UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH
Escola d'Enginyeria de Barcelona Est

TRABAJO DE FINAL DE GRADO

Doble grado en Ingeniería de Materiales y Mecánica

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ESTERILIZACIÓN EN INJERTOS ÓSEOS RETICULARES FUNCIONALIZADOS Y FABRICADOS MEDIANTE LA TECNOLOGÍA DIRECT INK WRITING

Memoria y Anexos

Autor/a: Anna Fernández Serra
Director/a: José Maria Manero Planella
Co-Director/a: Bàrbara Adrover Monserrat
Co-Director/a: Maria Pau Ginebra Molins

Convocatoria: Abril 2024

Resumen

Este estudio se enfoca en mejorar las propiedades del titanio puro de grado 2 para su uso en implantes óseos. Se utilizó la técnica de impresión 3D "*Direct Ink Writing"* (DIW) para fabricar muestras, las cuales fueron tratadas con plata y calcio para estimular la osteointegración y mejorar la resistencia antibacteriana. Posteriormente, se esterilizaron mediante autoclave, radiación gamma y óxido etileno y se compararon con muestras que no fueron esterilizadas, para evaluar el efecto del proceso de esterilización en las propiedades del material.

Para estudiar el efecto de la esterilización, se realizó una caracterización superficial mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS), asegurando así que se genera la estructura esperada. Se realizaron ensayos de liberación de iones, pruebas microbiológicas y ensayos de adhesión celular con el fin de evaluar la capacidad antimicrobiana y biocompatibilidad de las probetas. Adicionalmente se analizan y se estudian las distintas propiedades mecánicas del titanio, para así justificar la selección de este material y del patrón *Honeycomb* (HC).

Los resultados destacaron cierta influencia de la técnica de impresión 3D, pero los tratamientos termoquímicos fueron los que repercutieron más en las propiedades de las muestras. Aunque se observó cierto impacto del método de esterilización, las diferencias principales entre las muestras esterilizadas y no esterilizadas estaban relacionadas con procesos previos. Se sugiere mejorar la precisión de la impresión 3D y realizar controles mediante la técnica SEM, en distintas etapas de los tratamientos termoquímicos. Esto ayudaría a determinar las distintas propiedades y mejoraría la calidad de los injertos óseos.

Resum

Aquest estudi s'enfoca a millorar les propietats del titani pur de grau 2 per al seu ús en implants ossis. Es va utilitzar la tècnica d'impressió 3D *Direct Ink Writing* (DIW) per a fabricar mostres, les quals van ser tractades amb plata i calci per a estimular l'osteointegració i millorar la resistència antibacteriana. Posteriorment, es van esterilitzar mitjançant autoclau, radiació gamma i òxid etilè i es van comparar amb mostres que no van ser esterilitzades, per a avaluar l'efecte del procés d'esterilització en les propietats del material.

Per a estudiar l'efecte de l'esterilització, es va realitzar una caracterització superficial mitjançant microscòpia electrònica de rastreig (SEM) i espectroscopía de fotoelectrons de raigs X (XPS), assegurant així que es genera l'estructura esperada. Es van realitzar assajos d'alliberament d'ions, proves microbiològiques i assajos d'adhesió cel·lular amb la finalitat d'avaluar la capacitat antimicrobiana i biocompatibilitat de les provetes. Addicionalment s'analitzen i s'estudien les diferents propietats mecàniques del titani, per a així justificar la selecció d'aquest material i del patró *Honeycomb* (HC).

Els resultats van destacar una certa influència de la tècnica d'impressió 3D, però els tractaments termoquímics van ser els que van repercutir més en les propietats de les mostres. Encara que es va observar un cert impacte del mètode d'esterilització, les diferències principals entre les mostres esterilitzades i no esterilitzades estaven relacionades amb processos previs. Se suggereix millorar la precisió de la impressió 3D i realitzar controls mitjançant la tècnica SEM, en diferents etapes dels tractaments termoquímics. Això ajudaria a determinar les diferents propietats i milloraria la qualitat dels empelts ossis.

Abstract

This study focuses on improving the properties of pure grade 2 titanium for use in bone implants. The Direct Ink Writing (DIW) 3D printing technique was used to produce samples treated with silver and calcium, to promote osseointegration and improve antibacterial resistance. The samples were then sterilised by autoclaving, gamma irradiation and ethylene oxide and compared with unsterilised samples to evaluate the effect of the sterilisation process on material properties.

To investigate the effect of sterilisation, surface characterisation was carried out using scanning electron microscopy (SEM) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) to ensure that the expected structure was produced. Ion release test, microbiological tests and cell adhesion tests were performed to evaluate the antimicrobial capacity and biocompatibility of the samples. In addition, the different mechanical properties of titanium were analysed and studied to justify the choice of this material and the Honeycomb (HC) pattern.

The results showed some influence of the 3D printing technique, but it was the thermochemical treatments that had the biggest effect on the properties of the samples. Although some effect of the sterilisation method was observed, the main differences between sterilised and non-sterilised samples were related to the previous processes. It is suggested that the accuracy of 3D printing be improved, and SEM controls be carried out at different stages of the thermochemical treatments. This would help to determine the different properties and improve the quality of the bone grafts.

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutor José María Manero por darme la oportunidad de realizar este proyecto junto con el grupo de Biomateriales, Biomecánica e Ingeniería de Tejidos (BBT), por saberme guiar en todo momento y por su paciencia. También agradecer a mi cotutora Bàrbara Adrover por su ayuda, especialmente en campos más desconocidos como el análisis económico y medioambiental.

Mencionar a David Piñera por guiarme durante las primeras semanas en el laboratorio. Asimismo, personas como Alejandra Rodríguez y Patricia Armero por enseñarme el mundo de la microbiología y por prestar su ayuda siempre que la he necesitado, sin ellas hubiera sido un camino difícil y aburrido. También a Judit Buxadera y Miquel Punset, por su contribución y disponibilidad, así como a los distintos compañeros que han hecho que mi estancia en el laboratorio fuera inmejorable

Por último, agradecer el apoyo de familiares y amigos por darme ánimos y apoyarme en todo momento.

Glosario

β	Beta
μ	Micras
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
AENOR	Asociación Española de Normalización y Certificación
Ag	Plata
Ag^+	Ion plata
Ag_2CO_3	Carbonato de plata
Ag_2O	Óxido de plata (I)
$AgNO_3$	Nitrato de plata
AgO	Oxido de plata (II)
ASTM	Sociedad Estadounidense para Pruebas y Materiales
BBC	Cúbica centrada en el cuerpo
BHI	Infusión de cerebro y corazón
BSA	Albúmina sérica bovina
BSE	Electrones retrodispersados
$C_4H_6CaO_4$	Acetato de calcio
Ca	Calcio
Ca^{2+}	Ion calcio
$CaTiO_3$	Titanato de calcio
CO_2	Dióxido de carbono
Cu	Cobre
D.O.	Densidad óptica
DIW	Direct Ink Writing
E. coli	Escherichia coli
EBSD	Difracción de retrodispersión de electrones
EDS	Espectroscopía de rayos X de dispersión de energía
EN	Norma europea
FBS	Suero fetal bovino
g	Gramos

Gy	Gray
h	Horas
H_2O	Agua
H_3O^+	Hidronio
HC	Panel de abeja
HCP	Hexagonal compacta
HNO_3	Ácido nítrico
ICP – MS	Espectrómetro de Masas con Fuente de Plasma Acoplado Inductivamente
ICP-MS	Espectrometría de Masas con Fuente de Plasma Acoplado Inductivamente
IORFH	Injertos Óseos Reticulares Funcionalizados y Homologados
L	Litros
M	Molar
n	Nano
Na^+	Ion sodio
Na_2O	Óxido de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
O^{2-}	Ion oxigeno
ºC	Grados Celsius
OD	*Optical density*
OE, EO o C_2H_4O	Óxido etileno
Pa	Pascales
PBS	Tampón fosfato salino
PLA	Ácido poliláctico
ppb	Partes por billón
ppt	Partes por trillón
rpm	Revoluciones por minuto
S. Aureus	Staphylococcus aureus
SaOs-2	Células osteoblásticas
SEM	Microscópico electrónico de barrido
Ti	Titanio
Ti c.p	Titanio comercialmente puro
TiO_2	Dióxido de titanio

$tnCO_2$	Toneladas de dióxido de carbono
TRL	*Technology Readiness Level*
TSA	Agar soja y tripticaseína
TSB	Caldo soja tripticaseína
U	Unidades
UFC	Unidades formadoras de colonias
UNE	Asociación española de normalización
XPS	Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X
Zn	Zinc
α	Alfa

Lista de figuras

Figura 1. Ejemplos de biomateriales usados como sustitutos de órganos y tejidos en el cuerpo humano [5]. 21
Figura 2. Efecto del oxígeno en la resistencia y la elongación en el Ti c.p. [13]. 23
Figura 3. Comparación entre valores de módulo de Young (GPa) de distintas aleaciones para implantes y el hueso humano [4]. 24
Figura 4. Imágenes de ejemplos de aplicaciones del Ti en implantología: (a) prótesis de cadera, (b) tornillo dental, (c) prótesis de rodilla y (d) malla para cráneo [20], [21], [22], [23]. 26
Figura 5. Imagen de muestras con estructura porosa de tipo (a) lineal con porosidad inferior del 50%, (b) lineal con porosidad del 50% y (c) HC con porosidad del 50%. 27
Figura 6. Imágenes de la muestra de Ti c.p poroso con estructura HC. 33
Figura 7. Esquema de impresión 3D mediante la técnica DIW [47]. 34
Figura 8. Imagen del SEM del laboratorio de microscopia electrónica de la EEBE – UPC [51]. 36
Figura 9. Imagen del XPS del centro multiescala de la EEBE – UPC [53] . 36
Figura 10. Imagen del ICP-MS Agilent 7800ce [56]. 37
Figura 11. Imagen de cómo se realiza la inmersión. 39
Figura 12. Esquema del cambio estructural de la superficie de la probeta de Ti c.p de grado 2 sometido al tratamiento de inmersión de NaOH y posteriormente al tratamiento térmico [7]. 40
Figura 13. Autoclave RAYPA de mesa. 41
Figura 14. Cabinas de microbiología a) Haier HR900-IIA2 de clase II y b) Telstar PV-100 de clase I. 44
Figura 15. Esquema representativo de cómo se preparan las distintas soluciones. 46
Figura 16. Imagen de multiplaca para cultivo bacteriano. 46
Figura 17. Imágenes del ensayo de compresión: (a) Durante la realización del ensayo y (b) Final del ensayo. 49
Figura 18. Imágenes de la superficie de la muestra control 1 a: (a) 12.000 aumentos y (b) 3.000 aumentos. 50
Figura 19. Imágenes de la superficie de la muestra control 2 a: (a) 12000 aumentos y (b) 3000 aumentos. 50
Figura 20. Imágenes de la superficie de la muestra con tratamiento termoquímico y esterilizada con autoclave a: (a) 12000 aumentos y (b) 3000 aumentos. 51
Figura 21. Imágenes de la superficie de la muestra con tratamiento termoquímico y esterilizada con radiación gamma a: (a) 12000 aumentos y (b) 3000 aumentos. 51
Figura 22. Imágenes de la superficie de la muestra con tratamiento termoquímico y esterilizada con óxido de etileno a: (a) 12000 aumentos y (b) 3000 aumentos. 51
Figura 23. Espectro XPS de la muestra control 2 del: (a) O1s y (b) Ag3d [68], [69]. 54
Figura 24. Espectro XPS de la muestra autoclave del: (a) O1s y (b) Ag3d [68], [69]. 54
Figura 25. Espectro XPS de la muestra gamma del: (a) O1s y (b) Ag3d [68], [69]. 55
Figura 26. Espectro XPS de la muestra OE del: (a) O1s y (b) Ag3d [68], [69]. 55
Figura 27. Gráfico de la liberación de concentración de Ag^+ en ppm, para un periodo total de 15 días. 57
Figura 28. Gráfica mostrando el número de células viables (UFC/mL), en función del proceso de esterilización de la muestra de la cepa E. coli para: (a) Etapa de adhesión (1h incubación) (b) Etapa proliferación (3h incubación). 59

Figura 29. Gráfica comparativa de la etapa de adhesión (1h incubación) y proliferación (3h incubación), mostrando el número de células viables (UFC/mL) en función del proceso de esterilización de la muestra, de la cepa S. aureus. _____ *59*
Figura 30. Imagen SEM con bacteria E. Coli adherida a 5000 aumentos: (a) muestra control 2 y (b) muestra de control 1. _____ *60*
Figura 31. Imagen SEM con bacteria S. aureus adherida a 5000 aumentos: (a) muestra control 2 y (b) muestras de control 1. _____ *60*
Figura 32. Gráfico del número de células viables en función del tipo de muestra para un periodo total de 7 días. _____ *61*

Lista de tablas

Tabla 1. Características principales de diferentes biomateriales y sus aplicaciones [3]. 19
Tabla 2. Clasificación de biomateriales en función de su interacción con el tejido circundante. [4] 20
Tabla 3. Propiedades físicas del titanio policristalino α de alta pureza a 25 ºC [9]. 22
Tabla 4. Propiedades mecánicas del titanio comercialmente puro y sus aleaciones [12]. 23
Tabla 5. Clasificación de los métodos de esterilización y ejemplos [33]. 28
Tabla 6. Resumen de los parámetros del programa de impresión [7]. 35
Tabla 7. Etapas del tratamiento termoquímico desarrollado por la UPC [31]. 38
Tabla 8. Porcentajes en peso de las distintas muestras, obtenidos del análisis EDS. 52
Tabla 9. Porcentajes atómicos obtenidos mediante la técnica XPS. 55
Tabla 10. Características principales de los productos químicos empleados [77], [78]. 62
Tabla 11. Valores del consumo de energía de la maquinaria empleada. 64
Tabla 12. Coste de los productos químicos empleados. 69
Tabla 13. Coste de los distintos materiales empleados. 69
Tabla 14. Coste del uso de los distintos equipos empleados. 70
Tabla 15. Coste de las distintas normas consultadas durante el proyecto. 70
Tabla 16. Coste de las licencias y softwares empleados el proyecto. 71
Tabla 17. Coste del personal involucrado en los distintos ensayos y obtención de resultados. 71
Tabla 18. Coste total del proyecto. 71

Índice

RESUMEN I

RESUM II

ABSTRACT III

AGRADECIMIENTOS IV

GLOSARIO VI

LISTA DE FIGURAS IX

LISTA DE TABLAS XI

1. PREFACIO 17

1.1. Origen del trabajo 17

1.2. Motivación 18

2. INTRODUCCIÓN 19

2.1. Biomateriales 19

2.2. Titanio 21

2.2.1. Microestructura y propiedades 22

2.2.2. Propiedades mecánicas 23

2.2.3. Resistencia a la corrosión 25

2.2.4. Biomaterial 25

2.2.5. Aplicaciones 25

2.3. Injertos óseos 26

2.3.1. Biocompatibilidad 26

2.3.2. Osteointegración 26

2.3.3. Porosidad 27

2.3.4. Propiedades antimicrobianas: La Plata (Ag) 28

2.3.5. Esterilización 28

2.4. Fabricación aditiva 29

2.4.1. Características generales 29

2.4.2. Titanio en fabricación aditiva 30

2.5. Objetivo del trabajo 31

2.6. Alcance del trabajo 31

3. MATERIAL E INSTRUMENTACIÓN 33

3.1. Muestras de estudio 33
3.2. Obtención de las muestras: *Direct Ink Writing (DIW)* 33
3.2.1. Tinta empleada 34
3.2.2. Parámetros de impresión 34
3.2.3. Eliminación del aglutinado 35
3.2.4. Sinterización 35
3.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM) 35
3.4. Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) 36
3.5. Espectrometría de Masas con Fuente de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) 37

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL 38

4.1. Tratamientos termoquímicos alcalinos 38
4.1.1. Inmersión en NaOH 39
4.1.2. Inmersión en $C_4H_6CaO_4$ y $AgNO_3$ 40
4.1.3. Tratamiento térmico 40
4.1.4. Inmersión en H_2O 40
4.2. Esterilización 41
4.2.1. Autoclave 41
4.2.2. Radiación gamma 41
4.2.3. Óxido Etileno 42
4.3. Ensayo liberación de iones (ICP-MS) 42
4.3.1. Preparación previa material 43
4.3.2. Incubación de las muestras 43
4.3.3. Extracción muestras 43
4.3.4. Análisis final 44
4.4. Ensayo microbiológico 44
4.4.1. Preparación del pre – inóculo 45
4.4.2. Inóculo y siembra 45
4.4.3. Adhesión y proliferación bacteriana 46
4.4.4. Conteo bacteriano 47
4.4.5. Preparación de las muestras para la observación por SEM 47
4.5. Ensayo celular 47
4.5.1. Preparación previa: células 48
4.5.2. Adhesión y proliferación celular 48
4.6. Ensayo de compresión 48

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES ____ 50

5.1. Caracterización superficial 50

5.1.1. Análisis SEM – EDS 50

5.1.2. Análisis XPS 54

5.2. Liberación de iones (ICP) 56

5.3. Ensayo microbiológico 58

5.4. Ensayo adhesión celular 61

6. ANÁLISIS DEL IMPACTO AMBIENTAL ____ 62

6.1. Materiales 62

6.2. Consumo energético 63

6.3. Gestión de residuos 64

7. CONCLUSIONES ____ 66

8. PRESUPUESTO Y ANÁLISIS ECONÓMICO ____ 69

9. BIBLIOGRAFÍA ____ 74

ANEXO ____ 84

A1. Dimensiones muestras 84

A2. Programa Matlab porosidad 85

A3. Espectros EDX 86

A4. Resultados ensayo de compresión 88

1. Prefacio

A continuación, se explica el origen de este proyecto y la motivación que ha llevado a que se realizara.

1.1. Origen del trabajo

Este trabajo se enmarca en el proyecto *FIRe Bone,* cuyo objetivo principal es desarrollar equipos y métodos parala fabricación de Injertos Óseos Reticulares Funcionalizados y Homologados (IORFH), mediante la tecnología *Direct Ink Writing* (DIW). En este proyecto están involucradas varias empresas y grupos de investigación como la empresa AMES TECH (AT), AMES Medical (AM), Fundación Privada Centre CIM (CIM – UPC) y el grupo de investigación Biomateriales, Biomecánica e Ingeniería de Tejidos (BBT) de la Universidad Politécnica de Cataluña (UPC).

Para lograr el objetivo principal, el proyecto *FIRe Bone* está desglosado en cinco objetivos:

Objetivo 1: Diseño y fabricación de prótesis a medida con una estructura reticular óptima para los estados de carga soportados (AT; AM; BBT-UPC)

Objetivo 2: Automatización del proceso de impresión 3D asegurando trazabilidad y validación. Adecuación del equipo de impresión 3D para certificar su uso en la fabricación de productos sanitarios (AT; AM; CIM-UPC)

Objetivo 3: Optimización y validación del proceso de fabricación de prótesis con estructura reticular de Ti mediante DIW (AT; AM; CIM-UPC; BBT-UPC)

Objetivo 4: Optimización de un tratamiento termoquímico que permita dar un valor añadido (capacidades bioregenerativas y antibacterianas) a las prótesis con estructura reticular (AM; BBT-UPC)

Objetivo 5: Selección de un proceso de esterilización adaptado a la nueva tipología de injertos que serán producidos (AM; BBT-UPC).

Este proyecto de fin de grado se centra en el *Objetivo 5*. Se estudia el efecto de los diferentes procesos de esterilización comúnmente utilizados (autoclave, radiación gamma y óxido etileno) sobre unos injertos óseos reticulares de titanio, modificados con una capa bioactiva de titanato de calcio con iones plata. Este recubrimiento se desarrolla en paralelo con el *Objetivo 4*. Para logar esto, se emplea el tratamiento termoquímico desarrollado por T. Kokubo [1], modificado y optimizado por la UPC, con el fin de obtener las capacidades bioregenerativas y antibacterianas, realizando una etapa en la cual se

añade plata (Ag) y calcio (Ca) al injerto. Los distintos ensayos y el desarrollo del proyecto se realizan junto con el grupo BBT.

1.2. Motivación

El mundo de la biomedicina se encuentra en constante desarrollo para satisfacer las diversas necesidades médicas actuales. Prótesis, injertos, herramientas y cualquier material utilizado en medicina, requiere un exhaustivo estudio y una responsabilidad por parte de los ingenieros antes de poder ser empleados en seres humanos.

El uso de materiales avanzados en prótesis ha impulsado mejoras significativas en el ámbito de la biomedicina. Por ejemplo, la evolución de materiales para interfaces y encajes protésicos y ortopédicos ha resultado en propiedades mejoradas, como mayor resistencia a la flexión, reducción de la conductividad térmica y menor peso. Estos avances han desempeñado un papel crucial en la mejora de la funcionalidad, comodidad y calidad de vida en general. Este campo contribuye de manera sustancial a mejorar la vida de los seres vivos, especialmente la de las personas, siendo esta la principal motivación detrás de este proyecto.

Además, otro factor que ha contribuido ha sido la oportunidad de familiarizarse con el funcionamiento de un grupo de investigación y participar en una fase del proceso de desarrollo de un material, lo que me ha permitido adquirir nuevos conocimientos en el campo de la biomedicina. También ha sido beneficioso poder integrar y aplicar conocimientos tanto en materiales como en mecánica.

2. Introducción

En el diseño de injertos óseos, los distintos materiales y la comprensión de sus propiedades, es clave para poder llegar al objetivo principal que es lograr una buena osteointegración. A continuación, se definen los distintos conceptos más importantes para el desarrollo de este proyecto, así como los objetivos y el alcance de este.

2.1. Biomateriales

Durante siglos, las personas han estado usando dispositivos biomédicos para corregir, reemplazar o incluso restaurar estructuras biológicas dañadas. Para la obtención de estos dispositivos biomédicos se emplean biomateriales. Estos materiales deben de ser no tóxicos y tampoco pueden causar inflamación o reacción alérgica al cuerpo humano. Los principales factores que influencian la biocompatibilidad del material son, la respuesta del huésped frente al implante y la degradación de este una vez es implantado. Su origen puede ser metálico, polimérico, cerámico o composite, la selección de uno o de otro depende de muchos factores, pero principalmente de la necesidad del paciente. Por un lado, los metales como las aleaciones de titanio destacan por sus propiedades mecánicas, mientras que los polímeros, incluyendo las opciones biodegradables e hidrogeles, se exploran por su flexibilidad y potencial de liberación de fármacos. Por otro lado, las cerámicas avanzadas como la alúmina y los fosfatos de calcio destacan por su biocompatibilidad y su papel en la ingeniería de tejidos óseos. Sobre los composites, lo que más sobresale de estos es el gran auge en el que se encuentran actualmente. Estos ofrecen una gran variedad de beneficios por la combinación de distintos materiales logrando así, implantes capaces de soportar carga además de regenerar el tejido. En la siguiente Tabla 1, se pueden conocer y comparar mejor el papel de cada tipo de material en el campo de los biomateriales [2], [3].

Tabla 1. Características principales de diferentes biomateriales y sus aplicaciones [3].

Material	Ventajas	Desventajas	Aplicaciones
Polímeros	- Fácil producción - Densidad baja	- Baja resistencia mecánica - Fácil degradación	Suturas, arterias y venas, tendones artificiales, implantes
Metales	- Menor biocompatibilidad - Dúctiles - Alta resistencia al desgaste e impactos	- Menor resistencia a la corrosión en ambientes fisiológicos - Propiedades mecánicas distintas a los tejidos biológicos	Grapas, placas y alambres, prótesis articular, implantes dentales, placas craneales
Cerámicos	- Alta biocompatibilidad - Resistencia a la corrosión - Baja conductividad térmica y eléctrica	- Baja resistencia al impacto - Propiedades difíciles de reproducir - Dificultad de procesamiento y manufactura	Recubrimientos, equipamiento médico, herramientas para relleno óseo

Composites	- Alta biocompatibilidad - Resistente a la corrosión - Inertes	- Replicación inconsistente y difícil	Válvulas cardíacas, implantes, articulaciones artificiales

Un momento clave de los biomateriales, es cuando los implantes son expuestos a los tejidos y fluidos del interior del cuerpo humano. Una vez el material es implantado en el cuerpo humano, varias reacciones dan lugar entre el portador del implante y este, y dictan la aceptabilidad de estos materiales en el sistema. Cuando se emplea un implante no adecuado, aparecen problemáticas que pueden atentar contra la salud del paciente. Estas problemáticas son la trombosis, que implica la coagulación de la sangre y la adhesión de las plaquetas a la superficie del biomaterial, y la encapsulación de tejido fibroso de los biomateriales que se implantan en tejidos blandos [4]. En la siguiente Tabla 2 se muestra la clasificación de biomateriales, en función de su interacción con el cuerpo humano.

Tabla 2. Clasificación de biomateriales en función de su interacción con el tejido circundante. [4]

Clasificación	Respuesta	Ejemplos	Efectos
Materiales biotolerantes	Formación de cápsulas finas de tejido conectivo (0,1 a 10 µm) y la cápsula no se adhiere a la superficie del implante.	PTFE, PMMA, Ti, Co-Cr, etc.	Rechazo del implante que conduce al fracaso del implante.
Materiales bioactivos	Formación de tejido óseo alrededor del material del implante y que se integra fuertemente con la superficie del implante.	Biovidrio, fosfato de calcio sintético que incluye hidroxiapatita (HAP)	Aceptación del implante que conduce al éxito de la implantación.
Material bioreabsorbible	Reemplazado por el tejido obtenido del mismo individuo.	Ácido poliláctico y polímeros poliglicólicos e injertos óseos procesados, compuestos de todos los extractos de tejido o proteínas y andamios.	Aceptación del implante que conduce al éxito de la implantación.

En las tablas anteriores, se observa como cada biomaterial tiene una función y aplicación distinta. En la Figura 1, se ven varios ejemplos de estos materiales según la zona del cuerpo humano.

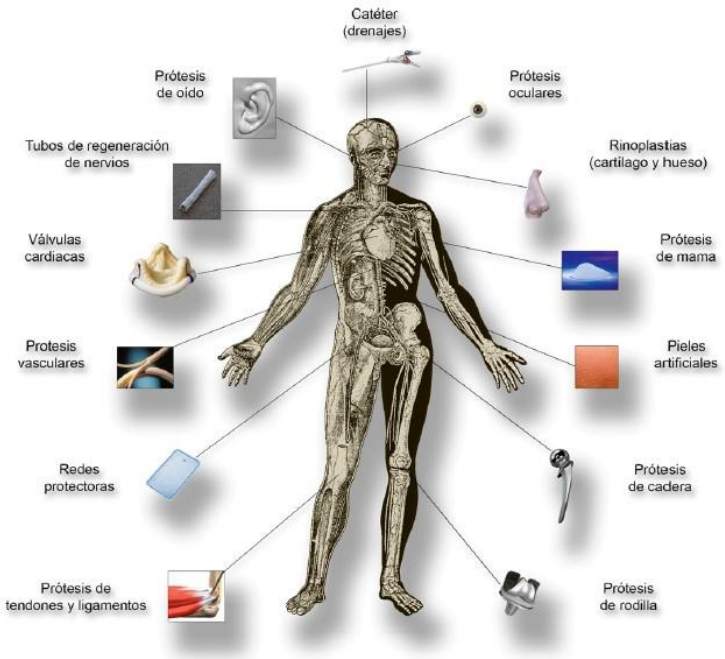


Figura 1. Ejemplos de biomateriales usados como sustitutos de órganos y tejidos en el cuerpo humano [5].

Esta gran variedad de opciones en biomateriales, no solo han mejorado la calidad de vida, sino que también han ampliado los horizontes de los profesionales en el mundo de la medicina. Actualmente, es posible ofrecer una gama más amplia de opciones de tratamiento y técnicas quirúrgicas, sin embargo, la búsqueda continua de investigación y desarrollo es crucial para poder seguir mejorando. Estos avances que se buscan lograr en biomateriales son esenciales para optimizar aún más sus propiedades, reducir costes y minimizar riesgos y complicaciones. Además, las capacidades personalizadas regenerativas de estos materiales presentan un gran potencial para el futuro de la medicina ya que prometen mejores resultados, tiempos de recuperación reducidos y mayor satisfacción del paciente. En este campo dinámico, la colaboración interdisciplinaria entre científicos, ingenieros y profesionales de la salud desempeña un papel fundamental a la hora de implementar los distintos progresos y convertirlos en aplicaciones clínicas transformadoras, beneficiando a la sociedad [3].

2.2. Titanio

El Titanio (Ti) es un material ampliamente usado en la actualidad y abarca industrias de todo tipo como la aeroespacial, marina y biomédica, entre otras. Sus propiedades principales son la alta resistencia específica (densidad 4,5 g/cm^3) [7], tenacidad y buena biocompatibilidad, tiene una gran capacidad para unirse al hueso y otros tejidos, también el hecho de ser muy ligero y altamente resistente a la corrosión en distintos medios. Por otro lado, presenta una rigidez o módulo elástico, bastante superior

al hueso humano [6], [7]. Esta última propiedad, hace que se pueda dar un fenómeno llamado apantallamiento de cargas, el cual provoca que las distintas prótesis, una vez adheridas al cuerpo humano, soporten todos los esfuerzos que es sometido este al largo de su vida, favoreciendo la disminución de densidad ósea [8]. Por este principal motivo, existe el interés en desarrollar materiales metálicos porosos y con distintas geometrías para implantes.

En este proyecto, se trabaja con muestras de titanio comercialmente puro (Ti c.p) de grado 2, aunque existen otros como el grado I, III y IV de acuerdo con la *American Society for Testing and Materials* (ASTM). No obstante, aunque en la práctica se hable de titanio puro, impurezas, tales como oxígeno, hidrógeno o nitrógeno, a concentraciones muy bajas, siempre lo acompañan. Estas impurezas, según sus cantidades, son las que determinan el grado de pureza [7], [8]. A continuación, se exponen las características y propiedades más interesantes del Ti para aplicaciones biomédicas.

2.2.1. Microestructura y propiedades

El metal Ti es alotrópico y presenta distinta estructura cristalina estable según la temperatura a la que se encuentra. A bajas temperaturas es hexagonal compacta (HCP – α) mientras que a temperaturas superiores a 885 ºC presenta una estructura cúbica centrada en el cuerpo (BBC – β). Las aleaciones de Ti se pueden clasificar según su estructura como aleaciones de fase alfa (α), alfa más beta (α + β) y beta (β). De estas tres aleaciones, las aleaciones de titanio de fase alfa (α) corresponden a las de Ti c.p. y tienen una resistencia relativamente débil, pero ofrecen una combinación de buena resistencia a la corrosión, buena soldabilidad, resistencia a la fluencia, receptividad al tratamiento térmico junto con facilidad de procesamiento y fabricación [9], [10].

Tabla 3. Propiedades físicas del titanio policristalino α de alta pureza a 25 ºC [9].

Coeficiente expansión térmica	8,36 [$10^{-6}K^{-1}$]
Conductividad térmica	14,99 [W/mK]
Capacidad calorífica específica	523 [J/kgK]
Resistencia eléctrica	564,9 [$10^{-9}\Omega m$]
Módulo de cizalla	44 GPa
Coeficiente de Poisson	0,33

Por otro lado, las aleaciones de alfa más beta (α + β), ofrecen una combinación de excelente ductilidad y resistencia cuando se tratan térmicamente adecuadamente, lo que las hace más fuertes comparadas con las de fase alfa (α). Sobre las aleaciones β, su estructura BBC tiene menos limitaciones que la HCP por lo que tiene una mayor ductilidad que las aleaciones α. En general, un control óptimo de la microestructura es esencial para lograr la mejor combinación de propiedades mecánicas asociadas a una aplicación determinada [10], [9].

2.2.2. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas son aquellas propiedades que describen como se comporta un material cuando este es sometido a distintas fuerzas. Propiedades como la dureza, la resistencia a compresión y/o tracción, el módulo elástico y la elongación son importantes para seleccionar el tipo de material de un implante. Para una prótesis, interesa que estas propiedades sean lo más parecidas al hueso humano para que se asegure una buena adherencia entre implante-hueso, por lo que se busca un valor de módulo elástico similar al del hueso (10-30 GPa) [4], una resistencia a la fatiga y una capacidad de alargamiento adecuadas. Aunque existan varios materiales capaces de cumplir con los requisitos, se escoge el Ti ya que presenta una buena combinación de características como la alta resistencia, baja densidad (alta resistencia especifica) y módulo de Young relativamente bajo [11], [9], [4]. En la Tabla 4 se pueden ver valores de distintas propiedades mecánicas del Ti c.p. y sus aleaciones [12].

Tabla 4. Propiedades mecánicas del titanio comercialmente puro y sus aleaciones [12].

Material	Módulo elástico [GPa]	Límite elástico [MPa]	Elongación [%]	Tipo de aleación
Ti c.p. grado I	102	170	24	α
Ti c.p. grado II	102	275	20	α
Ti c.p. grado III	102	380	18	α
Ti c.p. grado IV	104	483	15	α
Ti-6Al-4V-ELI	113	795	10	α+β
Ti-6Al-4V	113	860	10	α+β
Ti-6Al-4V-7Nb	114	880-950	8-15	α+β
Ti-5Al-2.5Fe	112	895	15	α+β
Ti-15Zr-4Nb-2Ta-0.2Pd	94-99	693-806	18-28	α+β
Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr	80	864	13.2	β

Los diversos grados de Ti c.p. se distinguen principalmente por su contenido de oxígeno, ya que otros elementos como el carbono y el hierro se consideran impurezas que se incorporan a la aleación durante el proceso de fabricación. Como elemento de aleación intersticial, el oxígeno aumenta considerablemente la resistencia del material, pero al mismo tiempo reduce su ductilidad, que se mide mediante la elongación, que indica la capacidad del material para deformarse plásticamente sin fracturarse [9]. Por otro lado, es posible modificar las propiedades mecánicas del titanio modificando la aleación [13].

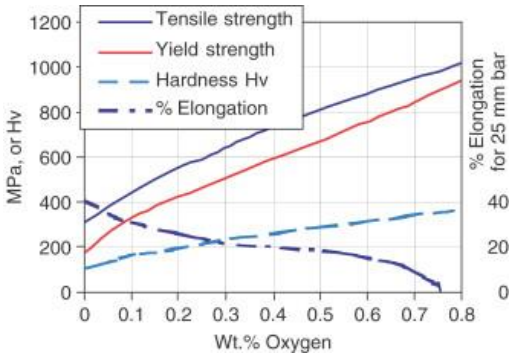


Figura 2. Efecto del oxígeno en la resistencia y la elongación en el Ti c.p. [13].

Acerca del módulo elástico que presenta el Ti c.p, este es de aproximadamente 100 GPa, aunque sus aleaciones pueden ir desde 110 a 55 GPa. Estos valores comparados con otros metales como el acero inoxidable 316L (210 GPa) o aleaciones de cromo cobalto (240 GPa), es el más bajo y el que se asemeja más al del hueso cortical, que tiene un valor de entre 7 y 30 GPa como se puede ver en la Figura 3 [4].

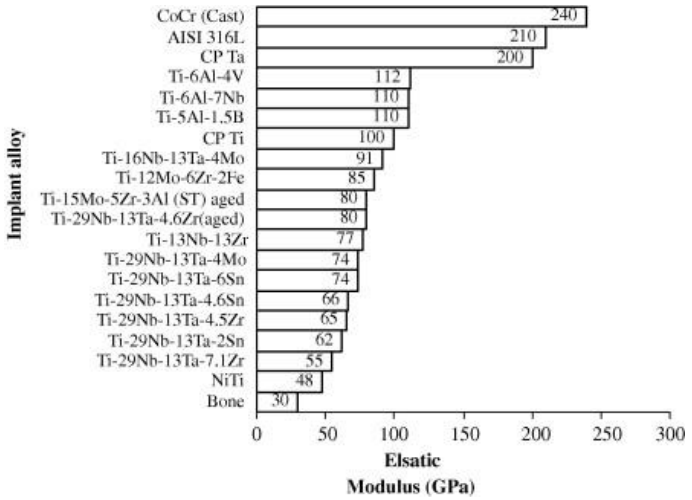


Figura 3. Comparación entre valores de módulo de Young (GPa) de distintas aleaciones para implantes y el hueso humano [4].

Sin embargo, aunque el módulo de Young del Ti c.p esté más cerca del valor del hueso humano, este sigue siendo bastante más elevado. Es por ello por lo que, con el fin de mejorar la unión hueso-implante y su durabilidad, se fabrican estructuras porosas, tanto a nivel macroscópico como microscópico, para así compensar el apantallamiento de cargas que se puede dar, debido a la diferencia de valores de módulo elástico. W. Xue y colaboradores [14] fabricaron estructuras porosas de Ti entre un 17% y 58% de porosidad con poros de unas 800 μm, y demostraron una disminución del valor del módulo elástico considerable obteniendo valores de entre 2,4 a 44 GPa. Sin embargo, existe un límite para la porosidad y el tamaño de poro como consecuencia de la restricción asociada a las propiedades mecánicas. La consecuencia principal es la reducción de la resistencia mecánica. Factores como la forma y la distribución de macroporos correspondientes a la densidad de llenado, pueden provocar una degradación de la resistencia mecánica debido a los defectos estructurales y a la concentración de tensiones alrededor de los poros. Esto puede llegar a ser crítico en la regeneración de huesos sometidos a cargas importantes, además de comprometer la integridad estructural de la estructura porosa [7], [15]. Aun así, V. Karageorgiou y D. Kaplan [16] demostraron que una porosidad alta y un tamaño de poro grande mejoran el crecimiento óseo y la osteointegración del material. Concluyeron que la regeneración ósea in vivo en biomaterial poroso supone el reclutamiento y la penetración de células desde el tejido óseo circundante y así como la vascularización. Adicionalmente, el uso del patrón de porosidad del tipo panel de abeja (*Honeycomb* – HC) pueden mejorar estas propiedades mecánicas aportando integridad estructural y resistencia al impacto [16].

2.2.3. Resistencia a la corrosión

La resistencia a la corrosión es una propiedad crítica en el ámbito de los biomateriales, especialmente en el caso de los implantes metálicos. La corrosión es la descomposición de un material en los átomos que lo forman, como resultado de reacciones químicas entre el material y sus alrededores [17]. La presencia de fluidos presentes en el cuerpo humano permite a los implantes metálicos la liberación de iones metálicos que se pueden acumular en el tejido nervioso, o ser transportado a otras partes del cuerpo provocando incompatibilidad debido a alergias o reacciones tóxicas [17], [4].

El Ti y sus aleaciones presentan una alta resistencia a la corrosión a los distintos fluidos del cuerpo humano comparando con otros biomateriales metálicos. Esta gran resistencia se debe a que estos forman una estable y protectora capa de óxido (TiO_2) debido a su alta afinidad por el oxígeno, protegiendo así de la corrosión. Esta capa de TiO_2 presenta un grosor de unos 4 a 10 nm y se forma rápidamente, proporcionándole al Ti la resistencia a ataques químicos sin comprometer sus propiedades mecánicas. Por otro lado, facilita que se puedan adherir biomoléculas logrando así su unión con tejidos del cuerpo humano y proporcionando una gran biocompatibilidad. Adicionalmente, los procesos de modificación superficial, como puede ser el aumento de porosidad, pueden fomentar la formación de una capa de óxido pasiva estable, procesamiento de haces de iones y texturizado de superficies consiguiendo así una mejorar la resistencia a la corrosión [4], [18].

2.2.4. Biomaterial

En el campo de la biomedicina, el titanio tiene un papel muy importante, debido en parte a sus propiedades mecánicas, bioquímicas y de biocompatibilidad, las cuales lo convierte en uno de los materiales que más se emplea actualmente en ortopedia e implantología, entre otros [19]. El mecanismo por el cual el Ti y sus aleaciones presentan una gran biocompatibilidad es debido a la oxidación de este. En ambientes oxidativos, se forma una capa pasiva, delgada y adhesiva, de TiO_2 que se forma espontáneamente en su superficie protegiendo al Ti. También, otra propiedad clave seria su resistencia a la corrosión lo que lo hace inerte a todos los fluidos y tejidos del cuerpo humano, además de su baja conductividad eléctrica. Por último, gracias a todas estas propiedades, los implantes del Ti son prácticamente inmunes al rechazo del cuerpo humano y tienen una alta tasa de unión física con los tejidos y los huesos del huésped [2].

2.2.5. Aplicaciones

Viendo las distintas propiedades y características que tiene el Ti, presenta una gran variedad de aplicaciones en muchos sectores, aunque haciendo hincapié en el médico, se encuentran entre las más destacadas herramientas quirúrgicas, suturas e injertos óseos. En la Figura 4 aparecen varios ejemplos.

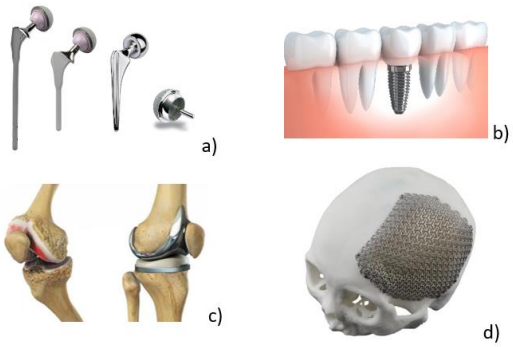


Figura 4. Imágenes de ejemplos de aplicaciones del Ti en implantología: (a) prótesis de cadera, (b) tornillo dental, (c) prótesis de rodilla y (d) malla para cráneo [20], [21], [22], [23].

Además, una propiedad muy interesante, especialmente cuando se habla de implantes, es que no es un metal ferromagnético por lo que los pacientes con implantes de Ti pueden ser examinados de forma segura mediante imágenes por resonancia magnética [24].

2.3. Injertos óseos

A continuación, se definen los distintos conceptos necesarios para realizar este estudio acerca de injertos óseos.

2.3.1. Biocompatibilidad

De cara a los injertos óseos, es muy importante que los materiales que se emplean para estos sean biocompatibles, es por ello por lo que se define el concepto de biocompatibilidad. Una manera de definir este concepto es diciendo que se trata de la evaluación de cómo los materiales terapéuticos no farmacológicos (implantados, inhalados o en contacto con la superficie) interactúan con el cuerpo humano [25]. Muchos factores determinan la biocompatibilidad de un material incluidos, entre otros, la forma, porosidad superficial, esterilización y uso.

2.3.2. Osteointegración

El objetivo principal de un injerto óseo es lograr una buena osteointegración. Esta se define como "La formación de interfase directa entre un implante y un hueso, sin la intervención de un tejido blando" [26]. Para conseguir dicho objetivo, hace falta realizar un estudio exhaustivo de los distintos materiales y del diseño de los injertos. Por otro lado, un implante osteointegrado, es un tipo de implante el cual se define como un "implante endóseo que contiene poros hacia los cuales pueden migrar los osteoblastos y el tejido conectivo de soporte" [27]. Significa que el hueso debe crecer hasta la superficie del implante sin que exista una capa de tejido blando. Dicho de otra manera, ninguna cicatriz,

cartílago o fibras del ligamento pueden estar presentes entre el hueso y el implante, la cual cosa es posible comprobar microscópicamente [28].

2.3.3. Porosidad

La porosidad (microporosidad), en estructuras metálicas se refiere a la presencia de espacios vacíos o poros dentro del material. Esta característica es importante porque influye mucho en las propiedades mecánicas del injerto óseo. Los materiales porosos para injertos óseos son ideales debido a que su rigidez es menor que la de los materiales densos y ayuda a compensar el apantallamiento de cargas, problemática comentada anteriormente en el apartado 2.2.2. Una estructura porosa y una superficie rugosa facilita la osteointegración, aportando mayor superficie de fijación y una mejor transmisión de esfuerzos entre el implante y el hueso, favoreciendo la unión entre ambos [7], [27].

A parte de la porosidad propia dentro del material, también se tiene la porosidad de la estructura llamada macroporosidad o densidad de llenado. Una estructura de poro que se emplea es la de *Honeycomb* (HC) o panel de abeja en español. Son materiales con excelentes propiedades mecánicas, ya que proporciona una alta relación entre resistencia y peso y otras propiedades únicas. Este tipo de estructura puede suponer un ahorro de material, manteniendo la integridad estructural y su resistencia. La estructura HC no solo busca un determinado comportamiento mecánico como la resistencia a la compresión, el pandeo y la fatiga, sino también ofrecer otras presentaciones como térmicas y acústicas [16], [29].

Numerosas investigaciones [16], [29], [30] buscan explotar aún más sus propiedades. En particular, a partir de un estudio sobre la resistencia al impacto [29], se confirmó que las estructuras de este tipo son una muy buena opción para absorber energía. Esta propiedad puede afectar considerablemente con la durabilidad de un implante aumentándola. También un estudio donde se compara distintos tipos de macroporosidad [7], se obtiene que la estructura HC presenta una mayor resistencia a la compresión sin comprometer el módulo elástico frente a una estructura lineal. En la Figura 5 se muestran muestras con macroporosidad lineal (a y b) y HC (c).

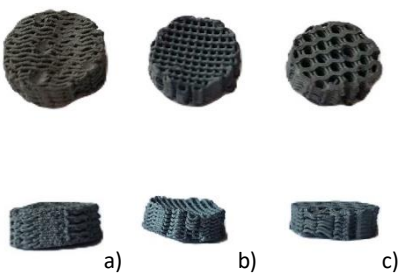


Figura 5. Imagen de muestras con estructura porosa de tipo (a) lineal con porosidad inferior del 50%, (b) lineal con porosidad del 50% y (c) HC con porosidad del 50%.

Las estructuras porosas, tanto del tipo HC como la lineal, tienen una amplia gama de aplicaciones, desde implantes médicos hasta componentes industriales. Además, con la aplicación de este tipo de estructuras en la fabricación aditiva, se da lugar a la creación rápida de prototipos proporcionando a diseñadores y fabricantes, la capacidad de modificar y fabricar ahorrando tiempo, material y por ende dinero [30].

2.3.4. Propiedades antimicrobianas: La Plata (Ag)

Una cualidad importante de un implante es que sea antimicrobiano, logrando así que no se adhieran bacterias o bien, que las que se adhieran, acaben muriendo. La plata (Ag), es un material reconocido por sus buenas propiedades antibacterianas y antivíricas, como otros iones metálicos como el cobre (Cu) y el zinc (Zn), y es por ello por lo que se lleva usando desde hace siglos. Estas propiedades se deben a la alta afinidad que tiene la plata con el grupo sulfhidrilo, presente en enzimas y proteínas, que fomenta la formación de especies reactivas de oxígeno. Consecuentemente, perturba el sistema de regulación de estas mismas especies de la bacteria, por lo que la esta sufre un alto estrés oxidativo que la conduce a la inactividad celular [31]. Aunque la Ag presenta una actividad antibacteriana, también se debe tener en cuenta sus posibles efectos adversos. D. Piñera y colaboradores [32], documentan que el ion Ag^+ es capaz de cruzar la membrana citoplasmática, penetrar en el núcleo e interaccionar directamente con el ADN de las células. Esto hace que el ion induzca daño oxidativo y altere puntos de control en el ciclo celular, además de imposibilitar una buena osteointegración. Sin embargo, esta toxicidad está relacionada con factores que se pueden ajustar, entre ellos la dosis, la concentración y el tiempo de exposición del ion Ag^+ y también la velocidad de liberación una vez incorporada en la superficie del implante, en este caso, de Ti.

2.3.5. Esterilización

La esterilización es el proceso de eliminación o destrucción de todos los microorganismos, incluyendo bacterias, hongos, virus y esporas, de un objeto o superficie [33] y debe cumplir los requisitos que se estipulan en la norma europea UNE-EN 556-1:2002/AC:2007 [34]. Existen varios métodos de esterilización, pero los dos grupos principales y en los que se centra este proyecto son los siguientes:

Tabla 5. Clasificación de los métodos de esterilización y ejemplos [33].

Métodos de esterilización	
Físicos	**Químicos**
Impiden el paso de microorganismos, incluyendo virus. No involucran sustancias letales para los microorganismos.	Involucran sustancias letales para los microorganismos.
Ejemplos	
Calor húmedo (autoclave), radiación, incineración.	Alcoholes, óxido de etileno, aldehídos.

El proceso de esterilizar es importante porque es fundamental para garantizar la seguridad de las personas, ya sean pacientes o personal, así como para obtener resultados precisos en experimentos y análisis.

2.4. Fabricación aditiva

A continuación, se explican aspectos generales acerca de la fabricación aditiva, y el uso del titanio en este campo.

2.4.1. Características generales

Des de finales de los años ochenta, la fabricación aditiva ha sido investigada y desarrollada comercialmente. Esta tecnología permite la fabricación de formas libres de piezas geométricamente complejas de manera sencilla. Habitualmente, se define como un método de producción digitalizada que consiste en fabricar objetos previamente modelados digitalmente, mediante la deposición de capa por capa de material, hasta conformar un objeto tridimensional (3D). Estos procesos pueden acortar significativamente el tiempo de entrega y acostumbran a ser más rentables, especialmente para piezas individuales, personalizadas y lotes pequeños, que no otros procesos como por ejemplo moldeo por fundición [35], [36], [37].

La fabricación aditiva, ofrece ventajas como que se puede fabricar directamente, esto permite eliminar pasos en el proceso de fabricación, por ejemplo, de moldes reduciendo tiempos y costes de producción. También es capaz de fabricar objectos de una sola pieza, incluyendo estructuras complejas, lo que supone una reducción del número de partes necesarias para producir un objeto y, por ende, una reducción de costes. Además, contrario a las técnicas de producción de mecanizado, se emplea solo el volumen de material que conforma el objeto reduciendo drásticamente el consumo energético y el impacto medioambiental de su producción [36]. Aunque tenga muchos puntos fuertes, esta tecnología aún se encuentra en desarrollo, por lo que también existen ciertos aspectos que se deben mejorar como el tamaño de los productos, ya que según qué tipo de material o técnica que se emplee no es posible obtener piezas de gran tamaño, especialmente en metales. También el coste de la maquinaria y de las materias primas, ya que no es lo mismo, por ejemplo, una máquina que trabaje con polímeros, que son relativamente económicas, a las que trabajan con metales que estas ya son de un coste más elevado. Adicionalmente, el acabado superficial, está comprometido por la velocidad de fabricación y puede presentar una menor calidad en función de esta y, por último, la calidad general del producto relacionado con la repetitividad del proceso con la cual no se puede asegurar dimensiones exactas [38], [39].

Los materiales metálicos, se pueden producir mediante procesos de forma "indirecta", en la que se utiliza un aglutinante para unir partículas metálicas que forman una pieza 3D y requiere de un postprocesamiento, o bien de forma "directa", en la que las partículas de metal se funden completamente para fabricar el producto final [37]. Algunos ejemplos de manufactura aditiva con metal que son empleados en la industria son *Selective Laser Sintering* (SLS), *Selective Laser Melting* (SLM)*, Material Extrusion* (MEX) *y Direct Ink Writing* (DIW).

Durante los últimos veinte años, se han desarrollado nuevos procesos de fabricación aditiva aplicados en campos como el aeroespacial, automotriz y biomédico, entre otros. La propia industria ha impulsado y cambiado técnicas desde la fabricación de prototipos hasta el uso de herramientas y rápida fabricación [37]. Actualmente, esta tecnología se emplea tanto para la fabricación de productos finales como para la fabricación de muestras, más enfocada para ensayos en el mundo de investigación y desarrollo, y se pretende lograr grandes avances y ampliar los campos en los que se usa.

2.4.2. Titanio en fabricación aditiva

Entre los distintos materiales metálicos habitualmente empleados en implantes ortopédicos (acero inoxidable, aleaciones de cobalto y aleaciones de titanio), el titanio y sus aleaciones presentan la mejor relación resistencia-peso y las propiedades mecánicas más adecuadas [40]. Sin embargo, todavía es necesario reducir la rigidez de los implantes y mejorar su fijación biológica para así evitar el fenómeno de apantallamiento de cargas, comentado en el apartado 2.2.2.

Con el fin de mejorar esta problemática, la fabricación de titanio poroso es una alternativa excepcional para la substitución de injertos óseos, gracias a su estructura porosa capaz de imitar al hueso humano [41]. Existen diferentes técnicas, convencionalmente se empleaban procesos de pulvimetalurgia sin embargo, no permitían un control total de la forma, el tamaño y ubicación de los poros, y su interconectividad. Debido a esto, se empezó a estudiar y emplear técnicas de fabricación aditiva como *Electron Beam Melting* (EBM), *Selective Laser Melting* (SLM) y *Direct Ink Writing* (DIW). Estas, técnicas han resultado ser una alternativa en la producción de implantes de titanio poroso, dando la posibilidad de obtener arquitecturas controladas y personalizadas [40].

Concretamente la técnica DIW, fue introducida por J.A. Lewis [42] como un nuevo enfoque de fabricación aditiva que permite la fabricación de piezas metálicas con geometrías complejas y buena resolución. Esta técnica, explicada con mayor detalle en el apartado 3.2, evita problemas derivados de las altas temperaturas localizadas, que se pueden dar en otras tecnologías de impresión 3D en metales [41]. Posteriormente, A.E. Jakus [43], demostró que la técnica DIW es adecuada para fabricar piezas en verde de muchos metales diferentes. Años después, H. Elsayed [44] empleó DIW para imprimir andamios de titanio con puntales de distintos diámetros, produciendo implantes con propiedades biológicas relevantes. Por último, más recientemente N. Valentin y colaboradores [45], demostraron

que algunas estructuras 3D complejas como tubos inclinados o el uso del patrón HC, fueron capaces de imprimirse/fabricarse mediante DIW con éxito, gracias a la gran capacidad de autosoporte de la tinta de aleación de titanio (Ti64).

2.5. Objetivo del trabajo

El objetivo general y principal del proyecto FIREBONE (UPC-AMES), es desarrollar una documentación específica con las instrucciones del proceso de fabricación de un recubrimiento bioactivo y antibacteriano desarrollado en la UPC, además de un protocolo de esterilización. Mediante la realización de este proyecto, se espera aumentar la escala de Madurez Tecnológica o *Technology Readiness Level* (TRL) en inglés, de la tecnología del *Direct Ink Writing* (DIW) y así estar un paso más cerca de la producción real de implantes óseos. El objetivo, específico de este proyecto, es ver qué efecto tienen los procesos de esterilización actuales (autoclave, radiación gamma y óxido etileno) sobre el injerto óseo. Específicamente, en las propiedades fisicoquímicas y biológicas (in vitro) y ver si realmente se puede añadir la etapa de esterilización en el proceso de fabricación en la industria AMES Medical (Sant Vicenç dels Horts, Barcelona). Este es un aspecto importante a nivel industrial debido a que la esterilización representa una inversión de dinero y tiempo. Actualmente, los métodos de esterilización son necesarios externalizaros, como Aragogamma (Aragogamma S.L., Les Franqueses del Vallés, Barcelona), con el consecuente retraso en la producción y gasto económico, por ello se estudia la adición de esta etapa en el proceso de fabricación dentro la empresa, con la finalidad de evitar los distintos inconvenientes.

2.6. Alcance del trabajo

Para poder lograr los distintos objetivos se han planteado las siguientes tareas específicas:

Tarea 1.- Fabricación de muestras porosas de titanio

Fabricar diferentes estructuras porosas de titanio de acuerdo con los procedimientos de fabricación desarrollados en el *Objetivo 1 (FIREBONE): "Diseño y fabricación de prótesis a medida con una estructura reticular óptima para los estados de carga soportados".* El proceso de fabricación se basará en los resultados obtenidos previamente en la tesis doctoral industrial de Diego Torres [7], dirigida juntamente con la empresa AMES y la UPC.

Tarea 2.- Desarrollo y trazabilidad del tratamiento termoquímico para la funcionalización de las estructuras de titanio 3D

Justificar mediante ensayos o bibliografía cada una de las etapas que constituye el tratamiento termoquímico (ataque alcalino, incorporación de iones metálicos (Ag^+), tratamiento térmico, y tratamiento final en agua). Asegurar la repetitividad del proceso y establecer los controles de verificación (si son posibles o necesarios) en cada una de las etapas. La repetitividad del proceso se evaluará a nivel microestructural (SEM), fisicoquímico (XPS, RAMAN, ICP-MS) y biológico (cultivos in vitro celulares y bacterianos) sobre diferentes muestras.

Tarea 3.- Efecto del proceso de esterilización

Evaluación comparativa del proceso de esterilización de autoclavado que tiene la empresa AMES Medical, comparándolo con otros procesos convencionales como el óxido de etileno (OE o EtO en inglés) o radiación gamma. Comprobar si los diferentes procesos de esterilización pueden afectar a las propiedades biológicas *in vitro* (antibacterianas y celulares) y fisicoquímicas del injerto óseo reticular. Para ello se proponen las siguientes tareas:

Tarea 3.1.- Caracterización topográfica mediante microscopia electrónica de barrido (SEM)

Tarea 3.2.-Caracterización química cualitativa y cuantitativa mediante espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDS) y la técnica de espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS).

Tarea 3.3.-Estudio de la liberación de iones Ag^+ mediante espectrometría de masas de plasma (ICP-MS)

Tarea 3.4.-Estudio de adhesión y proliferación celular “in vitro” mediante la línea celular osteoblásticas SaOS-2.

Tarea 3.5.-Estudio de adhesión bacteriana (1 y 3h) de dos cepas bacterianas (*Escherichia Coli* y *Staphylococcus aureus*)

En función de los resultados obtenidos, el grado de esterilidad alcanzado por el proceso de esterilización seleccionado se comprobará en un organismo certificado según la norma internacional UNE-EN ISO 11737-1:2018. Este ensayo no es objetivo del proyecto fin de grado actual.

3. Material e instrumentación

3.1. Muestras de estudio

Las muestras estudiadas es este proyecto son discos porosos de Ti c.p. de grado 2, con unas dimensiones de 10,18 ± 0,46 mm de diámetro y 3,56 ± 0,08 mm de grosor. Presentan una estructura capa por capa con patrón HC, y son fabricadas mediante impresión 3D con la técnica *Direct Ink Writing* (DIW). Las probetas son fabricadas por la empresa AMES Medical (AMES SA, Sant Vicenç dels Horts, España).

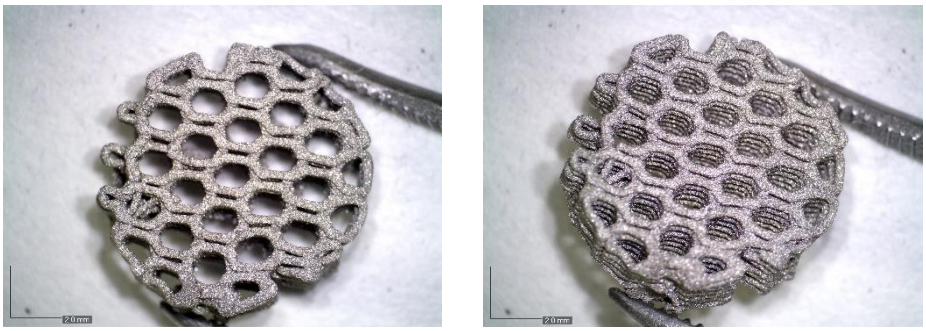


Figura 6. Imágenes de la muestra de Ti c.p poroso con estructura HC.

Las probetas presentan macroporosidad (densidad de llenado) y microporosidad. Se utiliza un programa de *Matlab* para conocer el valor real de la densidad de llenado con el cual se obtiene el valor de 70,94 ± 4,64 % real de macroporosidad. Este programa consiste en convertir una fotografía en blanco y negro y contar los pixeles negros (muestra) y blancos (fondo) y, comparando con los pixeles totales, ver su macroporosidad, en el apartado A2 del anexo se detalla el programa. Por último, a partir de estudios realizados previamente [7], [31] que emplean probetas iguales y/o parecidas, se conoce que el tamaño de los macroporos HC es de 347 ± 1 μm, mientras que los microporos, relacionados con la composición de la tinta empleada en la impresión, miden 8.6 ± 0.2 μm.

3.2. Obtención de las muestras: *Direct Ink Writing (DIW)*

Para la obtención de las muestras, se emplea la técnica llamada *Direct Ink Writing*. Esta es una técnica de fabricación aditiva, versátil y de bajo coste de impresión 3D comparada con otras técnicas de impresión de metales. Con esta tecnología se puede utilizar distintos materiales como cerámicos y metálicos. Además, permite la impresión directa de materiales, lo que puede reducir pasos de fabricación adicionales, ahorrando así tiempo y costes [39].

Acerca del proceso, las piezas son manufacturadas mediante la extrusión de una pasta o "tinta" (*ink*) a través de una boquilla, la cual posibilita la impresión de partes con filamentos suspendidos y sin soporte. Una cosa importante que se debe tener en cuenta es el control de las propiedades reológicas de la tinta. Para poder asegurar el éxito, es necesario tener un buen control del proceso de impresión para evitar la deformación de los filamentos tras la extrusión [46].

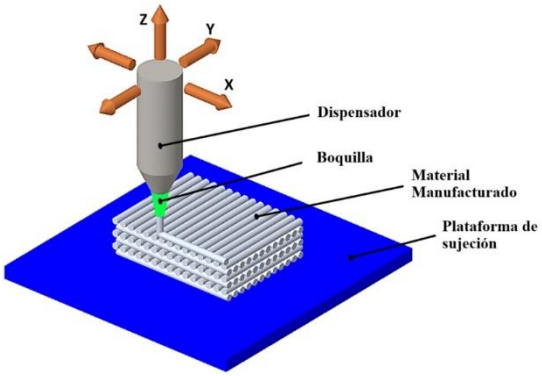


Figura 7. Esquema de impresión 3D mediante la técnica DIW [47].

El funcionamiento de esta técnica consiste, en un primer lugar, preparar la tinta del material deseado más los aditivos necesarios para llevar a cabo la impresión. Después se deben establecer las condiciones en las que se quiere imprimir como la temperatura, velocidad y el diseño. Estas propiedades varían según el material que se quiera extruir, y a continuación se empieza con el proceso de impresión. Este proceso tiene una duración de entre 2 y 3 horas para entre 8 y 10 muestras, es decir, el tiempo varía según la cantidad de piezas que se quiera fabricar. Posteriormente, se procede a eliminar el aglutinado que corresponde a la eliminación de uno de los aditivos que sirven para darle textura al polvo metálico y que este pueda ser impreso, obteniendo así las piezas metálicas. Por último, se realiza el proceso de sinterizado que sirve para obtener la muestra con las propiedades, tanto mecánicas como físicas, requeridas [48]. En los siguientes apartados se explican las distintas etapas con mayor detalle.

3.2.1. Tinta empleada

La tinta que se emplea para la fabricación de las piezas tiene una composición en peso de 60% de polvo de Ti c.p. de grado 2 (325 *mesh*), 30% de una disolución de ácido poliláctico (PLA) LX175 en acetato de etilo (20% en peso) y un 10% de hidrogel Pluronic F127 del 30% en peso [7].

3.2.2. Parámetros de impresión

La impresora que se emplea es el modelo *BCN3D+ dual extruder* prototipada por la fundación CIM. Para llevar a cabo la impresión, se deben tener en cuenta varios parámetros que se introducen en el programa que ejecutan la impresión [7]. En la siguiente Tabla 6 se tienen los más relevantes.

Tabla 6. Resumen de los parámetros del programa de impresión [7].

Diámetro interno boquilla	410 μm
Altura capa	350 μm
Densidad de llenado	30-50%
Patrón de llenado	HC
Velocidad de llenado/impresión	10 mm/s
Velocidad de desplazamiento	20 mm/s

3.2.3. Eliminación del aglutinado

La eliminación del aglutinado es la etapa en la cual se pretende eliminar el material que hace de ligante, y que permite la extrusión de la tinta metálica. Este proceso se realiza una vez se han impreso y secado las muestras. En el caso de estas muestras, en primer lugar, se introducen las piezas durante 1 hora en agua, donde se elimina el disolvente y parte de Pluronic. Por último, se les realiza un tratamiento térmico de 2 horas a 350 ºC en aire [7].

3.2.4. Sinterización

La sinterización se realiza una vez se ha eliminado el ligante, y corresponde al proceso donde se les confiere a las muestras las propiedades mecánicas y físicas que se desean. En este caso, se realiza la sinterización a 1150 ºC durante 2 horas en alto vacío ($5 \cdot 10^{-5}$ mbar) [6].

3.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El microscópico electrónico de barrido (*Scanning Electron Microscope* – SEM), utiliza un haz de electrones enfocado de alta energía para generar una variedad de señales en la superficie de muestras solidas. Estas señales, se derivan de las interacciones electrón – muestra y revelan información sobre esta, incluyendo la morfología externa (textura), composición química, estructura cristalina y orientación de los materiales que componen la muestra. Los datos se recopilan sobre un área seleccionada de la superficie de la muestra y se genera una imagen bidimensional (2D) que muestra variaciones espaciales correspondientes a esa zona. Las imágenes pueden variar desde 1 cm a 5 μm de ancho utilizando técnicas de SEM convencionales (ampliación que oscila entre 20X y aproximadamente 30.000X, resolución espacial de 50 a 100 nm). Por otro lado, el SEM también es capaz de realizar análisis de ubicaciones concretas de la muestra. Puede determinar cualitativa o semicuantitativamente composiciones químicas mediante energía de dispersión de rayos X (*Energy – Dispersive X – Ray Spectroscopy* – EDS), y la estructura cristalina y orientaciones de los cristales con difracción de retrodispersión de electrones (Electron Backscatter Diffraction – EBSD) [49], [50] .

Figura 8. Imagen del SEM del laboratorio de microscopia electrónica de la EEBE – UPC [51].

De forma general, los principios fundamentales del SEM consisten en que los electrones acelerados transportan cantidades significativas de energía cinética, y esta energía se disipa en forma de señales producidas por la interacción electrón – muestra, una vez los electrones incidentes se desaceleran en la muestra sólida. Entre estas señales encontramos electrones secundarios que proporcionan las imágenes SEM, electrones retrodispersados (*Back – scattered Electron Detector* – BSE) con los cuales se determinan estructuras cristalinas y orientaciones de minerales, fotones que proporcionan rayos X característicos para el análisis elemental y continuo, luz visible y calor. Por último, el análisis SEM se considera no destructivo, es decir, no hay pérdida de volumen de la muestra, por lo que es posible analizar un mismo material repetidamente [49], [50].

3.4. Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS)

La espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (*X-Ray Photoelectron Spectroscopy* – XPS) es una técnica no destructiva y sensible a la superficie que se utiliza para analizar aproximadamente los 10 nm más externos de materiales naturales y artificiales. Esta se emplea habitualmente para determinar la composición de las superficies de los materiales (elementos), la abundancia relativa de estos (análisis semicuantitativo) y el estado químico de los iones polivalentes midiendo las energías de enlace de los elementos, las cuales están relacionadas con la naturaleza y fuerza de sus enlaces químicos [52].

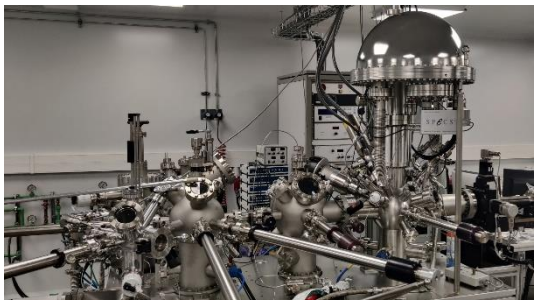


Figura 9. Imagen del XPS del centro multiescala de la EEBE – UPC [53] .

El funcionamiento de esta técnica se basa en que los átomos emiten electrones en respuesta a la radiación electromagnética incidente (rayos X). Estos rayos X provocan que la superficie de la muestra emita fotoelectrones con una cierta energía y esta se analiza. Esta técnica permite determinar la estructura de unión de los distintos elementos superficiales y sus cambios en función de los parámetros de procesamiento o tratamientos superficiales. La información sobre los distintos elementos y sus enlaces se suelen extraer comparando las medidas obtenidas de energía de enlace [52], [54].

3.5. Espectrometría de Masas con Fuente de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS)

La Espectrometría de Masas con Fuente de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS), es una técnica analítica que combina un plasma de acoplamiento inductivo como fuente de ionización, con un espectrómetro de masas para el análisis cuantitativo de elementos [55]. Permite el análisis de varios elementos, de forma rápida y con bajos límites de detección, llegando a niveles de partes por trillón (ppt) [58].

Figura 10. Imagen del ICP-MS Agilent 7800ce [56].

El funcionamiento de esta técnica consiste, en primer lugar, en la ionización de la muestra (líquida o sólida) introduciéndola en un plasma de argón a alta temperatura (6000-8000 K). El plasma atomiza e ioniza casi por completo los elementos presentes en la muestra, generando iones positivos. Después, estos iones son extraídos y enfocados mediante una interfaz de vacío que acopla el plasma a presión atmosférica con el espectrómetro de masas, que opera bajo alto vacío. En el espectrómetro de masas, los iones son separados de acuerdo con su relación masa/carga, generalmente usando un analizador de masas tipo cuadrupolo. Por último, los iones separados son detectados y cuantificados, permitiendo determinar la concentración de los elementos presentes en la muestra [57].

4. Procedimiento experimental

El Ti es el metal que presenta mejor biocompatibilidad con el cuerpo humano además de tener buenas propiedades mecánicas, junto con una alta resistencia a la corrosión. Sin embargo, al contrario que otros materiales como cerámicas, por ejemplo, la hidroxiapatita sinterizada, este le es más difícil adherirse al hueso vivo y su fijación con el circundante no es tan estable para un largo periodo de tiempo [1]. Tras varios estudios realizados al Ti [1], [58], se llega a la conclusión de que modificando la superficie del titanio se puede conseguir que aumente considerablemente su capacidad de unirse al cuerpo humano. Además, factores como la esterilización pueden influir en a lo propiedades antibacterianas, adhesión celular, entre otros.

Con el objetivo de mejorar la osteointegración, se llevaron a cabo tratamientos termoquímicos alcalinos. Para abordar el problema de la contaminación bacteriana, se modificaron estos tratamientos incluyendo una etapa de adición de plata. Además, se realizaron diversos procesos de esterilización para evaluar su efecto en las muestras. Una vez preparadas las muestras, se llevaron a cabo varios experimentos para analizar su capacidad de liberación del ion plata (Ag^+), antimicrobiana y de adhesión celular. A continuación, se describen en detalle los diferentes procesos llevados a cabo.

4.1. Tratamientos termoquímicos alcalinos

El tratamiento termoquímico consistió en varias etapas donde se prepararon las muestras, para aumentar su adherencia al hueso y su capacidad antibacteriana. Previamente, se realizó una limpieza tanto del material a emplear (vaso de precipitados, probeta, pinzas…), además de con agua y jabón, con ácido nítrico al 2%. Por otro lado, se prepararon las muestras mediante cuatro baños en ultrasonidos. El primer baño se hizo con acetona, el siguiente con etanol 96% y, por último, dos baños más con agua (H_2O) destilada, todos ellos con una cantidad aproximada de 10 ml/muestra. Los cuatro baños tuvieron una duración de cinco minutos y una vez finalizados, las muestras fueron secadas con nitrógeno. Una vez realizada la preparación de las probetas, se procedió a realizar el tratamiento termoquímico formado por las etapas que se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7. Etapas del tratamiento termoquímico desarrollado por la UPC [31].

Etapa	**Primera**	**Segunda**	**Tercera**	**Cuarta**
Tratamiento	Inmersión en NaOH 5M**	Inmersión en $C_4H_6CaO_4$ 100mM + $AgNO_3$ 1mM**	Tratamiento térmico en horno	Inmersión en H_2O**
		Características		

Cantidad	10 mL/ muestra	10 mL/muestra (de ambas)	-	10 mL/muestra
Tiempo	24 h	24h	24h*	24h
Velocidad	250 rpm	250rpm	5ºC/min (calentamiento)	250 rpm
Temperatura	60 ºC	40 ºC	600 ºC	80 ºC

**Duración total 24h, rampa de calentamiento de 2h, tiempo de mantenimiento a 600 ºC de 1h, resto enfriamiento a temperatura ambiente.*
***Todas las inmersiones se llevan a cabo con la ayuda de un agitador y un imán para fomentar la generación de la capa superficial correspondiente a esa etapa.*

4.1.1. Inmersión en NaOH

Siguiendo el tratamiento termoquímico que desarrolló T. Kokubo [1] años atrás, se realizó la *Primera Etapa* que aparece en la .

Tabla 7 en la cual se busca formar una capa de $Na_xH_yTiO_2$ en la superficie del Ti metal, que ayudará a formar apatita en la siguiente etapa [59], [1].

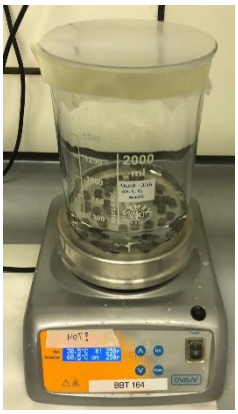


Figura 11. Imagen de cómo se realiza la inmersión.

Realizado el tratamiento, los iones Na^+ y O^{2-} forman una estructura del orden de nanómetros, penetrando en la superficie del Ti, la cual densificará una vez hecho el tratamiento térmico. Esta fina estructura es titanato de sodio hidrogenado, que pasa a ser titanato de sodio [7]. En la siguiente Figura 12 se indica.

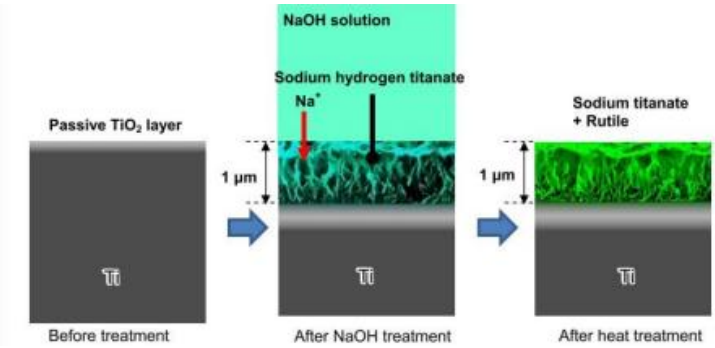


Figura 12. Esquema del cambio estructural de la superficie de la probeta de Ti c.p de grado 2 sometido al tratamiento de inmersión de NaOH y posteriormente al tratamiento térmico [7].

4.1.2. Inmersión en $C_4H_6CaO_4$ y $AgNO_3$

La formación de titanatos de calcio en las muestras da lugar a la incorporación de iones. Este fenómeno mejora tanto la bioactividad, como la capacidad antibacteriana gracias a la adición de plata por sus características anteriormente explicadas en el apartado 2.3.4. Así pues, con el objetivo de solucionar las carencias de otros iones metálicos, se hizo la *Segunda Etapa* con acetato de calcio ($C_4H_6CaO_4$) y nitrato de plata ($AgNO_3$). El $C_4H_6CaO_4$ se añade a la vez que el $AgNO_3$, de esta manera se incorporan simultáneamente los iones de Ca^{2+} y Ag^{+} en la superficie de Ti. Esto hace que se dé la liberación de iones plata en medio fisiológico, por un cierto tiempo, sin problemas de toxicidad aparente [7], [31].

4.1.3. Tratamiento térmico

En la *Tercera Etapa*, se llevaron las muestras tratadas al horno donde se calentaron hasta 600 ºC y se mantuvieron a esa temperatura por 1h. La duración total es de 24h porque se tiene una rampa de calentamiento de 2h, después una hora de mantenimiento a 600 ºC y finalmente se debe dejar varias horas de enfriamiento, para que cuando se vayan a recoger las muestras se encuentren a una temperatura aproximada a la temperatura ambiente. En esta etapa se busca el convertir la capa de gel que se forma después de la inmersión en $C_4H_6CaO_4$ y $AgNO_3$, en una capa mucho más estable mecánicamente como la que aparece en la Figura 12 [60].

4.1.4. Inmersión en H_2O

Tras 24h des de que se llevaron las muestras al horno, se empezó con la *Cuarta Etapa*. En esta etapa los iones de Ca^{2+} del titanato de calcio que se encuentra en la superficie, son parcialmente reemplazados con H_3O^{+} mientras están en el agua, para así obtener una capa de titanato de calcio ($CaTiO_3$) deficiente en calcio. Finalmente, esto ayudará a que los distintos iones (Ag^{+}) se liberen mejor en los fluidos biológicos [1].

4.2. Esterilización

Para la esterilización de las muestras, una vez finalizado el tratamiento termoquímico, las muestras se secaron con nitrógeno y se depositaron en bolsas de esterilización mixta, donde tiene una cara de poliéster polipropileno y otra de papel con permeabilidad controlada, capaces de mantener la esterilización al menos durante un tiempo una vez han sido esterilizadas. A continuación, se explican las técnicas empleadas.

4.2.1. Autoclave

Generalmente un autoclave es un recipiente de presión metálico de paredes gruesas con un cierre hermético que permite trabajar a alta presión para realizar una reacción industrial, una cocción o, como en este caso, una esterilización con vapor de agua, a fin de esterilizar materiales e instrumentos. En este proyecto se ha usado el autoclave RAYPA de mesa.

Figura 13. Autoclave RAYPA de mesa.

El programa que se empleó fue el P1 que se utiliza para materiales sólidos, que esteriliza a una temperatura de 121 ºC y a una presión de 1,1 bar. Además, su tiempo de esterilización es de 30 minutos y su tiempo de secado de 25 minutos. Básicamente el funcionamiento de estas máquinas consiste en la generación o entrada de vapor de agua, restringiendo su salida, hasta obtener la presión deseada (1,1 bar), pudiendo alcanzar así la temperatura de 121 ºC. El tiempo de esterilización y de secado dependerá del programa que se quiera emplear y de los distintos requerimientos del material a esterilizar.

4.2.2. Radiación gamma

La radiación gamma consiste en un método de esterilización que emplea radiaciones electromagnéticas ionizantes (rayos gamma), obtenidas por la desintegración de un núcleo atómico. Estos rayos son capaces de penetrar la materia y causar mutaciones en el ADN de los microorganismos causando la muerte celular. El principal inconveniente es que es un proceso de alto coste porque se

debe externalizar a una empresa que disponga de este tipo de tecnología [61]. En este caso se llevó a la empresa de Aragogamma (Aragogamma S.L., Les Franqueses del Vallés, España) que emplean una radiación de 25 kGy [62].

4.2.3. Óxido Etileno

Esta técnica de esterilización se basa en exponer el material a un gas altamente volátil y tóxico durante un período de tiempo controlado, este caso el óxido etileno (OE). Se suele emplear cuando otros métodos de esterilización no están disponibles o no son posibles y consiste en que la molécula de gas de OE reacciona con un ADN microbiano y lo destruye. Este gas es el más empleado y la energía necesaria para este método es muy baja durante el proceso. También se controla la concentración de gas, humedad, temperatura y tiempo de exposición. Al igual que la radiación gamma, este proceso se externalizó a una empresa llamada Archimedes (Soadco S.L – Archimedes®, Castellciutat, España). Las condiciones que se conocen en las cuales se realizan la esterilización, es la temperatura de 55 ºC.

4.3. Ensayo liberación de iones (ICP-MS)

El objetivo principal del ensayo de liberación de iones está orientado tanto a determinar la cantidad de plata que libera la muestra al medio de ensayo, este caso agua ultrapura Milli-Q, como a evaluar la cinética de liberación. La determinación del contenido de iones presente en el medio se realiza mediante técnicas de ICP-MS (apartado 3.5), cuyo uso más general es el de realizar el análisis elemental de soluciones mediante matrices acuosas y/u orgánicas. Esta técnica consiste en, mediante un plasma de Ar^+, ionizar los átomos presentes en una solución líquida y, en base a la relación masa/carga, diferenciar e identificar los distintos elementos, lo que permite obtener cuales de estos se encuentran presentes en la muestra. La realización de este ensayo es interesante porque permite simular las condiciones en las que se verán expuestas las muestras como injertos.

Para este ensayo es crucial la higiene y limpieza, ya que cualquier contaminación daría lugar a la invalidez del ensayo. La gran sensibilidad del equipo es del orden de 0,5 PPT para más del 95% de los elementos de la tabla periódica, por lo que le hace capaz de detectar cualquier elemento contaminante presente en la solución. Esto obliga a realizar una limpieza exhaustiva de todo el fungible y material de laboratorio que entre en contacto con las soluciones a analizar.

Para este estudio se han analizado un total de 12 muestras, las cuales corresponden a 3 réplicas de cada uno de los 4 grupos de muestras a evaluar, que se han diferenciado según el tipo de esterilización utilizado, no esterilizada, autoclave, radiación gamma y OE, respectivamente. Por último, para llevar a cabo el experimento, se emplea el ICP-MS del fabricante Agilent modelo 7800ce (Figura 10).

4.3.1. Preparación previa material

En primer lugar, para dar comienzo al ensayo es necesario realizar una limpieza exhaustiva previa de todo el instrumental y fungible necesario para la realización del ensayo, que se realiza con una solución de nítrico al 2%, con el fin de evitar cualquier tipo de contaminación. Principalmente se emplean vasos de precipitados de entre 50 – 100 mL, preferiblemente que no se hayan usado con anterioridad, pipeta de 5 mL, falcons de 10 mL, Eppendorfs de 1,5 mL y tubos de polipropileno (PP) de 10 mL. A parte del material, es necesario disponer de aproximadamente 1L de agua desionizada grado Milli – Q, así como otro litro de nítrico al 2%.

4.3.2. Incubación de las muestras

El ensayo de liberación de iones *"ion – release"* se ha realizado mediante la utilización de un horno de incubación MEMMERT modelo BE500 (MEMMERT Gmbh, *Scheabach,* Alemania), utilizando una temperatura constante de incubación de 37± 2ºC.

Cada muestra que evaluar se ha sumergido en una solución de agua Milli-Q, durante 5 períodos de tiempo diferentes (6h, 24h, 3 días, 7 días y 15 días), con una relación de ajuste peso/volumen del medio de extracción de 0,2g/1 mL, siguiente las especificaciones marcadas por la Norma ISO 10993-12 [63].

4.3.3. Extracción muestras

Para este ensayo, al ser muestras con geometrías similares, pero no exactamente iguales en dimensiones, se ha procedido al pesado individual de cada muestra de forma previa al ensayo con el fin de ajustar la cantidad de medio de cada muestra de forma individual, a razón de 1 mL cada 0,2g de peso.

Una vez se obtiene la cantidad de solución necesaria, se sumergen las muestras en esta, se cierran herméticamente con Parafilm para evitar la evaporación del medio durante la incubación, y se espera a los periodos correspondientes. Tras la finalización de cada periodo de tiempo de incubación, se ha extraído la totalidad del medio presente en cada muestra, que se ha depositado en un eppendorf previamente limpio, para posteriormente extraer 1 mL de muestra y colocarlo en un tubo de análisis. Una vez se cogen todas las muestras, se enrasan a 5 mL añadiendo 4 mL de nítrico al 2%, se sellan también con Parafilm y se almacenan en el frigorífico hasta el momento del análisis ICP conjunto de todas las muestras del ensayo. Finalmente, una vez preparadas las muestras de análisis, cada muestra se vuelve a sumergir en su misma cantidad de solución Milli-Q ajustada a su peso, y se devuelven de nuevo a la incubadora.

4.3.4. Análisis final

Una vez finalizado los 5 periodos temporales de incubación, se han obtenido un total de 60 muestras de análisis más otras 6 muestras de control (3 muestras de 5 mL de Milli-Q y 3 muestras de 5 mL de ácido nítrico 2%), que se han llevado a analizar de forma conjunta al equipo ICP – MS.

Por último, una vez se lleva a cabo el análisis, se obtiene la concentración de iones de plata liberados para cada periodo de tiempo, consiguiendo así cuantificar los distintos elementos en soluciones muy diluidas del orden de partes por billón o millón (1, 10, 100, 1000, 10000, 100000 ppb o ppm).

Adicionalmente, para la determinación cuantitativa del contenido de iones Ag^{+} de cada muestra ha sido necesario preparar una recta de calibración de 6 puntos (1, 10, 100, 1000, 10000, 100000 ppb), que se han preparado mediante la utilización de patrones de soluciones elementales (NIST).

4.4. Ensayo microbiológico

Una de las etapas de preparación de la superficie consistía en la incorporación de plata. Con el objetivo de comprobar las propiedades antibacterianas que la plata puede proporcionar a la superficie, se realizó un ensayo microbiológico con dos tipos de cepas bacterianas, una representante de Gram negativa *Escherichia coli* (*E. coli*, CECT 101) y una de Gram positiva *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, CECT 59).

El ensayo se llevó a cabo en dos campanas de microbiología de flujo laminar para poder tener ambientes libres de contaminación. En este proyecto, se usó una de clase I para trabajar con la bacteria *E. coli* y otra de clase II para la *S. aureus*.

Figura 14. Cabinas de microbiología a) Haier HR900-IIA2 de clase II y b) Telstar PV-100 de clase I.

La diferencia principal entre las dos clases de campana es la seguridad que ofrecen, siendo la clase I más adecuada para trabajar con bacterias de riesgo bajo y moderado, y la clase II para trabajar con agentes biológicos de mayor riesgo [64].

Se prepararon los distintos medios de cultivo, tanto líquido como agar. Para las placas Petri, se empleó medio de cultivo solido infusión de cerebro y corazón (BHI – *Brain Heart Infusion*) o Agar Triptona – Soja (TSA – *Tryptic Soy Agar*). Como medio de cultivo líquido, se utilizó el caldo de Triptona – Soja (TSB – *Tryptic Soy Broth*) y como fluido de pase y disolución se utilizó la solución salina tamponada con fosfato (PBS – *Phosphate Buffered Saline*). Todos estos medios se esterilizaron mediante autoclave. Adicionalmente, se utilizó material estéril diverso como falcons, pipetas, multiplacas, entre otros.

Antes de empezar los ensayos, las campanas se esterilizaron mediante luz ultravioleta, con etanol al 70% y espray desinfectante *Biocidal ZF*. Todo material utilizado dentro de las campanas fue esterilizado con etanol (70%).

4.4.1. Preparación del pre – inóculo

En microbiología, el inóculo es una concentración conocida de bacterias en medio líquido que se utiliza para hacer un posterior cultivo microbiano. En este caso, se preparó una solución bacteriana (pre – inóculo) a partir de un cultivo sólido en agar (TSA), mediante la ayuda de un asa *Kolle*. Se seleccionó una colonia definida y se dispersaron las bacterias en medio líquido (10 mL de TSB). El cultivo se incubó a 37 ºC por 24h.

4.4.2. Inóculo y siembra

Se preparó el inóculo a partir de la solución bacteriana (pre – inoculo) correspondiente a una densidad óptica (OD – *optical density*). La determinación de la OD se realiza para conocer cuanta luz pasa a través de una pequeña cantidad de dipersión de cultivo y así medir la cantidad de luz dispersada por este, de esta forma se obtiene la concentración bacteriana. Para *E. coli* se preparó una OD de 0,1 y para *S. aureus* de 0,07, estas medidas corresponden aproximadamente a $8{,}0 \times 10^7$ y 7×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC, CFU en inglés), respectivamente. El motivo por el cual se emplearon distintas OD, fue porque se observó que la bacteria *S. aureus* presenta más dificultad para ser eliminada que la *E. coli*, y al disminuir la OD, se facilita el conteo de bacterias que se comentara en apartados posteriores.

Para la cuantificación del número exacto de bacterias en el medio se hizo un estudio de conteo bacteriano por disoluciones (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, …), y posterior siembra en agar para poder contar las UFC. Para ello se utilizó 1 mL de inóculo que se diluyó en 9 mL de TSB o PBS para la dilución 1:10.

De esta disolución se utilizó un 1mL que se diluyó en 9 mL de TSB o PBS para la 1:100, y así sucesivamente como se muestra en la Figura 15.

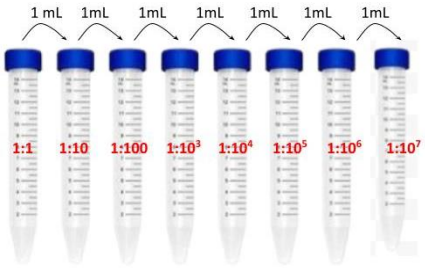


Figura 15. Esquema representativo de cómo se preparan las distintas soluciones.

De cada dilución obtenida, se utilizaron 100 μL para hacer la siembra por triplicado en platos de agar y distribuir por todo el medio mediante un esparcidor de células triangular de vidrio, desinfectado con etanol (70%) y secado al aire agitándolo manualmente. Por último, se incubó a 37 ºC durante 24h.

4.4.3. Adhesión y proliferación bacteriana

A continuación, se introdujeron las muestras a ensayar en los pocillos de un multiplacas de 24 pocillos (Figura 16) y se añadió 1mL de solución de inóculo. Se incubó a 37 ºC durante 1h para el estudio de adhesión y 3h para la proliferación. Un total de cinco muestras fueron ensayadas, una por cada condición (sin esterilizar, autoclave, radiación gamma y OE). Se utilizaron cuatro muestras de control sin plata, para comprobar su propiedad antimicrobiana, sin esterilización previa. Transcurridos los tiempos de ensayo, las muestras se pasaron a los pocillos de un nuevo multiplacas con 1 mL de PBS. Las muestras se sonicaron durante 10 minutos para desprender las bacterias de la superficie.

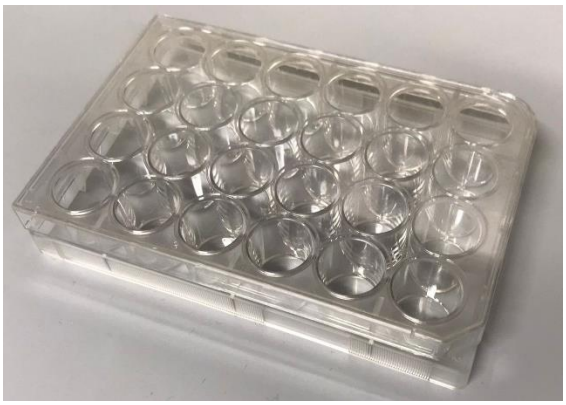


Figura 16. Imagen de multiplaca para cultivo bacteriano.

Para calcular el número de UFC en cada una de las muestras, se recogió el PBS de cada pocillo, con las bacterias desenganchadas, y se hicieron diluciones 1:1, 1:10, 1:100 y 1:10000 para comprobar la

concentración bacteriana. Se emplearon 100 μL de estas diluciones para sembrar por duplicado en platos de agar y distribuir por todo el medio mediante un esparcidor de celular triangular de vidrio, desinfectado con etanol (70%) y secado al aire agitándolo manualmente. Por último, se etiquetaron todas las placas y se incubaron a 37 ºC durante 24h.

4.4.4. Conteo bacteriano

Pasadas 24h de la siembra de las bacterias, se contaron la cantidad de colonias (UFC), que aparecieron en cada dilución. El conteo se limita a un número inferior a 300 colonias, o bien si aparecen colonias unidas.

Como resultado, se obtuvo el valor de UFC por mL. Este término se utiliza para medir la cantidad de bacterias en un líquido (solución). Este valor se obtiene al multiplicar el resultado obtenido del conteo de colonias por su solución entre el valor de la siembra, como se muestra en la Ecuación 1.

$$\boldsymbol{UFC/mL = \frac{núm.\,colonias \cdot factor\,solución}{Volumen\,siembra}} \qquad \textit{Ecuación 1}$$

Se realizó por triplicado, y los resultados se presentan como la media aritmética y la desviación estándar de los valores.

4.4.5. Preparación de las muestras para la observación por SEM

Para la observación morfológica de las bacterias adheridas por microscopia electrónica, se prepararon previamente las muestras. En primer lugar, se realizó una primera limpieza de las muestras en PBS durante 5 minutos, dos veces. Luego se fijaron las bacterias mediante una disolución de glutaraldehído al 2% en PBS durante 30 minutos a 4 grados. Después se realizaron tres limpiezas con PBS durante 5 minutos. A continuación, se deshidrataron las muestras mediante lavados de 10 minutos de etanol en distintas concentraciones (30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 96%). Por último, se dejaron secar al aire durante 24 horas.

Una vez preparadas las muestras, se recubrieron mediante pulverización catódica o sputtering con oro (Au) (aproximadamente 10 nm), para hacer la muestra conductora y evitar la sobrecarga electrónica en el microscopio.

4.5. Ensayo celular

Con el objetivo de comparar el comportamiento celular en las tres superficies esterilizadas, se llevaron a cabo los ensayos de adhesión y proliferación con células osteoblásticas SaOS-2.

Considerando que las muestras eran porosas, se realizó este ensayo cuantitativo mediante el kit de medición de células viables *Preston Blue.* Este reactivo de viabilidad celular es una solución basada en resazurina, un tinte azul no fluorescente que es reducido por células metabólicamente activas. Una vez reducido, se vuelvo rosa fluorescente [65].

El ensayo fue realizado por personal del equipo BBT y a continuación se explican los detalles de este.

4.5.1. Preparación previa: células

Para poder realizar el estudio comparativo, previamente se debieron preparar las células que más adelante se emplearon en el ensayo. Se utilizaron células osteoblásticas SaOS-2 cultivadas en medio McCoy's modificado con 1.5 mM de glutamina y se suplementa con un 15% de suero fetal bovino (FBS - *Fetal Bovine Serum*) junto con un 1% de penicilina/estreptomicina (50 U/mL y 50 µg/mL, respectivamente) (*GibcoTM*). Las células se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera con un 95% de humedad y un 5% de CO_2.

4.5.2. Adhesión y proliferación celular

Se prepararon por triplicado las muestras de los tres tipos de superficies más el control, que en este caso fueron muestras a las cuales se les realizó el tratamiento termoquímico de T. Kokubo [1] modificado con plata sin esterilizar, colocándolas en los pocillos de las placas estériles.

Se sembraron 15000 células por muestra y se cultivaron durante 24 horas para la adhesión, y 3, 7, 14, 21 hasta 28 días para proliferación. El medio fue cambiado cada dos o tres veces por semana. Tras cada período de incubación se lavaron las células con PBS, y se incubaron en una solución de *PrestoBlueTM* al 10% durante 1 hora a 37 °C evitando la exposición de luz. Adicionalmente, como control negativo, se incubó *PrestoBlueTM* sin células. Transcurrido este tiempo, 100 µL del medio se transfirieron a un multiplaca de 96 pocillos negra para poder medir la respuesta mediante una longitud de onda de excitación a 560 nm y una longitud de onda de emisión a 590 nm mediante un lector multimodal *Synergy HTX*.

4.6. Ensayo de compresión

Para poder comprobar las propiedades mecánicas de las probetas, se realiza un ensayo de compresión. El motivo principal es porque, una vez los implantes óseos son introducidos en el cuerpo humano, deben ser capaces de soportar cargas a compresión.

El ensayo consiste en la aplicación de una carga estática sobre la muestra, a lo largo de su eje longitudinal, lo que resulta en un acortamiento gradual hasta que se alcanza la rotura o se detiene el

ensayo. Durante la compresión de la probeta, se registran las deformaciones experimentadas, con las que posteriormente se calculan los esfuerzos y deformaciones, obteniendo el gráfico tensión-deformación del material. Mediante estos resultados, es posible obtener diversas propiedades como el límite elástico, módulo de elasticidad y resistencia a la compresión.

Al ser muestras proporcionadas por la empresa AMES Medical (Sant Vicenç dels Horts, Barcelona), su obtención era limitada, y no cumplían con el estándar ASTM o ISO. No obstante, se probó de ensayar cinco muestras fuera de norma y comprobar si existía cierta repetibilidad, para poder ver como afectaban los procesos realizados en este proyecto, al comportamiento mecánico de las piezas.

a) b)

Figura 17. Imágenes del ensayo de compresión: (a) Durante la realización del ensayo y (b) Final del ensayo.

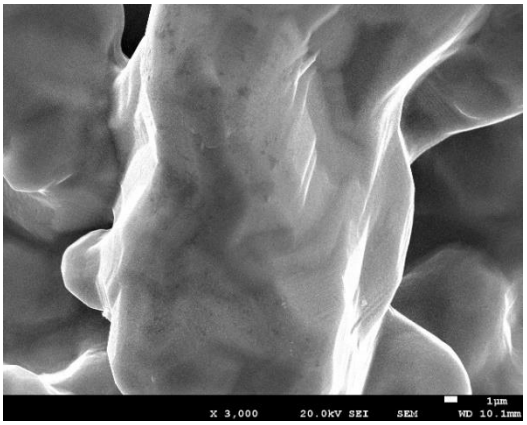
Desafortunadamente, no existía repetibilidad entre probetas debido a sus pobres tolerancias dimensionales y geométricas. Se obtuvo un gráfico tensión-deformación para cada muestra, se puede consultar en el apartado A4 del anexo. Sin embargo, los valores eran tan diferentes que incluso no parecía que se hubieran ensayado un mismo material. Es por ello por lo que finalmente, se descartó el ensayo realizado.

5. Resultados y discusiones

5.1. Caracterización superficial

5.1.1. Análisis SEM – EDS

Mediante microscopia electrónica, se observaron las superficies de las muestras a 12000 y 3000 aumentos. En este ensayo se quiere comprobar que el proceso de esterilización no afecta a la topografía de la capa bioactiva formada por una mezcla de óxidos de titanio (rutilo y anatasa) y titanatos de calcio ($CaTi_4O_9$) dopada con plata. Como muestras de titanio control, sin esterilizar, se han utilizado dos tipos: una original sin ningún tratamiento termoquímico (control 1) y otro con el tratamiento descrito en el apartado experimental 4.1 (control 2).

a) 

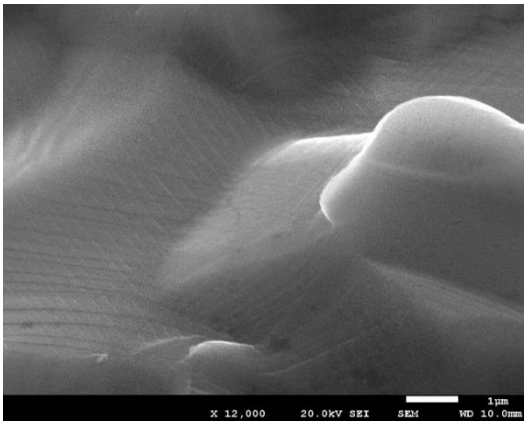
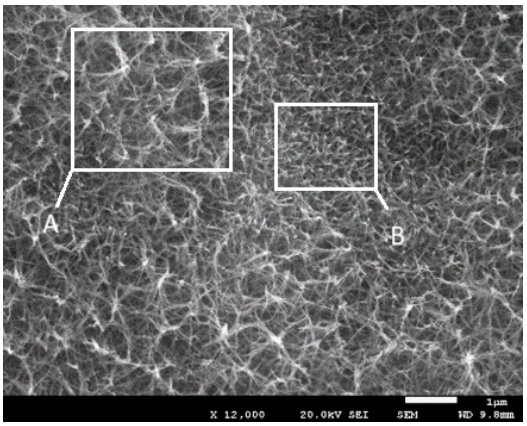
b) 

Figura 18. Imágenes de la superficie de la muestra control 1 a: (a) 12.000 aumentos y (b) 3.000 aumentos.

a) 

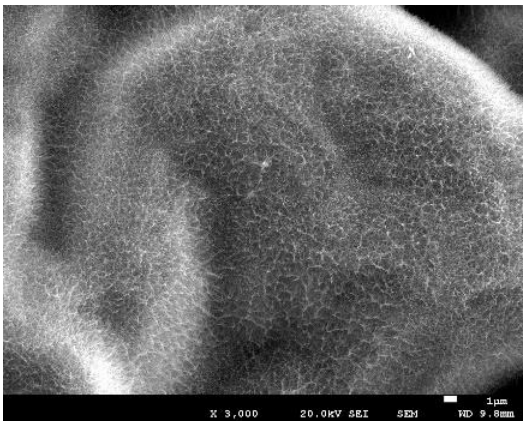
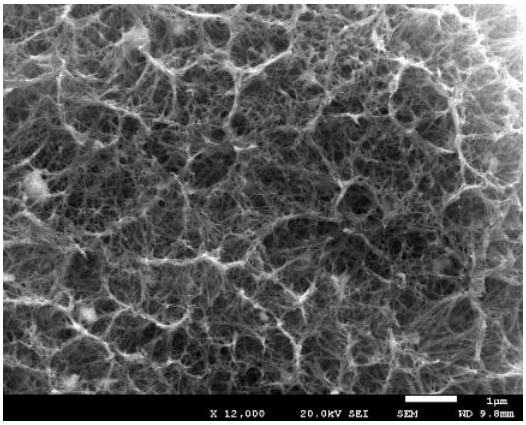
b) 

Figura 19. Imágenes de la superficie de la muestra control 2 a: (a) 12000 aumentos y (b) 3000 aumentos.

a) 

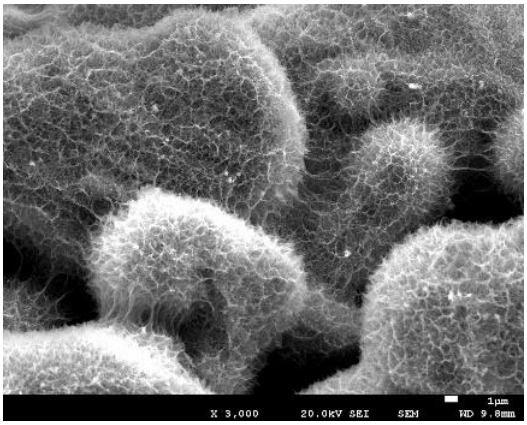
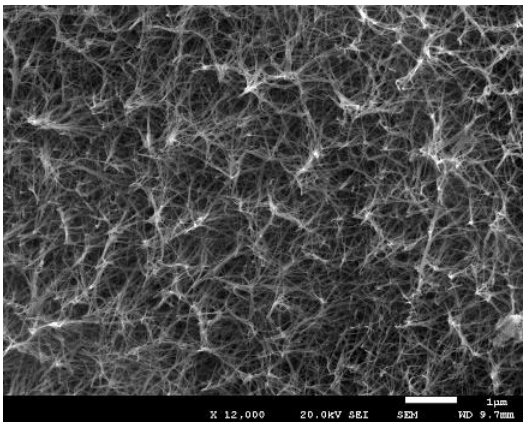
b) 

Figura 20. Imágenes de la superficie de la muestra con tratamiento termoquímico y esterilizada con autoclave a: (a) 12000 aumentos y (b) 3000 aumentos.

a) 

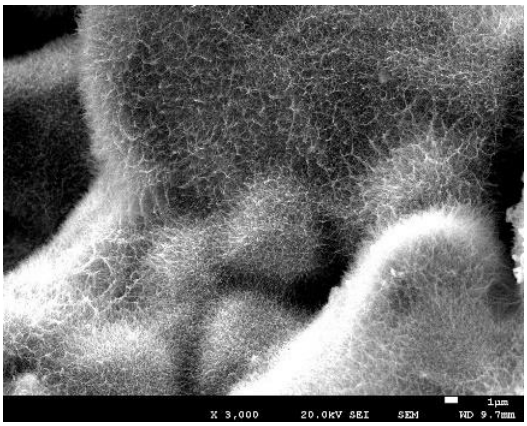
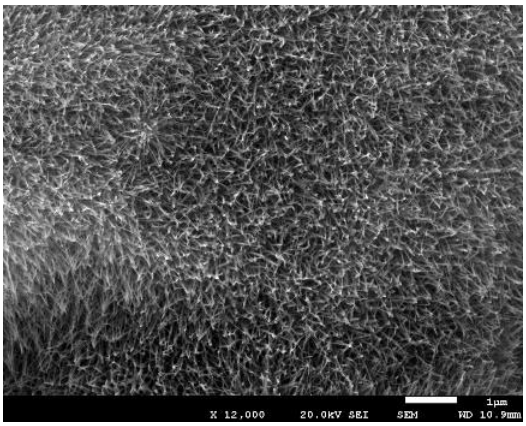
b) 

Figura 21. Imágenes de la superficie de la muestra con tratamiento termoquímico y esterilizada con radiación gamma a: (a) 12000 aumentos y (b) 3000 aumentos.

a) 

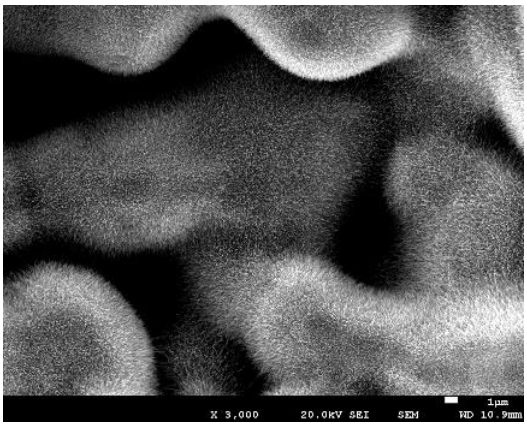
b) 

Figura 22. Imágenes de la superficie de la muestra con tratamiento termoquímico y esterilizada con óxido de etileno a: (a) 12000 aumentos y (b) 3000 aumentos.

En las figuras anteriores, se observa una estructura acicular nanoporosa, apreciable ya a 3000 aumentos, que coincide perfectamente con la literatura [31], [7]. También, en la Figura 20 b se

observan la presencia de partículas de plata que se esperaban en un principio. Acorde con la literatura [59], todas las muestras presentan una gran superficie específica que junto con la presencia de los iones calcio, da lugar a una capa bioactiva. A través de esta capa, se da el intercambio de iones Ca^{2+}con el medio y produce la formación de un recubrimiento bioactivo de fosfato de calcio [66]. Por otro lado, en la Figura 18, que corresponde a la muestra sin tratamiento termoquímico ni esterilización, presenta una estructura mucho más lisa sin esa estructura acicular nanoporosa. Esto indica la efectivad del tratamiento termoquímico [1].

Como control de verificación durante el proceso productivo, es buena opción la observación de la topografía mediante SEM a 3000X y 12000X porque sería un control válido para ser implantado en la empresa y, además, no es un ensayo destructivo y se puede aprovechar la muestra una vez realizado éste. Realizar este control de forma periódica, verificando la presencia de esta microestructura típica, podría asegurar la trazabilidad y fiabilidad del proceso industrial.

También en las micrografías de SEM, se observa cierta heterogeneidad en el tamaño de los nanoporos y/o estructuras aciculares. Especialmente, en la Figura 19 se aprecian dos regiones contiguas donde en una se observa un tamaño de la estructura acicular mayor (cuadro A) mientras que en la otra área el tamaño es menor (cuadro B). Asimismo, en la Figura 22, se observa una estructura más refinada. Estas diferencias en la nanotextura podrían tener su origen durante el proceso de ataque alcalino, y a la gran heterogeneidad superficial que tienen las muestras porosas de titanio. Durante el proceso de inmersión en NaOH, explicado en el apartado 4.1.1, la agitación no podría garantizar un ataque químico homogéneo en todas zonas de la estructura porosa. Sabiendo esto, establecer un control de verificación del tamaño de nanoporosidad a grandes aumentos (12000X) no sería útil. Una opción interesante seria realizar, en un estudio futuro, ensayos relacionados con esta etapa para poder ver cómo influyen los parámetros de agitación (rpm y temperatura). Finalmente, y de forma cualitativa, no se observan cambios apreciables en la topografía en función del proceso de esterilización.

Adicionalmente, también se obtienen los distintos porcentajes en peso de los elementos químicos que constituyen la muestra (Tabla 8) mediante el análisis EDS.

Tabla 8. Porcentajes en peso de las distintas muestras, obtenidos del análisis EDS.

	Elementos (% en peso)				
	C	**O**	**Ca**	**Ti**	**Ag**
Control 2	2,24 ± 0,44	35,09 ± 5,79	0,76 ± 0,11	56,06 ± 2,67	5,86 ± 3,47
Autoclave	3,40 ± 0,31	43,24 ± 5,01	0,98 ± 0,21	48,82 ± 6,27	3,57 ± 0,82
Gamma	2,86 ± 0,20	45,12 ± 2,02	1,34 ± 0,07	44,40 ± 3,29	6,27 ± 1,13
OE	2,53 ± 0,31	38,44 ± 3,10	0,90 ± 0,10	52,80 ± 3,68	5,33 ± 1,09

En la Tabla 8, se puede confirmar que se ha incorporado tanto plata como calcio en las distintas muestras, independientemente del método de esterilización. Tanto el calcio como la plata presentan la menor desviación en comparación con el oxígeno y el titanio. En comparación con otros estudios similares [31], [7], [32], cabe destacar el bajo contenido de calcio en la superficie. Utilizando la misma metodología experimental (mezcla de acetato de calcio y nitrato de plata), Alejandra Rodríguez [31] obtuvo mayores valores de $3{,}42 \pm 0{,}27$ (peso). La única diferencia era que las estructura 3D de titanio, fueron fabricadas por técnicas de impresión 3D (tintas) con un diseño distinto a las empleadas en este proyecto. Estas diferencias se deberían estudiar en mayor profundidad si se quiere industrializar y escribir un procedimiento de fabricación y calidad. Parámetros como la geometría y tamaño de microporo y macroporo, así como la temperatura y agitación de las soluciones en la *Primera* y *Cuarta* etapa del procedimiento termoquímico alcalino (apartado 4.1), se deberían estudiar con más detalle. Sin embargo, este no es el objetivo prioritario del presente proyecto.

Por otro lado, la presencia de carbono está principalmente asociada a la contaminación tanto atmosférica, como a la manipulación de las muestras. Durante la esterilización, las muestras se almacenan en una bolsa con una cara de papel con permeabilidad controlada y otra polimérica (poliéster, polipropileno), que puede contaminar ligeramente la muestra. En el caso de las muestras sin esterilizar sucede algo parecido ya que estas son almacenadas en un multiplacas donde también se puede dar una cierta contaminación. Se observa que los diferentes porcentajes de carbono son muy similares y se encuentran cerca del rango de la desviación estándar. No obstante, parece que las muestras procesadas con óxido etileno tienden a tener un menor porcentaje de carbono. El óxido etileno es una molécula muy pequeña (C_2H_4O), que le permite tener una gran capacidad de penetración, incluso en dispositivos con geometrías complicadas. Esta se agrega a los grupos hidroxilo, amino y carboxilo, desnaturalizando proteínas y ácidos nucleicos y, por tanto, inactivando el microbio. Posteriormente, en el proceso de desgasificación las distintas impurezas que hayan reaccionado con el óxido etileno pueden ser eliminadas, presentando una menor cantidad de carbono.

No se aprecian diferencias estadísticamente significativas, aunque se mantiene la tendencia de un mayor contenido de carbono (contaminación atmosférica) y menor contenido de plata en las muestras esterilizadas con autoclave. Esta tendencia a una mayor contaminación en las muestras de titanio esterilizadas con autoclave ha sido reportada en la literatura [67].

Por tanto, se puede concluir que se podría incluir en el procedimiento de calidad, un control rutinario, aleatorio en el tiempo, de la topografía de las muestras (3000X) mediante SEM para validar el proceso industrial. Actualmente, existe una variedad de tipos microscopios electrónicos de barrido de sobremesa, con precios más competitivos como para ser implementado en una empresa, o bien estipular el envío de muestras a un centro de microscopia electrónica de forma rutinaria.

Finalmente, tanto la técnica del SEM como el análisis químico mediante EDS, muestra que el método de esterilización no afecta ni a la topografía ni a la composición química. No obstante, según el método se puede dar cierta contaminación, como es el caso del autoclave.

5.1.2. Análisis XPS

La técnica de espectroscopía de energía dispersada de rayos X (EDS) utilizada en el apartado anterior presenta una serie de desventajas como los valores mínimos de detección analítica (0,5-1% en peso) o la profundidad media de análisis (≅ 10 μm). Con el fin de paliar estas desventajas, los resultados anteriores se han contrastado con la técnica de XPS. Además, mediante la deconvulación de los picos obtenidos, permite averiguar los enlaces de los distintos elementos químicos. Esto aporta una información muy relevante como la relación de óxidos superficiales, grupos funcionales superficiales, estados de oxidación, entre otros. Esto se puede observar en las siguientes figuras:

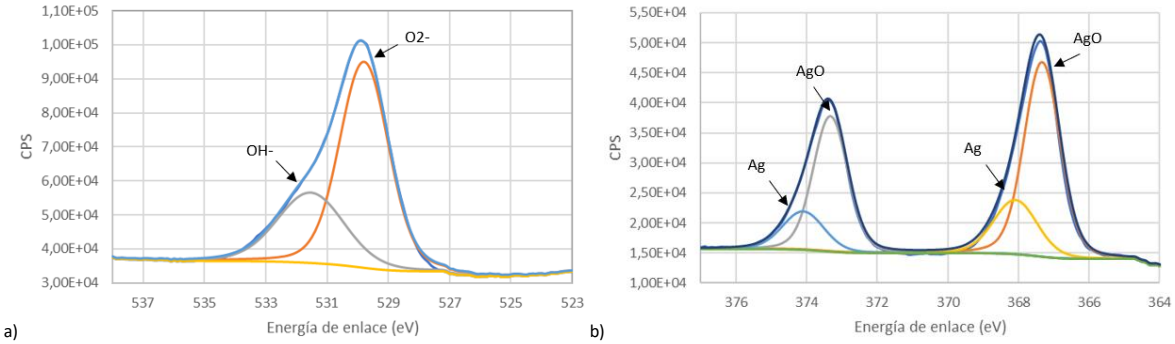


Figura 23. Espectro XPS de la muestra control 2 del: (a) O1s y (b) Ag3d [68], [69].

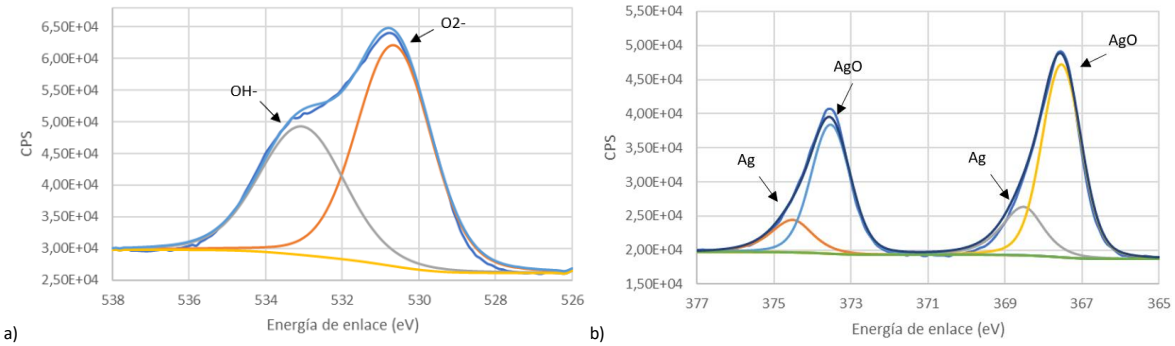


Figura 24. Espectro XPS de la muestra autoclave del: (a) O1s y (b) Ag3d [68], [69].

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH
Escola d'Enginyeria de Barcelona Est

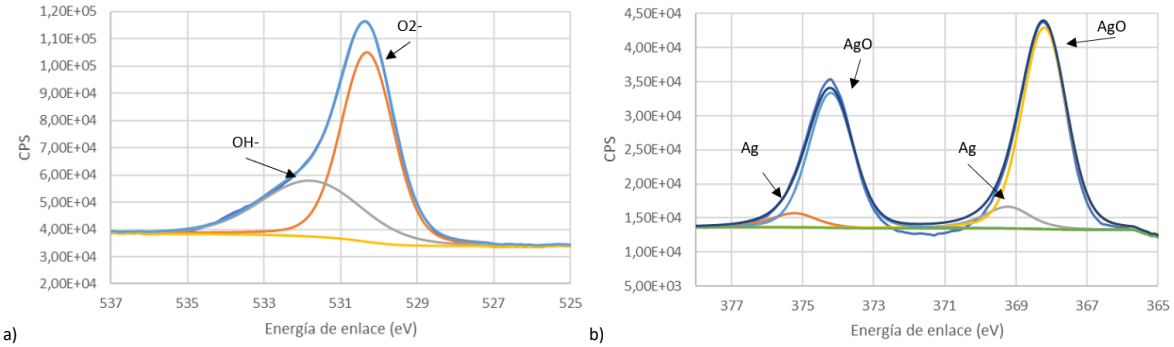


Figura 25. Espectro XPS de la muestra gamma del: (a) O1s y (b) Ag3d [68], [69].

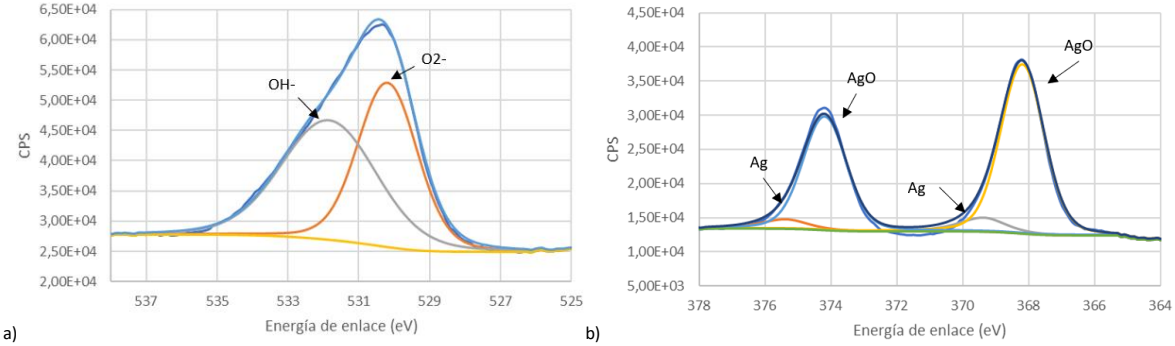


Figura 26. Espectro XPS de la muestra OE del: (a) O1s y (b) Ag3d [68], [69].

Gracias a los distintos espectros anteriores, se conoce como se encuentran los distintos elementos enlazados. En primer lugar, se observa para los espectros de O1s lo que ya se esperaba. Aparecen OH^- y O^{2-} que provienen de óxidos del tipo rutilo/anatasa, así como titanatos de calcio, que se forman durante el tratamiento termoquímico. Por otro lado, en los espectros de Ag3d, se observa la presencia tanto de plata metálica y óxidos. Se esperaba obtener una mayor cantidad de plata metálica ya que los óxidos de plata a alta temperatura (aproximadamente 250 ºC), tienden a reducirse dando lugar a plata neutra. Es por ello por lo que se comprueban los porcentajes atómicos de cada muestra, y se calculan las distintas ratios de los elementos del oxígeno y de la plata. En la Tabla 9, se presentan los porcentajes atómicos resultantes de las deconvulaciones de los picos O1s y $Ag3d_{5/2}$.

Tabla 9. Porcentajes atómicos obtenidos mediante la técnica XPS.

Porcentajes atómicos enlaces (%)												
Elemento	**O 1s**							**Ag $3d_{5/2}$**				
Enlace	**O^{2-}**			**OH^-**			**Ratio O^{2-}/OH^-**	**Ag**			**Ag_2O**			**Ratio Ag/ Ag_2O**
Control 2	69,52	±	1,90	30,49	±	1,90	2,28	24,34	±	3,24	75,66	±	3,25	0,32
Autoclave	60,93	±	1,03	39,08	±	1,03	1,56	27,40	±	1,82	72,60	±	1,82	0,38
Gamma	77,85	±	3,60	22,16	±	3,60	3,51	19,42	±	0,48	80,58	±	0,48	0,24
OE	77,17	±	0,96	22,83	±	0,96	3,38	6,89	±	0,06	93,12	±	0,06	0,07

Acerca de la deconvulución del pico O1s, muestra que los átomos de oxígeno están enlazados formando óxidos y titanatos correspondientes a la capa bioactiva originada por el tratamiento termoquímico, y también formando grupos hidroxilos en su superficie. Las ratios O^{2-}/OH^{-} indican que el método de esterilización de autoclave introduce un mayor porcentaje de grupos hidroxilos polares. Por tanto, cambian las propiedades superficiales de mojabilidad. Este hecho es lógico, ya que para el proceso de esterilización se utiliza vapor de agua a elevadas temperaturas.

Sobre la deconvulación de los picos de Ag3d, muestra que la plata se encuentra principalmente oxidada (367.9eV: Ag_2O y 367,6eV: AgO) y en forma de plata metálica (368,2eV: Ag). Cabe señalar que tanto las energías de enlace como los valores de los parámetros Auger, para los compuestos Ag_2O y AgO son muy similares, lo que dificulta su identificación. No obstante, se considera que el óxido Ag_2O con la valencia más estable, es el mayoritario. Las ratios Ag/Ag_2O-AgO, indican que el componente mayoritario de la plata es en forma de óxidos. Como se ha comentado anteriormente, a diferencia de la plata metálica, el óxido de plata es ligeramente soluble en agua debido a la formación del ion $Ag(OH)_2^-$ y posiblemente productos de hidrólisis relacionados. Esto es importante porque es conocido que los iones de plata cargados positivamente (Ag^+), son un agente microbiano para las bacterias, hongos y ciertos virus. Los iones de plata actúan sobre los microorganismos a través de varios modos de acción [70], [71], por ejemplo, bloqueando el sistema respiratorio bacteriano a través de su membrana o bloqueando la división celular al unirse al ADN.

En definitiva, entre los distintos métodos de esterilización se observan espectros similares (Figura 23, Figura 24, Figura 25 y Figura 26). Sin embargo, en los porcentajes atómicos de los distintos enlaces (Tabla 9) se observa cierta diferencia entre sí. Esto puede ser consecuencia, como se ha comentado en apartados anteriores, de la contaminación que se haya podido dar durante la esterilización o manipulación de las muestras, o bien del diseño poco preciso de las distintas muestras.

5.2. Liberación de iones (ICP)

En el estudio de liberación de iones, se ha cuantificado la liberación del ion Ag^+ para las distintas muestras sumergidas en agua Milli – Q. El ensayo se ha realizado acumulativamente, es decir, la misma muestra se sumerge sucesivamente en agua Milli – Q, analizando la liberación en cada momento. Finalmente, se obtienen las curvas de liberación de los iones Ag^+ que se presentan en la Figura 27.

Es interesante que se libere una cierta concentración de iones plata de forma continua, el máximo tiempo posible. Que apenas se libere plata puede ser desfavorable si no proporciona esa capacidad antimicrobiana que se busca aunque, una liberación en exceso, también porque esta puede llegar a ser tóxica.

Comparando las curvas de las distintas muestras, existe la misma tendencia en todas, aunque se observa diferencia entre los valores de las series. En todas las muestras (control 2, autoclave, gamma y óxido etileno), sucede que durante las primeras 24 horas es cuando más plata se libera. Pasado un día, esta liberación disminuye considerablemente, estabilizándose a los 3 días.

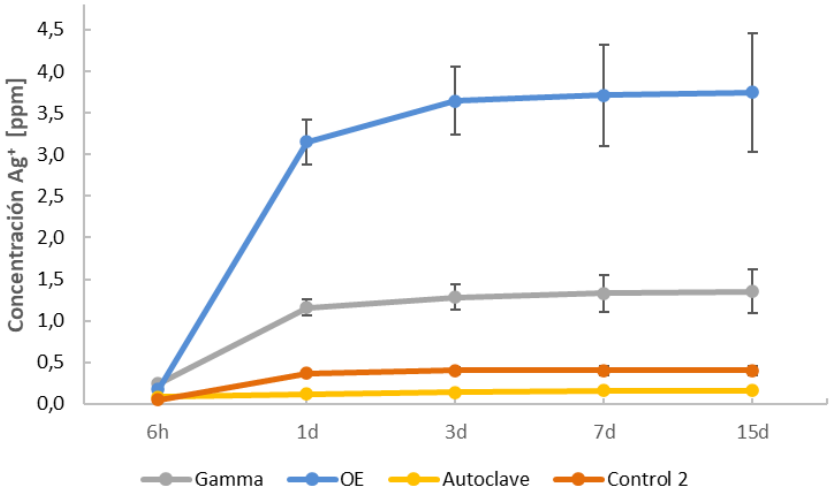


Figura 27. Gráfico de la liberación de concentración de Ag^+ en ppm, para un periodo total de 15 días.

En la Figura 27 se observa que existe diferencia entre los distintos tipos de muestras esterilizadas y de control. Destaca que la muestra esterilizada mediante óxido etileno muestra una mayor concentración liberada del ion plata, que corresponde con la que presenta una mayor presencia de óxidos de plata según la Tabla 9. Esto es coherente ya que los óxidos de plata son ligeramente solubles en agua. Esto es positivo, ya que esta liberación no se encuentra dentro de los límites de toxicidad de la plata [72].

Los valores de concentración liberada de Ag^+ de las muestras gamma, autoclave y control 2, son similares a los de la literatura [73], [31], [7]. En el caso de T. Kizuki y colaboradores [73], en tal solo 20h se estabiliza la liberación de plata en un valor ligeramente superior a 1 ppm, como es el caso de la muestra esterilizada mediante radiación gamma. Las diferencias que se dan, puede ser debido a que, para añadir iones calcio realizan una inmersión en cloruro de calcio y, tras el tratamiento termoquímico, con nitrato de plata, lo que puede fomentar una mayor adherencia de plata en superficie. Por otro lado, en el caso de A. Rodríguez y colaboradores [31], estudian la liberación empleando solución de *Hanks* (HBSS, *Hanks Balanced Salt Solution*) en vez de agua ultrapura. La solución de Hanks está compuesta de diversas sales además de glucosa, con las cuales puede reaccionar la plata promoviendo la liberación de Ag^+. En ambos estudios, esa cantidad de plata liberada no se considera tóxica, por tanto, tampoco la liberada por las muestras gamma, autoclave y control 2.

En resumen, existen diferencias entre las distintas muestras esterilizadas y de control. En este caso se podría determinar que la esterilización si influye, aunque tras analizar los distintos resultados

obtenidos, se relacionan las diferencias entre muestras con las limitaciones del tratamiento alcalino realizado (apartado 4.1) y el método de fabricación de las muestras. Es necesario respaldar los resultados obtenidos con otros ensayos como un ensayo microbiológico y/o de adhesión celular.

5.3. Ensayo microbiológico

A modo de comprobar la capacidad antibacteriana de las muestras, se realizaron los ensayos microbiológicos y se determinó la adhesión y proliferación bacterianas, con una representante de Gram negativa *E. coli* (Figura 28), y una de Gram positiva *S. aureus* (Figura 29).

En el ensayo de adhesión (1h de incubación), se observa en la gráfica de la Figura 28 a y Figura 29, los resultados obtenidos para los diferentes tratamientos de esterilización. Se aprecia que, en el caso de esterilización con autoclave, tanto para la *E. coli* como para la *S. aureus*, aparecen un número mayor de UFC/mL. Posteriormente, pasadas las tres horas de incubación correspondientes a la etapa de proliferación (Figura 28 b y Figura 29), en todas las muestras se observa una gran disminución del número de colonias, aproximadamente 10^5 menos, en ambas cepas y especialmente para la *E. coli.*

En el caso de la cepa *E. coli*, al haber obtenido valores tan bajos de UFC'S en la etapa de proliferación, se ha representado la gráfica de adhesión y proliferación por separado (Figura 28), mientras que para la cepa *S. aureus* se ha representado la gráfica comparativa de ambas etapas (Figura 29). Esto puede deberse a una mayor resistencia a los antimicrobianos de la cepa *S. aureus*. Un artículo del Centro Nacional de Información Biotecnológico (NCBI) en el que estudian el crecimiento de ambas bacterias *E. coli* y *S.* aureus en diferentes medios nutritivos [74], concluye que la *S. aureus* tiene una mayor capacidad de sobrevivir que la *E. coli*. Esto se puede deber a sus factores de virulencia y resistencia a los antibacterianos, por lo que se necesita de estrategias específicas para eliminarla. Si bien ambas bacterias presentan resistencia a múltiples antibióticos, los mecanismos específicos que contribuyen a su supervivencia y resistencia varían. La principal diferencia es que la *S. aureus* es capaz de sobrevivir en condiciones más extremas durante la colonización e infección. Además, se ha demostrado que *S. aureus* tiene múltiples estrategias para atacar a los anticuerpos [75], [76], lo que puede contribuir a su capacidad para inhibir la unión de anticuerpos y evadir las respuestas inmunitarias. Por tanto, tiene sentido que aparezcan más bacterias *S. aureus* aun habiendo la presencia de plata en la muestra, en comparación a la *E. coli*.

Teniendo en cuenta los resultados de XPS (Tabla 9), donde se aprecia que las muestras esterilizadas mediante autoclave presentan menor cantidad de plata, esto podría explicar el efecto menos antibacteriano de estas muestras.

A excepción de las muestras esterilizadas con autoclave, los valores de adhesión son bastante similares. No hay diferencias significativas entre el control 2 y las muestras esterilizadas con radiación gamma y óxido de etileno, para la *E. coli*. En el caso de la cepa *S. aureus,* tampoco hay diferencias significativas entre el número de células bacterianas de las muestras control 2, con las muestras esterilizadas con óxido de etileno y radiación gamma.

El control 1, presenta valores de viabilidad bacteriana muy por encima de los resultados para las superficies tratadas con plata (aproximadamente 10^7 UFC/mL según la OD empleada), por lo que no se han representado en las gráficas comparativas. Esto, confirma que el tratamiento termoquímico añadiendo plata en la superficie tiene un efecto antibacteriano, independientemente del tratamiento de esterilización posterior, a excepción del autoclave.

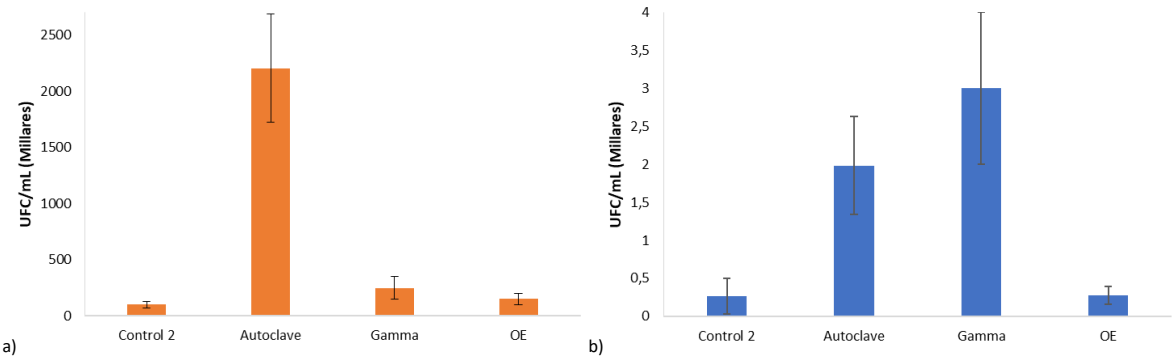


Figura 28. Gráfica mostrando el número de células viables (UFC/mL), en función del proceso de esterilización de la muestra de la cepa E. coli para: (a) Etapa de adhesión (1h incubación) (b) Etapa proliferación (3h incubación).

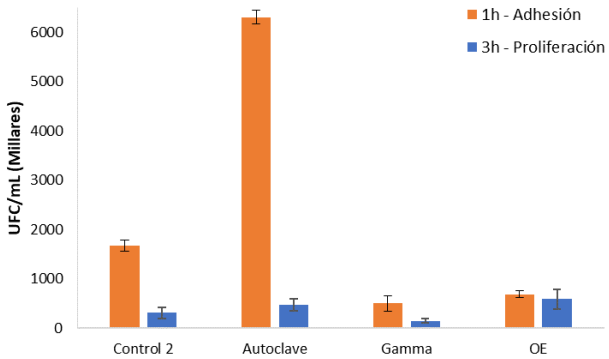
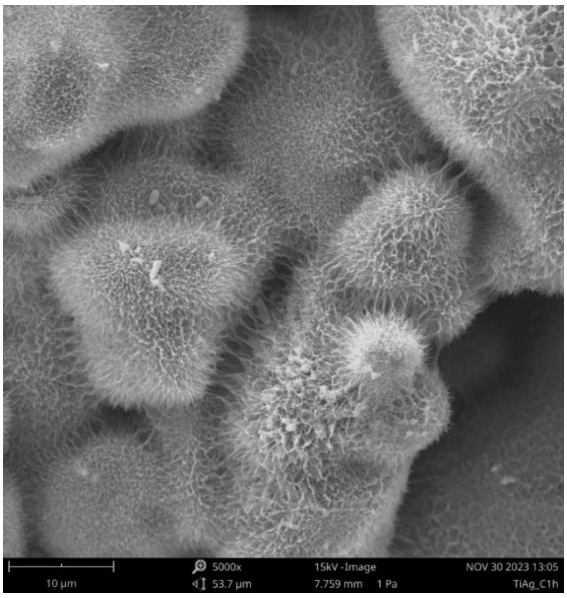


Figura 29. Gráfica comparativa de la etapa de adhesión (1h incubación) y proliferación (3h incubación), mostrando el número de células viables (UFC/mL) en función del proceso de esterilización de la muestra, de la cepa S. aureus.

A continuación, se muestran imágenes de microscopía electrónica de *E. coli* (Figura 30) y *S. aureus* (Figura 31), adheridas a las superficies tratadas con plata y muestras de control sin plata.

a) 

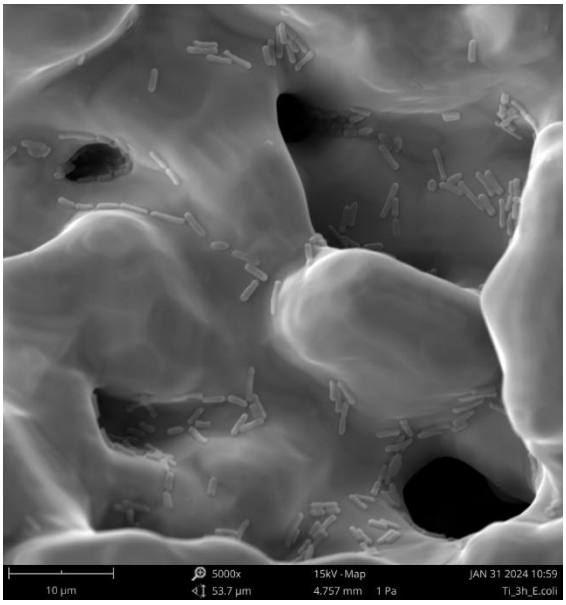
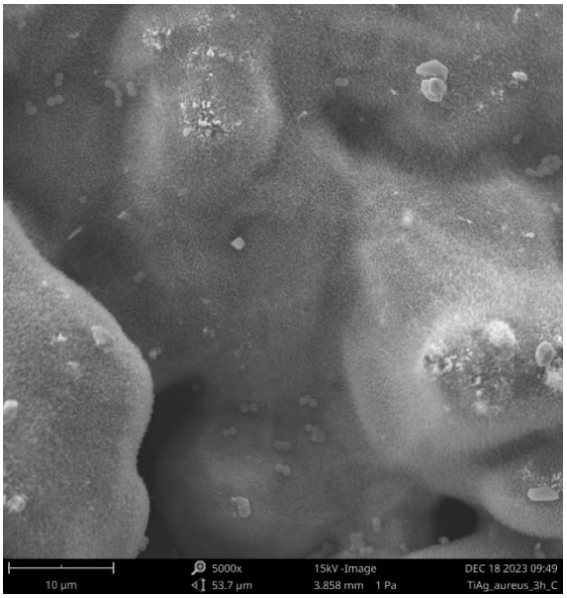
b) 

Figura 30. Imagen SEM con bacteria E. Coli adherida a 5000 aumentos: (a) muestra control 2 y (b) muestra de control 1.

a) 

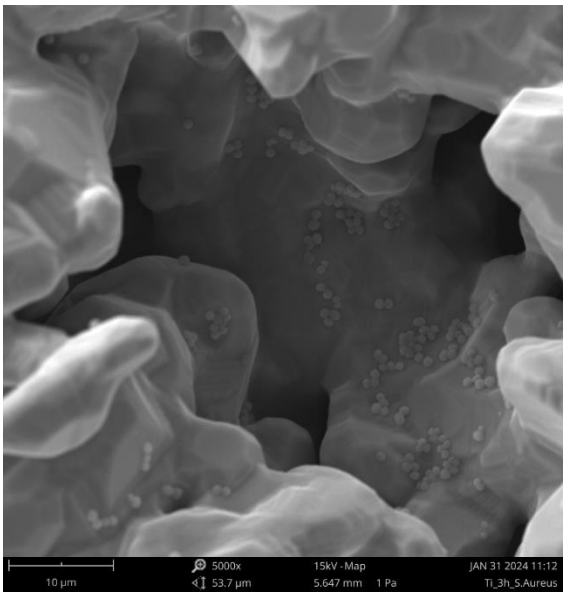
b) 

Figura 31. Imagen SEM con bacteria S. aureus adherida a 5000 aumentos: (a) muestra control 2 y (b) muestras de control 1.

Por último, acerca de la Figura 30, se puede observar una clara diferencia entre el número de bacterias *E. coli* de la muestra control 2 (Figura 30 a) y control 1 (Figura 30 b). Esto permite confirmar que la plata tiene efecto antimicrobiano. Los mismo sucede con la bacteria *S. aureus* (Figura 31).

5.4. Ensayo adhesión celular

El objetivo del ensayo de adhesión y proliferación celular es comparar la respuesta osteoblástica de las superficies tratadas a partir de tratamientos termoquímicos (apartado 4.1) con posterior esterilización, mediante diferentes técnicas. En la Figura 32 se muestran los resultados de viabilidad celular en función del tiempo para cada tratamiento de esterilización.

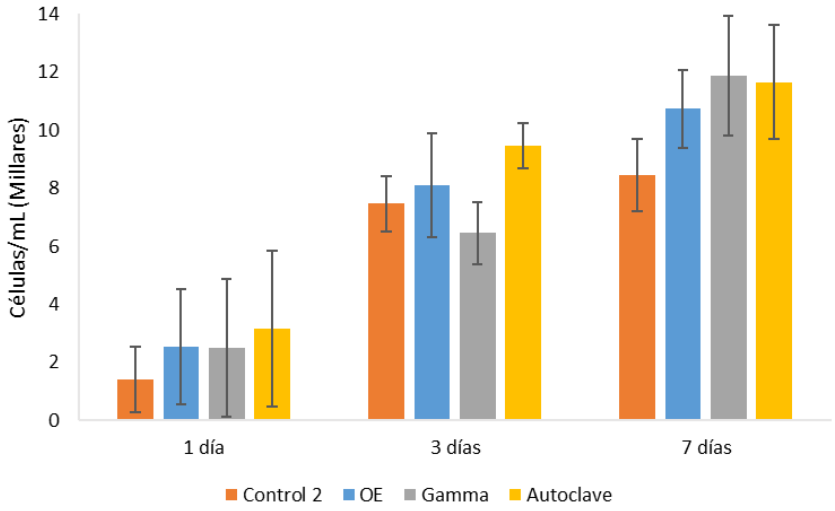


Figura 32. Gráfico del número de células viables en función del tipo de muestra para un periodo total de 7 días.

En cuanto a la adhesión celular, se puede observar que hay en general una leve mayor adhesión en las muestras esterilizadas que en el control 2, pero sin mostrar diferencias significativas. En cuanto a la proliferación celular, se observa que hay una tendencia a incrementar el número de células viables hasta los 7 días en todas las muestras.

Una alta presencia de plata en la superficie podría ser citotóxico para las células, como se ha comentado en el apartado 2.3.4. Aunque en algunos casos se haya visto una liberación de plata más elevada (apartado 5.2), esta cantidad no se considera tóxica. Las diferencias que se aprecian pueden estar relacionadas con el diseño de las probetas. Al ser un diseño irregular, puede fomentar que en algunas superficies las células se adhieran con mayor facilidad. Sin embargo, pasados los siete días se observa para todas las muestras, un aumento de la proliferación celular.

Teniendo en cuenta los resultados de adhesión y proliferación celular, no se observa una gran disparidad entre las muestras en ningún caso. Esto significa que las células se desarrollan de la misma forma en todas las muestras, independientemente de la esterilización.

6. Análisis del impacto ambiental

El análisis del impacto ambiental es el estudio de los factores relacionados con la realización del proyecto, que indican que consecuencias ambientales (positivas y negativas) ha tenido este para el medio ambiente. Por ejemplo, el material empleado, el consumo energético asociado a los distintos procesos, equipos empleados y la gestión de residuos, se tienen en cuenta y se determina su contribución. Por tanto, el objetivo de este análisis es cuantificar el impacto sobre el medio ambiente y, a ser posible, considerarlo en proyectos futuros similares.

6.1. Materiales

Como material principal, están las muestras de Ti c.p. de grado 2. Estas son proporcionadas por la empresa AMES Medical (Sant Vicenç dels Horts, Barcelona), y no hay asociado un gasto de material en la obtención de estas. Además, se han usado la cantidad necesaria e incluso en algunos casos se ha aprovechado una misma muestra para más de un estudio. Por otro lado, también se han usado distintos reactivos químicos provisionados por el grupo BBT, y solamente se han usado aquellos que eran necesarios para preparar y realizar cualquier ensayo. Estos productos químicos son almacenados de forma segura en distintos armarios, según el protocolo de laboratorio. En la Tabla 10 se muestran los distintos productos químicos empleados junto con sus características más relevantes para el análisis ambiental.

Tabla 10. Características principales de los productos químicos empleados [77], [78].

Producto químico	Composición	Seguridad	Residuo
Gránulos de hidróxido de sodio	NaOH		Contenedor de bases
Ácido Nítrico 69%	HNO_3		Contenedor de ácidos
Acetato de calcio	$C_4H_6CaO_4$	Producto no peligroso	Contenedor especifico de $C_4H_6CaO_4$ + $AgNO_3$

Nitrato de plata	$AgNO_3$		Contenedor especifico de $C_4H_6CaO_4$ + $AgNO_3$
Infusión de cerebro y corazón	BHI	Producto no peligroso	Contenedor de microbiología con posterior esterilización mediante autoclave
Agar Triptona – Soja	TSA	Producto no peligroso	Contenedor de microbiología con posterior esterilización mediante autoclave
Triptona – Soja	TSB	Producto no peligroso	Contenedor de microbiología con posterior esterilización mediante autoclave
Solución salina tamponada con fosfato	PBS	Producto no peligroso	Contenedor de microbiología con posterior esterilización mediante autoclave
Solución de glutaraldehído	$OHC(CH_2)_3CHO$		Contenedor específico de glutaraldehído

Por último, se han empleado materiales de un solo uso de procedencia polimérica como pipetas, falcons, eppendorfs, etc. Se ha intentado disminuir su consumo, pero dada la inexperiencia en este tipo de ensayos, su gestión ha sido más complicada y ha representado ser el gasto de material más elevado. Para poder tener una idea, en un único ensayo de microbiología se han llegado a gastar alrededor de 200 pipetas solo de 1 mL. Esto puede suponer un gran impacto medioambiental y es por ello por lo que hay una gestión de residuos para reducir este impacto al mínimo.

6.2. Consumo energético

En este proyecto se emplea una gran variedad de maquinaria, la cual tiene un gasto energético asociado. En general, las máquinas que se emplean, como una báscula, un agitador magnético, entre otros, se han usado escasamente o bien no implican un impacto grande en el consumo energético. Sin embargo, también se emplea máquinas como el Horno MUFLA, el autoclave, el SEM, el XPS y el ICP – MS que, debido a su funcionamiento, sí implican un consumo energético más relevante. Se ha preguntado a los distintos técnicos de laboratorio el consumo medio de cada máquina, y se han

obtenido los valores que se muestran en la Tabla 11. Un detalle que comentar es que no se ha tenido en cuenta los procesos de esterilización de radiación gamma y óxido etileno, debido a que se han externalizado y no se han realizado en las propias instalaciones.

Tabla 11. Valores del consumo de energía de la maquinaria empleada.

Maquinaria	Tiempo uso	Consumo	Consumo total
Autoclave	8 h	5 kW	40 kWh
Horno MUFLA	80 h	1,8 kW	144 kWh
SEM	5 h	3,2 kW	16 kWh
XPS	3 h	4 kW	12 kWh
ICP – MS	1 h	5 kW/h	5 kWh
TOTAL			**217 kWh**

Para poder comparar el valor obtenido de 217 kWh y saber si ha implicado un gasto elevado o no, se compara con un estudio realizado en centros universitarios de España [79] acerca del consumo energético entre los años 2013 – 2020 de CRUE (Conferencia de Rectores de las Universidades Españolas). En el estudio para el año 2020, el consumo medio por persona en el departamento de investigación es de 88,45 kWh/persona. Esto indica que este proyecto tiene asociado un alto consumo energético, por lo que sería interesante reducir el uso de elementos, especialmente del Horno MUFLA que es el que supone el mayor consumo.

Adicionalmente, se realiza el cálculo y registro de la huella de carbono. Este dato pretende obtener los valores de CO_2 equivalente emitidas a la atmósfera. El cálculo es complejo ya que se tiene en cuenta variables como la electricidad, combustibles fósiles, gases fluorados, transporte dentro de la propia organización, viajes, entre otros. Sin embargo, en este análisis se tiene en cuenta únicamente la energía eléctrica consumida por las distintas máquinas empleadas, por lo que se simplifica este cálculo. Siguiendo una la guía [80] para calcular la huella de carbono a través de la norma EN ISO14064-1:2019 [81], se obtiene la Ecuación 2 y se realiza el cálculo.

$$\frac{kWh}{\text{año}} \times \ factor\ de\ emisión = Kg\ de\ CO_2 \qquad \textit{Ecuación 2}$$

$$217 \times \ 0{,}85 = 184{,}45\ Kg\ de\ CO_2$$

Por último, se obtiene que el proyecto ha emitido **184,45 Kg de CO_2** a la atmosfera.

6.3. Gestión de residuos

En los laboratorios se generan una gran variedad de residuos no peligrosos y peligrosos. Con el objetivo de gestionarlos correctamente, se consultan los distintos pasos del procedimiento que se necesita

hacer, des del momento en que se generan hasta que son retirados por una empresa adjudicataria del servicio de recogida, transporte y tratamiento de residuos tóxicos y peligroso a la UPC. Los pasos que seguir para son los siguientes [82]:

PASO 1: *Identificación y clasificación de residuos de laboratorio.* Los residuos tóxicos y peligrosos que se generan en el laboratorio se deben clasificar y determinar de la mejor manera para poder gestionarlos.

PASO 2: *Envasado de residuos de laboratorio.* Una vez identificado los residuos, es necesario seleccionar el envase más adecuado para poder almacenarlo temporalmente.

PASO 3: *Etiquetaje de residuos de laboratorio.* En las etiquetas debe de aparecer suficiente información para notificar el riesgo asociado tanto al productor, transportista como al gestor final.

PASO 4: *Almacenamiento de residuos de laboratorio.* En el caso de la Universidad Politécnica de Cataluña, los residuos se pueden guardar temporalmente en almacenes y/o armarios de seguridad preparados para acumular residuos tóxicos y peligrosos.

PASO 5: *Proceso de recogida de residuos del laboratorio.* Siguiendo con los criterios y calendario establecido en los distintos Centros o Campus, se entregan los residuos al gestor autorizado en los términos y condiciones legalmente establecidas. Este último paso, es gestionado por la empresa *aproema – SRCL CONSENUR*, encargada de la gestión racional y avanzada de residuos biosanitarios, citotóxicos y químicos.

Finalmente, estos cinco pasos se deben llevar a cabo especialmente para los distintos residuos tóxicos, sin embargo, para los residuos no peligrosos se sigue un procedimiento similar. La gestión de estos consiste en identificarlos y simplemente se vierten en el contenedor correspondiente. En algunas ocasiones se encarga la propia universidad, y en otras a través también de la empresa *aproema – SRCL CONSENUR.*

7. Conclusiones

Las distintas conclusiones a las que se llegan durante la realización del proyecto son las siguientes:

I. Caracterización superficial

El uso del SEM confirma la formación de una capa bioactiva debido a la presencia de iones de calcio, validando la efectividad del tratamiento termoquímico. Se sugiere emplear esta técnica como control de verificación, particularmente entre la *Segunda* y *Tercera Etapa* del proceso, donde se puede observar la formación de titanatos de calcio y partículas de plata en la superficie. Esto permite evitar tratamientos térmicos innecesarios y los costes asociados si surgen problemas en etapas anteriores. También se propone realizar un control justo después de la esterilización para asegurar que no se haya modificado la superficie de la muestra.

Por otro lado, la técnica XPS permite la deconvolución de los picos de O1s y Ag3d, revelando los diferentes porcentajes atómicos de los enlaces. Se observa que el óxido de plata Ag_2O es el componente mayoritario, lo cual es beneficioso ya que facilita la liberación del ion Ag^+ y mejora las propiedades antimicrobianas. Aunque los diferentes métodos de esterilización muestran una tendencia similar, las diferencias entre ellos están relacionadas con la posible contaminación durante el proceso de esterilización o con el diseño poco preciso de las muestras.

II. Liberación de iones (ICP – MS)

Acerca de la liberación del ion Ag^+, las distintas probetas presentan una misma tendencia y pasadas las primeras 24h se estabiliza la liberación. Se observa que la muestra esterilizada mediante óxido etileno libera una superior cantidad de Ag^+, debido a que presenta una mayor presencia de óxidos de plata. Acerca de las demás muestras, estas presentan valores inferiores similares a la literatura consultada. Por último, comparando con los distintos estudios, se cree que la diferencia de valores entre las distintas probetas esté relacionada con el proceso de obtención de estas o con las características del ensayo de liberación de iones.

III. Ensayo microbiológico

En el ensayo microbiológico, se confirma la capacidad antibacteriana de las probetas para ambas cepas *E. coli* y *S. aureus*. A excepción de la muestra autoclave, el resto no presentan diferencias significativas. La probeta esterilizada mediante autoclave muestra un número más elevado de UFC/mL, que se relaciona con una menor presencia de plata que las otras muestras. Este hecho se relaciona con el proceso termoquímico por el cual se obtienen las distintas muestras, previo a la esterilización.

IV. Ensayo adhesión celular

Acerca de los resultados obtenidos en el ensayo de adhesión celular, tanto en la etapa de adhesión como proliferación las muestras presentan una tendencia similar. Se concluye que las células se desarrollan de la misma forma en todas las muestras, independientemente de la esterilización.

V. Fabricación muestras (DIW)

El factor más interesante del uso de esta técnica ha sido su flexibilidad del diseño, dando la posibilidad de realizar muestras con una densidad de llenado y microporosidad específica. Sin embargo, los defectos de impresión como las irregularidades superficiales, o bien la necesidad de post-procesamientos, hacen que las probetas que se obtienen presenten cierta discontinuidad. Este fenómeno dificulta la caracterización de las muestras y el tratamiento de estas. Esto se observa en el ensayo a compresión que se intentó llevar a cabo pero que no fue posible, debido a que las probetas no cumplían con las características según la norma ASTM o ISO. En el apartado 4.6, se observa como las probetas presentan una geometría y diseño muy irregular y los resultados obtenidos (Anexo A4) no son fiables.

VI. Conclusiones generales y sugerencias

A partir de los distintos resultados obtenidos, se confirma que el método de esterilización no modifica las propiedades del injerto. Es cierto que sí se observan diferencias y algunas probetas presentan, por ejemplo, una mayor capacidad microbiana o liberación iónica. Estas diferencias, se asocian al proceso de obtención de las muestras.

Se ha observado que la tecnología DIW empleada, proporciona probetas de baja precisión. Esta poca exactitud entre las muestras causa que el tratamiento termoquímico no sea igual de eficiente por tanto, la adición de plata no sea homogénea en la estructura de la probeta. No obstante, se conoce la influencia del uso de la estructura HC como patrón de densidad de llenado. Esta puede tener un impacto significativo en sus propiedades mecánicas, incluida la resistencia, rigidez, peso y eficiencia energética. La propiedad más interesante es la de eficiencia energética porque, una estructura HC con una densidad de llenado óptima, puede ofrecer una excelente relación resistencia-peso.

Acerca del método de esterilización recomendado, dependería de los intereses de la empresa que quisiera implementarlo. El más sencillo de implementar en la empresa y barato es el autoclave, mientras que el de óxido etileno presenta unos resultados más interesantes, pero es complicado implementarlo y genera residuos tóxicos.

Finalmente, como sugerencias para proyectos futuros, una mejora del proceso de obtención de muestras sería muy recomendable. Mediante la tecnología DIW, se obtienen probetas de forma rápida

y sin un coste elevado asociado, pero también se obtienen de una precisión muy baja, lo que no permite determinar propiedades precisas de las muestras. También sería recomendable revisar el tratamiento termoquímico y asegurar que todas las muestras son tratadas de igual manera. Una propuesta seria realizar el procedimiento con pocas muestras (entre 5 – 15) a la vez. Por estos motivos, se sugiere realizar controles de la estructura de las muestras mediante SEM en una o dos etapas, durante el proceso de obtención de la muestra.

8. Presupuesto y Análisis Económico

La obtención de un presupuesto y la realización de un análisis económico muestra el coste del proyecto. Debe incluir el coste relacionado con materiales, equipo y personal. A continuación, se muestran las distintas tablas donde se adjunta la información del coste y el cálculo aproximado del gasto que han supuesto los distintos recursos y personal empleado.

En la Tabla 12 se muestran los distintos costes que suponen el uso de los distintos productos químicos. El valor del coste/unidad se ha obtenido a través de los proveedores PanReacAppliChem y SIGMA [77], [78].

Tabla 12. Coste de los productos químicos empleados.

Producto	Cantidad	Coste / Unidad	Coste
Acetona	700 mL	54,2 €/L	37,94 €
Etanol	700 mL	45 €/L	31,50 €
Agua destilada	3,5 L	20 €/L	70 €
Ácido nítrico (HNO_3) 69%	1,5 L	67,7 €/L	101,55 €
Hidróxido de sodio (NaOH)	250 g	62 €/Kg	15,5 €
Nitrato de plata ($AgNO_3$)	0,012 g	132 €/25g	0,07 €
Acetato de calcio ($C_4H_6CaO_4$)	O,11 g	75,3 €/100g	0,09 €
PBS	4 discos	265,3 €/100 discos	10,62 €
TSA	100 g	90,8 €/500g	18,16 €
BHI	100 g	233,2 €/500g	46,64 €
TOTAL			**332,07 €**

En la Tabla 13 se muestran los costes de los materiales usados en los distintos ensayos. En este caso, la información del coste/unidad ha sido proporcionada por LabBox y Fisher Scientific [83], [84].

Tabla 13. Coste de los distintos materiales empleados.

Material	Cantidad	Coste / Unidad	Coste
Guantes de nitrilo	70	9 €/100 u	6,3 €
Papel absorbente	20	0,44 €/u	8,8 €
Multiplacas x 24 pozos	20	66,75 €/50 u	26,7 €
Multiplacas x 48 pozos	8	66,75 €/50 u	10,68 €
Envase tapa roja (100 mL)	8	150 €/ 1000 u	1,2 €
Pipetas Pasteur	10	10 €/ 500 u	0,2 €
Tubos ICP (10 mL)	66	190,12 €/1000 u	12,55 €

Tapones ICP	66	13,10 €/10 u	86,46 €
Falcons (15 mL)	55	132,90 €/500 u	14,62 €
Falcons (50 mL)	20	199,72 €/500 u	7,99 €
Eppendorfs (1,5 mL)	66	22,50 €/500 u	2,97 €
Pipetas (25 mL)	10	156 €/200 u	7,8 €
Pipetas (10 mL)	25	94,80 €/200 u	11,85 €
Pipetas (5 mL)	75	55,30 €/28 u	148,13 €
Pipetas (1 mL)	112	55,30 €/28 u	221,2 €
Pipetas (200 μL)	224	38,90 €/1000 u	8,72 €
Placas Petri	264	137 €/600 u	60,28 €
TOTAL			**636,45 €**

En la siguiente Tabla 14 aparecen los costes relacionados con los distintos equipos y procesos. Esta información se obtiene a través de la página web del centro multiescala de la EEBE – UPC, Aragogamma y Archimedes - Soadco.

Tabla 14. Coste del uso de los distintos equipos empleados.

Equipo	Tiempo total	Coste / hora	Coste
Autoclave	8h	50,35 €/h	402,8 €
Radiación gamma	8h	80 €/h	640 €
Óxido Etileno	8h	80 €/h	640 €
Horno MUFLA	80h	1,2 €/h	96 €
SEM	5h	250 €/h	1250 €
Recubrimiento (Au)	1h	30 €/h	30 €
XPS	3h	120 €/h	360 €
ICP	1h	150 €/h	150 €
TOTAL			**3568,8 €**

En la Tabla 15, se muestran los costes relacionados de las distintas normas consultadas en el proyecto. Esta información se obtiene a través de la página web de AENOR.

Tabla 15. Coste de las distintas normas consultadas durante el proyecto.

Norma	Coste
UNE-EN 556-1:2002/AC:2007	Gratuita
UNE-EN ISO 11737-1:2018	120 €
UNE-EN ISO 10993-12:2022	70 €
UNE-EN ISO14064-1:2019	109 €
TOTAL	**299 €**

En la Tabla 16, aparecen los precios de las distintas licencias y softwares empleados y se obtienen a través de las páginas oficiales de estos. En todos los programas se escoge la licencia versión estudiantes ya que es la que se ha empleado.

Tabla 16. Coste de las licencias y softwares empleados el proyecto.

Licencias y softwares	Coste
Microsoft Office Estudiantes	146 €
MATLAB and Simulink Student Suite	69 €
La Casa XPS	830 €
TOTAL	**1045 €**

En la Tabla 17 se muestran los costes relacionados con el personal involucrado en la realización del proyecto y que ha realizado ensayos o pruebas necesarias para la obtención de resultados. La información sobre los costes se ha obtenido de los distintos convenios.

Tabla 17. Coste del personal involucrado en los distintos ensayos y obtención de resultados.

Personal	Cantidad	Coste / hora	Coste
Ingeniero (director/codirector)	40 h	50 €/h	2000 €
Ingeniero técnico (autor)	750 h	16 €/h	12000 €
Técnico laboratorio 1 (Microbiología)	150 h	40 €/h	6000 €
Técnico laboratorio 2 (SEM)	6 h	40 €/h	240 €
Técnico laboratorio 3 (XPS)	4 h	40 €/h	160 €
Técnico laboratorio 4 (ICP - MS)	2 h	40 €/h	80 €
TOTAL			**20480 €**

Por último, se suman los distintos costes totales de las tablas anteriores y se obtiene el coste final del proyecto en la Tabla 18.

Tabla 18. Coste total del proyecto.

Norma	Coste
Productos químicos	332,07 €
Materiales	636,45 €
Equipos	3568,8 €
Normas	299 €
Licencias y Softwares	1045 €
Personal	20480 €
TOTAL	**26361,32 € + IVA**

Finalmente, el coste total del proyecto sin tener en cuenta el IVA, ha sido de veintiséis mil trescientos sesenta y uno con treinta y dos centésimos.

9. Bibliografía

[1] T. Kokubo y S. Yamaguchi, «Novel bioactive materials developed by simulated body fluid evaluation: Surface-modified Ti metal and its alloys,» *Acta Biomaterialia,* vol. 44, pp. 16-30, 15 Octubre 2016.

[2] K. Ronoh, F. Mwema, S. Dabees y D. Sobola, «Advances in sustainable grinding of different types of the titanium biomaterials for medical applications: A review,» *Biomedical Engineering Advances,* vol. 4, nº 100047, Diciembre 2022.

[3] M. Z. Al Mahmud, M. H. Mobarak, N. Hossain, M. A. Islam y M. T. Rayhan, «Emerging breakthroughs in biomaterials for orthopedic applications: A comprehensive review,» *Bioprinting,* vol. 36, nº e00323, 2023.

[4] M. Geetha, A. Singh, R. Asokamani y A. Gogia, «Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review,» *Progress in Materials Science,* vol. 54, nº 3, pp. 397-425, Mayo 2009.

[5] J. V. Cauich Rodríguez, «Desarrollo de biomateriales de origen polimérico en México,» 2020. [En línea]. Available: http://www.sociedadpolimerica.org.mx/node/187.

[6] M. D. Ortuño García, «Materiales para aplicaciones médicas: Biomateriales metálicos,» Julio 2022. [En línea]. Available: https://repositorio.upct.es/.

[7] D. Torres Garrido, «Tesis doctoral: Desarrollo de un nuevo proceso basado en la inyección 3D de tintas con carga metálica para fabricar prótesis porosas de titanio bioactivas y con porpiedades antibacterianas,» Barcelona, 2021.

[8] E. Liverani, G. Rogati, S. Pagani, S. Brogini, A. Fortunato y P. Caravaggi, «Mechanical interaction between additive-manufactured metal lattice structures and bone in compression: implications for stress shielding of orthopaedic implants,» *Mechanical behaviour of Biomedical Materials,* vol. 121, nº 104608, 2021.

[9] C. Leyens y M. Peters, Titanium and Titanium Alloys, Weinheim: WILEY-VCH, 2003.

[10] N. Poondla, T. Srivatsan, A. Patnaik y M. Petraroli, «A study of the microstructure and hardness of two titanium alloys: Commercially pure and Ti–6Al–4V,» *Alloys and Compounds,* vol. 486, nº 1-2, pp. 162-167, 2009.

[11] V. Sáez de Viteri y E. Fuentes, «Titanium and Titanium Alloys as Biomaterials,» *Tribology - Fundamentals and Advancements,* 22 Mayo 2013.

[12] S. Singh Bhasin, E. Perwez, S. Sachdeva y R. Mallick, «Trends in prosthetic biomaterials in implant dentistry,» *International Clinical Dental Research Organization ,* vol. 7, nº 148-59, 2015.

[13] F. Bassani, G. L. Liedl y P. Wyder, Encyclopedia of Condensed Matter Physics, Elsevier Ltd, 2005.

[14] W. Xue, B. Vamsi Krishna, A. Bandyopadhyay y S. Bose, «Processing and biocompatibility evaluation of laser processed porous titanium,» *Acta Biomaterialia,* vol. 3, nº 6, pp. 1007-1018, November 2007.

[15] J. M. Recio López, «OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE TITANIO POROSO PARA IMPLANTES DENTALES,» *Escuela técnica superior de ingenieros,* pp. 114-116, Junio 2009.

[16] C. Qi, F. Jiang y S. Yang, «Advanced honeycomb designs for improving mechanical properties: A review,» *Composites Part B: Engineering,* vol. 227, nº 109393, 2021.

[17] S. J. Gobbi, G. Reinke, V. J. Gobbi, Y. Rocha, T. P. Sousa y M. M. Coutinho, «Biomaterial: Concepts and Basics Properties,» *European International Journal of Science and Technology,* vol. 9, nº 2, 29 Febrero 2020.

[18] J. M. Jáquez Muñoz, C. Gaona Tiburcio, J. Chacón Nava, J. Cabral Miramontes, D. Nieves Mendoza, E. Maldonado Bandala, A. D. Delgado, J. P. Flores De los Rios, P. Bocchetta y F. Almeraya Calderón, «Electrochemical Corrosion of Titanium and Titanium Alloys Anodized in H2SO4 and H3PO4 Solutions,» *Coatings,* vol. 12, nº 3, 2022.

[19] D. Docio de Lera, «Biomateriales: el Titanio en Odontología,» de *Universidad de Salamanca*, Salamanca, 2013.

[20] P. Roza Miguel, «Tipos de prótesis de cadera,» MBA SURGICAL EMPOWERMENT, 2018. [En línea]. Available: https://www.mba.eu/blog/tipos-de-protesis-de-cadera/.

[21] «Tratamiento con implantes dentales,» CLINICA DENTALART, 2023. [En línea]. Available: https://www.clinicadentalartmallorca.com/service/implantes-dentales/.

[22] J. I. Ortega García, «Prótesis de Rodilla: beneficios, desventajas y riesgos,» TOP DOCTORS CO, 10 Octubre 2023. [En línea]. Available: https://www.topdoctors.mx/articulos-medicos/protesis-de-rodilla-beneficios-desventajas-y-riesgos/.

[23] «Mallas de titanio para una cirugía de craneoplastía,» MEDLEDD, 2021. [En línea]. Available: https://medledd.com.ve/neurocirugia/que-es-una-craneoplastia/mallas-de-titanio-para-craneoplastia/.

[24] J. Emsley, Nature's Building Blocks:An A-Z Guide to the Elements, Oxford University Press, 2001.

[25] S. E. Gad y S. C. Gad, «Biocompatibility,» *Encyclopedia of Toxicology,* vol. 2, nº 2024, pp. 91-98, 1 Noviembre 2023.

[26] M. Keane, M. T. O'Toole, E. R. y F. , Miller-Keane Encyclopedia & Dictionary of Medicine, Nursing & Allied Health, Séptima ed., Camden: Elsevier, 2003.

[27] Mosby, Mosby's Dictionary of Medicine, Nursing & Health Professions, Undécima ed., Elsevier, 2021.

[28] T. Albrektsson y C. Johansson, «Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration,» *Eur Spine J,* nº 10, pp. S96-S101, 2001.

[29] Z. Wang, «Recent advances in novel metallic honeycomb structure,» *Composites Part B: Engineering,* vol. 166, pp. 731-741, 2019.

[30] S. Afkhami, M. Amraei, L. Gardnerc, H. Piili, M. A. Wadee, A. Salminen y T. Björk, «Mechanical performance and design optimisation of metal honeycombs fabricated by laser powder bed fusion,» *Thin-Walled Structures,* vol. 180, nº 109864, Noviembre 2022.

[31] A. Rodríguez Contreras, D. Torres, B. Rafik, M. Ortiz Hernandez, M. P. Ginebra, J. A. Calero, J. M. Manero y E. Ruperez, «Bioactivity and antibacterial properties of calcium-and silver-doped coatings on 3D printed titanium scaffolds,» *Surface and Coatings Technology,* vol. 421, nº 127476, 6 Julio 2021.

[32] D. Piñera Avellaneda, J. Buxadera Palomera, M. P. Ginebra, J. A. Calero, J. M. Manero y E. Rupérez, «Surface competition between osteoblasts and bacteria on silver-doped bioactive titanium implant,» *Biomaterials Advances,* vol. 146, nº 213311, Marzo 2023.

[33] A. Archundia García, Educación quirúrgica para el estudiante de ciencias de salud, Mendez - editores, 1997, pp. 81-109.

[34] U. N. Española, «UNE-EN 556-1:2002/AC:2007,» 1 Enero 2017. [En línea]. Available: https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma/?c=norma-une-en-556-1-2002-ac-2007-n0038907.

[35] N. Guo y M. C. Leu, «Additive manufacturing: technology, applications and research needs,» *Frontiers of Mechanical Engineering,* vol. 8, nº 3, pp. 215-243, 2013.

[36] R. Christoph, R. Muñoz y Á. Hernández, «Manufactura Aditiva (Additive manufacturing),» *Realidad y Reflexión (Reality and Reflection),* nº 43, 2016.

[37] K. Satish Prakash, T. Nancharaih y V. Subba Rao, «Additive Manufacturing Techniques in Manufacturing - An Overview,» *Materials Today: Proceedings,* vol. 5, pp. 3873-3882, 2018.

[38] G. G. Moreno Sanchez, J. A. Molina Gil, M. d. R. Francés Reynoso y I. Becerril Rosales, «Manufactura aditiva, una alternativa de producción actual,» *REAXION,* vol. 5, nº 3, Mayo - Agosto 2018.

[39] J. Bonada, E. Xuriguera, L. Calvo, L. Poudelet, R. Cardona, J. Padilla, M. Niubó y F. Fenollosa, «Analysis of printing parameters for metal additive manufactured parts through Direct Ink Writing process,» *Procedia Manufacturing,* vol. 41, pp. 666-673, 2019.

[40] M. Coffigniez, L. Gremillard, S. Balvay, J. Lachambre, J. Adrien y X. Boulnat, «Direct-ink writing of strong and biocompatible titanium scaffolds with bimodal interconnected porosity,» *Additive Manufacturing,* vol. 39, nº 101859, Marzo 2021.

[41] Y. Chen, P. Han, L. J. Vandi, A. Dehghan-Manshadi, J. Humphry, D. Kent, I. Stefani, P. Lee, M. Heitzmann, J. Cooper-White y M. Dargusch, «A biocompatible thermoset polymer binder for Direct Ink Writing of porous titanium scaffolds for bone tissue engineering,» *Materials Science and Engineering: C,* vol. 95, pp. 160-165, Febrero 2019.

[42] J. Lewis, «Direct Ink Writing of 3D Functional Materials,» *Advanced Functional Materials,* vol. 16, nº 17, pp. 2193-2204, Octubre 2006.

[43] A. Jakus, S. Taylor, N. Geisendorfer, D. Dunand y R. Shah, «Metallic architectures from 3D-printed powder-based liquid inks,» *Advanced Functional Materials,* Vols. %1 de %2256985-6995, nº 45, Noviembre 2015.

[44] H. Elsayed, P. Rebesan, G. Giacomello, M. Pasetto, C. Gardin, L. Ferroni, B. Zavan y L. Biasetto, «Direct ink writing of porous titanium (Ti6Al4V) lattice structures,» *Materials Science and Engineering: C,* vol. 103, nº 109794, Octubre 2019.

[45] N. Valentin, W. Hua, A. K. Kasar, L. Raymond, P. L. Menezes y Y. Jin, «Direct ink writing to fabricate porous acetabular cups from titanium alloy,» *Bio-Design and Manufacturing,* vol. 6, pp. 121-135, Noviembre 2022.

[46] H. Elsayed, P. Rebesan, G. Giacomello, M. Pasetto, C. Gardin, L. Ferroni, B. Zavan y L. Biasetto, «Direct ink writing of porous titanium (Ti6Al4V) lattice structures,» *Materials Science and Engineering: C,* vol. 103, nº 109794, Octubre 2019.

[47] S. Khan y I. Lazoglu, «Development of additively manufacturable and electrically conductive graphite–polymer composites,» *Progress in Additive Manufacturing,* vol. 5, 1 Junio 2020.

[48] Á. S. Machado Rodriguez, E. Kido Shimomoto, R. Silverio, G. García del Pino, A. Chagoyén Méndez y J. L. Moya Rodriguez, «SINTERIZACIÓN, UN PROCESO DE CONFORMACIÓN DEMETALES COMO ALTERNATIVA ECONÓMICA CON UN BAJOIMPACTO AMBIENTAL,» *Revista Centro Azúcar,* vol. 44, 5 Abril 2017.

[49] S. Swapp, «Geochemical Instrumentation and Analysis: Scanning Electron Microscopy (SEM),» SERC, 18 Octubre 2023. [En línea]. Available: https://serc.carleton.edu/18401.

[50] A. Abdullah y A. Mohammed, «Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review,» *Proceedings of 2018 International Conference on Hydraulics and Pneumatics - HERVEX,* Enero 2019.

[51] «Serveis cientificotècnics - Laboratori de Microscopia - Besòs,» Escola d'Enginyeria de Barcelona Est (EEBE), [En línea]. Available: https://serveiscientificotecnics.upc.edu/ca/infraestructures/materials-avancats/laboratori-de-microscopia-besos.

[52] D. Mogk, «Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS; también conocida como espectroscopia electrónica para análisis químico, ESCA),» SERC, 19 Octubre 2023. [En línea]. Available: https://serc.carleton.edu/245417.

[53] «Serveis Cientificotècnics - Centre de Recerca en Ciència i Enginyeria Multiescala,» Escola d'Enginyeria de Barcelona Est, 2023. [En línea]. Available: https://serveiscientificotecnics.upc.edu/ca/infraestructures/materials-avancats/centre-de-recerca-en-ciencia-i-enginyeria-multiescala.

[54] G. Greczynski y L. Hultman, «X-ray photoelectron spectroscopy: Towards reliable binding energy referencing,» *Progress in Materials Science,* vol. 107, nº 100591, Enero 2020.

[55] Libretexts, «11.3: Espectrómetro de masas de plasma acoplado inductivamente,» LibreTexts Español, 30 Octubre 2022. [En línea]. Available: https://espanol.libretexts.org/Quimica/Qu%C3%ADmica_Anal%C3%ADtica/An%C3%A1lisis_Instrumental_%28LibreTextos%29/11:_Espectrometr%C3%ADa_de_Masa_At%C3%B3mica/11.03:_Espectr%C3%B3metro_de_masas_de_plasma_acoplado_inductivamente.

[56] Agilent, «ICP-MS Instruments 7800 ICP-MS,» 2023. [En línea]. Available: https://www.agilent.com/en/product/atomic-spectroscopy/inductively-coupled-plasma-mass-spectrometry-icp-ms/icp-ms-instruments/7800-icp-ms.

[57] « ESPECTROMETRÍA DE MASAS POR PLASMA DE ACOPLAMIENTO INDUCTIVO - Servicios Técnicos de Investigación,» Universidad de Alicante, 26 Octubre 2022. [En línea]. Available: https://sstti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-analisis/espectrometria-de-masas-por-plasma-de-acoplamiento-inductivo.html

[58] D. Armitage, R. Mihoc, T. Tate, D. McPhail, R. Chater, J. Hobkirk, L. Shinawi y F. Jones, «The oxidation of calcium implanted titanium in water: A depth profiling study,» *Aplied Surface Science,* vol. 253, nº 8, pp. 4085-4093, 15 Febrero 2007.

[59] H.-M. Kim, F. Miyaji, T. Kokubo y T. Nakamura, «Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment,» *Biomedical Materials Research,* vol. 32, nº 3, pp. 409-417, Noviembre 1996.

[60] H. Kim, F. Miyaji, T. Kokubo y T. Nakamura, «Effect of heat treatment on apatite-forming ability of Ti metal induced by alkali treatment,» *Materials Science: Materials in Medicine,* vol. 8, nº 6, pp. 341-347, Junio 1997.

[61] H. Erramli y J. El Asri, Uso de técnicas de radiación gamma en aplicaciones pacíficas, IntechOpen, 2019.

[62] Aragogamma, «Serveis,» Aragogamma S. L., 2023. [En línea]. Available: https://aragogamma.com/ca/serveis/.

[63] U. N. Española, «UNE-EN ISO 10993-12:2022: Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 12: Preparación de muestras y materiales de referencia.,» 6 Febrero 2022. [En línea]. Available: https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma?c=N0068519.

[64] A. Carazo, «Cabinas de seguridad biológica: características técnicas,» INGELYT INGENIERÍA E INSTALACIONES, 2 Setiembre 2014. [En línea]. Available: https://ingelyt.com/wiki/clases-y-tipos-de-cabinas-de-bioseguridad-cbs/.

[65] «Reactivo de viabilidad celular HS PrestoBlue™,» ThermoFisher SCIENTIFIC, 2023. [En línea]. Available: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/es/es/P50200.

[66] T. Kizuki, H. Takadama, T. Matsushita, T. Nakamura y T. Kokubo, «Preparation of bioactive Ti metal surface enriched with calcium ions by chemical treatment,» *Acta Biomateriala,* vol. 6, pp. 2836-2842, 13 Enero 2010.

[67] K. G. D. R. K. J. Vezeau PJ, «Effects of multiple sterilization on surface characteristics and in vitro biologic responses to titanium,» *J Oral Maxillofac Surg,* pp. 54(6):738-46, 1996.

[68] R. Benoit, «La Surface - XPS Database,» cnrs, [En línea]. Available: http://lasurface.com/database/element.php.

[69] M. Biesinger, «X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) Reference Pages,» 2009-2021. [En línea]. Available: www.xpsfitting.com.

[70] E. O. Mikhailova, «Silver Nanoparticles: Mechanism of Action and Probable Bio-Application,» *J Funct Biomater,* p. 11(4): 84, 2020.

[71] S. A. Ahmad, S. S. Das, A. Khatoon, M. T. Ansari, M. Afzal, M. S. Hasnain y A. K. Nayak, «Bactericidal activity of silver nanoparticles: A mechanistic review,» *Materials Science for Energy Technologies,* vol. 3, pp. 756-769, 2020.

[72] B. Le Ouay y F. Stellacci, «Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight,» *Nano Today,* vol. 10, nº 3, pp. 339-354, 2015.

[73] T. Kizuki, T. Matsushita y T. Kokubo, «Antibacterial and bioactive calcium titanate layers formed on Ti metal and its alloys,» *Materials Science: Materials in Medicine,* vol. 25, pp. 1737-1746, 29 Marzo 2014.

[74] G. R. Pidwill, J. F. Gibson, J. Cole, S. A. Renshaw y S. J. Foster, «The Role of Macrophages in Staphylococcus aureus Infection,» *Frontiers in Immunology,* vol. 11, nº 620339, 2021.

[75] A. Medveďová, R. Györiová, V. Lehotová y Ľ. Valík, «Co-Cultivation Growth of Escherichia coli and Staphylococcus aureus as Two Common Dairy Contaminants,» *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences,* vol. 70, nº 2, pp. 151-157, 2020.

[76] D. D. Bannerman, M. J. Paape, . J.-W. Lee, . X. Zhao, J. C. Hope y . P. Rainard, «Escherichia coli and Staphylococcus aureus Elicit Differential Innate Immune Responses following Intramammary Infection,» *Clinical and Diagnostic Loboratory Immunology,* vol. 11, nº 3, pp. 463-472, 2004.

[77] «PanReacAppliChem,» ITW Reagents, 2024. [En línea]. Available: https://www.itwreagents.com/iberia/en/home.

[78] «Merck - Sigma-Aldrich®,» Merck KGaA, 2024. [En línea]. Available: https://www.sigmaaldrich.com/ES/es.

[79] «Consumo de agua y energía en universidades españolas. Encuesta 2013 - 2020,» Grupo de Trabajo en Mejoras Ambientales en Edificios Universitarios de CRUE - Sostenibilidad, 2022.

[80] «Carbon Footprint Calculation- A small introduction of ISO 14064 - Green Clean Guide,» Green Clean Guide, 2011. [En línea]. Available: https://greencleanguide.com/calculate-your-carbon-footprint/.

[81] «UNE-EN ISO 14064-1:2019 Gases de efecto invernadero.,» UNE - Asociación Española de Normalización, 2019. [En línea]. Available: https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma?c=N0062629.

[82] «Residus de laboratori - Comunitat UPC Sostenible,» Universitat Politécnica de Catalunya (UPC), [En línea]. Available: https://sostenible.upc.edu/ca/recircula/residus-de-laboratori.

[83] «lab suplies at fair prices - catálogo,» LABBOX LABWARE, S.L., 2024. [En línea]. Available: https://esp.labbox.com/.

[84] «Productos,» Thermo Fisher Scientific, 2024. [En línea]. Available: https://www.fishersci.es/es/es/browse/products?gclid=CjwKCAiA2pyuBhBKEiwApLaIO60UGB0o1L9UWdj7QKbLdFXAzyrP5IlZ2z4nI7E152_NmP9GH5CS-BoCaXcQAvD_BwE&ef_id=CjwKCAiA2pyuBhBKEiwApLaIO60UGB0o1L9UWdj7QKbLdFXAzyrP5IlZ2z4nI7E152_NmP9GH5CS-BoCaXcQAvD_BwE:G:s&s_kwcid=.

[85] V. Karageorgiou y D. Kaplan, «Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis,» *Biomaterials,* vol. 26, pp. 5474-5491, 2005.

Anexo

A1. Dimensiones muestras

Tabla A1.1. Medidas de diámetro de seis muestras representativas.

	Diámetro muestras [mm]					
	1	2	3	4	5	6
	10,2	10,37	10,27	10,65	10,73	9,93
Medidas	8,60	10,01	10,51	10,77	9,8	10,29
	9,27	10,54	10,57	10,35	10,77	9,69
Media	9,36	10,31	10,45	10,59	10,43	9,97
Desviación	0,80	0,27	0,16	0,22	0,55	0,30
Media total [mm]	10,18			Desviación final	0,46	

Tabla A1.2. Medidas de grosor de seis muestras representativas.

	Grosor muestras [mm]					
	1	2	3	4	5	6
	3,54	3,54	3,52	3,35	3,57	3,65
Medidas	3,56	3,52	3,55	3,53	3,55	3,67
	3,49	3,45	3,58	3,66	3,53	3,83
Media	3,53	3,50	3,55	3,51	3,55	3,72
Desviación	0,04	0,05	0,03	0,16	0,02	0,10
Media total [mm]	3,56			Desviación final	0,08	

A2. Programa Matlab porosidad

```
% Lee imagen “xxx.jpg”
imagen = imread('xxx.jpg');

% Convertir imagen a escala grises
if size(imagen, 3) == 3
imagen = rgb2gray(imagen);
end

% Binarizar la imagen (blanco y negro)
umbral = graythresh(imagen);
imagen_binarizada = imbinarize(imagen, umbral);

% Calcular porosidad contando píxeles negros
total_pixeles = numel(imagen);
pixeles_negros = sum(imagen_binarizada(:) == 0);
porosidad = (pixeles_negros / total_pixeles) * 100; % Porosidad

% Mostrar resultados
fprintf('Porosidad: %.2f%%\n', porosidad);

% Mostrar imagen original e imagen binarizada
subplot(1, 2, 1), imshow(imagen), title('Imagen Original');

subplot(1, 2, 2), imshow(imagen_binarizada), title('Imagen Binarizada');
```

A3. Espectros EDX

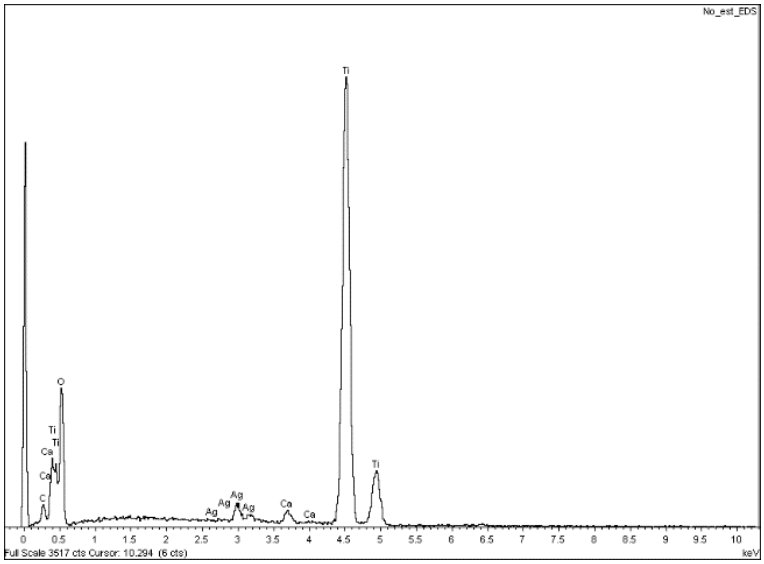


Figura A3.1. Espectro EDX de la muestra de control 2.

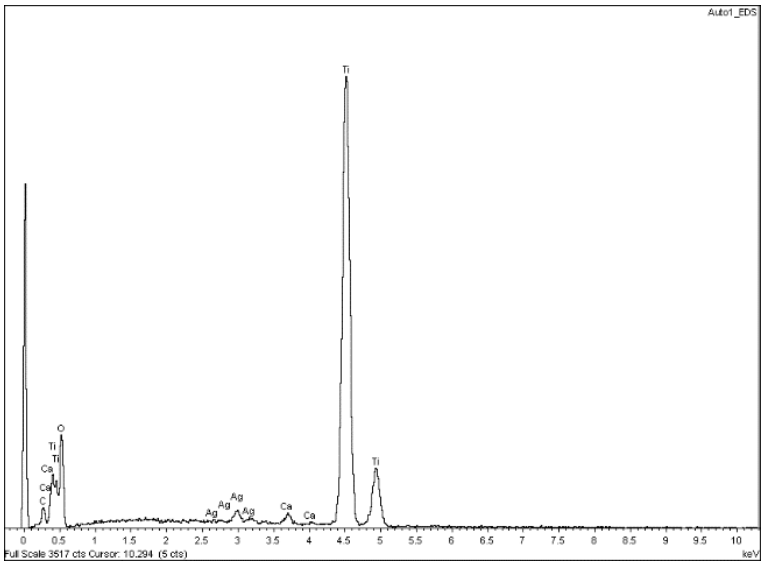


Figura A3.2. Espectro EDX de la muestra esterilizada mediante autoclave.

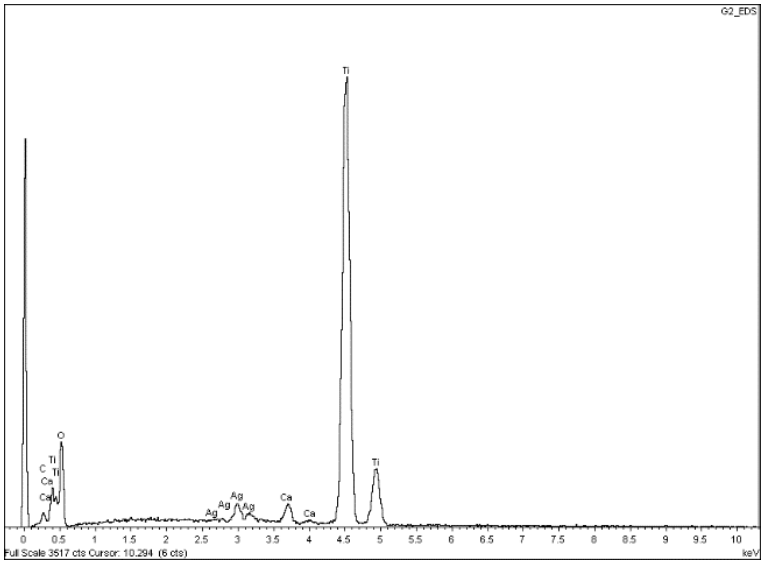


Figura A3.3. Espectro EDX de la muestra esterilizada mediante radiación gamma.

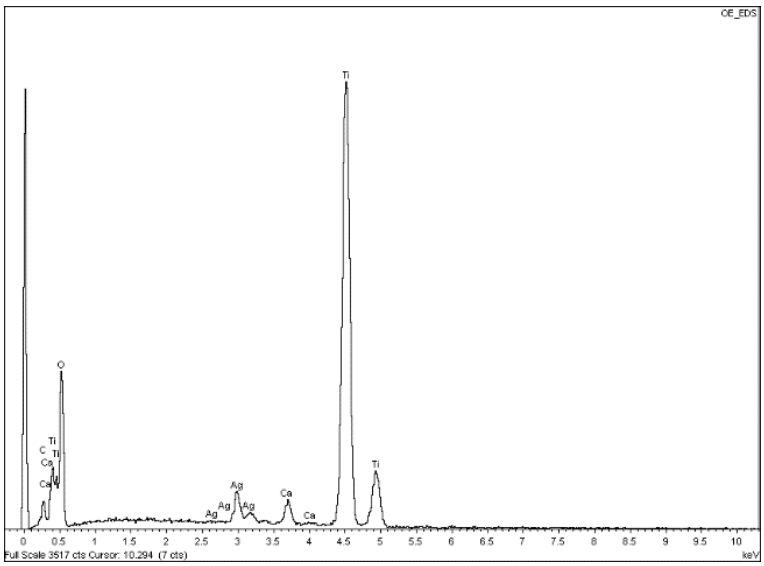


Figura A3.5. Espectro EDX de la muestra esterilizada mediante óxido etileno.

A4. Resultados ensayo de compresión

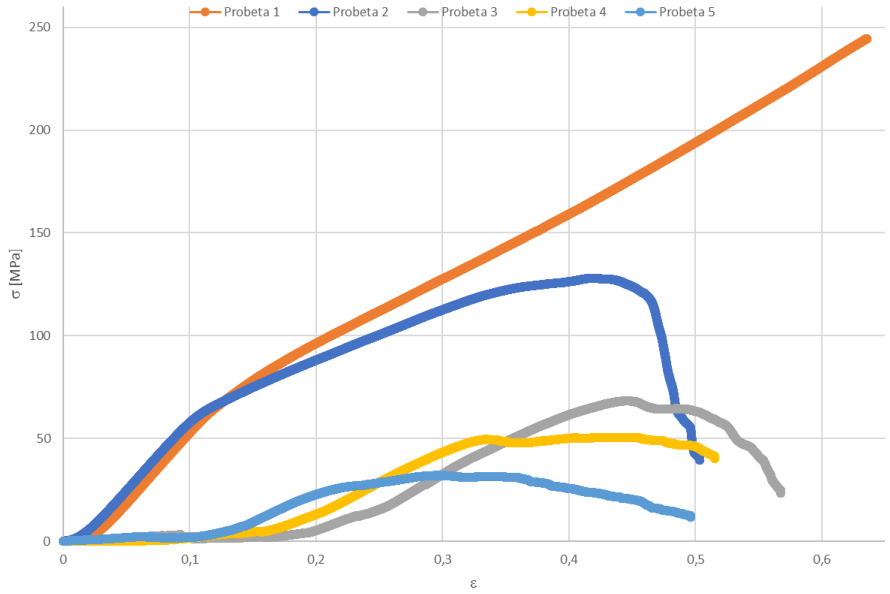


Figura A4.1. Gráfico tensión – deformación del ensayo de compresión.