

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

GRADO EN FÍSICA



TRABAJO FIN DE GRADO

**Superficies con mojado heterogéneo para mitigar el
crecimiento bacteriano**

Autor: Guillermo Lorite Méndez

Curso Académico : 2022/2023

Resumen

En este trabajo utilizaremos un láser para producir distintos patrones sobre biocerámicas de circonio alterando su superficie. Se estudiará el efecto que este procedimiento ha tenido sobre las superficies, midiendo su topografía y los cambios en la energía superficial. Se realizaron plantaciones de bacterias *in vitro*, permitiéndonos estudiar cómo el cambio en la topografía altera la adhesión de las bacterias a la superficie. Finalmente, se discutirá cuales son las características que tendrían que tener los patrones sobre el circonio para maximizar sus propiedades antibacterianas.

Abstract

In this work, we will use a laser to produce different patterns on zirconia bioceramics, altering their surface. The effect of this procedure on the surfaces will be studied by measuring their topography and changes in surface energy. *In vitro* bacterial implantations were performed, allowing us to study how the change in topography alters bacterial adhesion to the surface. Finally, we will discuss the characteristics that the patterns on zirconia would need to have in order to maximize their antibacterial properties.

Índice

1. Introducción.	4
2. Fundamento teórico	5
2.1. Mojabilidad	5
2.1.1. Mojabilidad en superficies ideales	6
2.1.2. Mojabilidad en superficies reales	7
2.2. Biopelículas	8
3. Metodología	11
3.1. Preparación de las muestras	11
3.2. Texturizado láser DLIP	12
3.3. Estudio de la topografía	13
3.4. Estudio de la mojabilidad	14
3.5. Análisis de la composición química	15
3.6. Evaluación de la adhesión bacteriana	15
3.6.1. Método de cultivo.	16
3.6.2. Ensayo de adenosín trifosfato (ATP)	16
3.6.3. Microscopía de barrido	16
4. Resultados	17
4.1. Caracterización de la superficie y rugosidad	17
4.1.1. Superficies pulidas	17
4.1.2. Superficies no pulidas	20
4.1.3. Efectos del tratamiento térmico	21
4.2. Mojabilidad de las superficies	23
4.2.1. Mojabilidad de las superficies pulidas	23
4.2.2. Mojabilidad de las superficies sin pulir	29
4.3. Adhesión bacteriana	30
5. Posibles ampliaciones del estudio	32
6. Conclusiones	33
Referencias	34

1. Introducción.

Los implantes dentales se han convertido en una solución efectiva y duradera para el reemplazo de dientes perdidos y dañados, resultando en una gran mejora para la calidad de vida de muchos pacientes a lo largo del mundo [1]. Tradicionalmente el material más utilizado en la producción de estos implantes ha sido el titanio, debido a su gran biocompatibilidad y resistencia [2].

Sin embargo, la búsqueda continua de mejora en los materiales utilizados, tanto a un nivel estético como funcional, ha ocasionado que un nuevo material esté ganando popularidad, asentándose como una gran alternativa al titanio en el campo de la odontología implantológica: el circonio.

Este material presenta numerosas ventajas sobre el titanio en distintos niveles. A un nivel biológico el circonio presenta una mayor biocompatibilidad [3, 4], viéndose que la colonización bacteriana sobre superficies de circonio es menor que la vista sobre superficies de titanio [5], además, los implantes de circonio presentan una mejor osteointegración [6, 7], que es el proceso por el cual las células óseas se adhieren a una superficie metálica, y supone uno de los principales criterios en éxito del implante [8]. Así mismo, se encontró que la respuesta inflamatoria y la resorción ósea producida por muchos implantes de titanio son inducidas por sus propias partículas [9], por lo que es un problema que no presentan los implantes de circonio.

A un nivel mecánico se ha observado que el circonio con estructura cristalina tetragonal presenta una excelente resistencia a la corrosión y al desgaste [10], lo que lo hace idóneo para su uso en un entorno bucal, donde se encuentra expuesto a humedad constante y otros fluidos bucales. Esto presenta una gran diferencia con el titanio, que puede corroerse o desprender partículas metálicas con el tiempo, mientras el circonio mantiene su integridad estructural y estética a largo plazo [10, 11].

Además, el circonio presenta una conductividad térmica más baja que el titanio, siendo menos propenso a transmitir los cambios de temperatura al hueso circundante y los dientes adyacentes. Esto puede reducir la sensibilidad dental que sufren muchos pacientes tras recibir un implante, haciéndolo mucho más cómodo.

A un nivel estético, el circonio es un material cerámico de color blanco brillante que se asemeja al color natural de los dientes [12]. A diferencia del titanio, que puede revelar una línea grisácea en la encía, los implantes de circonio ofrecen un aspecto más estético y natural, lo que los hace especialmente adecuados para pacientes con encías finas.

Debido a estas ventajas el circonio está aumentando cada vez más en popularidad en el campo de la odontología implantológica. Sin embargo, como con cualquier tipo de implante, sigue existiendo el riesgo de infección bacteriana peri-implante, que puede comprometer la salud oral y la función del implante. Para abordar este problema, se han desarrollado diversos métodos antibacterianos destinados a prevenir y controlar las infecciones en los implantes de circonio.

Dos de las principales estrategias antibacterianas que se suelen aplicar en distintos biomateriales han sido el recubrimiento pasivo con biopolímeros catiónicos que evitan la unión bacteriana [13, 14] y la liberación de compuestos en el tejido que matan las bacterias suspendidas [15, 16, 17]. Sin embargo estas estrategias pueden producir problemas de toxicidad y el desarrollo de cepas microbianas resistentes que compromete su aplicación [18], e idoneidad para el desarrollo de prótesis .

Por este motivo, muchas alternativas que utilizan mecanismos físicos en lugar de químicos han comenzado a ganar relevancia en los últimos años. Entre ellas la creación de micro-estructuras en las superficies para mitigar la adhesión bacteriana y la formación de biopelículas han mostrado un gran éxito en una gran variedad de materiales, entre los que se incluye el titanio [19, 20, 21].

Muchos métodos han sido utilizados para la generación de las micro-estructuras sobre las superficies de los materiales; electrohilado, grabado químico, litografía, nanofabricación... Sin embargo entre todos ellos el texturizado láser o "direct laser interference patterning (DLIP)" se ha mostrado extremadamente conveniente en la fabricación de prótesis dentales, debido a su mayor velocidad al compararlo con el resto de métodos, su gran precisión y fácil implementación. Además, el texturizado láser no requiere que exista ningún contacto por lo que se reduce la contaminación superficial que pueda inducir el texturizado.

Durante este trabajo de fin de grado haremos un primer estudio experimental sobre el efecto antibacteriano de la texturización láser (DLIP) de circonio dental para su integración en implantes bucales. Para ello, estudiaremos distintos patrones de texturizado midiendo los cambios producidos en la mojabilidad del circonio inducidos por el texturizado y los efectos en la adhesión bacteriana a partir de estudios *in vitro*.

2. Fundamento teórico

2.1. Mojabilidad

Podemos definir la mojabilidad de una superficie como la propiedad física que describe la capacidad de un líquido para extenderse sobre ella. En otras palabras, se trata de la medida en la que un líquido entra en contacto y se extiende sobre un material sólido en lugar de formar gotas o una película en la superficie. La mojabilidad está determinada por la interacción entre las fuerzas intermoleculares del líquido y las del sólido.

El parámetro más utilizado para expresar la mojabilidad de una superficie es el ángulo de contacto θ . Cuando la afinidad entre la superficie sólida y el líquido es alta, la gota se esparce con facilidad por toda la superficie y el ángulo de contacto es bajo, como podemos ver en la figura 1a. En el caso contrario, si la afinidad entre el líquido y la superficie líquida es baja, el ángulo de contacto será alto, como podemos ver en la figura 1b.

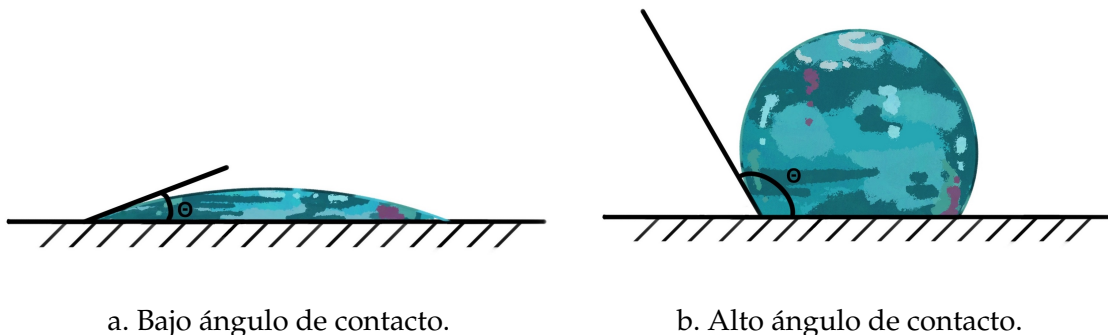


Figura 1: Perfiles de las gotas con comportamiento hidrofóbicos e hidrofílicos.

Dependiendo del ángulo de contacto, la interacción entre la superficie del material y el líquido se suele clasificar como:

- Hidrofílico: ángulo de contacto menor a 90° .
- Hidrofóbico: ángulo de contacto mayor a 90° .

2.1.1. Mojabilidad en superficies ideales

Cuando una gota se encuentra sobre una superficie, nos encontramos con un sistema donde tenemos en contacto tres interfases; sólido (*s*), líquido (*l*) y gaseoso (*g*) como podemos ver en la figura 2.

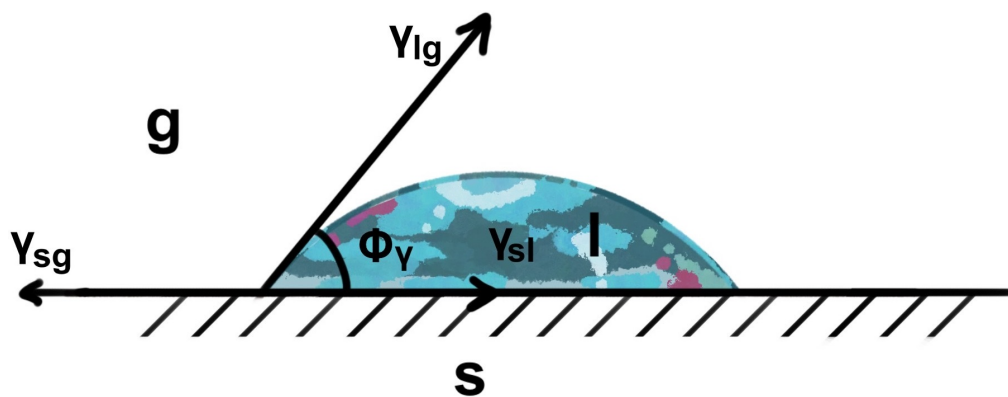


Figura 2: Representación del modelo de las tres fases con esquema de las tensiones entre las fases.

Las moléculas que se sitúan en el seno (*bulk*) de cada una de las fases están sometidas a fuerzas intermoleculares de atracción iguales en todas las direcciones, por lo tanto la suma de estas es nula. Mientras tanto las fuerzas que se encuentran en las interfaces no tienen las fuerzas alineadas. El resultado de esta asimetría entre las fuerzas de las moléculas que se encuentran en el seno y las que se encuentran en la superficie, en la interfase, provoca un exceso de energía en cada una de las interfaces.

Cuanto mayor sea la afinidad entre las moléculas de esas fases, menor será esta energía de interfase (γ). En este caso, al estar en contacto las tres interfases tendríamos, γ_{LG} la energía correspondiente a la interfase líquido-gas, que es la tensión superficial del líquido, γ_{SG} la correspondiente a la interfase sólido-gas, que es la energía superficial del sólido y γ_{SL} es la correspondiente a la interfase entre la superficie del sólido y el líquido.

La gota tomará la forma que minimice la energía total del sistema. Por lo tanto, la superficie de contacto entre cada una de las interfases aumentará o disminuirá dependiendo del coste energético del sistema cambiando la forma de la gota. El equilibrio entre estas tres interfases puede entenderse mediante las tensiones entre ellas, las cuales representan la tendencia de cada interfase a reducir su área en orden a minimizar la energía acumulada. En la figura 2 puede verse de una forma esquematizada cómo la tensión entre cada una de las interfases está ejerciendo una línea en el punto donde todos los estados coexisten, tratando de minimizar cada una de estas áreas. El equilibrio entre estas fuerzas puede

ser expresado a partir de:

$$\gamma_{SL} + \gamma_{LG} \cos(\theta_Y) - \gamma_{SG} = 0 \quad (2.1)$$

donde θ_Y es el ángulo de contacto de equilibrio en una superficie ideal, también conocido como ángulo de contacto de Young [22]. Las superficies ideales son totalmente planas, lisas, químicamente homogéneas e inertes. Bajo esas condiciones el ángulo de contacto observable en el equilibrio será igual al de Young, que podemos definir únicamente a partir de las interacciones moleculares en las interfases:

$$\cos(\theta) = \cos(\theta_Y) = \frac{\gamma_{SG} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LG}} \quad (2.2)$$

2.1.2. Mojabilidad en superficies reales

Cuando trabajamos con superficies reales, la forma de la gota y el ángulo de contacto también dependen de las interacciones entre el líquido y el sólido como es predicho por el ángulo de contacto de Young. Sin embargo, otros factores como la rugosidad de la superficie o su homogeneidad química también juegan un papel importante.

El estudio del comportamiento de la mojabilidad de una superficie respecto a su rugosidad está basado en el modelo de Wenzel [23]. Este modelo considera que el líquido penetra por las micro y nanoestructuras generadas por la rugosidad de la superficie como puede verse en la figura 3.

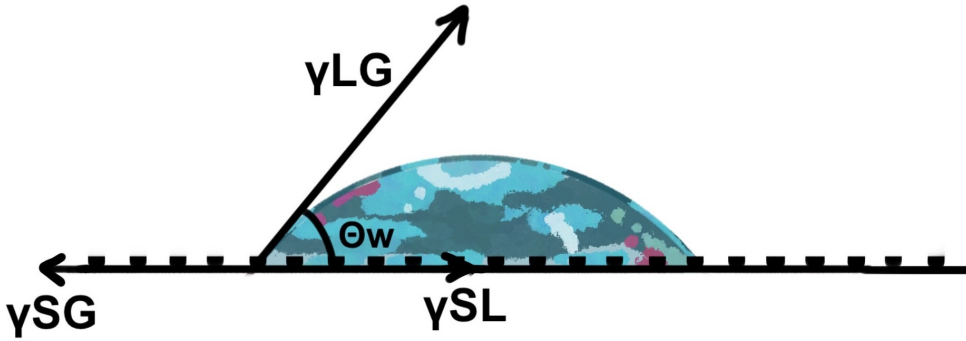


Figura 3: Representación de una gota en una superficie rugosa.

El coeficiente de rugosidad es definido como el cociente de área de la superficie, partiendo del área proyectada, que es el área que debería tener la superficie si fuese perfectamente lisa ($r_W = \frac{A}{A_{Proyectada}}$). Por lo tanto, cuando la gota se deposita sobre la superficie, el área en la que esta está en contacto con la superficie se incrementa en un factor r_W , aumentando la energía por unidad de área proyectada de la interfase sólido líquido en un factor r_W . Este aumento del área de contacto produce una reducción idéntica en el área de la interfase sólido gas. Por lo tanto, partiendo de la expresión (2.2) podemos obtener el ángulo de contacto en equilibrio para una gota teniendo en cuenta la rugosidad de la superficie:

$$\cos(\theta) = r_W \cdot \frac{\gamma_{SG} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LG}} = r_W \cdot \cos(\theta_Y) \quad (2.3)$$

A partir de esta expresión podemos ver de forma muy clara que un aumento en la

rugosidad solo acentúa el comportamiento de la mojabilidad. Si nos encontramos en una superficie hidrofóbica ($\theta_Y > 90^\circ$), el ángulo de contacto aumenta con un incremento en la rugosidad, haciendo la superficie todavía más hidrofóbica. Sin embargo, si nos encontramos en una superficie hidrofílica ($\theta_Y < 90^\circ$), el ángulo de contacto disminuye con un incremento en la rugosidad, haciendo que la superficie sea todavía más hidrofílica.

Por otro lado, para estudiar el rol que juega la heterogeneidad química en la mojabilidad de una superficie hacemos uso del modelo de Cassie [24]. Para simplificar la explicación consideremos una superficie lisa compuesta por n componentes químicos distintos, donde la fracción que ocupa un componente i -ésimo es ϕ_i . El esquema de la forma de la gota con la representación de las fuerzas se ilustra en la figura 4.

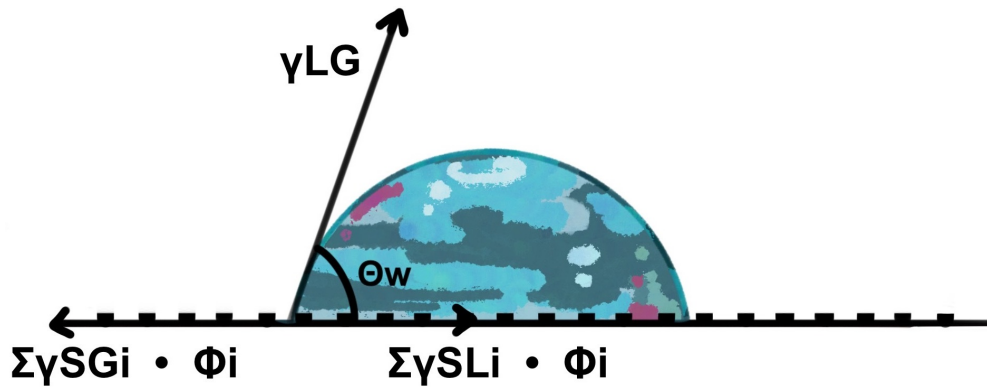


Figura 4: Representación de una gota en una superficie con heterogeneidad química.

La energía total por unidad de área de la interfase será la sumatoria de las energías de interfase de cada uno de los componentes multiplicadas por la fracción en la que está dicho componente en la superficie. Al igual que cuando analizábamos cómo variaba con la rugosidad, partiendo de la expresión (2.2) podemos obtener el ángulo de contacto en equilibrio para una gota teniendo en cuenta la heterogeneidad química de la superficie:

$$\cos(\theta) = \sum_1^n \phi_i \cdot \frac{\gamma_{SGi} - \gamma_{SLi}}{\gamma_{LG}} = \sum_1^n \phi_i \cdot \cos(\theta_{Y_i}) \quad (2.4)$$

donde θ_{Y_i} es el ángulo de contacto de Young para cada uno de los compuestos químicos que forman parte de la superficie. Como podemos ver en la expresión (2.4) el comportamiento de la mojabilidad de la superficie dependen de la mojabilidad de cada uno de los compuestos que la forman y la proporción que haya de estos.

Mediante la unión de los modelos de Wenzel y Cassie podemos obtener una predicción de la mojabilidad de una superficie sobre la cual se posa una gota de un fluido si el tamaño de la gota es varios órdenes de magnitud mayor que las estructuras creadas por la rugosidad [25], como es el caso del experimento que aquí estamos realizando.

2.2. Biopelículas

Para sobrevivir los microorganismos tienden a asociarse formando estructuras conocidas como biopelículas o *biofilms*. Estas estructuras les brindan protección ante el sistema inmunitario y los antibióticos cuando se forman en el interior del cuerpo humano, jagan-

do un papel importante en infecciones [26] u otros problemas de salud bucal. Por ejemplo, la placa dental, que es una de las biopelículas más comunes conteniendo bacterias como la cepa *Streptococcus mutans*, produce los ácidos y polisacáridos responsables de las caries dentales [27, 28].

Podemos definir las biopelículas como comunidades tridimensionales complejas de microorganismos que se adhieren a una superficie y están encapsuladas en un polímero extracelular formado por una sustancia polimérica (EPS), las cuales está compuesta por proteínas, ADN, ARN, polisacáridos y agua [29]. El agua es su componente principal (~ 97 %) y actúa como el principal canal de flujo de los nutrientes dentro de la matriz de la biopelícula [30].

El mecanismo de formación de las biopelículas está separado en cuatro fases bien diferenciadas, este mecanismo puede ser observado gráficamente en la figura 5.

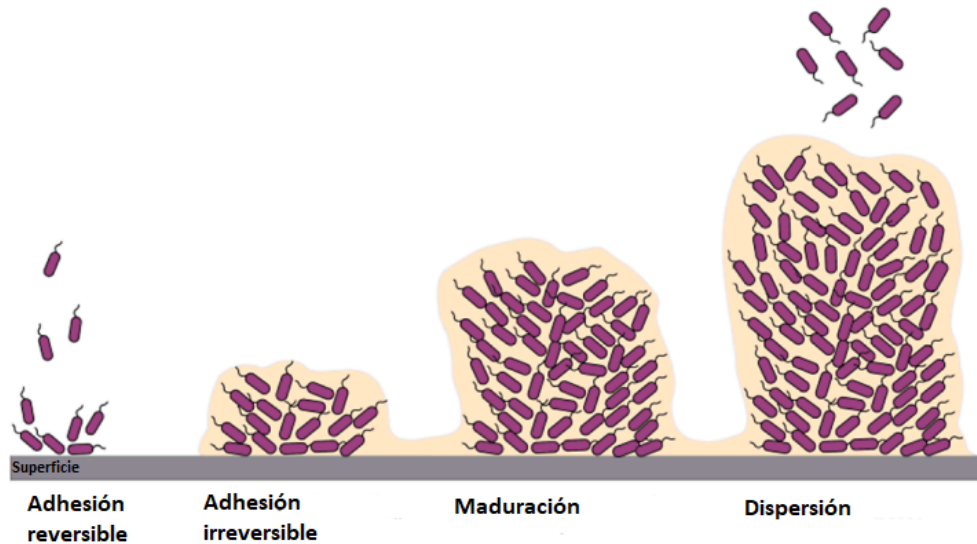


Figura 5: Proceso de formación de la biopelícula; (I) adhesión reversible, (II) adhesión irreversible, (III) Maduración y (IV) Dispersión. Imagen adaptada de .Maunders et al [31].

Durante la primera etapa, ocurre la adhesión reversible de las bacterias a la superficie. En esta etapa, las células que se encuentran flotando de forma libre, por movimiento browniano¹, transporte convectivo o movimiento bacteriano activo; identifican una superficie. Una vez posadas en ella se inicia un proceso de interacción y adhesión sobre la misma. Esta unión de las células planctónicas² a la superficie no es permanente.

En la segunda etapa de la formación de la biopelícula ocurre una adhesión irreversible, en esta fase también se suele observar típicamente una deformación de la pared celular sobre la superficie del sustrato.

¹Movimiento aleatorio que se observa en las partículas que se hallan en un medio fluido (líquido o gas), como resultado de choques contra las moléculas de dicho fluido.

²Células que se encuentran libres flotando y nadando en el medio líquido.

Durante la tercera etapa se forma una biopelícula madura con una estructura en tres dimensiones que contiene células empaquetadas en *cluster*³, con canales entre ellas que permiten el transporte de agua y nutrientes, y la eliminación de los desechos que se generen. Algunas propiedades de estas biopelículas, como su resistencia a productos químicos externos, pueden resultar imprevisibles debido a la gran capacidad adaptativa de las bacterias. Una vez la red tridimensional que forma la estructura de la biopelícula esta totalmente formada, comienza la cuarta etapa.

Durante esta última etapa ocurre la desadhesión y dispersión de las células que forman la biopelícula, dando inicio a la formación de nuevas biopelículas. La morfología de las células dispersadas es más parecida a la de las células planctónicas que a la de las células de la biopelícula madura, que pueden iniciar el desarrollo de la biopelícula de nuevo [32], es decir, se puede iniciar la propagación de células bacterianas infecciosas.

La comprensión completa de los procesos que llevan a la formación y el desarrollo de las biopelículas y cómo evitar la formación de estas es una tarea compleja, debido a la gran cantidad de variables que intervienen. Sin embargo, si observamos la naturaleza podemos ver cómo durante millones de años de evolución numerosas especies han adquirido pieles que impidieron la adhesión irreversible de bacterias, evitando de este modo la formación de la estructura tridimensional de la biopelícula y su dispersión. Estos mecanismos antibacterianos son de gran interés en recientes investigaciones puesto a que estos no están recubiertos con sustancias biocidas.⁴

Algunas plantas como el taro y el loto tienen en sus hojas micro-protuberancias elípticas de aproximadamente $\sim 10\mu m$ de radio [33, 34]. Estas protuberancias producen un aumento en el ángulo de contacto formado entre la hoja y las gotas de agua que caen sobre ella, volviendo a la superficie más hidrofóbica [34]. Se ha demostrado que un aumento en la densidad de estas micro-estructuras reducen la adhesión bacteriana y limitan la formación de biopelículas, incluso en entornos bajo el agua [35, 36].

Ejemplos similares los podemos encontrar en el reino animal. Por ejemplo la piel de los tiburones está cubierta con micro-estructuras de aproximadamente $\sim 100\mu m$ de radio llamadas *riblets* [37] y los pies de los gecko presentan pequeños pelos llamados *setae* con radios comprendidos entre los $15\mu m$ y $65\mu m$ [38]. Estas pequeñas estructuras en la piel de los animales modifican su mojabilidad impidiendo la fijación de las bacterias. En el caso de los geckos se ha hablado de que las estructuras formadas en sus pies han evolucionado permitiendo maximizar tanto propiedades hidrofóbicas como hidrofílicas, lo que le permite adherirse en los muros a voluntad [39].

El estudio de estas superficies antibacterianas de origen natural nos ha permitido observar el importante rol que juega la mojabilidad de la superficie en la capacidad de adhesión y formación de biopelículas de las bacterias [34, 35, 38]. Esta relación ha sido ampliamente discutida en los últimos años [40] debido a su gran utilidad en la creación de biomateriales.

Desde un punto de vista teórico se ha estudiado esta relación asumiendo que las bacterias se comportan como simples partículas coloidales. Partiendo de dicha premisa, se explica la adhesión bacteriana a partir de una aproximación termodinámica [41], que con-

³Conjunto de microorganismos.

⁴Los biocidas pueden ser sustancias químicas o microorganismos que están destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo considerado nocivo para el ser humano.

sidera a la bacteria fijada a una superficie como una fase termodinámica con su correspondiente tensión superficial. Utilizando esta simplificación podemos calcular la energía total de interacción en función de las energías de interfase. Podemos escribir expresión de la energía libre de Gibbs de la adhesión bacteriana como:

$$\Delta G_{adhesión} = \gamma_{SB} - \gamma_{SL} - \gamma_{BL} \quad (2.5)$$

donde γ_{SB} es la energía del interfase bacteria-superficie y γ_{BL} la correspondiente al interfase líquido-bacteria. Si la energía libre de Gibbs de la adhesión es negativa ($G_{adhesión} < 0$), entonces estaremos en un proceso favorable energéticamente y por lo tanto se producirá de forma espontánea.

Experimentalmente se ha encontrado que cuando la energía libre del líquido es mayor que la de la bacteria, la energía libre de la adhesión se hace menos negativa al aumentar la energía libre de la superficie del sustrato sobre la que está adherida la bacteria[42]. Esto produce que la adhesión sea mayor en superficies hidrofóbicas. Sin embargo, en el caso en el que la energía libre del líquido es menor que la de la bacteria habrá una adhesión mayor en superficies hidrofílicas.

Contextualizando esto dentro de este trabajo de fin de grado, el líquido que se presenta en el entorno bucal más predominantemente es la saliva, la cual tiene una energía libre muy baja (parecida a la del agua). La energía libre de la saliva es mucho menor a la energía libre de las principales bacterias bucales dañinas para nuestro organismo, por lo tanto, a mayor sea la energía superficial de la superficie (cuando sea más hidrofílico) mayor facilidad tendrán las bacterias en adherirse de forma irreversible, favoreciendo la creación de biopelículas que le permita sobrevivir y expandirse. Por lo tanto si tuviésemos solo en cuenta la mojabilidad de la superficie y quisiéramos minimizar la adhesión bacteriana, tendríamos que disminuir lo máximo posible la energía superficial, utilizando materiales hidrofóbicos.

3. Metodología

3.1. Preparación de las muestras

El material utilizado para la realización del estudio fue óxido de circonio monolítico *Cercon* [43]. El disco original tenía unas dimensiones de 10 cm de diámetro y 4 cm de grosor, sobre este se realizaron cortes transversales y longitudinales, obteniendo muestras rectangulares de $(0,49 \pm 0,02)\text{cm}^2$ de área y una anchura de $(2,07 \pm 0,03)\text{mm}$.

Tras esto, las muestras sobre las que fueron realizados los estudios *in vitro* fueron pulidas a 4000 grit. Algunas muestras sobre las que solo se estudió mojabilidad no fueron pulidas, permitiéndonos ver cómo afecta el pulido a la mojabilidad de algunos de los patrones realizados sobre el circonio. Además, al no ser pulidas el proceso de fabricación pudo ser acelerado, lo que nos permitió estudiar la mojabilidad sobre patrones para los cuales no se pudo realizar el estudio *in vitro*.

Todas las muestras fueron sinterizadas a 1550°C siguiendo la curva de calentamiento y enfriamiento del fabricante en un horno *Zirkonofen 600/V3* [44].

3.2. Texturizado láser DLIP

Tras la fabricación de las muestras se imprimieron las microestructuras con los distintos patrones sobre la superficie del circonio mediante irradiación láser. Para ello se utilizó un láser *Rofin PowerLine E 20*, que puede verse en la figura 6. Las características del láser junto los parámetros utilizados para la fabricación de las muestras se encuentran en el cuadro 1. Para conseguir que las microestructuras tuvieran la profundidad deseada el láser realizó dos pasadas sobre ellas.

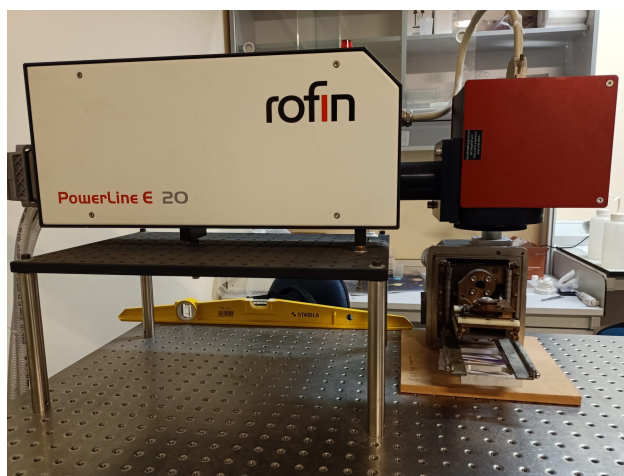


Figura 6: Láser *Rofin PowerLine E 20*, utilizado para la micro-texturización de las muestras.

Tras la ablación láser se observaron cambios de pigmentación

de las superficies tratadas. Este mismo comportamiento fue observado por la doctora Erica Roitero en su estudio de los efectos de la micro-texturización láser del circonio dental [45]. En este estudio habla de cómo en la interacción con el láser, el material se derrite localmente, estableciéndose un fuerte gradiente térmico en la superficie que produce una recristalización direccional, creando una transformación de una red cristalina tetragonal a una red monoclinica. A pesar de esto no se observaron ningunos cambios en la composición química del circonio.

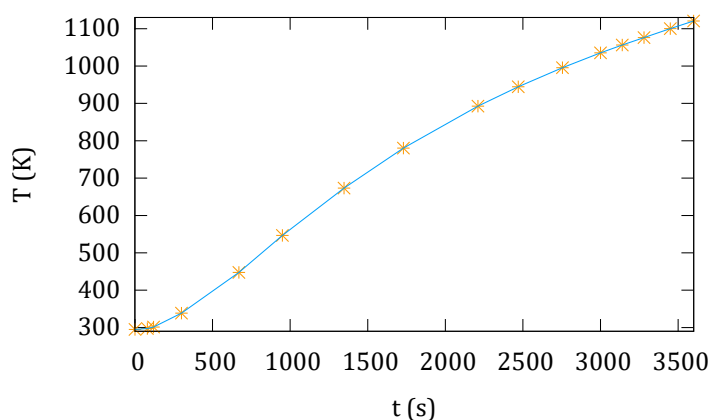


Figura 7: Curva de calentamiento.

Basándonos en los estudios de la doctora Erica Roitero [46] decidimos calentar las muestras en un horno para producir una nueva cristalización y obtener nuevamente una estructura tetragonal. Este proceso fue realizado en un horno *Herotec HK-11* durante una hora. Una vez pasado el tiempo se dejó enfriar dentro del horno de forma natural durante nueve horas. Se midió la temperatura dentro del horno durante todo el proceso de calentamiento, obteniendo la curva de calentamiento que podemos ver en la figura 7.

Para asegurar que las muestras no fueran contaminadas durante su estancia en el horno se calentaron dentro de recipientes de arcilla con rendijas para que el calentamiento no fuera apantallado.

Longitud de Onda	Corriente	Frecuencia	Velocidad	Anchura Láser	Duración Pulso
532nm	22,0A	15kHz	$10^{-1} \frac{m}{s}$	0,1mm	1ns

Tabla 1: Parámetros del texturizado Láser

3.3. Estudio de la topografía

Para analizar las micro-estructuras creadas mediante el texturizado láser, se estudiaron las topografías de las superficies de las muestras de circonio. Para ello se utilizó un microscopio confocal *Niko ECLIPSE L150* (figura 8) con una lente de 50 aumentos. Las áreas estudiadas con el confocal en cada una de las medidas fueron de $6008\mu\text{m}^2$ para los patrones con menores periodicidades y de $314520\mu\text{m}^2$ para los patrones con mayores periodicidades donde las estructuras formadas tenían un tamaño mayor.

Posteriormente las medidas tomadas con el microscopio confocal fueron analizadas con la herramienta de software libre *Gwyddion* [47], que utilizamos para obtener los siguientes datos:

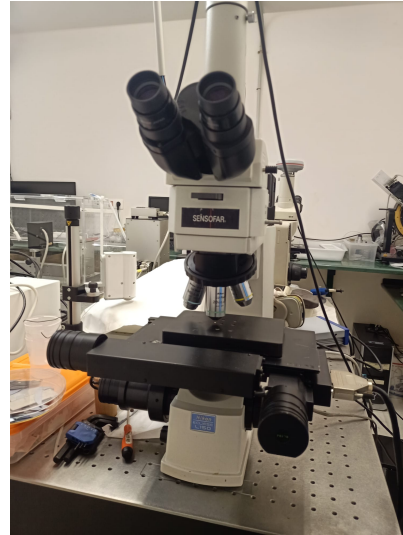


Figura 8: Microscopio confocal *Niko ECLIPSE L150*.

- $\lambda_{Esperada}$: Periodicidad diseñada en el patrón, hace referencia a la distancia de separación de las incisiones producidas por el láser sobre la superficie.
- $\lambda_{Experimental}$: Periodicidad media obtenida al estudiar las micro-estructuras formadas en el patrón.
- PV : Distancia pico valle. Diferencia entre la altura del punto más alto y el más bajo en el área estudiada
- $A_{Proyectada}$: Área del plano analizado con el microscopio confocal
- A : Área total expuesta de la muestra dentro del espacio estudiado con el confocal.
- $r_W = \frac{A}{A_{Proyectada}}$: Coeficiente de rugosidad
- Ra : Promedio de rugosidad de los picos y valles
- RMS : Raíz cuadrática media de los picos y valles medidos en la superficie
- $PV_{Residual}$: Distancia entre el máximo de rugosidad residual obtenido al filtrar la micro-estructura producida por el patrón.
- $Ra_{Residual}$: Promedio de rugosidad de los picos y valles residuales obtenidos al filtrar las micro-estructura producidas por el patrón.

3.4. Estudio de la mojabilidad

Para medir el efecto que tiene en la mojabilidad de las muestras el texturizado láser, se realizaron medidas del ángulo de contacto estático con gotas de agua Mili-Q. Para ello, usando pipetas milimetradas colocamos gotas con volúmenes de $(5,0 \pm 0,1)\mu\text{l}$, $(10,0 \pm 0,1)\mu\text{l}$ y $(15,0 \pm 0,1)\mu\text{l}$ sobre la superficie de las muestras. Una vez la gota se había estabilizado y no había variación del ángulo de contacto se realizaron fotografías de las gotas desde una perspectiva cenital y lateral, estas últimas fueron tomadas a contraluz para facilitar su análisis.

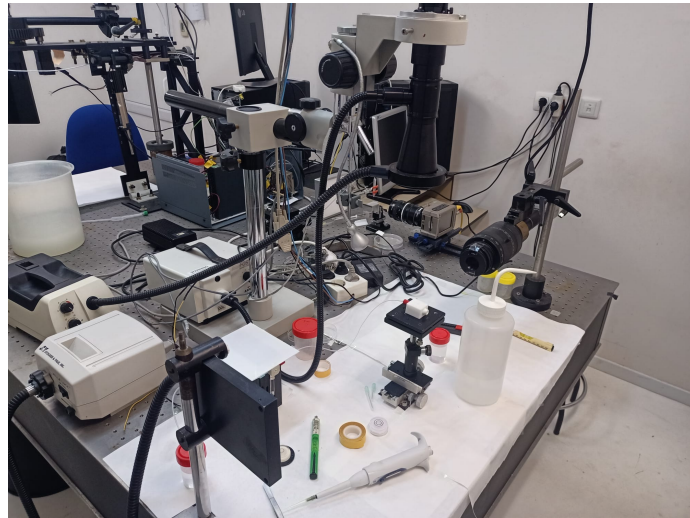


Figura 9: Montaje experimental para la realización de las fotografías de las gotas.

El montaje experimental utilizado para realizar las fotografías puede verse en la figura 9. Este está formado por un soporte donde se colocan las muestras y dos cámaras que enfocan dicho punto. La primera está colocada justo encima del soporte tomando las imágenes cenitales y la otra se encuentra a uno de los laterales del soporte permitiendo captar la forma de la gota. Para observar con mayor detalle la forma de la gota en el lado opuesto a esta última cámara se coloca una pantalla luminosa que permite observar la gota a contraluz.

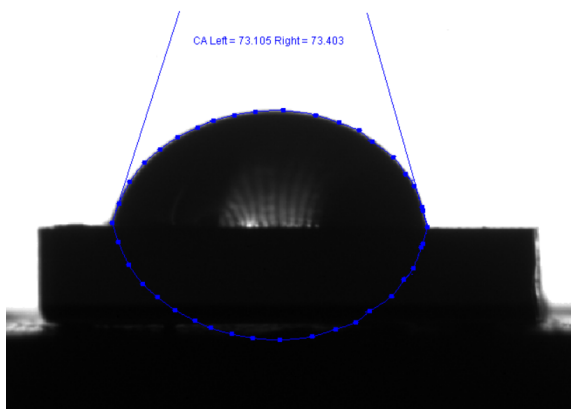


Figura 10: Análisis de una gota de agua Mili-Q para obtener el ángulo de contacto utilizando *Image J* [48].

Estas fotografías fueron analizadas utilizando la herramienta de software libre *Image J* con la extensión *DropSnake* [48] permitiéndonos obtener los ángulos de contacto como se ve en la figura 10.

Estas medidas fueron tomadas diariamente para las muestras sobre las cuales realizamos las plantaciones *in vitro*, permitiéndonos observar cómo evoluciona la mojabilidad con el tiempo pasado tras haber recibido el tratamiento láser y para las muestras no pulidas pasados 45 días desde su tratamiento, observando el ángulo de contacto estático una vez esta ya se había estabilizado.

3.5. Análisis de la composición química

Para conocer si existían diferencias químicas entre las muestras tratadas con los distintos patrones que pudiera afectar a la mojabilidad y adhesión bacteriana en las muestras analizadas, se utilizó un espectrómetro de fotoelectrones de rayos X (XPS) *Axis Ultra*.

Este procedimiento fue realizado para los cuatro patrones para los que se realizaron los estudios *in vitro*. Las espectroscopías fueron realizadas 28 días después de que se produjera la texturización láser, cuando la mojabilidad de las muestras ya se había estabilizado mostrando los distintos comportamientos que esta presentaba.

3.6. Evaluación de la adhesión bacteriana

Una vez ya texturizadas, las muestras que fueron utilizadas para los ensayos microbiológicos fueron estabilizadas en un autoclave a 121°C durante 20 minutos. Antes de ser contaminadas con las bacterias fueron expuestas a saliva artificial. La saliva artificial utilizada fue elaborada siguiendo la siguiente fórmula [49]:

- (0,25 ± 0,01)g/l de cloruro de sodio (*NaCl*)
- (0,20 ± 0,01)g/l de cloruro de potasio (*KCl*)
- (0,20 ± 0,01)g/l de cloruro de calcio (*CaCl*)
- (1,00 ± 0,05)g/l de polvo de Lab-Lemco
- (5,00 ± 0,05)g/l de peptona proteasa
- (2,00 ± 0,05)g/l de extracto de levadura
- (2,50 ± 0,05)g/l de mucina gástrica de cerdo

Estos compuestos fueron mezclados mediante agitación por una hora a temperatura ambiente (~ 25°C). Tras esto, se esterilizaron en el autoclave y se añadieron 1.25ml de urea al 40 % (p/v) filtrada con un filtro estéril de 0,22µm. Cuando terminó su preparación fue encerrada en oscuridad a una temperatura de 4°C para enviar la degradación de las proteínas, hasta su posterior utilización, aproximadamente una semana después. Antes de realizar la contaminación bacteriana se expuso cada una de las muestras a 1ml de saliva artificial durante 30 minutos a una temperatura de 37°C en una mesa de balanceo para simular las condiciones bucales.

Para estudiar la adhesión bacteriana utilizamos la cepa *Streptococcus sanguinis* [50] que se mantuvo en tubos en una lengüeta con agar BHI⁵ [51] a 4°C. Para la contaminación bacteriana de las muestras se preparó una suspensión bacteriana en el medio BHI con una densidad óptica de 1.0 en la escala de MCFarland [52] en un turbidímetro *DensiCHECKTM plus 180330-1*. Esta suspensión fue diluida con una proporción de 1/30 en caldo BHI, equivaliendo aproximadamente a 10⁷ UFC/ml (unidades formadoras de colonias por mililitro).

⁵BD Brain Heart Infusion (BHI) es un medio de uso general adecuado para el cultivo de una amplia variedad de tipos de organismos, incluidos las bacterias, levaduras y hongos filamentosos, a partir de muestras clínicas.

Cada muestra fue expuesta a 1ml de la suspensión bacteriana en las placas de microtiter de 24 pocillos [53] y fueron incubadas durante 24 horas a una temperatura de 37°C en condiciones óptimas para la proliferación de las bacterias (condiciones de anaerobiosis⁶). Una vez terminada la incubación las muestras fueron extraídas de los pozos con unas pinzas estériles y lavadas con una solución de agua salina. Los tubos se agitaron en vórtex durante 20 segundos y tras eso fueron introducidos durante 10 minutos en ultrasonidos para recuperar las bacterias.

La capacidad de adhesión bacteriana fue medida por tres métodos distintos.

3.6.1. Método de cultivo.

Se tomaron muestras de 410ml de las suspensiones recuperadas y fueron incubadas en condiciones de anaerobiosis durante 24 horas a una temperatura de 37°C , lo que nos permitió obtener unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml). Con las cuales obtuvimos los $\log_{10}(\text{UFCs} + 1)$ que serán utilizados en el análisis de los resultados de las plantaciones realizadas.

3.6.2. Ensayo de adenosín trifosfato (ATP)

$10\mu\text{l}$ de la suspensión recuperada fueron añadidos a $100\mu\text{l}$ del reactivo Bac-Titer-Glow [54] y fueron incubados durante 5 minutos.

La luminiscencia emitida fue medida mediante la utilización del luminómetro “*Pro-mega GloMax*”. Estos datos fueron utilizados para calcular la media de las señales del cultivo bacteriano menos la media del blanco (TSB) y se expresaron como unidades de luz relativa (ULRs).

3.6.3. Microscopía de barrido

Dos muestras adicionales de cada uno de los patrones analizados fueron separadas para ser observadas utilizando un microscopio electrónico de barrido *LEO 1430-VP*. Estas muestras fueron preparadas en el Laboratorio de preparación de muestras biológicas (LPMB) del servicio de microscopía electrónica del Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada.

Las muestras en primer lugar se fijaron en una solución de glutaraldehído al 2,5 % en un tampón cacodilato 0.1M, con un $pH = 7,4$ durante unas 2 horas a una temperatura de 4°C . Tras esto fueron lavadas en el mismo tampón tres veces durante quince minutos manteniendo la temperatura constante a 4°C .

Tras la limpieza, fueron deshidratadas en un gradiente de concentraciones crecientes de etanol siguiendo los siguientes pasos.

- Etanol 50 % durante 15 minutos.
- Etanol 70 % durante 15 minutos.
- Etanol 90 % durante 15 minutos.

⁶Condiciones óptimas de supervivencia para microorganismos que pueden sobrevivir y multiplicarse en ambientes sin oxígeno

- Etanol 100 % durante 15 minutos. Este último paso fue realizado dos veces.

Posteriormente se secaron utilizando el método del punto crítico [55] utilizando dióxido de carbono en un secador de punto crítico *Polaron CPD7501*. Finalmente las muestras fueron recubiertas con carbón y observadas en el microscopio electrónico de barrido.

4. Resultados

4.1. Caracterización de la superficie y rugosidad

4.1.1. Superficies pulidas

Durante este estudio fueron utilizados cuatro patrones distintos sobre muestras pulidas en las que posteriormente se realizaron los estudios *in vitro*. Las superficies estudiadas fueron un grupo del control sobre el cual no se realizó ninguna texturización láser, dos patrones con forma de red rectangular con distintas periodicidades y un patrón de canal con la misma periodicidad que el patrón de red de menor periodicidad.

Las observaciones topográficas de las micro-estructuras formadas a partir de cada uno de estos patrones nos permiten observar los cambios en la morfología de las muestras de circonio. Las imágenes tridimensionales obtenidas haciendo uso del microscopio confocal pueden observarse en la figura 11 junto una representación del perfil transversal de las muestras para observar la forma patrón con una mayor facilidad el patrón.

Los datos obtenidos a partir del análisis de las superficies se encuentran en la tabla 2.

Tipo Patrón	Control	Red	Red	Canal
$\lambda_{Esperada}(\text{nm})$	-	15	60	15
$\lambda_{Experimental}(\text{nm})$	-	$15,1 \pm 0,3$	$59,8 \pm 0,4$	$14,6 \pm 0,3$
$PV(\mu\text{m})$	$4,5 \pm 0,8$	$11,6 \pm 0,5$	$10,2 \pm 0,4$	$11,1 \pm 0,7$
$A_{Proyectada}(\mu\text{m}^2)$	60008	60008	319200	60008
$A(\mu\text{m}^2)$	60495 ± 99	68352 ± 168	326733 ± 409	74147 ± 1294
r_w	$1,008 \pm 0,002$	$1,139 \pm 0,003$	$1,0236 \pm 0,0013$	$1,24 \pm 0,02$
$R_a(\mu\text{m})$	$0,18 \pm 0,02$	$0,834 \pm 0,012$	$0,66 \pm 0,02$	$1,15 \pm 0,04$
$RMS(\mu\text{m})$	$0,28 \pm 0,02$	$1,050 \pm 0,014$	$0,81 \pm 0,02$	$1,33 \pm 0,03$
$PV_{Residual}(\mu\text{m})$	$4,5 \pm 0,8$	$0,36 \pm 0,02$	$0,65 \pm 0,04$	$0,84 \pm 0,05$
$R_{aResidual}(\mu\text{m})$	$0,18 \pm 0,02$	$0,096 \pm 0,003$	$0,188 \pm 0,007$	$0,257 \pm 0,014$

Tabla 2: Datos de caracterización de las superficies pulidas.

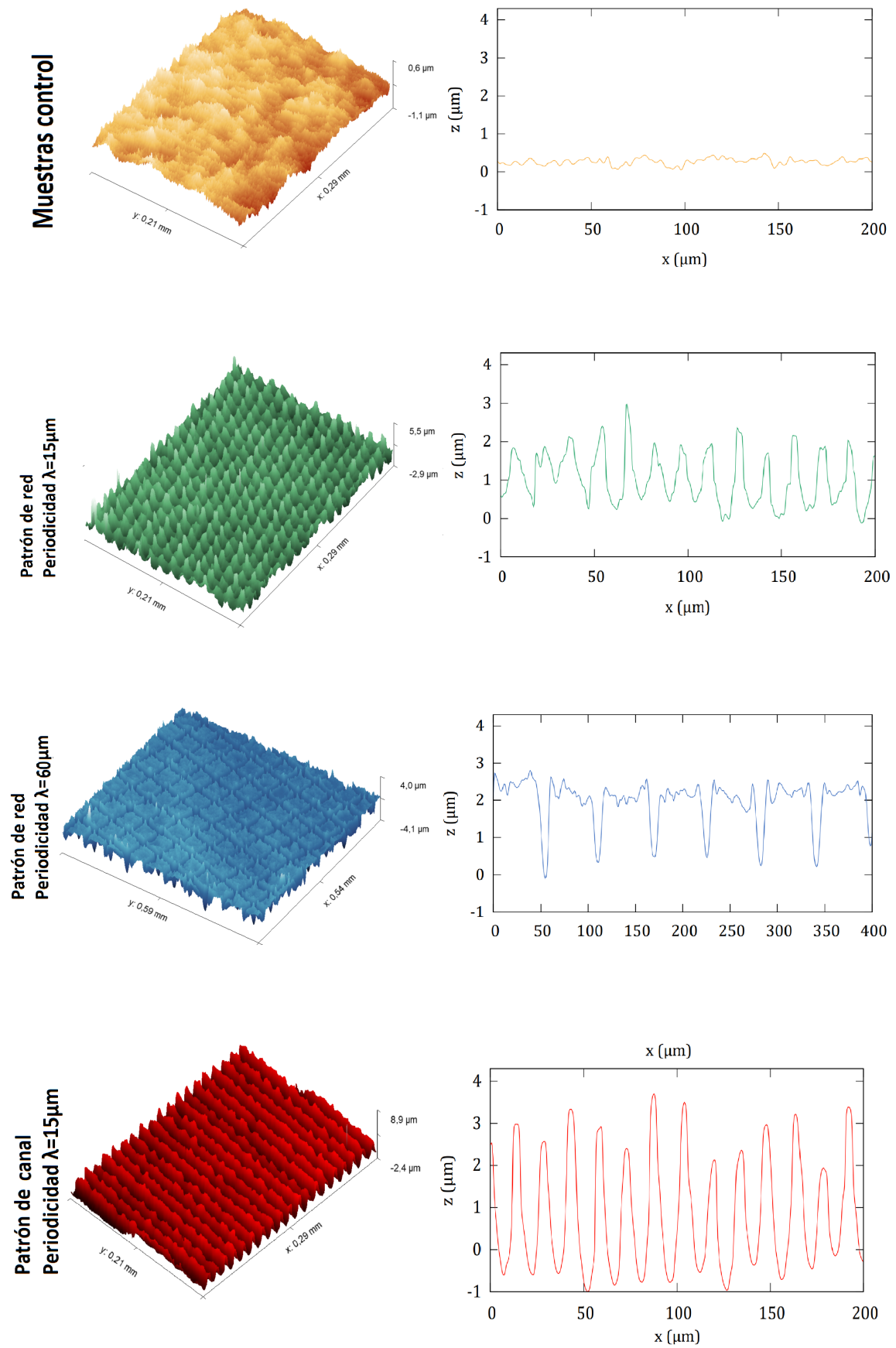


Figura 11: Imagen 3D y perfil transversal de las superficies pilidas estudiadas.

Observando los datos de la tabla 2 podemos ver que la superficie con una mayor rugosidad, de acuerdo a los tres parámetros utilizados, es la correspondiente al patrón de canal. Estos resultados, en parte se ven influenciados en gran medida por la rugosidad que se queda de forma residual al eliminar computacionalmente la rugosidad producida por el patrón, que también alcanza su mayor valor para las muestras con este tipo de texturizado.

Como era de esperar, en los patrones de red se obtiene una mayor rugosidad al menor ser la periodicidad del patrón, ya que aumenta el número de micro-estructuras formadas aumentando el área total de la muestra en ese espacio. En cuanto a la distancia pico valle, obtenemos para todos los patrones resultados muy parecidos de media pero con una gran desviación típica entre los resultados de cada muestra de un patrón.

Estas grandes diferencias de altura entre los picos de las muestras de un mismo patrón se deben a las pequeñas irregularidades en las superficie de las muestras de circonio pre-texturizado, que produce que la altura de contacto entre la superficie y el foco del láser no fuese homogénea durante toda la superficie, lo que produjo puntos donde las incidencias del láser es menor y puntos donde es ligeramente mayor. Parte de esta dispersión también se debe a la irregularidad de forma de las estructuras formadas en los patrones de menor periodicidad, esto puede observarse con mucha claridad en las representaciones de los perfiles transversales que aparecen en la figura 11.

Para estudiar las superficies sin texturizado láser hemos analizado el grupo de control permitiéndonos ver cómo en este se forman, de forma accidental, pequeñas estructuras que contribuyen a un ligero aumento en la rugosidad de estas superficies, siendo su coeficiente de rugosidad $r_W > 1$ a pesar de encontrarse pulidas. En la figura 12 pueden observarse imágenes de la superficie de las muestras de circonio del grupo de control tomadas con el confocal. En estas imágenes podemos ver cómo en las muestras de control se forma una gran cantidad de protuberancias y fisuras con tamaños que pueden llegar hasta los $(14,37 \pm 0,01)\mu m$, produciendo cambios grandes en las estructuras formadas al ser texturizadas con el láser, creando la gran dispersión en la rugosidad y la distancia pico valle que comentamos anteriormente.



Figura 12: Imperfecciones superficies en el grupo de control.

4.1.2. Superficies no pulidas

Para estudiar los efectos que el pulido produjo sobre las superficies de las muestras, estudiamos la topografía de algunas sobre las que no se realizó el pulido. Las superficies estudiadas fueron un grupo de control, donde no se realizó ningún texturizado láser, un grupo sobre la cual se texturizó un patrón de red con una periodicidad de $15\mu\text{m}$, permitiéndonos ver cómo afecta la falta de pulido a la formación de las micro-estructuras en el texturizado láser, y un patrón de puntos que no fue estudiado en las muestras pulidas. En este último patrón hemos utilizado el láser para producir circunferencias con una mayor profundidad en las superficies. Estas circunferencias tienen de $30\mu\text{m}$ de radio y una periodicidad de $140\mu\text{m}$.

Las imágenes tridimensionales obtenidas a partir del estudio de estas muestras pueden observarse en la figura 13 junto una representación del perfil transversal de para observar la forma del patrón con una mayor facilidad, así como los efectos producidos por el texturizado. Los datos que obtuvimos a partir del análisis de las superficies se encuentran en la tabla 3.

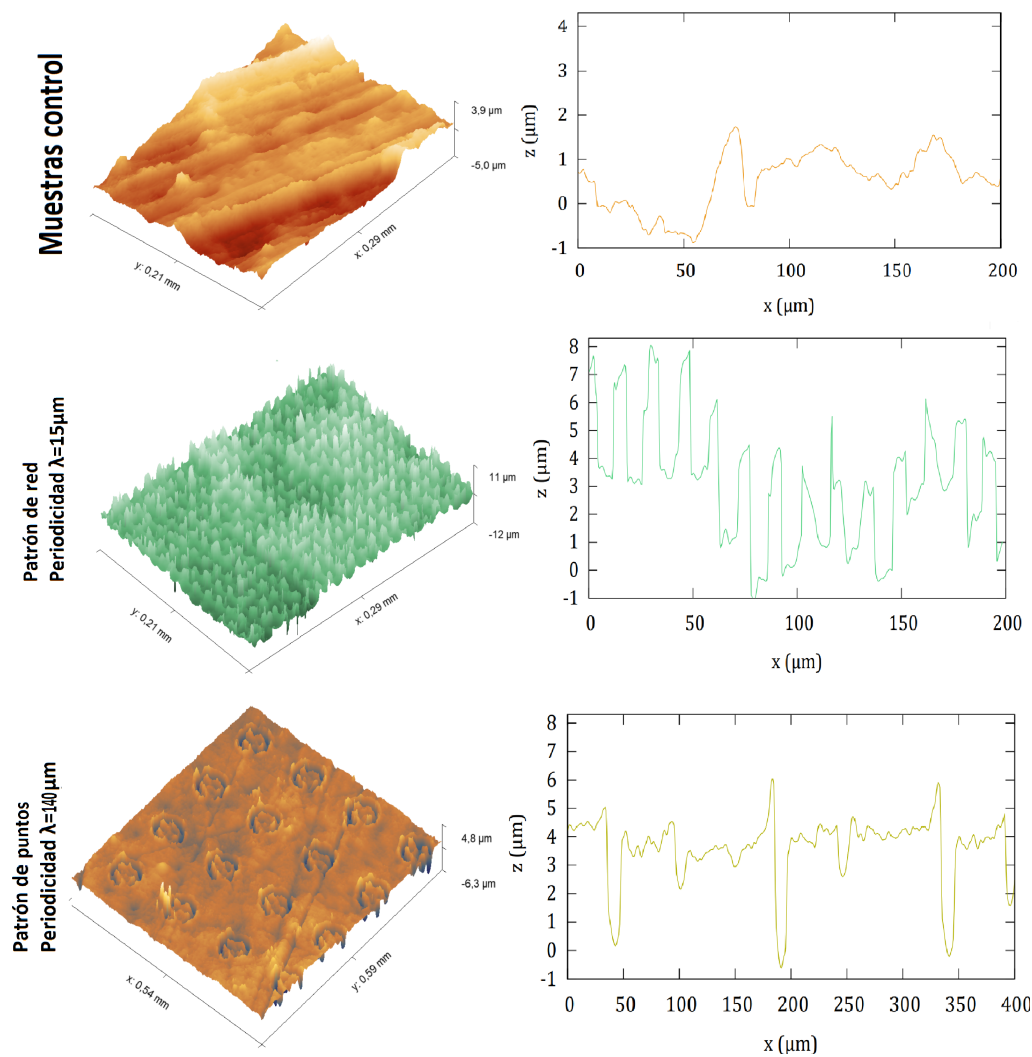


Figura 13: Imagen 3D y perfil transversal de las superficies no pulidas.

Tipo Patrón	Control	Red	Puntos
$\lambda_{Esperada}$ (nm)	-	15	150
$\lambda_{Experimental}$ (nm)	-	$15,1 \pm 0,5$	$151,0 \pm 1,1$
PV (μm)	$6,3 \pm 0,6$	$21,0 \pm 1,2$	21 ± 2
$A_{Proyectada}$ (μm^2)	60008	60008	319200
A (μm^2)	60748 ± 97	89338 ± 3189	359949 ± 7164
r_w	$1,012 \pm 0,002$	$1,49 \pm 0,05$	$1,13 \pm 0,02$
R_a (μm)	$0,47 \pm 0,07$	$1,80 \pm 0,05$	$0,89 \pm 0,12$
RMS (μm)	$0,62 \pm 0,09$	$2,25 \pm 0,06$	$1,4 \pm 0,1$
$PV_{Residual}$ (μm)	$6,3 \pm 0,6$	$10,6 \pm 0,9$	$8,2 \pm 0,8$
$R_{a_{Residual}}$ (μm)	$0,47 \pm 0,07$	$1,74 \pm 0,12$	$0,65 \pm 0,08$

Tabla 3: Datos de caracterización de las superficies no pulidas.

Como era de esperar, las muestras no pulidas presentan una rugosidad muchísimo mayor a las muestras que han sido pulidas, siendo más prevalentes las protuberancias, fracturas y otras imperfecciones en las superficies. A diferencia de las muestras pulidas estas imperfecciones siguen teniendo una gran presencia en las muestras que han sido texturizadas, a pesar de que la periodicidad del texturizado sea pequeña como es el caso del patrón de red.

El principal problema de estas muestras es en la variación de altura de las superficie de las muestras, que provocan gran diferencia en la morfología que obtenemos tras el texturizado. Esto ocurre porque al variar ligeramente la altura de las muestras es posible que el foco del láser no coincida con la superficie llegando a encontrar regiones completas de las muestras donde no llegó a formarse de forma clara la micro-estructura que tratábamos implantar con el patrón.

Debido a la gran irregularidad que presentan estas muestras, llegando a tener desviaciones típicas muy elevadas en comparación a las muestras pulidas, podemos concluir que un pulido previo es necesario aunque este suponga una mayor inversión de tiempo y recursos debido a que homogeniza los resultados obtenidos y nos permite ver más claramente el comportamiento de cada tipo de patrón de forma aislada. Aun así, es un estudio útil puesto a que nos permitirá estudiar posteriormente cómo este gran aumento de la rugosidad de las patrones influye en la mojabilidad de las muestras de circonio dental texturizado.

4.1.3. Efectos del tratamiento térmico

El texturizado láser utilizado para la formación de patrones a escala micrométrica sobre la superficie de las muestras de circonio dental que estamos utilizando en este estudio, puede llegar a producir algunos daños colaterales sobre los primeros micrómetros del material debido al fuerte gradiente térmico y altas tensiones térmicas a las que es inducida la superficie por efecto del láser. Las principales consecuencias del texturizado son la trans-

formación de la estructura cristalina del material, pasando de tetragonal a monoclinica y las tensiones residuales generadas [56]. Un efecto secundario del tratamiento es el cambio de pigmentación que hemos podido observar experimentalmente, aunque algunos investigadores han reportado que este cambio de pigmentación no se ha observado con la utilización de láser menos energéticos [46].

Como hemos explicado en el apartado 3.2, para aliviar las tensiones residuales generadas por la texturización y revertir el cambio de estructura cristalina calentamos en un horno las muestras según la curva de calentamiento que podemos ver en la figura 7. Los efectos de este tratamiento térmico en la topografía de las muestras fueron estudiados haciendo uso del microscopio confocal.

A pesar de que la estructura monoclinica tiene un volumen mayor a la estructura tetragonal, no observamos cambios de tamaño en las estructuras formadas en la texturización láser, permaneciendo la morfología de las muestras inalteradas tras el tratamiento. Esto puede deberse a que la transformación de la estructura monoclinica al incidir el láser no ocurre de forma homogénea en toda la superficie, siendo solo una proporción minoritaria la que sufre este efecto, como observaron S. Deepthi et al. en su estudio [57].

Al estudiar los efectos del tratamiento térmico en las muestras del grupo de control se observó que las pequeñas imperfecciones que estas poseían antes de recibir el tratamiento térmico, como protuberancias, fisuras o cualquier daño que estas pudieran tener que afectase su morfología, no fueron alteradas. Aun así, sí se pudieron observar la aparición de nuevas micro-fisuras producidas en la superficie tras el tratamiento térmico. Es muy posible que la aparición de estas micro-fisuras también pudiese ocurrir en las muestras texturizadas, aunque debido al pequeño tamaño de las estructuras formadas no pudieron ser observadas.

El efecto principal que observamos en las muestras tras ser calentadas en el horno fue cómo su pigmentación pasaba del color negro intenso, que adquirieron tras la texturización, al color blanco brillante característico del circonio y que tanto se asemeja al tono de los dientes. En la figura 14 podemos ver imágenes del conjunto de muestras lijadas, sobre las cuales se ha texturizado el patrón de red con periodicidad $\lambda = 15\mu m$, antes de la figura 14a y después de la figura 14b del tratamiento térmico.

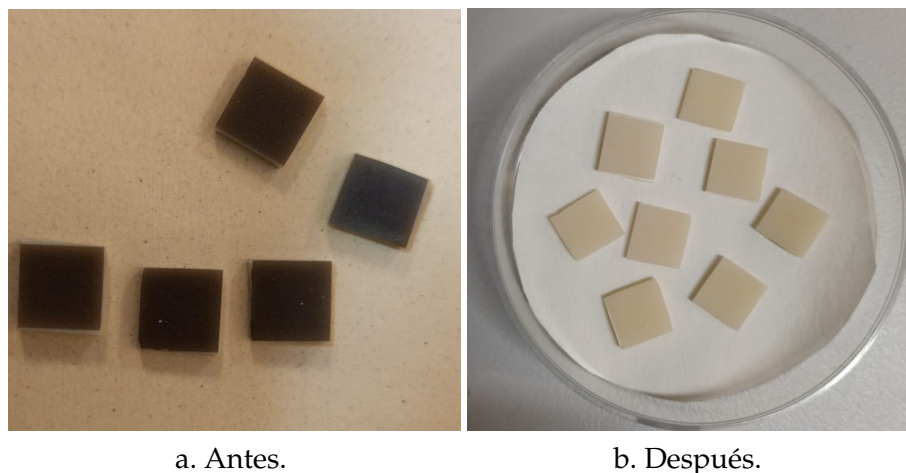


Figura 14: Muestras lijadas con patrón de red $\lambda = 15\mu m$ antes y después del tratamiento térmico.

4.2. Mojabilidad de las superficies

Como hemos visto en el apartado 2.2, la mojabilidad de una superficie tiene una gran influencia sobre la capacidad de las bacterias de adherirse a ella formando biopelículas que permitan su supervivencia. Para predecir cómo el texturizado láser puede afectar a las capacidades antibacterianas de la superficie hemos estudiado el ángulo de contacto de las muestras tras haber recibido el texturizado láser y el tratamiento térmico.

Lo primero que hicimos fue medir el ángulo de contacto estático del circonio dental utilizado para el estudio antes de realizar ningún tratamiento sobre él, encontrando que su valor es de $\theta = (62,4 \pm 1,1)^\circ$. Tras esto estudiamos los ángulos de contacto estático para todas las muestras, tanto las lijadas como las no lijadas.

A la hora de tomar las medidas, el tamaño de las muestras supuso un gran limitante. Esto fue así porque, como veremos más adelante, algunas de las muestras analizadas tienen un comportamiento muy hidrofílico haciendo que la gota se extienda homogéneamente por toda la superficie. Debido al pequeño tamaño de las muestras, cuando la

gota se extendía en este tipo de superficies llegaba a los extremos de la muestras. Esto producía que se formase el ángulo de contacto mínimo permitido por la muestras, el cual se encontraba entre los 28° y los 35° dependiendo de la muestra analizada. Un ejemplo de esto puede verse en la figura 15, donde podemos apreciar imágenes cenitales y laterales de una gota posada sobre una superficie altamente hidrofílica, donde esta se ha extendido por toda la superficie formando el ángulo de contacto mínimo permitido por el tamaño de la muestra. Es por ello, que estos resultados donde obtuvimos un ángulo de contacto bajo no son totalmente fiables, pues el valor real de este podría ser mucho menor. Aun así, los resultados que rondan estos ángulos nos permiten apreciar que estas superficies presentan comportamientos altamente hidrofílicos.

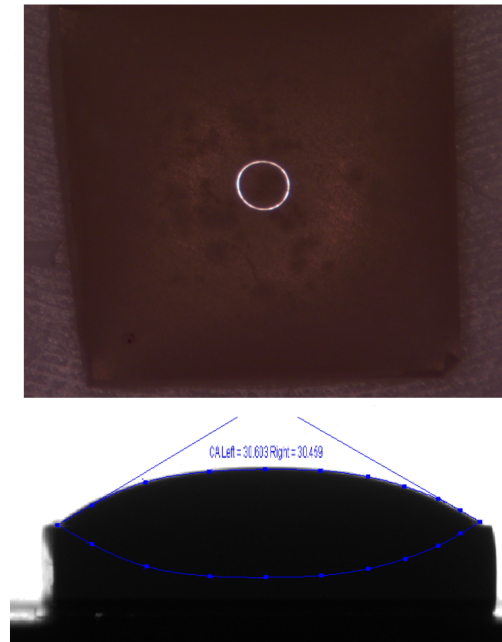


Figura 15: Ejemplo de muestra de altamente hidrofílica sobre la que se posa una gota de agua mili-Q.

4.2.1. Mojabilidad de las superficies pulidas

Tras realizar el texturizado láser y el posterior tratamiento térmico observamos que el ángulo de contacto de todas las muestras se había reducido considerablemente, incluyendo las pertenecientes al grupo de control que no habían sido irradiadas con el láser. Durante días posteriores fuimos observando como la energía superficial de las muestras

iba variando, suponiendo un cambio en el ángulo de contacto.

La evolución del ángulo de contacto respecto al tiempo se ilustra para cada uno de los patrones en la figura 16. Esta evolución se puede ver también de forma muy clara en la figura 17, donde aparecen imágenes tomadas en distintos días de una misma muestra de cada uno de los patrones permitiéndonos observar cómo variaba la mojabilidad de la superficie con el paso de los días.

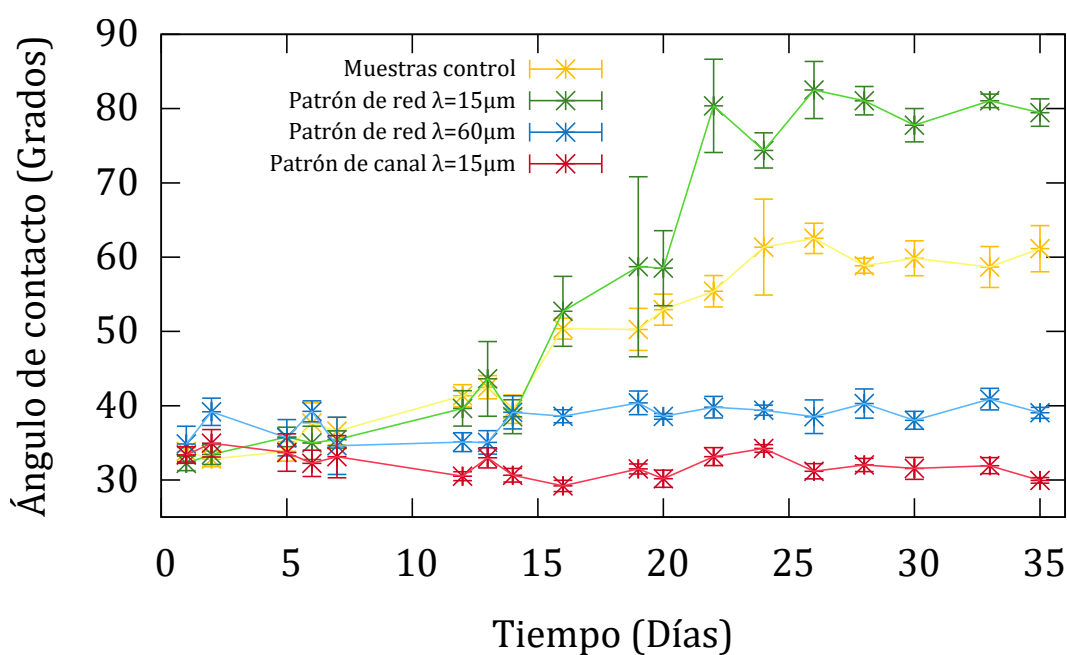


Figura 16: Evolución del ángulo de contacto con el tiempo para cada uno de los patrones estudiados.

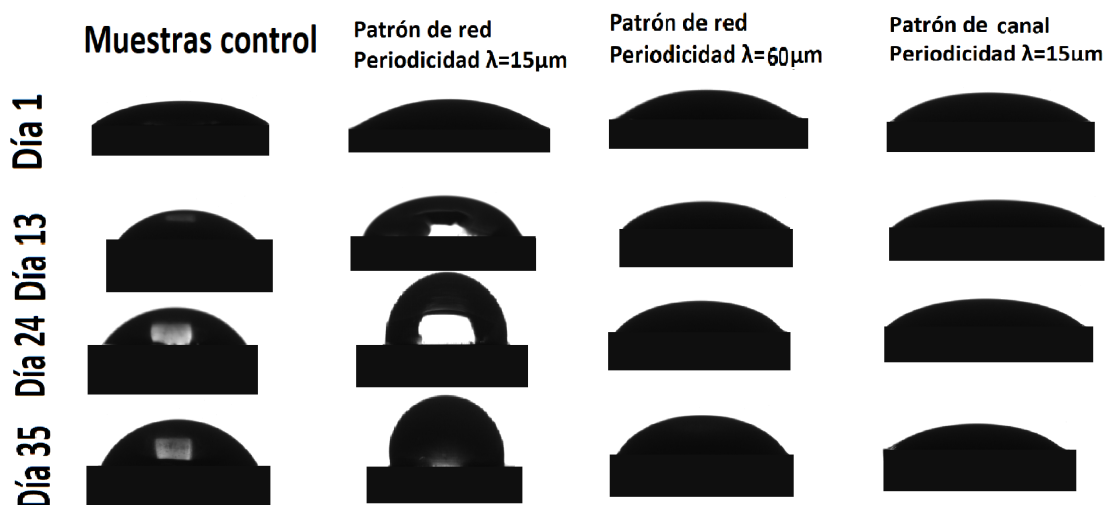


Figura 17: Imágenes de gotas que muestran la evolución del ángulo de contacto con el tiempo para cada uno de los patrones estudiados.

Observando la gráfica de la figura 16, podemos ver cómo, en los primeros días tras haber realizado la modificación de las muestras, todas las analizadas presentan un ángulo de contacto similar ($\theta \sim (32 \pm 2)^\circ$), mostrando un comportamiento completamente hidrofílico. Esto también podemos verlo en la figura 17, donde el primer día todos los perfiles laterales de las gotas son prácticamente idénticos, extendiéndose todas ellas hasta los límites de las muestras.

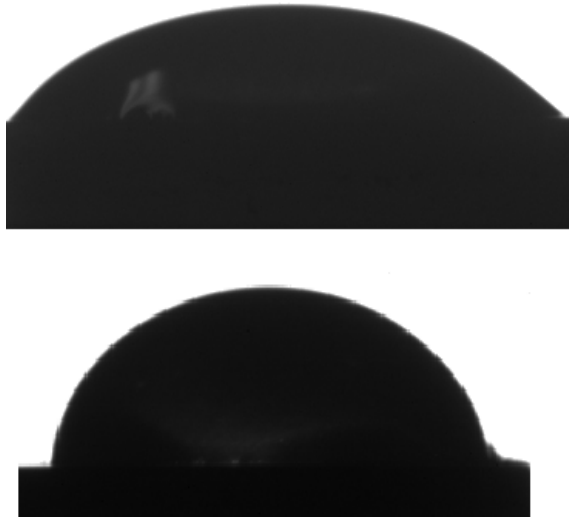


Figura 18: Diferencia ángulo de contacto superficies con patrón de red $\lambda = 15\mu\text{m}$, día 19.

patón tienen un comportamiento similar, existía una pequeña diferencia en la velocidad de evolución de cada una de las muestras, aumentando en algunas muestras el ángulo de contacto más rápido que en otras muestras. Un ejemplo de esto lo podemos ver en la figura 18, donde vemos dos imágenes del perfil lateral de dos muestras con un patrón de red $\lambda = 15\mu\text{m}$ el día 19 tras la texturización.

Una vez alcanzada la estabilidad las muestras del grupo de control vuelven a tener un ángulo de contacto prácticamente idéntico⁷ al medido antes de realizar cualquier modificación sobre las superficies. El resto de superficies tienen un comportamiento totalmente distinto dependiendo del patrón utilizado en su texturización. Las muestras texturizadas con el patrón de red con periodicidad $\lambda = 60\mu\text{m}$ elevan muy ligeramente su ángulo de contacto manteniéndose en valores cercanos a los medidos durante los primeros días. Por otro lado, las pertenecientes al patrón de canal con periodicidad $\lambda = 15\mu\text{m}$ sufren una ligera disminución de su ángulo de contacto, aunque no podemos saber cuán drástica es esta disminución debido a que el pequeño tamaño de las muestras limita los valores que podemos medir.

Con el paso de los días el comportamiento que las gotas presentan al ser posadas sobre las superficies comienza a variar dependiendo del patrón utilizado. Esta diferenciación de las superficies comienza a hacerse notable a partir del día doce, acrecentándose la diferencia hasta el día veinticuatro donde la mojabilidad de las superficies comienza a estabilizarse. Manteniéndose prácticamente constante desde ese punto.

Durante los días en los que se produce la diferenciación de las muestras, antes de que alcance la estabilidad, se acrecenta mucho la dispersión entre los resultados de un mismo patrón. Esto ocurre porque, aunque todas las muestras texturizadas con un mismo

⁷Existe una pequeña disminución del ángulo de contacto debido a las micro-fracturas generadas en el tratamiento térmico, que aumentan ligeramente la rugosidad de las muestras, reduciendo el ángulo de contacto como vemos en la expresión 2.3

El comportamiento más dispar fue obtenido al estudiar las muestras que han sido texturizadas con el patrón de red con periodicidad $\lambda = 15\mu\text{m}$. En estas muestras el ángulo de contacto sufre un gran aumento alcanzando valores mayores a los 80° ($\theta > 80^\circ$). En estas muestras también es donde obtenemos una mayor disparidad entre los resultados obtenidos para cada una de ellas, llegando a encontrar algunas que presentan comportamientos hidrofóbicos ($\theta > 90^\circ$), como podemos ver en la figura 19.

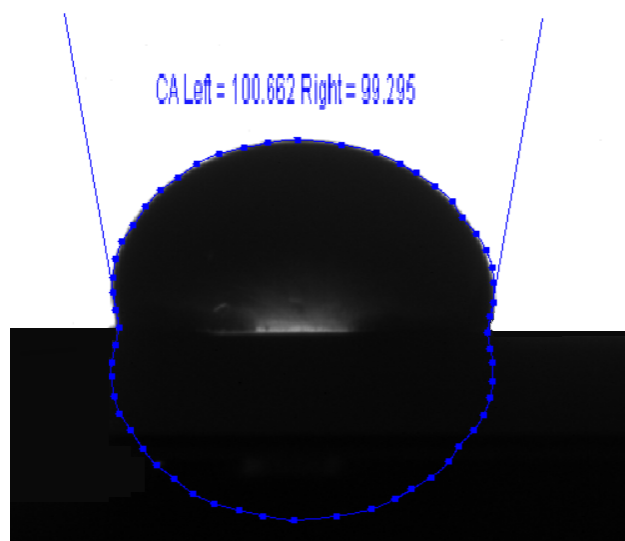


Figura 19: Gota de agua mili-Q posada sobre una superficie patrón de red $\lambda = 15\mu\text{m}$ presentando un comportamiento hidrofóbico.

Como hemos visto en el apartado 2.1.2, el modelo de

Wenzel describe el comportamiento de la mojabilidad de una superficie rugosa. En este modelo el ángulo de contacto de la superficie puede ser calculado haciendo uso de la ecuación 2.3. Puede verse que si tenemos una superficie hidrofílica ($\theta < 90^\circ$), como ocurre en las muestras de control, un aumento de rugosidad significa una reducción del ángulo de contacto. En otras palabras, haciendo uso exclusivamente de la rugosidad de la superficie podemos ver que al haber sido texturizadas deberían presentar un comportamiento más hidrofílico que las muestras de control, y este comportamiento no debería de variar con el tiempo.

Gracias al modelo de Cassie podemos ver que los cambios de las proporciones de los componentes químicos presentes en la superficie pueden influenciar enormemente el comportamiento de la mojabilidad de un material. Estudiando este principio se ha encontrado que en muchos materiales como el titanio, utilizado para la fabricación de prótesis, la contaminación de la superficie producida por el contacto con la atmósfera juega un importante papel en la mojabilidad que presenta su superficie [58, 59].

También, recientes estudios realizados sobre la mojabilidad del circonio dental han reportado que la contaminación superficial producida como consecuencia de la exposición a los gases ambientales puede producir variaciones en la mojabilidad de la superficie con el paso del tiempo [60].

Para comprobar los efectos que la texturización láser tuvo sobre la composición química de la superficie y la relación de estos cambios con los resultados obtenidos al estudiar los ángulos de contacto, analizamos las muestras utilizando un XPS veintiocho días después de que se produjera la modificación de las muestras, cuando la mojabilidad ya se había estabilizado. El porcentaje medio de composición atómica de la superficie obtenido para las muestras de cada uno de los patrones estudiados aparece representado en la tabla 4. En la figura 20 podemos ver la representación del espectro obtenido utilizando el XPS para los tres principales componentes de la superficie; Zr, O y C.

Tipo de Patrón	Zr 3d	O 1s	C 1s	F 1s
Control	$(9,3 \pm 1,1) \%$	$(39 \pm 4) \%$	$(44 \pm 2) \%$	$(0,6 \pm 0,2) \%$
Red $\lambda = 15\mu\text{m}$	$(9,2 \pm 0,9) \%$	$(33,8 \pm 1,2) \%$	$(52 \pm 5) \%$	$(0,4 \pm 0,2) \%$
Red $\lambda = 60\mu\text{m}$	$(14,3 \pm 0,9) \%$	$(50,2 \pm 1,2) \%$	$(26 \pm 3) \%$	$(3,0 \pm 1,2) \%$
Canal $\lambda = 15\mu\text{m}$	$(14,9 \pm 0,1) \%$	$(54,3 \pm 0,6) \%$	$(24,1 \pm 1,1) \%$	$(1,36 \pm 0,09) \%$

Tabla 4: Composición química de las muestras texturizadas con cada uno de los patrones.

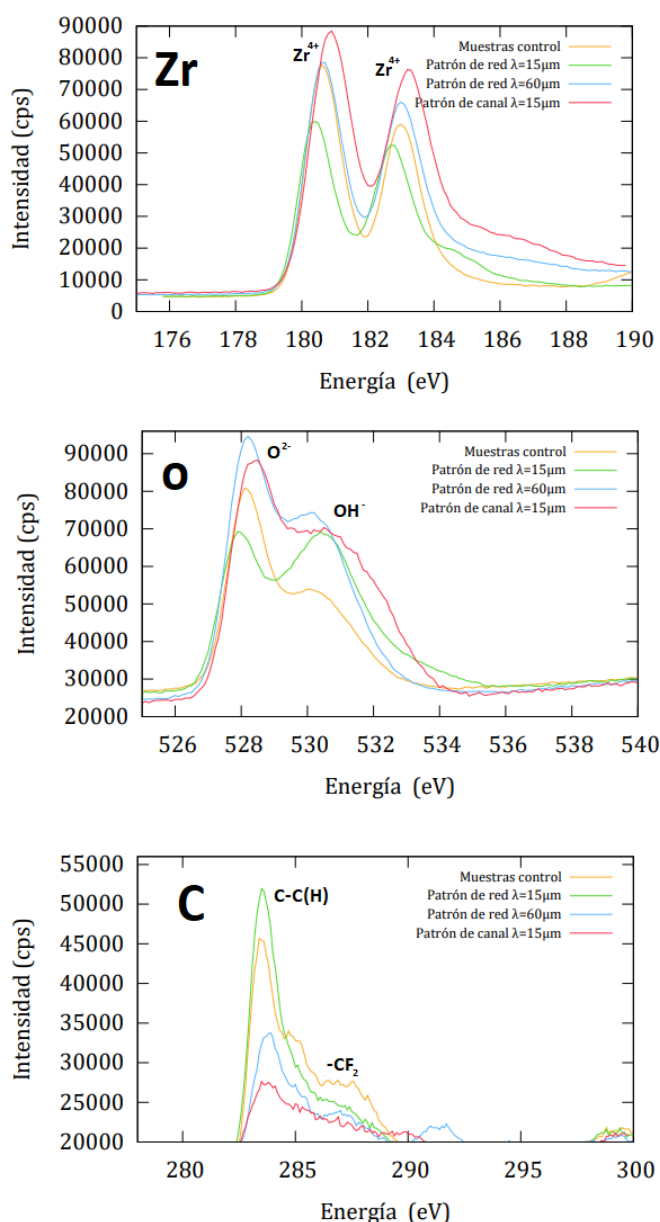


Figura 20: Espectros del C, Zr y O para cada uno de los patrones estudiados.

Observando los porcentajes de composición de cada uno de los elementos podemos observar una gran diferencia entre los resultados obtenidos para las superficies con comportamientos más hidrofílicos y para aquellas que tienen un ángulo de contacto algo más elevado.

Las superficies con patrones de canal y de red con una periodicidad $\lambda = 60\mu\text{m}$, que son las superficies que presentan un comportamiento más hidrofílico, contienen las mayores cantidades de circonio en superficie, entre un 14 % y un 15 %, en todas las muestras analizadas. Estas superficies también presentan una mayor cantidad de oxígeno ligado al circonio.

Aunque no todo el oxígeno presente en la superficie se encuentre ligado al circonio, observando la espectroscopia del oxígeno podemos ver cómo el pico correspondiente al O^{2-} va decreciendo en la misma proporción del doblete de picos del circonio. Por otro lado, el pico correspondiente al OH^- se mantiene prácticamente constante en las tres superficies tratadas con el láser.

En todas las muestras correspondientes al grupo de control se ha encontrado que la proporción de OH^- es mucho menor al resto de muestras, por lo tanto, este puede estar producido por alguna reacción química ocurrida durante la ablación.

Al estar en contacto con los gases ambientales, el óxido de circonio es cubierto por otros compuestos, alterando la composición química superficial de las muestras. El principal de estos compuestos químicos es el carbono, que representa un gran porcentaje de la composición superficial de las muestras. El carbono en la superficie está en forma de C-C(H), $-\text{CF}_2$, $-\text{CF}_3$ y CO_2 , aunque estas dos últimas se encuentran en muy poca proporción, no pudiendo apreciarse los picos que forman debido a la cercanía con los otros dos.

El C-C(H) y el $-\text{CF}_2$ son dos componentes que tienen energías superficiales muy bajas [61]. Por lo tanto, utilizando el modelo de Cassie (apartado 2.1.2) podemos ver que un aumento en la proporción en la que estos compuestos se presentan en la superficie generan un descenso en la energía superficial total de la superficie, haciendo que el ángulo de contacto aumente.

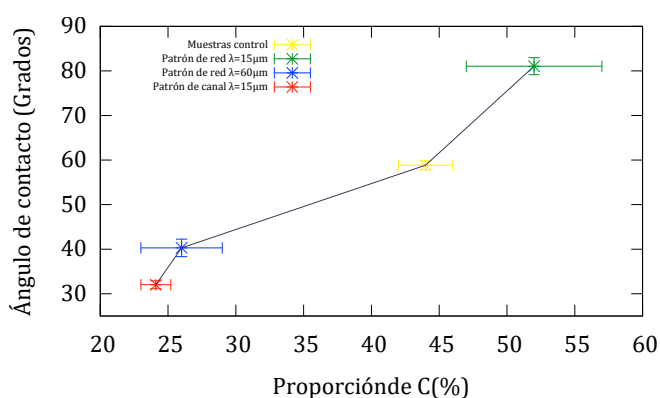


Figura 21: Relación entre la proporción de carbono superficial y el ángulo de contacto.

Por lo tanto, los cambios químicos que tienen lugar al estar la superficie en contacto con los componentes de la atmósfera son los principales responsables de la alteración del ángulo de contacto, jugando la rugosidad un papel secundario. Sin embargo, los distintas micro-estructuras que hemos generado en las superficies han mostrado diferencias grandes en la adhesión de estos componentes atmosféricos, haciendo que la topografía de las muestras juegue un papel fundamental en la mojabilidad de la superficie.

A pesar de haber visto la influencia que tienen los cambios de topografía en la adhesión de los componentes atmosféricos a la superficie de las muestras, con el número tan reducido de patrones que hemos analizado no tenemos datos suficientes para poder determinar las características más relevantes para poder controlar y predecir los cambios químicos de la superficie y controlar de este modo la mojabilidad.

Algunos estudios realizados sobre la texturización de materiales como el titanio [58] o el circonio [60], han observado grandes diferencias en los niveles de óxido en las superficies de las muestras para distintos patrones, atribuyendo esto a distintas reacciones que hayan podido ocurrir al entrar en contacto el láser con la superficie, debido a las grandes presiones y temperaturas que este produce.

La relación entre la proporción de carbono en la superficie y el comportamiento que muestra una gota al posarse sobre ella se puede ver de forma muy clara en la figura 21, que muestra el ángulo de contacto medido el día en el que se realizó el análisis XPS en función de la proporción de carbono en superficie que presentó dicho patrón.

En primer lugar, si comparamos las muestras que hemos texturizado con igual patrón pero distinta periodicidad podemos ver cómo para aquellas con un coeficiente de rugosidad (r_W) más alto se ha obtenido una mayor cantidad de carbono en su superficie y, por lo tanto, una menor energía superficial, mostrando un comportamiento menos hidrofílico, llegando algunas muestras a presentar comportamientos hidrofóbicos. Esto puede ser porque un aumento en el coeficiente de rugosidad implica un aumento en el área de contacto entre la muestra y los compuestos ambientales, haciendo que haya una mayor proporción de estos que se adhieran a la superficie (mayor reactividad).

Sin embargo, comparando dicho patrón con otro de distinto tipo pero igual periodicidad (el patrón de canal) se han obtenido resultados muy distintos. En este caso las muestras del patrón de canal tienen un coeficiente de rugosidad (r_W) mayor pero presentan una concentración de carbono en la superficie mucho menor. Por lo que podemos postular que dependiendo del tratamiento realizado sobre la superficie, la interacción química entre la superficie y los componentes ambientales puede verse alterado sin importar el área de contacto. Aun así, sería necesario un estudio futuro teniendo en cuenta un número mucho mayor de patrones y creando una variación mucho mayor en los parámetros utilizados para llegar a resultados concluyentes.

4.2.2. Mojabilidad de las superficies sin pulir

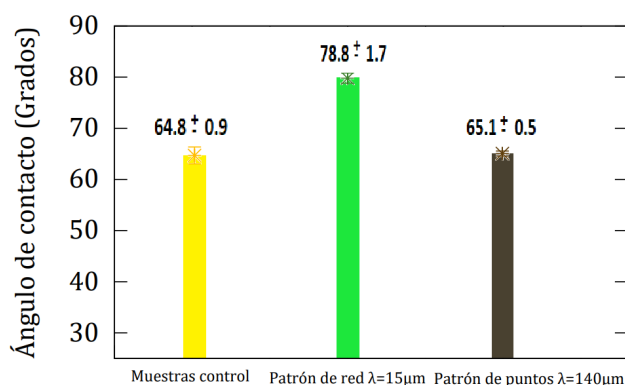


Figura 22: Ángulo de contacto medido para las muestras no pulidas 45 días tras la modificación de la superficie.

te se sigue manteniendo para estas superficies. El aumento en la rugosidad producido por no haber lijado las muestras no tiene un efecto significativo en la interacción que se produce entre la gota y la superficie, jugando el principal papel en esta interacción la composición química superficial.

Las muestras que han sido tratadas con el patrón de puntos presentan un ángulo de contacto similar al de las muestras de control pese al gran tamaño de las estructuras generadas. Aunque esto requeriría de más experimentos para poder confirmarlo, el uso de distintos tipos de patrón podría permitirnos una gran variedad de posibilidades para la generación de superficies con distintas cualidades. Por ejemplo, este patrón de puntos, que presenta un ángulo de contacto similar al del circonio sin texturizar podría permitirnos superficies donde se cree un aumento en la rugosidad sin cambiar sus propiedades

Para comprobar cómo un aumento de la rugosidad influirá en los resultados obtenidos hemos medido el ángulo de contacto de gotas mili-Q depositadas sobre las superficies de las muestras no pulidas. Los resultados obtenidos pueden observarse representados en la figura 22.

Comparando estos resultados con los obtenidos para muestras lijadas podemos ver cómo el comportamiento que discutimos anteriormente

de mojabilidad. Esto puede ser de gran utilidad en diversos procesos, por ejemplo, un estudio de la sobre la integración ósea de implantes de titanio observó que un aumento en la rugosidad superficial podría favorecer la osteointegración [62].

4.3. Adhesión bacteriana

Un estudio realizado por Schwibbert et al. [63] sobre la adhesión de las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en materiales poliméricos micro-estructurados observó que las propiedades antibacterianas de una superficie no solo vienen determinadas por su mojabilidad, sino que la relación de forma y tamaño entre las bacterias y las micro-estructuras formadas en la superficie también juega un papel importante.

Para poder determinar la forma idónea que nos permitiese maximizar las propiedades antibacterianas de la superficie, estudiamos la adhesión bacteriana mediante cultivos *in vitro* sobre las muestras pulidas. Estos cultivos fueron realizados el segundo día tras la texturización para eliminar las diferencias en la mojabilidad producidas por el contacto con los componentes ambientales, estudiando así los cuatro patrones cuando el ángulo de contacto medido en estos era aproximadamente el mismo, como podemos ver en la figura 16.

La cepa utilizada para la realización del estudio fue el *Streptococcus sanguinis*, debido a que es una de las bacterias más comunes en la microbiota bucal, sirviendo como atadura para la unión de otros microorganismos orales en la formación de la biopelícula en la superficie del diente o implante, formando la placa dental. Lo que contribuye al desarrollo de caries y otras enfermedades [64].

Podemos encontrar los resultados obtenidos a partir de los estudios *in vitro* en la tabla 5.

Tipo de Patrón	Control	Red $\lambda = 15\mu\text{m}$	Red $\lambda = 60\mu\text{m}$	Canal $\lambda = 15\mu\text{m}$
$\text{Log}_{10}(\text{UFCs})$	$7,7 \pm 0,3$	$7,67 \pm 0,13$	$7,89 \pm 0,07$	$7,8 \pm 0,3$
ULRs	47669 ± 11188	61132 ± 14380	51036 ± 12044	73181 ± 17919

Tabla 5: Meda de $\text{Log}_{10}(\text{UFCs})$ y Unidades de Luz Relativa ULRs de las superficies tras ser expuestas al *Streptococcus sanguinis*

El parámetro $\text{Log}_{10}(\text{UFCs})$ representa el logaritmo base diez de las unidades formadoras de colonias que fueron encontradas en las superficies, es decir, el conteo total de bacterias que se han encontrado adheridas irreversiblemente a la superficie, actuando como base la formación de biopelículas.

Observando los resultados en la tabla 5 podemos ver que las superficies para las que se ha obtenido el segundo menor valor de unidades formadoras de colonias ha sido para las del grupo de control. Esto puede ser explicado a partir del tamaño de la bacteria utilizada. Las bacterias pertenecientes a la cepa del *Streptococcus sanguinis* poseen un tamaño inferior a $2\mu\text{m}$ [65], siendo más pequeñas que las micro-estructuras formadas mediante la texturización de las superficies, por lo que se facilita de este modo que las bacterias se introduzcan en el espacio disponible entre las micro-estructuras, facilitándose de este modo la adhesión. Este mismo comportamiento fue observado por Schwibbert et al. [63]

en su estudio de la adhesión de la cepa *Staphylococcus aureus* en superficies de poliméricos micro-estructurados.

Las únicas muestras para las que se ha obtenido unos valores más bajos de bacterias adheridas de forma irreversible han sido para las correspondientes al patrón de red con periodicidad $\lambda = 15\mu\text{m}$. Esto podría explicarse como una contribución de la forma de las micro-estructuras generadas sobre la superficie que, por efecto de la incisión del láser, no tienen forma cuadrada como el patrón de red $\lambda = 60\mu\text{m}$, sino que forman pequeños picos 'puntiagudos' cuya punta tiene una superficie inferior al de las bacterias, como puede ser observado en la figura 11. Al ser la superficie de la punta mas pequeña en comparación a la de la superficie bacteriana, esta última puede ser dañada impidiendo la adhesión de las bacterias a la muestra.

Este es un comportamiento que ha sido estudiado ampliamente en la creación de superficies antibacterianas. Por ejemplo, Rhea et al. observaron que la creación de micro estructuras de tamaños menores a las bacterias disminuye la colonización de la superficie en su estudio sobre polímeros micro y nano-estructurados basados en la piel de los tiburones [66].

Basándonos en los resultados obtenidos para las superficies analizadas podemos ver que para crear una superficie con propiedades antibacterianas, si no tenemos en cuenta la energía superficial, sería más ventajoso la utilización de patrones que generen estructuras menores a la de las bacterias dañinas que podemos encontrar en la microflora bucal, o en su defecto que la parte superior de la micro-estructura tenga un tamaño inferior al de la bacteria, como ocurre con las muestras sobre las que se texturizó el patrón de red con periodicidad $\lambda = 15\mu\text{m}$. Sin embargo, este tipo de estructuras también podrían generar daños en las células de las encías impidiendo la aceptación de la prótesis.

Las unidades de luz relativa *ULRs* nos permiten medir la bioluminiscencia de las muestras tras su exposición al *Streptococcus sanguinis*. La bioluminiscencia es el proceso por el cual los seres vivos emiten luz a través de una reacción bioquímica intervenida por la enzima luciferasa. Esta reacción química es resultado del producto de la combinación del oxígeno, el ATP y esta enzima, permitiéndonos estudiar a partir de la intensidad de emisión de la luz la cantidad de ATP presente en la superficie y, por lo tanto, la actividad de las bacterias adheridas.

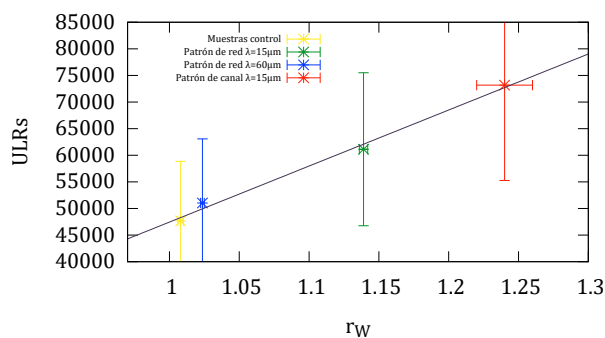


Figura 23: Relación lineal entre *ULRs* y r_w .

ajuste $r^2 = 0,993$. Al ser este muy cercano a la unidad podemos confirmar la relación

Si comparamos las unidades de luz relativa *ULRs* obtenidas para cada uno de los patrones estudiados con la caracterización de las superficies que podemos ver en la tabla 2, observamos que existe una relación muy directa entre el coeficiente de rugosidad (r_w) y la actividad bacteriana. En la figura 23 podemos comprobar la existencia de una relación lineal entre ambos parámetros. Ajustando los datos a una recta obtenemos un coeficiente de

lineal entre ambas magnitudes .

Este aumento en la intensidad de la luz, proveniente de las reacciones químicas que las bacterias adheridas irreversiblemente al material producen al entrar en contacto con el oxígeno y la enzima luciferasa, se debe simplemente al aumento de área producido por el aumento en la rugosidad.

Este aumento de área puede ocasionar distintos efectos que explican los resultados obtenidos. En primer lugar, un aumento de área supone una mayor dispersión de las bacterias adheridas sobre la superficie, lo cual produce un aumento en el área de contacto que estas bacterias tienen con el oxígeno, traduciéndose en una mayor reacción del ATP con el oxígeno, lo que acelera la velocidad de la reacción bioluminiscente y, en consecuencia, aumenta la intensidad de la luz emitida. Un aumento del área también puede suponer un aumento en la movilidad bacteriana, lo que se traduce en un aumento en la actividad bacteriana y, por lo tanto, en la bioluminiscencia de la bacteria. Sin embargo, debido al aumento de oxígeno que entra en contacto con las bacterias es complicado medir cuál es el aumento real en la actividad bacteriana.

5. Posibles ampliaciones del estudio

La investigación realizada en este trabajo de fin de grado ha supuesto un primer estudio sobre un tema de gran complejidad, encontrándonos en ella variables que no esperábamos que jugarán un papel tan importante, como la diferencia de la proporción de agentes químicos ambientales adheridos a la superficie de las muestras para los distintos patrones utilizados en la texturización de estas. Aun así, los resultados obtenidos pueden servir de guía para futuras investigaciones.

Para realizar un estudio en mayor profundidad de este tema que suponga la implementación de técnicas de texturizado láser (DLIP) en prótesis dentales de circonio en un futuro, el primer paso sería estudiar en un número mayor de patrones, variando características como la profundidad, periodicidad o tamaño de las micro-estructuras formadas. Esto nos permitirá entender de una mejor manera como afecta la topografía a la interacción con los gases ambientales, especialmente el carbono, permitiéndonos así poder generar superficies que se ajusten a una cantidad muy diversa de situaciones, pudiendo mostrar resultados totalmente hidrofílicos y hidrófobos, como hemos observado en las pocas estructuras analizadas en esta investigación.

También sería importante observar experimentalmente cómo afectarían los cambios en la energía superficial de las muestras a los resultados obtenidos en la adhesión bacteriana una vez la energía superficial de estas se haya estabilizado. Este resultado no pudo ser incluido en el trabajo de fin de grado debido al gran tiempo necesario para la estabilización de las muestras.

Un análisis de los cambios en la estructura cristalina en los procesos de texturización y en el tratamiento térmico también serían importantes, debido a que con la temperatura utilizada en el horno y el tiempo de aplicación de esta temperatura no podemos estar seguros de que toda la estructura superficial sea tetragonal, pudiendo alterar esto los resultados obtenidos y la interacciones entre la superficie y el medio.

El efecto de los cambios en la energía superficial y rugosidad en la osteointegración de la prótesis son también totalmente desconocidos. Este estudio sería crucial para la imple-

mentación de este tipo de tratamiento debido a la gran importancia de la osteointegración en el éxito del implante.

Por último, habría que estudiar los cambios en la composición química superficial de las muestras al estar expuesta de forma continuada a un entorno bucal, como en el que se encontraría al llegar a implantarse, y un estudio de la degradación de sus propiedades a largo plazo para asegurarnos que pueda cumplir su función por un largo periodo sin afectar a la salud de los portadores del implante.

6. Conclusiones

Durante este trabajo de fin de grado hemos investigado los efectos de la texturización láser de circonio dental buscando maximizar sus propiedades antibacterianas para la implementación de este tratamiento a los implantes dentales de circonio que tanta popularidad han adquirido en los últimos años. Para finalizar este trabajo, haremos un resumen de los resultados más importantes obtenidos en este estudio.

En primer lugar hemos analizado la topografía de las muestras irradiadas con el láser para formar las distintas micro-estructuras, obteniendo sus formas, rugosidad y permitiéndonos ver las posibles irregularidades que se hayan podido ocasionar debido a las irregularidades superficiales que las muestras presentaban. Hemos comprobado cómo pulir las muestras puede ser beneficioso para su estudio y aplicación, ya que homogeniza toda la superficie erradicando gran parte de las irregularidades provenientes de la rugosidad de la superficie pre-tratamiento.

La ablación láser produce un cambio en la estructura cristalina de las muestras que puede verse reflejado en un cambio de la pigmentación del circonio. Este cambio de estructura cristalina supone una degeneración de las características que hacen del circonio un material tan bueno para su aplicación en prótesis dentales, como su gran resistencia a la corrección. Además el cambio en la pigmentación supone un problema para uno de sus mayores atractivos, el color blanco brillante similar al color natural de los dientes pasaría a un color negro intenso. Para revertir este cambio en la estructura cristalina y liberar la tensión residual generada por la gran presión y temperatura del láser, hemos sometido las muestras a un tratamiento térmico tras su texturización consistente en un calentamiento en un horno durante una hora, llegando a temperaturas cercanas a los 900°. El único cambio inducido por este tratamiento en la topografía de las muestras ha sido la generación de pequeñas micro-fracturas en la superficie.

Debido a la relación directa que existe entre la energía superficial y la capacidad de las bacterias de adherirse irreversiblemente formando biopelículas que le faciliten su supervivencia, investigamos los efectos que el texturizado láser tenía sobre las propiedades de mojabilidad de las muestras de circonio. Para ello estudiamos el ángulo de contacto de las muestras, observando inicialmente que todas ellas tenían un ángulo de contacto similar, mostrando comportamientos totalmente hidrofílicos. Con el paso de los días el ángulo de contacto observado fue evolucionando de forma distinta para cada una de las superficies estudiadas hasta estabilizarse aproximadamente 24 días después del tratamiento.

Esta diferenciación en la energía superficial que mostraban las superficies con distintos patrones no era efecto de la rugosidad como en un inicio podría pensarse, sino que provenía de cambios en la proporción de agentes químicos en la superficie, principalmente el carbono ambiental que se adhería a la superficie bajando su energía de contacto, vol-

viéndola así menos hidrofílica, llegando incluso a mostrar comportamientos hidrofóbicos en algunas muestras.

Aunque la rugosidad de las muestras jugase un papel secundario, las distintas microestructuras generadas en la superficie mediante la texturización láser presentaban diferencias muy claras en la cantidad de carbono presente en la superficie, por lo tanto, podemos concluir que existe una dependencia con el patrón utilizado, lo que nos permite generar superficies con características de mojabilidad muy distintas para adaptarnos a los requisitos que necesitemos.

El estudio de las superficies no pulidas nos permitió ver cómo un aumento en la rugosidad no implica un cambio significativo en el ángulo de contacto observado, confirmando así el papel secundario que juega la rugosidad en la energía superficial de las muestras. Además, el estudio del patrón de puntos nos permitió ver cómo otros patrones pueden producir superficies con energías y con tamaños muy distintos, lo que nos permite una gran versatilidad en la formación de superficies.

Las superficies con las que obtuvimos ángulos de contacto más altos al depositar sobre ella las gotas de agua mili-Q son las que fueron texturizadas con un patrón de red con una periodicidad $\lambda = 15\mu m$. Estas superficies son las que presentan una energía superficial más baja encontrándose en el límite entre la hidrofobia y la hidrofília, por lo tanto, sabiendo que las bacterias se adhieren mejor a superficies hidrofílicas, este tipo de estructura sería la que mejores propiedades antibacterianas ofrecería basándonos en la mojabilidad, aunque esto requeriría estudio *in vitro* para su confirmación. Por otro lado, el resto de patrones presentan una mayor hidrofília que el grupo de control, lo que favorece la adhesión de las bacterias, empeorando las cualidades antibacterianas del circonio.

Por último, estudiamos cómo las micro-estructuras formadas en la superficie afectan a la adhesión bacteriana durante los primeros días después del tratamiento, evitando así, en gran medida, las diferencias que puedan ocurrir debido a la energía superficial de las muestras. En este estudio vimos cómo la generación de estructuras mayores a las bacterias pueden favorecer la adhesión de éstas. Sin embargo, la presencia de estructuras cuya parte superior tenga un tamaño inferior al de las bacterias puede producir daños en las superficies de estas últimas, mitigando de este modo su adhesión. Este comportamiento fue observado en las muestras texturizadas con el patrón de red con periodicidad $\lambda = 15\mu m$, las cuales fueron las únicas para las que se obtuvo un número de unidades formadoras de colonias ligeramente inferior que para el grupo de control, por lo que la presencia de este tipo de estructuras permiten maximizar las propiedades antibacterianas de las muestras independientemente de su energía superficial. Por otra parte, los otros dos patrones estudiados presentan un mayor número de bacterias adheridas en su superficie, empeorando las características antibacterianas del circonio.

Referencias

- [1] Takuo Kuboki, Soichiro Okamoto, Hidenori Suzuki, Manabu Kanyama, Hikaru Arakawa, Wataru Sonoyama, Atsushi Yamashita, Takuo Kuboki, Soichiro Okamoto, Hidenori Suzuki, Manabu Kanyama, Hikaru Arakawa, Wataru Sonoyama, and Atsushi Yamashita. Quality of life assessment of bone-anchored fixed partial denture patients with unilateral mandibular distal-extension edentulism. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 82(2):182–187, 8 1999.

- [2] Rita Depprich, Markus Schlee, Michelle A Ommerborn, Christian Naujoks, Hans-Peter Wiesmann, Sirichai Kiattavorncharoen, Hans-Christoph Lauer, Ulrich Meyer, Norbert R. Kübler, and Jörg Handschel. Osseointegration of zirconia implants compared with titanium: an in vivo study. *Head Face Med*, 4(1), 12 2008.
- [3] Harald Tschernitschek, Lothar Borchers, and Werner Geurtsen. Nonalloyed titanium as a bioinert metal—A review. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 96(1):12, 7 2006.
- [4] Y. Josset, Zohra Oum'Hamed, A. Zarrinpour, M. Lorenzato, Adnet Jj, and Dominique Laurent-Maquin. In vitro reactions of human osteoblasts in culture with zirconia and alumina ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research*, 47(4):481–493, 12 1999.
- [5] Lia Rimondini, Loredana Cerroni, Antonio Carrassi, and Paola Torricelli. Bacterial colonization of zirconia ceramic surfaces: an in vitro and in vivo study. *PubMed*, 17(6):793–8, 1 2003.
- [6] Antonio Scarano, Fabio Di Carlo, Manlio Quaranta, and Adriano Piattelli. Bone Response to Zirconia Ceramic Implants: An Experimental Study in Rabbits. *Journal of Oral Implantology*, 29(1):8–12, 2 2003.
- [7] Vincenzo Sollazzo, Furio Pezzetti, Antonio Scarano, Adriano Piattelli, Carlo Alberto Bignozzi, Leo Massari, Giorgio Brunelli, and Francesco Carinci. Zirconium oxide coating improves implant osseointegration in vivo. *Dental Materials*, 24(3):357–361, 3 2008.
- [8] S Parithimarkalaignan and T. V. Padmanabhan. Osseointegration: An Update. *The Journal of Indian Prosthodontic Society*, 13(1):2–6, 1 2013.
- [9] Thomas Sterner, Norbert Schütze, Guido Saxler, Franz Jakob, and Christof P. Rader. Auswirkungen von klinisch relevanten Aluminium Keramik-, Zirkonium Keramik- und Titanpartikel unterschiedlicher Größe und Konzentration auf die TNF-Ausschüttung in einem humanen Makrophagensystem / Effects of clinically relevant alumina ceramic particles, zirconia ceramic particles and titanium particles of different sizes and concentrations on TNF release in a human monocytic cell line. *Biomedizinische Technik*, 49(12), 12 2004.
- [10] Corrado Piconi and Giulio Maccauro. Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials*, 20(1):1–25, 1 1999.
- [11] Isabelle Denry and J. Robert Kelly. State of the art of zirconia for dental applications. *Dental Materials*, 24(3):299–307, 3 2008.
- [12] Matthew Jackson. Restoration of posterior implants using a new ceramic material. *PubMed*, 16(7):19–22, 9 1999.
- [13] Honglue Tan, Zhaoxiang Peng, Qingtian Li, Xiaofen Xu, Shengrong Guo, and Tingting Tang. The use of quaternised chitosan-loaded PMMA to inhibit biofilm formation and downregulate the virulence-associated gene expression of antibiotic-resistant staphylococcus. *Biomaterials*, 33(2):365–377, 1 2012.
- [14] Jun Lin, Shuyi Qiu, Kim Lewis, and Alexander M. Klibanov. Mechanism of bactericidal and fungicidal activities of textiles covalently modified with alkylated polyethylenimine. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(2):168–172, 5 2003.

- [15] Charles E. Edmiston, Gary R. Seabrook, Michael P. Goheen, Candace J. Krepel, Christopher N. Johnson, Brian D. Lewis, Kellie R. Brown, and Jonathan B. Towne. Bacterial Adherence to Surgical Sutures: Can Antibacterial-Coated Sutures Reduce the Risk of Microbial Contamination? *Journal of The American College of Surgeons*, 203(4):481–489, 10 2006.
- [16] Jonny J. Blaker, Showan N. Nazhat, and Aldo R. Boccaccini. Development and characterisation of silver-doped bioactive glass-coated sutures for tissue engineering and wound healing applications. *Biomaterials*, 25(7-8):1319–1329, 3 2004.
- [17] Mehdi Kazemzadeh-Narbat, Benjamin F.L. Lai, Chuan-Fan Ding, Jayachandran N. Kizhakkedathu, Robert E. W. Hancock, and Rizhi Wang. Multilayered coating on titanium for controlled release of antimicrobial peptides for the prevention of implant-associated infections. *Biomaterials*, 34(24):5969–5977, 8 2013.
- [18] Davide Campoccia, Lucio Montanaro, Pietro Speziale, and Carla Renata Arciola. Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use. *Biomaterials*, 31(25):6363–6377, 9 2010.
- [19] Cristina Díaz, Patricia Laura Schilardi, Roberto Carlos Salvarezza, and M. F. L. De Mele. Nano/Microscale Order Affects the Early Stages of Biofilm Formation on Metal Surfaces. *Langmuir*, 23(22):11206–11210, 9 2007.
- [20] Russell J. Crawford, Hayden K. Webb, Vi Khanh Truong, Jafar Hasan, and Elena P. Ivanova. Surface topographical factors influencing bacterial attachment. *Advances in Colloid and Interface Science*, 179-182:142–149, 11 2012.
- [21] Vi Khanh Truong, Rimma Lapovok, Yuri Estrin, Stuart Rundell, James Z. Wang, Christopher J. Fluke, Russell J. Crawford, and Elena P. Ivanova. The influence of nano-scale surface roughness on bacterial adhesion to ultrafine-grained titanium. *Biomaterials*, 31(13):3674–3683, 5 2010.
- [22] III. An essay on the cohesion of fluids. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, 95:65–87, 12 1805.
- [23] Robert G. Wenzel. RESISTANCE OF SOLID SURFACES TO WETTING BY WATER. *Industrial engineering chemistry*, 28(8):988–994, 8 1936.
- [24] A. B. D. Cassie. Contact angles. *Discussions of the Faraday Society*, 3:11, 1 1948.
- [25] A. B. D. Cassie. Contact angles. *Discussions of the Faraday Society*, 3:11, 1 1948.
- [26] Zhiqiang Cao, Luo Mi, Jose Mendiola, Jean-Rene Ella-Menye, Lei Zhang, Hong Xue, and Shaoyi Jiang. Reversibly Switching the Function of a Surface between Attacking and Defending against Bacteria. *Angewandte Chemie*, 51(11):2602–2605, 12 2011.
- [27] J. Parker M. T. Madigan, J. M. Martinko. *Biología de los Microorganismos*. Pearson Prentice-Hall, 2003.
- [28] M. Negroni. *Microbiología Estomatológica: Fundamentos y guía práctica*. Médica Panamericana, 2009.

- [29] A. Unepetty, A. Dávila-Lezama, Diana Garibo, Alina Oknianska, Nina Bogdanchikova, J. F. Hernández-Sánchez, and Arturo Susarrey-Arce. Strategies applied to modify structured and smooth surfaces: A step closer to reduce bacterial adhesion and biofilm formation. *Colloid and Interface Science Communications*, 46:100560, 1 2022.
- [30] Anthony D Verderosa, Makrina Totsika, and Kathryn E. Fairfull-Smith. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. *Frontiers in Chemistry*, 7, 11 2019.
- [31] Eve Maunders and Martin Welch. Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation. *Fems Microbiology Letters*, 364(13), 6 2017.
- [32] S.Venkata Mohan, Ashok Pandey, and Sunita Varjani. *Biomass, Biofuels, Biochemicals*. Elsevier, 9 2018.
- [33] Jianwei Ma, Yuekai Sun, Karla T. Gleichauf, Jun Lou, and Qilin Li. Nanostructure on Taro Leaves Resists Fouling by Colloids and Bacteria under Submerged Conditions. *Langmuir*, 27(16):10035–10040, 7 2011.
- [34] Hans J. Ensikat, Petra Ditsche-Kuru, Christoph Neinhuis, and Wilhelm Barthlott. Superhydrophobicity in perfection: the outstanding properties of the lotus leaf. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 2:152–161, 3 2011.
- [35] Yingying Yan, Nong Gao, and Wilhelm Barthlott. Mimicking natural superhydrophobic surfaces and grasping the wetting process: A review on recent progress in preparing superhydrophobic surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 169(2):80–105, 12 2011.
- [36] Alka Jaggessar, Hesam Shahali, Asha Mathew, and Prasad Yarlagadda. Biomimicking nano and micro-structured surface fabrication for antibacterial properties in medical implants. *Journal of Nanobiotechnology*, 15(1), 10 2017.
- [37] Tae Jeong Kim. Assessment of Hydro/Oleophobicity for Shark Skin Replica with Riblets. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14(10):7562–7568, 10 2014.
- [38] Chaoqun Zhang, Daniel A. McAdams, and Jaime C. Grunlan. Nano/Micro-Manufacturing of Bioinspired Materials: a Review of Methods to Mimic Natural Structures. *Advanced Materials*, 28(30):6292–6321, 5 2016.
- [39] Andre K. Geim, S. V. Dubonos, Irina V. Grigorieva, Kostya S. Novoselov, Arcady Zhukov, and S. Yu. Shapoval. Microfabricated adhesive mimicking gecko foot-hair. *Nature Materials*, 2(7):461–463, 6 2003.
- [40] Sanjay Kumar, Somashekhar S. Hiremath, Balaji Ramachandran, and Vignesh Muthuvijayan. Effect of Surface Finish on Wettability and Bacterial Adhesion of Micromachined Biomaterials. *Biotribology*, 18:100095, 6 2019.
- [41] Malte Hermansson. The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 14(1-4):105–119, 8 1999.
- [42] Marc Quirynen and Curd M. L. Bollen. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. *Journal of Clinical Periodontology*, 22(1):1–14, 12 2005.

- [43] CERCON HT DISCO 98/14MM. <https://n9.cl/v9hhxp>.
- [44] Zirkonofen 600/V3. <https://zirkonzahn.com/es/productos/maquinaria/horno-de-sinterizacion-zirkonofen/zirkonofen-600-v3>.
- [45] E. Roitero, Federico Lasserre, Joan Josep Roa, Marc Anglada, Frank Mücklich, and Emilio Jiménez-Piqué. Nanosecond-laser patterning of 3Y-TZP: Damage and microstructural changes. *Journal of the European Ceramic Society*, 37(15):4876–4887, 12 2017.
- [46] E. Roitero, M. I. Ochoa, Marc Anglada, Frank Mücklich, and Emilio Jiménez-Piqué. Low temperature degradation of laser patterned 3Y-TZP: Enhancement of resistance after thermal treatment. *Journal of the European Ceramic Society*, 38(4):1742–1749, 4 2018.
- [47] Gwyddion–free spm data analysis software. <http://gwyddion.net>.
- [48] Aurélien F. Stalder, Gerit Kulik, Daniel Sage, Luisa Barbieri, and Patrik Hoffmann. A snake-based approach to accurate determination of both contact points and contact angles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 286(1-3):92–103, 9 2006.
- [49] Sophie E. Mountcastle, Nina Vyas, Victor M. Villapún, Sophie C. Cox, Sara Jabbari, Rachel Sammons, Richard C. Shelton, Anthony Walmsley, and Sarah A. Kuehne. Bio-film viability checker: An open-source tool for automated biofilm viability analysis from confocal microscopy images. *npj Biofilms and Microbiomes*, 7(1), 5 2021.
- [50] Culture Collections. Bacteria Collection: NCTC 7863 Streptococcus sanguinis. <https://www.culturecollections.org.uk/products/bacteria/detail.jsp?collection=nctc&refId=NCTC+7863>.
- [51] Brain Heart Infusion. Scharlau chemie. *Barcelona, España*.
- [52] C Washington Winn, Jr. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 1994.
- [53] Jet Biofil. Guangzhou. *China*.
- [54] BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay. https://www.promega.es/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/bactiter_glo-microbial-cell-viability-assay/?catNum=G8230.
- [55] PF13-Punto crítico. <https://www.ujaen.es/servicios/scai/recursos/pf13-punto-critico>.
- [56] E. Roitero, Federico Lasserre, Joan Josep Roa, Marc Anglada, Frank Mücklich, and Emilio Jiménez-Piqué. Nanosecond-laser patterning of 3Y-TZP: Damage and microstructural changes. *J. Eur. Ceram. Soc.*, 37(15):4876–4887, 12 2017.
- [57] S. Deepthi, Jayachandran Venkatesan, Se-Kwon Kim, Joel D. Bumgardner, and Rangasamy Jayakumar. An overview of chitin or chitosan/nano ceramic composite scaffolds for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93:1338–1353, 12 2016.

- [58] Zhongxu Lian, Jinkai Xu, Zhanjiang Yu, Peng Yu, Ren Wanfei, Zuobin Wang, and Huadong Yu. Bioinspired Reversible Switch between Underwater Superoleophobicity/Superaerophobicity and Oleophilicity/Aerophilicity and Improved Antireflective Property on the Nanosecond Laser-Ablated Superhydrophobic Titanium Surfaces. *ACS Applied Materials Interfaces*, 12(5):6573–6580, 11 2019.
- [59] Peter Gregorčič, B. Šetina Batič, and Marko Hočevar. Controlling the stainless steel surface wettability by nanosecond direct laser texturing at high fluences. *Applied Physics A*, 123(12), 11 2017.
- [60] Zihao Pu, Xiubing Jing, Chengjuan Yang, Fujun Wang, and Kornel F. Ehmann. Wettability modification of zirconia by laser surface texturing and silanization. *International Journal of Applied Ceramic Technology*, 17(5):2182–2192, 7 2020.
- [61] E. F. Hare, Elaine G. Shafrin, and William A Zisman. Properties of Films of Adsorbed Fluorinated Acids. *The Journal of Physical Chemistry*, 58(3):236–239, 3 1954.
- [62] Christoph Zwahr, Denise Günther, Tina Brinkmann, Nikolai Gulow, Steffen Oswald, Marzellus Grosse Holthaus, and Andrés Fabián Lasagni. Laser Surface Patterning of Titanium for Improving the Biological Performance of Dental Implants. *Advanced Healthcare Materials*, 6(3):1600858, 12 2016.
- [63] Karin Schwibbert, Friederike Menzel, Nadin Epperlein, Jörn Bonse, and Jörg Krüger. Bacterial Adhesion on Femtosecond Laser-Modified Polyethylene. *Materials*, 12(19):3107, 9 2019.
- [64] Shlomo Matalon, Dana Safadi, Avi Meirowitz, and Zeev Ormianer. The Effect of Aging on the Roughness and Bacterial Adhesion of Lithium Disilicate and Zirconia Ceramics. *Journal of Prosthodontics*, 30(5):440–446, 10 2020.
- [65] Boston University. Streptococcus pyogenes agent information sheet. [https://www.bu.edu/research/ethics-compliance/safety/rohp/agent-information-sheets/streptococcus-pyogenes-agent-information-sheet/#:~:text=Streptococcus%20pyogenes%20Group%20A%20\(Îš,than%20.5%20mm%20in%20size.](https://www.bu.edu/research/ethics-compliance/safety/rohp/agent-information-sheets/streptococcus-pyogenes-agent-information-sheet/#:~:text=Streptococcus%20pyogenes%20Group%20A%20(Îš,than%20.5%20mm%20in%20size.)
- [66] Rhea M. May, Chelsea M. Magin, Ethan E. Mann, Michael C Drinker, John F. Fraser, Christopher A. Siedlecki, Anthony B. Brennan, and Shrvanthi T. Reddy. An engineered micropattern to reduce bacterial colonization, platelet adhesion and fibrin sheath formation for improved biocompatibility of central venous catheters. *Clinical and translational medicine*, 4(1), 2 2015.
- [67] Juan José Muñoz Pérez. Tensión superficial, bacterias y caries. *Revista española de física*, 33(4):1–10, 12 2019.

Agradecimientos

Antes de concluir con el trabajo me gustaría agradecerles a todas las personas que han prestado su apoyo a esta investigación, y sin las cuáles esto no hubiese sido posible.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutor de TFG Miguel Ángel Rodríguez Valverde por brindarme esta oportunidad y por guiarme durante todo el trabajo, enseñándome el mundo de la investigación y siendo un gran pilar en mi formación.

También me gustaría agradecerle a Pablo Ibañez Ibañez y Schon Gabriel Fusco por la gran ayuda prestada en el laboratorio, estando siempre allí para cualquier duda o problema que pudiera tener.

También habría sido impensable la realización de esta investigación sin el apoyo del co-tutor de este TFG Juan Ignacio Rosales Leal, por todo el apoyo que ha supuesto en la preparación del circonio utilizado y los cultivos bacterianos. También tendría que agradecer a la compañera con la cual he colaborado durante todo este proyecto Paula Morales Serrano.

Agradecimientos también a Laura Méndez Liñan por su ayuda en la obtención de los espectros superficiales de las muestras, que han jugado un papel crucial en los resultados obtenidos, permitiéndonos entender los resultados obtenidos al estudiar la mojabilidad de las muestras. También me gustaría agradecerle a Miguel Cabrerizo Latorre por las vasijas utilizadas para la realización del tratamiento térmico sin las cuales no se hubiera podido realizar el estudio.

No podría faltar los agradecimientos a Alicia Sola Godoy por los dibujos de las gotas utilizados durante el fundamento teórico, y sobre todo por todo el apoyo que he recibido, animándome en todo momento e inspirándome todos los días a querer dar lo mejor de mi. Gracias por todo.

Me gustaría también agradecer a mis amigos y todas las personas maravillosas que he conocido durante estos años por todos los momentos juntos. En especial me gustaría agradecerle a Enrique Gallego Toribio por todo el apoyo y ayuda brindada.

Agradecimientos también a Pedro Ariza Sánchez, profesor del centro educativo Sagrada familia de Úbeda, quien desde muy pequeño me mostró el fascinante mundo de la física, cultivando mi curiosidad y vocación.

Por último y más importante, me gustaría darle las gracias a toda mi familia y en especial a mis padres, por todo el apoyo que me han dado, brindando la oportunidad de estar aquí estudiando lejos de casa, y sobre todo, me gustaría darles las gracias por educarme y hacer que sea la persona que soy gracias a ellos. Gracias por estar siempre ahí.