (ánodo), la terminal negativa al cátodo de platino (contra-electrodo) para cerrar el circuito con el fin de acelerar el proceso de oxidación controlada sobre la superficie del electrodo de trabajo [71-72].

Se agregaron 5 ml de la solución electrolítica a temperatura ambiente (25 °C) a la celda electroquímica y se siguieron las condiciones y parámetros de la tabla para obtener NTs de TiO₂ sobre la superficie del electrodo de trabajo.

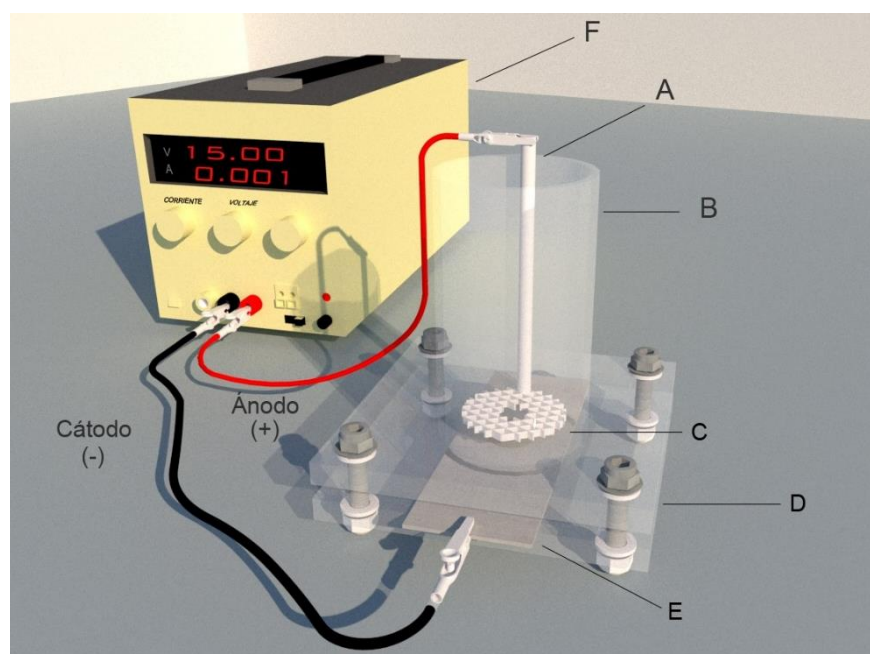


Figura 14. Imagen esquemática de celda electroquímica para anodizado electroquímico. A) Contra-electrodo de platino, B) Contenedor para solución electrolítica, C) Electrodo de trabajo, muestra de Ti sobre E) lámina de aluminio, D) Base, F) Fuente de corriente directa.

Todas las muestras fueron anodizadas un día antes de cada ensayo para utilizar los NTs con menos de 24 horas de haber sido sintetizados. Los parámetros utilizados para la síntesis de NTs se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Parámetros de anodizado electroquímico.

Tiempo anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetro de NT (nm)	Longitud de NT (nm)	Espesor de pared (nm)	Densidad de NT (gr·cm ³)
20	15	80	400	8	1.64

3.3 PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN SIMULADA DE SALIVA.

La solución simulada de saliva utilizada en el estudio como electrolito es la modificación realizada por J.M. Meyer [85] a la solución propuesta por T. Fusayama [86] debido a su acercamiento al comportamiento electroquímico de la saliva natural y su amplio uso desde su formulación en estudios de corrosión en superficies metálicas en el ambiente bucal [87]. Su composición se muestra en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Composición de Solución Simulada de Saliva.

Reactivos	Composición (g/l)
-----------	-------------------

NaCl	0.400
KCl	0.400
CaCl ₂ ·H ₂ O	0.800
Na ₂ S	0.0100
Urea	1.000

Al momento de preparar la solución la temperatura se monitorizó a 37 °C y el pH se estabilizó a 4.5 con una solución de HCl a 1 M.

3.4 ACONDICIONAMIENTO DE INÓCULO INICIAL PARA LOS ENSAYOS.

La preparación del inóculo inicial de *C. albicans* para los ensayos microbiológicos y electroquímicos se preparó entre 18 y 20 horas antes de que iniciaran para permitir que la levadura se encuentre en su fase exponencial de crecimiento y de esta forma obtener la mayor la cantidad de células viables asegurando resultados confiables y reproducibles.

3.4.1 ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS.

El inóculo para los ensayos microbiológicos se preparó siguiendo la siguiente metodología.

- i. En un área de trabajo aséptica agregar 1 ml de CSD estéril a un tubo de 1.5 ml estéril.
- ii. De la caja de APD con la resiembra más reciente tomar entre 2 y 3 colonias aisladas y homogeneizar en tubo con caldo.
- iii. Incubar a 37 °C en condiciones aerobias entre 18 y 20 horas.
- iv. Pasado el tiempo establecido, dispensar 1 ml de solución FM estéril en otro tubo de 1.5 ml estéril y transferir 20 µl de la biomasa resuspendida mecánicamente del tubo con caldo dextrosa-Sabouraud.

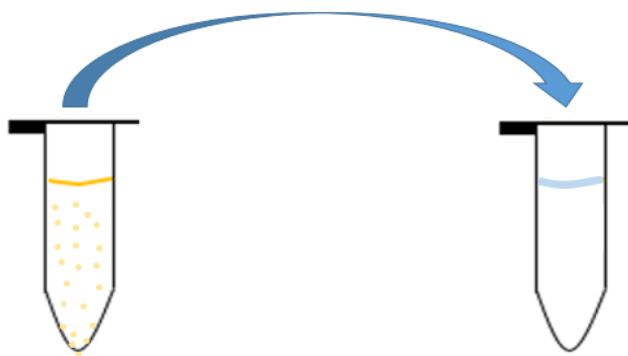


Figura 15. Diagrama de paso final para preparación de inóculo inicial de *C. albicans* en solución FM.

3.4.2 ENSAYOS ELECTROQUÍMICOS.

La celda electroquímica requiere de 30 ml de solución FM inoculada con *C. albicans* por lo que la metodología para acondicionar el inóculo inicial se realizó con base a la metodología descrita a continuación.

- i. En un área de trabajo aséptica agregar 10 ml de CSD estéril a un tubo de 15 ml estéril.
- ii. De la caja de APD con la resiembra más reciente tomar entre 2 y 3 colonias aisladas y homogeneizar en tubo con caldo.
- iii. Incubar a 37 °C en condiciones aerobias entre 18 y 20 horas.
- iv. Pasado el tiempo de incubación establecido centrifugar el tubo inoculado a 1,500 RPM durante 5 minutos para separar la biomasa del caldo de cultivo.
- v. Una vez que se obtuvo el precipitado y el sobrenadante, retirar cuidadosamente el caldo de cultivo evitando levantar la biomasa.
- vi. Agregar al precipitado 15 ml de la solución FM estéril, resuspender y homogeneizar con la puntilla de micropipeta y movimientos mecánicos.
- vii. Montar celda electroquímica con electrodo de trabajo, muestra de estudio, previamente esterilizada en baño con etanol al 70% durante 2 horas y bajo luz ultravioleta por 15 minutos, y agregar los 15 ml del inóculo acondicionado.
- viii. Ajustar la OD de inóculo inicial acondicionado tomando 50 μ l y 50 μ l de solución FM, blanco, y depositando en placa de equipo Thermo Scientific MultiSkan GO. Se realiza la medición a 595 nm y se ajusta la densidad óptica en caso de ser necesario.

- ix. Una vez se obtuvo la OD deseada se lleva la celda electroquímica al Laboratorio de Corrosión y se ingresa a una caja de poliestireno aislada para dar inicio a las pruebas electroquímicas.

3.5 ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS.

Los ensayos microbiológicos consistieron en depositar sobre las superficies de Ti NTs, Ti6Al4V NTs y controles 50 µl del inóculo acondicionado de *C. albicans* en solución FM, incubar a 37 °C y analizar en los tiempos estipulados en el estudio: 1, 5, 7, 14 y 21 días.

La **Figura 16** se muestra una imagen esquemática de la caja de 12 pocillos utilizada en los ensayos microbiológicos. En cada columna se depositan 3 superficies de cada muestra de estudio de manera que por grado de titanio se requirieron 3 cajas de 12 pocillos estériles.

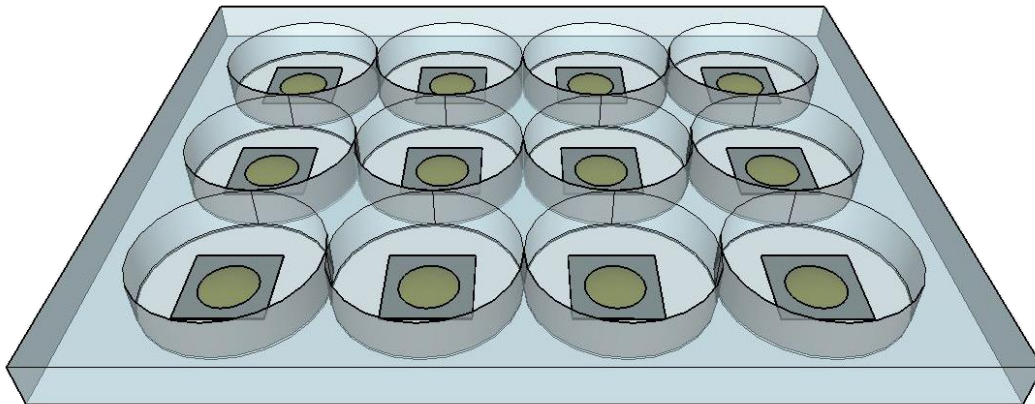


Figura 16. Imagen esquemática de una caja de 12 pocillos con muestras de Ti con un volumen de solución FM inoculada con *C. albicans* sobre su superficie.

3.5.1 VIABILIDAD MICROBIANA.

Durante los días estipulados en el estudio para el análisis del proceso de CMI se evaluaron las UFC en cada superficie de estudio para obtener la variación en la adherencia de *C. albicans* siguiendo la metodología descrita a continuación.

- i. Retirar cuidadosamente la solución de cada pocillo para evitar desprender la biopelícula adherida a la superficie de estudio.
- ii. Agregar gentilmente 500 μ l de PBS a cada pocillo cuidando no golpear directamente la superficie de estudio y dejar reposar durante 5 minutos.
- iii. Retirar cuidadosamente el volumen de PBS siendo este el primer lavado. Repetir en tres ocasiones el paso ii y iii.
- iv. Con un bisturí estéril raspar mecánicamente las superficies de estudio para remover la mayor cantidad posible de células de *C. albicans* adheridas a ella. Para mantener la superficie hidratada agregar entre 150-200 μ l de PBS previo al raspado.
- v. Preparar 4 tubos con 950 μ l de PBS por muestra para realizar diluciones tomando un volumen de paso de 50 μ l de la alícuota anterior con el fin de alcanzar una concentración de 10^6 .
- vi. Tomar 10 μ l del pocillo y realizar las diluciones.
- vii. Dividir por la mitad 6 cajas de APD para sembrar en cada mitad las últimas dos diluciones por muestra tomando 20 μ l y depositando en su respectivo centro de la mitad de la caja y estriar en 4 direcciones.
- viii. Incubar las cajas a 37 °C en condiciones aerobias para ser revisadas a las 24 horas de crecimiento.

La **Figura 17** muestra una imagen esquemática de las cajas de APD inoculadas con las últimas dos diluciones, 10^4 y 10^6 , y el estriado en 4 direcciones.

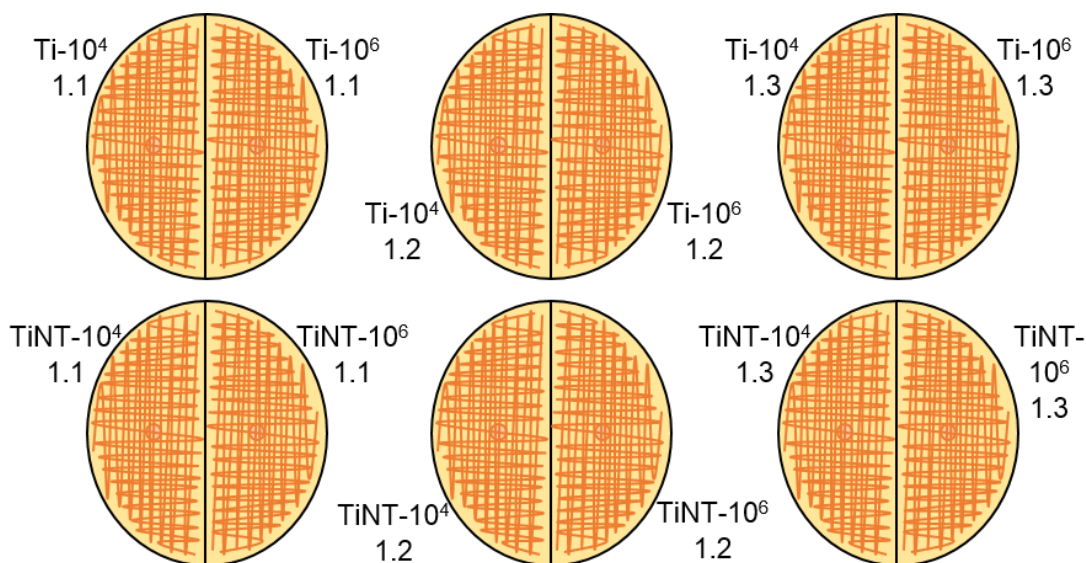


Figura 17. Ilustración esquemática de cajas de APD inoculadas con diluciones 10^4 y 10^6 estriadas en 4 direcciones de cada muestra de Ti.

Posterior a las 24 horas de incubación las colonias que crecieron en APD fueron contadas utilizando un contador de colonias marca Reichert® modelo Darkfield Quebec.

3.6 ENSAYOS ELECTROQUÍMICOS.

Por su naturaleza las técnicas electroquímicas son apropiadas para el estudio de la corrosión. La forma en que se realizan las pruebas de laboratorio son en una celda electroquímica de 3 electrodos [88] con una muestra del metal a estudiar de pocos centímetros de área al que se le llamará electrodo de trabajo, una solución electrolítica que simule las condiciones reales, un electrodo de referencia con un potencial estándar conocido el cual será de calomelanos, Hg_2^{2+}/Hg_2Cl_2 (SCE por sus siglas en inglés) con un valor de 0.240 V contra el electrodo de hidrógeno (SHE) y un contra-electrodo de material inerte de malla de platino los cuales se montarán en una celda electroquímica que se conectará a un equipo electrónico llamado potenciostato marca *CH Instruments Electrochemical WorkStation E600*, que tiene la capacidad de controlar el voltaje de entrada y medir la corriente entre el electrodo de trabajo y el de referencia como se muestra en la **Figura 18** [88].

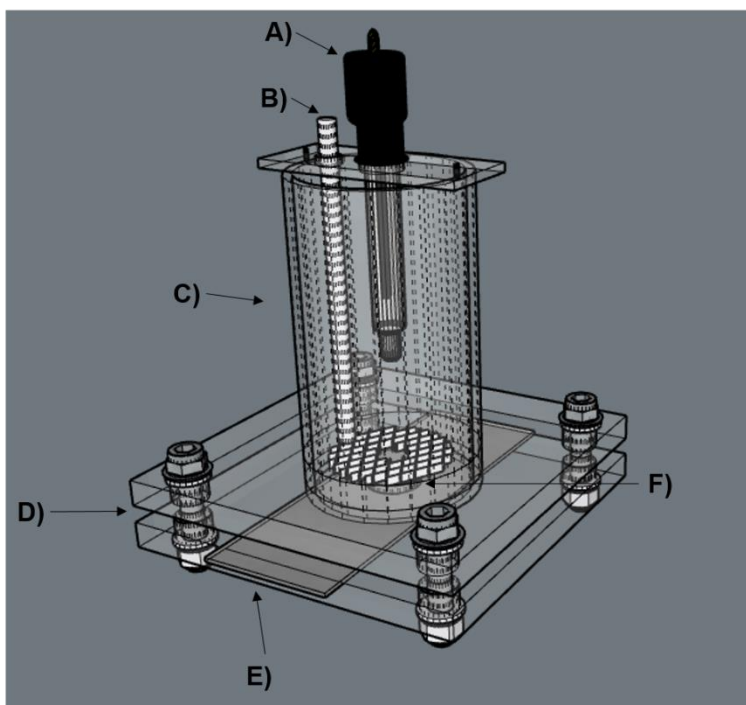


Figura 18. Ilustración esquemática de una celda electroquímica de 3 electrodos. A) Electrodo de referencia de SCE, B) Contra-electrodo de malla de platino, C) Columna contenedora de solución electrolítica, D) Base de celda electroquímica, E) Lámina de aluminio que funciona como conductor eléctrico, F) Electrodo de trabajo, muestras de Ti [88].

Para simular las condiciones en la cavidad bucal se optó por utilizar una caja de poliestireno aislada para simular la boca, se ingresó una fuente de luz que mantendrá la temperatura a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la celda electroquímica será recubierta con un aislante oscuro para evitar que los fotones interactúen y puedan provocar cambios morfológicos o metabólicos en *C. albicans*. La **Figura 19** representa lo descrito anteriormente con un corte en la caja para visualizar los elementos que estarían aislados.

Las técnicas analizadas en el presente estudio son NO DESTRUCTIVAS al no propiciar reacciones corrosivas sobre la superficie utilizar amplitudes de voltaje y densidades de corriente muy pequeñas con una alta impedancia de salida para obtener solamente información sobre las reacciones presentes en la interface superficie/electrolito. Debido a lo anterior, los análisis proveerán información importante para dilucidar el mecanismo mediante el cual ocurre el proceso de corrosión microbiológica.

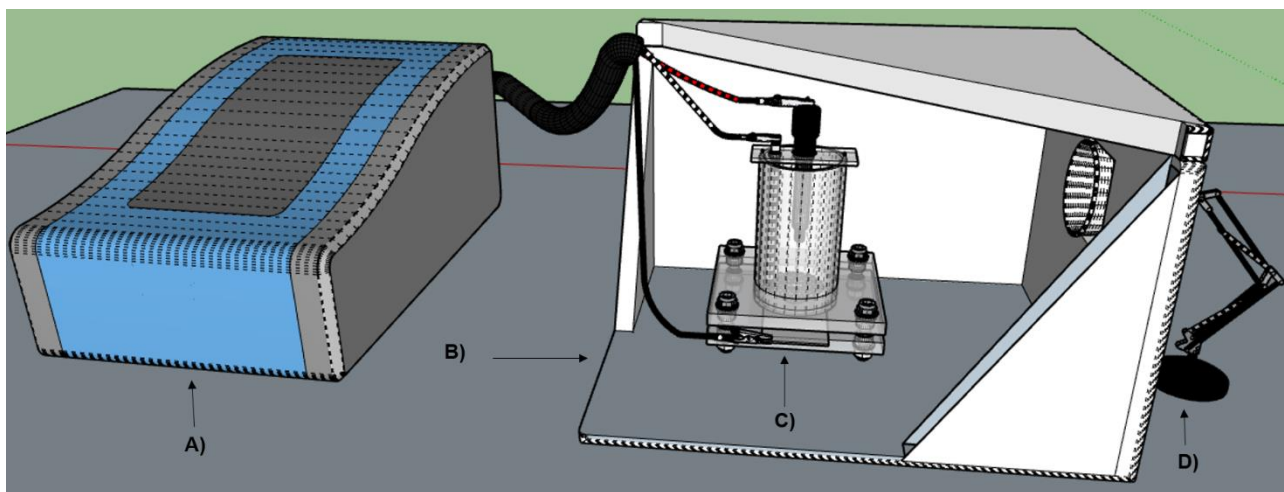


Figura 19. Ilustración esquemática de celda electroquímica para ensayos de corrosión. A) Potenciostato, B) Caja de poliestireno, C) Celda electroquímica de 3 electrodos, D) Fuente de luz.

3.6.1 POTENCIAL DE CIRCUITO ABIERTO (OCP).

La técnica de OCP es un método pasivo conocido potencial de corrosión, potencial de equilibrio que permite la medición del potencial de reposo de un sistema donde las reacciones redox sobre la superficie de la muestra se mantienen en equilibrio termodinámico al no haber perturbaciones o un flujo de corriente externa [89-90]. Se considera un sistema estable si presenta variaciones en OCP de ± 5 mV o menos durante un periodo de tiempo determinado.

Para su realización se requiere que el contra-electrodo, utilizado para el paso de corriente en la celda, se abra ya sea desconectando o con una muy alta impedancia de entrada de modo que la medición solamente se realiza entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo por un tiempo determinado de inmersión en el medio corrosivo como indica la ecuación 26.

$$E_{OCP} = E_W - E_{REF} \quad (26)$$

Donde E_W es el electrodo de trabajo y E_{REF} es el electrodo de referencia.

Considerando la ecuación 2 de reducción, donde Ox es reducido a R con una transferencia n de electrones se obtiene un potencial termodinámico E^0 el cual puede ser

determinado al obtener el OCP además de la razón de redox por medio de la ecuación de Nernst, ecuación 8.



$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_O}{C_R} \quad (8)$$

En la investigación se utilizarán los parámetros de la **Tabla 7** para la prueba de OCP.

Tabla 7. Parámetros para prueba OCP.

Tiempo (segundos)	Intervalo de muestreo (segundos)	Voltaje máximo (V)	Voltaje mínimo (V)
86,400	0.1	1	-1

3.6.2 VOLTAMPEROMETRÍA DE BARRIDO LINEAL (LSV).

La aplicación de un segmento de una Voltamperometría cíclica se denomina LSV donde el electrodo de trabajo se somete a un estímulo de un E_f a un E_i , se obtiene el valor de la corriente en función del tiempo que provee información cualitativa y cuantitativa sobre el sistema electroquímico, la cinética de reacciones de transferencia electrones y especies formadas en la superficie del electrodo de trabajo.

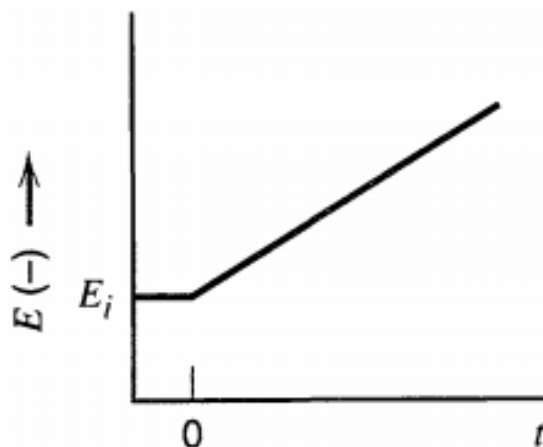


Figura 20. Gráfico de LSV, inicia en E_i y termina en E_i después de un tiempo determinado.

Considerando la ecuación 2, si el potencial de barrido comienza a acercarse a E^0 , Ox comienza a reducirse hacia R creando un gradiente de concentración que aumente la transferencia de masa en la superficie del electrodo. Cuando el potencial de barrido es mayor que E^0 la concentración de Ox en la superficie de electrodo es casi cero y la transferencia de masa ha llegado a su punto máximo de forma que la corriente comienza a decaer mientras que el potencial llega a su punto final. El pico de corriente resultante, i_p , se describe por la ecuación de Randles-Ševčík, 27.

$$i_p = 0.4463nFAC \left(\frac{nFvD}{RT} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (27)$$

Donde n es el número de electrones, F es la constante de Faraday, A es el área de electrodo en cm^2 , D el coeficiente de difusión, C la concentración, R la constante de gases, T la temperatura en Kelvin y v la intervalo de muestreo.

En la **Tabla 8** se muestran los parámetros utilizados para la prueba de LSV en el estudio.

Tabla 8. Parámetros para prueba LSV.

Potencial inicial (V)	Potencial final (V)	Rango de barrido (V/s)	Intervalo de muestreo (V)
-0.02	0.02	0.01	0.0016

3.6.3 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA (EIS).

La técnica EIS permite obtener información sobre procesos electroquímicos en interfase metal/electrolito como adsorción de moléculas, funcionamiento de baterías y análisis de corrosión. Utiliza una señal sinusoidal de pocos mV de amplitud y mide la respuesta en I del sistema transformando a impedancia. Entre sus ventajas se encuentran:

- Capacidad experimental para realizar mediciones de alta precisión por su respuesta altamente estable.
- Linearización teórica de la respuesta de corriente-potencial.

- Medición en un alto rango de frecuencias, 10^{-6} a 10^4 Hertz.

Para comprender el funcionamiento de CA es necesario comprender el comportamiento de circuitos de CD. La resistencia al paso de corriente se define por la ley de Ohm.

$$V = IR \quad (28)$$

Donde V es la diferencia de potencial o voltaje, I es la corriente medida en amperes (A) y R es la resistencia con unidades en Ohms (Ω) siendo este elemento el que se opone al flujo de corriente. En la teoría de CA la impedancia se define como la relación compleja entre voltaje y corriente en un circuito de corriente alterna.

$$Z(j\omega) = \frac{V(j\omega)}{I(j\omega)} \quad (29)$$

Donde Z es la impedancia, j la componente imaginaria y ω la frecuencia. Existen componentes electrónicos que limitan el flujo de corriente en la CA.

$$I = CV \quad (30)$$

$$I = V/L \quad (31)$$

C es la capacitancia y L la inductancia, con estos elementos se puede reescribir la ecuación de impedancia.

$$Z = \frac{1}{\omega C} \quad (32)$$

$$Z = \omega L \quad (33)$$

Las ecuaciones 30 y 31 describen la parte real e imaginaria de la impedancia.

$$Z' = R_s + \frac{R_{ct}}{1 + \omega^2 R_{ct}^2 C_{dl}^2} \quad (30)$$

$$Z'' = \frac{R_{ct}^2 C_{dl} \omega}{1 + \omega^2 R_{ct}^2 C_{dl}^2} \quad (31)$$

Donde R_s es la resistencia de la solución, R_{ct} es la resistencia a la transferencia de carga, ω es la frecuencia angular y C_{dl} es la resistencia de la doble capa. La R_s es independiente de la frecuencia y se presenta en las frecuencias altas del espectro, R_{ct} es la oposición al movimiento de electrones e influye en la parte real ecuación 32, C_{dl} es la capacitancia de doble capa y puede estimarse visualmente en el diagrama de Nyquist, **Figura 19**, extrapolando el semicírculo sobre el eje de impedancia real.

$$Z'' = \frac{RT}{F^2 k^0 C} \quad (32)$$

Donde R es la constante de los gases, T la temperatura, F la constante de Faraday y C la concentración de las especies electroactivas.

Los datos de EIS se presentan modelan con elementos en circuitos electrónicos los cuales facilitan bastante su interpretación. Los elementos se muestran en la **Tabla 9**. [

Tabla 9. Elementos utilizados en circuitos de EIS.

Elemento equivalente	Impedancia
R	R
C	$1/j\omega C$
L	$j\omega L$
W (elemento infinito de Warburg)	$1/Y_0\sqrt{(j\omega)}$
O (elemento finito de Warburg).	$\tanh(B\sqrt{(j\omega)})/Y_0\sqrt{(j\omega)}$
Q (CFE)	$1/Y_0(j\omega)^\alpha$

La **Figura 21** presenta un diagrama de Nyquist con la parte real de impedancia en el eje X y parte imaginaria en el eje Y con un circuito de Randles que modela el semicírculo que es controlada por cinética de transferencia de carga y una región controlada por activación.

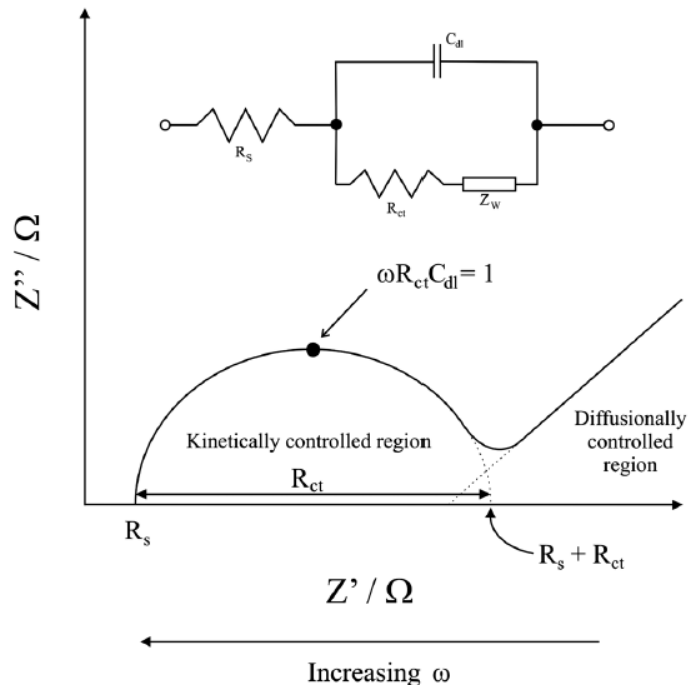


Figura 21. Gráfico de Nyquist y circuito de Randles que simula respuesta del espectro de EIS [91].

En el presente estudio se utilizarán los parámetros de la **Tabla 10** para los estudios de EIS.

Tabla 10. Parámetros para prueba de EIS.

Amplitud (mV)	Frecuencia inicial (Hz)	Frecuencia final (Hz)
-0.02	0.02	0.01

3.7 CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES.

Para caracterizar las superficies previo y posterior a los ensayos electroquímicos se utilizarán las siguientes técnicas de microscopía electrónica.

3.7.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM).

Los equipos utilizados fueron un TESCAN modelo LYRA3.

3.7.2 ESPECTROSCOPIA DE ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X (EDS).

El equipo marca JEOL modelo JSM-6010LA cuenta con sonda para análisis de EDS, mientras que el equipo TESCAN está acoplado a sonda marca BRUKER.

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los ensayos microbiológicos se realizaron por triplicado para asegurar la repetitividad, confiabilidad y reproducibilidad de los datos los cuales fueron analizados en el software especializado en análisis y presentación de datos estadísticos GraphPad PRISM 9 (2019) donde las barras de error representan la desviación estándar. Para evaluar la significancia entre los datos se utilizó el análisis de variancia de dos vías, ANOVA, que requiere que los grupos de datos contengan la misma cantidad, cuenten con una distribución normal, el factor de varianza entre ellos sea similar, que los residuos estén distribuidos alrededor de cero y que las muestras sean independientes.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS.

Las **Figuras 22** y **23** muestran las cajas de 12 pocillos rotuladas con los días de incubación para cada triplicado de las superficies Ti 2 NTs y Ti6Al4V NTs con sus controles respectivamente. Cada muestra se rehidrató con 70 µl de solución FM cada 48 horas con la finalidad de mantener un volumen constante para evitar su evaporación y secado de las células *C albicans*, lo cual invalidaría el ensayo. La **Figura 24** es una imagen representativa de las diluciones realizadas una vez que se retiraron mecánicamente las células adheridas a las distintas superficies.

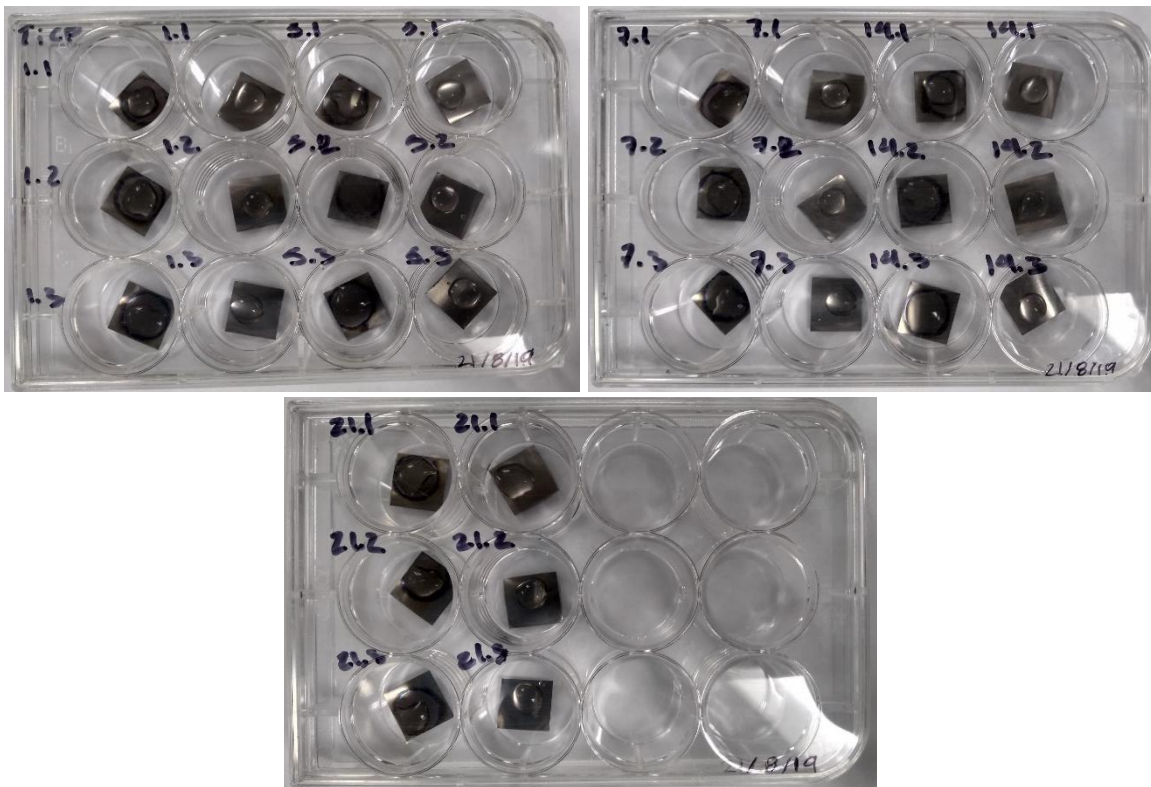


Figura 22. Muestras de Ti 2 NTs y controles en caja de 12 pocillos con 70 µl de solución FM inoculadas con *C. albicans* depositados en su superficie.

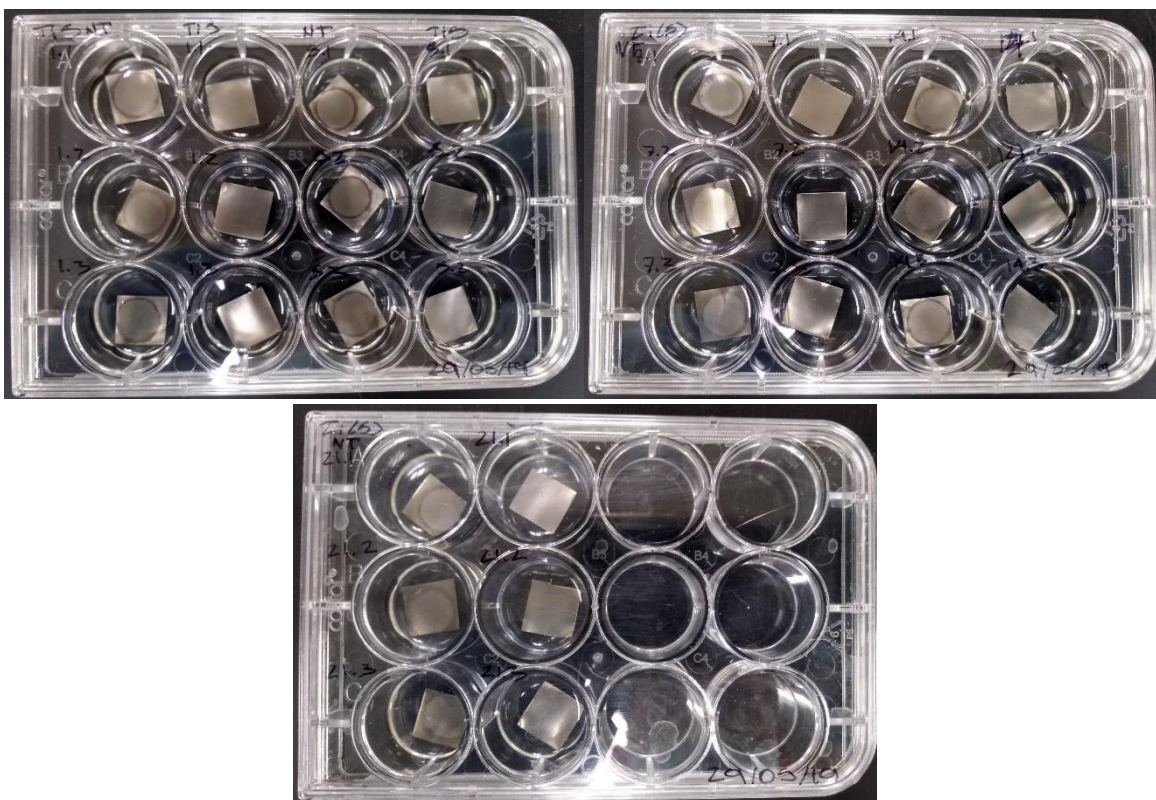


Figura 23. Muestras de Ti6Al4V NTs y controles en caja de 12 pocillos con 70 μ l de solución FM inoculadas con *C. albicans* depositados en su superficie.

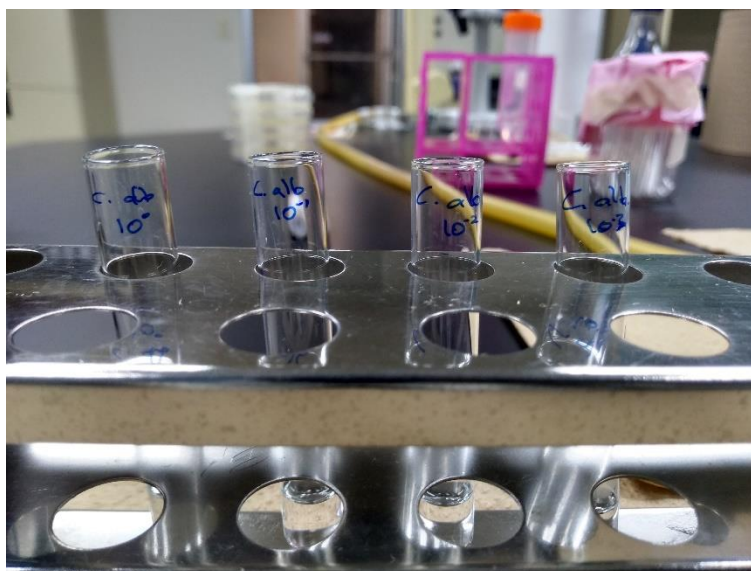


Figura 24. Diluciones 10^0 , 10^2 , 10^4 y 10^6 de *C. albicans* en solución PBS.

Los conteos de las unidades formadoras de colonias se visualizaron en el contador de colonias entre 18 y 20 horas después de haber sido incubadas. Posteriormente, fueron contadas y los datos obtenidos se analizaron en el software GraphPad Prism 9 (2019) para

obtener la diferencia significativa entre cada superficie de estudio. En la **Figura 25**, se presentan las fotografías de los conteos de Ti 2. Mientras que en las **Figuras 26** y **27** se presenta el análisis de la viabilidad de *C. albicans* sobre las superficies de Ti 2 y Ti6Al4V, respectivamente.

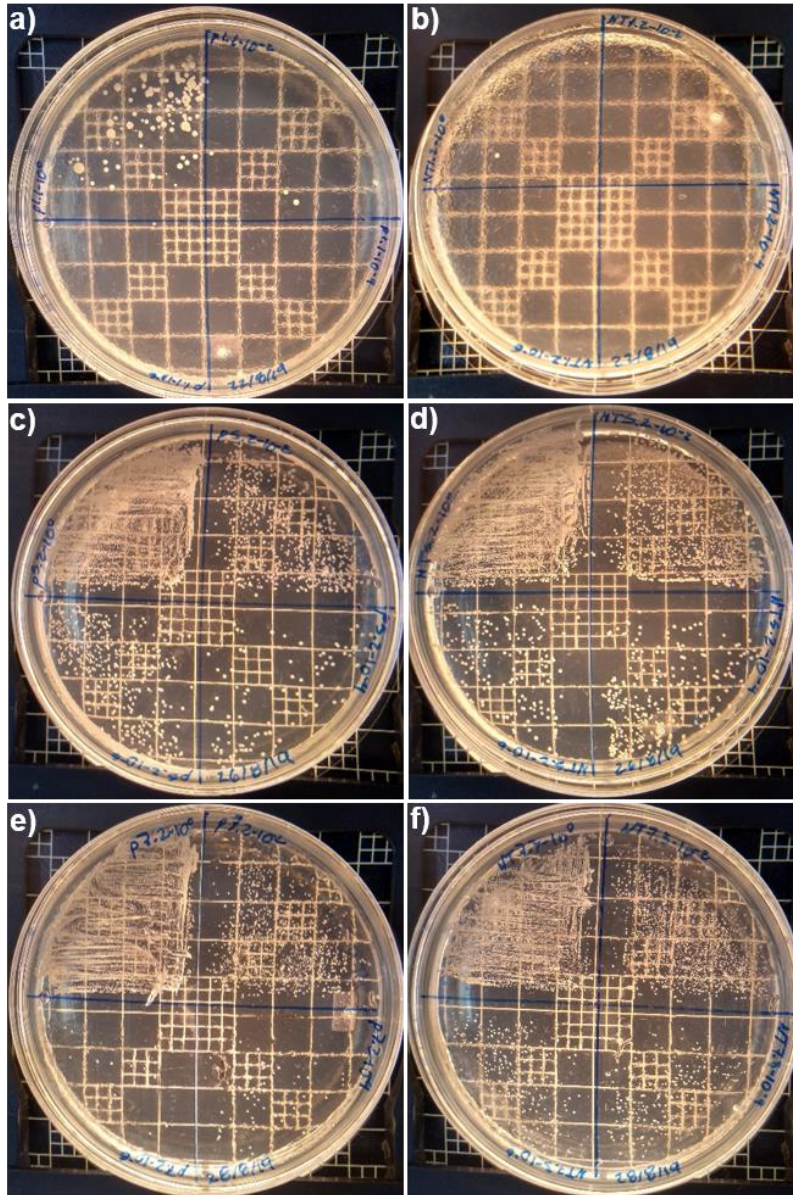


Figura 25. Crecimiento de diluciones de *C. albicans* en cajas Petri de APD de Ti NTs y control: a) 1 día Ti 2, b) 1 día Ti 2 NTs, c) 5 días Ti 2, d) 5 días Ti 2 NTs, e) 7 días Ti 2 y f) 7 días Ti 2 NTs.

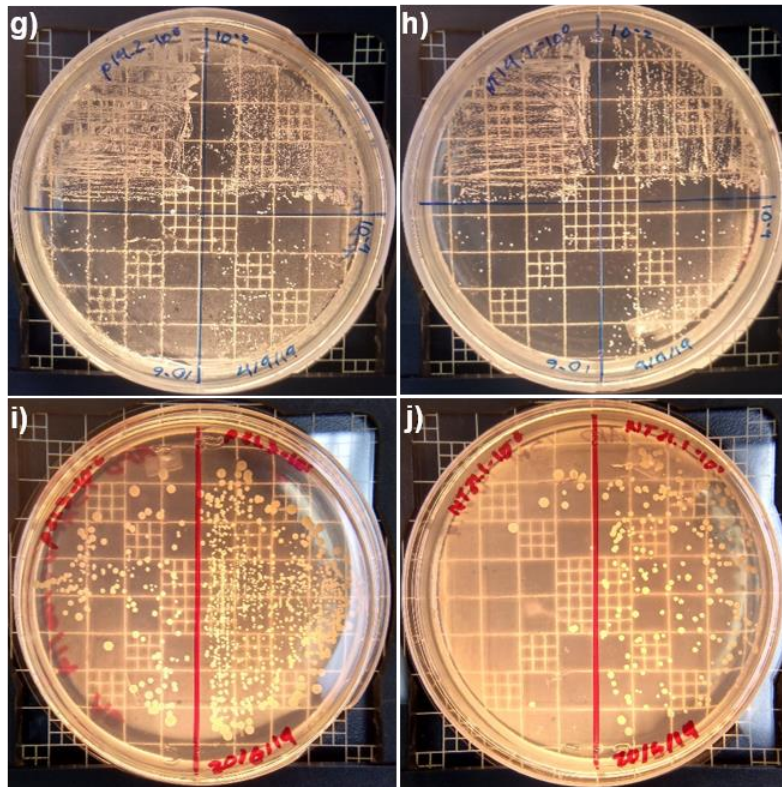


Figura 25 (continuación). Crecimiento de diluciones de *C. albicans* en cajas Petri de APD de Ti NTs y control: g) 14 días Ti 2, h) 14 días Ti 2 NTs, i) 21 días Ti 2 y j) 21 días Ti 2 NTs.

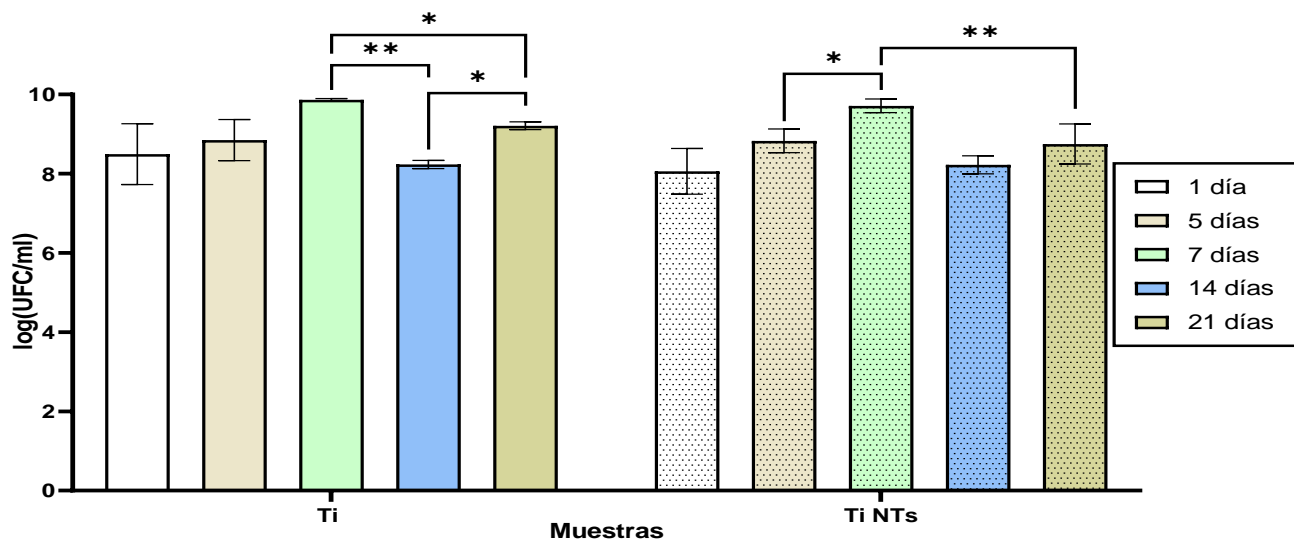


Figura 26. Evaluación de la viabilidad de *C. albicans* inoculada sobre superficies de Ti y Ti NTs a distintos tiempos de incubación. Las barras muestran la media más menos la desviación estándar, n=3. *Indica diferencia significativa entre Ti a 7 y 21 días de incubación, a 13 y 21 días comparando Ti2 NTs a 5 y 7 días de incubación. **Indica mayor diferencia significativa entre Ti a 7 y 14 días y entre Ti NTs a 12 y 21 días de incubación.

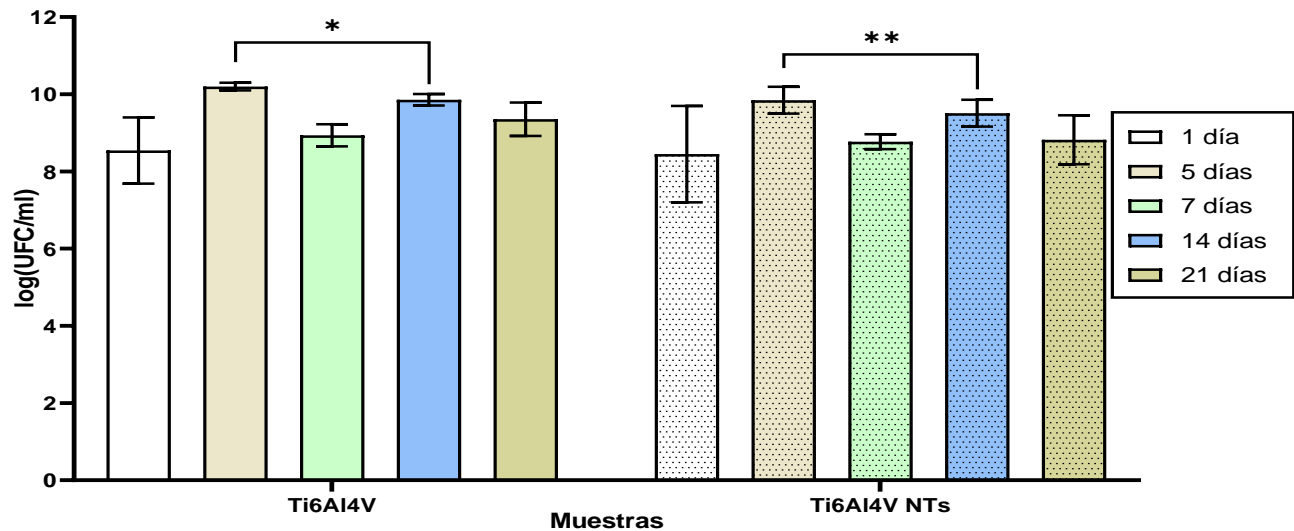


Figura 27. Evaluación de la viabilidad de *C. albicans* inoculada sobre superficies de Ti6Al4V y Ti6Al4V NTs a distintos tiempos de incubación. Las barras muestran la media más menos la desviación estándar, n=3. *Indica diferencia significativa entre Ti6Al4V a 5 y 14 días de incubación. **Indica mayor diferencia significativa entre Ti6Al4V NTs a 5 y 14 días de incubación.

4.2 ENSAYOS ELECTROQUÍMICOS.

4.2.1 POTENCIAL DE CIRCUITO ABIERTO (OCP).

Los resultados obtenidos de la prueba de OCP de Ti 2 se muestran en la **Figura 28**, donde se aprecia que con el paso de los primeros 7 días el potencial aumenta gradualmente a valores cada vez más positivos. Sin embargo, a partir de los 14 días su valor comienza a decaer a valores más negativos volviéndolo más susceptible a ataques corrosivos de la solución electrolítica. En el caso de Ti 2 NTs, **Figura 29**, todas las mediciones a los tiempos de incubación del estudio muestran que el valor se vuelve cada vez más positivo, lo que indica que la capa pasiva formada en su superficie incrementa en espesor.

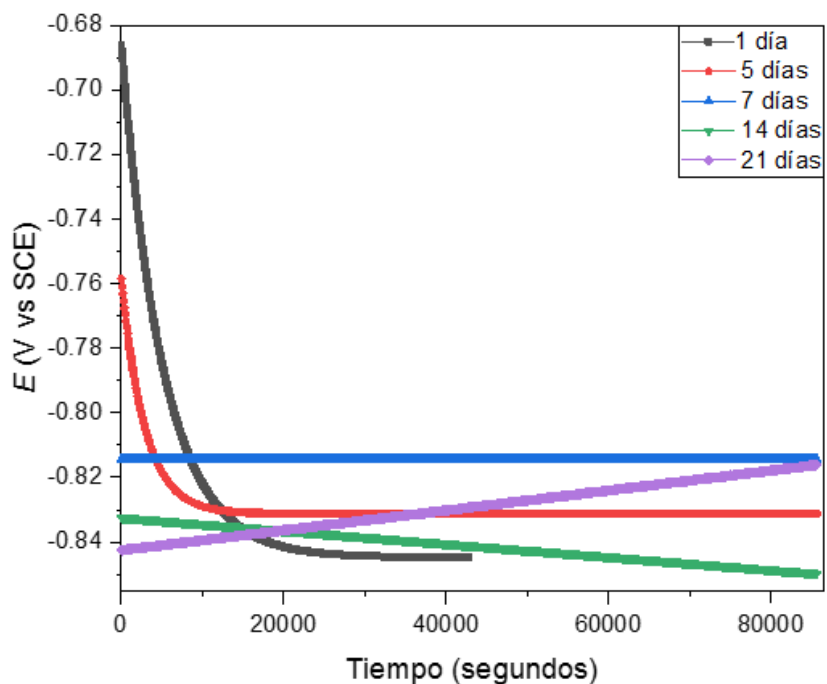


Figura 28. OCP de muestra de Ti después de 21 días en solución FM inoculada con *C. albicans*.

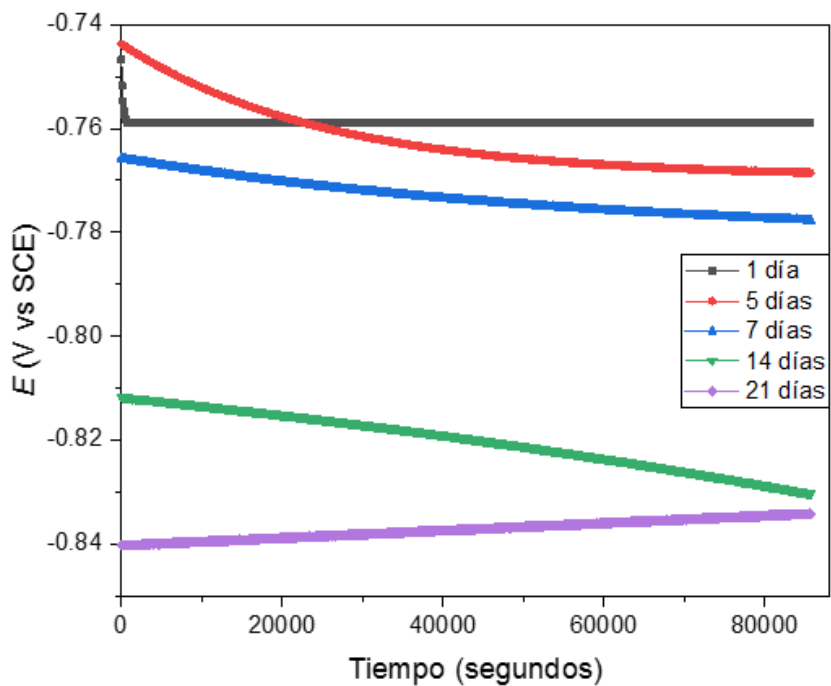


Figura 29. OCP de muestra de Ti NTs después de 21 días en solución FM con *C. albicans*.

En las superficies de Ti6Al4V (**Figura 30**) el potencial decrece gradualmente con el paso del tiempo, salvo un ligero incremento a 21 días al final del esquema experimental. Para la muestra de Ti6Al4V NTs (**Figura 31**) el valor tiende a valores negativos mostrando un comportamiento similar a Ti NTs, lo que indica que la adherencia de *C. albicans* es mucho

menor comparando con la superficie sin modificación superficial. En la **Tabla 11** se muestra el valor de OCP de todas las muestras de Ti después de 21 días en contacto con la solución FM y *C. albicans*. Puede apreciarse que los valores de las superficies con NTs tienden a variar ligeramente o hacia valores negativos lo cual indica que la superficie tiende a pasivarse.

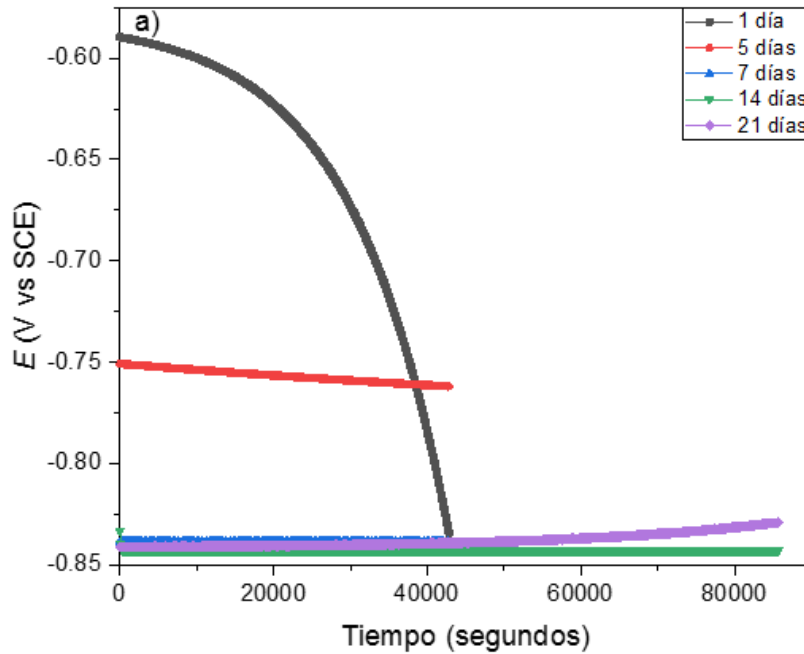


Figura 30. OCP de muestra de Ti6Al4V después de 21 días en solución FM inoculada con *C. albicans*.

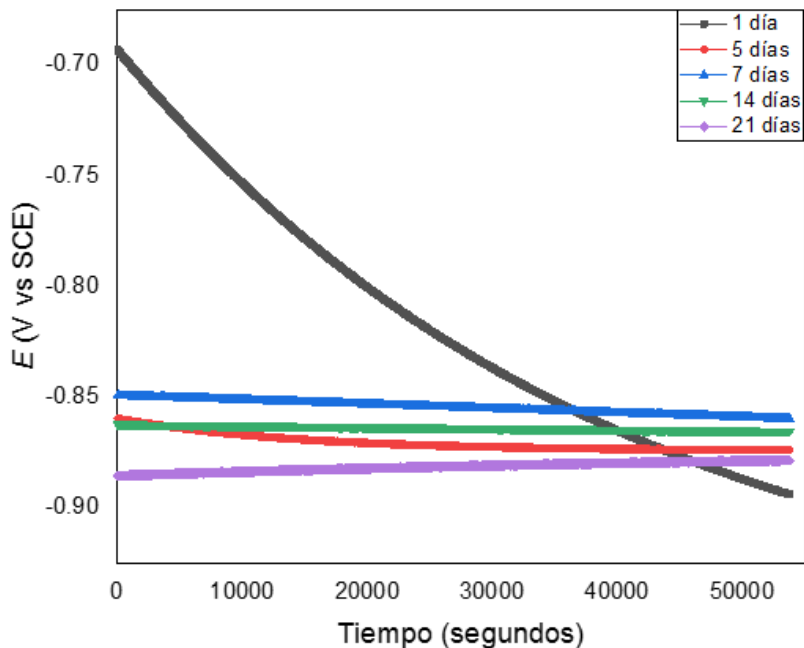


Figura 31. OCP de muestra de Ti6Al4V NTs después de 21 días en solución FM inoculada con *C. albicans*.

Tabla 11. OCP (V vs SCE) de las muestras en solución FM inoculada con *C. albicans* durante 21 días.

Muestra	Tiempo (días)				
	1	5	7	14	21
Ti 2	-0.852	-0.850	-0.840	-0.866	-0.829
Ti 2 NTs	-0.750	-0.779	-0.799	-0.838	-0.859
Ti 5	-0.758	-0.850	-0.860	-0.861	-0.852
Ti 5 NTs	-0.900	-0.889	-0.885	-0.889	-0.900

4.2.2 VOLTAMPEROMETRÍA DE BARRIDO LINEAL (LSV).

Las **Figuras 32** y **33** muestran el valor del potencial de corrosión E_{corr} , para Ti 2 NTs y control. En Ti 2 se observa que E_{corr} se vuelve cada vez más positivo con el paso de los días, fenómeno totalmente opuesto al que ocurre en la superficie con NTs. Al aumentar el tiempo de interacción de los NTs con la solución, se vuelve cada vez más negativo lo que indica que la corrosión inducida por el contacto con la solución electrolítica y el microorganismo es mucho menor comparada con a la muestra control.

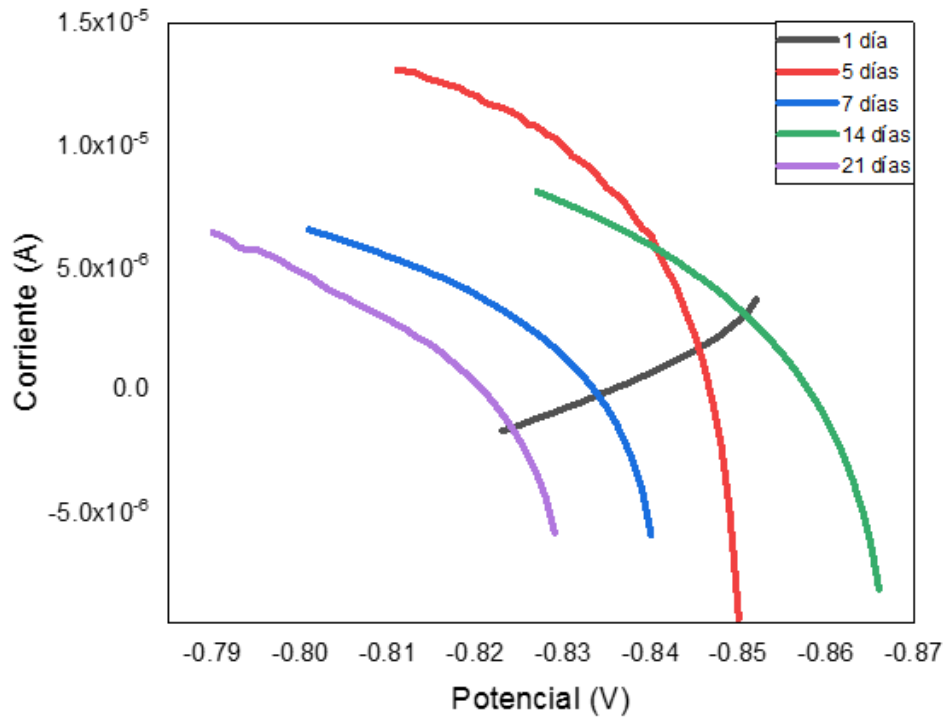


Figura 32. LSV de muestra de Ti después de 21 días en solución FM inoculada con *C. albicans*.

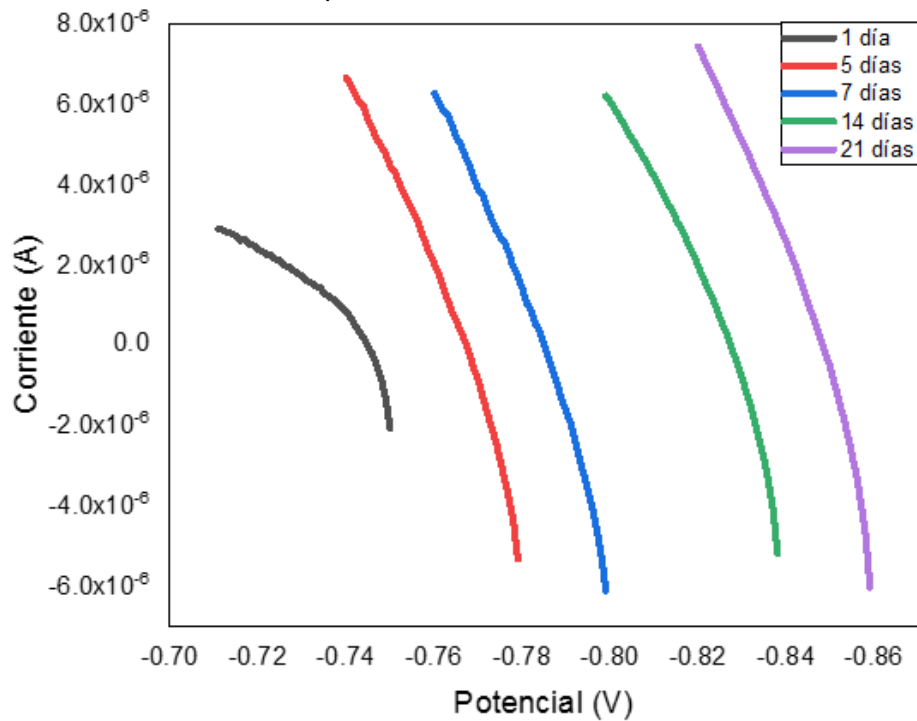


Figura 33. LSV de muestra de Ti NTs después de 21 días en solución FM inoculada con *C. albicans*.

Las **Figuras 33** y **34** muestran los valores de E_{corr} de Ti6Al4V NTs y control. Se observa que en ambas superficies ocurre una situación similar a la obtenida en Ti 2 pues en ambos casos se presenta un comportamiento de decremento en el potencial en la superficie

con NTs y de aumento en los controles. La **Tabla 12** muestra los valores de E_{corr} de las superficies de Ti6Al4V después de los 21 días en contacto con la solución FM inoculada con *C. albicans*.

Tabla 12. E_{corr} (V) de las muestras Ti6Al4V NTs y control en solución FM inoculada con *C. albicans* durante 21 días.

Muestra	Tiempo (días)				
	1	5	7	14	21
Ti 2	-0.823	-0.811	-0.801	-0.827	-0.790
Ti 2 NTs	-0.711	-0.740	-0.760	-0.799	-0.820
Ti6Al4V	-0.719	-0.751	-0.821	-0.822	-0.813
Ti6Al4V NTs	-0.861	-0.850	-0.846	-0.850	-0.861

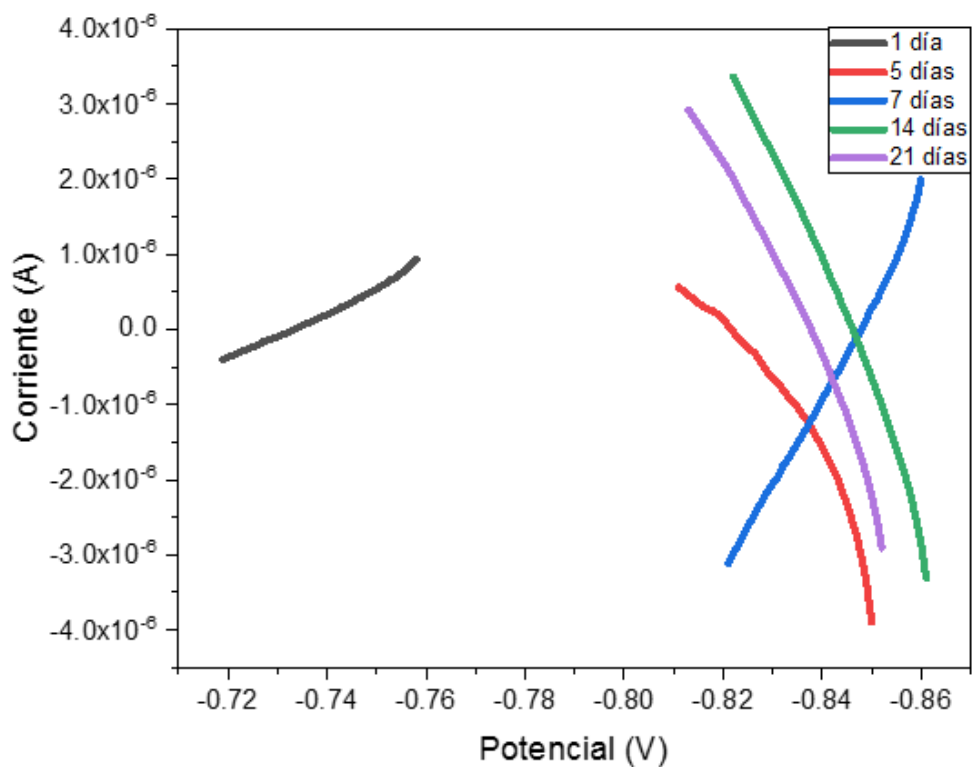


Figura 34. LSV de muestra de Ti6Al4V después de 21 días en solución FM inoculada con *C. albicans*.

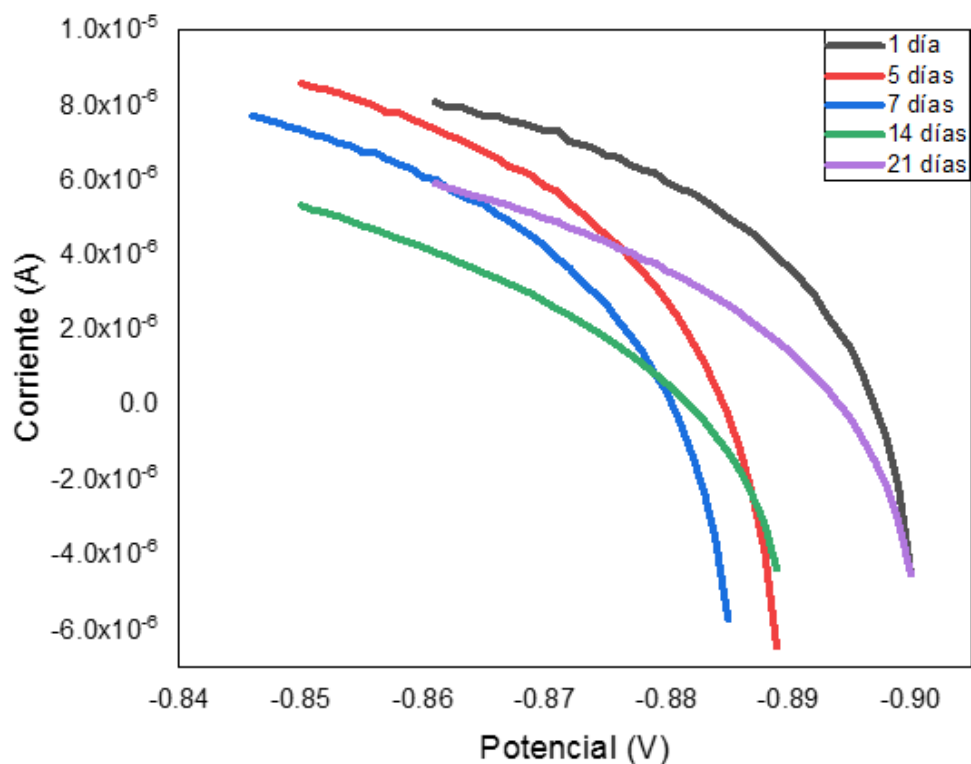


Figura 35. LSV de muestra de Ti6Al4V NTs después de 21 días en solución FM inoculada con *C. albicans*.

4.2.3 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA (EIS).

Los diagramas de Nyquist proveen información valiosa para dilucidar el comportamiento de la superficie en contacto con el electrolito con el paso del tiempo y la interacción en la interface entre electrolito/substrato. En la **Figura 36** se observa que el comportamiento de Ti 2 está gobernado por un proceso de difusión durante todo el tiempo del estudio.

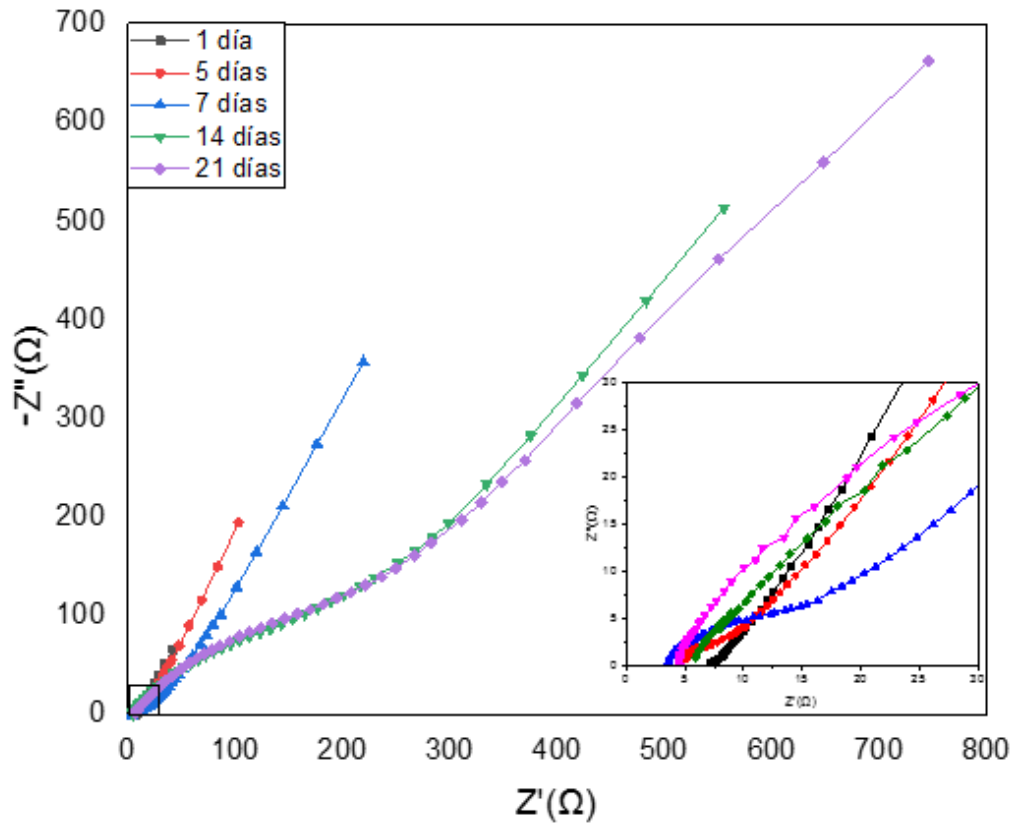


Figura 36. Diagrama de Nyquist de muestra de Ti durante 21 días en solución FM inoculada con *C. albicans*.

El diagrama de Ti NTs (**Figura 37**) presenta un comportamiento interesante ya que se aprecia un efecto meramente resistivo que disminuye en los primeros 7 días y aumenta ligeramente a los 14 y 21 días. Se detectó que tienden a formar un semicírculo, lo que indica que está regido por transferencia de carga (comportamiento resistivo). Con el paso de los días disminuye la parte imaginaria de la impedancia del semicírculo, siendo constante del tiempo, e indica la adsorción de distintas especies químicas las cuales pudieran ser productos de corrosión.

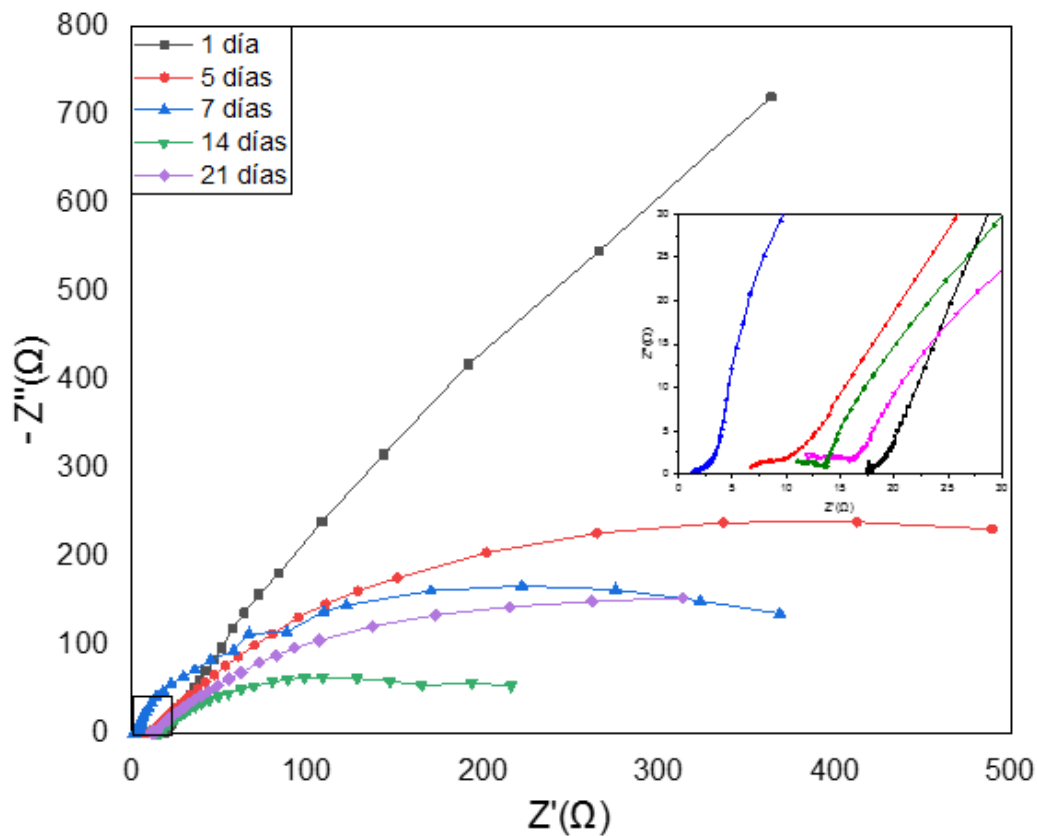


Figura 37. Diagrama de Nyquist de muestra de Ti NTs durante 21 días en solución FM inoculada con *C. albicans*.

El análisis de Ti6Al4V mostrado en la **Figura 38** ilustra una tendencia a formar un semicírculo al día 1 de interacción. Efecto que indica que la etapa temprana es de adaptación y acondicionamiento de la superficie por parte de la levadura para facilitar su adhesión y formación de la biopelícula. Con el transcurso de los días se aprecia que la parte resistiva del electrolito disminuye, lo que es indicativo de una completa adherencia y formación de una biopelícula madura y compacta con poros gobernada por un proceso de difusión.

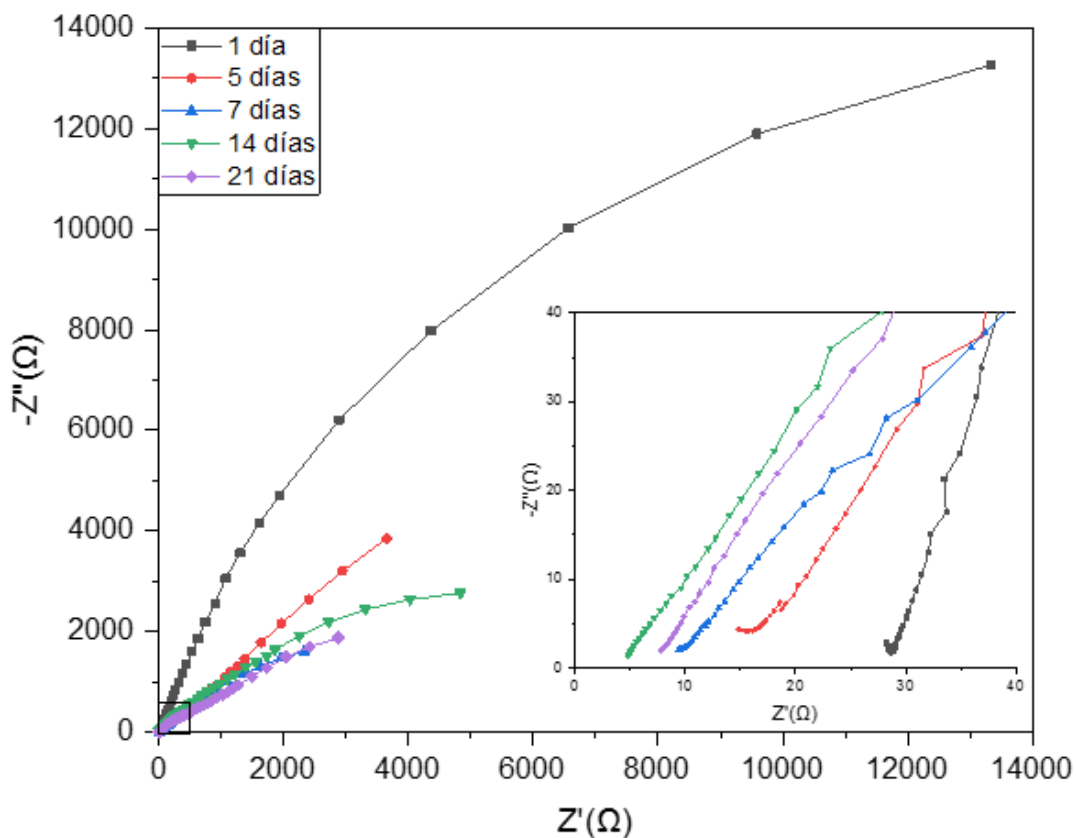


Figura 38. Diagrama de Nyquist de muestra de Ti6Al4V durante 21 días en solución FM inoculada con *C. albicans*.

Por otro lado el diagrama de Ti6Al4V NTs (**Figura 39**) presenta un comportamiento prácticamente lineal con aumento en la magnitud de la impedancia con el paso de los días de análisis siendo mayor a 21 días. Este comportamiento se asocia a la adsorción de moléculas orgánicas y del microorganismo metabólicamente activo generando un proceso de difusión en la superficie de los NTs.

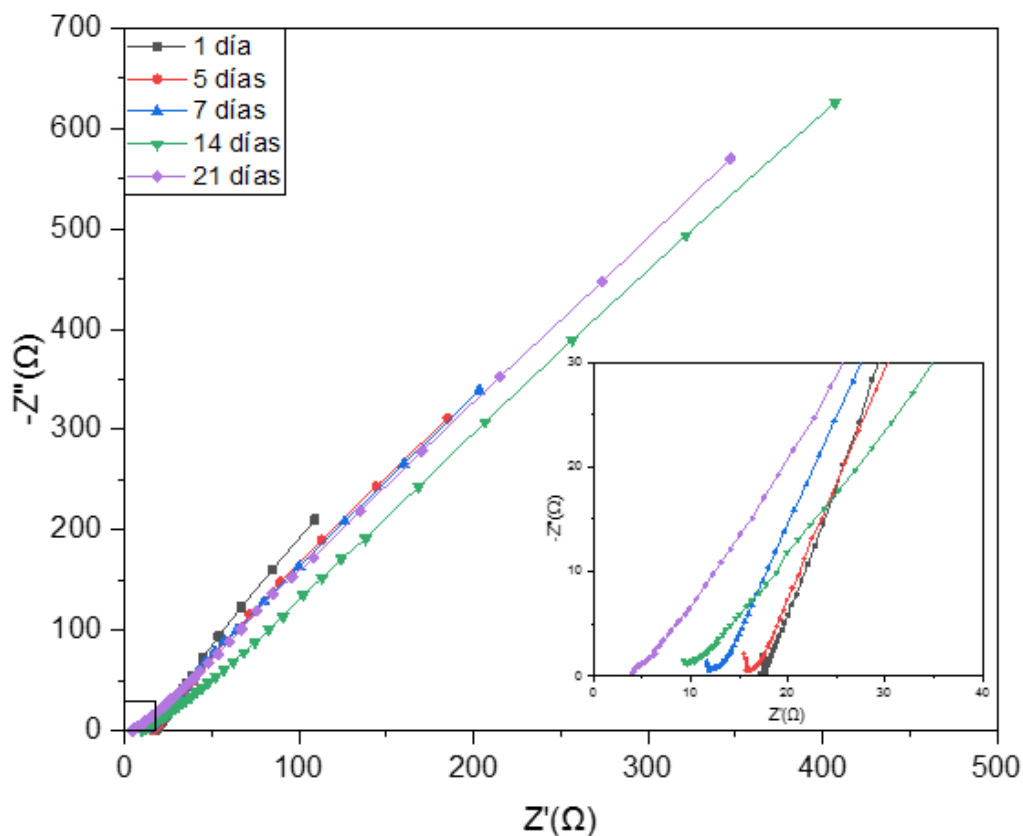


Figura 39. Diagrama de Nyquist de muestra de Ti6Al4V con NTs durante 21 días en solución FM inoculada con *C. albicans*.

4.3 CARACTERIZACIÓN DE SUPERFICIES.

Posterior a los 21 días del seguimiento electroquímico las muestras se enviaron al Laboratorio de Microscopía Avanzada con un lavado simple para la captura de la superficie con la biopelícula y posteriormente con una remoción de ella para obtener la información sobre la superficie directamente y evaluar el posible daño corrosivo.

4.3.1 ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELÉCTRICA DE BARRIDO.

La **Figura 40** presenta las muestras de Ti 2 como fueron recibidas y con NTs sintetizados. Se aprecia que el acabado con el cual se recibieron las muestras no es del todo liso y al momento de haber realizado el proceso de anodizado electroquímico se logra observar que no fue un ataque oxidativo del todo homogéneo sobre la superficie. A pesar de

lo anterior los NTs obtenidos se encuentran en el rango entre 75 y 80 nm de acuerdo a lo reportado por Escamilla, A. [72].

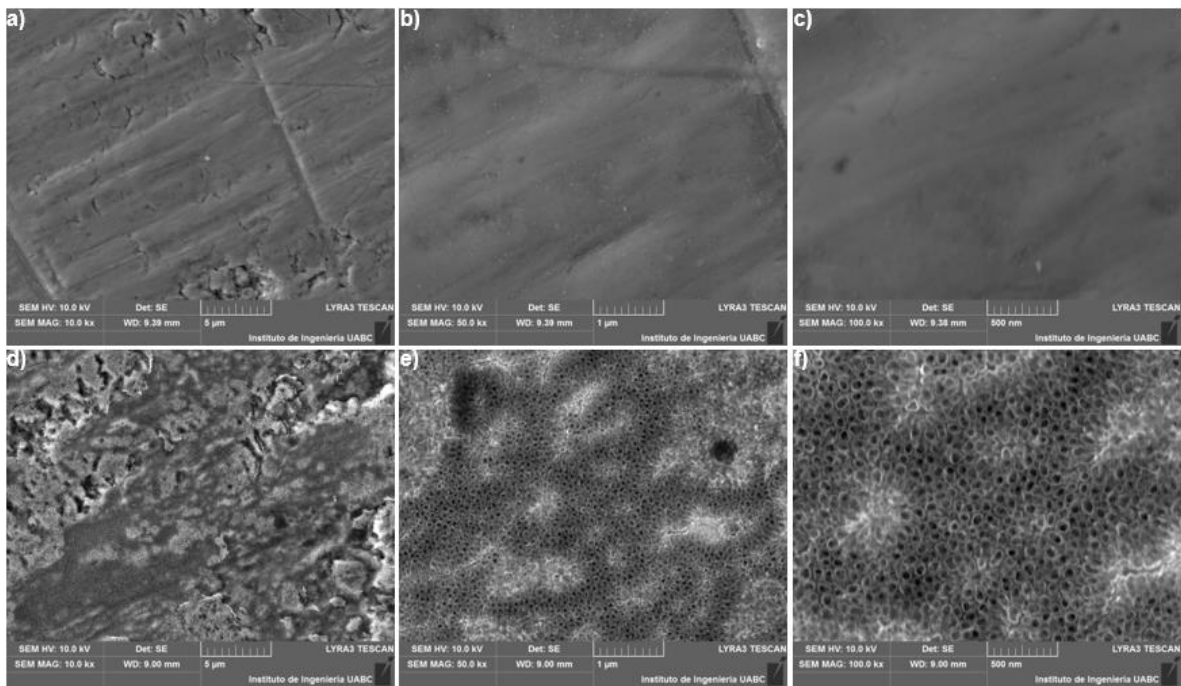


Figura 40. Micrografías SEM de muestras de Ti como fue recibida, a-c), y con NTs, d-f).

La **Figura 41** presenta la muestra de Ti con biopelícula y sin biopelícula después de los 21 días del ensayo electroquímico. En la **Figura 41** a-c) se aprecia la biopelícula de EPS de *C. albicans* cubriendo completamente la superficie de Ti, en los incisos d-f) se observa una degradación dependiente de fase al dejar esas aparentes “islas” las cuales son la fase β del titanio de forma que la fase α sufrió el proceso de corrosión localizada por su coeficiente de difusión de hidrógeno a temperatura ambiente permitiendo la acumulación de hidrógeno gas en la superficie propiciando su reducción dentro de la zona atacada y la disolución del catión (Ti^{3+}/Ti^{4+}) promoviendo un ataque por acción de *C. albicans* debido a que el proceso ocurrió en un pH ácido con un contenido importante de cloruros [92-93]. Las flechas rojas indican los puntos donde el ataque se observa más dramático. En el inciso f se aprecia la capa corroída de óxido de titanio por efecto de iones de cloruros y oxígeno que se difundían a través de la biopelícula.

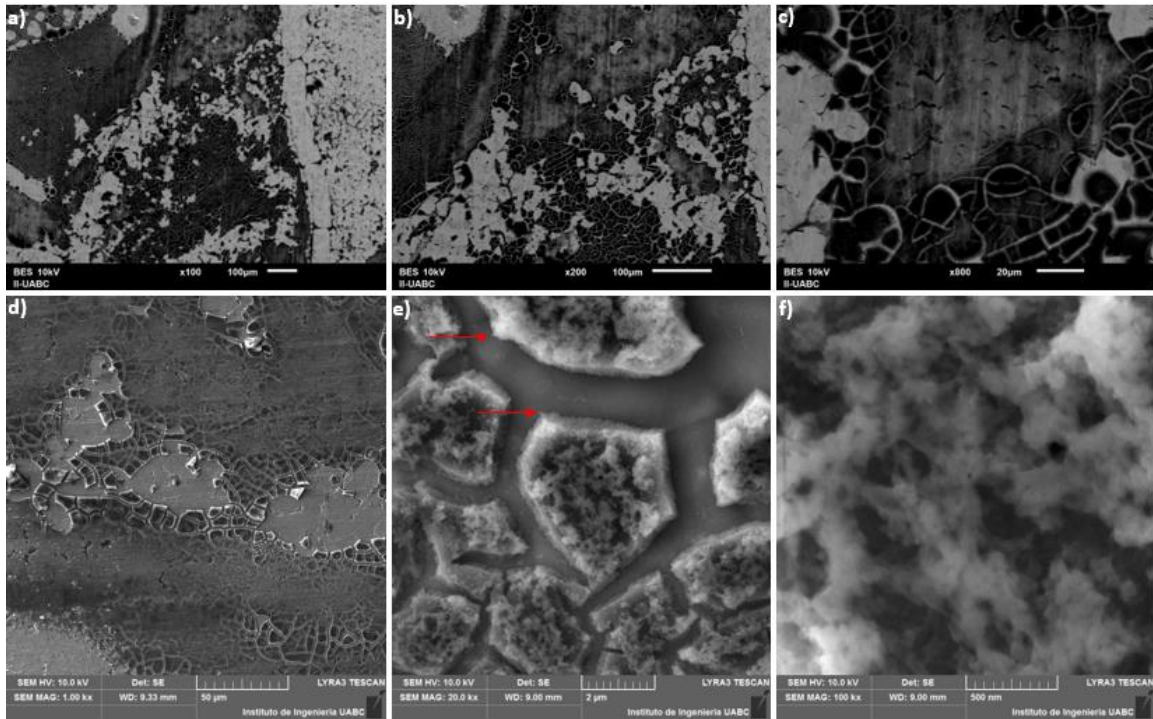


Figura 41. Micrografías SEM de Ti después de 21 días en solución FM inoculada con *C. albicans* con biopelícula, a-c), y sin biopelícula, d-e).

La **Figura 42** muestra la superficie de Ti 2 NTs cubierta por biopelícula, a-c), y sin biopelícula, d-f). Las micrografías con la biopelícula permiten observar de una manera mucho más clara la matriz de exopolisacáridos en la que se encuentran incrustadas las levaduras de *C. albicans*, su porosidad y que no es del todo homogénea, por lo que crea poros y canales de difusión de moléculas orgánicas, inorgánicas, iones, nutrientes, etc. que al ser retirados revelaron un ligero daño en la integridad de los NTs al haber corroído sus paredes mostrando irregularidades, recuadro azul, y desprendimiento de ciertas zonas con NTs, recuadro rojo.

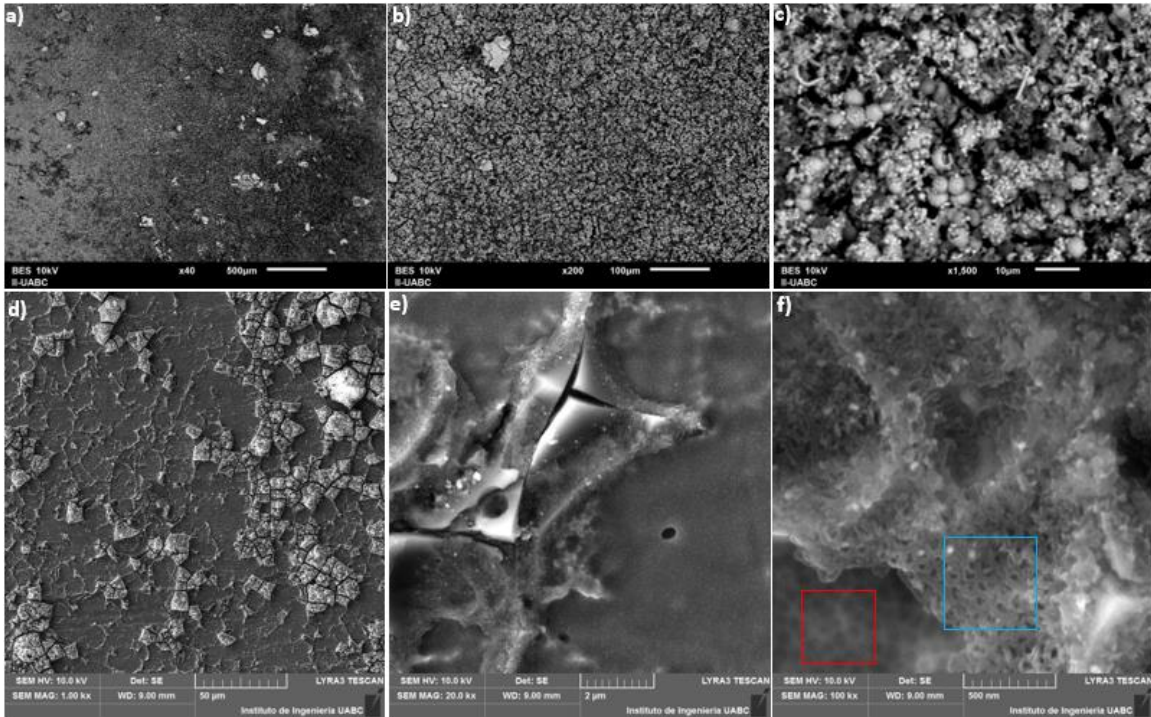


Figura 42. Micrografías SEM de Ti NTs después de 21 días en solución FM inoculada con *C. albicans* con biopelícula, a-c), y sin biopelícula, d-f).

4.3.2 ESPECTROSCOPIA DE ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X (EDS).

Los análisis elementales realizados a las muestras como se recibió de Ti 2 y Ti 2 NTs se muestran en las **Figuras 43 y 44**. Los espectros muestran presencia únicamente de titanio y en el caso de la muestra que no fue sometida a anodizado electroquímico y en la muestra con NTs se observa oxígeno (33.14%) y de flúor (5.01%), datos que se encuentran en la **Tabla 13**.

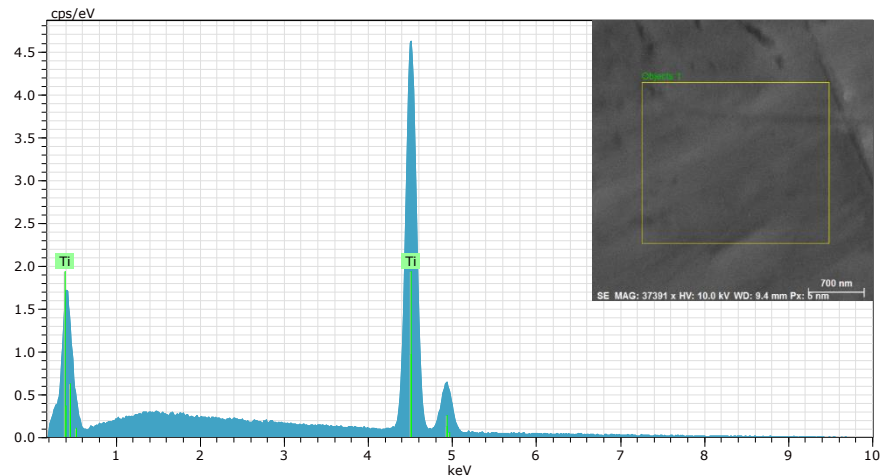


Figura 43. Espectro de muestra de Ti 2 control.

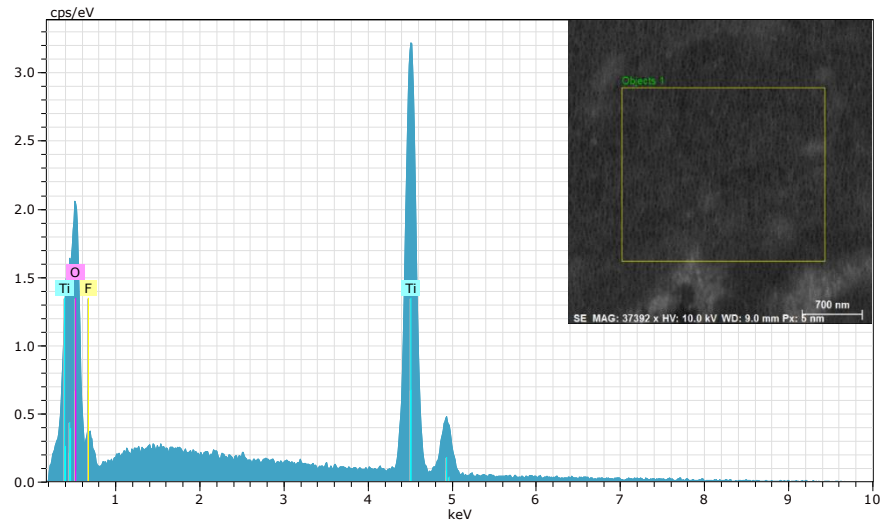


Figura 44. Espectro de muestra de Ti 2 después de proceso de anodizado electroquímico.

Tabla 13. Composición química de muestras de Ti control con NTs.

Sin modificación		Con NTs	
Elemento	Masa (%)	Elemento	Masa (%)
Ti	100	Ti	61.85
		O	33.14
		F	5.01

El espectro de la muestra de Ti 2 recubierta con biopelícula se presenta en la **Figura 45** y en la **Tabla 14** se presenta la composición elemental de los 4 puntos analizados. Por otro lado, en la **Figura 46** se presenta el espectro de la muestra de Ti 2 sin la biopelícula, y en la **Tabla 15** se presenta la composición elemental de los 4 puntos analizados.

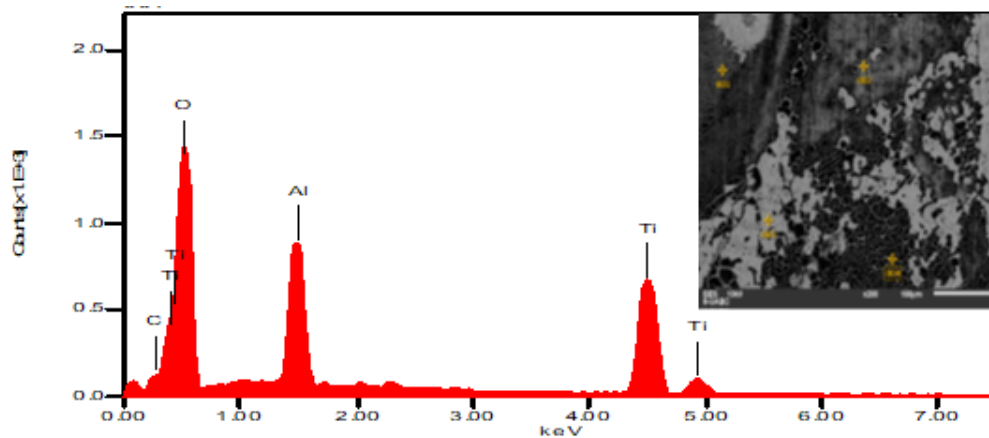


Figura 45. Espectro de muestra de Ti 2 recubierta con biopelícula después de 21 días en contacto con solución FM y *C. albicans*.

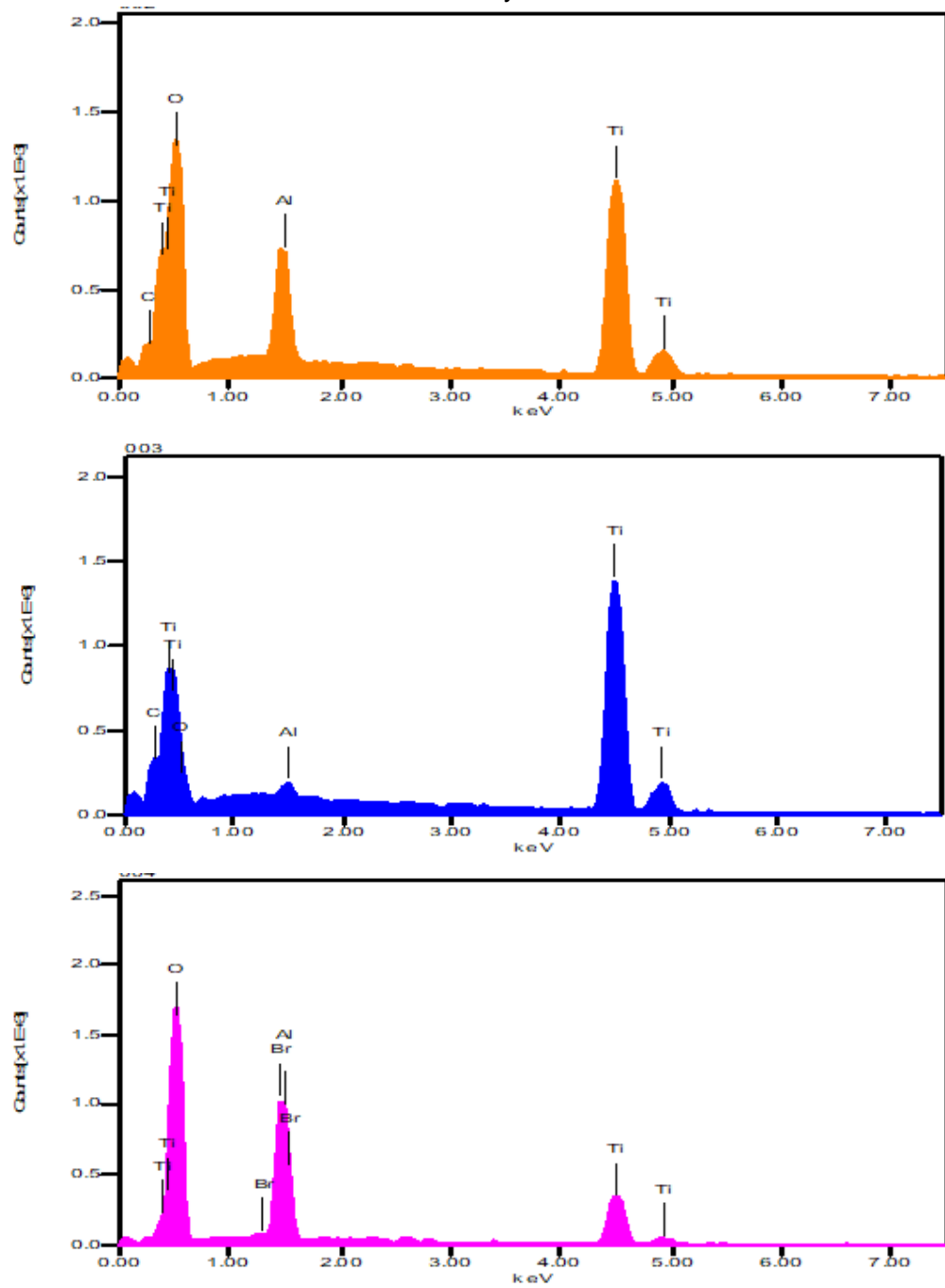


Figura 44 (continuación). Espectro de muestra de Ti 2 recubierta con biopelícula después de 21 días en contacto con solución FM y *C. albicans*.

Tabla 14. Composición química de Ti con biopelícula después de 21 días en contacto con solución FM y *C. albicans*.

	Concentración atómica (%)				
	O	C	Al	Ti	Br
1	31.66	1.37	8.23	58.74	-
2	23.53	1.48	4.68	70.31	-
3	2.71	2.78	0.47	94.04	-
4	39.83	-	4.70	38.62	16.85
Promedio	24.43	1.87	1.87	65.43	16.85

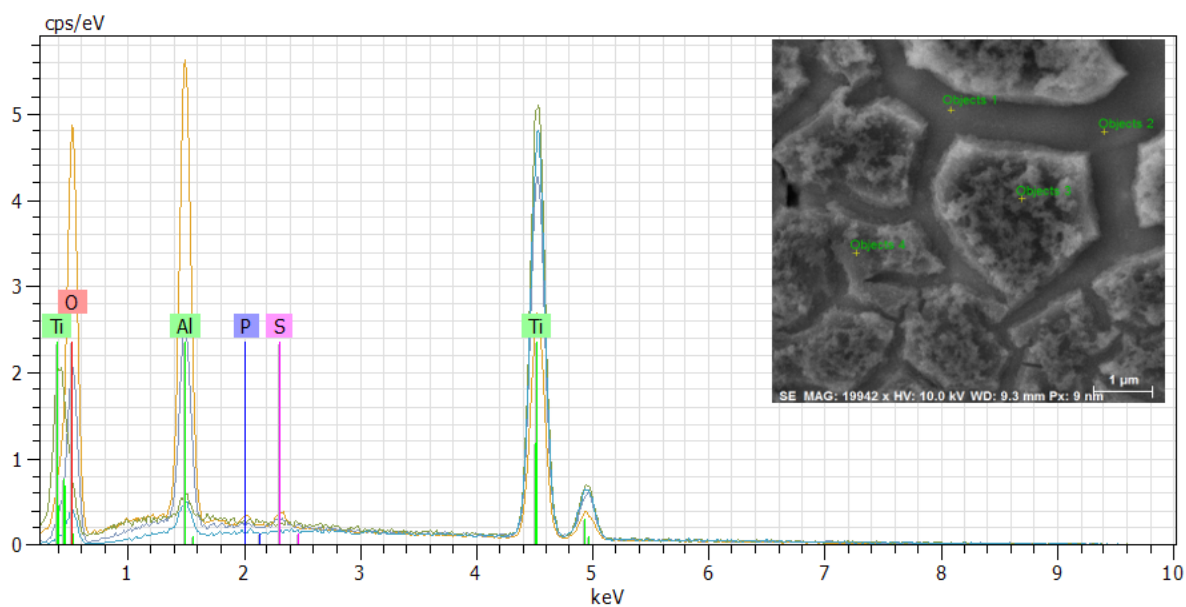


Figura 46. Espectro de muestra de Ti sin biopelícula después de 21 días en contacto con solución FM y *C. albicans*.

Tabla 15. Composición química de Ti sin biopelícula después de 21 días en contacto con solución FM y *C. albicans*.

	Concentración atómica (%)				
	O	Al	P	S	Ti
1	10.34	2.51	-	-	86.20
2	-	0.90	-	-	100.69
3	33.49	7.97	-	0.37	69.41
4	51.84	15.08	0.32	0.62	43.77
Promedio	37.89	6.61	0.32	0.49	75.2

El espectro de las superficies de Ti 2 NTs y biopelícula se muestra en la **Figura 46**, y en la **Tabla 16** se presenta el análisis elemental de los 4 puntos analizados. Mientras que en la **Figura 47** y **Tabla 17** se presentan el espectro y composición elemental de la superficie de Ti con NTs lavada sin la biopelícula después de los 21 días del ensayo.

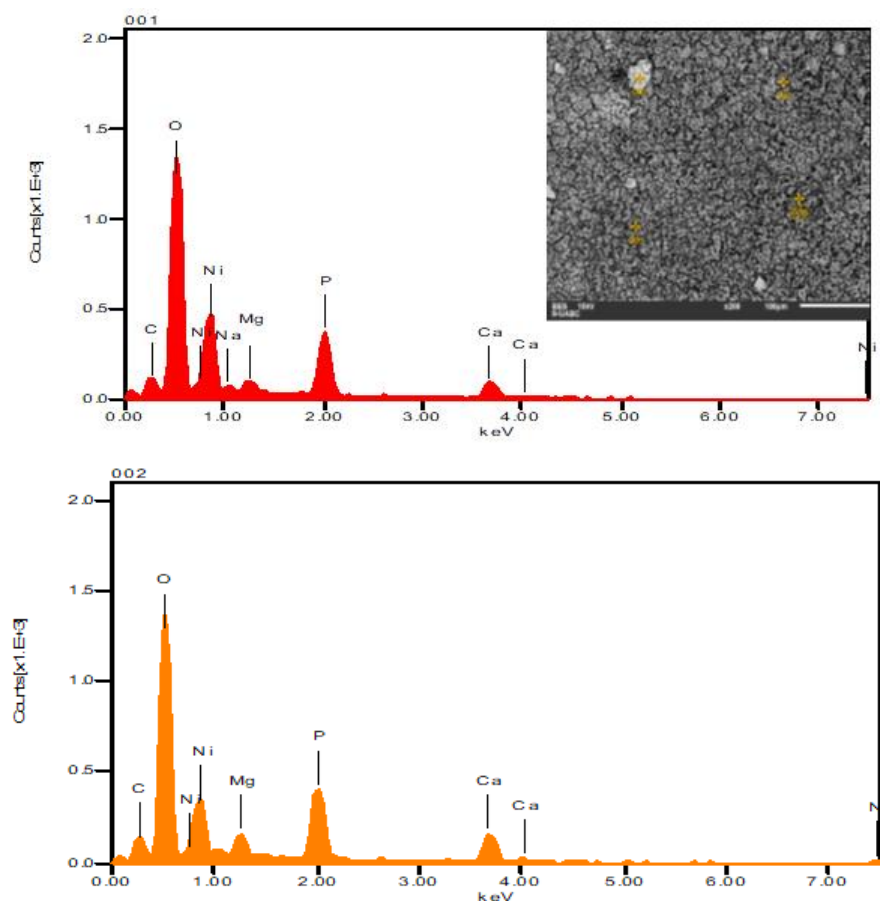


Figura 47. Espectro de muestra de Ti NTs con biopelícula después de 21 días en contacto con solución FM y *C. albicans*.

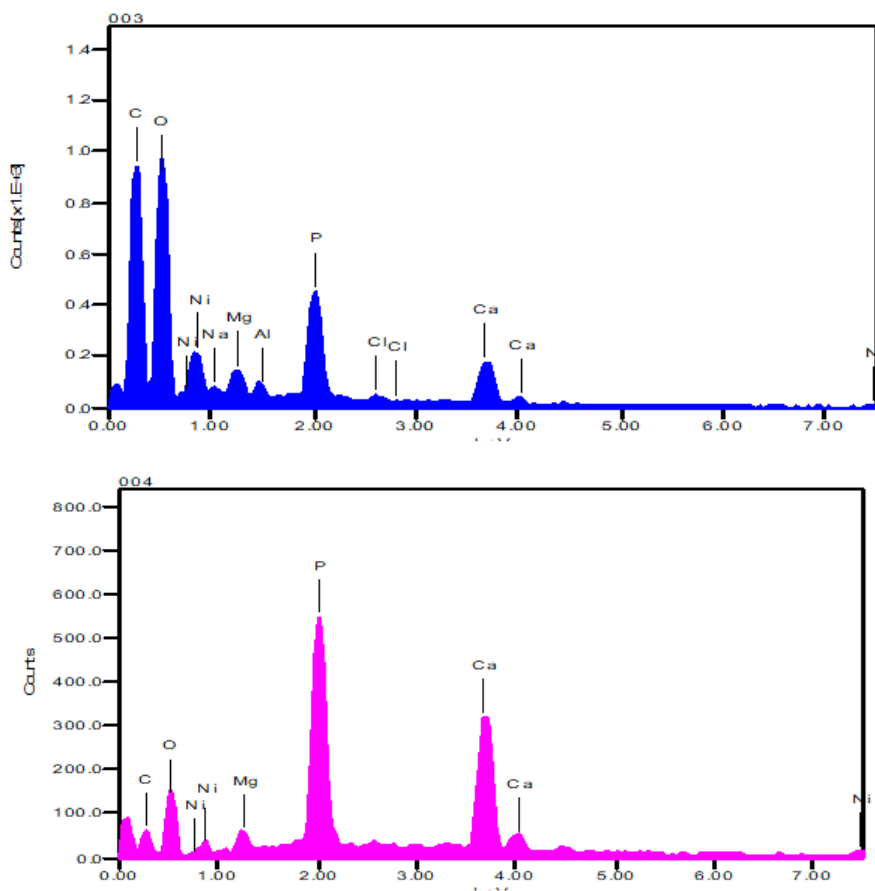


Figura 47 (continuación). Espectro de muestra de Ti NTs con biopelícula después de 21 días en contacto con solución FM y *C. albicans*.

Tabla 16. Composición química de Ti NTs y biopelícula después de 21 días en contacto con solución FM y *C. albicans*.

	Concentración atómica (%)								
	P	O	C	Na	Mg	Al	Cl	Ca	Ni
1	12.76	38.36	6.28	1.29	1.87	-	-	8.36	31.09
2	14.24	39.81	7.98	-	3.12	-	-	13.64	21.22
3	10.48	26.30	38.86	0.78	1.53	0.75	0.71	11.33	9.26
4	27.50	12.40	8.53	-	1.54	-	-	46.09	3.94
Promedio	16.25	29.21	15.41	1.04	2.01	0.75	0.71	19.85	16.38

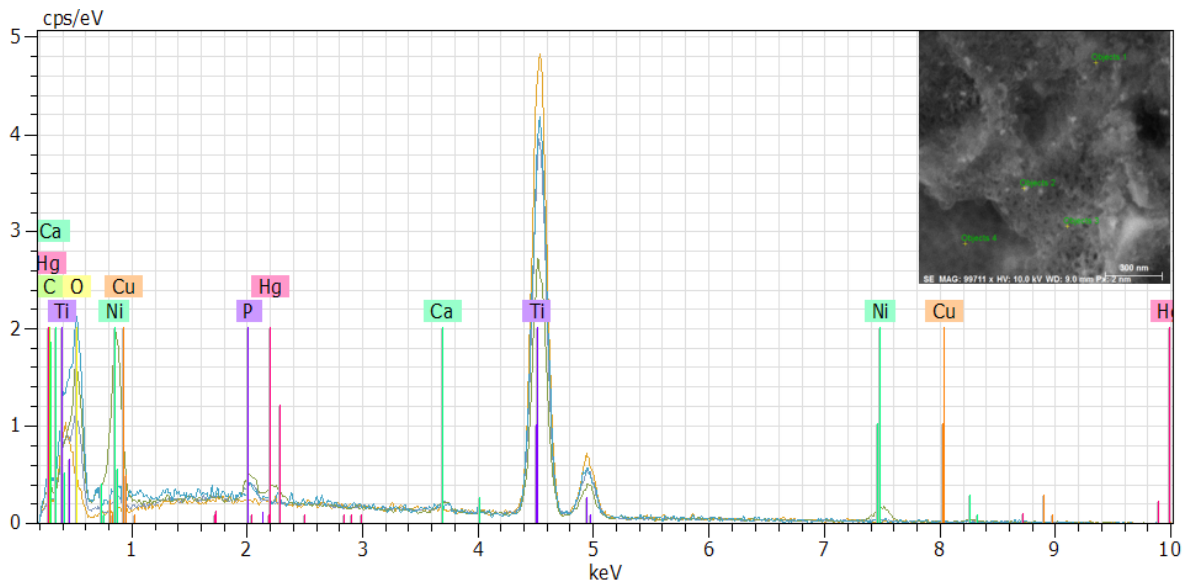


Figura 48. Espectro de muestra de Ti NTs sin biopelícula después de 21 días en contacto con solución FM y *C. albicans*.

Tabla 17. Composición química de Ti grado 2 con NTs y sin biopelícula después de 21 días en contacto con solución FM y *C. albicans*.

	Concentración atómica (%)							
	C	O	P	Ca	Ti	Ni	Cu	Hg
1	2.45	36.36	0.32	-	77.03	-	-	-
2	-	23.36	1.18	1.12	52.98	19.92	-	2.03
3	-	22.80	0.68	0.68	77.88	-	1.25	-
4	-	-	-	-	94.70	-	-	-
Promedio	2.45	27.51	0.73	0.90	75.64	19.92	1.25	2.03

CAPÍTULO 5
DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS.

Las superficies con recubrimientos nanométricos han demostrado reducir la adhesión y viabilidad bacteriana [94-95] así como micótica [20] al presentar residuos de especies químicas, como el flúor, que inhiben el anclaje de dichos microorganismos. Desde un punto de vista clínico es un punto crítico evitar la adherencia temprana de microorganismos, pues de otra manera, dará inicio un proceso que concluirá con la formación de una biopelícula de exopolisacáridos con las posibles especies patógenas incrustadas en ella siendo protegidas del sistema inmune y de tratamientos con antibióticos o antimicóticos [96].

La reducción de la deposición de microorganismos por el control en las configuraciones fisicoquímicas de la superficie, ha sido una estrategia que ha avanzado en los últimos años [95, 97]. Información que soporta los resultados obtenidos, donde se descubrió una viabilidad menor en las superficies con NTs comparada con las superficies control. La recuperación de células viables es un parámetro importante, debido a que indica si aquellas que se encontraban adheridas en la biopelícula cuenta con un crecimiento retardado lo que sugeriría una alteración en su desarrollo, en UFC lo que mostraría una reducción en su posterior crecimiento y capacidad de colonización disminuyendo su capacidad infecciosa.

Como se observa en las **Figuras 26 y 27** hay un menor crecimiento en las superficies con NTs comparando con las superficies sin modificación, lo cual permite corroborar lo reportado previamente por Beltrán-Partida *et al.* que señalan que la presencia de NTs no permite una correcta adherencia de la levadura ni mucho menos una proliferación en una correcta formación de una biopelícula estable la cual cumpla su función de protección y formación de gradientes de concentración de iones, metabolitos y nutrientes [20, 71, 94].

5.2 ENSAYOS ELECTROQUÍMICOS.

El OCP representa el estado de equilibrio termodinámico de la superficie de estudio. En las superficies analizadas se observa que con el paso de las horas y con mayor tiempo de

interacción entre la solución electrolítica y sus iones, la levadura y la superficie comienza a variar. Para el Ti dicho potencial se modifica al iniciar la deposición de moléculas orgánicas, acondicionamiento de la superficie, al aumentar a cerca de -0.816 V, tendencia que continúa durante los primeros 7 días. Posteriormente el potencial tiende a disminuir a los 14 días siendo un indicativo de un posible desprendimiento de la biopelícula aunque a los 21 días vuelve a incrementarse en una pendiente que después de 24 horas sigue subiendo a valores mayores de -0.82 V.

En la superficie de Ti NTs ocurre un efecto distinto debido a que con el paso de los días el OCP decae a valores más negativos indicando que la superficie se encuentra recubierta con la biopelícula pero de forma inestable. Un fenómeno similar ocurre en la muestra de Ti6Al4V control pues solo a 21 días el potencial tiene un ligero aumento terminando en -0.835 V mientras que en Ti6Al4V NTs el potencial a las 24 horas se encuentra cerca de -0.9 V, a los 5 días terminar cerca de -0.875 V y aumenta a -0.85 a los 7 días pero vuelve a decaer a los 14 y 21 días con valores entre -0.86 V y 0.874 V.

En la prueba de LSV el E_{corr} obtenido en cada una de las superficies así como la forma del potencial contra corriente dan para interpretar distintas situaciones en la superficie de Ti. Para Ti el valor del potencial de corrosión varía de -0.823 V, a -0.811 V, -0.801 V y sufre un aumento a los 14 días a -0.827 V para decaer hasta -0.790 V a los 21 días indicando que la superficie se pasiva por la adhesión de la biopelícula. Lo anterior concuerda con los datos obtenidos en OCP pues ambos indican que la muestra Ti NTs además de no permitir una correcta adhesión de la levadura de igual manera sufre un efecto de pasivación ante un ataque corrosivo y se tiende hacia valores más nobles.

Para Ti NTs el potencial de corrosión tiene una tendencia a disminuir su valor volviéndose cada vez más activo ante un proceso corrosivo lo que permite pensar que las imperfecciones del acabado de la lámina de Ti tienen un efecto adverso al interactuar con el electrolito y la levadura promoviendo una mayor deposición para la formación de celdas de concentración que tienen un efecto corrosivo.

Los valores para Ti6Al4V tienden a disminuir, comportamiento similar a Ti NTs, para aumentar ligeramente a los 21 días a un valor de -0.813 de -0.822 mientras que para Ti6Al4V NTs los valores se comportan muy similares variando en el orden de los mV.

Por medio de los diagramas de Nyquist es posible dilucidar información valiosa sobre el mecanismo de interacción entre la superficie, el electrolito y la levadura de *C. albicans* con el paso del tiempo. En la **Figura 35** se observa que el comportamiento de Ti está gobernado por un proceso de difusión durante todo el tiempo del estudio, con el paso de los días aumentó la magnitud de la parte real e imaginaria, sin embargo, la zona de altas frecuencias presenta el inicio de un semi-círculo lo que indica que la transferencia de carga comienza a regir el comportamiento en pendiente es indicativo de adsorción de moléculas orgánicas y mismas células a la superficie lo cual se traduce en formación de la biopelícula .

El diagrama de Ti NTs (**Figura 37**), presenta datos interesante, ya que se aprecia un comportamiento meramente resistivo que disminuye en los primeros 7 días y aumenta ligeramente a los 14 y 21 días, y todos tienden a formar un semicírculo lo que indica que está regido por transferencia de carga (comportamiento resistivo). Con el paso de los días disminuye la parte imaginaria de la impedancia del semicírculo, constante de tiempo, e indique la adsorción de distintas especies químicas las cuales pudieran ser productos de corrosión.

El análisis de Ti6Al4V mostrado en la **Figura 38** indica una tendencia a formar un semicírculo al día 1 de interacción, lo cual sugiere que la etapa temprana es de adaptación y acondicionamiento de la superficie por parte de la levadura para facilitar su adhesión y formación de la biopelícula. Con el transcurso de los días se aprecia que la parte resistiva del electrolito disminuye así como la magnitud de la parte real e imaginaria de la impedancia. Esto es indicativo de una completa adherencia y formación de una biopelícula madura, compacta con poros gobernada por un proceso de difusión.

Por otro lado, el diagrama de Ti6Al4V NTs presenta un comportamiento prácticamente lineal con aumento en la magnitud con el paso de los días de análisis. Este comportamiento se asocia a la adsorción de moléculas orgánicas y microorganismo, se observa que fue constante en todo el ensayo de forma que dicha deposición gobernó el ensayo.

5.3 CARACTERIZACIÓN DE SUPERFICIE.

Las muestras control de Ti que se presentan en la **Figura 39** se observa que el acabado desincrustado de las láminas no fue muy fino de manera que al realizar el anodizado electroquímico se aprecian ciertas hendiduras e imperfecciones que muestran una capa no homogénea de NTs de TiO₂ los cuales tuvieron un diámetro entre 75 y 80 nm que de acuerdo a estudios previos disminuyen la adherencia y proliferación de *C. albicans* [20]. La **Figura 40** y **Tabla 13** demuestran la presencia de flúor y un aumento considerable de oxígeno en las superficies con NTs. Se sabe que el flúor tiene propiedades antimicrobianas sobre todo con bacterias relacionadas con las caries, *Staphylococcus mutans* por ejemplo [97, 98].

En la **Figura 41** se encuentran las micrografías de Ti con biopelícula después de 21 días y sin ella. Con la biopelícula se observa la capa de exopolisacáridos adherida a la superficie con ciertas zonas que permiten observar el sustrato el cual presenta corrosión por picadura como se observa en el inciso c). Del inciso d-f) se observa la superficie sin la biopelícula y hay un fenómeno interesante debido a que la fase β de titanio se encuentra por encima de las zonas que corresponden a la fase α que tiene mayor susceptibilidad a la corrosión de acuerdo al estudio de Chen *et al.* quienes mencionan que en ciertas condiciones de pH ácido dicha fase tiene mayor tendencia a degradarse que la fase β que sufre una transformación física por la pérdida de propiedades mecánicas y promoviendo la aparición de corrosión por hendidura que se asocia a la CMI.

La superficie de Ti NTs se muestra en la **Figura 42**, con biopelícula, a-c), y sin biopelícula, d-f). Se observa la matriz de exopolisacáridos en la que se encuentran incrustadas las levaduras de *C. albicans*, su heterogeneidad al contar con poros los cuales facilitan los canales de difusión de iones y especies químicas oxidantes que promueven la proliferación del microorganismo. Las protuberancias que se observan en el inciso d) son partes de la biopelícula que no se logró remover sin embargo los NTs sufrieron ese destino al ser desprendidos por influencia de la levadura durante los 21 días del estudio. Dicha acción se puede atribuir a los cloruros presentes en la solución FM los cuales al disminuir la pasividad de la capa de TiO₂ atacaron directamente la capa insoluble hasta desprenderla.

En los espectros obtenidos por EDS se observa contenido de carbono cuando hay presencia de la biopelícula lo cual es indicativo de material biológico. En los análisis de titanio con NTs, tabla 12 y 13, la presencia de varios metales es indicativo de posible contaminación de la cámara del microscopio, níquel, cobre y Hg.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6. CONCLUSIONES.

Para el desarrollo experimental de la presente investigación se simularon las condiciones desde una perspectiva química lo más apegado al posible ambiente bucal: ausencia de luz al instalar la celda electroquímica recubierta con aislante negro dentro de una caja de poliestireno aislada, temperatura fisiológica controlada al ingresar a la caja una fuente de luz que mantuviera la temperatura a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ con la celda electroquímica completamente cubierta para evitar una interacción entre los fotones, la solución simulada de saliva, el modelo microbiológico y la muestra de cada ensayo. Por lo tanto, se puede considerar que los resultados obtenidos y analizados se encuentran fuertemente apegados a la realidad.

La hipótesis de la investigación fue comprobada al presentar una pasivación mayor las superficies con NTs de Ti y un ataque corrosivo menor comparada con las superficies control. Aun así, se recomiendan estudios donde se utilice una superficie que pueda ser tratada por metalografía previo a los estudios para obtener parámetros que han sido estandarizados con resultados no tengan tanta variabilidad entre ellos al contar con una superficie homogénea donde se sintetizarán las NTs. En el presente estudio las irregularidades a escala nanométrica de las muestras permitieron el anclaje de *C. albicans* en las regiones donde la síntesis de los NTs no fue homogénea lo que resultó en corrosión que probablemente no se hubiera presentado si la muestra se hubiera pulido a espejo previo a someterla al anodizado oxidativo al igual que dichas irregularidades funcionaron como pequeños canales donde la deposición y proliferación fueron posibles.

Se espera que en siguientes investigaciones se utilice un número mayor de modelos microbiológicos de microorganismos presentes en la cavidad bucal, crecimientos de bacterias con levaduras donde pueda evaluarse el comportamiento entre ambas en la formación de biopelícula y su desarrollo en agares específicos, tipos de exopolímeros secretados y su influencia sobre el deterioro del metal en solución simulada de saliva tanto

como saliva natural. Al reportarse que tienen la capacidad de adherirse sobre superficies metálicas generando problemas de infección e inflamación que desembocan en la remoción del implante, y que probablemente se observará con una biopelícula en su superficie resultando en problemas relacionados con la corrosión inducida por microorganismos. Lo anterior con la finalidad de probar si las superficies con NTs de Ti con el procedimiento de anodizado tiene un efecto negativo sobre la adherencia microbiana como fue demostrado en el presente estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- [1] Raichev, R., Veleva L., Valdez B. (2009). *Corrosión de Metales y Degradación de Materiales*. Universidad Autónoma de Baja California y Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados. Mexicali, Baja California, México: Universitaria.
- [2] Lu, C., Zheng, Y. y Zhong, Q. (2017). Corrosion of Dental Alloys in Artificial Saliva with *Streptococcus mutans*. *PLOS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0174440.
- [3] Chaturvedi, T.P. (2009) An Overview of the Corrosion Aspects of Dental Implants (Titanium and its Alloys). *Indian Journal of Dental Research*, 20, 91-98. doi: 10.4103/0970-9290.49068.
- [4] Kovacs, P. y Davidson, J. (1996) Chemical and electrochemical aspects of the biocompatibility of titanium and its alloys. En Brown, S. y Lemons, J. (Ed.). *Medical Application of Titanium and its Alloys: The Material and Biological Issues (pp163-178)*. West Conshohocken, Pennsylvania: ASTM International. doi: 10.1520/STP16077S.
- [5] Seunghan, Oh., Chiara, D., Li-Han, Ch. Pisanic, T., Fiñones, R. and Sungho, J. (2005). *Significantly Accelerated Osteoblast Cell Growth on Aligned TiO₂ Nanotubes*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 97-103.
- [6] Brammer, K., Seunghan, Oh., Cobb, C., Bjursten, L., van der Heyde, H. and Jin, S. (2009). Improved Bone-forming Functionality on Diameter-Controlled TiO₂ Nanotube Surface. *Acta Biomaterialia*, 5(8), 3215-3223.
- [7] Khang D., Lu, J., Yao, C., Haberstroh, K. and Webster, T. (2008). *The Role of Nanometer and Sub-micron Surface Features on Vascular and Bone Cell Adhesion on Titanium*. *Biomaterials*, 29(8), 970-983.

- [8] Hatton, B. (2015). Antimicrobial Coatings for Metallic Biomaterials. En Wen, C. (Ed.). *Surface Coating and Modification of Metallic Biomaterials (pp 379-391)*. Cambridge, Reino Unido: Woodhead Publishing. doi: 10.1016/B978-1-78242-303-4.00013-2.
- [9] Prasad, K., Bazaka O., Chua M., *et al.* (2017). Metallic Biomaterials: Current Challenges and Opportunities. *Materials*, 10(884), 1-33. doi: 10.3390/ma10080884.
- [10] Srivastava, S. y Ghosh, B. (2018). Metallic Biomaterials for Dental Implant Systems. En Preetha, B., Skreekala, M. y Sabu, T. (Ed.). *Fundamentals Biomaterials: Metals (pp 111-137)*. Cambridge, Reino Unido: Woodhead Publishing. doi: 10.1016/B978-0-08-102205-4.00005-2.
- [11] López, G., Morales, R., Olea, O. *et al.* (2013). Nanoestructuras Metálicas: Síntesis, Caracterización y Aplicaciones. Universidad Autónoma del Estado de México. Editorial Reverté.
- [12] Seneviratne, C.J. y Samaranayake, L.P. (2008). Biofilm Lifestyle of *Candida*: A Mini Review. *Oral Disesease*, 14, 582-590. doi: 10.1111/j.1601-0825.2007.01424.x.
- [13] Metwalli, K., Khan, S., Krom, B. y Jabra-Rizk, M. (2013). *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* and the Human Mouth: A Sticky Situation. *PLOS Phatogens*, 9(10). doi: 10.1371/journal.ppat.1003616.
- [14] Souza, J.C.M., Henriques, M., Oliverira, R., Teughels, W., Celis, J.P. y Rocha, L.A. (2010). Do Oral Biofilms Influence the Wear and Corrosion Behavior of Titanium?. *Biofouling*, 26(4), 471-478. doi: 10.1080/08927011003767985.
- [15] Suito, H., Iwawaki, Y., Goto, T., Tomotake, Y. y Ichikawa, T. (2013). Oral Factors Affecting Titanium Elution and Corrosion: An In Vitro Study Using Simulated Body Fluid. *PLOS ONE*, 8(6). doi: 10.1371/journal.pone.0066052.
- [16] Bürgers, R., Hahnel, S., Reichert, T. *et al* (2009). Adhesion of *Candida albicans* to Various Dental Implant Surfaces and the Influence of Salivary Pellicle Proteins. *Acta Biomaterialia*, 6(2010), 2307-2313. doi: :10.1016/j.actbio.2009.11.003.

- [17] Brown A., Brown, G., Netea M., Gow N. (2014). Metabolism Impacts upon *Candida albicans*. Immunogenicity and Pathogenicity at Multiple Levels. *Trends in Microbiology*, 22(11), 614-622. doi: 10.1016/j.tim.2014.07.001.
- [18] Buchacz, K., Lau, B., Jing, Y., *et al.* (2016). Incidence of AIDS-Defining Opportunistic Infections in a Multicohort Analysis of HIV-infected Persons in the United States and Canada, 2000-2010. *The Journal of infectious diseases*, 214(6), 862-872. doi: 10.1093/infdis/jiw085.
- [19] Roy, P. Steffen, B. y Patrick, S. (2011). TiO₂ Nanotubes: Synthesis and Applications. *Angewandte Chemie International*, 50, 2909.
- [20] Beltrán-Partida, E., Valdez-Salas, B., Curiel-Álvarez, M., Castillo-Urbe, S., Escamilla, A., Nedev, N. (2017). Enhanced Antifungal Activity by Desinfecting Titanium Dioxide Nanotubes via Reduced Nano-Adhesion Bonds. *Material Science and Engineering: C., Materials for Biological Applications*, 76, 59-65.
- [21] Abraham, C. (2014). A Brief Historical Perspective on Dental Implants, Their Surface Coatings and Treatments. *The Open Dentistry Journal*, 8, 50-55. doi: 10.2174/1874210601408010050.
- [22] Saini, M., Singh, Y., Arora, P., Arora, V. y Jain, K. (2015). Implant Biomaterials: A Comprehensive Review. *World Journal of Clinical Cases*, 3(1), 52-57. doi: 10.12998/wjcc.v3.i1.52.
- [23] Manivasagam, G., Dhinasekaran, D. y Rajamanickam A. (2010). Biomedical Implants: Corrosion and its Prevention – A Review. *Recent Patents on Corrosion Science*, 2, 40-54.
- [24] Olmedo, D., Tasat, D., Duffó, G., Guglielmotti, M. y Cabrini, R. (2009). The Issue of Corrosion in Dental Implants: A Review. *Acta Odontológica Latinoamericana*, 22(1), 3-9.

- [25] Manam, N., Harun, W., Shri, D., Ghani, S., Kurniawan, T., Ismail, M. and Ibrahim, M. (2017). Study of Corrosion in Biocompatible Metals for Implants: A Review. *Journal of Alloys and Compounds*, 701, 698-715. doi: 10.1016/j.jallcom.2017.01.196.
- [26] Sastri, V. (2014). Types of Corrosion Inhibitor for Managing Corrosion in Underground Pipelines. En Orazem, M (Ed.). *Underground Pipeline Corrosion. Detection, Analysis and Prevention (pp161-211)*. Cambridge, Reino Unido: Woodhead Publishing.
- [27] Antunes, R. y Lopes, M. (2013). Corrosion in biomass combustion: A Materials Selection Analysis and its Interaction with Corrosion Mechanisms and Mitigation Strategies. *Corrosion Science*, 76, 6-26. doi: /10.1016/j.corsci.2013.07.013.
- [28] Briggs, T. y Eseonu, Y. (2014). Efficiency of Corrosion Inhibitors on Cathodic Protection System. *International Journal of Engineering Trends and Technology*, 8(3), 113-126. doi: 10.14445/22315381/IJETT-V8P222.
- [29] Zuo, R. (2007). Biofilms: Strategies for Metal Corrosion Inhibition Employing Microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 1245-1253. doi: 10.1007/s00253-007-1130-6
- [30] Schweitzer, P. (2007). *Fundamentals of Metallic Corrosion. Atmospheric and Media Corrosion of Metals*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- [31] Koch, G., Brongers, M. y Thompson, N. Corrosion Costs and Preventive Strategies in the United States. Número de Publicación: FHWA-RD-01-156. *NACE International*. Houston, Estados Unidos.
- [32] Hou, B., Li, X., Ma, X. et al. (2017). The Cost of Corrosion in China. *Nature Partner Journals. Materials Degradation*, 1(4).
- [33] Tems, R. and Al Zahrani, A.M. (2006). Cost of Corrosion in Oil Production and Refining. *Saudi Aramco Journal of Technology*, 2, 14.
- [34] Cramer, S. y Covino, B. (2003). Handbook 13A. *Corrosion: Fundamentals, Testing and Protection*. ASM International.

- [35] Majed, R. y Hameed, M. (2016). Capítulo 5, Tribocorrosion. En Darji, P. (Ed.). *Advances in Tribology* (89-110). Rijeka, Croacia: IntechOpen.
- [36] Course Hero. (2020). *General Chemistry. Electrochemistry. Corrosion*. Recuperado de: <https://www.coursehero.com/sg/general-chemistry/corrosion/>.
- [37] Brad, D. y Faulkner, L. (2001). *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*. Nueva York, Estados Unidos: Wiley.
- [38] Javaherdashti, R. (2008). *Microbiologically Influenced Corrosion. An Engineering Insight*. Australia del Oeste, Australia: Springer. doi: 10.1007/978-1-84800-074-2.
- [39] Klinke, T., Kneist, S., de Soet, J., Kuhlisch, E., Mauersberger, S., Förster, A. & Klimm, W. (2009). Acid Production by Oral Strains of *Candida albicans* and Lactobacilli. *Caries Research*, 43(2), 83-91.
- [40] Rodriguez, D., Valderrama, P., Wilson, T., Palmer, K., et al. (2013). Titanium Corrosion Mechanisms in the Oral Environment: A Retrieval Study. *Materials*, 6, 5258-5274. doi: 10.3390/ma6115258.
- [41] Little, B., Blackwood, D., Hinks, J. et al. (2020). Microbially Influenced Corrosion – Any Progress?. *Corrosion Science*, 170. doi: 10.1016/j.corsci.2020.108595.
- [42] Shunkla, S., Mangwami, N., Karley, D. y Rao, S. (2017). Chapter 19. Bacterial Biofilms and Genetic Regulation for Metal Detoxification. En Das, S. y Dash, H. (Ed.) *Handbook of Metal-Microbe Interactions and Bioremediation* (pp 317-332). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- [43] Nadell, C., Xavier, J. y Foster, K. (2009). The Sociobiology of Biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*, 33, 206-224. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00150
- [44] Vasudevan, R. (2014). Biofilms: Microbial Cities of Scientific Significance. *Journal of Microbiology and Experimentation*, 1(3), 1-16.

- [45] Cvitkovitch, D., Li, Y. y Ellen, R. (2003). Quorum Sensing and Biofilm Formation in streptococcal Infections. *Journal of Clinical Investigation*, 112, 1626-1632. doi: 10.1172/JCI200320430.
- [46] Malagutti, F., Ramos, L., Freire, F. et al. (2017). Influence of Sucrose on Growth and Sensitivity of *Candida albicans* alone and in Combination with *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans* to Photodynamic Therapy. *Lasers in Medical Science*, 32, 1237-1243. doi: 10.1007/s10103-017-2201-2.
- [47] Beech, I., Bergel, A. Mollica, et al. (2000). Simple Methods for the Investigation of the Role of Biofilm in Corrosion. *Brite Euram Thematic Network on MIC of Industrial Materials, Task Group 1, Biofilm Fundamentals*.
- [48] Little, B. y Wagner, P. (1997). Myths Related to Microbiologically Influenced Corrosion. *Mater Perform*, 36(6), 40-44.
- [49] Meiyong, L. y Min, D. (2018). A Review: Microbiologically Influenced Corrosion and the Effect of Cathodic Polarization on Typical Bacteria. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 17, 431-446.
- [50] Rao, T. (2012). Chapter 6. Microbial Fouling and Corrosion: Fundamentals and Mechanisms. Rajagopal, S., Jenner, H. y Venugopalan, V. (Eds.) *Operational and Environmental Consequences of Large Industrial Cooling Water Systems (pp 97-126)*. Berlín, Alemania: Springer.
- [51] Uppuluri, P. y Lopez-Ribot, J. (2016). Go Forth and Colonize: Dispersal From Clinically Important Microbial Biofilms. *PLOS Pathogens*, 12(2), 1-9. doi: 10.1371/journal.ppat.1005397.
- [52] Li, S., Jeon, K., Kang, T., Kho, Y. y Kim, Y. (2001) Microbiologically Influenced Corrosion of Carbon Steel Exposed to Anaerobic Soil. *Corrosion*, 57:815–828.
- [53] Duan, J., Wu, S., Zhang, X., Huang, G., Du, M. y Hou, B. (2008). Corrosion of Carbon Steel Influenced by Anaerobic Biofilm in Natural Seawater. *Electrochimica Acta*, 54:22–28

- [54] Jia, R., Yang, D., Xu, J., Xu, D. y Gu, T. (2017). Microbiologically Influenced Corrosion of C1018 Carbon Steel by Nitrate Reducing *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm under Organic Carbon Starvation. *Corrosion Science*, 127:1–9
- [55] Little, B. y Ray, R. (2001). A Review of Fungal Influenced Corrosion. *Corrosion Reviews*, 19(5-6). doi: 10.1515/CORREV.2001.19.5-6.401.
- [56] Montelongo-Jauregui, D., Srinivasan, A., Ramasubramanian, A. y Lopez-Ribot, J. (2018). An In Vitro Model for *Candida albicans-Streptococcus gordonii* Biofilms on Titanium Surfaces. *Journal of Fungi* 4(66), 1-12. doi: 10.3390/jof4020066.
- [57] Ramage, G., Martínez, J. and López-Ribot, J. (2006). *Candida* Biofilms on Implanted Biomaterials: A Clinically Significant Problem. *FEMS Yeast Research* 6(7), 979-986.
- [58] Baumgartner, J., Watts, C. and Xia, T. (2000). Occurrence of *Candida albicans* in Infections of Endodontic Origin. *Journal of Endodontics*, 26(12), 695-698.
- [59] Kojic, E. y Darouiche, O. (2004). *Candida* Infections of Medical Devices. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(2), 255-267. doi: 10.1128/CMR.17.2.255-267.2004.
- [60] Dong-Seok, S., Jung-Kwang, L., Hong-In, S. et al. (2009). Fungal Infection as a Complication of Sinus Bone Grafting and Implants: a Case Report. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 107(3), 375-380. doi: 10.1016/j.tripleo.2008.08.002.
- [61] Uppuluri, P., Chaturvedi, A., Srinivasan, A. Et al. (2010). Dispersion as an Important Step in the *Candida albicans* Biofilm Developmental Cycle. *PloS Pathology*, 6(3),
- [62] Klabunde, K.J. (2001). *Nanoscale Materials in Chemistry*. Estados Unidos de América: Wiley-Interscience edition.
- [63] Sudrik, S.G., Chavan, V.B., Chavan, S.P. (2006). Silver Nanocluster Redox-Couple-Promoted Nonclassical Electron Transfer: an Efficient Electrochemical Wolff

Rearrangement. *Chemistry a European Journal*, 12(13), 859-864.
doi: 10.1002/chem.200500696.

- [64] Indira, K, Kamachi, U., Nishimura, T. y Rajendra, N. (2015). A Review of TiO₂ Nanotubes: Influence of Anodization Parameters, Formation Mechanism, Properties, Corrosion Behavior and Biomedical Applications. *Journal of Bio Tribo Corrosion*, 1:28.
doi: 10.1007/s40735-015-0024-x.
- [65] Kulkarni, M., Mazare, A., Gongadze, E. et al. (2014). Titanium Nanostructures for Biomedical Applications. *Nanotechnology* 26(6), 1-18.
doi: 10.1088/0957-4484/26/6/062002.
- [66] Garrett, P, Johnston, G., Bosshardt, D. et al. (2020). Hard and Soft Tissue Evaluation of Titanium Dental Implants and Abutments with Nanotubes in Canines. *Journal of Periodontology*, 91, 516-523. doi: 10.1002/JPER.18-0205.
- [67] Zhanga, X., Huang, Y. Wang, B. et al. (2020). A Functionalized Sm/Sr Doped TiO₂ Nanotube Array on Titanium Implant Enables Exceptional Bone-Implant Integration and also Self-Antibacterial Activity. *Ceramics International*, 46(10), 14796-14807.
doi: 10.1016/j.ceramint.2020.03.004.
- [68] Huo, K., Xu, N., Fu, J. y Chu, P. (2019). Bioactive Inorganic-ion-Doped Titania Nanotube Coatings on Bone Implants with Enhanced Osteogenic Activity and Antibacterial Properties. En Subramani K. y Ahmed, W. (Ed.). *Nanobiomaterials in Clinical Dentistry. A Volume in Micro and Nano Technologies (401-427)*. Amsterdam, Holanda: Elsevier.
doi: 10.1016/C2017-0-03524-3.
- [69] Gunpath, U., Le, H., Lawton, K. et al. (2019). Antibacterial Properties of Silver Nanoparticles Grown in situ and Anchored to Titanium Dioxide Nanotubes on Titanium Implant Against *Staphylococcus aureus*. *Nanotoxicology*, 14(1), 97-110.
doi: 10.1080/17435390.2019.1665727.
- [70] Chandra, J., Patel, J., Li, J., Zhou, G. Mukherjee, P., McCormick, T., Anderson, J. and Ghannoum. M. (2005). Modification of Surface Properties of Biomaterials Influences the

Ability of *Candida albicans* To Form Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8795-8801. doi: 10.1128/AEM.71.12.8795-8801.2005.

- [71] Beltrán-Partida, E., Valdez-Salas, B., Escamilla, A. Moreno-Ulloa, A., Burtseva, L., Valdez-Salas, E., Curiel-Álvarez, M. and Nedev, N. (2015). The Promotion of Antibacterial Effects of Ti6Al4V Alloy Modified with TiO₂ Nanotubes Using a Superoxidized Solution. *Journal of Nanomaterials*. doi: 10.1155/2015/818565.
- [72] Escamilla, A. (2017). *Modificación de Superficies de Ti y la Aleación de Ti6Al4V por Anodizado Electroquímico para la Obtención de Nano-Estructuras en Electrolitos Base Agua Súper-Oxidada (tesis doctoral)*. Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, México.
- [73] Tang, Y., Tao, J., Zhang, Y., Wu, T., Tao, H. y Bao, Z. (2008), Preparation and Characterization of TiO₂ Nanotube Arrays via Anodization of Titanium Films Deposited on FTO Conducting Glass at Room Temperature. *Acta Physico-Chimica Sinica*, 24(12), 2191-2197. doi 10.1016/S1872-1508(08)60082-0:
- [74] Widdel, F.(2010). *Theory and Measurement of Bacterial Growth*. Max-Planck-Institut fur Marine Mikrobiologie.
- [75] A. Czyrska-Filemonowicz, P.A. Buffat, M. Łucki, T. Moskalewicz, W. Rakowski, J. Lekki, T. Wierzchon. (2005). Transmission Electron Microscopy and Atomic Force Microscopy Characterization of Titanium-Base Alloys Nitrided Under Glow Discharge. *Acta Materialia*.
- [76] Smith, D. (2015). CHAPTER 1: Characterization of nanomaterials using transmission electron microscopy. In *Hierarchical Nanostructures for Energy Devices* (37 ed., Vol. 2015-January, pp. 1-29). (RSC Nanoscience and Nanotechnology; Vol. 2015-January, No. 37). Royal Society of Chemistry.
- [77] Egerton, R. (2005). *Physical Principles of Electron Microscopy*. Edmonton, Canadá: Springer.

- [78] Ghelardi, E., Pichierri, G., Castagna, B., Barnini, S., Tavanti, A. y Campa, M. (2008). Efficacy of Chromogenic Candida Agar for Isolation and Presumptive Identification of Pathogenic Yeast Species. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(2), 141-147. doi: 10.1128/JCM.39.4.1647–1649.2001.
- [79] Fricker-Hidalgo, H., Orenga, S., Lebeau, B., Pelloux, H., Brenier-Pinchart, M., Ambroise-Thomas, P. y Grillot, R. (2001). Evaluation of Candida ID, a New Chromogenic Medium for Fungal Isolation and Preliminary Identification of Some Yeast Species. *American Society of Microbiology*, 39(4), 1647-1649. doi: 10.1128/JCM.39.4.1647–1649.2001.
- [80] Sanders, E. (2012). Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. *Journal of Visualized Experiments*, 63, 18. doi: 10.3791/3064.
- [81] ASTM International. (2010). ASTM B625 – 17: Standard Specification for Titanium and Titanium Alloy Strip, Sheet and Plate. West Conshohocken, Pennsylvania: Estados Unidos de América.
- [82] ASTM International. (2017). ASTM G1 – 03: Standard Practice for Preparing, Cleaning and Evaluating Corrosion Test Specimens. West Conshohocken, Pennsylvania: Estados Unidos de América.
- [83] ASTM International. (2017). ASTM E3 – 11: Standard Guide for Preparation of Metallographic Specimens. West Conshohocken, Pennsylvania: Estados Unidos de América.
- [84] ASTM International. (1995). ASTM E3 – 95: Standard Practice for Preparation of Metallographic Specimens. West Conshohocken, Pennsylvania: Estados Unidos de América.
- [85] Meyer, J. Nally, J. y Dent, J. (1975). *Influence of Artificial Salivas on the Corrosion of Dental Alloys*”. 11th Annual Congress IADR.
- [86] Fusayama, T., Katayori, T., Nomoto, S. y Dent, J. (1963). *Corrosion of Gold and Amalgam Placed in Contact with Each Other*. *Journal of Dental Research*, 42, 1183-1197.

- [87] G.S., Duffó, E. Quezada Castillo. (2004). Development of an Artificial Saliva Solution for Studying the Corrosion Behavior of Dental Alloys. *Corrosion, The Journal of Science and Engineering*, 60 (6), 594-602.
- [88] Jiang, X, Zhou, Y., Shi, C. y Mao, D. (2018). Effects of Ultrasonic-Aided Quenching on the Corrosion Resistance of GB 35CrMoV Steel in Seawater Environment. *Metals. Open Access Metallurgy*, 8(2), 1-8. doi: 10.3390/met8020104.
- [89] Videla, H. (1996). *Manual of Biocorrosion*. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.
- [90] Kissinger, P. y Heineman, W. (1996). *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*. Nueva York, Estados Unidos de América: Marcel Dekker, Inc.
- [91] Randviir, E. y Banks, C. (2012). Electrochemical Impedance Spectroscopy: An Overview of Bioanalytical Applications. *Analytical Methods*, 5, 1098-1115. doi: 10.1039/c3ay26476a.
- [92] Chen, X., Shah, K., Dong, S., Peterson, L., Callagon, E. y Sant, G. (2020). Elucidating the Corrosion-Related Degradation Mechanisms of a Ti-6Al-4V Dental Implants. *Dental Materials*, 36(3), 431-441. doi: 10.1016/j.dental.2020.01.008.
- [93] Shoosmith, D. y Noël, J. (2010). 3.10 Corrosion of Titanium and its Alloys. doi: 10.1016/B978-044452787-5.00097-4.
- [94] Beltrán-Partida, E., Valdez-Salas, B., Escamilla, A., Curiel, Valdez-Salas, E., Nedev, N., Bastidas, J.M. (2016). Disinfection of Titanium Dioxide Nanotubes Using Super-Oxidized Water Decrease Bacterial Viability without Disrupting Osteoblast Behavior. *Material Science and Engineering: C., Materials for Biological Applications*, 60, 239-245. doi: 10.1016/j.msec.2015.11.042.
- [95] Puckett, S., Taylor, E., Raimondo, T. y Webster. T. (2010). The Relationship between the Nanostructure of Titanium Surfaces and Bacterial Attachment. *Biomaterials*, 31(4), 706-713. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.081.

- [96] Liao, J., Anchun, M., Zhu, Z. y Quan, Y. (2010). Antibacterial Titanium Plate Deposited by Silver Nanoparticles Exhibits Cell Compatibility. *International Journal of Nanomedicine*, 5, 337-342. doi: 10.2147/ijn.s9518.
- [97] Ameer, M., Fekry, A. y Bahr, M. (2017). Effect of Streptococcus mutans on the Corrosion Behavior of Nano-Coating Ni-Cr Dental Alloy. *International Journal of Electrochemical Science*, 12(10), 9652-9664. Doi: 10.20964/2017.10.33.
- [98] Burke, F., Ray, N. y McConnell, R. (2006). Fluoride-containing Restorative Materials. *International Dental Journal*, 56(1), 33-43. doi: 10.1111/j.1875-595X.2006.tb00072.x.