



UNIVERSITAT POLITÈCNICA
DE CATALUNYA
BARCELONATECH

Desarrollo de un nuevo proceso basado en la inyección 3D de tintas con carga metálica para fabricar prótesis porosas de titanio bioactivas y con propiedades antibacterianas

Diego Torres Garrido 

ADVERTIMENT La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del repositori institucional UPCommons (<http://upcommons.upc.edu/tesis>) i el repositori cooperatiu TDX (<http://www.tdx.cat/>) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual **únicament per a usos privats** emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei UPCommons o TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a UPCommons (*framing*). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del repositorio institucional UPCommons (<http://upcommons.upc.edu/tesis>) y el repositorio cooperativo TDR (<http://www.tdx.cat/?locale-attribute=es>) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual **únicamente para usos privados enmarcados** en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio UPCommons No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a UPCommons (*framing*). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the institutional repository UPCommons (<http://upcommons.upc.edu/tesis>) and the cooperative repository TDX (<http://www.tdx.cat/?locale-attribute=en>) has been authorized by the titular of the intellectual property rights **only for private uses** placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading nor availability from a site foreign to the UPCommons service. Introducing its content in a window or frame foreign to the UPCommons service is not authorized (*framing*). These rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH

Departament de Ciència dels Materials
i Enginyeria Metal·lúrgica

Programa de Doctorado: Ciència i Tecnologia de Materials

DOCTORAT INDUSTRIAL

**Desarrollo de un nuevo proceso basado
en la inyección 3D de tintas con carga
metálica para fabricar prótesis porosas
de titanio bioactivas y con propiedades
antibacterianas**

Tesis doctoral realizada por:

Diego Torres Garrido

Dirigida por:

Dr. José M. Manero (Universitat Politècnica de Catalunya)

Dra. Elisa Rupérez (Universitat Politècnica de Catalunya)

Dr. José Antonio Calero Martínez (AMES PM TECH CENTER)

Barcelona, junio 2021

*Dedicado con todo el cariño a la memoria del Dr. Héctor Garrido Vecino uno de los muchos héroes de la pandemia, un ejemplo como profesional y más aún como persona.
Te quiero. .*



"Pain is temporary. It may last for a minute, or an hour, or a day, or even a year. But eventually, it will subside. And something else takes its place. If I quit, however, it will last forever."

Eric Thomas

"Shoot for the moon. Even if you miss, you'll land among stars!"

Les Brown

"If you see me in a fight with a bear, pray for the bear."

Kobe Bryant

Agradecimientos

Esta tesis doctoral es el resultado de más de 4 años de duro trabajo que no hubiese sido posible sin la colaboración de muchísimas personas, que a su manera han aportado su granito, bien sea directa o indirectamente. A todo aquel que haya estado conmigo en este viaje ¡muchas gracias de verdad! Estoy seguro que me dejaré a más de una persona, espero que lo entiendan, he dejado los agradecimientos para el final y ya tengo la cabeza un poco loca.

La familia es lo primero y más importante así que me gustaría empezar agradeciéndoles el interés constante, los ánimos en los momentos más complicados, el apoyo incondicional y la infinita paciencia. Hermano, papá, mamá gracias por cuidarme y acompañarme en todo momento. A mi queridísima abuelita, no sé cuántas velitas habrá puesto, casi las mismas que las veces que me ha preguntado cuando presento, y no son pocas. A todos mis tíos y primos repartidos por el mundo, pese a estar lejos siempre los he tenido muy presente.

Expresar mi agradecimiento a mis directores de tesis, el Dr. Calero por darme la oportunidad de desarrollar la tesis en la empresa, apostar por mi sin apenas conocerme y darme siempre toda la confianza. La verdad es que me has dado mucha tranquilidad y has sabido manejar mis repentinas crisis y cambios de humor, eso no es nada fácil. A mis directores de la universidad, el Dr. José M. Manero y la Dra. Elisa Rupérez, me habéis soportado desde mucho antes, desde el TFM, y aun así aquí seguís intentando controlar y ordenar mi mente dispersa. Por último, a la Dra. Elena Bernardo, mi directora en la sombra, no sé si eres la persona que más veces se ha leído la tesis, pero sí estoy seguro que eres la que lo ha hecho con más cariño, incluso después de dejar la empresa (por el bien de la PM esperemos que de forma temporal) y con todos los maravillosos proyectos personales y profesionales que tienes has sacado tiempo para interesarte por mi tesis y seguir animándome y corrigiéndome.

Agradecer al Dr. Yassine Maazouz y la Dra. M^a Pau Ginebra hablarle de mí a Calero, con muy poco habéis contribuido muchísimo en mi vida profesional. Por su puesto, al Dr. Cèsar Molins, por tener el buen criterio de escuchar a Calero y darme esta oportunidad, creo que no hay muchas empresas en las que el director general apueste por el I+D de esta manera, no solo a nivel económico, la verdad es que notas la implicación y el interés que tiene por tu trabajo y es algo muy gratificante, no sé cuántas veces habré escuchado ¿com ho portes? ¿quan llegeixes?, jo vull venir eh, etc... esto es algo que motiva y es de agradecer, aunque bueno a veces viniendo del DG también mete un poquito de presión.

A todo el equipo de la Fundació CIM, enormes profesionales con los que ha sido un gusto colaborar en el desarrollo de la impresora prototipo y final, espero que podamos seguir trabajando en más proyectos como este.

Muchísimas gracias a mis compañeros de AMES, desde el primer día me han acogido y ayudado técnica y mentalmente. Al Dr Estefano (doctorado con honores en la universidad de la vida) una grandísima persona, el sindicalista más pro empresa que conozco (en plan trabajador y eso), uno de los pilares de mi tesis y, desde mi punto de vista, del departamento. A l@s vecinos de Medical Sara, Dra. Elia (ya me sufriste en el TFM y ahora en medical), György, Emili, Jordan y por supuesto la Dra. Cristina un gran apoyo desde el primer día siempre tan "dulce" conmigo, otro de mis pilares, es impagable todo lo que me has aportado en estos años (personal y profesional), incluso hasta me has dado coleguita de surf (el Dr. Ásido). A Mario e Iu, sin vosotros todavía estaría imprimiendo muestras. A la Dra. Jing,

siempre interesada por mí, ayudándome con la estructura y con el inglés junto con el Dr. MJ Dougan, English and climbing teacher (esto último con ayuda de Eva, deberíamos retomarlo...). Al fichaje estrella de la casa Itzel, has llegado en el momento más amargo de la tesis para endulzarlo. A mi compañero de tecnología Luisito Allut, junto Suárez los dos Luises que más respeto, siempre dispuesto a ayudar en las incontables peleas con nuestro querido horno de Ti. A los compañeros de oficina técnica, en especial a Rubén sin ti seguiría dibujando engranajes y nunca hubiese calculado la cota entre rodets. Y finalmente a los eternos acogedores de becarios Dori y Vega, dos bellísimas personas y mejores profesores (para aprender hay que tocar).

Gracias a todos mis compañeros de BBT, a mis compis doctorandos, me hubiese gustado poder escaparme más por allí. A mi queridísima Mar que me suportas desde antes del TFM y espero que después de la tesis, sé que te daba un vuelco al corazón cada vez que me veías por células, pero aun así siempre me has ayudado. A mi amigo Quim siempre dispuesto a ayudar, y sinceramente verte igual de agobiado que yo pues siempre alivia un poco. A el otro Kim, una relación de amor/odio desde el TFM. A Yago otro apasionado del surf y del 3D, con una llamada (whatsapp claro que no) ya me despejabas cualquier duda. Al grupo de empresa Mònica, Jordi, Miquel y Sandra, excelente trato personal y profesional, la cátedra AMES-BBT es gracias a vosotros. A los estudiantes de TFM, Patri con el galio, casi quemamos una campana, pero al final fue perfecto, Belal con la plata y un bigote que desprendía seguridad, y Luis Pérez con plata y galio, creo hicimos un equipo perfecto con nuestro jugador estrella Anchón, sabes que hay normas y cursos de seguridad gracias a nuestro paso por el laboratorio, eso es dejar huella.

Gracias a todos mis amigos que, aunque no seáis conscientes de la ayuda que me habéis brindado durante estos últimos años, os aseguro que ha sido inmensurable, gracias por estar siempre ahí. A Toni, por meterme en el mundillo del 3D (yo te introduje en el Wen y de ahí salió tu prometida, estamos en paz). A mis compañeros del feeling, Álvaro, Gonzalo, Pruni y Tere, superar aquellas noches me dio fuerzas para poder con todo. A Sandra por la infinita paciencia que no sé de donde la sacas, has sido un gran apoyo. A mis hermanos Álvaro, Muri, e Iván grandes personajes de mi vida, Alvarito un gran ejemplo de perseverancia, pasaste de ir rayado a rehabilitación a irte a vivir con tu fisio (Cris gran fichaje), Muri no sé cómo lo haces, pero ya con acordarme de ti me entra la risa, además me has dejado la contraseña de Netflix y eso ya forja una amistad inquebrantable, el futuro Dr. Sparky sabes que hemos vivido un paralelismo profesional e incluso personal, creo que eso nos ha mantenido medianamente cuerdos, cuando uno estaba hundido el otro en plan positivo y viceversa. A mi primo Nico, que es como mi hermano, un gran amigo más del grupo, un ejemplo de superación (un superviviente de Barrokos) y de los que más me ha soportado estos años.

Prefacio

La presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo bajo el marco de la segunda convocatoria del Plan de Doctorado Industrial promovido por la Generalitat de Catalunya y la Agencia de Gestión de Ayudas Universitarias y de Investigación (AGAUR).

Esta convocatoria de ayudas contribuye al acercamiento y conexión entre instituciones académicas y empresas del tejido industrial catalán con el objetivo de facilitar la inserción laboral y ampliar la formación de jóvenes estudiantes en ámbitos de proyectos de I+D+I.

A principios del año 2016 se adjudicó la beca DI 067 a la empresa AMES S.A. en conjunto con el Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica de la Universitat Politècnica de Catalunya, concretamente en el grupo de investigación BBT con el proyecto de desarrollar un nuevo método para fabricación de prótesis porosas de titanio, así como la funcionalización de las mismas para conseguir mejores propiedades antibacterianas y de osteointegración, bajo el título de "Desarrollo de un nuevo proceso basado en la inyección 3D de tintas con carga metálica para fabricar prótesis porosas de titanio bioactivas y con propiedades antibacterianas".

RESUMEN

Durante décadas el titanio ha sido uno de los metales más utilizados en la industria biomédica debido a sus propiedades mecánicas y buena biocompatibilidad. Sin embargo, la diferencia de rigidez entre el titanio y el hueso provoca apantallamiento de tensiones (stress shielding) que se traduce en reabsorción del tejido óseo y fallo del implante. En últimos años se han estudiado diferentes vías para abordar este problema, entre las cuales se encuentra el desarrollo de métodos para la fabricación de estructuras porosas de titanio. La pulvimetalurgia convencional (prensado y sinterizado) ofrece la oportunidad de fabricación de sistemas porosos. Sin embargo, el limitado control del tamaño y de la arquitectura, y la poca flexibilidad de diseño la hacen inviable para la fabricación de implantes a medida. Si bien en los últimos años la fabricación aditiva se postula como una alternativa prometedora, las principales tecnologías (electron beam melting, laser power bed fusion y binder jetting) están muy limitadas por las características del polvo (composición, tamaño y morfología) y el elevado coste total del proceso (materia prima, equipo y pos tratamientos). Por otra parte, durante el transcurso de la tesis, al colaborar con distintos traumatólogos y asistir a congresos de cirugía ortopédica, se evidenció la necesidad de mejorar la bioactividad y combatir la infección bacteriana en los implantes de titanio, ya que cada vez es mayor la demanda de implantes multifuncionales capaces de tener simultáneamente respuestas específicas tanto a fluidos corporales, como células y agentes patógenos. La funcionalización mediante tratamientos químicos y térmicos simples (termoquímicos) es una estrategia factible, e industrializable, ya que no requiere equipos especiales.

En esta tesis se ha desarrollado y optimizado un método novedoso (100% propio), que permite fabricar estructuras porosas de titanio mediante inyección 3D de tintas con carga metálica (impresión 3D), seguido de la eliminación de los productos orgánicos y una posterior sinterización del polvo metálico. Para llevarlo a cabo con éxito ha sido necesario estudiar las condiciones y los parámetros de cada una de las etapas que intervienen en el proceso de fabricación: desarrollo de la tinta, inyección 3D, procesado de las piezas en verde y sinterizado. Además, se han propuesto varios tratamientos termoquímicos que permiten la formación de titanatos de calcio con incorporación de plata, de galio y de ambos iones simultáneamente en estructuras porosas de titanio, aumentando la bioactividad y proporcionando capacidad antibacteriana, sin producir citotoxicidad.

Para abordar las variables que afectan principalmente al proceso de fabricación a desarrollar fue necesario realizar estudios previos, que consistieron en llevar a cabo todas las etapas con una tinta preliminar sin optimizar, pero suficientemente válida para ser inyectada. De esta manera se pudieron valorar las variables que afectaban al proceso, así como las limitaciones y problemáticas del mismo, muchas de las cuales ni siquiera se habían contemplado inicialmente. Un claro ejemplo se observó en la optimización de la etapa de secado. A priori en esta etapa tan sólo se buscaba aumentar su eficiencia para acotar el tiempo total del proceso, pero en determinadas piezas causaba distorsiones dimensionales que obligaban a descartar las piezas finales.

Una vez identificadas las variables se llevó a cabo la selección del polvo de partida, en la que se caracterizaron diferentes polvos de titanio y se confirmó que todos podían ser inyectados modificando convenientemente la formulación de la tinta, independientemente de la composición, morfología, tamaño de partícula y fluidez, por lo que finalmente se eligió el que más se adecuaba a los requerimientos del producto final objeto de estudio.

Resumen

Para conseguir desarrollar la tinta final fue necesario formular y evaluar 3 tintas diferentes: la preliminar base Pluronic (en hidrogel), con la cual se llevaron a cabo los estudios previos; la tinta base PLA (disolución en cloroformo); y la final, mezcla de las dos primeras (con acetato de etilo como disolvente). Todas ellas fueron caracterizadas mediante ensayos de inyectabilidad (que replica las condiciones de impresión en una máquina de ensayos mecánicos), análisis termogravimétricos (TGA) y pruebas de impresión 3D. Con la tinta preliminar se identificaron dos requerimientos esenciales y algunas de sus limitaciones dieron pie a generar nuevas necesidades para mejorar la usabilidad del proceso: a) aumentar la resistencia en verde para manipular las piezas con confianza y b) mantener una cierta insolubilidad con el agua para poder desarrollar soportes solubles. Estas limitaciones se superaron con la formulación de la tinta base PLA. Sin embargo, con sólo PLA era necesario reducir el contenido de disolvente para aumentar el tiempo de conservación e inyección de la tinta, algo que finalmente se consiguió con el desarrollo de la tinta final, tras optimizar una mezcla de las dos anteriores.

Paralelamente a la optimización de la tinta final se llevó a cabo el estudio sobre el proceso de impresión 3D, ya que ambos apartados dependían uno del otro. Las pruebas previas se realizaron con la tinta base Pluronic en la impresora BCN3D+ dual paste extruder (PVP inferior a 1000 €). El proceso estuvo muy limitado por el equipo y fue necesario llevar a cabo diversas modificaciones. La mayoría de problemas no se corrigieron por completo y se decidió realizar una recopilación de datos, problemáticas y requerimientos que facilitaron a la Fundació CIM el diseño de un equipo industrial a medida. Tras el desarrollo de la impresora prototipo industrial se procedió de la misma manera que con la anterior, esta vez con la tinta final. Se realizaron pruebas de impresión para identificar los fallos y requerimientos para la impresora final.

Con la formulación de la tinta final se evitaron los problemas derivados del secado y se abrió un abanico de oportunidades en cuanto al procesado de las piezas en verde. Surgió la posibilidad del mecanizado en verde. Se midió la resistencia de las muestras impresas mediante el ensayo de flexión a tres puntos y a compresión, confirmando que eran aptas para el mecanizado. Una vez validadas, se llevaron a cabo con éxito los principales procesos de mecanizado (corte, desbaste, torneado y taladrado).

La eliminación del compuesto orgánico se realizó en 2 etapas: una primera etapa de inmersión en agua disolviendo parte del Pluronic y un posterior tratamiento térmico. Se optimizó el tratamiento térmico con el objeto de reducir el tiempo de proceso y manteniendo el contenido de elementos intersticiales (C, O, N) dentro de los límites permitidos por las normas ISO 5832:1999 y ASTM F67-06,

En la etapa final de sinterizado se estudiaron tanto las condiciones del proceso (temperatura, tiempo y velocidad) como las características de la pieza (porosidad y estructura), teniendo como referencia las propiedades de OsteoSinter®, implante poroso de titanio consolidado en el mercado, obtenido por pulvimetalurgia convencional. Se empezó con el estudio del ciclo térmico (temperatura y tiempo), mediante el cual se constató que al incrementar la temperatura los cuellos de soldadura entre partículas y la resistencia a compresión (σ_c) aumentan; sin embargo, también lo hace la contracción y con ello la distorsión asociada. Para reducir la distorsión sin variar la temperatura se sinterizó calentando y enfriando a la mayor velocidad posible; fomentando el crecimiento de cuellos por difusión superficial y minimizando en lo posible la etapa de densificación por difusión volumétrica, consiguiendo disminuir notablemente la contracción, manteniendo la estructura característica del sinterizado (cuellos de soldadura), pero perdiendo más de la mitad de propiedades mecánicas. Finalmente, se

consiguieron obtener estructuras porosas, con propiedades mecánicas similares a OsteoSinter®, disminuyendo el grado de porosidad y reduciendo la temperatura de sinterización, permitiendo así reducir también la contracción y el contenido de O de las piezas obtenidas. Así mismo, se decidió estudiar el efecto de la estructura de impresión para comprobar si era factible maximizar la porosidad sin comprometer las propiedades mecánicas. Efectivamente, al cambiar la estructura lineal por *honeycomb* la resistencia a compresión aumentó lo suficiente como para poder incrementar la porosidad alrededor de un 10%. Para concluir, se realizó un estudio complementario sobre el efecto de añadir perímetros a la estructura porosa, en el que se observó que con cada perímetro añadido se duplica tanto la resistencia a compresión como el módulo elástico.

En cuanto a la funcionalización de las estructuras porosas de titanio y con el fin de mejorar la osteointegración y dotarles de propiedades antibacterianas, se realizó una modificación del tratamiento termoquímico convencional desarrollado por T. Kokubo. La incorporación de iones Calcio permitió obtener una capa de titanato de calcio que mejoró la bioactividad del titanio mientras que la incorporación de iones Ag y Ga aportó un comportamiento antibacteriano. Se valoraron dos reactivos ($C_4H_6CaO_4$ y $CaCl_2$) para introducir iones de Ca en la capa en forma de titanatos; resultando ambos válidos. La incorporación de plata en la capa se consiguió utilizando nitrato de plata y acetato de calcio, evitando así la precipitación de AgCl. Las muestras tratadas presentaron bioactividad y, debido a la liberación de iones Ag^+ , respuesta inhibitoria frente a 4 cepas bacterianas más comunes en infecciones de implantes, 2 Gram-positivas (*pseudomona aeruginosa* y *escherichia coli*) y 2 Gram-negativas (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*), sin ser citotóxicas.

Paralelamente se desarrolló un tratamiento para la formación de titanatos de calcio con galio, evitando la utilización de $GaCl_3$ como reactivo para introducir los iones de galio, por su dificultad de aplicación a nivel industrial. Las muestras tratadas presentaron una mejora de la bioactividad y, debido a la liberación de iones Ga^{3+} , respuesta inhibitoria frente a 2 cepas Gram-positivas. Además, la presencia de galio en la estructura contribuyó en el aumento de la diferenciación y mineralización celular.

Finalmente se decidió evaluar la acción sinérgica de Ag y Ga desarrollando un tratamiento para la formación de titanatos de calcio con la incorporación de plata y galio, consiguiendo muestras bioactivas y demostrando que la adición de ambos iones mejora la capacidad antibacteriana respecto a las muestras con un solo ion. La plata proporciona mayor espectro de inhibición y el galio mejor respuesta frente a la *pseudomona aeruginosa*.

Con todo ello, y a falta de la realización de futuros trabajos, se ha conseguido desarrollar un proceso de fabricación de implantes porosos a medida, con propiedades mecánicas similares a los del mercado, teniendo conocimiento y control de todas las etapas del proceso. Además, se han propuesto tres tratamientos termoquímicos que permiten funcionalizar dichos implantes, aumentando su bioactividad y dotándolos de respuesta antibacteriana.

SUMMARY

Titanium (Ti) has been used for decades for bone prostheses due to its mechanical performance and good biocompatibility. However, the stress shielding effect, as a result of the stiffness mismatch between titanium and the bone leads to bone resorption and implant failure. The use of porous titanium structures is presented as an interesting alternative material to alleviate this drawback.

The conventional process of powder metallurgy (PM) offers the possibility to manufacture this kind of porous systems. Nevertheless, it is important to highlight the main challenge of this development: However, there is a constant need to manufacture flexible designs and customized implants, which is far beyond the limits of this manufacturing technology. In this sense, the main additive manufacturing (AM) technologies such as electron beam melting, laser powder bed fusion or binder jetting have been postulated as promising producing techniques, even though the strong constraints associated to the powder composition, size and morphology as well as the inherent high cost of the process (raw material, equipment and post-treatments).

During the development of this thesis, it was possible to work with several traumatologists and, as a result, different points of view and opinions were discussed. Some dealt topics were the need of improving both the bioactivity and antibacterial response and the currently demand of multifunctional implants with both characteristics. The functionalization by thermochemical treatments is a good and easy strategy to be applied in the industry, since not special equipment is required.

In this thesis a novel direct ink writing (DIW) process was developed and optimized. The goal was to achieve the manufactured Ti porous structures through a three-step process, which consist in 3D ink injection, debinding and a sintering process as the last stage. In order to carry it out successfully, it was necessary to study all the parameters involved in each phase of the manufacturing process. Furthermore, different thermochemical treatments were proposed to obtain a calcium titanate coating by adding functional ions of silver, gallium and both elements simultaneously. The pursued aim was to increase the bioactivity of the titanium scaffolds and generate antibacterial response without producing cytotoxicity.

In order to know the importance of the variables of the manufacturing process, it was necessary to carry out previous studies with a preliminary ink. The obtained conclusions were useful to assess each stage and identify the critical parameters that were not even considered from the beginning. For instance, the drying process was not considered as a significant step until the preliminary results showed that it can induce dimensional distortions in the samples.

Besides several Ti powders were evaluated and characterized, regardless of the composition, morphology, particle size and fluidity, all of them were acceptable for the ink formulation and DIW process. Therefore, the powder best suited to the requirements of the final product was selected.

Until the final ink formulation was achieved, it was necessary to develop three different inks. The first one was Pluronic-based (preliminary ink), the second PLA-based and the last ink was made by mixing both materials. All these inks were characterized by injectability test, thermogravimetric analysis (TGA) and 3D printing tests. The preliminary results, with the Pluronic-based ink, showed the need of improving both the green strength and the water resistance. The PLA-based ink did not have these limitations, but the time of usability

Summary

(handling) was very low. This problem was solved by the formulation of the final ink, mixing both polymers (PLA and Pluronic).

The 3D printing and ink studies were carried out at the same time due to the existing dependence between them. The first printer was the BCN3D+ dual paste extruder (Retail price~1000€). The preliminary results showed the limitations of this machine and the requirement of using an industrial printer. This was solved by working with the CIM Center, where an industrial prototype was developed and tested. As a result, an industrial custom printer was obtained.

Through the correct formulation of the final ink not only lots of drawbacks related with the drying process were solved, but also a wide range of opportunities related to the manufacturing process of the green body appeared. The green strength was evaluated through bending and compressive tests and the obtained high values made it suitable to green machining. The key machining processes were successfully performed (cutting, polishing, turning and drilling) in the green samples.

The debinding process was carried out in two optimized steps: water immersion and thermal treatment. Moreover, the complete binder removal without oxidation and contamination was achieved. The content of interstitial elements (C, O, N) was among the limits allowed by the standard ISO 5832:1999 and ASTM F67-06.

The sintering step was the final part of the manufacturing process. The conditions of the thermal treatment were studied (temperature, time, rate) and also the characteristics of the sample (porosity and fill pattern). The reference as a "gold standard" was Osteosinter®, a porous titanium implant obtained by space holder. The study started with a thermal cycle (temperature and time), showing that temperature improved sinter neck development and the compressive strength (σ_c), but also the shrinkage (dimensional distortions). In order to reduce the magnitude of the shrinkage, the rate of the cycle was maximized to promote the neck formation by surface diffusion instead of volumetric diffusion. As a result, the shrinkage reduction was achieved but the corresponding decrease in the mechanical properties. Finally, through the modulation of porosity, it was possible to obtain porous structures with mechanical properties close to Osteosinter®, at lower temperatures, reducing the shrinkage and the oxygen content. Likewise, the filling pattern was studied in order to maximize the porosity while maintaining the mechanical properties. Using the honeycomb pattern instead of the lineal one, allowed the growth of the porosity around 10%. To conclude, a study about the effect of the number of the perimeters in the structure was carried out, finding that the compressive stress and the Young Module doubles with the number of perimeters added.

Regarding the functionalization, a modification of conventional thermochemical treatment (developed by T. Kokubo) was carried out on the porous structures. With the replacement of Na by Ca ions to form calcium titanate the bioactivity was improved, and with the addition of Ag and Ga ions antibacterial behaviour was conferred. Two reagents ($C_4H_6CaO_4$ y $CaCl_2$) were previously validated to introduce the Ca ions. The addition of Ag without AgCl precipitates was achieved using $AgNO_3$ and $C_4H_6CaO_4$ instead of $CaCl_2$. The treated samples showed bioactivity and, due to Ag^+ release, inhibitory response against the most common strains involved in implant infections: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* as a Gram-positive and *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* as a Gram-negative. No cellular cytotoxicity was observed. Calcium containing gallium titanate coating was obtained avoiding the use of $GaCl_3$. This reagent needs special requirements to handle and would be difficult to

industrialize and certify. The used samples showed bioactivity and, due to Ga^{3+} release, inhibitory response against Gram-positive strains. Moreover, an increase of the cellular differentiation and mineralization was observed in gallium containing surfaces.

Finally, the functionalization studies were carried out, where the synergic effect of Ag and Ga ions were evaluated. A novel thermochemical treatment was proposed to be used in both ions, obtaining calcium containing silver and gallium titanate. The antibacterial response was improved; silver provides more antibacterial spectrum and gallium better response against *pseudomona aeruginosa*.

All these above exposed results confirm that a method to manufacture porous titanium implants has been successfully developed. The full control of the process has been triggered by the acquired know-how in each single step. Moreover, the bioactivity and antibacterial response can be improved by the application of three different thermochemical treatments.

Summary

MOTIVACIÓN

Uno de los principales objetivos de la ingeniería de tejidos es el desarrollo de estructuras porosas que imiten tanto las propiedades estructurales como las funcionales del hueso. Para la fabricación de implantes es necesario que el material tenga una biointegración óptima, incluyendo una interacción fuerte y estable entre el material y las células. En los últimos años se han estudiado y desarrollado estructuras porosas de titanio que han mostrado una excelente biocompatibilidad, propiedades mecánicas, y un bajo módulo elástico que permite reducir el apantallamiento de tensiones (stress shielding).

La pulvimetalurgia¹ (PM), proceso de fabricación utilizado en la empresa (grupo AMES), ofrece una oportunidad evidente para la fabricación de sistemas porosos. Sin embargo, presenta ciertos inconvenientes debido a que tanto la capacidad de controlar la arquitectura de los poros como la distribución de tamaños e interconectividad son muy limitadas. Además esta tecnología está pensada para la fabricación de series largas y existe poca flexibilidad en cuanto al diseño. Ante esta situación conviene buscar y desarrollar algún otro método económico como alternativa a la tecnología PM convencional.

Las tecnologías de fabricación aditiva (AM, additive manufacturing en inglés) construyen el objeto depositando material (plástico, cerámico, metálico) capa a capa de manera controlada a partir de un archivo CAD-3D, permitiendo un control de porosidad y una gran flexibilidad en cuanto al diseño. Para la fabricación de piezas metálicas las técnicas más conocidas y utilizadas son las de fabricación "directa", en las que, mediante un haz láser o de electrones, se funde o sinteriza el polvo capa a capa, obteniendo la pieza final en un único proceso. El coste de estos equipos es considerablemente elevado (~0.5-1M euros), además dicha tecnología presenta algunas limitaciones: no se puede utilizar cualquier tipo de polvo (composición, tamaño y morfología) y normalmente es necesario llevar a cabo etapas de post-procesado como un mecanizado o tratamientos térmicos, lo cual encarece todavía más el proceso. A pesar del evidente crecimiento de la fabricación aditiva en el sector biomédico, a día de hoy la realidad es que el mercado no es lo suficientemente robusto como para plantear una inversión de tal magnitud. Por este motivo, es necesario buscar y valorar otro tipo de tecnologías aditivas, como por ejemplo las denominadas "indirectas"

En la fabricación aditiva "indirecta", primero se obtiene la pieza en verde (con suficiente consistencia para poder ser manipulada, pero sin resistencia mecánica) y, posteriormente se realiza el tratamiento térmico de sinterización (etapa de calentamiento de la PM convencional). Los principales procesos que se están utilizando para la obtención de piezas metálicas en verde basadas en la fabricación aditiva "indirecta" son: el *Binder Jetting* (BJ), donde por medio de un inyector se añade un líquido adhesivo sobre el polvo en las zonas seleccionadas, *la extrusión de filamento polimérico con carga metálica* y *la inyección de tintas*, compuestas por una dispersión de partículas de polvo metálico en un polímero que ejerce de ligante o

¹ La pulvimetalurgia es un proceso de fabricación que, partiendo de polvos finos y tras su compactación para darles una forma determinada (obtención de pieza en verde), se sinterizan, es decir, se calientan en una atmósfera controlada durante un tiempo determinado a una temperatura inferior al punto de fusión del metal base, la elevada temperatura provoca

la soldadura de las partículas de polvo entre sí, y la difusión de los elementos aleantes, mediante un mecanismo de difusión en estado sólido.

Motivación

aglutinante (binder). Esta última presenta una mayor versatilidad en cuanto al tamaño y morfología del polvo (fluencia) con el *Binder Jetting*, con un coste de proceso similar al de las tecnologías directas y evita la necesidad de calentar el extrusor para depositar el filamento fundido, todo ello a un coste relativamente bajo.

El desarrollo de un proceso de fabricación aditiva "indirecta" propio abre la puerta al conformado de piezas de series pequeñas con formas más complejas y estructuras graduales, y más concretamente la extrusión de tintas cargadas con material metálico biocompatible, que puede ayudar a solucionar las cuestiones anteriormente mencionadas. Además, de esta manera no sólo se reduce notablemente la inversión inicial, sino también se facilita y agiliza la implementación en la línea de producción, ya que este proceso únicamente "sustituye" la etapa de prensado; por lo tanto, se tiene un control total de todas las etapas (tinta, impresión, debinding y sinterizado) sin dependencias o limitaciones externas.

Otras de las necesidades que se están abordando recientemente son las de mejorar la bioactividad y combatir la infección bacteriana en los implantes de titanio. Debido a esto, es mayor la demanda de implantes multifuncionales capaces de tener simultáneamente respuestas específicas tanto a fluidos corporales, células como a agentes patógenos.

En la actualidad se han desarrollado diferentes estrategias para funcionalizar la superficie de los implantes; como recubrimientos poliméricos, adición de péptidos, nano estructuras, liberación de fármacos, implantación iónica, entre otras. Sin embargo, la mayoría de los estudios se realizan sobre muestras macizas. Con la aparición de los implantes porosos surgen nuevos desafíos, como intentar replicar estas estrategias en estructuras porosas, aprovechando la porosidad interconectada para funcionalizar tanto el exterior como el interior de los implantes.

Los tratamientos termoquímicos no requieren equipos especiales y son fácilmente aplicables a gran escala para piezas de estructuras complejas o porosas. De hecho, ya se han llevado a cabo tratamientos termoquímicos sobre muestras porosas, que han permitido generar una capa bioactiva de titanato de sodio que favorece la penetración del hueso hacia su interior. Además, este tipo de tratamientos permiten añadir iones funcionales que son efectivos para la promoción del crecimiento óseo y proporcionan capacidad actividad antibacteriana.

Desde hace años se conoce que tanto la plata metálica (Ag^0) como los iones de plata (Ag^+) tienen fuertes efectos inhibitorios y bactericidas, así como un amplio espectro de actividades antimicrobianas. Por su parte el galio (Ga) en los últimos años ha despertado un gran interés en dispositivos implantables ya que ofrece una doble funcionalidad; el efecto inhibitorio de los iones de galio sobre la resorción ósea y su actividad antibacteriana. La eficacia de un agente antibacteriano depende, entre otras cosas, de cómo interactúa éste con la célula y de su mecanismo de acción; por lo tanto, es de esperar que el diseño de un sistema antibacteriano formado por agentes con mecanismos de acción diferentes (Ag y Ga) presente una mayor actividad antibacteriana. Dada la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos y la escasez de nuevos antibióticos en desarrollo, la liberación de iones Ag y/o Ga, por separado o de forma sinérgica, ofrecerían alternativas efectivas a los antibióticos o podrían complementar las terapias actuales.

Con todo esto, si bien el desarrollo de un proceso de fabricación de estructuras porosas de titanio mediante inyección 3D y sinterizado permitiría a la empresa entrar en el mercado de los implantes a medida; la funcionalización con un método propio que aumente la bioactividad

y proporcione capacidad antibacteriana, daría un valor añadido considerable respecto a la competencia.

OBJETIVOS

El objetivo de la tesis es desarrollar y optimizar un método de conformado que permita la obtención de estructuras porosas de titanio mediante un proceso novedoso basado en la inyección 3D, económicamente viable y con suficiente valor añadido (funcionalización) como para poderlo explotar competitivamente en la fabricación de implantes porosos a medida para aplicaciones biomédicas. Para alcanzar dicho objetivo se plantearon dos objetivos parciales: la fabricación de las estructuras y la funcionalización de las mismas.

Para desarrollar con éxito el proceso de fabricación fue necesario estudiar las condiciones y los parámetros de cada una de las etapas, surgiendo así una serie de objetivos intermedios, que se describen a continuación:

- **Desarrollo de la tinta:** Formular una tinta con el mayor porcentaje de carga metálica posible, que cumpla las necesidades de todas las etapas del proceso.
- **Impresión 3D:** Conocer las limitaciones y requerimientos de proceso, para así poder contribuir en el desarrollo y la fabricación de un equipo a medida. Optimizar las condiciones y parámetros de impresión para las tintas desarrolladas.
- **Procesado en verde:** Eliminar el ligante (binder) de las piezas impresas (en verde) sin contaminarlas ni oxidarlas. Valorar la posibilidad de obtener una forma cercana a la final a través del mecanizado en verde.
- **Sinterización:** Optimizar las condiciones del tratamiento térmico de sinterización (velocidad de calentamiento, temperatura y tiempo) y determinar el tipo de estructura y porosidad que permitan obtener estructuras porosas sin distorsiones y con propiedades similares a las de un implante de referencia con marcado CE (OsteoSinter®).

En cuando a la funcionalización, los objetivos intermedios son los siguientes:

- Replicar y validar un tratamiento termoquímico, desarrollado y contrastado por T. Kokubo, para generar **titanatos de sodio** bioactivos sobre las estructuras porosas fabricadas mediante impresión 3D. Además, se plantea optimizar el proceso reduciendo tiempo de proceso para hacerlo más competitivo.
- Desarrollar un tratamiento termoquímico que permita la formación de **titanatos de calcio con incorporación de plata, galio o ambos iones simultáneamente** aumentando la bioactividad y proporcionando capacidad antibacteriana, sin producir citotoxicidad.

Objetivos

Índice de contenidos

RESUMEN	I
SUMMARY	V
MOTIVACIÓN	IX
OBJETIVOS	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DEL HUESO	1
1.2 EL TITANIO PARA IMPLANTES	2
1.3 PROBLEMÁTICA 1: EL APANTALLAMIENTO DE TENSIONES	3
1.3.1 ESTRATEGIA: FABRICACIÓN DE PRÓTESIS POROSAS.....	3
1.4 PROBLEMÁTICA 2: LAS INFECCIONES	5
1.4.1 CONTAMINACIÓN BACTERIANA DE LOS IMPLANTES	5
1.4.2 ESTRATEGIAS ANTIBACTERIANAS	7
1.4.2.1 Recubrimientos poliméricos	8
1.4.2.2 Péptidos antimicrobianos.....	8
1.4.2.3 Nano-estructuras/texturas y estructuración superficial	9
1.4.2.4 Liberación de antibiótico y recubrimientos antisépticos.....	9
1.4.2.5 Implantación de iones.....	9
1.5 LOS TRATAMIENTOS TERMOQUÍMICOS MULTIFUNCIONALES	10
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 IMPLANTES POROSOS DE REFERENCIA EN EL MERCADO	11
2.1.1 IMPLANTE POROSO TIPO CUÑA PARA OSTEOTOMÍA EN PIE HUMANO.	11
2.1.1.1 Cuña Unite3D de Zimmer Biomet	12
2.1.1.2 Trabecular Metal de Zimmer Biomet	13
2.1.1.3 Cuña BIOFOAM de Wright	14
2.1.1.4 Cuña Integra Titanium Bone de Integra.....	15
2.1.1.5 Cuña Biosync de Arthrex	15
2.1.2 IMPLANTE VETERINARIO TIPO CUÑA DE ALTA POROSIDAD	16
2.1.2.1 Cuña MMP OrthoFoam de Orthomed.	18
2.1.2.2 Dispositivo TTA de Kyon	18

2.1.2.3 Dispositivo TTA Rapid de Rita Leibinger Medical.	19
2.2 MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE ESTRUCTURAS POROSAS.....	21
2.2.1 MÉTODOS CONVENCIONALES (MIM, PM)	21
2.2.1.1 Metal injection moulding (MIM)	21
2.2.1.2 Pulvimetalurgia convencional con espaciadores (space holder)	22
2.2.2 FABRICACIÓN ADITIVA EN ESTADO LÍQUIDO (DIRECTA)	23
2.2.2.1 Electron Beam Melting (EBM)	26
2.2.2.2 Laser Powder Bed Fusion (LPBF).....	26
2.2.3 FABRICACIÓN ADITIVA EN ESTADO SÓLIDO (NO DIRECTA).....	28
2.2.3.1 Binder Jetting (BJ) o 3D Printing (3DP)	28
2.2.3.2 Fused Deposition Modeling (FDM) o Fused Filament Fabrication (FFF).....	28
2.3. MÉTODO A DESARROLLAR: INYECCIÓN 3D + SINTERIZADO	30
2.3.1 IMPORTANCIA DEL POLVO DE PARTIDA.....	30
2.3.2 INYECCIÓN 3D: 3D FIBER DEPOSITION (3DF) O DIRECT INK WRITING (DIW).	31
██	36
██	36
██	37
2.3.4 EL SINTERIZADO	38
2.3.4.1 La temperatura	38
2.3.4.2 El tiempo.....	39
2.3.4.3 La atmósfera.....	39
2.4. TIPOS DE TRATAMIENTOS TERMOQUÍMICOS.....	40
2.4.1 TRATAMIENTO TERMOQUÍMICO CONVENCIONAL CON NA	40
2.4.2 MODIFICACIÓN DEL TRATAMIENTO CONVENCIONAL PARA SUSTITUIR NA POR CA.....	42
2.4.3 MODIFICACIÓN DEL TRATAMIENTO PARA AÑADIR CA CON AG	44
2.4.3.1 Mecanismo antibacteriano	44
2.4.3.2 Método de incorporación.....	45
2.4.4 MODIFICACIÓN DEL TRATAMIENTO PARA AÑADIR CA CON GA	47
2.4.4.1 Mecanismo antibacteriano	47
2.4.4.2 Método de incorporación.....	48
2.4.5 SINERGIA DE AGENTES ANTIBACTERIANOS	50
3. MATERIALES Y MÉTODOS	53
3.1 ESQUEMA GENERAL DEL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	53

3.2 MATERIALES	54
3.2.1 POLVOS BASE TITANIO	54
3.2.1.1 Descripción de los polvos de partida.....	54
3.2.1.2 Equipos y técnicas para la caracterización de los polvos de partida	55
3.2.2 AGLUTINANTES O LIGANTES POLIMÉRICOS.....	58
3.2.3 DISOLVENTES ORGÁNICOS	59
3.2.4 REACTIVOS TRATAMIENTO TERMOQUÍMICO	60
[REDACTED]	60
[REDACTED]	60
[REDACTED]	60
[REDACTED]	61
[REDACTED]	62
[REDACTED]	62
[REDACTED]	62
[REDACTED]	63
3.3.4 EQUIPOS Y TÉCNICAS UTILIZADOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LAS TINTAS.....	66
3.3.4.1 Ensayo de inyectabilidad	66
3.3.4.2 Pruebas de impresión 3D	68
3.4 IMPRESIÓN 3D, OBTENCIÓN DE PIEZAS EN VERDE	69
3.4.1 PRUEBAS PREVIAS CON LA IMPRESORA PILOTO.....	69
3.4.2 PRUEBAS IMPRESORA PROTOTIPO	72
3.4.3 EQUIPOS Y TÉCNICAS UTILIZADOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA IMPRESIÓN 3D	73
3.4.3.1 Pruebas de impresión 3D	73
3.4.3.2 Ensayos mecánicos a compresión de cilindros impresos (en verde)	73
3.5 PROCESADO PIEZAS EN VERDE	74
3.5.1 ESTUDIOS PREVIOS CON LA TINTA PRELIMINAR BASE PLURONIC.	74
3.5.1.1 Secado de las piezas.....	74
3.5.1.2 Eliminación térmica del ligante.....	75
[REDACTED]	75
[REDACTED]	75
[REDACTED]	76
3.5.3 EQUIPOS Y TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN UTILIZADOS CON LAS PIEZAS EN VERDE.....	78
3.5.3.1 Ensayo de inmersión en agua	78

Índice

3.5.3.2	Análisis termogravimétrico (TGA).....	78
3.5.3.3	Termogravimetría (escala laboratorio)	79
3.5.3.4	Contenido intersticiales (oxígeno y carbono)	80
3.5.3.5	Resistencia en verde.....	80
3.5.3.6	Mecanizado en verde	81
3.6	SINTERIZACIÓN Y ACABADO FINAL	83
3.6.1	ESTUDIOS PREVIOS (CON LA TINTA PRELIMINAR BASE PLURONIC)	83
3.6.1.1	Control dimensional y acabado superficial tras el sinterizado	83
3.6.1.2	Caracterización previa.....	84
3.6.2	ESTUDIO SOBRE EL EFECTO DEL CICLO TÉRMICO (TEMPERATURA Y TIEMPO).....	84
3.6.3	ESTUDIO SOBRE EFECTO DE LA VELOCIDAD DE CALENTAMIENTO Y ENFRIAMIENTO	85
3.6.4	ESTUDIO SOBRE EFECTO DE LA POROSIDAD	87
3.6.5	ESTUDIO SOBRE EL EFECTO DE LA ESTRUCTURA (PATRÓN DE IMPRESIÓN).....	88
3.6.6	TÉCNICAS Y EQUIPOS UTILIZADOS EN LA CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS SINTERIZADAS ...	90
3.6.6.1	Microscopía óptica (MO).....	90
3.6.6.2	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	91
3.6.6.3	Cálculo de la contracción.....	91
3.6.6.4	Porosidad	92
3.6.6.5	Contenido en intersticiales	94
3.6.6.6	Resistencia a compresión	95
3.7	TRATAMIENTO TÉRMOQUÍMICO SOBRE MUESTRAS POROSAS	97
3.7.1	PREPARACIÓN DE MUESTRAS.....	97
3.7.2	TRATAMIENTO KOKUBO CONVENCIONAL O TRATAMIENTO NA	98
3.7.3	MODIFICACIÓN DEL TRATAMIENTO PARA AÑADIR CALCIO	100
3.7.4	MODIFICACIÓN DEL TRATAMIENTO PARA AÑADIR PLATA.....	102
3.7.5	MODIFICACIÓN DEL TRATAMIENTO PARA AÑADIR GALIO	105
3.7.6	MODIFICACIÓN DEL TRATAMIENTO PARA AÑADIR CONJUNTAMENTE GALIO Y PLATA.....	108
3.7.7	TÉCNICAS Y EQUIPOS UTILIZADOS EN LA CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS TRATADAS TÉRMOQUÍMICAMENTE	111
3.7.7.1	Caracterización microestructural y físico-química.....	111
3.7.7.2	Formación de apatita.....	112
3.7.7.3	Liberación de iones	113
3.7.7.4	Actividad antibacteriana	114
3.7.7.5	Evaluación biológica in vitro	117

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. FABRICACIÓN.....	123
4.1 SELECCIÓN DEL POLVO DE PARTIDA	123
[REDACTED]	124
[REDACTED]	124
[REDACTED]	124
[REDACTED]	124
[REDACTED]	124
[REDACTED]	129
[REDACTED]	129
[REDACTED]	131
4.3 IMPRESIÓN 3D	137
4.3.1 DESARROLLO DE LA IMPRESORA 3D.....	137
4.3.2 OPTIMIZACIÓN CÓDIGOS (GCODE) Y PARÁMETROS DE IMPRESIÓN	137
4.3.2.1 Optimización con la impresora preliminar.....	137
4.3.2.2 Modificación código de impresión (Gcode) para la impresora prototipo y final .	138
4.4 PROCESADO DE LAS PIEZAS EN VERDE.....	140
4.4.1 ESTUDIOS PREVIOS CON LA TINTA BASE PLURONIC	140
4.4.2 OPTIMIZACIÓN PROCESO DE ELIMINACIÓN DEL LIGANTE	140
4.4.2.1 Eliminación por inmersión en agua.....	140
4.4.2.2 Eliminación por degradación térmica	145
4.4.3 RESISTENCIA EN VERDE.....	156
4.4.3.1 Flexión	156
4.4.3.2 Compresión.....	157
4.4.4 ESTUDIO DEL MECANIZADO EN VERDE	160
4.4.4.1 Corte.....	160
4.4.4.2 Desbaste	161
4.4.4. Taladrado	162
4.4.4.4 Torneado	163
4.4.4.5 Mecanizado en verde de una pieza estándar	164
4.5 PROCESO DE SINTERIZACIÓN	165
4.5.1 ESTUDIOS PREVIOS (CON LA TINTA PRELIMINAR)	165
4.5.2 ESTUDIO DEL CICLO TÉRMICO: TEMPERATURA Y TIEMPO.	165
4.5.2.1 Efecto del ciclo térmico en el tamaño de grano	166

Índice

4.5.2.2 Efecto del ciclo térmico en el grado de sinterización.	168
4.5.2.3 Efecto del ciclo térmico en la contracción.....	170
4.5.2.4 Efecto del ciclo térmico en las propiedades mecánicas.....	171
4.5.2.5 Conclusiones del estudio del ciclo térmico.....	172
4.5.3 ESTUDIO DE LA VELOCIDAD DEL CICLO TÉRMICO.....	173
4.5.3.1 Efecto de la velocidad del ciclo térmico en el grado de sinterización.....	173
4.5.3.2 Efecto de la velocidad del ciclo térmico en el grado de contracción.....	174
4.5.3.3 Efecto de la velocidad del ciclo térmico en las propiedades mecánicas.....	175
4.5.3.4 Conclusiones del estudio sobre la velocidad del ciclo térmico.....	176
4.5.4 ESTUDIO DE LA POROSIDAD.....	177
4.5.4.1 Medida de la porosidad.....	177
4.5.4.2 Efecto de la porosidad en el grado contracción.....	183
4.5.4.3 Efecto de la porosidad en las propiedades mecánicas.....	184
4.5.4.4 Efecto de la temperatura y la porosidad en el contenido de oxígeno y carbono	187
4.5.4.5 Conclusiones del estudio de la porosidad.....	188
4.5.5 ESTUDIO DEL PATRÓN DE IMPRESIÓN.....	189
4.5.5.1 Efecto del patrón de impresión (Lineal vs Honeycomb).....	190
4.5.5.2 Efecto del número de perímetros.....	193
4.5.5.5 Conclusiones del estudio sobre la estructura.....	194
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. FUNCIONALIZACIÓN.....	195
5.1 FORMACIÓN DE TITANATOS DE CALCIO E INCORPORACIÓN DE PLATA, CON PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS, SOBRE ESTRUCTURAS POROSAS DE TITANIO.....	195
5.1.1 ESTRUCTURA SUPERFICIAL.....	197
5.1.2 ANÁLISIS FISICOQUÍMICO.....	198
5.1.3 FORMACIÓN DE APATITA.....	200
5.1.4 LIBERACIÓN DE IONES.....	201
5.1.5 HALO DE INHIBICIÓN BACTERIANA.....	202
5.1.6 CITOTOXICIDAD.....	204
5.2 FORMACIÓN DE TITANATOS DE CALCIO E INCORPORACIÓN DE GALIO, CON PROPIEDADES BIOACTIVAS Y ANTIBACTERIANAS, SOBRE ESTRUCTURAS POROSAS DE TITANIO.....	205
5.2.1 ESTRUCTURA SUPERFICIAL.....	206
5.2.2 ANÁLISIS FISICOQUÍMICO.....	207
5.2.3 FORMACIÓN DE APATITA.....	209
5.2.4 LIBERACIÓN DE IONES.....	212

5.2.5 HALO DE INHIBICIÓN BACTERIANA	214
5.2.6 CITOTOXICIDAD	216
5.2.7 ADHESIÓN, PROLIFERACIÓN Y MINERALIZACIÓN CELULAR	217
5.3 FORMACIÓN DE TITANATOS DE CALCIO E INCORPORACIÓN DE PLATA Y GALIO, CON PROPIEDADES BIOACTIVAS Y ANTIBACTERIANAS, SOBRE ESTRUCTURAS DE TITANIO.	220
5.3.1 SUSTITUCIÓN DEL CLORURO DE CALCIO POR ACETATO EN LA GENERACIÓN DE TITANATOS DE CALCIO CON GALIO.	221
5.3.1.1 Estructura superficial	221
5.3.1.2 Análisis fisicoquímico	222
5.3.1.3 Formación de apatita	223
5.3.2 ESTRUCTURA SUPERFICIAL	224
5.3.3 ANÁLISIS FISICOQUÍMICO	226
5.3.4 FORMACIÓN DE APATITA	228
5.3.5 LIBERACIÓN DE IONES	230
5.3.6 HALO DE INHIBICIÓN BACTERIANA	232
5.3.7 CITOTOXICIDAD	234
5.3.8 ADHESIÓN BACTERIANA	235
6. CONCLUSIONES	237
6.1 CONCLUSIONES DE LA FABRICACIÓN	237
6.2 CONCLUSIONES DE LA FUNCIONALIZACIÓN	239
7. TRABAJO FUTURO	241
7.1 TRABAJOS FUTUROS SOBRE LA FABRICACIÓN.....	241
7.2 TRABAJOS FUTUROS SOBRE LA FUNCIONALIZACIÓN	241
8. ANEXOS.....	243
8.1 ANEXO 1: ESTUDIOS PREVIOS DE FABRICACIÓN	243
8.1.1 CARACTERIZACIÓN POLVOS DE TITANIO	243
8.1.1.1 Morfología y composición de los polvos	244
8.1.1.2 Distribución de tamaños de partícula.....	247
8.1.1.3 Fluidez.....	253
8.1.1.4 Inyectabilidad de los polvos.....	253
.....	258
.....	258
.....	260

Índice

8.1.3 ESTUDIOS PREVIOS DE PROCESADO EN VERDE.....	267
8.1.3.1 Secado	267
8.1.3.2 Eliminación del aglutinante Pluronic	269
8.1.4 ESTUDIOS PREVIOS DE SINTERIZADO.....	272
8.1.4.1 Control dimensional y acabado superficial tras el sinterizado	272
8.1.4.2 Caracterización preliminar de muestras sinterizadas	277
8.2 ANEXO 2: DESARROLLO DE LA IMPRESORA 3D.....	278
8.2.1 PRUEBAS IMPRESORA PILOTO: BCN3D+ DUAL PASTE EXTRUDER	278
8.2.1.1 Ajustes y modificaciones del equipo	278
8.2.1.2 Recopilación de datos, problemáticas y requerimientos.....	283
8.2.2 PRUEBAS IMPRESORA PROTOTIPO INDUSTRIAL	286
8.2.2.1 Mejoras respecto a la impresora piloto	286
8.2.2.2 Ajustes y modificaciones de la impresora prototipo.....	288
8.2.2.3 Recopilación de datos, problemáticas y requerimientos finales.....	291
8.2.3 OBTENCIÓN Y VALIDACIÓN IMPRESORA FINAL	294
8.3 ANEXO 3: ESTUDIOS PREVIOS DE FUNCIONALIZACIÓN	295
8.3.1 FORMACIÓN DE TITANATOS DE SODIO SOBRE ESTRUCTURAS POROSAS DE TITANIO	295
8.3.1.1 Estructura superficial	296
8.3.1.2 Análisis fisicoquímico	297
8.3.1.3 Formación de apatita	300
8.3.2 FORMACIÓN DE TITANATOS DE CALCIO SOBRE ESTRUCTURAS POROSAS DE TITANIO.	304
8.3.2.1 Estructura superficial	305
8.3.2.2 Análisis fisicoquímico	306
8.3.2.3 Formación de apatita	307
9. REFERENCIAS.....	309
10. PUBLICACIONES.....	331
10.1 PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	331
10.2 CONGRESOS	331
10.3 ARTÍCULOS.....	331

Índice de figuras

Figura 1.1 Esquema estructura del hueso [2].	1
Figura 1.2 Esquema de la formación del biofilm [29].	6
Figura 1.3 Ejemplos de superficies antimicrobianas según el mecanismo de acción: superficies bacteriostáticas o bactericidas [30].	7
Figura 2.1 Esquema alteraciones del pie plano [77].	11
Figura 2.2 Fijación de los implantes porosos tipo cuña en las Osteotomías Evans y Cotton (imagen cedida por AMES Medical).	12
Figura 2.3 Estructura porosa obtenida por Osseo Ti imitando al hueso trabecular y cuña Unite3D [81].	13
Figura 2.4 Implantes porosos de Trabecular Metal.	13
Figura 2.5 Estructura porosa del titanio BIOFOAM, superficie rugosa y diseño de la cuña.	14
Figura 2.6 Cuñas Integra Titanium Bone para osteotomías Evan y Cotton [89].	15
Figura 2.7 Cuñas Biosync para osteotomías Evan y Cotton [90].	15
Figura 2.8 Esquema movimientos sistema anatómico tibia-fémur: A) desplazamiento anterior y posterior de la tibia, B) rotación interna de la tibia y C) la hiperextensión de la rodilla [91].	17
Figura 2.9 Osteotomía y adelantamiento de la tuberosidad tibial. Técnica TTA [92].	17
Figura 2.10 Cuña MMP con el sistema de anclaje [94].	18
Figura 2.11 Sistema TTA de Kyon desarrollado en la Universidad de Zürich [92].	19
Figura 2.12 Simulación en fantoma, intervención quirúrgica y radiografía del dispositivo [97].	19
Figura 2.13 Estructura de la caja de titanio: A) vista frontal, B) vista lateral. C) Dibujo esquemático en 3D de la estructura <i>honey comb</i> [99].	20
Figura 2.14 Esquema proceso MIM [102].	21
Figura 2.15 Esquema proceso space holder [103].	22
Figura 2.16 Esquema proceso de fabricación aditiva en estado líquido (directa) y en estado sólido (no directa).	23
Figura 2.17 Resumen esquemático de los procesos actuales de fabricación de aditiva para metales [105].	24
Figura 2.18 Resumen esquemático de los procesos actuales de fabricación de aditiva para metales (fuente AMPower).	25
Figura 2.19 Esquema sistema EBM. Imagen Cortesía Arcam.	26
Figura 2.20 Esquema sistema LPBF. Imagen cortesía de Simufact.	27
Figura 2.21 Esquema sistema 3DP [111].	28

Índice

Figura 2.22 Esquema sistema FDM [111].	29
Figura 2.23 a) Polvo de titanio esponja; b) Polvo de Ti HDH; c) Polvo de titanio atomizado por plasma, d) Polvo de titanio electrolítico producido por el proceso FFC-Cambridge [117].	30
Figura 2.24 Esquema sistema DIW [127]. A) Robot controlado por ordenador durante la deposición, B) deposición del filamento en 2D, y C) resultado de la estructura 3D.	31
Figura 2.25 Imagen de muestras en verde del estudio de Ren y colaboradores [131].	32
Figura 2.26 Diferentes tipos de fibras de acero inoxidable fabricadas mediante 3DF [132].	33
Figura 2.27 Tipos de estructuras conseguidas y posibles materiales para la impresión [133].	33
Figura 2.28 Imagen de las muestras obtenidas a partir de las tintas base Pluronic [134].	34
Figura 2.29 Imagen SEM de un scaffold obtenido mediante 3DF. Se observa contaminación tanto en la superficie como en la sección transversal de la muestra [139].	35
Figura 2.30 Proceso de fabricación de scaffolds de Ti a partir extrusión de pasta de TiH ₂ [140].	35
Figura 2.31 Estructura atómica del Pluronic F127 [142].	36
Figura 2.32 Estructura química de los estereoisómeros del ácido láctico y estructura repetitiva del PLA [151].	37
Figura 2.33 Esquema del número de estudios publicados utilizando diferentes temperaturas de sinterización. Todos los estudios considerados utilizaron una atmósfera controlada (alto vacío o argón) y no aplicaron presión durante el sinterizado [166].	38
Figura 2.34 Cambio estructural de la superficie del Ti metal sometido al tratamiento NaOH y posterior tratamiento térmico.	40
Figura 2.35 Proceso de formación de apatita tras tratamiento termoquímico alcalino [182].	41
Figura 2.36 Estructura cristalina del titanato de sodio hidrogenado, el titanato de calcio hidrogenado y el titanato de calcio [66].	42
Figura 2.37 Micrografías SEM del Ti y aleaciones tipo Ti-Zr-Nb-Ta sometidas al proceso completo (NaOH + CaCl ₂ + tratamiento térmico + tratamiento en agua) tras estar sumergidas 3 días en SBF [187]–[190].	43
Figura 2.38 Esquema mecanismo antibacteriano de los iones de plata [208].	45
Figura 2.39 Imagen SEM de la superficie de Ti tras los diferentes tratamientos térmicos y la inmersión en SBF [74].	46
Figura 2.40 Representación esquemática del mecanismo “caballo de Troya” del Galio. A) transporte intramembrana del Fe ³⁺ a través de sideróforos. B) Los iones Ga ³⁺ compiten con los iones Fe ³⁺ por la unión con los sideróforos. C) se interrumpen las rutas metabólicas cruciales dependientes de Fe en la bacteria [218].	48
Figura 2.41 Representación esquemática del mecanismo antibacteriano del sistema TE – AgNPs [238].	50
Figura 3.1 Esquema general del procedimiento experimental seguido.	53

Figura 3.2 Microscopio electrónico Zeiss EVO MA25 con detector EDS α -Flash 5010 de Bruker.	55
Figura 3.3 Analizador elemental: A) de carbono LECO-CS 200 y B) de oxígeno LECO ON736.	56
Figura 3.4 Cribadora Retsch AS-200 digit.	56
Figura 3.5 Equipo de difracción Beckman Coulter LS 13320 del CCITUB.	57
Figura 3.6 Fluidímetro Carney.	58
Figura 3.7 Ejemplo de tinta válida y no válida (>60%).	61
Figura 3.8 Elementos para la preparación de tinta: material, recipientes, báscula y mezclador.	65
Figura 3.9 Utensilios de impresión 3D y acoplamiento del utillaje en la máquina de compresión AG-IS SHIMADZU.	66
Figura 3.10 Modelos 3D de las piezas estándar para las pruebas de impresión. A) Cilindro de 10x15 mm, B) y C) cuñas para osteotomías en humano (Evans y Cotton) y D) cuña veterinaria.	68
Figura 3.11 Impresoras 3D A) BCN 3D+ y B) dual paste extruder.	69
Figura 3.12 Descripción gráfica de la carga de jeringas y preparación de la impresora.	71
Figura 3.13 Ejemplo de preparación de los parámetros de impresión.	71
Figura 3.14 Impresora 3D prototipo.	72
Figura 3.15 A) Prototipo de molde de secado, B) impresora 3D Ultimaker3.	76
Figura 3.16 Tratamiento de eliminación en agua sobre cilindros porosos.	78
Figura 3.17 Equipo de Análisis Térmico Simultaneo (STA) modelo 409 PC Netzsch.	79
Figura 3.18 A) Preparación de muestras y B) estufa Heraeus Instrument 1000 para la termogravimetría.	80
Figura 3.19 Equipo de ensayos mecánicos (AG-IS SHIMADZU 100 kN) adaptado con el utillaje para el ensayo flexión a 3 puntos.	81
Figura 3.20 A) Equipo de ensayos mecánicos (AG-IS SHIMADZU 100 kN) adaptado para el ensayo a compresión. B) Muestras para la caracterización mecánica a compresión.	81
Figura 3. 21 Rugosímetro–perfilómetro MITUTOYO Sv C3200.	82
Figura 3.22 Equipos de mecanizado: A) cortadora, B) pulidora, C) taladro y D) torno.	82
Figura 3.23 Ejemplo cuña veterinaria fabricada de OsteoSinter® (Ames Medical).	83
Figura 3.24 Transporte A) superficial y B) a través de volumen [258].	85
Figura 3.25 Ejemplos de muestras cúbicas para el ensayo de compresión. A) Aplicación de la carga paralela a la dirección de impresión. Aplicación de la carga perpendicular al patrón de impresión B) Lineal y C) Honeycomb.	88
Figura 3.26 Microscopio Olympus GX51	90
Figura 3.27 Equipos de preparación metalográfica: A) embutidora, B) equipo de desbaste semiautomático C) pulidora automática y D) campana de ataque.	91

Índice

Figura 3.28 A) Micrómetro (palmer) digital Mitutoyo. B) Esquema de las mediciones.	91
Figura 3.29 A) Porosímetro AutoPore IV9500 Micrometrics. B) Lupa electrónica Olympus SZ61.	93
Figura 3.30 MicroCT Skyscan 1272 de Bruker. Fuente: Centro de Investigación en Ciencia e Ingeniería Multiescala.	93
Figura 3.31 Ejemplos de procesado de imagen con el software DATA VIEWER de Extron, en rojo se indica el volumen de interés (VOI).	94
Figura 3.32 A) Testigo del proceso, placa en la misma gaveta que las muestras. B) testigo del sinterizado, polvo de sacrificio.	95
Figura 3.33 A) Equipo de ensayos mecánicos (AG-IS SHIMADZU 100 kN) adaptado con el utillaje para el ensayo a compresión. B) Dimensiones establecidas por la norma.	95
Figura 3.34 Curvas tensión-deformación para determinar los valores característicos del ensayo de compresión en metales porosos. A) Determinación región de Plateau (σ_{pl}). B) Metodología para calcular el módulo elástico. Fuente: ISO 13314:2011(E).	96
Figura 3.35 Muestra porosa y lisa.....	97
Figura 3.36 Etapas tratamiento Na: A) limpieza, B) ataque NaOH y C) tratamiento térmico. .	98
Figura 3.37 Etapas tratamiento Ca: A) limpieza, B) ataque NaOH, C) inmersión en solución con Ca, D) tratamiento térmico y E) tratamiento con agua.	101
Figura 3.38 Microscopio de haz de iones focalizados (FIB) Zeiss Neon40.	111
Figura 3.39 Equipos utilizados para la cara caracterización fisicoquímica: A) Renishaw's inVia Qontor (Raman) y B) difractómetro D8 Advance de Bruker (DRX).	111
Figura 3.40 A) Materiales utilizados, B) mezcla de todos los componentes para la elaboración del SBF y C) control del PH de la solución.	113
Figura 3.41 Equipo 7800 ICP-MS del centro Multiscale.	114
Figura 3.42 Ejemplo de placa tras la incubación, lista para el conteo de colonias	117
Figura 3.43 Cuadrantes cámara de Neubauer.	119
Figura 4.1 Carga máxima y fuerza de impresión 3D de las tintas metálicas fabricadas con diferentes porcentajes de PLA (50%, 60% y 75% de Ti). Ensayo realizado en una sala a temperatura ambiente con las jeringas de 3cc y puntas de 0,41 mm.	125
Figura 4.2 Curvas de inyectabilidad de las tintas: A) Ti1PLA1 (50%Ti) y B) Ti3PLA1 (75%Ti). Ensayo realizado en una sala a temperatura ambiente con las jeringas de 3cc y puntas de 0,41 mm.	126
Figura 4.3 Ejemplo de dos muestras impresas con la tinta Ti3PLA2 (60%Ti) A) válida y B) defectuosa.	127
Figura 4.4 Proceso de RLP [279]	128
Figura 4.5 Ejemplo de A) tinta resistente al agua B) tinta no resistente al agua, C) Impresión válida de una muestra estándar D) Impresión defectuosa de una muestra estándar.	130

Figura 4.6 Evolución de la carga máxima y la fuerza de impresión 3D con el tiempo para la tinta base PLA/Pluronic. Ensayo realizado en una sala a temperatura ambiente con las jeringas de 3cc y puntas de 0,41 mm.....	131
Figura 4.7 Curvas de inyectabilidad de la tinta base PLA/Pluronic A) inmediatamente después de ser preparada y B) transcurridas 24 horas. Ensayo realizado en una sala a temperatura ambiente con las jeringas de 3cc y puntas de 0,41 mm.....	132
Figura 4.8 Efecto de la temperatura (calentado o enfriando la matriz donde se colocan las jeringas, no la sala) sobre la carga máxima y la fuerza de impresión 3D de la tinta base PLA/Pluronic. Ensayo realizado en una sala a temperatura ambiente con las jeringas de 3cc y puntas de 0,41 mm.....	133
Figura 4.9 Imagen del ensayo inyectabilidad a 60°C (calentado la matriz donde se colocan las jeringas, no la sala) y de la jeringa tras el ensayo. Ensayo realizado en una sala a temperatura ambiente con las jeringas de 3cc y puntas de 0,41 mm.....	134
Figura 4.10 Carga máxima y fuerza de impresión 3D para las diferentes puntas dosificadoras. Ensayo realizado en una sala a temperatura ambiente con las jeringas de 3cc y puntas de 0,41 mm y 0, 25mm.	134
Figura 4.11 Ejemplo de cilindro poroso impreso sobre el plato con adhesivos solubles en agua. Se evita la necesidad de utilizar un papel entre el plato y la pieza.	135
Figura 4.12 Ejemplo de muestra estándar segundos después de la impresión con la tinta final	136
Figura 4.13 Configuración de la zona de impresión de A) Impresora piloto B) impresora prototipo.....	138
Figura 4.14 Aumento del flujo x2 en el Gcode.	139
Figura 4.15 Resultados de la inmersión en agua a temperatura ambiente y diferentes tiempos (0.25, 0.5, 1, 2 y 4 horas). Renovando el agua y manteniendo el volumen constante.....	141
Figura 4.16 Resultados de la inmersión en agua fría (10°C) y caliente (40°C), a 0,5 y 1 hora.	142
Figura 4.17 Imagen de una muestra durante la inmersión en agua a temperatura ambiente.	143
Figura 4.18 A) Diseño en 3D de un molde para colocar la muestra durante la inmersión en agua y B) muestra tras la inmersión con el uso del molde.	144
Figura 4.19 Comportamiento térmico de las tintas preliminares base Pluronic y base PLA y de la tinta final base PLA/Puronic. Análisis termogravimétrico calentando a 5°C/min hasta 520°C.	145
Figura 4.20 Efecto de la inmersión previa en agua en el comportamiento térmico de la tinta base PLA/Pluronic mediante análisis termogravimétrico. 5°C/min hasta 520°C.	148
Figura 4.21 Porcentaje de carbono y de pérdida de masa a 300°C durante 1, 2, 4, 24, 48 y 72 horas.	150
Figura 4.22 Porcentaje de Oxígeno presente en el polvo después de tratamientos térmicos a diferentes temperaturas durante 1h.....	151

Índice

Figura 4.23 Superficie del polvo tras calentar 1 hora a diferentes temperaturas.....	152
Figura 4.24 Flexión a 3 puntos de muestras en verde (sin eliminar los ligantes poliméricos, únicamente dejando las piezas al aire overnight): A) sin aplicar carga B) aplicando carga. ...	156
Figura 4.25 Gráfico tensión deformación de los cilindros macizos en verde (sin eliminar los ligantes poliméricos, únicamente dejando las piezas al aire overnight).	157
Figura 4.26 Cilindro poroso (impreso con la tinta final) tras el ensayo de compresión.	159
Figura 4.27 Proceso de corte con A) la tronzadora y B) cortadora de precisión.	160
Figura 4.28 Sección A) transversal y B) longitudinal de la muestra tras el corte.	160
Figura 4.29 Proceso de desbaste de una muestra en verde.....	161
Figura 4.30 Imagen de la superficie de una muestra A) antes y B) después del desbaste.	161
Figura 4.31 Proceso de taladrado en verde.	162
Figura 4.32 Imágenes de la superficie taladrada.....	162
Figura 4.33 Proceso de torneado de cilindro en verde.	163
Figura 4.34 Sección A) longitudinal y B) transversal del cilindro torneado y refrentado en verde.	163
Figura 4.35 Implante poroso tipo cuña. A) Superficie lateral (perímetro) mecanizada en verde, B) superficie superior mecanizada en verde, C) superficie lateral sin mecanizar y D) superficie superior sin mecanizar.....	164
Figura 4.36 Imagen MO a X50 aumentos de la microestructura de una muestra sinterizada A) 1150°C y B) 1350°C).	166
Figura 4.37 Representación gráfica del tamaño de grano de las muestras sinterizadas a diferentes temperaturas y tiempos; expresado como A) Area media y B) diámetro máximo.	166
Figura 4.38 Imágenes SEM a X1000 aumentos de las muestras sinterizadas a 1350°C durante A) 3 horas, B) 2 horas, C) 1 hora.	168
Figura 4.39 Imágenes SEM a X1000 aumentos de las muestras sinterizadas a 1250°C durante A) 3 horas, B) 2 horas, C) 1 hora.	168
Figura 4.40 Imágenes SEM a X1000 aumentos de las muestras sinterizadas a 1150°C durante A) 3 horas, B) 2 horas, C) 1 hora.	168
Figura 4.41 Imágen SEM a X1000 aumentos de una muestra en verde.....	169
Figura 4.42 Representación gráfica de la contracción de las muestras sinterizadas a diferentes temperaturas y tiempos.	170
Figura 4.43. Representación gráfica del A) modulo elástico y B) resistencia a compresión de las muestras sinterizadas a diferentes temperaturas y tiempos.	171
Figura 4.44 Imágenes SEM a X1000 aumentos de las muestras sinterizadas a 1350°C A) 2.5°C/min y 2 horas, B) 4°C/min y 0 horas.....	173
Figura 4.45 Imágenes SEM a X1000 aumentos de las muestras sinterizadas a 1150°C A) 2.5°C/min y 2 horas, B) 4°C/min y 0 horas.....	174

Figura 4.46 Representación gráfica de la contracción de las muestras sinterizadas a diferentes velocidades y temperaturas.	174
Figura 4.47 Representación gráfica de A) modulo elástico y B) resistencia a compresión de las muestras sinterizadas a diferentes velocidades y temperaturas.	175
Figura 4.48 Imágenes de MO tratadas de diferentes muestras con 70% de porosidad.....	178
Figura 4.49 Imagen la sección A) transversal y B) longitudinal de muestras en verde impresas con 50%, 60% y 70% de porosidad (según el gcode).....	179
Figura 4.50 Gráfico de la intrusión de mercurio según el diámetro del poro (canal de poro). 180	
Figura 4.51 Imágenes a 1.25 aumentos de muestras sinterizadas. A) 70% B) 60% C) 50%.	180
Figura 4.52 Reconstrucción 3D de las muestras sinterizadas. A) 70% B) 60% C) 50 %	181
Figura 4.53 Contracción de las muestras sinterizadas a diferentes porosidades y temperaturas.	183
Figura 4.54 Representación gráfica de A) modulo elástico y B) resistencia a compresión de las muestras con diferentes porosidades sinterizadas a 1350°C y 1150°C.	184
Figura 4.55 Propiedades mecánicas a compresión en función de la porosidad A) Módulo elástico B) Resistencia a compresión. (fuente: Northwest Institute for Nonferrous Metal Research, China).	185
Figura 4.56 Propiedades mecánicas a compresión en función de la porosidad A) obtenida mediante space holder a 1350°C (fuente: Grupo AMES), B) mediante DIW a 1350°C y 1150°C.	186
Figura 4.57 Representación gráfica de del %C y %O de las muestras con diferentes porosidades sinterizadas a 1350°C y 1150°C, así como de los testigos. Límites de O (0.4%) y C (0.1%) según la norma ASTM F67-06.	187
Figura 4.58 Representación gráfica de A) modulo elástico y B) resistencia a compresión de las muestras con diferentes estructuras y porosidades.	190
Figura 4.59 Imágenes de las muestras tras el ensayo de compresión. Aplicación de carga paralela a la impresión A) estructura lineal B) estructura honeycomb.....	191
Figura 4.60 Imágenes de las muestras tras el ensayo de compresión. Aplicación de carga perpendicular a la impresión A) estructura lineal B) estructura honeycomb.	192
Figura 4.61 Representación gráfica de A) modulo elástico y B) resistencia a compresión de las muestras con diferente número de perímetros.....	193
Figura 4.62 Imágenes de las muestras tras el ensayo de compresión: A) sin perímetro, B) con perímetro.....	194
Figura 5.1 Imagen SEM a 10k aumentos de la superficie de la muestra tratada con acetato de calcio y nitrato de plata (KAg).....	197
Figura 5.2 Espectro Raman de las muestras tras la inmersión en acetato de calcio y nitrato de plata (antes del tratamiento térmico). TCH: titanato de calcio hidrogenado.....	198

Índice

Figura 5.3 Diagrama de DRX tras el tratamiento termoquímico completo con acetato de calcio y nitrato de plata (KAg). AgTC: titanato de calcio con plata, R: rutilo, Ti: titanio, Ag: plata..	199
Figura 5.4 Imágenes SEM a 4K aumentos de A) la superficie y B) la sección de la capa generada tras incubar las muestras KAg 7 días en SBF.	200
Figura 5.5 Liberación de iones Ag^+ y Ca^{2+} de muestras porosas (3D) y lisas (2D).	201
Figura 5.6 Halo de inhibición bacteriana en las muestras control (KAc). Staphylococcus epidermidis (S. epi), Staphylococcus aureus (S. aureus), pseudomona aeruginosa (P. aeru) y escherichia coli (E. coli).....	202
Figura 5.7 Halo de inhibición bacteriana en las muestras KAg. Staphylococcus epidermidis (S. epi), Staphylococcus aureus (S. aureus), pseudomona aeruginosa (P. aeru) y escherichia coli (E. coli).....	203
Figura 5.8 Citotoxicidad de muestras porosas Ti, KAc y KAg.	204
Figura 5.9 Imágenes SEM a 10k aumentos de la superficie de las muestras tratadas con cloruro de calcio y diferentes concentraciones de nitrato de galio. A) KGa5, B)KGa10, C) KGa50, D) KGa100.....	206
Figura 5.10 Espectro Raman de las muestras tras la inmersión en cloruro de calcio y nitrato de galio a diferentes concentraciones (5, 10, 50 y 100mM). A: anatasa, Ga-TCH: titanato de calcio hidrogenado con galio.....	207
Figura 5.11 Diagrama de DRX de una muestra tras el tratamiento termoquímico completo con cloruro de calcio y nitrato de galio 5mM (KGa5). A: anatasa, Ga-TC: titanato de calcio con galio, TC: titanato de calcio, R: rutilo, Ti: titanio.....	208
Figura 5.12 Imágenes SEM a 4K aumentos de A) la superficie y B) la sección de la capa generada tras incubar las muestras KGa5 7 días en SBF.	209
Figura 5.13 Imágenes SEM a 4K aumentos de A) la superficie y B) la sección de la capa generada tras incubar las muestras KGa10 7 días en SBF.	209
Figura 5.14 Imágenes SEM a 4K aumentos de A) la superficie y B) la sección de la capa generada tras incubar las muestras KGa50 7 días en SBF.	209
Figura 5.15 Imágenes SEM a 4K aumentos de A) la superficie y B) la sección de la capa generada tras incubar las muestras KGa100 7 días en SBF.....	210
Figura 5.16 Imágenes SEM a 4K aumentos de la superficie de la capa generada tras incubar en SBF las muestras A) KGa5 durante 5 días y B) KGa100 durante 3 días.	210
Figura 5.17 Liberación (acumulativa) de iones Ga^{3+} y Ca^{2+} de muestras porosas (3D) y lisas (2D), tratadas con la menor y mayor concentración de nitrato de galio.	212
Figura 5.18 Halo de inhibición bacteriana en las muestras KGa100. Staphylococcus epidermidis (S. epi), Staphylococcus aureus (S. aureus), pseudomona aeruginosa (P. aeru) y escherichia coli (E. coli).....	215
Figura 5.19 Citotoxicidad de muestras porosas Ti, KCa, KGa5 y KGa100.	216
Figura 5.20 Adhesión celular a 6h de muestras porosas Ti, K24, KGa5 y KGa100.....	217

Figura 5.21 Resultados de los ensayos in vitro de muestras Ti, K24, KGa5 y KGa100. A) Proliferación celular a 6 horas, 7, 14, 21 y 28 días. B) Cuantificación de depósitos de calcio producidos por las células a 28 días. C) Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) 21 días.	218
Figura 5.22 Imágenes SEM a 10k aumentos de la superficie de la muestra tratada con acetato de calcio y nitrato de galio 5mM (KAcGa5).	221
Figura 5.23 Espectro Raman de las muestras tras la inmersión en acetato de calcio y nitrato de galio 5mM (KAcGa5). Ga-TCH: titanato de calcio hidrogenado con galio.	222
Figura 5.24 Imágenes SEM a 4K aumentos de A) la superficie y B) sección de la capa generada tras incubar las muestras KAcGa5 7 días en SBF.	223
Figura 5.25 Imágenes SEM a 10k aumentos de la superficie de las muestras tratadas con acetato de calcio y diferentes concentraciones de nitrato de galio y plata. A) KGAg51, B) KGAg52, C) KGAg55, D) KGAg102.	224
Figura 5.26 Espectro Raman de las muestras tras la inmersión en acetato de calcio y nitrato de galio y de plata a diferentes concentraciones (antes del tratamiento térmico). Ga-TCH: titanato de calcio hidrogenado con galio, A: anatasa, R: rutilo.	226
Figura 5.27 Diagrama de DRX de una muestra lisa tras el tratamiento termoquímico completo con $C_4H_6CaO_4$ y $Ga(NO_3)_3$ 5mM y $AgNO_3$ 1mM (KGAg51). Ag/Ga-TC: titanato de calcio con galio y plata, R: rutilo, Ti: titanio, Ag: plata, TC: titanato de calcio.	227
Figura 5.28 Imágenes SEM a 4K aumentos de A) la superficie y B) la sección de la capa generada tras incubar las muestras KGAg51 7 días en SBF.....	228
Figura 5.29 Imágenes SEM a 4K aumentos de A) la superficie y B) la sección de la capa generada tras incubar las muestras KGAg52 7 días en SBF.....	228
Figura 5.30 Imágenes SEM a 4K aumentos de A) la superficie y B) la sección de la capa generada tras incubar las muestras KGAg55 7 días en SBF.....	228
Figura 5.31 Imágenes SEM a 4K aumentos de A) la superficie y B) la sección de la capa generada tras incubar las muestras KGAg102 7 días en SBF.....	229
Figura 5.32 Liberación (acumulativa) de iones de Ga, Ag y Ca de las muestras porosas (3D) y lisas (2D) tratadas con diferentes concentraciones de nitrato de galio y de plata.	230
Figura 5.33 Halo de inhibición bacteriana de las muestras KGAg51.....	233
Figura 5.34 Citotoxicidad de muestras porosas tratadas con diferentes concentraciones de nitrato de plata y de galio, con Ti sin tratamiento como control.....	234
Figura 5.35 Resultados de adhesión bacteriana para las muestras porosas KGAg51, KGAg52 y KGAg102, con Ti como control.	235
Figura 8.1 Muestra fabricada con polvo esférico (Ti_E), tras impresión 3D (A) y tras eliminación del ligante (B). Muestra fabricada con polvo irregular (Ti), tras impresión 3D (C) y tras eliminación del ligante (D).....	243
Figura 8.2 Micrografía de los polvos A)Ti_G, B) Ti y C) Ti64 a x500.	244
Figura 8.3 Análisis cualitativo mediante EDS de los polvos: A) Ti_G, B) Ti y C) Ti64.....	245

Índice

Figura 8.4 Análisis cuantitativo (% en peso) con un equipo LECO de los elementos intersticiales presentes en los polvos de titanio: A) contenido de C y O y B) contenido de N.	246
Figura 8.5 Distribución del % en masa y % masa acumulada para diferentes rangos de tamaños de partícula A) Ti_G, B) Ti y C) Ti64, medido por tamizado.	248
Figura 8.6 Histograma de distribución del tamaño de partícula y curva de frecuencia acumulada de los polvos A) Ti_G, B) Ti y C) Ti64.	249
Figura 8.7 Distribución del tamaño de partícula de los polvos A) Ti_G, B) Ti y C) Ti64.	251
Figura 8.8 Curvas de inyectabilidad de las tintas fabricadas con los polvos A)Ti y B) Ti64....	254
Figura 8.9 Carga máxima y fuerza de impresión 3D de cada tinta.	255
Figura 8.10 Resultados de la inyectabilidad del polvo Ti_G con: A) Puntas dosificadoras metálicas y B) puntas cónicas.	255
Figura 8.11 Curvas de inyectabilidad de la tinta de Ti_G con las puntas: A) cónica 1.6 mm, B) cónica 1.19 mm C) metálica 1.36mm y D) metálica 1.54m.	256
Figura 8.12 Carga máxima y fuerza de impresión 3D de la tinta de Ti_G para las diferentes puntas dosificadoras.	257
Figura 8.13 Carga máxima y fuerza de impresión del hidrogel en función del porcentaje de Pluronic.	258
Figura 8.14 Evolución de la carga máxima y la fuerza de impresión con el tiempo para hidrogeles con diferentes concentraciones de Pluronic.	259
Figura 8.15 Imagen de la consistencia de la tinta metálica con un 10% de Pluronic.....	260
Figura 8.16 Carga máxima y fuerza de impresión de las tintas metálicas (~60% Ti) fabricadas con hidrogeles del 20%, 30% y 40% de Pluronic.	261
Figura 8.17 Deposición de polvo esférico e irregular [339]	261
Figura 8.18 Curvas de inyectabilidad de las tintas con A) 20% y B) 40% de Pluronic.	262
Figura 8.19 Evolución de la carga máxima y la fuerza de impresión con el tiempo para las tintas base Pluronic (~60% Ti) con diferentes concentraciones de Pluronic.....	263
Figura 8.20 Ejemplo de impresión 3D de piezas estándar con la tinta Ti/Plur30%.....	264
Figura 8.21 Impresora BCN3D+ paste extruder y sistema de control de %HR y Temperatura.	265
Figura 8.22 Ejemplo esquemático de uno de los problemas de la falta de adhesión al plato.	265
Figura 8.23 Ejemplo de impresión de una pieza (parte gris) sobre soporte de hidrogel base Pluronic (parte transparente que la rodea).....	266
Figura 8.24 Ejemplo de distorsión tras el secado de una muestra porosa (80%) tipo cuña veterinaria.	267
Figura 8.25 Muestra porosa (60%) sobredimensionada en el eje Z (20%) ligeramente distorsionada tras el secado overnight a temperatura ambiente.	268
Figura 8.26 Muestra porosa tipo cuña veterinaria impresa sobre una estructura de soporte.	269

Figura 8.27 Análisis termogravimétrico del polvo de Pluronic (5°C/min hasta 520°C)	269
Figura 8.28 Análisis termogravimétrico de polvo de Pluronic a una temperatura constante de 300°C (velocidad de calentamiento 30°C/min).	270
Figura 8.29 %C de las muestras tras los diferentes tiempos de tratamiento térmico.....	271
Figura 8.30 Cuña V1. Sinterizada a 1350°C, porosidad 80%, sin sobredimensionar ni mecanizar.....	272
Figura 8.31 Cuña V2. Sinterizada a 1350°C, porosidad 80%, sin sobredimensionar, caras desbastadas.	273
Figura 8.32 Cuña V3. Sinterizada a 1350°C, porosidad 50%, sin sobredimensionar ni mecanizar.....	273
Figura 8.33 Cuña V4.Sinterizada a 1350°C, porosidad 50%, sin sobredimensionar, caras desbastadas.	274
Figura 8.34 Cuña V5. Sinterizada a 1350°C al revés de cómo se ha secado, porosidad 50%, sin sobredimensiona ni mecanizar	274
Figura 8.35 A) Secuencia de impresión de una cuña. B) Cara superior de una cuña sinterizada	275
Figura 8.36 Cuña V6. Sinterizada a 1350°C al revés de cómo se ha secado, porosidad 50%, sobredimensiona y cortada por la cara superior.	275
Figura 8.37 Cuña V7. Sinterizada a 1350°C al revés de cómo se ha secado, porosidad 50%, sobredimensiona y desbastada.....	276
Figura 8.38 Cuña V8. Sinterizada a 1350°C al revés de cómo se ha secado, porosidad 50%, sobredimensiona y desbastada en verde.	276
Figura 8.39 Imágenes SEM de las muestras sinterizadas a A) X150 y B) X1000 aumentos. .	277
Figura 8.40 Esquema de del sistema de extrusión.....	278
Figura 8.41 Imagen de los extrusores A) de serie y B) mecanizado. C) Diseño CAD de los extrusores.....	279
Figura 8.42 Planos y extrusores mecanizados en aluminio.	279
Figura 8.43 Desgaste de los engranajes.	280
Figura 8.44 Planos de los engranajes.....	280
Figura 8.45 Recambios de los engranajes impresos.....	281
Figura 8.46 Esquema del ensamblaje soporte jeringas-carro de impresión.	281
Figura 8.47 Ejemplo de diseños CAD del soporte de las jeringas y ensamblaje final.	282
Figura 8.48 Ensamblaje soporte, jeringas 5cc y 3cc, y sus respectivos adaptadores.	283
Figura 8.49 Ensamblaje guía y extrusor para la jeringa de 10cc.	283
Figura 8.50 CAD de los diferentes tamaños de jeringas propuestos.	284
Figura 8.51 Impresora 3D prototipo.....	286

Índice

Figura 8.52 Secuencia de imagen para obtención de una pieza: A) proceso de extrusión 3D de titanio dentro de un gel, B) pieza impresa dentro del gel, C) inmersión de la pieza en agua para la eliminación del gel, D) pieza en verde.	287
Figura 8.53 Función creada set z0.	288
Figura 8.54 Función creada Situar Encima Esquina.	289
Figura 8.55 Función creada Bajar más.	289
Figura 8.56 Función creada Extruir 0.1.	289
Figura 8.57 Modificación de la función Pause.....	290
Figura 8.58 Modificación de la función Resume.....	290
Figura 8.59 Modificación de la posición del ventilador de la cabina.	291
Figura 8.60 Carga máxima a compresión y cilindro obtenido (en verde) con la impresora A) piloto y B) prototipo.	292
Figura 8.61 Defecto escalón producido por el cambio de jeringa.	292
Figura 8.62 Jeringa con escape de material.....	293
Figura 8.63 A) Fotografía general de la impresora final. B) imagen del sistema de doble extrusión. C) Ejemplo de impresión. D) Pieza modelo impresa con dos materiales.	294
Figura 8.64 Imágenes SEM a 50 y 10k aumentos de la superficie exterior e interior de las muestras K24.	296
Figura 8.65 Imágenes SEM a 10k aumentos de la superficie de las muestras porosas A) K6, B) K10, C) K24. D) Imagen de la literatura de una muestra a la que se le ha realizado el mismo tratamiento que a K24 (control) [349].	297
Figura 8.66 Espectro Raman de las muestras tras el ataque alcalino a diferentes tiempos (sin tratamiento térmico). A: anatasa, TSH: titanato de sodio hidrogenado, R: rutilo.	298
Figura 8.67 Diagrama de DRX de las muestras lisas A) K6, B) K10 y C) K24 (tratamiento completo). TS: titanato de sodio, R: rutilo, Ti: titanio.	299
Figura 8.68 Imágenes SEM a 4K aumentos de la superficie y la sección de la capa generada tras sumergir las muestras A y B) K6, C y D) K10 y E y F) K24 en SBF durante 7 días.	300
Figura 8.69 Espectro Raman de la capa de precipitados generada en la muestra K24 tras la inmersión en SBF durante 7 días. A: anatasa, TS: titanato de sodio, R: rutilo, HA: hidroxiapatita.	301
Figura 8.70 Imágenes SEM a 4K aumentos de superficie y sección tras sumergir en SBF: A y B) K10 5 días, C y D) K10 3 días.	302
Figura 8.71 Imágenes SEM a 4K aumentos de superficie y sección tras sumergir en SBF: A y B) K24 5 días, C y D) K24 3 días.	303
Figura 8.72 Imágenes SEM a 10k aumentos de la superficie de las muestras tratadas con: A) acetato (KAc) y B) cloruro de calcio (KCa).....	305
Figura 8.73 Espectros Raman de las muestras tras la inmersión en acetato (KAc) y cloruro (KCa) de calcio (antes del tratamiento térmico). TCH: titanato de calcio hidrogenado.	306

Figura 8.74 Imágenes SEM a 4K aumentos de la superficie y la sección de la capa generada tras sumergir las muestras 7 días en SBF. A) y B) Muestras tratadas con acetato de calcio (KAc) y C) y D) con cloruro de calcio (KCa). 307

Índice de tablas

Tabla 1.1 Propiedades mecánicas del hueso [5].	2
Tabla 1.2 Características de los materiales porosos comerciales para ortopedia [14].	4
Tabla 2.1 Resumen resultados ensayos mecánicos espuma de Tántalo [12]	14
Tabla 2.2 Resumen propiedades prótesis porosas en el mercado.	16
Tabla 2.3 Contenido de oxígeno/nitrógeno para polvos de titanio según la distribución de la malla (mesh) [171].	39
Tabla 3.1 Descripción de los polvos base Ti usados en este trabajo	54
Tabla 3.2 Descripción de los pellets de PLA usados en este trabajo.	58
Tabla 3.3 Descripción de los disolventes orgánicos usados en este trabajo.	59
Tabla 3.4 Identificación de los reactivos utilizados en el tratamiento termoquímico	60
Tabla 3.5 Requerimientos de la tinta final.	63
Tabla 3.6 % en masa de los componentes de las tintas.	64
Tabla 3.7 Designación de las puntas dosificadoras	67
Tabla 3.8 Principales componentes de la impresora prototipo.	70
Tabla 3.9 Parámetros y condiciones que pueden afectar en la distorsión durante el secado.	74
Tabla 3.10 Parámetros y condiciones de la inmersión en agua	75
Tabla 3.11 Condiciones de la termogravimetría y del estudio del %O y la T ^a	77
Tabla 3.13 Condiciones de los tratamientos térmicos (TT) de eliminación propuestos	77
Tabla 3.13 Parámetros usados en el análisis térmico de descomposición.	79
Tabla 3.14 Parámetros que pueden influir en el acabado de las piezas sinterizadas.	83
Tabla 3.15 Parámetros variables y constantes del estudio sobre el ciclo térmico	84
Tabla 3.16 Parámetros variables y constantes del estudio de la velocidad del ciclo térmico.	86
Tabla 3.17 Parámetros variables y constantes del estudio de la porosidad	87
Tabla 3.18 Parámetros variables y constantes del estudio de la estructura	88
Tabla 3. 19 Parámetros variables y constantes del estudio sobre los perímetros.	89
Tabla 3.20 Identificación de las muestras tratadas con Kokubo.	99
Tabla 3.21 Número de muestras utilizadas en el tratamiento Na.	99
Tabla 3.22 Identificación de las muestras del tratamiento Ca	101
Tabla 3.23 Número de muestras utilizadas en el tratamiento Ca.	102
Tabla 3.24 Identificación de las muestras del tratamiento Ag	103

Índice

Tabla 3.25 Número de muestras utilizadas en el tratamiento Ag.....	104
Tabla 3.26 Identificación de las muestras del tratamiento Ga.....	106
Tabla 3.27 Número de muestras utilizadas en el tratamiento Ga.....	107
Tabla 3.28 Identificación de las muestras del tratamiento Ag-Ga.....	109
Tabla 3.29 Número de muestras utilizadas en el tratamiento Ag-Ga.....	110
Tabla 3.30 Reactivos preparación SBF.	112
Tabla 4.1. Identificación de las tintas base PLA.....	125
Tabla 4.2 Resultados de la optimización de las tintas base mezcla de ligantes	129
Tabla 4.3 Resumen de los parámetros más relevantes del gcode.....	137
Tabla 4.4 Evolución del % en masa de los componentes hasta la inmersión en agua. Composición inicial de la tinta, después del tiempo de impresión y tras la inmersión en agua (más secado overnight).....	143
Tabla 4.5 Evolución del % en masa de los componentes de la tinta base Pluronic y base PLA. Composición inicial de las tintas, después del secado (Pluronic) / evaporación del disolvente (PLA) y resultado del análisis termogravimétrico (TGA).	146
Tabla 4.6 Evolución del % en masa de los componentes de la tinta final base PLA/Pluronic. Composición inicial de la tinta, después del tiempo de impresión, tras la inmersión en agua (más secado overnight) y el resultado del análisis termogravimétrico (TGA).	147
Tabla 4.7 Evolución del % en masa de los componentes de la tinta base PLA/Pluronic sin la etapa de inmersión en agua. Composición inicial de la tinta, después de la evaporación de disolventes y resultado del análisis termogravimétrico (TGA).	149
Tabla 4.8 Evolución de los componentes de la tinta final en cada una de las etapas de eliminación del ligante PLA/Pluronic. Composición inicial de la tinta, después del tiempo de impresión, tras 1 hora de inmersión en agua (más secado overnight) y tras 72 horas de tratamiento térmico a 300°C.	150
Tabla 4.9 Resultados del análisis del %O y %C del polvo de titanio y de las muestras impresas tras los tratamientos térmicos a 300°C durante 1, 24, 48 y 72 horas.....	153
Tabla 4.10 Resultado del análisis del %O y %C del polvo de titanio y de las muestras impresas tras los tratamientos térmicos a 220°C y 270°C durante 24 horas y una semana.....	154
Tabla 4.11 Resultado del análisis del %O y %C. del polvo de titanio y de las muestras impresas tras los tratamientos térmicos a 350°C durante 1, 2, 3, 12 horas.	155
Tabla 4.12 resultados flexión a 3 puntos sobre muestras en verde.	156
Tabla 4.13. Resistencia máxima a compresión en verde.....	158
Tabla 4.14 Identificación de las muestras utilizadas para el estudio del ciclo térmico.....	165
Tabla 4.15 Identificación de las muestras con el promedio y la desviación estandar del area y diámetro de grano.	167
Tabla 4.16 Identificación de las muestras con el promedio y la desviación estandar de la contracción.	170

Tabla 4.17 Identificación de las muestras con el promedio y desviación estandar del modulo elástico y la resistencia a compresión	171
Tabla 4.18 Identificación de las muestras utilizadas para el estudio de la velocidad ciclo térmico.	173
Tabla 4.19 Identificación de las muestras con el promedio y la desviación estandar la contracción.	175
Tabla 4.20 Identificación de las muestras con el promedio y la desviación estándar del módulo elástico y la resistencia a compresión	176
Tabla 4.21 Identificación de las muestras utilizadas para el estudio de la porosidad.	177
Tabla 4.22 Identificación de las muestras con el promedio y la desviación estándar del peso, volumen (calculado) y porosidad calculada.....	177
Tabla 4.23 Identificación de las muestras con el promedio de la porosidad obtenida por MIP	179
Tabla 4.24 Identificación de las muestras con el promedio y la desviación estándar de la porosidad obtenida mediante microCT	181
Tabla 4.25 Identificación de las muestras con el promedio y la desviación estandar la contracción	183
Tabla 4.26 Identificación de las muestras con el promedio y la desviación estándar del módulo elástico y la resistencia a compresión.	184
Tabla 4.27 Identificación de las muestras con el promedio y la desviación estándar del contenido de intersticiales.	187
Tabla 4.28 Identificación de las muestras utilizadas para el estudio del patrón de impresión.	189
Tabla 4.29 Identificación de las muestras utilizadas para el estudio complementario sobre efecto de añadir perímetros a la estructura.	189
Tabla 4.30 Identificación de las muestras con el promedio y la desviación estándar del módulo elástico y la resistencia a compresión	190
Tabla 4.31 Identificación de las muestras con el promedio y la desviación estándar del módulo elástico y la resistencia a compresión.	193
Tabla 5.1 Identificación de las muestras con el tratamiento para añadir Ag	196
Tabla 5.2 Análisis elemental EDS (%at.) de las muestras KAg.	197
Tabla 5.3 Análisis elemental EDS (%at.) de capa de precipitados generada en la muestra KAg tras 7 días de inmersión en SBF	200
Tabla 5.4 Diámetro del halo de inhibición en las muestras tras 24 y 48 horas de incubación.	203
Tabla 5.5 Identificación de las muestras con el tratamiento para introducir Ga.	205

Índice

Tabla 5.6 Análisis elemental EDS (%at.) de las muestras tratadas con cloruro de calcio y diferentes concentraciones de nitrato de galio.	206
Tabla 5.7 Análisis elemental EDS (%at.) de capa de precipitados generada en la muestra KGa5 tras 7 días de inmersión en SBF.	211
Tabla 5.8 Diámetro del halo de inhibición en las muestras tras 24 y 48 horas de incubación.	214
Tabla 5.9 Identificación del tratamiento en función de la concentración de nitrato de galio y de plata utilizada.	220
Tabla 5.10 Análisis elemental EDS (%at.) de la muestra KAcGa5.	221
Tabla 5.11 Análisis elemental EDS (%at.) de las muestras con tratadas con acetato de calcio y diferentes concentraciones de nitrato de galio y plata. Muestras KGa5 ($\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ 5mM) y KAg(AgNO_3 1mM) como referencia.	225
Tabla 5.12 Diámetro del halo de inhibición en las muestras tras 24 y 48 horas de incubación.	232
Tabla 8.1 Identificación de los polvos base Ti valorados	243
Tabla 8.2 Distribución de tamaño de partícula obtenida por tamizado de los polvos de titanio.	248
Tabla 8.3 Distribución de tamaño de partícula obtenida por análisis de imagen de los polvos de titanio.	250
Tabla 8.4 Distribución de tamaño de partículas según el método de análisis.	252
Tabla 8.5 Fluidez de los polvos de titanio.	253
Tabla 8.6 Hidrogeles base Pluronic	258
Tabla 8.7 Tintas de titanio-hidrogel Pluronic.	260
Tabla 8.8 Identificación de las muestras fabricadas.	272
Tabla 8.9 Resumen caracterización mecánica (a compresión) y química.	277
Tabla 8.10 Identificación de las muestras con el tratamiento termoquímico de Kokubo.	295
Tabla 8.11 Análisis elemental EDS (%at.) de capa de precipitados generada en la muestra K24 tras la inmersión de las muestras en SBF	301
Tabla 8.12 Etapas del proceso Kokubo modificado e identificación de las muestras.	304
Tabla 8.13 Análisis elemental EDS (%at.) de las muestras KAc y KCa.	305

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DEL HUESO

El tejido óseo es un tipo de tejido conectivo, siendo junto con los dientes el único tejido duro del cuerpo. Está constituido por células y una matriz extracelular calcificada. El hueso está compuesto por células rodeadas de una matriz extracelular, produciendo un tejido altamente organizado. La matriz extracelular está formada por una fase orgánica (30 % en peso), principalmente de colágeno y otras proteínas, y una fase mineral (70 % en peso) correspondiente a nano cristales de hidroxiapatita biológica [1].

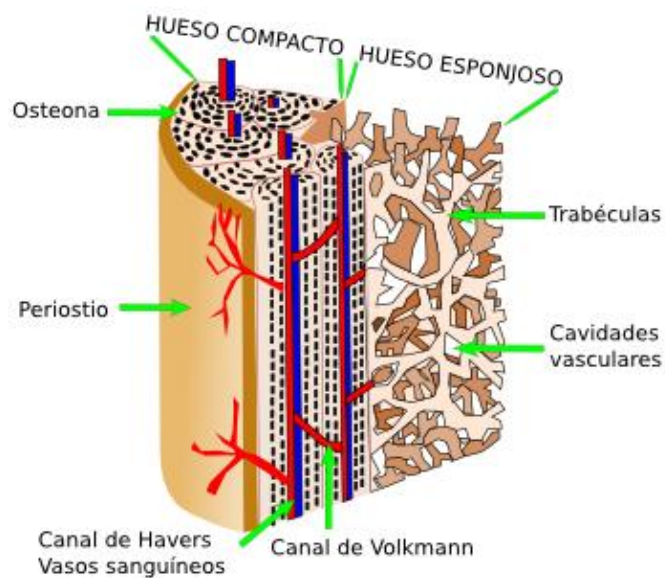


Figura 1.1 Esquema estructura del hueso [2].

Los huesos se encuentran en constante remodelación adaptándose a las necesidades del cuerpo, tanto mecánicas como biológicas. Esta remodelación es el resultado de la interacción, organización y comportamiento coordinado de los tres tipos de células que se identifican en el tejido óseo: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos [3]. Según su morfología, existen dos tipos de hueso: el hueso cortical o compacto (5-10% de porosidad y módulo de Young 10-30GPa), y el hueso trabecular o esponjoso (75-90% de porosidad y módulo de Young 0.5-1GPa). En general, el esqueleto adulto es aproximadamente 80% de hueso cortical y 20% de hueso trabecular [4].

Tabla 1.1 Propiedades mecánicas del hueso [5].

	Porosity	Modulus (GPa)		Strength (MPa)		Poisson's ratio
Compact Bone	3-5%	Longitudinal	17.9 ± 3.9	Tension	135 ± 15.6	0.4 ± 0.16
				Compression	205 ± 17.3	
		Transverse	10.1 ± 2.4	Tension	53 ± 10.7	0.62 ± 0.26
				Compression	131 ± 20.7	
		Shear	3.3 ± 0.4	Shear	65 ± 4.0	
Trabecular Bone	Up to 90%	Vertebra	0.067 ± 0.045		2.4 ± 1.6	
		Tibia	0.445 ± 0.257		5.3 ± 2.9	
		Femur	0.441 ± 0.271		6.8 ± 4.8	

1.2 EL TITANIO PARA IMPLANTES

El titanio (Ti) es conocido por ser muy ligero, tener una excelente resistencia a la corrosión, y por su gran biocompatibilidad. La densidad del Ti (4.5 g/cm^3) es significativamente baja comparada con otros metales, acero inoxidable 316L (8.3 g/cm^3) y el cobalto cromo (8.3 g/cm^3), también utilizados como biomateriales. El Ti comercialmente puro (cp-Ti) y la aleación Ti6Al4V son los metales base titanio más utilizados en la industria biomédica [3], [4] [3], [6].

La American Society for Testing and Materials (ASTM) ha clasificado el Ti-cp (titanio comercialmente puro) en cuatro grados diferentes, Ti grado 1, Ti grado 2, Ti grado 3, y Ti grado 4. Esta clasificación se basa en la cantidad de impurezas (como oxígeno, nitrógeno y hierro) presentes en el metal. En particular, la cantidad de oxígeno presente en el Ti tiene una influencia significativa en las propiedades mecánicas (módulo de Young, límite elástico, resistencia a tracción). En general, el incremento de la cantidad de impurezas en el cp-Ti provoca un aumento en resistencia, pero una disminución en la ductilidad. La resistencia a fatiga también mejora al aumentar la cantidad de oxígeno.

El Titanio y sus aleaciones poseen una capa de óxido superficial de 5-20nm de espesor. Esta capa pasiva de óxido es la responsable de su excelente resistencia a la corrosión y su biocompatibilidad. La topografía y la química superficial del Ti pueden ser alteradas por diferentes métodos dependiendo de la aplicación. Los tratamientos más comunes para alterar las superficies del Ti son: los tratamientos mecánicos (pulido y granallado), químicos (ataques con ácidos), y electroquímicos (anodización) [6], [7]. Otro de los principales motivos de la utilización de titanio frente a otros materiales metálicos, es su módulo elástico. El titanio presenta un módulo elástico (100-110 GPa) inferior a otros materiales como las aleaciones de cobalto (220-234 GPa) y del acero inoxidable (200-210 GPa), que lo hace más adecuado para su aplicación como material base de prótesis endoóseas, ya que produce menor apantallamiento de tensiones respecto al hueso cuyo módulo elástico de la zona cortical es de 20 GPa. Este punto es muy importante para la distribución de fuerzas en la zona del implante, ya que si no se tiene en cuenta, podría existir una reabsorción del hueso y por consiguiente el fallo mecánico del implante [8], [9].

1.3 PROBLEMÁTICA 1: EL APANTALLAMIENTO DE TENSIONES

Los materiales metálicos se utilizan ampliamente en implantología cuando se requiere cierta exigencia a nivel de propiedades mecánicas. Su mayor aplicación es la sustitución de tejidos duros: sistemas de fijación, osteosíntesis, prótesis ortopédicas, implantes dentales entre otros [3]. Cuando se implanta una pieza estructural en el cuerpo humano con un módulo elástico excesivamente alto, es decir, que presenta una rigidez mucho mayor a la del hueso, al realizar una carga sobre el conjunto implante-hueso ésta es soportada por el implante. Consecuentemente, el cuerpo advierte que el hueso ya no realiza ninguna función debido a la falta de carga o sollicitaciones. Esto provoca la reabsorción del tejido óseo. Este fenómeno se conoce como apantallamiento de tensiones y tiene una gran repercusión, ya que la prótesis a largo plazo queda desprovista de sujeción. En ese momento se pueden producir fallos de funcionamiento que requieren de posteriores intervenciones, hasta el punto de ser necesaria la retirada del implante [8], [9].

1.3.1 Estrategia: fabricación de prótesis porosas

El problema de la pérdida ósea debido al apantallamiento de tensiones se puede evitar usando implantes con una menor rigidez, más parecida a la del hueso. Los materiales porosos son unos candidatos ideales ya que su rigidez es menor que la de los materiales densos. Como valor añadido, con la superficie rugosa de los materiales porosos se facilita la osteointegración, aportando una mayor superficie de fijación y una mejor transmisión de esfuerzos entre el implante y el hueso, provocando una unión biológica entre el implante y el tejido [9].

La porosidad y el tamaño de poro, tanto a nivel macroscópico como microscópico, son propiedades morfológicas importantes para producir la regeneración ósea en un biomaterial poroso. Karageorgiou y colaboradores publicaron en 2005 una interesante revisión del estado del arte del conocimiento existente sobre la relación entre la porosidad y el tamaño de poro en biomateriales empleados para regeneración del tejido óseo. Las principales conclusiones de este estudio se presentan a continuación. Una porosidad alta (45-60%) y un tamaño grande de poro (150-350 μm) mejoran el crecimiento óseo y la osteointegración del material. La regeneración ósea in vivo en un biomaterial poroso supone el reclutamiento y la penetración de las células desde el tejido óseo circundante y así como la vascularización [10].

El tamaño mínimo de poro recomendado es 100 μm , valor definido a partir de un estudio inicial de Hulbert y colaboradores (1970) [11]. Sin embargo, estudios posteriores han demostrado una mejor osteogénesis para tamaños de poro superiores a 300 μm (concretamente para el rango entre 300 y 400 μm), siendo éste el tamaño crítico por encima del cual se pueden observar capilares (vascularización). Los poros relativamente grandes favorecen la osteogénesis porque permiten la vascularización y una alta oxigenación, mientras que los poros pequeños favorecen más la osificación osteocondral, aunque el tipo de crecimiento óseo depende del biomaterial y de la geometría de los poros. Existe sin embargo un límite superior para la porosidad y el tamaño del poro como consecuencia de la restricción asociada a las propiedades mecánicas. Un aumento de la porosidad y en el tamaño de los poros, trae como consecuencia una reducción de la resistencia mecánica, que puede ser crítica en la regeneración de huesos sometidos a cargas importantes, además de comprometer la integridad estructural de la estructura porosa. La formación directa de hueso

Introducción

en la estructura porosa también está influenciada por la geometría del poro. En el estudio de Jin y colaboradores (2000) se observó que los poros más largos y redondeados dificultaban la penetración de las células mesenquimales y de los capilares, produciéndose la formación de hueso sólo en la superficie exterior del material [11],[12],[13].

Tabla 1.2 Características de los materiales porosos comerciales para ortopedia [14].

Name	Description	Processing	Applications	Limitations
Actipore™	Fully porous NiTi alloy Porosity ~ 65% Pore size ~ 215 µm	Not reported	Spine and shoulder surgeries	Low mechanical properties and limited part geometries
Regenerex™	Fully porous Ti Porosity ~ 67% Pore size ~ 300 µm Modulus ~ 1.6 GPa	Porous plasma processing	Hip and shoulder surgeries	Low strength, limited sizes and only acetabular components and augments are available
Tritanium™	Porous Ti coating Porosity ~ 60% Pore size ~ 616 µm Modulus ~ 106–115 GPa	Low temperature arc vapor deposition of polyurethane foam shell	Hip surgeries	It is not manufactured as a stand-alone structure, and it is only available in acetabular components. The manufacture process is also limited at this time to large sized components
CSTi™	Porous Ti coating Porosity ~ 50–60% Pore size ~ 400–600 µm Modulus: 106–115 GPa	Powder sintering with pressure	Hip and knee surgeries	Simple and limited part geometries, low fatigue resistance
Stiktite™	Porous Ti coating Porosity ~ 60% Pore size ~ 500 µm Modulus ~ 100–110 GPa	Porous plasma processing	Hip and knee surgeries	Simple and limited part geometries, low fatigue resistance
Trabecular metal™	Open cell fully porous Ta Porosity ~ 75–85% Pore size ~ 550 µm Modulus ~ 2.5–3.9 GPa	Chemical vapor deposition/ infiltration of carbon skeleton	Hip and knee surgeries	Relatively high cost of manufacture, inability to produce a modular all tantalum implant
CoCr beads	Porous CoCrMo coating Porosity ~ 30–50% Pore Size ~ 100–400 µm Modulus ~ 210 GPa	Powder sintering	Hip surgeries	Simple and limited part geometries, low fatigue resistance
Fiber metal	Porous Ti coating Porosity ~ 40–50% Pore Size ~ 100–400 µm Modulus ~ 106–115 GPa	Sintering	Hip surgeries	Simple and limited part geometries, low fatigue resistance

Además de la necesidad de tener un tamaño de poro lo suficientemente grande para permitir la penetración y crecimiento celular en el interior de la estructura porosa, es también recomendable la presencia de microporosidad (inferior a 10 µm) [10]-[15]. Esta microporosidad provoca un aumento del área superficial de la estructura porosa, lo cual contribuye a una mayor absorción de proteínas inductoras de hueso, así como al intercambio de iones ($\text{Ca}^{2+}/\text{PO}_4^{3-}$) y a la formación de apatita (fase mineral del hueso) [16].

1.4 PROBLEMÁTICA 2: LAS INFECCIONES

Los problemas derivados de infecciones en intervenciones quirúrgicas y procesos post-operatorios suponen un coste de 40 billones de euros al año en países desarrollados. De estas infecciones, aproximadamente el 80% se atribuyen al uso de dispositivos médicos. La demanda de estos implantes es cada vez más alta (en los últimos 20 años la demanda de implantes de rodilla se ha multiplicado por 6) y por tanto se prevé que los casos por infección protésica crezcan con la misma rapidez. En España se realizan 30.000 artroplastias al año, con una tasa media de infección del 34%, lo que conlleva un coste adicional sanitario de 46 M€ [17].

Tradicionalmente estas infecciones en implantes son tratadas con una antibioterapia prolongada basada en antibióticos que además requiere de intervenciones quirúrgicas para su tratamiento. Se ha observado además que la tasa de liberación del fármaco en los casos en los que va incorporado en la prótesis es tan incontrolable que origina otros efectos en la salud del paciente. El uso de antibióticos puede conllevar daño al paciente en riñones e hígado, pero además contribuye al desarrollo de organismos resistentes a estos antibióticos como algunos tipos de *S. Aureus*.

En junio de 2017 la UE adoptó (http://ec.europa.eu/health/amr/action_eu_en) un nuevo plan de salud en respuesta a la creciente y preocupante resistencia a los antibióticos de numerosas bacterias. En él se identifican 7 áreas diferentes que son necesarias abordar con nuevas medidas de actuación e investigación, entre ellas, destaca el objetivo de este proyecto, desarrollar de nuevos tratamientos antibacterianos alternativos y promover el desarrollo y la investigación en este campo.

Cualquier avance en el tratamiento sin antibióticos contribuirá a reducir la proliferación de bacterias resistentes y mejorará la calidad de vida de los pacientes, así como los costes asociados al tratamiento post operatorio por infección bacteriana.

1.4.1 Contaminación bacteriana de los implantes

Diversos informes revelan los fallos relacionados con el uso de titanio, lo cual repercute en la salud del paciente y en los costes de atención médica a nivel nacional. La infección microbiana es una de las principales causas de fallo del implante. A pesar de los grandes avances en la calidad de la atención médica, la probabilidad de infección durante un procedimiento quirúrgico sigue siendo elevada [18]–[20]. Hoy en día, en la ortopedia, se utilizan grandes volúmenes de diversos tipos de biomateriales, por lo que las infecciones adquiridas en el hospital (HAI o nosocomiales) se han convertido en una prioridad de la salud pública. Durante la cirugía, los implantes son susceptibles a la contaminación bacteriana tanto de la piel como de las membranas mucosas [18]. Estas infecciones asociadas al implante pueden progresar rápidamente a medida que las bacterias planctónicas² se adhieren primero a la interfaz del implante y finalmente evolucionan a biopelícula (biofilm) [21].

Los principales patógenos involucrados en las infecciones protésicas son el *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Staphylococcus epidermidis* (*S. epi.*), siendo el primero es el principal

² No adheridas, es decir, viviendo como microorganismos libres flotando y nadando en el medio líquido.

Introducción

colonizador de implantes metálicos, mientras que el segundo más para superficies poliméricas [22], [23]. *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) son otros de los patógenos implicados en las infecciones protésicas, por lo que hay bastantes estudios sobre su comportamiento en materiales ortopédicos, tanto metálicos como poliméricos [24], [25].

La adhesión bacteriana se divide en una secuencia de etapas que dan como resultado la formación del biofilm maduro [23], [26]–[28]:

1. Una primera unión reversible de bacterias a la superficie, principalmente debido al movimiento browniano³ celular y las interacciones microbio-superficie: fuerzas electrostáticas, gravitacionales o de Van der Waals, y el grado hidrofóbico de las bacterias y del biomaterial. La rugosidad y la topografía de la superficie tienen una gran influencia en esta etapa.
2. La acumulación de bacterias y la unión irreversible, que están mediadas por las interacciones moleculares y celulares específicas (proteínas de adhesión, apéndices proteicos y producción de sustancias poliméricas extracelulares, EPS del inglés).
3. La maduración del biofilm, la formación de microcolonias bacterianas y el atrapamiento de células planctónicas en el EPS.
4. Desprendimiento de algunas bacterias para la colonización de nuevas superficies.

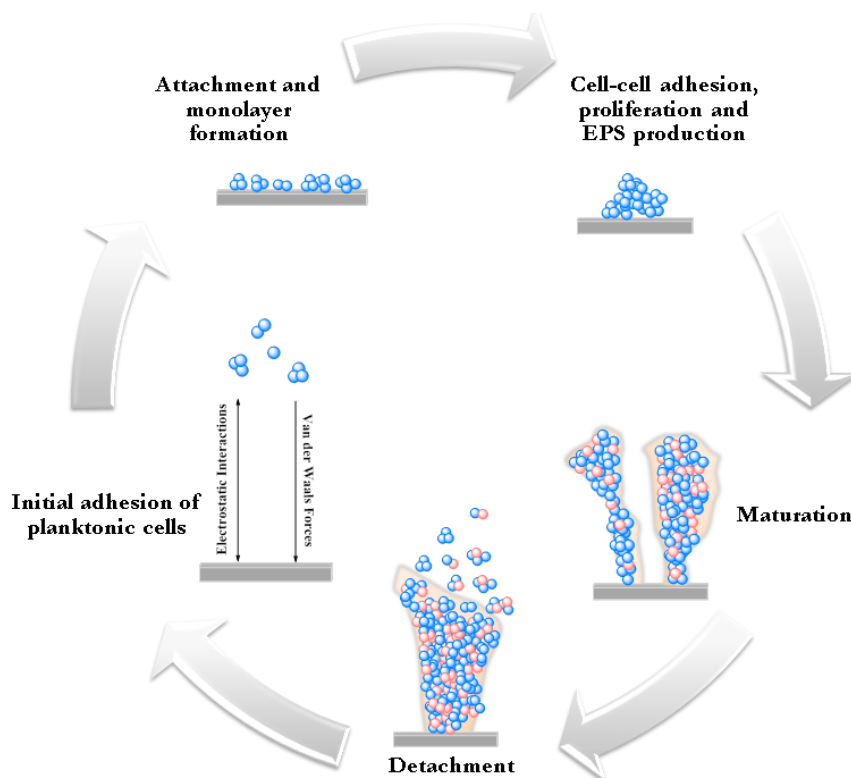


Figura 1.2 Esquema de la formación del biofilm [29].

³ es el movimiento aleatorio que se observa en las partículas que se hallan en un medio fluido (líquido o gas), como resultado de choques contra las moléculas de dicho fluido.

Una vez que se ha desarrollado el biofilm maduro en cualquier superficie del implante, la erradicación bacteriana se convierte en un gran desafío a pesar del uso de antibióticos y la irrigación y desbridamiento⁴ quirúrgico. La pobre penetración de los antibióticos debido a la matriz del biofilm, la escasa vascularización, la gran superficie del implante, las variedades de colonias pequeñas o las células persistentes a través de mutaciones explican la dificultad de tratar y curar estas infecciones relacionadas con los dispositivos implantados. Hasta la fecha no hay un tratamiento que garantice una rápida y total destrucción del biofilm o prevenir la recurrencia de la infección. Por lo tanto, el éxito clínico a largo plazo depende de las propiedades antimicrobianas de los materiales implantados [30].

1.4.2 Estrategias antibacterianas

La prevención de la formación de biopelículas mediante el uso superficies antimicrobianas es la mejor manera de evitar la propagación de patógenos y el deterioro del biomaterial. Los materiales deben evitar la adhesión primaria de las células microbianas planctónicas vivas de su entorno. En general, esto se puede lograr al repeler o matar las bacterias que se acercan.

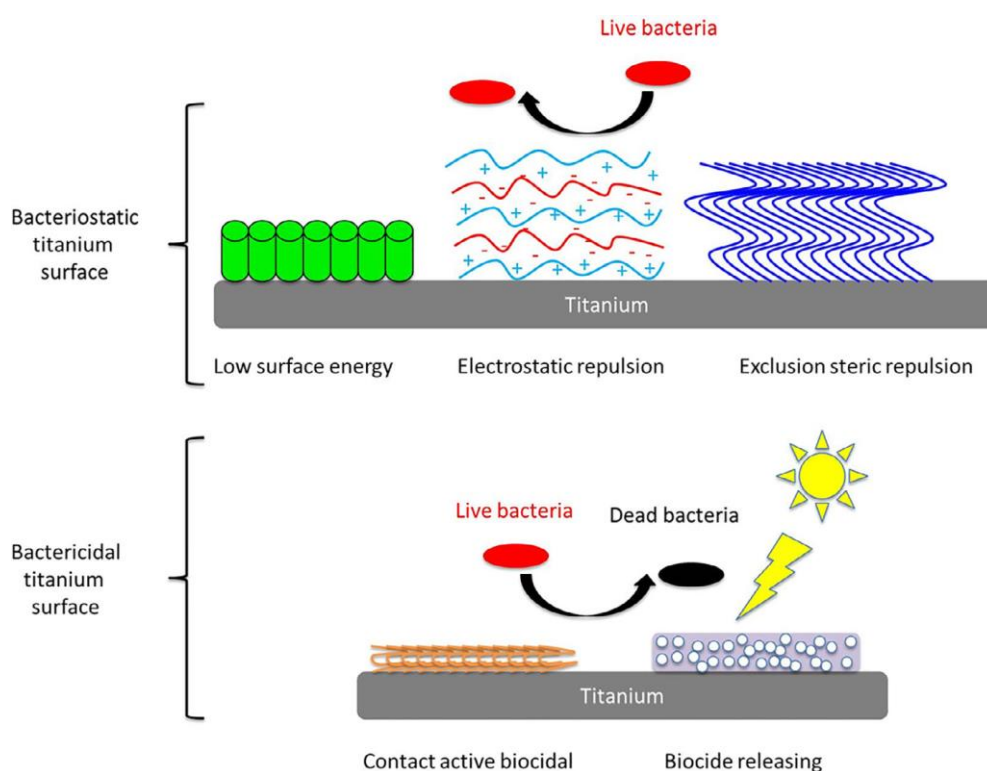


Figura 1.3 Ejemplos de superficies antimicrobianas según el mecanismo de acción: superficies bacteriostáticas o bactericidas [30].

La modificación de la superficie de los implantes es una solución efectiva contra las infecciones. Es posible dividir los tratamientos superficiales en dos categorías: modificación de

⁴ la eliminación del tejido muerto, dañado o infectado para mejorar la salubridad del tejido restante.

Introducción

la superficie y recubrimientos. La primera implica que se modifica la estructura del mismo material, a escala atómica, molecular o textural. Los recubrimientos implican una propagación de una sustancia sobre un sustrato, formando así una capa adicional en la superficie. Esto se puede lograr mediante diversas técnicas que pueden ser físicas, químicas o una combinación de ambas [31]. Se han realizado diversos estudios para intentar mejorar las propiedades antibacterianas de los implantes. A continuación, se introducirán algunos ejemplos de las principales técnicas o tipos de tratamientos antibacterianos que hay.

1.4.2.1 Recubrimientos poliméricos

Las células microbianas generalmente están cargadas tiene una carga neta negativa en la superficie debido a sus proteínas de membrana entre otros factores. De esta forma, los policationes⁵ son atraídos y si tienen un carácter anfifílico, pueden alterar la membrana citoplasmática y provocar la lisis de la célula. Schaer y colaboradores [32], estudiaron el efecto del polication hidrofóbico N, N-dodecil, metil-PEI (PEI: polietilenimina) en *S. aureus*. Chua y colaboradores [33] mostraron la disminución de la adherencia de *E. coli* y *S. aureus* al usar diferentes capas de quitosano (CH) y ácido hialurónico (HA). Ambos polímeros tienen un efecto antibacteriano: el CH es un polímero policationico que tiene una acción bactericida, mientras que el HA, un polímero polianiónico, muestra un efecto inhibitor debido al incremento de la hidrofobicidad de la superficie.

Hay otros tipos de recubrimientos poliméricos con mecanismos antibacterianos diferentes, por ejemplo, el polietilenglicol (PEG) ha sido ampliamente estudiado para su uso como recubrimiento antiincrustante en implantes y prevenir así la adhesión bacteriana [34].

1.4.2.2 Péptidos antimicrobianos

En los últimos años los péptidos antimicrobianos (AMP) han ido adquiriendo interés como agentes antimicrobianos, estos están compuestos tanto por péptidos de defensa natural como péptidos diseñados. Muchos AMP son α -helicoidales y anfipáticos, lo que significa que son hidrofílicos en un lado e hidrofóbicos en el otro. Esta naturaleza anfipática les permite insertarse en el componente de la bicapa lipídica de la membrana, donde su lado hidrofóbico interactúa con el núcleo lipídico de la bicapa, y su lado hidrofílico interactúa con las cabezas polares de los lípidos de la membrana, y de esta manera alteran la integridad de la membrana celular [29].

Las proteínas y péptidos antimicrobianos son producidos por una amplia variedad de organismos como su primera línea de defensa. Las proteínas antimicrobianas más abundantes incluyen lisozima, colectina y lactoferrina [35]. El péptido LF1-11 es un péptido antimicrobiano derivado de la proteína lactoferrina (LF). La actividad antibacteriana de la LF se atribuye a su capacidad para secuestrar iones férricos, privando así a los patógenos potenciales de este nutriente esencial para el crecimiento, así como su capacidad para distorsionar directamente las membranas Gram-negativas y Gram-positivas [36].

⁵ Los polielectrolitos son polímeros cuyas unidades de repetición soportan un grupo electrolito. Policationes y polianiones son polielectrolitos.

1.4.2.3 Nano-estructuras/texturas y estructuración superficial

Se conoce que las propiedades texturales de la superficie de los implantes, como la morfología y la rugosidad, ejercen una gran influencia en las respuestas celulares tanto a nivel *in vitro* como *in vivo* [37]. Se ha visto que los picos y valles micrométricos y nanométricos de la superficie del implante pueden afectar la organización del citoesqueleto celular y, por lo tanto, las vías de señalización de transducción intracelular [38]. Esta nanotopografía se puede obtener mediante oxidación electroquímica de las superficies de Ti para producir nano-pozos [39] y/o nanotubos (NT) [40].

Además de mejorar la osteointegración, recientemente se ha reconocido que las superficies provistas con nanotubos de TiO₂ pueden desarrollar otras funcionalidades. Por ejemplo, se pueden dotar de propiedades antimicrobianas adicionales a las superficies nanotubulares de TiO₂ mediante la aplicación de post tratamientos adecuados [41].

Narendrakumar y colaboradores [15], recubrieron la superficie del titanio con nanotubos de TiO₂, y tales nanoestructuras anodizadas mostraron un cierto grado de propiedades antibacterianas asociadas con su diámetro y el ángulo de contacto. Además, para un diámetro dado, los nanoporos pueden permitir menos adhesión bacteriana que los nanotubos. Ercan y colaboradores [42], llegaron a la misma conclusión respecto a la influencia del diámetro de los nanotubos en la eficacia antibacteriana, y demostraron que la nanomodificación superficial de Ti cambiaba significativamente la respuesta bacteriana.

1.4.2.4 Liberación de antibiótico y recubrimientos antisépticos

Uno de los enfoques para evitar la infección bacteriana en los implantes, se trata del uso de recubrimientos que puedan liberar antibióticos o antisépticos en el nicho local. La liberación local de antibióticos *in situ* en el implante puede ser una estrategia eficaz contra las biopelículas y puede presentar diversas ventajas. En primer lugar, en caso de dosis altas locales, estas no causan toxicidad sistémica. Además, la administración local de antibióticos permite atacar patógenos específicos, evitando la posible resistencia a los antibióticos. La gentamicina es un antibiótico comúnmente utilizado en tales aplicaciones, en parte debido a su amplio espectro antibacteriano [30]. Además, otros antibióticos como cefalotina, carbenicilina, amoxicilina, cefamandol, tobramicina y vancomicina también se han utilizado en recubrimientos en implantes óseos [43].

La manera de incorporar los medicamentos en los recubrimientos, así como las velocidades de liberación, son aspectos muy importantes, ya que pueden influir mucho en la efectividad de los antibióticos. Materiales como el poliuretano, polímeros biodegradables y fosfatos de calcio se presentan como ejemplos de recubrimientos que pueden cumplir estos requisitos [44].

1.4.2.5 Implantación de iones

Un enfoque muy prometedor para combatir las infecciones bacterianas se basa en la liberación local de iones de especies inorgánicas, dado que también pueden ser eficaces contra los patógenos resistentes a los antibióticos [41]. Elementos como flúor (F), zinc (Zn) calcio (Ca), plata (Ag), cloro (Cl), yodo (I), cobre (Cu), cerio (Ce) o selenio (Se) pueden incorporarse en recubrimientos de titanio o hidroxiapatita mediante oxidación anódica [30].

Introducción

La actividad bactericida de estos iones parece depender de su liberación gradual. Un mecanismo de bacteriostasis⁶ es la hidroxilación en componentes altamente reactivos, como HCl, HOCl, TiOH, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o superóxido (O²⁻), ya que éstos causan la oxidación de las membranas celulares bacterianas, lo que resulta en una mayor permeabilidad celular y en última instancia, muerte celular. Por otro parte, otro mecanismo bactericida de los iones es la capacidad de inhibir del metabolismo bacteriano [45]–[49].

1.5 LOS TRATAMIENTOS TERMOQUÍMICOS MULTIFUNCIONALES

Recientemente, se han abordado nuevos desafíos en los implantes de Ti, con el fin de mejorar la bioactividad, combatir la infección bacteriana y la formación de biopelículas, así como la modulación de la inflamación. Debido a esto, es mayor la demanda de implantes multifuncionales capaces de tener simultáneamente respuestas específicas tanto a fluidos corporales, células (osteoblastos, fibroblastos, macrófagos) como a agentes patógenos (bacterias, virus) [41]. Por lo tanto, cada vez es mayor la necesidad de realizar estudios sobre el desarrollo de estrategias que aborden no solo la falta de bioactividad sino también generen respuestas antibacterianas en la superficie de los implantes.

Se han estudiado diversos tipos de modificaciones superficiales para conferir capacidad de formación de apatita o generar actividad de unión ósea en el Ti y sus aleaciones utilizando diversas técnicas, incluida la implantación de iones [50]–[52], tratamientos electroquímicos [53]–[60] y tratamientos hidrotérmicos [61]–[65]. Sin embargo, estas técnicas requieren equipos especiales y no son fácilmente aplicables a gran escala para piezas de estructuras complejas o porosas. En contraste con estas técnicas, los tratamientos químicos y térmicos simples (termoquímicos) no tienen tales limitaciones [66].

En 1994 Kokubo y colaboradores realizaron un tratamiento químico (ataque alcalino) sobre una prótesis de titanio y, tras la implantación, observaron una capa amorfa entre el implante y hueso que provocaba una unión rígida entre los mismos, sin la formación del tejido fibrilar separador. El tratamiento generaba titanina (TiO₂ en estructura anatasa), siendo éste un inductor de hidroxiapatita (HA) debido a sus grupos TiOH. La titanina desarrolla una capa de apatita al captar los iones de calcio y fosfato del fluido corporal [67]. A partir del tratamiento desarrollado por Kokubo y colaboradores se han llevado a cabo diferentes estudios y proyectos para implementar y evaluar este proceso sobre diferentes tipos de implantes, por ejemplo prótesis porosas[68]–[70]. También se han realizado modificaciones en diferentes etapas del proceso, como cambios de reactivo de ataque (añadir una etapa de inmersión en CaCl₂ [71]), con el fin de poder mejorar el tratamiento añadiendo iones funcionales como Mg²⁺[72], Sr²⁺[72] y Zn²⁺[73] que son efectivos para la promoción del crecimiento óseo, y Ag⁺[74] y Ga³⁺[75], que tienen actividad antibacteriana.

⁶ interrupción del desarrollo bacteriano por inhibición del crecimiento y reproducción de las bacterias.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 IMPLANTES POROSOS DE REFERENCIA EN EL MERCADO

Para validar y evaluar la tecnología y la optimización del proceso de producción, se fabricarán implantes porosos tipo cuña ya existentes en el mercado y se llevará a cabo una comparativa con los fabricados en AMES. Los tipos implantes a fabricar son: las cuñas veterinarias de alta porosidad para la técnica de avance de la tuberosidad tibial (TTA), que tiene por objeto modificar la biomecánica de la rodilla con el fin de eliminar el desplazamiento antero-posterior de la tibia respecto al fémur (efecto cajón) en la rodilla, tras la rotura del ligamento cruzado anterior (LCA), y los implantes porosos tipo cuña para la osteotomía del calcáneo con desplazamiento medial en la corrección de las deformidades del pie plano. A continuación, se detallan los principales tipos de implantes comercializados.

2.1.1 Implante poroso tipo cuña para osteotomía en pie humano.

En los últimos 30 años ha habido muchos cambios en el tratamiento quirúrgico del pie plano adquirido del adulto. Actualmente la cirugía con preservación de las articulaciones que pretende alinear el retropié⁷ tiene más importancia que la cirugía de artrodesis⁸, que se limita a casos con artrosis. La doble osteotomía de calcáneo es una buena opción en los casos de pie plano flexible grado IIB que combina una deformidad en valgo⁹ del retropié con la abducción¹⁰ del antepié¹¹ [76].



Figura 2.1 Esquema alteraciones del pie plano [77].

⁷ El retropié es parte posterior del pie (talón).

⁸ La artrodesis, es un procedimiento quirúrgico que consiste en fijar una articulación en posición funcional, bloqueando o impidiendo su movimiento.

⁹ El pie valgo es un trastorno que se produce una desviación lateral del talón hacia la parte interna y esto provoca que el peso del cuerpo se desplace hacia la zona media del pie

¹⁰ En el pie abducto el antepié se desvía hacia fuera.

¹¹ El antepié es la parte anterior del pie (empeine y dedos).

Revisión bibliográfica

La osteotomía de Evans es una técnica quirúrgica para la corrección de los pies planos. Consiste en la introducción de un injerto óseo en el calcáneo para modificar la estructura del pie y dotarle de mayor resistencia a las fuerzas pronadoras. La osteotomía de Evans tiene tal capacidad correctora que, si es practicada en primer lugar, puede permitir al cirujano hacer una evaluación objetiva y radioscópica del pie y decidir si es necesario realizar también la osteotomía de Cotton, pudiendo evitarse en algunos casos este segundo gesto quirúrgico, es decir, si después de la doble osteotomía de calcáneo persiste la supinación¹² del antepié, se realiza una osteotomía de Cotton para corregirla. [78].

A continuación, se describen los dispositivos más significativos de referencia ámbito de la cirugía ortopédica humana. Es conveniente recordar que se trata de productos comerciales en donde no siempre es posible obtener características mecánicas concretas.

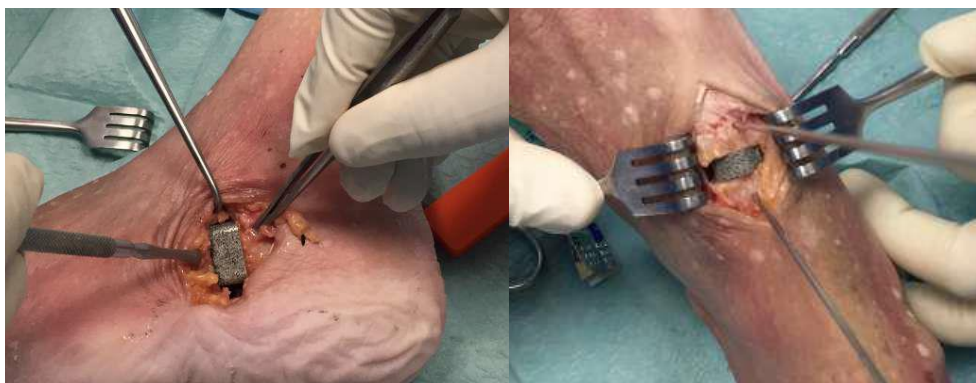


Figura 2.2 Fijación de los implantes porosos tipo cuña en las Osteotomías Evans y Cotton (imagen cedida por AMES Medical).

A continuación, se describen los dispositivos más significativos de referencia ámbito de la cirugía ortopédica humana. Es conveniente recordar que se trata de productos comerciales en donde no siempre es posible obtener características mecánicas concretas.

2.1.1.1 Cuña Unite3D de Zimmer Biomet

Unite3D es un implante tipo cuña diseñado para osteotomías en el pie como una alternativa al aloinjerto¹³ tradicional. Estos implantes son fabricados mediante la tecnología Osseo Ti patentada por Zimmer Biomet. Con esta tecnología Osseo Ti imita la arquitectura del hueso trabecular, presenta 70% de porosidad altamente interconectada con un tamaño medio de poro de 475µm, que facilita la migración celular, la vascularización, el crecimiento de tejido óseo y la unión entre el hueso y el metal [79], [80].

¹² En el pie supinado la planta del pie mira hacia dentro.

¹³ Un aloinjerto es tejido que se trasplanta de una persona a otra. Si el tejido se traslada de un lugar a otro en su propio cuerpo, se le llama autoinjerto.



Figura 2.3 Estructura porosa obtenida por Osseo Ti imitando al hueso trabecular y cuña Unite3D [81].

La tecnología Osseo Ti utiliza los datos CT (tomografía computarizada) en combinación con la fabricación aditiva para construir una estructura de Ti6A14V (con excelente resistencia a la corrosión) que imita directamente la arquitectura del hueso trabecular humano. Utilizando un proceso de fabricación patentado, se construyen capa por capa las estructuras para generar un componente con regiones sólidas y porosas. Este proceso mantiene la consistente porosidad y resistencia necesarias para facilitar el crecimiento del tejido y la estabilidad del implante [79],[80]. La estructura de Osseo Ti presenta una resistencia mecánica entre el hueso esponjoso y cortical, que facilita la fijación biológica y la carga del hueso circundante. Se ha demostrado mediante un estudio animal una excelente integración con el hueso [81][82].

2.1.1.2 Trabecular Metal de Zimmer Biomet

Trabecular Metal es una superficie de fijación avanzada diseñada para implantes ortopédicos y dentales. Con un alto coeficiente de fricción (0.98), proporciona un excelente ajuste de rayado inicial [15]. A diferencia de los revestimientos y otras superficies, el material metálico de Trabecular tiene hasta 80% de porosidad (tamaño medio de poro 440 μ m) y un módulo elástico de 3.9 GPa, aumentando el potencial de crecimiento óseo y vascularización de los tejidos blandos. Con su arquitectura, el material de Trabecular Metal es similar al hueso esponjoso en cuanto a estructura, función y fisiología, esto promueve la integración ósea, la remodelación ósea y la vascularización [83].



Figura 2.4 Implantes porosos de Trabecular Metal.

Revisión bibliográfica

Trabecular Metal está hecho de tántalo, uno de los metales biológicamente más estables y biológicamente inerte utilizados en implantes ortopédicos, lo que lo hace altamente biocompatible y resistente a la corrosión. El tántalo es un material ideal para esta estructura de crecimiento, debido a su alta resistencia a la fatiga y un módulo de compresión que le permite deformarse antes de romperse, además debido a su bajo módulo elástico, similar al hueso esponjoso, tiene un gran potencial para reducir el apantallamiento de tensiones. Trabecular Metal se produce utilizando un proceso patentado de deposición térmica, el tántalo elemental se deposita sobre un sustrato (similar a la deposición química de vapor) [83],[84],[85]. Sin embargo, este metal tiene un coste elevado y el proceso para obtener las estructuras del tántalo que se comercializan actualmente es caro y complicado.

Tabla 2.1 Resumen resultados ensayos mecánicos espuma de Tántalo [12]

Bulk Disc	Sample Type	Ultimate Strength (MPa)	Yield Strength (MPa)	Modulus (GPa)	% Elongation	Vickers Hardness
A	Compression	49.7 ± 6.6	35.3 ± 6.5	1.5 ± 0.4	N/A	278.7 ± 38.0
B	Compression	59.8 ± 14.6	34.7 ± 8.3	1.5 ± 0.4	N/A	345.0 ± 34.9
C	Compression	55.0 ± 38.0	40.8 ± 25.4	1.3 ± 0.6	N/A	327.9 ± 61.2
D	Tension	59 ± 6	45 ± 5 (0.2% Offset)	8 ± 1	7.3 ± .4	N/A
E	Tension	68 ± 5	51 ± 6 (0.2% Offset)	10 ± 2	4.1 ± 2.2	N/A
F	Tension	63 ± 2	47 ± 1 (0.2% Offset)	8 ± 1	3.9 ± 1.5	N/A
G	Bending	110.2 ± 14.0	74.1 ± 7.1	48.7 ± 4.5 (Rigidity MPa/mm)	N/A	N/A
Cancellous Bone	Bending	10.4 ± 4.8	5.1 ± 2.0	6.8 ± 3.1 (Rigidity MPa/mm)	N/A	N/A

2.1.1.3 Cuña BIOFOAM de Wright

La tecnología BIOFOAM genera una estructura de titanio que imita la estructura y las propiedades mecánicas del hueso trabecular (resistencia a compresión entre el hueso cortical y trabecular y un módulo elástico de 2.9 GPa) promoviendo un crecimiento óseo interno sin riesgo de una respuesta inmune. Presenta una porosidad completamente interconectada de hasta un 70%, un tamaño medio de poro de 530µm y un elevado coeficiente de fricción (0.58) que proporciona estabilidad inicial en la interfaz del implante y el hueso, minimizando el movimiento (buena fijación primaria) y creando un entorno estable para el crecimiento y la fijación ósea. Sin embargo presenta una pérdida de masa por abrasión considerable (13%) [86],[87],[88].

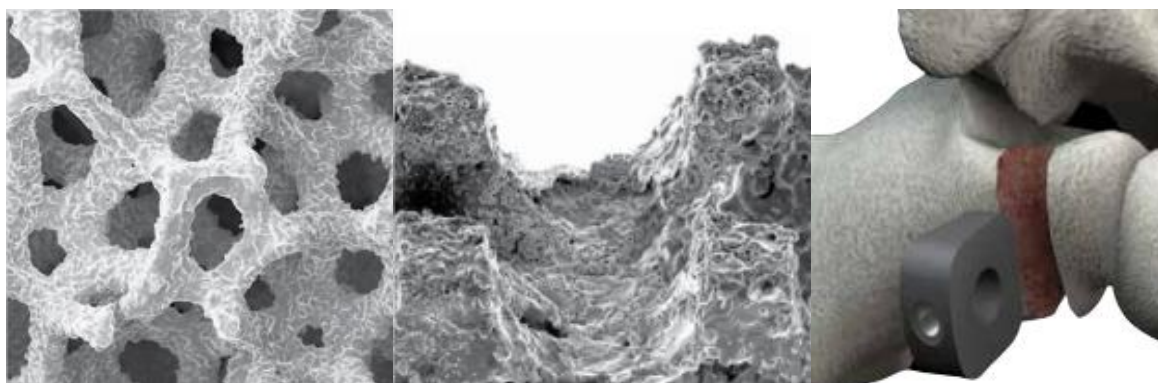


Figura 2.5 Estructura porosa del titanio BIOFOAM, superficie rugosa y diseño de la cuña.

2.1.1.4 Cuña Integra Titanium Bone de Integra

Las cuñas de Integra Titanium Bone son una serie de dispositivos en forma de cuña destinados a la corrección angular de huesos pequeños en el tobillo y el pie. Están fabricadas con titanio comercialmente puro formado en una estructura similar al hueso trabecular.



Figura 2.6 Cuñas Integra Titanium Bone para ostetotomias Evan y Cotton [89].

2.1.1.5 Cuña Biosync de Arthrex

Las cuñas BioSync proporcionan una alternativa al aloinjerto comúnmente utilizado para los procedimientos de Evans y Cotton. La cuña de titanio poroso consiste en un andamiaje¹⁴ (scaffold en inglés) de titanio tridimensional de porosidad abierta (poros interconectados) para el crecimiento interno de los huesos y los tejidos. Este entorno osteoconductor está diseñado para mejorar el potencial de integración ósea e intenta minimizar la pérdida de corrección realizada.



Figura 2.7 Cuñas Biosync para ostetotomias Evan y Cotton [90].

Las cuñas BioSync tienen una porosidad media del 60%, tamaños de poro que varían de 434-660 μm , y un promedio de canal de poro (interconectividad de poro) de 229 μm . Se fabrica

¹⁴ En ingeniería de tejidos se utiliza el término scaffold o andamio para referirse a una estructura tridimensional que aporta la rigidez y las resistencias adecuadas para favorecer la proliferación de las células.

Revisión bibliográfica

con titanio comercialmente puro de grado 2¹⁵ que con la norma ASTM F672. El material Biosync presenta un módulo elástico de 3.2 GPa, una resistencia superior a 10MPa para 10 millones de ciclos de fatiga, un coeficiente de fricción de 1.07 y una pérdida de masa por abrasión del 0.19% [88]. En la siguiente tabla recogen las principales propiedades de las espumas metálicas de referencia en el mercado.

Tabla 2.2 Resumen propiedades prótesis porosas en el mercado.

	Cuña Unite3D	Trabecular Metal	Cuña BIOFOAM	Cuña Integra	Biosync
Material	Ti6Al4V	Tántalo	Titanio	Titanio	Titanio
Porosidad (%)	70	80	60-70%		58.80%
Tamaño medio de poro (µm)	475	440	530	-	523
Coeficiente de fricción	-	0.98	0.58	-	1.07
Masa pérdida por abrasión (%)	-	-	13	-	0.19
Módulo elástico (GPa)	-	2.5-3.9	2.9	-	3.2

2.1.2 Implante veterinario tipo cuña de alta porosidad

En traumatología canina, una de las patologías de rodilla más frecuentes es la rotura del ligamento cruzado anterior (LCA), cuyo coste en diagnóstico y tratamiento fue de 1,32 billones de dólares en EEUU durante el año 2003. Los efectos a corto plazo son la inestabilidad de la rodilla, osteoartritis, lesiones meniscales, dolor y pérdida de funcionalidad de la articulación. El LCA actúa como estabilizador de la articulación. Su función es limitar el desplazamiento anterior de la tibia con respecto al fémur (es decir que la tibia no se desplace hacia delante respecto al fémur), la rotación interna de la tibia y la hiperextensión de la rodilla. El tratamiento médico-farmacológico en la ruptura del LCA tiene un éxito en la solución de los signos clínicos en el 80% de los perros menores a los 15 Kg de peso, sin embargo, en animales con un peso superior a los 15Kg los resultados son desalentadores si se manejan con otro método que no sea la cirugía.

¹⁵ El titanio es clasificado por grados según los elementos de la aleación, siendo el grado1 el grado de mayor pureza. El grado 2 es considerado como grado médico.

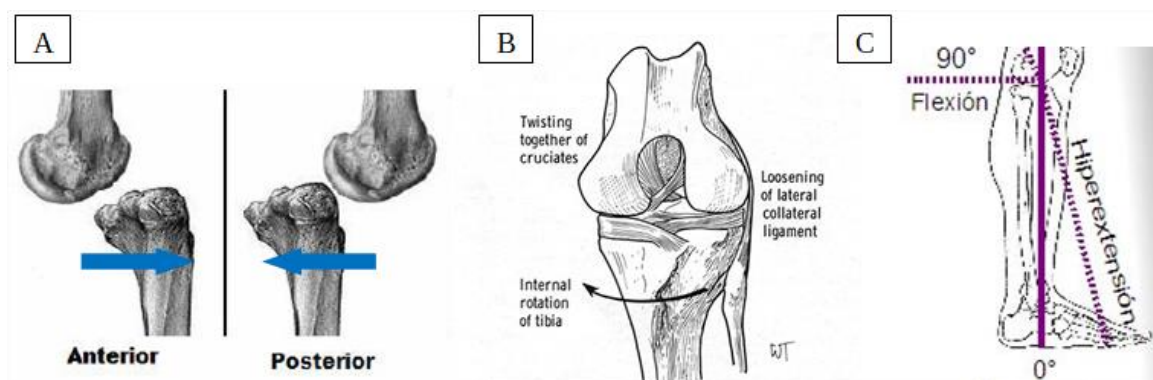


Figura 2.8 Esquema movimientos sistema anatómico tibia-fémur: A) desplazamiento anterior y posterior de la tibia, B) rotación interna de la tibia y C) la hiperextensión de la rodilla [91].

La técnica de avance de la tuberosidad tibial (TTA), tiene por objeto modificar la biomecánica de la rodilla con el fin de eliminar el desplazamiento anteroposterior de la tibia respecto al fémur (efecto cajón) en la rodilla, tras la rotura del LCA. En esta técnica se realiza una osteotomía tibial en forma de cuña para adelantar la tuberosidad de la tibia. De esta manera se consigue que el ligamento rotuliano quede perpendicular a la meseta y así se anula la fuerza que ejercía tensión sobre el LCA [92].

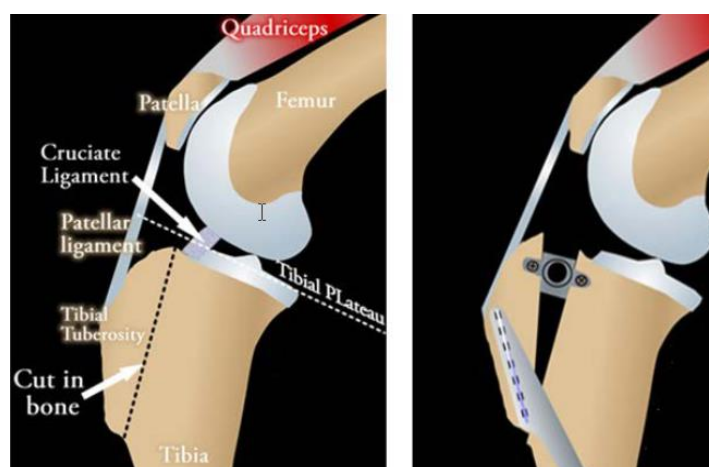


Figura 2.9 Osteotomía y adelantamiento de la tuberosidad tibial. Técnica TTA [92].

La fuerza resultante de compresión en la articulación es paralela al tendón patelar, y se puede descomponer en 2 componentes ortogonales respecto al platillo tibial: normal y cortante. Si el avance produce un ángulo del tendón patelar respecto al platillo tibial de 90° , entonces la fuerza cortante es cero. Es una técnica encaminada a neutralizar dinámicamente la fuerza cortante femorotibial en rodillas con rotura del LCA durante la fase de carga de la marcha [93].

Revisión bibliográfica

A continuación, se detallan los dispositivos más significativos para el tratamiento quirúrgico de la rotura del LCA en perros mediante la técnica TTA anteriormente citada. Es conveniente recordar que se trata de productos comerciales en donde no siempre es posible obtener características mecánicas concretas.

2.1.2.1 Cuña MMP OrthoFoam de Orthomed.

Sistema para la reparación de ligamento cruzados basado en el uso de una cuña fabricada a partir de una espuma de Titanio (estructura porosa de titanio), la cual es fijada mediante el uso de agujas y grapas. El dispositivo tiene como objetivo realizar el avance de la tuberosidad tibial mediante una osteotomía incompleta de la misma. El avance se completa mediante la colocación de una cuña fabricada a partir de una espuma metálica de titanio que permite el crecimiento del tejido a través de su estructura [94].



Figura 2.10 Cuña MMP con el sistema de anclaje [94].

La cuña OrthoFoam puede ser fabricada en un amplio rango de medidas y provee una fijación sólida y resistente con una impresionante estabilidad en estadios muy tempranos. La estructura porosa abierta (porosidad interconectada) asegura un crecimiento óseo temprano y elimina la necesidad de utilizar un injerto óseo o similar. El alto coeficiente de fricción entre la cuña OrthoFoam y el hueso proporcionan los factores necesarios que le confieren una alta estabilidad [95].

2.1.2.2 Dispositivo TTA de Kyon

Del mismo modo que en el sistema anterior, el dispositivo está basado en la técnica del avance de la tuberosidad tibial mediante osteotomía de la misma y colocación de un dispositivo entre los extremos de la osteotomía.

La técnica para el tratamiento de la rotura del ligamento cruzado anterior desarrollada por la Universidad de Zúrich y comercializada por la empresa Kyon, consiste en realizar una osteotomía de la tibia y avanzar cranealmente la tuberosidad tibial con el fin de tensar, como si de un arco se tratara, el ligamento patelar que impide de esta forma el desplazamiento craneal de la tibia. Para ello, se intercala una "caja" de diferentes anchuras y longitudes, que se sujeta mediante un tornillo insertado en la porción craneal y otro en la porción caudal de la

tibia. La porción craneal se fija mediante una placa que se sujeta mediante una horquilla compuesta de varios dientes (o mediante tornillos en otros modelos comerciales) y en su extremo distal la placa queda fijada al fragmento caudal mediante 2 tornillos [96].

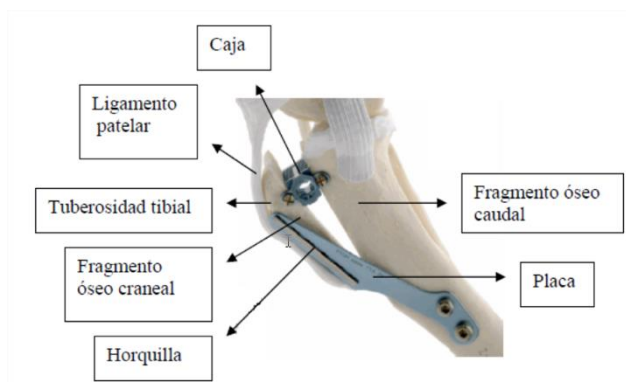


Figura 2.11 Sistema TTA de Kyon desarrollado en la Universidad de Zürich [92].

2.1.2.3 Dispositivo TTA Rapid de Rita Leibinger Medical.

El dispositivo se basa en una placa-cuña sin sistema de estabilización distal, la cual se coloca entre los fragmentos de una osteotomía incompleta. El dispositivo se estabiliza gracias al anclaje a ambos fragmentos, gracias a la placa incorporada en el diseño. Adicionalmente, esta placa-cuña y el espacio entre fragmentos puede rellenarse de sustituto óseo para acelerar el proceso de unión entre fragmentos.

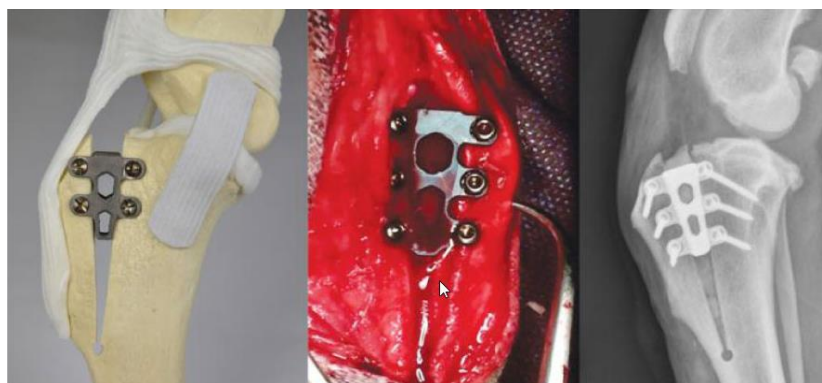


Figura 2.12 Simulación en fantoma, intervención quirúrgica y radiografía del dispositivo [97].

Por razones biomecánicas (es decir, la distribución de la fuerza en la región de osteotomía) la pendiente de las cajas se fijó en 12° para las cajas más grandes (7,5-12 mm de ancho), 8° para las medianas (4,5-6 mm de ancho) y 6° para la más pequeña (3 mm de ancho). La caja fue diseñada para optimizar el crecimiento óseo, estimulado por la estructura abierta tipo panel de abeja (*honey comb*), que también proporciona fricción a la superficie ósea de la osteotomía [98], [99].

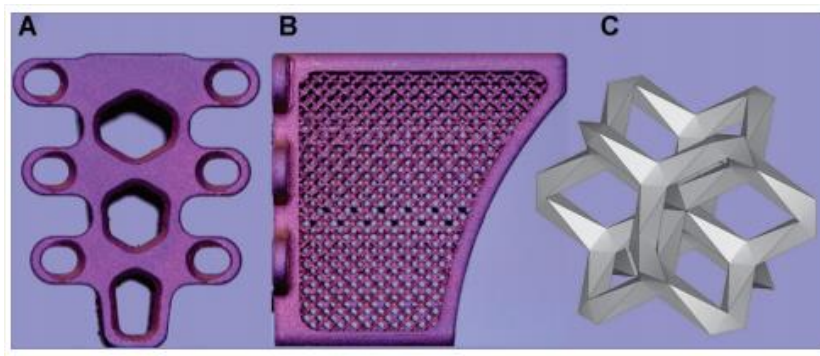


Figura 2.13 Estructura de la caja de titanio: A) vista frontal, B) vista lateral. C) Dibujo esquemático en 3D de la estructura *honey comb* [99].

Los bordes están contruidos en titanio denso (no poroso) para proporcionar la estabilidad necesaria, mientras que el resto de la caja tiene una construcción con porosidad abierta. Ésto permite un rápido crecimiento celular para ayudar a la estabilidad de la caja. La rugosidad de la estructura *honey comb* crea la fricción necesaria dentro de la osteotomía, esta fricción entre el tejido óseo y el implante ayuda a tener una mejor fijación primaria (fijación mecánica, previa a la osteointegración) que junto con la fijación del tornillo, ayuda a mantener la caja en la posición apropiada en la osteotomía [99].

Las cajas TTA Rapid se han fabricado con polvo muy fino de titanio comercialmente puro mediante el sinterizado selectivo por láser (en inglés, selective laser sintering, o SLS) [100].

2.2 MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE ESTRUCTURAS POROSAS

A continuación, se describen las principales tecnologías que permiten conseguir estructuras porosas de diferentes materiales, muchas ya se están utilizando para la fabricación con Ti y aleaciones, otras se han enfocado más en cerámicos, polímeros termoplásticos e hidrogeles; sin embargo, se presentan como una alternativa prometedora para la fabricación de titanio poroso.

2.2.1 Métodos convencionales (MIM, PM)

2.2.1.1 Metal injection moulding (MIM)

Metal injection moulding es una ruta de fabricación que ofrece una reducción en los costes para biomateriales de titanio e implantes ya que la producción inicial de la pieza es muy similar a la final (concepto conocido en inglés como near net-shape) por lo tanto, no es necesario la realización de tratamientos posteriores para el acabado superficial. El proceso MIM tiene un gran potencial para la fabricación de implantes ya que se pueden fabricar componentes de tamaños pequeños o medianos con geometrías complejas.

El proceso MIM empieza con la preparación del material de entrada (feedstock) que consiste en una mezcla del polvo metálico y un material aglutinante (binder). La mezcla obtenida es granulada y, mediante una máquina de moldeo por inyección, se inyecta en la cavidad del molde a temperatura elevada ($<200^{\circ}\text{C}$) y a presión. Una vez en el molde, la mezcla se enfría y endurece para formar la pieza "en verde" o "en crudo". A continuación, se retira el ligante y lo que queda es una es una pieza altamente porosa. En la técnica MIM la calidad del acabado superficial depende en gran medida de los parámetros del procesado como el molde y la distribución del tamaño de partícula del polvo inicial [101][102].

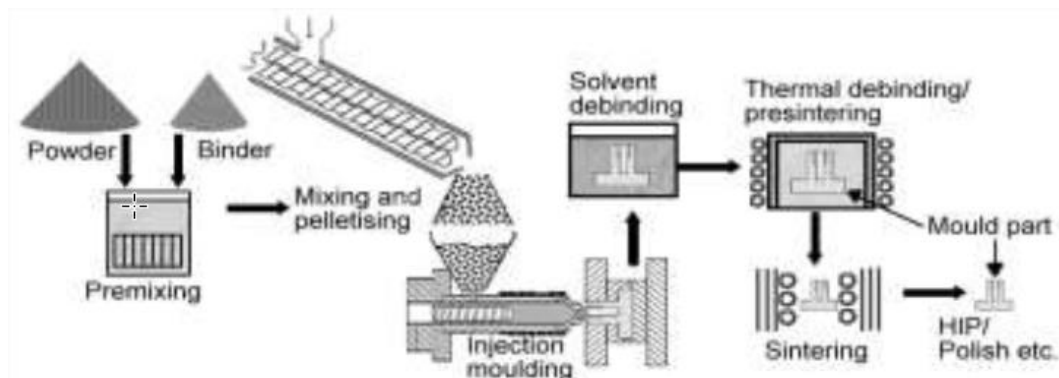


Figura 2.14 Esquema proceso MIM [102].

2.2.1.2 Pulvimetalurgia convencional con espaciadores (space holder)

El método space holder ha sido reconocido como uno de los métodos viables para la fabricación de materiales porosos. En este método, partículas de polvo temporales (por ejemplo, NaCl), llamadas espaciadores (space holder), se emplean como formadores de poros para las espumas metálicas. En general, el proceso de fabricación mediante el método space holder se puede dividir en cuatro etapas: (i) mezcla del polvo metálico y las partículas space holder; (ii) compactación del material granular; (iii) eliminación de las partículas space holder; (iv) sinterizado del material poroso [103].

El sinterizado de polvo, ha sido ampliamente utilizado, por su simplicidad, en generación de estructuras metálicas porosas. El sinterizado de polvo se puede complementar con el método space holder para alcanzar mayores niveles de porosidad y un mejor control sobre la estructura porosa [104]. Este proceso es una vía interesante para la fabricación de espumas metálicas, de hecho AMES Medical ha patentado un proceso basado en espaciadores para fabricar OsteoSinter®, una estructura de titanio poroso que imita las propiedades estructurales, mecánicas y biológicas del hueso trabecular, además dispone de la certificación de marcado CE.

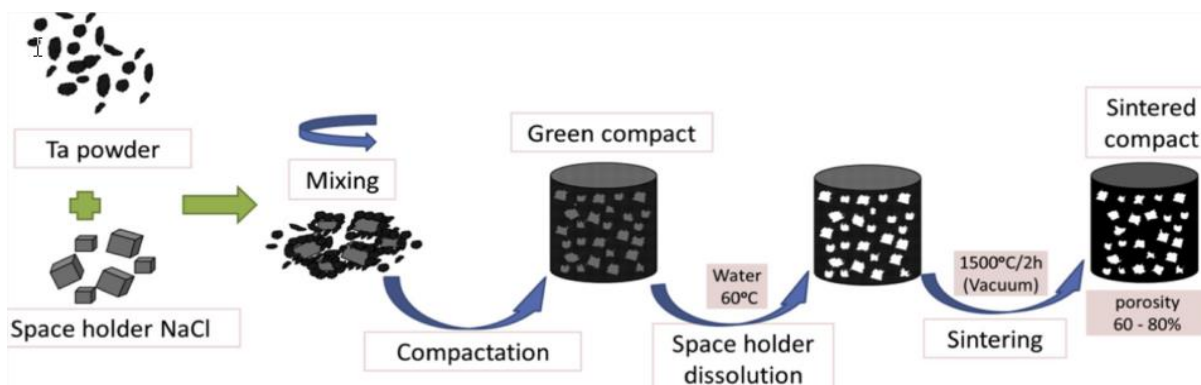


Figura 2.15 Esquema proceso space holder [103].

Estos procesos forman estructuras con poros dispuestos aleatoriamente y con una amplia gama de tamaños. Sin embargo, tanto la capacidad de controlar la arquitectura de los poros, como la distribución de tamaños e interconectividad son muy limitadas. Para obtener estructuras con una porosidad controlada y una mayor flexibilidad en cuanto al diseño y la forma es necesario utilizar tecnologías de fabricación aditiva. A continuación, se describen las principales técnicas de fabricación aditiva.

2.2.2 Fabricación aditiva en estado líquido (directa)

La VDI Guideline 3405: Additive Manufacturing, define la fabricación aditiva como un proceso mediante el cual una pieza es construida capa a capa o elemento a elemento. Según la norma DIN EN ISO/ASTM 52900.2018, la fabricación aditiva es un proceso de unión de materiales para obtener piezas a partir de un modelo 3D, usualmente capa sobre capa, de manera opuesta a la fabricación substractiva (fresado, torneado, etc...) y métodos de fabricación formativa (forja, doblar, enderezar, etc.).

La fabricación aditiva es un sector en constante crecimiento y evolución, en los últimos años se han ido modificando y mejorando las tecnologías de fabricación aditiva, incluso han surgido nuevos métodos a partir de dichas modificaciones. Debido a esto, se suele llamar de manera diferente a métodos prácticamente iguales y viceversa, generando cierta confusión.

Según la fuente bibliográfica se pueden organizar o agrupar los métodos de fabricación teniendo en cuenta diferentes criterios como el tipo de material (polvo, hilo, etc...), método de aplicación de energía (láser, haz de electrones, horno, etc...), sistema de dosificación de material de partida (cama o lecho de polvo, aplicación directa, etc...).

La figura 2.18 es un resumen presentado por Qian y colaboradores, en donde primero agrupan las tecnologías según el sistema de dosificación de material de partida y, a continuación, según el sistema de consolidación de la pieza [105].

Otra manera de agrupar o clasificar las tecnologías de fabricación aditiva es según el proceso de consolidación del material (figura 2.19), si es un proceso de fabricación en estado líquido (procesos de fusión) o de fabricación en estado sólido (procesos de sinterización). Los procesos en estado líquido también se conocen como directos, ya que se obtiene la "pieza final" directamente del plato de impresión 3D, mientras que en los procesos de estado sólido se obtiene una pieza en verde que posteriormente se tendrá que procesar y sinterizar para obtener la consistencia mecánica.

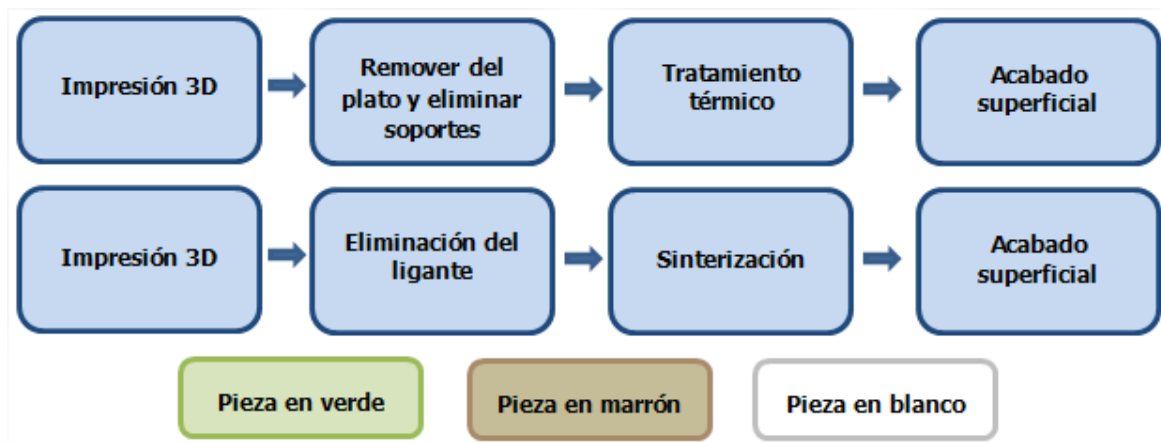


Figura 2.16 Esquema proceso de fabricación aditiva en estado líquido (directa) y en estado sólido (no directa).

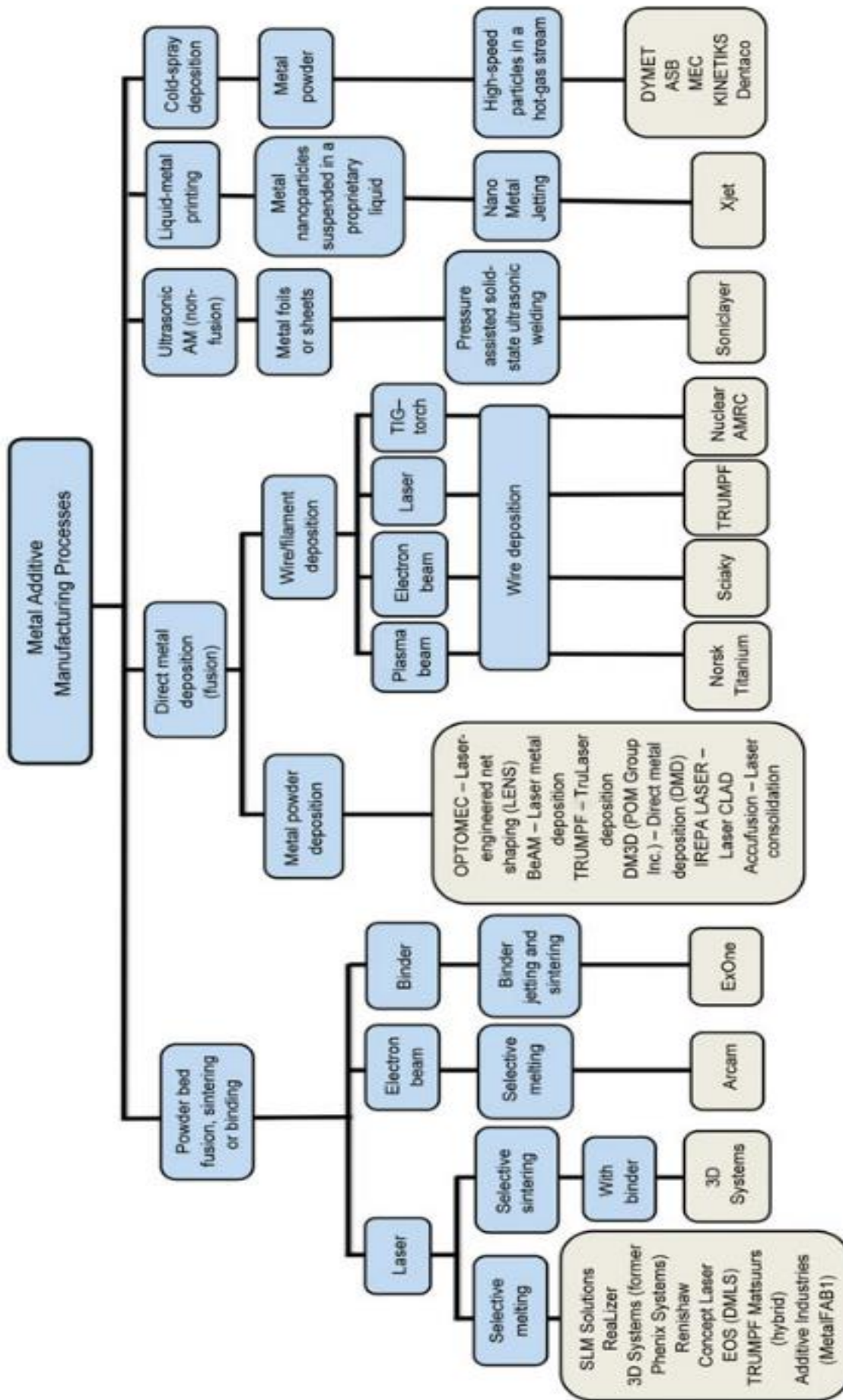


Figura 2.17 Resumen esquemático de los procesos actuales de fabricación de aditiva para metales [105].

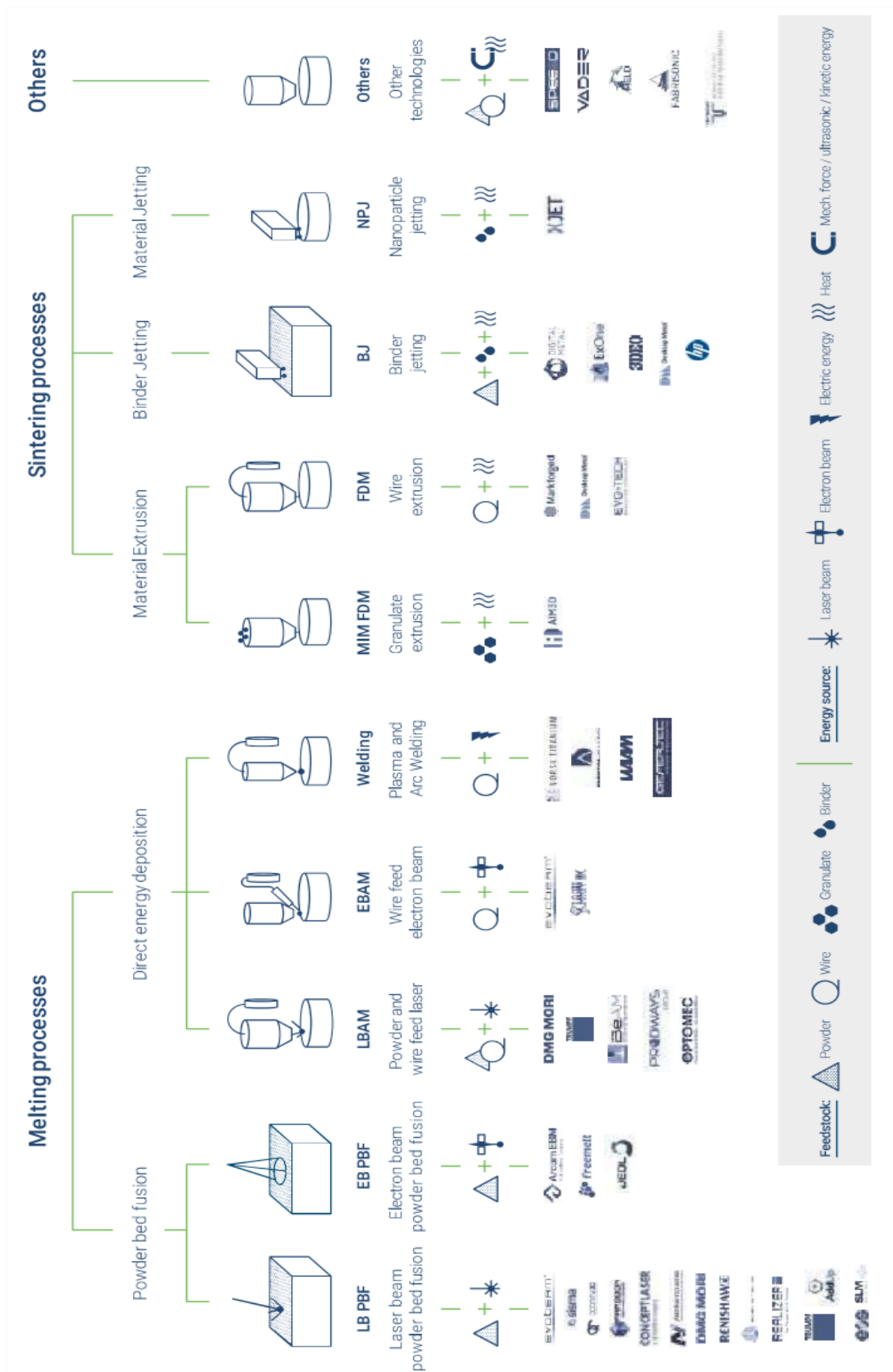


Figura 2.18 Resumen esquemático de los procesos actuales de fabricación de aditiva para metales (fuente AMPower).

2.2.2.1 Electron Beam Melting (EBM)

EBM es una técnica de fabricación aditiva que utiliza un haz de electrones para fundir el polvo metálico y construir una pieza sólida capa a capa. Al igual que otras técnicas de adición de capas, EBM es capaz de crear componentes con formas complejas a partir de modelos CAD. A diferencia de otros métodos que se basan en sinterizado láser (se explicarán a continuación), EBM es capaz de conseguir una fusión completa del polvo, es decir, una densidad de 100%.

El proceso comienza distribuyendo una capa de 100 μm de polvo metálico sobre una plataforma de acero. El polvo contiene partículas esféricas entre 45 y 100 μm de diámetro. El haz de electrones escanea las áreas definidas por el modelo del ordenador y funde completamente el polvo de estas áreas escaneadas; a continuación, se distribuye una nueva capa de polvo sobre la capa previamente fundida. Este procedimiento continua capa a hasta producir la pieza.

Este proceso se realiza en una atmósfera al vacío, ésto lo diferencia de otros métodos de sinterizado láser que trabajan con gas protector inerte. La fusión y formación de piezas de titanio en una cámara de vacío minimiza las reacciones químicas entre el polvo metálico fundido y la atmósfera que lo rodea [9].

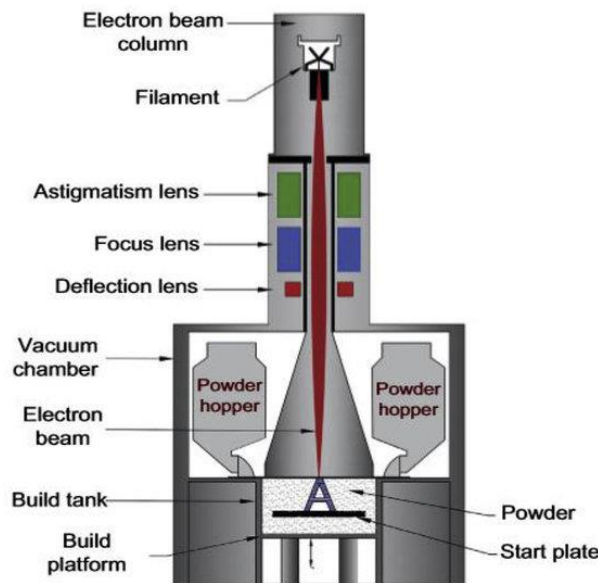


Figura 2.19 Esquema sistema EBM. Imagen Cortesía Arcam.

2.2.2.2 Laser Powder Bed Fusion (LPBF)

LPBF es una tecnología aditiva de fabricación de metal. A menudo se hace referencia también a la utilización de los términos Selective Laser Melting (SLM), Direct Metal Laser Sintering (DMLS) o Laser Metal Fusion (LMF) [106]. En el sistema LPBF, un láser óptico de alta potencia (de 200 a 400 W) se utiliza para fundir el polvo metálico a partir de un archivo CAD en 3D. De manera similar al proceso EBM, los componentes se construyen capa a capa, siendo el espesor típico de capa 20 μm [101].

El haz láser es transportado a través de una fibra óptica y es enfocado en el polvo. El tratamiento con el haz se lleva a cabo en una cámara llena de gas inerte, como el argón o el nitrógeno, para evitar la oxidación [107].

Se han realizado diferentes estudios para investigar la biocompatibilidad de muestras de Ti obtenido mediante LPBF, los resultados muestran diferentes propiedades superficiales de este material, los autores concluyen en que el incremento de la actividad metabólica de los osteoblastos en las muestras obtenidas es debida a una mayor área superficial [108].

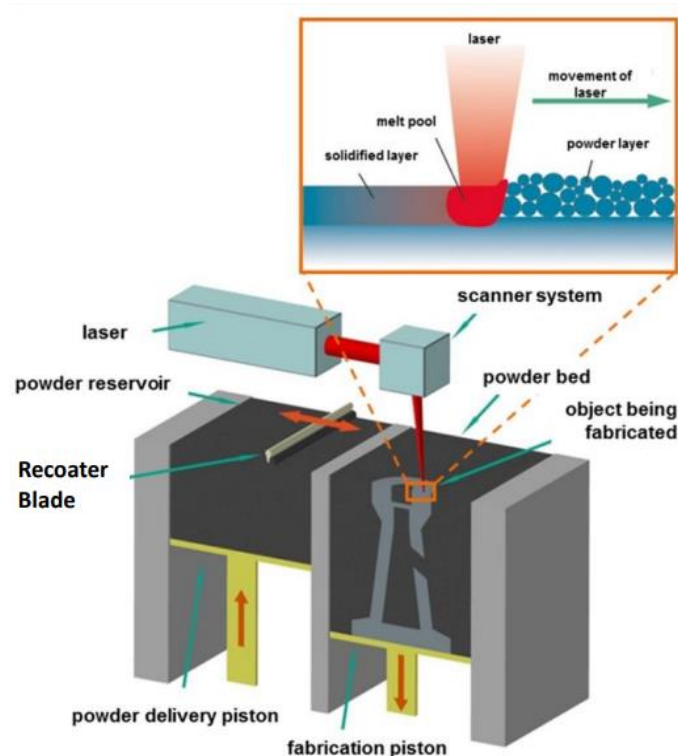


Figura 2.20 Esquema sistema LPBF. Imagen cortesía de Simufact.

En los últimos años, estas tecnologías mencionadas han sido las más estudiadas y utilizadas para la fabricación de metales con porosidades controladas. Como se ha comentado anteriormente, estas técnicas son identificadas como de fabricación "directa", ya que se obtiene la pieza final en un único proceso, directamente a partir del polvo. Estas tecnologías aditivas "directas" son considerablemente costosas en cuanto a gastos de amortización de máquina y post procesos. La estructura de soporte necesaria para la fabricación de formas complejas o con voladizos es difícil de eliminar y aún no son lo suficientemente maduras para garantizar la repetitividad estructural de las piezas metálicas fabricadas. Por el contrario, en la fabricación "no directa", primero se obtiene la pieza en verde (con consistencia y manipulable, pero sin resistencia mecánica) que luego se introduce en el horno para la sinterización (etapa de calentamiento de la PM convencional). A continuación, se describen las principales tecnologías aditivas de fabricación "no directa".

2.2.3 Fabricación aditiva en estado sólido (no directa)

2.2.3.1 Binder Jetting (BJ) o 3D Printing (3DP)

El sistema de BJ está principalmente compuesto por una cámara de suministro de polvo, una base para la construcción de la pieza, un rodillo y un inyector de tinta. La cámara de suministro de polvo se desplaza hacia arriba dejando el espesor de una capa de polvo que a continuación, es transferida dentro de la cámara de impresión con ayuda del rodillo. Luego el mecanismo de inyección de tinta deja caer selectivamente el líquido adhesivo (se utiliza alcohol de polivinilo como binder) sobre el área de sección transversal del corte del objeto "slice". Esta acción produce una capa de material en polvo unido en las regiones seleccionadas. A continuación, la cámara de construcción se desplaza hacia abajo una distancia igual a la del espesor de la capa impresa y posteriormente la cámara de suministro se mueve hacia arriba para depositar una nueva capa polvo. Este procedimiento se repite hasta la obtención de la pieza [109][110].

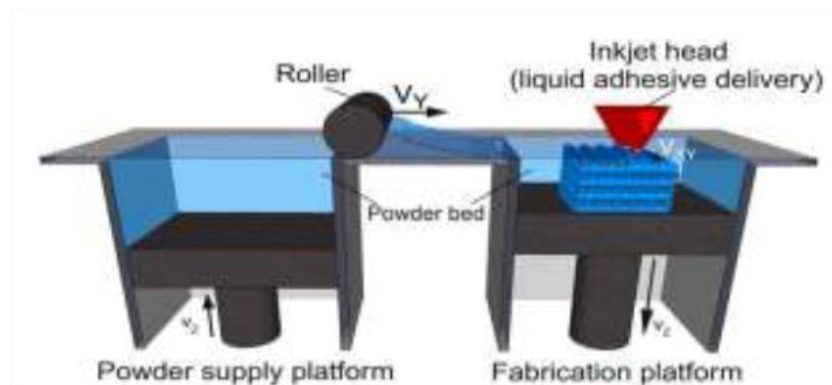


Figura 2.21 Esquema sistema 3DP [111].

2.2.3.2 Fused Deposition Modeling (FDM) o Fused Filament Fabrication (FFF)

FDM es la deposición de material termoplástico fundido a través de una cabeza extrusora con un pequeño orificio. La pieza se construye capa a capa siguiendo el patrón predefinido. Estas capas se fusionan hasta construir la pieza en 3D. Los criterios más importantes de selección para los materiales FDM son las características de transferencia de calor y la reología. Las variables a controlar son la anchura del ráster (mapa de bits que representa una rejilla rectangular de píxeles), espacio entre rásters y el grosor de la capa (depende del diámetro de la punta de extrusión). El líquido fundido extruido debe estar lo suficientemente caliente para inducir la fusión con el material previamente extruido y solidificar rápidamente para minimizar el flujo y el tamaño característico. En la industria esta tecnología es ampliamente utilizada para fabricación de moldes o prototipos a partir de la extrusión de filamento de materiales termoplásticos con bajo punto de fusión como el PLA (ácido poliláctico), el ABS (acrilonitrilo butadieno estireno), el nylon y la cera [112]. Se suele llamar impresión 3D cuando la tecnología FDM se utiliza con filamentos termoplásticos. Con este método también es posible fabricar materiales biocompatibles con diferentes morfologías, tamaños y canales de poro, siendo el PCL (policaprolactona) y el PLGA (en inglés, lactic-co-glycolic acid) los polímeros más utilizados [111]. Comercialmente existen filamentos termoplásticos cargados con partículas metálicas, sin embargo, solo pretenden mejorar el acabado superficial o dar a la pieza un

aspecto metálico, es decir no tiene una función mecánica o estructural y si se elimina el polímero pierden la consistencia. Por otra parte la empresa Desktop Metal acaba de lanzar al mercado una sistema de producción de piezas en verde tipo FDM, de un filamento cargado con partículas metálicas, se extruye y se fabrica la pieza en verde capa a capa, a continuación se produce el debinding (eliminación de ligante o polímero) y se sinteriza [113], [114].

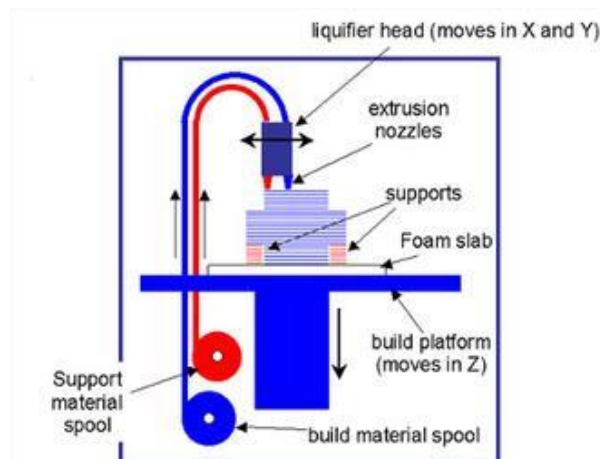


Figura 2.22 Esquema sistema FDM [111].

2.3. MÉTODO A DESARROLLAR: INYECCIÓN 3D + SINTERIZADO

2.3.1 Importancia del polvo de partida

Uno de los principales retos de la industria de pulvimetalurgia es conseguir polvo económico y apto para ser procesado por las distintas técnicas pulvimetalúrgicas, ya sea prensado y sinterización, inyección de polvos, compactación isostática en caliente, etc. Además, los productores de polvo tienen que ser capaces de garantizar una calidad constante del polvo, ya que pequeñas variaciones de composición o de morfología, pueden influir notablemente en el procesamiento del material y en las propiedades finales de los materiales sinterizados.

Los polvos esféricos son utilizados en las tecnologías de fabricación aditiva, especialmente en los métodos directos y con lecho de polvo como LPBF. En general, estos polvos fluyen mejor que los irregulares y en este tipo de procesos esto es un factor limitante [115], ya que es necesario que el polvo fluya para que pueda ser dispersado por la cama de impresión sin generar aglomeraciones [116]. En tecnologías no directas como la extrusión de filamento (FFF) también se suele utilizar polvo esférico ya que al fluir mejor desgasta menos la boquilla de impresión. En 3DF no es necesario que el polvo fluya para poder inyectar las tintas y fabricar las piezas, por lo que se puede prescindir de la utilización del polvo esférico.

En cuanto a la morfología de las partículas, existen distintas variantes de polvo con características diferentes según sea el proceso de fabricación por el que han sido obtenidos. Los polvos de titanio se clasifican principalmente en: Partículas de titanio esponja, polvo hidrurado-dehidrurado (HDH), polvos atomizados en gas, y polvos electrolíticos (figura 4.3)[117].

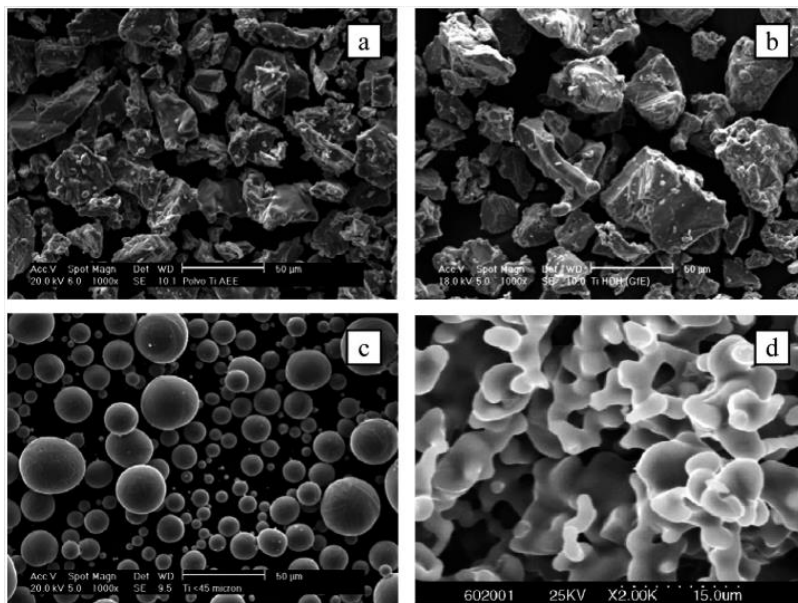


Figura 2.23 a) Polvo de titanio esponja; b) Polvo de Ti HDH; c) Polvo de titanio atomizado por plasma, d) Polvo de titanio electrolítico producido por el proceso FFC-Cambridge [117].

Las propiedades de las espumas metálicas están fuertemente influenciadas por las características del polvo inicial. Güden y colaboradores [118], compararon polvos de Ti

esféricos e irregulares en el proceso de sinterizado, y no encontraron diferencias en la resistencia a compresión para muestras con la misma porosidad. Estos resultados confirmaron que la resistencia a la compresión de muestras porosas se ve afectada principalmente por la porosidad, más que por la forma o tamaño de las partículas y la microestructura. Por otra parte, Torres y colaboradores [119], afirman que la combinación de un polvo de Ti irregular y menor tamaño medio de partícula ($<45\ \mu\text{m}$) mejoraría la sinterización del compacto (calidad del cuello sinterizado), ayudando a compensar la pérdida de resistencia mecánica inherente al aumento de la porosidad. Respecto al tamaño medio de partícula Chen y colaboradores [120], reportaron que las partículas más pequeñas tienen más energía superficial y esto repercute en la formación de apatita. Sin embargo, cuanto más grandes sean las partículas de Ti utilizadas, menor será el efecto tóxico, ya que tienen un área específica menor y por lo tanto menos reactividad química [121], [122].

2.3.2 Inyección 3D: 3D Fiber deposition (3DF) o Direct ink writing (DIW).

Esta técnica, también conocida como Direct Write Assembly, permite crear patrones de casi cualquier geometría con una gran variedad de materiales [110]. Los hidrogeles (pastas o tintas) se introducen en jeringas colocadas verticalmente, eje Z, y se inyectan por medio de una boquilla (ésta puede ser de distintos diámetros; desde $100\ \mu\text{m}$ hasta 1mm) para ser depositados encima de una plataforma, ejes XY. Por lo que respecta al control de los parámetros de impresión o extrusión (como la velocidad de extrusión, porcentaje de llenado, patrón de llenado, entre otros) hay disponibles varios programas de código abierto que permiten modificarlos y ajustarlos. Las tintas utilizadas para esta técnica deben cumplir dos criterios importantes: presentar un comportamiento viscoelástico controlable (deben fluir al ser inyectadas e inmediatamente asentarse para retener la forma y soportar el peso de su estructura capa a capa) y presentar un elevado porcentaje de materia seca (por ejemplo el polvo metálico en este caso) para minimizar la contracción (shrinkage) de la pieza una vez se haya terminado el proceso (eliminado el ligante) [123]. Algunos investigadores usan esta técnica para la fabricación de andamios heterogéneos, es decir; impresos con diferentes tintas; para mimetizar el tejido vascular o imprimir múltiples tipos celulares [124]. En los últimos años se ha utilizado y estudiado esta tecnología para la fabricación de scaffold para ingeniería de tejidos a partir de hidrogeles cargados con células o compuestos cerámicos biocompatibles (3D bioprinting) [125], [126].

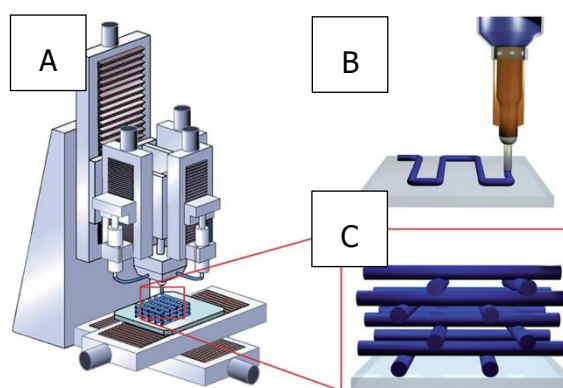


Figura 2.24 Esquema sistema DIW [127]. A) Robot controlado por ordenador durante la deposición, B) deposición del filamento en 2D, y C) resultado de la estructura 3D.

Revisión bibliográfica

El término DIW se suele emplear más para aplicaciones en el campo de la electrónica y robocasting para extrusión (en ciertas ocasiones aplicando temperatura) de pastas cargadas con partículas cerámicas [128],[129],[130]. Ésta es una tecnología emergente en cuanto a la fabricación de estructuras metálicas, y es más conocida como 3DF (en inglés, 3D fiber deposition).

Este proceso es aplicable para la fabricación de piezas metálicas para componentes electrónicos. Ren y colaboradores, 2017 [131], demostraron que se podían obtener muestras metálicas en verde a través de un proceso de extrusión basado en un aglutinante (binder) termoplástico orgánico. La pasta o tinta se obtuvo a partir de la mezcla de polvo de cobre de 45-75 μm (65% en volumen) con el binder, compuesto por parafina, polietileno de baja densidad, y ácido esteárico (74, 23 y 3% en peso). Las tintas fueron extruidas a 160°C con una aguja de 2mm de diámetro y presentaron aproximadamente un 20% de contracción tras el sinterizado. Las muestras obtenidas en este estudio presentan poca precisión dimensional, distorsiones en el secado (solucionan? calentando la placa a 90°C) y bastante contracción debido a la elevada proporción de binder utilizado, que además se elimina completamente a temperaturas considerablemente altas (entre 400 y 500°C) [131].



Figura 2.25 Imagen de muestras en verde del estudio de Ren y colaboradores [131].

Michielsen y colaboradores, 2013 [132], fabricaron membranas porosas de acero inoxidable mediante esta técnica. En este caso no se construyó una estructura tridimensional, pero sí se utilizó un agente polimérico como ligante para fabricar una pasta metálica que permitió obtener una estructura en verde que posteriormente fue sinterizada. La pasta metálica estaba compuesta por polvo de acero inoxidable (316 L 150 μm) y se usó polisulfona como aglutinante polimérico y N-metil-2-pirrolidona como disolvente. Esta técnica permitió fabricar membranas de acero con gran precisión y poca contracción debido al bajo porcentaje de ligante (4% en peso). Sin embargo, el uso de este ligante para la fabricación de pastas metálicas implica un proceso de fabricación demasiado largo, ya que para eliminar el disolvente es necesario sumergir la pieza en agua desionizada durante 24h y a continuación, llevar a cabo un proceso de secado durante 48h más. Por otra parte, el polímero utilizado como ligante se elimina a 600°C [132].

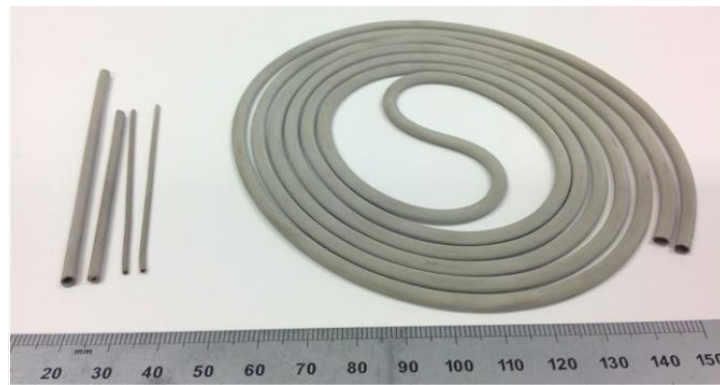


Figura 2.26 Diferentes tipos de fibras de acero inoxidable fabricadas mediante 3DF [132].

Jakus y colaboradores, 2015 [133], han desarrollado un nuevo tipo de tinta a partir de la cual se puede imprimir (extruir) prácticamente cualquier metal y construir estructuras muy complejas. Las estructuras metálicas se forman a partir de metal, óxido metálico y otros polvos. Las tintas están compuestas de tres componentes: (1) polvos metálicos, (2) ácido poliláctico-glicólico (PLGA), y (3) una mezcla tri-disolvente: diclorometano (DCM), ftalato de dibutilo (DBP) y 2-butoxietanol (2- Bu). Hay una gran versatilidad en cuanto a la composición final de la pieza ya que pueden utilizarse distintos polvos para hacer tintas de partículas distintas. Estas tintas compuestas, formadas por múltiples tipos de polvo, pueden sintetizarse ya sea: (A) creando una tinta a partir de una mezcla de polvos o (B) mezclando tintas previamente sintetizadas en las cantidades apropiadas de una manera similar a la mezcla de colores de pintura. Independientemente del polvo que comprende la tinta, el comportamiento reológico es el mismo siempre que la composición sea 7:3 en volumen (polvo: PLGA), permitiendo la extrusión por orificios de 200 μ m. Las tintas cargadas de partículas se extruyen como un líquido de alta viscosidad y endurecen inmediatamente, y además mantienen sus propiedades (no se deposita o se separa) en el transcurso de 105 días. Las estructuras impresas prácticamente no experimentan pérdidas de masa al ser sumergidas en agua y a pesar de estar constituidas por polvo mayoritario, son notablemente robustas; presentan propiedades mecánicas similares a las del polímero y son capaces de experimentar una deformación del 100% antes del fallo[133]. A continuación, se muestran ejemplos del tipo de estructuras que consiguen y los materiales con los que Jakus y colaboradores han trabajado.

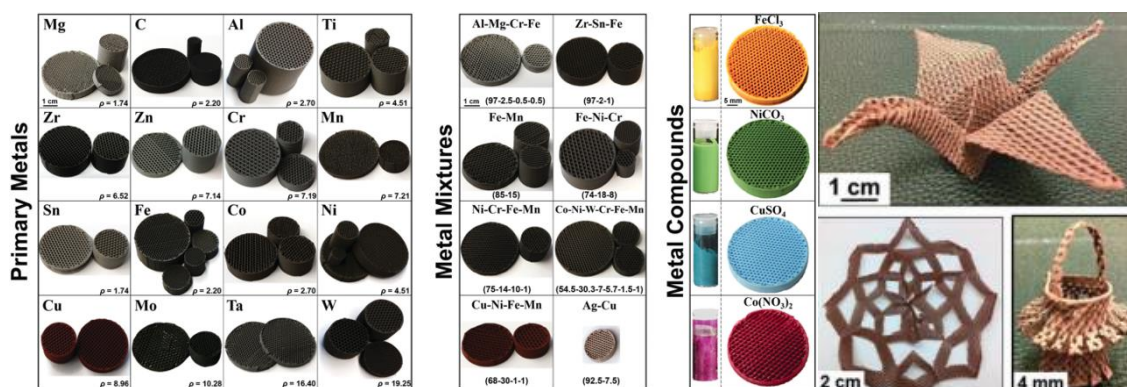


Figura 2.27 Tipos de estructuras conseguidas y posibles materiales para la impresión [133].

Revisión bibliográfica

Rocha y colaboradores, 2017 [134], formularon tintas con cobre y grafeno a partir de un hidrogel de Pluronic F127 (25% en peso), para la fabricación mediante impresión 3D (extrusión) de supercondensadores o ánodos para baterías de iones de litio [134]. Las tintas se basan en un polímero termosensible (Pluronic F127). El Pluronic F127 es un copolímero en tribloque (formado por 3 componentes) no iónico que en agua forma un hidrogel capaz de transportar cualquier sistema de partículas. En solución responde a la temperatura cambiando su configuración y como consecuencia su flujo y comportamiento viscoelástico. A temperaturas inferiores a la temperatura crítica ($<TC$), los tres componentes en el tribloque son hidrofílicos y su viscosidad es muy baja. A temperaturas superiores a su TC , un componente se vuelve hidrófobo, lo que lleva a un cambio en la conformación del tribloque, con la formación de micelas que aumentan considerablemente la viscosidad [134][135]. Las tintas se prepararon mezclando partículas esféricas de $10\mu\text{m}$ de cobre (85% en peso) con hidrogel de Pluronic (25% en peso), se desconoce el tamaño, la forma y el contenido exacto de grafeno. Las muestras fueron impresas con agujas de diferentes diámetros (de 100 a 1000 μm) y mostraron baja contracción (5%) y un buena precisión dimensional (sin distorsiones) tras el proceso térmico [134].



Figura 2.28 Imagen de las muestras obtenidas a partir de las tintas base Pluronic [134].

En cuanto la aplicación de la tecnología 3DF para fabricación scaffolds metálicos hay relativamente pocos estudios. Li y colaboradores, 2005 [136], fabricaron un scaffold de Ti6Al4V mediante esta tecnología, la tinta utilizada estaba compuesta una mezcla de partículas esféricas de Ti6Al4V con un diámetro medio de $45\mu\text{m}$ (66% en volumen) y una solución acuosa de aglutinantes (metilcelulosa y ácido esteárico). Estudiaron el efecto de la porosidad y el tamaño de las fibras (utilizando boquillas con diferentes diámetros) en la resistencia a compresión y observaron que a menor porosidad y menor diámetro mayor resistencia a compresión (54-58% porosidad, 0.4mm diámetro extrusión y 432 ± 30 MPa resistencia a compresión). En el estudio concluyen que la técnica utilizada se presenta como una alternativa a las tecnologías ya conocidas, sin embargo la cantidad de ligante que utilizan es elevada y en las micrografías SEM se observa la presencia de impurezas debido a una eliminación incompleta de este [136], [137]. Li y colaboradores, 2006 [138], realizaron estudios *in vitro* sobre scaffolds de Ti6Al4V fabricados por 3DF. Los resultados revelaron una biocompatibilidad, no solo no son tóxicos sino que también favorecen la adhesión, proliferación y diferenciación celular [138]. Li y colaboradores, 2006 [139], estudiaron el efecto de la porosidad en el crecimiento óseo, para llevar a cabo el ensayo fabricaron diferentes scaffolds de Ti6Al4V con diferentes porosidades y patrones de llenado (% de porosidad, tamaño medio de poro, tamaño de poro interconectado) por medio de 3DF y realizando un ensayo *in vivo* en un modelo de espina lumbar de cabra. Los resultados

indicaron que el aumento de la porosidad y el tamaño de poro, en los implantes fabricados por 3DF ejerce un efecto positivo en cuanto la cantidad de crecimiento de hueso nuevo [139].

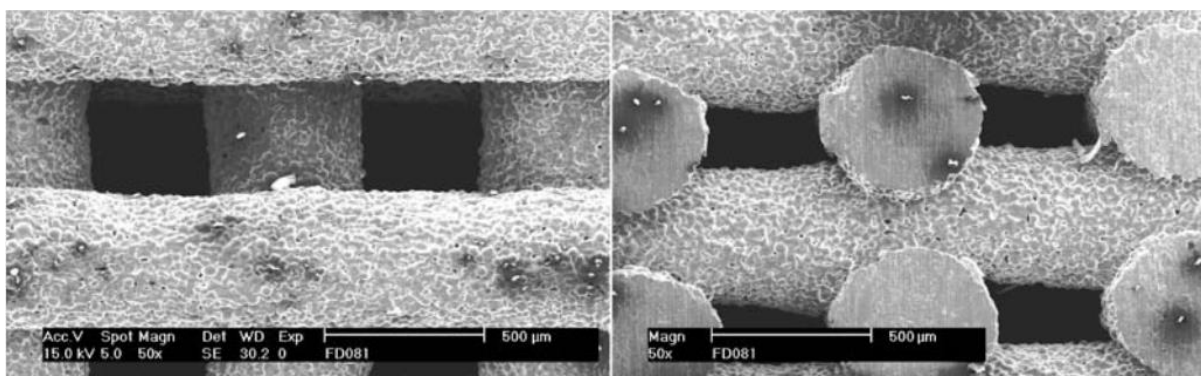


Figura 2.29 Imagen SEM de un scaffold obtenido mediante 3DF. Se observa contaminación tanto en la superficie como en la sección transversal de la muestra [139].

Ahn y colaboradores, 2016 [140], consiguieron fabricar estructuras de titanio con porosidad interconectada ($42\% \pm 7\%$ con un área de poro de $\approx 165 \times 167 \mu\text{m}$) a partir de extrusión de pastas de hidruro de titanio (TiH_2) y con unas propiedades mecánicas favorables (resistencia a compresión $48 \pm 15 \text{ MPa}$ y módulo $1.4 \pm 0.7 \text{ GPa}$). Los resultados de los ensayos *in vitro* indican un gran número de células adheridas que se extienden activamente sobre la superficie de las muestras. Para la obtención de la pasta se utilizó polvo muy fino de TiH_2 ($\approx 1\text{-}3 \mu\text{m}$) mezclado con metilcelulosa, agua y un dispersante de poliéster oligomérico¹⁶. La pasta es extruida a través de una aguja con una boquilla de $510 \mu\text{m}$ a una presión de $\approx 200 \text{ kPa}$ sobre un baño de acetona, que provoca una rápida solidificación de la pasta debido a la extracción del disolvente [140]. A continuación, se presenta esquema del proceso utilizado por Ahn y colaboradores.

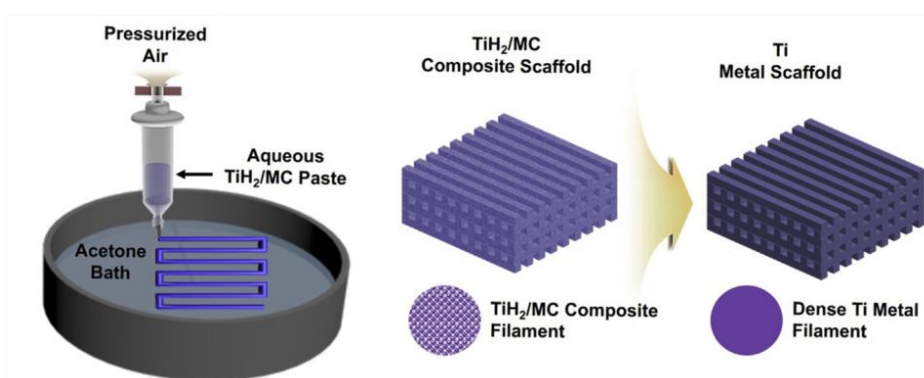


Figura 2.30 Proceso de fabricación de scaffolds de Ti a partir extrusión de pasta de TiH_2 [140].

¹⁶ Se dice que una molécula constituye un oligómero cuando los radicales asociados son distintos entre sí. En cambio, un polímero es una molécula con dos o más radicales de la misma especie

Revisión bibliográfica

A pesar de los buenos resultados en cuando precisión, porosidad, propiedades mecánicas y biológicas, el uso de este tipo de tecnología con esta tinta tiene considerables limitaciones, únicamente se puede utilizar el polvo fino de TiH₂, ya que para tamaños de $\approx 45 \mu\text{m}$ las muestras presentan poca resistencia en verde y colapsan [140]. Por otra parte, estudios previos realizados en el departamento de I+D de AMES indicaron que el sinterizado del polvo de TiH₂ es bastante complejo y se descartó su uso.

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

2.3.4 El sinterizado

El sinterizado es un proceso capaz de generar enlaces a nivel atómico entre las partículas mediante tratamiento térmico. El tratamiento de sinterización da como resultado la formación de pequeños cuellos de sinterización o "cuellos de soldadura" entre las partículas por difusión, así como la generación de poros relativamente pequeños debido a una densificación incompleta. La temperatura, la presión y la duración del tratamiento de sinterización deben controlarse adecuadamente para que sean suficientes para provocar la unión entre partículas, pero no para alcanzar casi la densidad total. En general, el aumento de la temperatura, el tiempo o la presión de sinterización aumentará el tamaño del cuello, lo que ayuda a mejorar las propiedades mecánicas de los materiales porosos [165].

2.3.4.1 La temperatura

La temperatura de sinterización de un material depende de su temperatura de fusión, que en el caso del titanio ronda los 1678°C [166]. Teóricamente, el rango óptimo de temperaturas de sinterización está entre el 60% y el 80% de la temperatura de fusión; por tanto, para el titanio entre 1006°C y 1342°C. Una temperatura de sinterización alta tiende a tapar los poros finos reduciendo la porosidad total, además de producir una morfología esferoidizante. Por tanto, se desean temperaturas más bajas para desencadenar la difusión atómica adecuada para generar las conexiones de las partículas de Ti. Aproximadamente el 30% de los estudios encontrados en la bibliografía sinterizan el titanio puro a 1250°C (figura 2.34)[166].

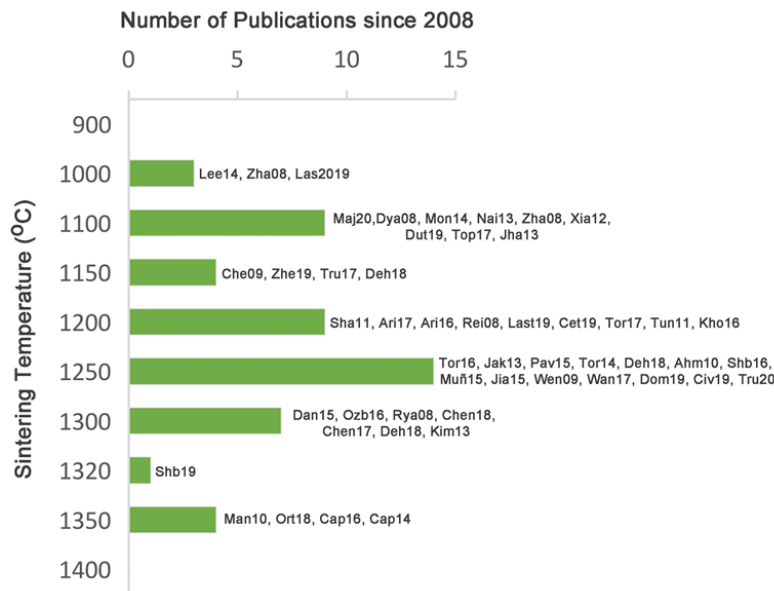


Figura 2.33 Esquema del número de estudios publicados utilizando diferentes temperaturas de sinterización. Todos los estudios considerados utilizaron una atmósfera controlada (alto vacío o argón) y no aplicaron presión durante el sinterizado [166].

2.3.4.2 El tiempo

No hay muchos estudios que se focalicen únicamente en el estudio del tiempo de sinterizado del titanio. Sin embargo, algunos autores han reportado una disminución en el número y tamaño de poros al aumentar el tiempo de sinterización así como la temperatura, lo que provoca un incremento de las propiedades mecánicas [167], [168].

2.3.4.3 La atmósfera

La contaminación de las estructuras porosas de titanio durante el sinterizado puede ser debida a residuos provenientes del procesado en verde, mala eliminación del ligante, contaminaciones del propio horno, o exposición a las condiciones atmosféricas durante el ciclo de sinterización. El proceso de sinterización normalmente se lleva a cabo bajo una atmósfera inerte de argón o helio [169], [170]. Esto se debe a que el Ti tiene una alta afinidad con el nitrógeno, el oxígeno, el hidrógeno y el carbono, y el contenido de elementos intersticiales juegan un papel importante en la influencia de las propiedades mecánicas. La suma del contenido de oxígeno, nitrógeno y carbono es responsable del endurecimiento y fragilización por solución sólida [171]. La resistencia aumenta de manera lineal con el incremento del contenido de oxígeno manteniendo la elongación más o menos constante hasta caer repentinamente al alcanzar un cierto valor [171], [172]. Para ayudar a entender la influencia de intersticiales se introduce la ecuación del oxígeno equivalente según Conrad, 1966:

$$O_{eq} = 2C_N + C_O + 0.5 C_C$$

C_N , C_O y C_C son las concentraciones de nitrógeno, oxígeno y carbono respectivamente [173].

Tabla 2.3 Contenido de oxígeno/nitrógeno para polvos de titanio según la distribución de la malla (mesh) [171].

	60/80 mesh		120/200 mesh		200/325 mesh		325/500 mesh		-500 mesh	
	O	N	O	N	O	N	O	N	O	N
CP-Ti	0.12– 0.20	0.004– 0.008	0.18– 0.26	0.006– 0.011	0.30– 0.35	0.007– 0.012	0.31– 0.40	0.011– 0.017	0.47– 0.50	0.020– 0.026
Ti-Na	0.17– 0.24	0.004– 0.009	0.18– 0.27	0.006– 0.012	0.20– 0.32	0.008– 0.016	0.33– 0.35	0.012– 0.032	0.38– 0.44	0.020– 0.039
Ti-6-4	0.30– 0.36*	0.007– 0.018	0.35– 0.44*	0.018– 0.022	0.45– 0.52*	0.025– 0.038	0.48– 0.54	0.035– 0.047	0.80– 1.0	0.08– 0.1

La norma ASTM F67-06 establece para un titanio grado 2-4 (grado médico) el límite de contenido en oxígeno en 0.25 y 0.40 (% en masa) respectivamente [174].

La sinterización en alto vacío con una presión del orden de 10^{-2} Pa o inferior [175], [176] puede controlar eficazmente la reacción activa entre el Ti y las impurezas intersticiales como el oxígeno, el nitrógeno y el carbono. Normalmente es preferible sinterizar el titanio en alto vacío en lugar de con atmósfera de argón o helio, ya que se obtiene mayor densificación y, en consecuencia, mejores propiedades mecánicas [171].

2.4. TIPOS DE TRATAMIENTOS TERMOQUÍMICOS

2.4.1 Tratamiento termoquímico convencional con Na

El tratamiento termoquímico inicial desarrollado por Kokubo y colaboradores [177], se componía de dos etapas:

1. Inmersión en una solución de NaOH 10M a 60°C durante 24h, posterior limpieza con agua destilada y secado a 40°C 24h en atmósfera de aire.
2. Tratamiento térmico calentando las muestras a 5°C/min hasta 600-800°C y manteniendo durante 1h. Enfriamiento en horno hasta temperatura ambiente.

Tras el tratamiento alcalino con NaOH los iones de Na^+ y O^{2-} penetran en la superficie del Ti generando una fina estructura de red a escala nanométrica, que consistirá en fases tipo pluma, de un $1\mu\text{m}$ de espesor, que densificará tras el posterior tratamiento térmico, además de que los iones de oxígeno penetrarán ligeramente más [178], [179]. Esta fina estructura generada tras el tratamiento con NaOH se trata de titanato de sodio hidrogenado ($\text{Na}_x\text{H}_{2-x}\text{Ti}_y\text{O}_{2y+1}$, donde $0 < x < 2$ e $y = 2, 3, \text{ o } 4$), que se convierte en titanato de sodio ($\text{Na}_2\text{Ti}_y\text{O}_{2y+1}$, $y = 5, 6\dots$) y rutilo (TiO_2) tras el tratamiento térmico posterior [180].

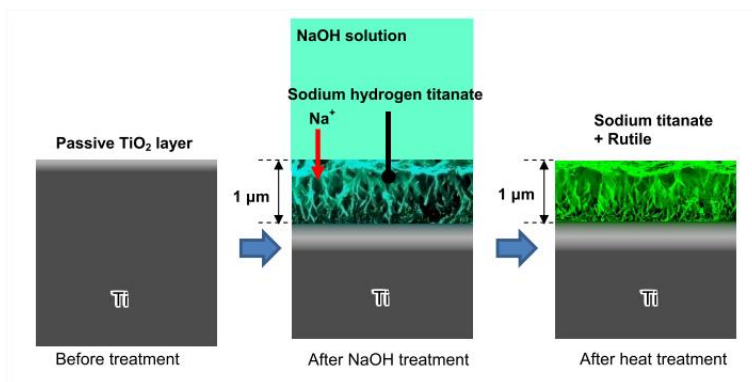


Figura 2.34 Cambio estructural de la superficie del Ti metal sometido al tratamiento NaOH y posterior tratamiento térmico.

La bioactividad ósea *in vivo* de un material puede predecirse a partir de la formación en superficie de apatita tras la inmersión en un fluido corporal simulado (del inglés SBF) con concentraciones de iones casi iguales a las del plasma sanguíneo humano [181]. Cuando el Ti tratado es sumergido en SBF se empieza a generar apatita en la superficie, esto no sucede con el titanio sin tratar [179]. A continuación, se describe el mecanismo de formación de la apatita sobre la superficie de Ti tratado (Figura 2.35).

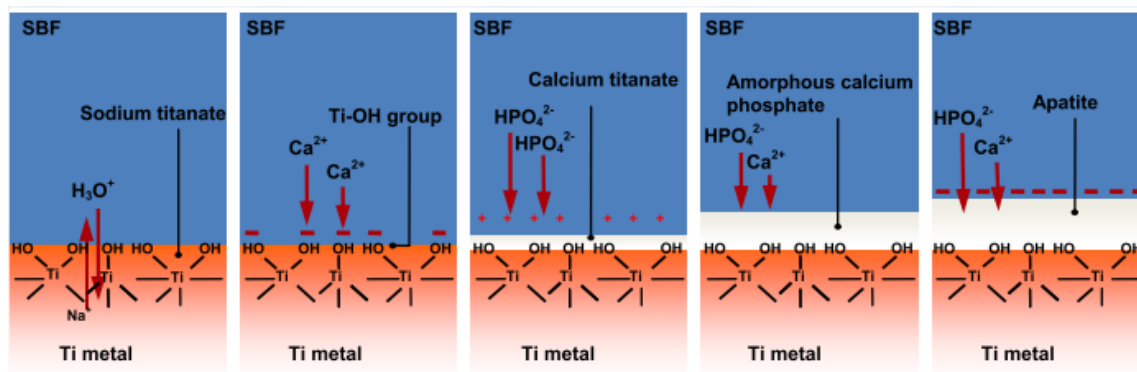


Figura 2.35 Proceso de formación de apatita tras tratamiento termoquímico alcalino [182].

Al sumergir el Ti en SBF los iones Na^+ procedente del titanato de sodio ($\text{Na}_2\text{Ti}_y\text{O}_{2y+1}$) se intercambian con los H_3O^+ del medio acuoso y se forman grupos Ti-OH en la superficie del metal. Como resultado de esta reacción, se produce localmente un ambiente alcalino en la superficie del metal Ti y se ha comprobado que el óxido de titanio se carga negativamente en ambiente alcalino [183]. En consecuencia, grupos Ti-OH que se forman en la superficie se absorben los iones calcio cargados positivamente (Ca^{2+}) del SBF formando titanato de calcio amorfo. A medida que los iones de calcio se acumulan, la superficie se va cargando positivamente y éstos reaccionan con los iones de fosfato cargados negativamente (HPO_4^{2-}) formando un fosfato de calcio amorfo. Este fosfato de calcio está en una fase metaestable que finalmente se transforma en una apatita cristalina estable similar al hueso [184], [182].

A pesar de las ventajas descritas anteriormente, el tratamiento termoquímico convencional (con NaOH) también presenta ciertos inconvenientes. Los iones Na^+ del titanato de sodio se liberan fácilmente, sobre todo cuando el Ti metal se almacena en un ambiente húmedo, debido al intercambio iónico con los iones H_3O^+ del entorno. Éste es un problema en aplicaciones clínicas, ya que cualquier disminución en la concentración de sodio del titanato de sodio disminuye la capacidad de formación de apatita [180]. Por otra parte, estos tratamientos no son efectivos para nuevos tipos de aleaciones de Ti tipo Ti-Zr-Nb-Ta, que son de gran interés actual debido a que están libres de elementos citotóxicos [182]. Los elementos de aleación como Zr, Nb y Ta apenas se eliminan de la superficie mediante el tratamiento con NaOH, ya que son muy poco solubles en la solución de NaOH. Ésto bloquea la migración y liberación de iones Na^+ , impidiendo así el intercambio iónico con el fluido corporal y, por lo consiguiente, la formación de apatita [185].

Surge otra problemática cuando se realiza el tratamiento químico para grandes muestras. Por norma general, los reactivos comerciales de NaOH contienen una pequeña cantidad de impurezas de Ca. Se ha demostrado que en soluciones de NaOH superiores a 30 mL existe una contaminación de iones Ca^{2+} que sustituyen al Na^+ en las capas del titanato, provocando una disminución de la reactividad con el SBF y, por lo tanto, de la habilidad de formación de apatita [186]. Es posible evitar estos problemas y mejorar el tratamiento remplazando el titanato de sodio por titanato de calcio [66].

2.4.2 Modificación del tratamiento convencional para sustituir Na por Ca

El titanato de sodio hidrogenado, generado por el tratamiento con NaOH, tiene una estructura en capas y los iones de Na^+ ubicados en los espacios intermedios pueden ser reemplazados fácilmente por iones Ca^{2+} en una solución que contiene Ca. Cuando el Ti se sumerge en una solución de CaCl_2 100 mM a 40°C durante 24 h, después del tratamiento con NaOH, el titanato de sodio hidrogenado se convierte por completo en titanato de calcio hidrogenado ($\text{Ca}_x\text{H}_{2-2x}\text{Ti}_3\text{O}_7$) mediante la sustitución de los iones Na^+ y H^+ por iones Ca^{2+} . A continuación, se realiza el tratamiento térmico y el titanato de calcio hidrogenado se convierte en titanato de calcio (CaTi_4O_9) [66]. Sin embargo, las muestras tratadas no generan apatita en SBF, ya que la tasa de liberación de los iones Ca^{2+} del titanato de calcio es muy baja como resultado de su estructura compacta. Después del tratamiento térmico, se sumerge el Ti en agua a 80°C durante 24 h. Como resultado, los iones Ca^{2+} de la superficie del titanato son reemplazados parcialmente por iones H_3O^+ del agua, produciendo así un titanato de calcio con una superficie deficiente en calcio, que genera apatita en SBF tras 1-3 días [187].

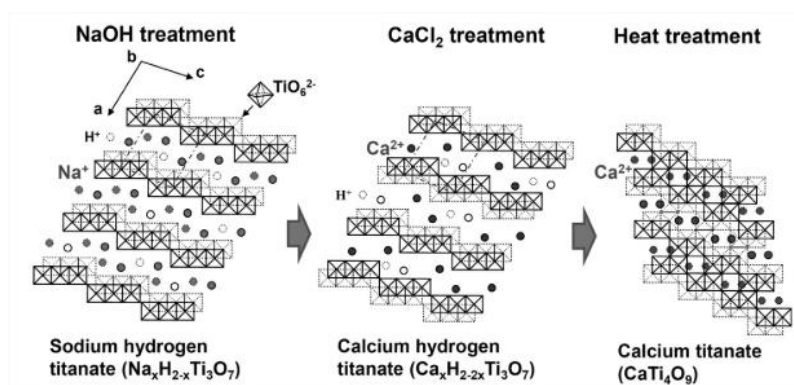


Figura 2.36 Estructura cristalina del titanato de sodio hidrogenado, el titanato de calcio hidrogenado y el titanato de calcio [66].

De esta manera se solucionan los problemas presentes con el titanato de sodio. Las muestras tratadas no pierden reactividad al almacenarlas, ya que los iones de calcio no se liberan fácilmente con la humedad. Las contaminaciones de Ca en el reactivo de NaOH no tienen repercusión alguna ya que el titanato de sodio es completamente sustituido por el de calcio. Diferentes estudios confirmaron que el presente tratamiento induce la formación de apatita en las aleaciones de Ti-Zr-Nb-Ta [187]–[190].

Otra ventaja del tratamiento presentado es que los iones Ca^{2+} liberados promueven la formación de apatita de manera más efectiva que los iones Na^+ . El ion Ca^{2+} es uno de los componentes de la apatita y, por lo tanto, su liberación aumenta efectivamente la actividad iónica de la apatita en el fluido circundante, mientras que el ion Na^+ no lo es, por lo que su mecanismo de acción es diferente, al liberarse aumenta la actividad iónica indirectamente al aumentar la concentración de OH^- en el fluido circundante [66].

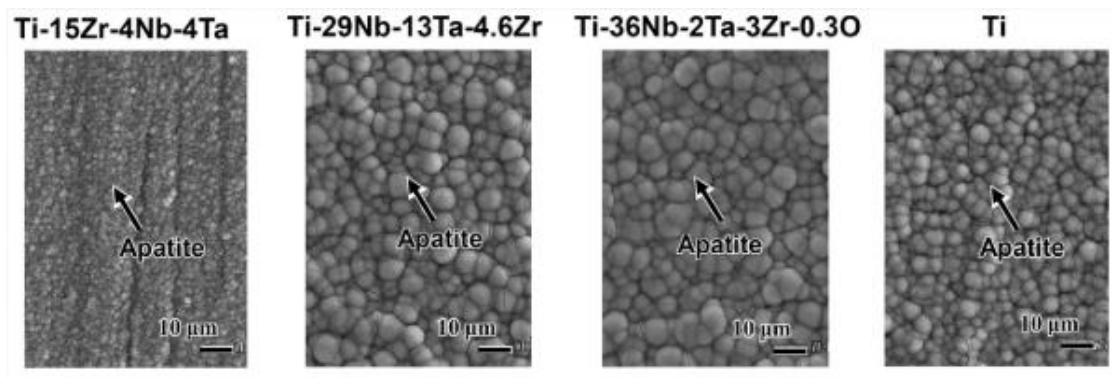


Figura 2.37 Micrografías SEM del Ti y aleaciones tipo Ti-Zr-Nb-Ta sometidas al proceso completo (NaOH + CaCl₂ + tratamiento térmico + tratamiento en agua) tras estar sumergidas 3 días en SBF [187]–[190].

Por otra parte, en un estudio realizado por Kizuki y colaboradores [187] se observó la influencia de esta capa de titanato de calcio en la diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimales en osteoblastos, acelerando el proceso de adhesión de las mismas en la superficie.

Con el tratamiento con Ca es posible añadir ciertos iones que son efectivos para la promoción del crecimiento óseo, tales como Mg²⁺[72], Sr²⁺[72]+ y Zn²⁺[73], y otros como Ag⁺[74] y Ga³⁺[75], que presentan actividad antibacteriana.

2.4.3 Modificación del tratamiento para añadir Ca con Ag

Desde hace años se conoce que tanto la plata metálica (Ag^0) como los iones de plata (Ag^+) tienen fuertes efectos inhibitorios y bactericidas, así como un amplio espectro de actividades antimicrobianas [191]–[196].

2.4.3.1 Mecanismo antibacteriano

Para diseñar un sistema antibacteriano potente, primero es necesario comprender su mecanismo de acción. Se pueden distinguir dos puntos que influyen en la eficiencia. Por una parte, está el comportamiento de la plata con el entorno, es decir, las modificaciones físicas o químicas que pueden ocurrir, como por ejemplo agregación, disolución, reacciones de Redox (reducción-oxidación), adsorción o desorción de iones, etc. Por otra parte, está la forma en que las especies que contienen plata interactúan con la célula bacteriana y conducen a la muerte celular. Por lo tanto, este segundo paso depende del primero, ya que la interacción célula-plata depende como este presente la plata en la solución, siendo en forma de nanopartículas (NP) e iones Ag^+ los sistemas más estudiados. Por este motivo es difícil de comparar con diferentes estudios el impacto de la toxicidad [197].

Se pueden distinguir dos mecanismos de acción de la plata en función de si ésta se presenta en forma de plata metálica, normalmente como NP, o bien como plata iónica. Las NP de Ag tienden a acumularse en la membrana bacteriana y formar agregados, provocando una disminución de la integridad de la membrana bacteriana y perforaciones, que conducen a la muerte celular [195], [198], [199]. También se ha considerado como uno de los modos citotóxicos de actuación la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) debido a la plata metálica (Ag), ya que bajo estas condiciones las células soportan un estrés oxidativo muy alto que conduce a la inactivación celular [200], [201].

Los iones Ag^+ reaccionan con las proteínas que contienen azufre o grupos sulfhidrilo (o grupos tiol, SH^-) entre las membranas celulares bacterianas, causando lisis celular. Por lo tanto, tienen la capacidad de inactivar una variedad de especies de bacterias Gram positivas y negativas [202], [203].

Los iones de plata interactúan con tres componentes principales de la célula bacteriana para producir el efecto bactericida: la pared celular de peptidoglucano [204] y la membrana plasmática [205]; el ADN bacteriano (citoplasmático) [206], [207]; y las proteínas bacterianas [205], [204] especialmente enzimas involucradas en procesos celulares vitales como la cadena de transporte de electrones (Figura 2.41).

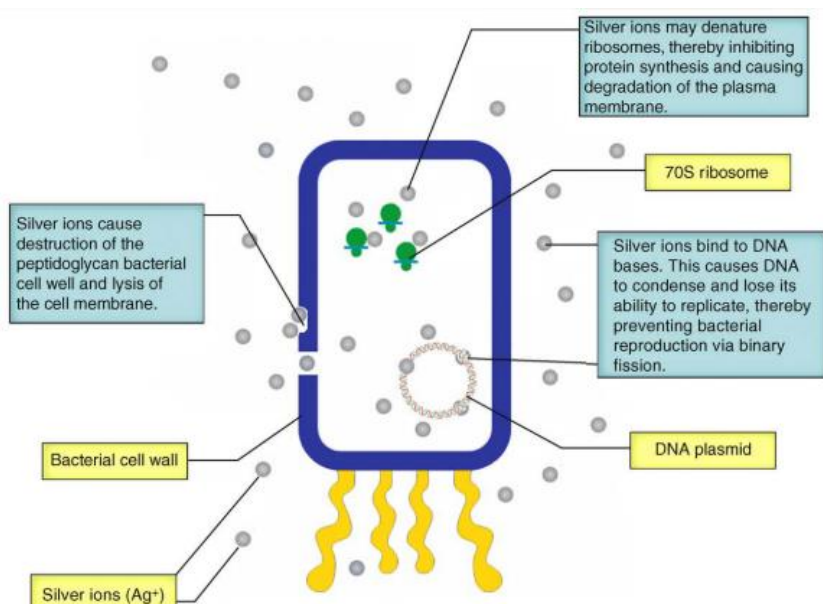


Figura 2.38 Esquema mecanismo antibacteriano de los iones de plata [208].

2.4.3.2 Método de incorporación

Existen diferentes maneras para incorporar la plata en los diversos materiales para implantes, como el método sol-gel, la implantación iónica, el intercambio iónico y la pulverización catódica (sputtering) [209]–[213].

Como se ha comentado anteriormente, la formación de titanatos de calcio permite la incorporación de iones, para mejorar tanto la bioactividad como la capacidad antibacteriana, siendo la plata un candidato ideal debido a sus características anteriormente citadas. Inoue y colaboradores [214] intentaron formar una capa de titanato de sodio con Ag sumergiendo el Ti, que previamente se le había realizado el tratamiento con NaOH, en una solución 0.05M de acetato de plata. En este caso los iones Ag^+ se incorporaron (vía intercambio iónico con Na^+) con éxito en la capa de titanato de sodio con algunos precipitados de partículas de plata. El producto resultante exhibió una gran capacidad antibacteriana (más del 99% de reducción) en *S. aureus*. Otros estudios demostraron que los iones Ag^+ se podían incorporar en el titanato de sodio hidrogenado sin formar precipitados de plata, sumergiendo las muestras en una solución de $Ag(NO_3)$ 0.01-100mM tras el tratamiento con NaOH. Sin embargo, al realizar el tratamiento térmico vuelven a aparecer precipitados de plata [74], [215]. Kizuki y colaboradores [74] consiguieron generar un titanato de calcio con Ag libre de precipitados mediante el proceso secuencial: NaOH, $CaCl_2$ (100mM a 40°C 24h), tratamiento térmico y $AgNO_3$ (0.001-25mM a 80°C 24h). El producto resultante exhibió una gran capacidad antibacteriana (más del 99% de reducción) en *S. aureus*, además de generar apatita tras inmersión en SBF.

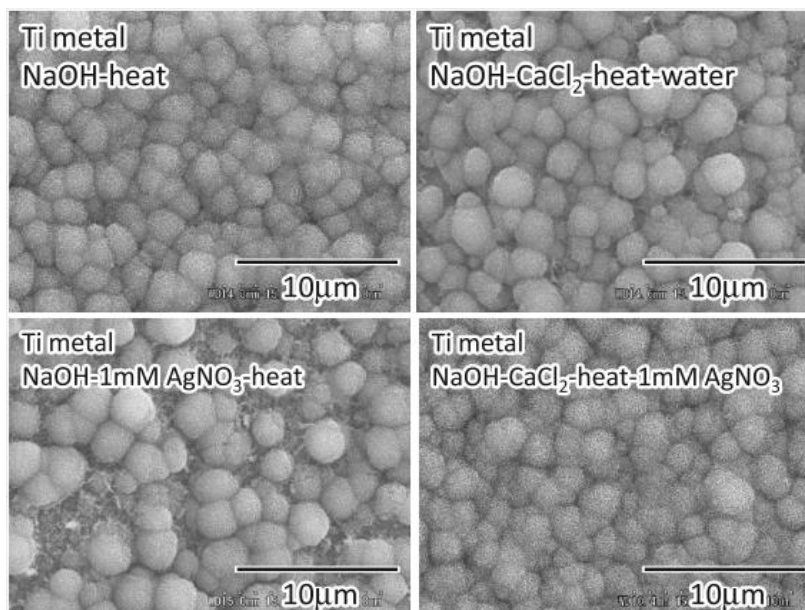


Figura 2.39 Imagen SEM de la superficie de Ti tras los diferentes tratamientos térmicos y la inmersión en SBF [74].

Diversos estudios indican que los iones Ag^+ liberados parecen exhibir una actividad antibacteriana suficientemente alta cuando su concentración es más de 1.2 ppm en suero bovino fetal (FBS) o en agua ultra pura (UPW), 0.25 ppm en agua destilada (DW), 0.38 ppm en solución salina con fosfato (PBS) Y 1 ppm en SBF [41]. Sin embargo, a día de hoy el número de estudios relevantes aún es escaso y se necesitan más investigaciones para establecer una correlación cuantitativa clara entre la cantidad de iones Ag^+ liberados y la actividad antibacteriana. Se ha informado que concentraciones de hasta 10 ppm de iones Ag^+ son aceptables para el cuerpo humano, pero por encima de este valor la plata puede causar efectos graves en la salud, incluida la neuropatía [216], [217].

2.4.4 Modificación del tratamiento para añadir Ca con Ga

En los últimos años el galio (Ga) ha despertado un gran interés en aplicaciones para dispositivos implantables ya que ofrece una doble funcionalidad, el efecto inhibitorio de los iones de galio sobre la resorción ósea y su actividad antibacteriana. El galio (Ga) es conocido por su efecto inhibitorio sobre la liberación de calcio del tejido óseo, que es eficaz para prevenir la resorción ósea. Bloquea la reabsorción de osteoclastos, sin ser citotóxico para los estos, ni inhibir el metabolismo celular [218]. Además, ha demostrado tener eficacia clínica en la supresión de la osteólisis y del dolor óseo y se sugiere como tratamiento para la osteoporosis [75]. Recientes estudios han reportado la capacidad antibacteriana de los iones de Ga. Valappil y colaboradores [219] demostraron la actividad antibacteriana de vidrios base fosfato dopados con Ga contra bacterias tanto Gram negativa (*E. Coli* y *P. aeruginosa*) como Gram positiva (*S. Aureus* y *C. difficile*). Cochis y colaboradores [218] observaron que muestras de titanio dopado con Ga, obtenidas mediante deposición anódica por chispa, mostraban mayor inhibición antibacteriana contra *Acinetobacter baumannii* que muestras de titanio dopado con plata, obtenidas mediante el mismo método. Además, a diferencia de la plata, el galio exhibe estos beneficiosos efectos antibacterianos sin producir citotoxicidad [220]–[222].

2.4.4.1 Mecanismo antibacteriano

En contraste con Ag, Ga puede activarse metabólicamente sustituyendo al Fe en muchos sistemas biológicos, debido a las similitudes químicas de Ga^{3+} con Fe^{3+} en términos de carga, radio iónico y configuración electrónica [223]. Estas características permiten que el Ga^{3+} sustituya al Fe^{3+} en el grupo protésico¹⁷ de varias enzimas. Entre ellas, las proteínas transportadoras de hierro, como la transferrina (Tf) y la lactoferrina (Lf) pueden formar complejos con el Ga^{3+} y enviarlos a la célula. Dentro de la célula, el Ga^{3+} perturba el metabolismo del hierro, ya que se incorpora a las proteínas y enzimas esenciales en lugar de éste. A diferencia del hierro, el Ga^{3+} no puede reducirse en condiciones fisiológicas y, por lo tanto, no puede participar en reacciones Redox inhibiendo una serie de funciones esenciales como la conformación de proteínas, el transporte de electrones y la síntesis de DNA (interfiere en la enzima ribonucleoide reductasa)[221], [224]–[226].

El transporte de Fe^{3+} al interior de la célula se realiza mediante el sideróforo¹⁸ pyoverdine que disuelve los iones Fe^{3+} en Fe^{2+} , debido a que a pH neutro la solubilidad del Fe^{3+} es muy baja, para así ser asimilados en el núcleo. Debido a que el ion Ga^{3+} es metabólicamente similar al ion Fe^{3+} , las bacterias pueden confundirlos y absorber el galio mediante los sideróforos y, como se ha comentado anteriormente, como el galio no posee el potencial de reducción del hierro, numerosas funciones dependientes de dicha reducción se ven afectadas. Este proceso es comúnmente conocido en bacteriología como la estrategia del “caballo de Troya” [227], [218].

¹⁷ Es el componente no aminoacídico de una proteína conjugada. El grupo protésico se enlaza de forma covalente a la estructura proteica y puede ser un lípido, carbohidrato, grupo fosfato, hemo o ion metálico

¹⁸ Del griego: «transportador de hierro») es un compuesto quelante (es una sustancia que forma complejos con iones de metales pesados) de hierro secretado por microorganismos. Los sideróforos disuelven los iones Fe^{3+} a complejos de Fe^{2+} , que pueden ser asimilados por mecanismos de transporte activo.

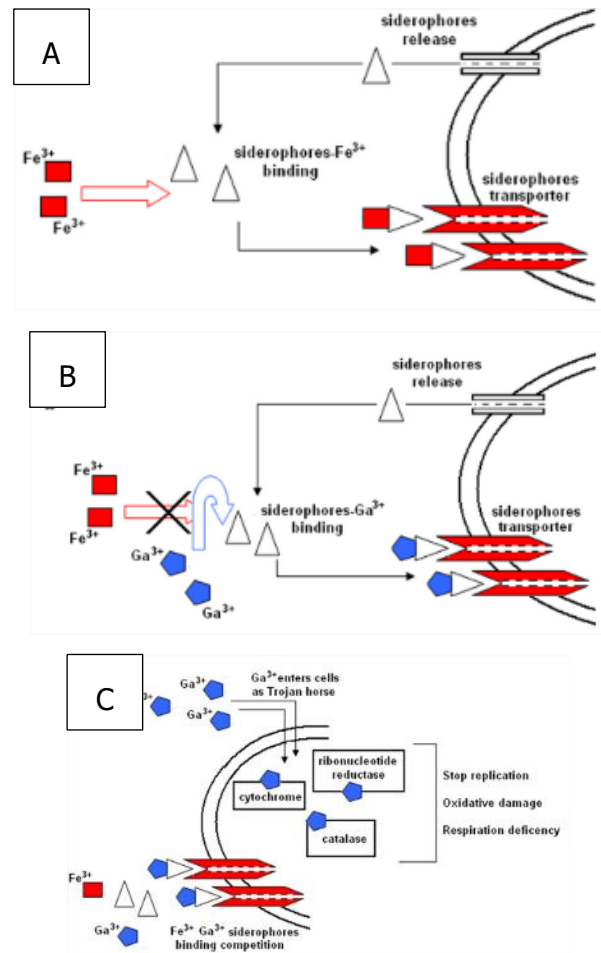


Figura 2.40 Representación esquemática del mecanismo "caballo de Troya" del Galio. A) transporte intramembrana del Fe³⁺ a través de sideróforos. B) Los iones Ga³⁺ compiten con los iones fe³⁺ por la unión con los sideróforos. C) se interrumpen las rutas metabólicas cruciales dependientes de Fe en la bacteria [218].

2.4.4.2 Método de incorporación

En los últimos años se han estudiado diferentes métodos para la incorporación y aplicación de Ga sobre la superficie de implantes bien en forma de nanopartículas, dopando vidrios base fosfato, aplicación directa a la superficie vía deposición anódica por chispa e intercambio iónico [75], [218], [219], [227]–[231]. Tal y como se ha comentado, la formación de titanatos de calcio es una estrategia prometedora ya que aporta multifuncionalidad al permitir la incorporación de distintos iones, para así mejorar tanto la bioactividad como la capacidad antibacteriana, siendo el galio, al igual que la plata, un candidato ideal debido a sus características ya mencionadas.

Yamaguchi y colaboradores [75] consiguieron incorporar galio sobre superficies de titanio por medio de la formación de titanatos de calcio con galio siguiendo un proceso termoquímico similar al utilizado para adición de plata [74]. En este caso el tratamiento alcalino es el mismo (inmersión 24h en una solución 5M de NaOH), donde se genera la capa de titanato de sodio hidrogenado, a continuación, se realiza una inmersión en una solución mixta de CaCl₂ 100mM

y GaCl_3 xMm (donde x es un rango de 0.01 a 0.1) a 40°C durante 25h obteniendo un titanato de calcio con galio hidrogenado, que se convierte en titanato de calcio con galio al llevar a cabo el tratamiento térmico a 600°C. Finalmente se realiza el tratamiento en agua a 80°C durante 24h para generar la superficie deficiente el calcio y favorecer el intercambio iónico. El estudio concluye con la formación de apatita tras inmersión en SBF durante 3 día y actividad antibacteriana contra *Acinetobacter baumannii* [75].

Wadge y colaboradores [228], también consiguieron generar superficies con titanato de galio a través de reacciones hidrotermales de intercambio iónico. Los autores realizaron el mismo tratamiento alcalino que en los tratamientos convencionales (solución de NaOH 5M 24h), posteriormente incorporaron el galio sumergiendo las muestras en una solución 4 mM de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ a 60°C 24h. Finalmente llevaron a cabo un tratamiento térmico muy similar al convencional (calentando a 700°C en lugar de 600°C). Los resultados indicaron liberación de galio a 168h en el medio de cultivo celular DMEM (dulbecco modified Eagles minimal essential medium) y deposición de fosfatos de calcio sobre la superficie de las muestras tras 24h. Sin embargo, no se observó efecto antibacteriano sobre *S. aureus* [228].

2.4.5 Sinergia de agentes antibacterianos

Como se ha explicado anteriormente, la eficacia de un agente antibacteriano depende, entre otras cosas, de cómo interactúa éste con la célula y de su mecanismo de acción. Por lo tanto, es de esperar que el diseño de un sistema antibacteriano formado por agentes con mecanismos de acción diferentes presente una mayor actividad antibacteriana. De hecho, el concepto de sinergia antibacteriana no es algo reciente, desde hace años en farmacología ya se implementan terapias con el uso sinérgico de antibióticos para aumentar la eficacia del tratamiento [232], [233].

Evaluar el sinergismo antimicrobiano mediante ensayos in vitro es realmente complejo, siendo los mecanismos de la actividad sinérgica muchas veces desconocidos. Sin embargo, ya se han llevado a cabo diversos estudios que demuestran el efecto sinérgico de la plata junto con diferentes antibióticos y otros metales para aumentar el efecto antimicrobiano [234]–[239].

Brasil y colaboradores [236] observaron como la combinación de nanopartículas de plata (AgNps) junto con diversos antibióticos presentaba propiedades altamente antibacterianas cuando se exponía ante la bacteria *Salmonella typhimurium* catalogada como "multidrug resistance bacterium". Se demostró la sinergia entre ambos agentes antibacterianos, ya que las partículas de plata se adherían en mayor cantidad a las bacterias cuando se encontraban en presencia de tetraciclina (TE) y la liberación de iones plata se incrementaba de un 9,7% a un 18%. El mecanismo de la actividad sinérgica antibacteriana se explicó como una conjunción de sucesos que implicaban la formación de complejos entre las AgNPs y el antibiótico, el posterior enlace de los complejos a las bacterias y la liberación de iones Ag que provocaban la muerte celular.

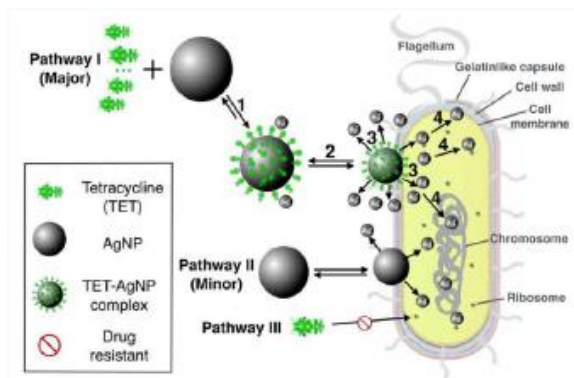


Figura 2.41 Representación esquemática del mecanismo antibacteriano del sistema TE – AgNPs [238].

Zhang y colaboradores [234] vieron como un recubrimiento de óxido de titanio TiO_2 dopado con iones Zn^{2+} y Ag^+ , fabricado mediante oxidación de micro-arco, evitaba la formación de biofilm de *S. aureus*, debido a la liberación conjunta de iones, mostrando mejores resultados que cuando éstos se liberaban por separado.

También se ha estudiado el efecto antibacteriano conjunto de Ga y Ag, por ejemplo, Valappil y colaboradores [235] evaluaron la sinergia de vidrios base fosfatos (conocidos por ser unos excelentes controladores de liberación de agentes) con Ga y Ag. En el estudio se observó la inhibición del biofilm de *Porphyromonas Gengivalis* debido a la liberación de iones Ga^{3+} y Ag^+ ,

obteniendo resultados similares que con antibióticos convencionales. El sistema Ag-Ga podría ofrecer algunas ventajas sobre los agentes terapéuticos convencionales, ya que los organismos resistentes a los antibióticos (incluso aquellos con resistencia a múltiples fármacos) probablemente sean sensibles al galio, ya que el mecanismo de éste es completamente diferente al de los medicamentos convencionales. Por otra parte, los iones de plata desestabilizan la matriz del biofilm aumentando la posibilidad de que otros iones (en este caso de galio) penetren y actúen sobre la bacteria, siendo, por lo tanto, una gran ventaja la acción sinérgica de ambos iones [235].

Dada la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos y la escasez de nuevos antibióticos en desarrollo, los sistemas de liberación conjunta de iones de Ag y Ga ofrecerían alternativas efectivas a los antibióticos o podrían complementar las terapias actuales a través del suministro controlado y localizado de iones de galio y plata en el sitio de infección.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ESQUEMA GENERAL DEL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Para el cumplimiento de los objetivos planteados, se ha llevado a cabo el proceso experimental esquematizado en el diagrama de flujo (figura 3.1). En él, se distinguen tres partes de trabajo cuyo desarrollo ha sido posible a través diferentes acciones y del empleo de diversas técnicas de caracterización.

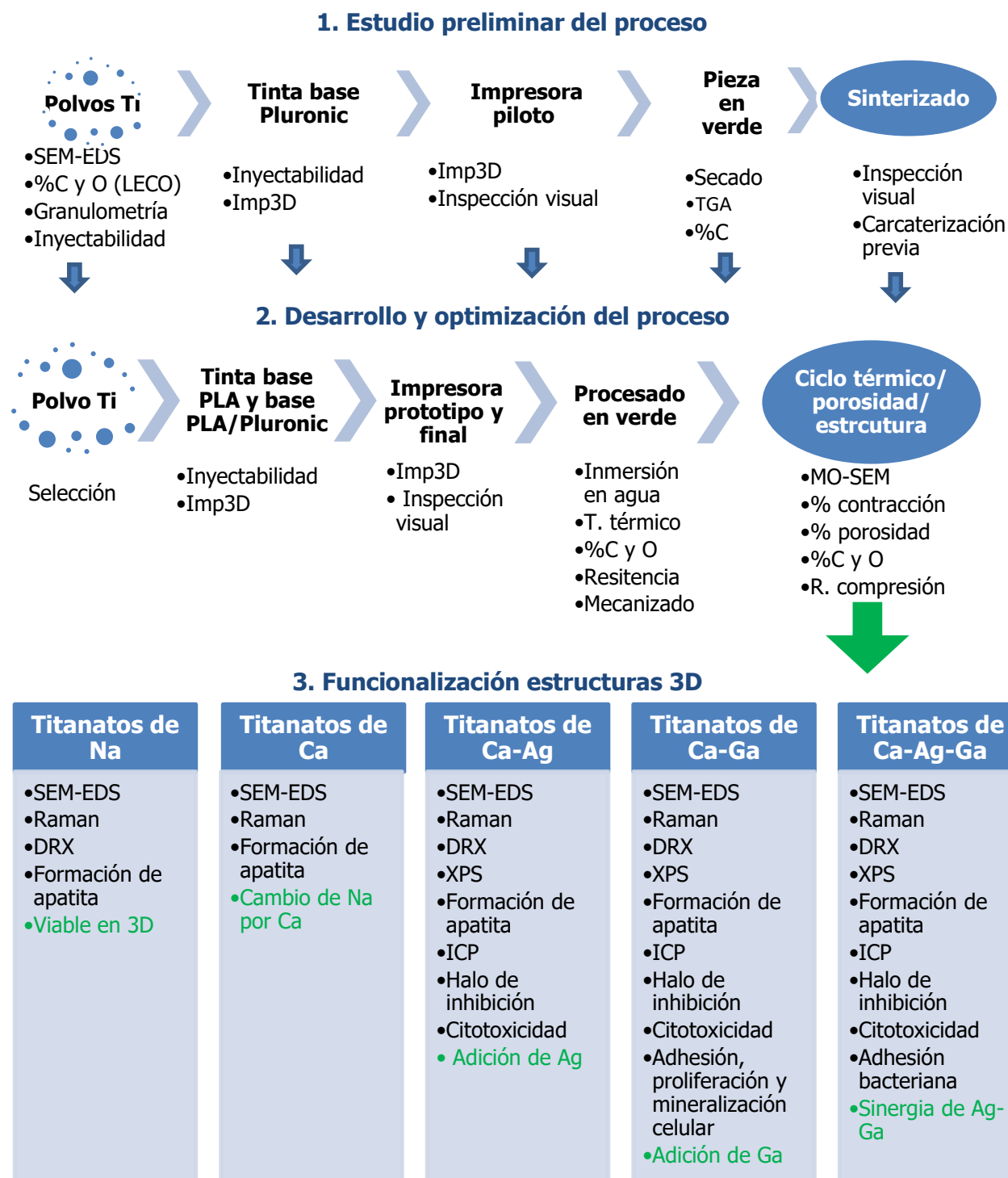


Figura 3.1 Esquema general del procedimiento experimental seguido.

Las partes 1 y 2 pertenecen al mismo bloque dedicado al desarrollo y optimización de la tecnología de extrusión 3D para fabricar estructuras porosas de titanio, mientras que la parte 3 se focaliza en la funcionalización dichas estructuras para mejorar la bioactividad y la respuesta antibacteriana.

En la primera parte se llevaron a cabo ensayos preliminares para conocer las limitaciones y requerimientos de cada una de las etapas del proceso; en la segunda, se desarrolló y optimizó el proceso de fabricación, a partir del "know how" obtenido con los ensayos y pruebas previas; en la tercera parte se aplicaron diferentes tratamientos termoquímicos para añadir iones a las muestras porosas obtenidas mediante la tecnología propuesta.

3.2 MATERIALES

A continuación, se detallan todos los materiales utilizados en la presente tesis, clasificándolos en polvos base Ti, aglutinantes o ligantes poliméricos, disolventes orgánicos y reactivos para el tratamiento termoquímico

3.2.1 Polvos base titanio

3.2.1.1 Descripción de los polvos de partida

En el capítulo 2 se describen las características del titanio y sus aleaciones, así como porque es un excelente candidato para aplicaciones biomédicas. En la siguiente tabla se recogen los polvos base titanio, utilizados en el transcurso de la tesis.

Tabla 3.1 Descripción de los polvos base Ti usados en este trabajo

ID	Proveedor	Tamaño D ₅₀ (µm)	composición	Morfología	Obtención
Ti grano fino (Ti)	Phelly Materials	44	Grado 2 ASTM F1580-12	irregular	Hidruado deshidruado
Ti grano grueso (Ti_G)	Reading Alloys	105-250	Grado 2 ASTM F1580-12	Irregular esponja	Reducido al sodio
Ti6Al4V (Ti64)	Phelly Materials	44	Grado 5 ASTM F1580-18 y B348	irregular	Hidruado deshidruado
Ti esférico (Ti_E)	Advanced powders AP&C	20-63	Grado 2 ASTM B348, ASTM F67, ASTM F1580	esférica	Atomizado por plasma

Se han considerado estos polvos para el desarrollo del estudio ya que, de esta manera, se tienen en cuenta las características más importantes y críticas la fabricación aditiva: tamaño de partícula, comparando polvo fino con grueso ; composición, Ti cp(comercialmente puro) con la aleación Ti6Al4V; y morfología irregular con esférico [115]–[117], [240], [241]. En el capítulo 4.1 se presentan los resultados de la caracterización del polvo de partida.

3.2.1.2 Equipos y técnicas para la caracterización de los polvos de partida

Caracterización microestructural

La morfología de los polvos se observó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) con el equipo Zeiss EVO MA25. También se realizó microanálisis elemental mediante espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) con el detector de EDS acoplado, modelo α -Flash 5010 de Bruker. En la figura 3.2 se muestra microscopio electrónico utilizado.



Figura 3.2 Microscopio electrónico Zeiss EVO MA25 con detector EDS α -Flash 5010 de Bruker.

Contenido de intersticiales (oxígeno y carbono)

El porcentaje de carbono se analiza en un LECO-CS 200 que detecta el carbono y el azufre por gasometría. El procedimiento experimental para el análisis del contenido en carbono se basa en pesar una masa conocida de la muestra en un crisol cerámico al que se le añaden dos aceleradores de la combustión tungsteno + estaño en una proporción 70-30%, respectivamente (denominados Alphacell[®] (W) y tin metal accelerator 20 mesh de Alpha resources Inc.). La muestra se funde en presencia de O₂ y se desprenden los gases CO (g) y CO₂ (g), cuya concentración es analizada mediante un detector de infrarrojos.

El porcentaje de oxígeno se mide con un LECO ON736, donde la muestra previamente pesada se coloca en un crisol de grafito que se calienta en un horno de impulso para liberar gases de analito. El oxígeno presente en la muestra reacciona con el crisol de grafito para formar CO y CO₂. El oxígeno se detecta como CO₂ utilizando una célula infrarroja no dispersiva (NDIR). En la figura 3.3 se muestran imágenes de los analizadores elementales utilizados para caracterizar el polvo

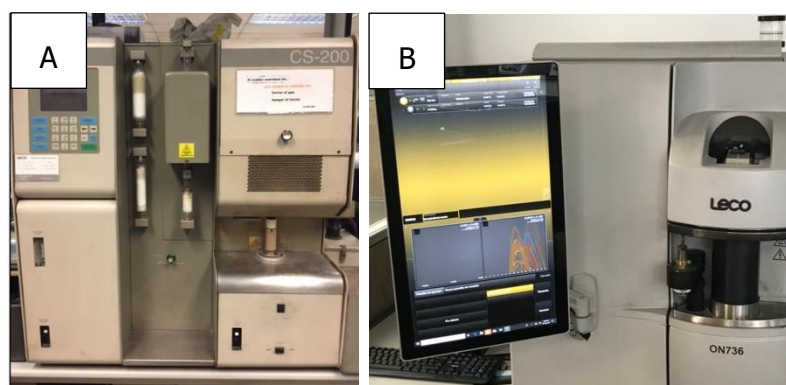


Figura 3.3 Analizador elemental: A) de carbono LECO-CS 200 y B) de oxígeno LECO ON736.

Como norma general se establecen 3 análisis por condición tanto para el %C como el %O.

Granulometría

Para conocer la distribución de tamaño de partícula y calcular el D_{90} , D_{50} y D_{10} de los polvos caracterizados, se utilizaron tres técnicas diferentes (tamizado, análisis de imagen y difracción láser) y se compararon los resultados. D_{90} , D_{50} y D_{10} son los valores más utilizados para describir la distribución de tamaño de partícula, indican el 90%, 50% y 10% de la masa acumulada; por ejemplo, si un polvo tiene un D_{10} de 20 μm querrá decir que el 10% de la masa está compuesta por partículas con un diámetro inferior a 20 μm . El D_{50} es el tamaño de partícula correspondiente al 50% de la masa y representa el tamaño medio de partícula. El D_{10} y D_{90} se utilizan como límites inferior y superior de la distribución de tamaños de un polvo.

Para el tamizado se utilizó la cribadora Retsch AS-200 digit y los tamices de <25, 25-45, 45-75, 75-100 y >100 μm . Se analizaron 1kg de cada polvo en 10 cribas de 100g y a partir de los gramos obtenidos en cada tamiz se calculó el porcentaje acumulado y los respectivos valores de D_{90} , D_{50} y D_{10} . En la figura 3.4 se muestran imágenes de los diferentes tamices y el tamizador utilizado



Figura 3.4 Cribadora Retsch AS-200 digit.

La granulometría por tamiz es de las más utilizadas debido a la rapidez y facilidad de análisis, así como el bajo coste. Sin embargo hay ciertos inconvenientes o limitaciones de la técnica

como: tamices sobrecargados o dañados, tamices ciegos (el polvo tapa el orificio del tamiz), las partículas de forma irregular pueden pasar a través de las aberturas del tamiz dependiendo de su orientación, y el efecto de las aglomeraciones [242]. Por este motivo conviene complementar el análisis con otras técnicas como análisis de imagen de partículas y difracción láser.

Para la granulometría por análisis de imagen se utilizó el microscopio electrónico Zeiss EVO MA25 para obtener micrografías a 150 de los polvos; concretamente 3 de los finos y 5 del grueso. Mediante el software de análisis de imagen ImageJ se medía la longitud máxima y mínima de las partículas (diámetro). Con los polvos finos se analizaron un total de entre 450 y 500 partículas (alrededor de 150 por foto) y con el polvo grueso 150, ya que el tamaño es mayor y hay menos partículas por imagen (alrededor de 50 por foto). Con las longitudes se representó la frecuencia de repetición para un intervalo de valores, obteniendo un histograma a partir del cual se calculó el % acumulado y los valores D_{90} , D_{50} y D_{10} .

Para la difracción laser se utilizó el equipo Beckman Coulter LS 13320 (figura 3.5) del Centro Científico y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona (CCiTUB), el cual en función del ángulo de la dispersión del láser proporciona una distribución de tamaños. En este caso se obtiene directamente la distribución en volumen y/o frecuencia con los valores D_{90} , D_{50} y D_{10} .



Figura 3.5 Equipo de difracción Beckman Coulter LS 13320 del CCiTUB.

Fluidez

La velocidad de flujo o fluidez de los polvos evaluados en la presente tesis se ha realizado de acuerdo con la norma ASTM B 213 usando el dispositivo fluidímetro de Hall para los que presentan una correcta fluidez. Por otra parte, para aquellos polvos que presentan cierta dificultad en su velocidad de flujo se usó el dispositivo llamado fluidímetro Carney de acuerdo con la norma ASTM B 417.

Ambos fluidímetros tienen las mismas dimensiones a excepción del diámetro del orificio de salida del polvo, donde el fluidímetro Hall presenta un orificio de diámetro de 2,5 mm mientras que el del fluidímetro Carney (figura 3.6) es el doble, 5mm. Este último dispositivo se utiliza para obtener una medida relativa de la fluidez de aquellos polvos metálicos que no fluyen libremente o muestran dificultades para ello.

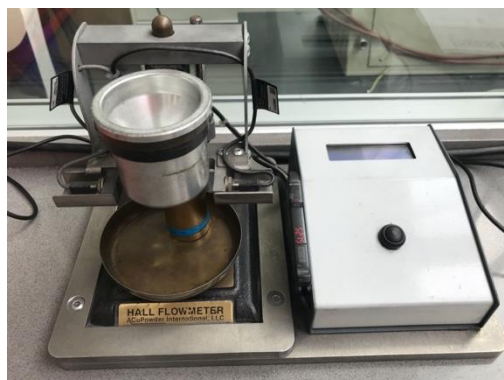


Figura 3.6 Fluidímetro Carney.

3.2.2 Aglutinantes o ligantes poliméricos

En este trabajo se formularon tintas (o pastas) compuestas por disoluciones poliméricas cargadas de polvo titanio para poder fabricar estructuras porosas mediante DIW. Como aglutinantes poliméricos se estudiaron el **Pluronic F127** (Sigma-Aldrich) o poloxamer 407, y se valoraron y caracterizaron **diferentes tipos de PLA**. En la tabla 3.2 se resumen las características de cada uno de los tipos de PLA valorados. En el apartado 2.5 del capítulo 2 se describen con mayor detalle las características y aplicaciones de los polímeros elegidos como ligante

Tabla 3.2 Descripción de los pellets de PLA usados en este trabajo.

ID	Nombre comercial	Proveedor	Densidad (g/cm ³)	T ^a fusión (°C)	Pureza estereoquímica	Humedad
PLA1	PLA pellets	ColorFabb	ND	ND	ND	ND
100L	Purasorb PL65*	Corbion	ND	170-200	≥99,9%L	ND
L175	Luminy L175	Corbion	1,24	175	≥ 99% L	≤ 400 ppm
LX175	Luminy LX175	Corbion	1,24	155	96% L	≤ 400 ppm

*grado médico

Del PLA1 se desconocen muchos datos debido a la poca información proporcionada por el proveedor. No se dispone de ficha técnica ni de seguridad, es un producto utilizado para fines lúdicos o como stock para fabricación de filamento de FDM de bajo coste. Además este tipo de PLA se suele reciclar y reutilizar varias veces [243], añadiendo aditivos y plastificantes que mejorar sus propiedades mecánicas, térmicas y ópticas [244].

El PLA 100L presenta buenos resultados en cuanto a eliminación, además cumple con la normativa para dispositivos implantables lo que indica que no contiene restos de catalizadores

como plomo, estaño o zinc [153], [245], [246]. Sin embargo, para la aplicación requerida, no es necesario que el polímero cumpla una normativa tan restrictiva ya que el objetivo final es eliminarlo.

Tanto el PLA L175 como el LX175 presentan unas propiedades de degradación térmica que permiten eliminarlos a temperaturas y tiempos adecuados, además tienen un precio bajo para poder utilizarlos en la fabricación de las tintas a nivel industrial (2,25 euros/ Kg).

3.2.3 Disolventes orgánicos

El cloroformo es un eficaz disolvente del PLA, de hecho en FDM se utiliza para atacar las piezas impresas en PLA y mejorar el acabado superficial [247]. También se ha empleado para el desarrollo de tintas en la tecnología SC-DW (solvent casting direct writing), por ejemplo Schieber y colaboradores [248], desarrollaron una tinta de PLA disuelta en cloroformo para fabricación de stents cardiovasculares.

El acetato de etilo presenta un punto de ebullición mayor y una presión de vapor menor que el cloroformo; por consiguiente, utilizando el acetato como disolvente el tiempo de conservación de las tintas podría ser mayor. En la siguiente tabla se resumen las características de los disolventes utilizados durante la tesis.

Tabla 3.3 Descripción de los disolventes orgánicos usados en este trabajo.

ID	No. CAS	Marca	Peso molecular (g/mol)	T ^a ebullición (°C)	P. vapor (hPa)	Densidad relativa (g/cm ³)	Solubilidad en agua
Acetato de etilo	141-78-6	Sigma Aldrich	88,11	76,5 - 77,5	97,3	0,90	8,7% a 20 °C
Cloroformo	67-66-3	Sigma Aldrich	119,38	60,5-61,5	210	1,492	0,8 g/100 ml a 20 °C

3.2.4 Reactivos tratamiento termoquímico

En función del tratamiento termoquímico se utilizaron diferentes reactivos, recogidos en la siguiente tabla.

Tabla 3.4 Identificación de los reactivos utilizados en el tratamiento termoquímico

ID	No. CAS	Marca	Fórmula	Peso molecular (g/mol)	Solubilidad en agua
Hidróxido de sodio	1310-73-2	Merck	NaOH	40	1.090 g/l a 20 °C
Cloruro de calcio	10043-52-4	Merck	CaCl ₂	110,98	749 g/l
Acetato de calcio	62-54-4	Merck	(CH ₃ CO ₂) ₂ Ca	158,17	soluble
Nitrato de plata	7761-88-8	Merck	AgNO ₃	169,87	ND
Nitrato de galio	69365-72-6	Merck	Ga(NO ₃) ₃	255,74	soluble

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

Materiales y métodos

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted text]

[Redacted text]

[Redacted text]

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	+	+
[Redacted]	-	+
[Redacted]	+	-
[Redacted]	-	+
[Redacted]	+	-

[Redacted text]

[Redacted text]

[Redacted text block]

[Redacted text line]

[Redacted text block]

3.3.4 Equipos y técnicas utilizados para la caracterización de las tintas

3.3.4.1 Ensayo de inyectabilidad

La inyectabilidad es una característica crítica en las tintas utilizadas en la impresión 3D y está relacionada con la reología de éstas. Se ha diseñado un ensayo que replica las condiciones de impresión, de esta manera se puede conocer la fuerza que aplica la impresora para extruir cada tinta, además de la repetitividad del proceso.

Se determinó la inyectabilidad de cada tinta mediante una máquina hidráulica de ensayos mecánicos, AG-IS SHIMADZU, con control de desplazamiento. Se fabricó un utillaje (punzón, matriz y soporte) para poder utilizar los mismos utensilios que en la impresión 3D (pistón, jeringa 3cc, y punta Nordson EFD), este se acopla a la máquina y transmite la fuerza al pistón interno de la jeringa (figura 3.9), haciendo que se extruya la tinta.

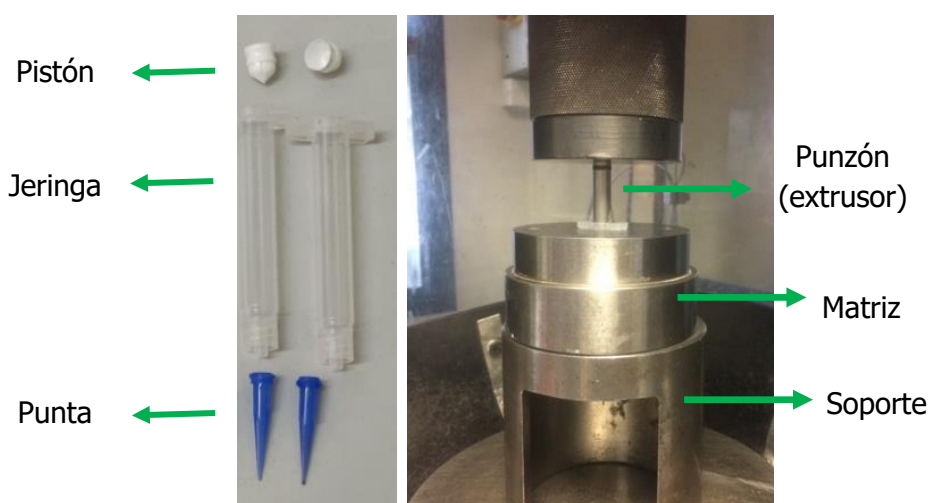


Figura 3.9 Utensilios de impresión 3D y acoplamiento del utillaje en la máquina de compresión AG-IS SHIMADZU.

A partir del diámetro de la punta y de la jeringa, y la velocidad y flujo de impresión, se calcula la velocidad que se tendrá que introducir en el programa (TRAPEZIUM2) para que la máquina se desplace (mordazas bajen). Se ha generado una hoja de cálculo en donde se introducen estos parámetros y se recalcula la velocidad del ensayo. Las condiciones estándar de impresión y, por lo tanto, de ensayo son: punta de 0,41mm, jeringa 3cc (9,5mm de diámetro), velocidad de impresión (10mm/s) y temperatura ambiente (de la sala, entre 24-30°C). Para los polvos de partículas gruesas se probaron puntas metálicas (general purpose, Nordson EFD) y cónicas (SmoothFlow, Nordson EFD) de diferentes tamaños mientras que con los polvos de granulometría fina (Ti y Ti64) únicamente se utilizaron puntas cónicas de diámetro 0,41 mm.

Tabla 3.7 Designación de las puntas dosificadoras

Puntas metálicas		Puntas cónicas	
Color	∅ (mm)	Color	∅ (mm)
Oliva	1,54	Oliva	1,60
Ámbar	1,36	Gris	1,19
Verde	0,84	Verde	0,84
Rosa	0.61	Rosa	0.58
		Azul	0,41
		Roja	0.25

Esta técnica no sigue ninguna normativa ya que las condiciones del ensayo se realizan según los parámetros de impresión. El equipo registra el desplazamiento de las mordazas en mm y la fuerza aplicada en N, obteniendo así un gráfico con las curvas de inyectabilidad (similar a uno de tensión-deformación). Como norma general, en cada ensayo (condición) se utilizan 4 jeringas diferentes, para evaluar repetitividad entre jeringas; por lo tanto, cada gráfico de inyectabilidad constará de 4 curvas. Mediante este ensayo se obtiene: la **fuerza de impresión**, que es el valor cuando la fuerza se mantiene más o menos constante, el punto donde se produce el cambio de pendiente y la curva se estabiliza y **la máxima carga**, pico máximo de fuerza en caso de haber burbujas u obstrucciones en la boquilla; y el % de inyectabilidad, que se considerará 100% o apta si extruye durante el tiempo que se tarda en imprimir una de las piezas estándar (equivalente a entre 2 y 4 mm de desplazamiento).

Estos dos parámetros resumen la información de las curvas de los gráficos de inyectabilidad (promedio de las curvas de cada gráfico): por experiencia valores superiores a 100N causan problemas como saltos de engranajes en la impresora piloto; valores inferiores a 10 N implicarían que la tinta se inyecta prácticamente sin necesidad de aplicación de carga por lo que no tendría consistencia ni sería apta para impresión. Una diferencia notable entre ambos valores es un indicativo de que en algún momento se ha producido una obstrucción considerable en la punta; y cuanto mayor sea la dispersión de resultados, menor repetitividad entre jeringas y peor será la condición.

3.3.4.2 Pruebas de impresión 3D

Para la completar la caracterización y validación de las tintas se llevaron a cabo pruebas de impresión 3D, ya que es la finalidad de estas. A pesar de presentar buenos resultados de inyectabilidad pueden surgir otros problemas en la impresión de las piezas, tales como: falta de adhesión entre capas, demasiada adhesión entre capas (se arrastra el hilo extrusor), poca consistencia estructural (en términos de viscosidad), poca consistencia mecánica (poca manipulación). Dichas pruebas se realizaron con la impresora prototipo (figura 3.12 B) y consistían en imprimir piezas estándar (figura 3.10); un cilindro poroso de 10x15mm y una estructura porosa tipo cuña (ambas >60% de porosidad) y evaluarlas mediante inspección visual.

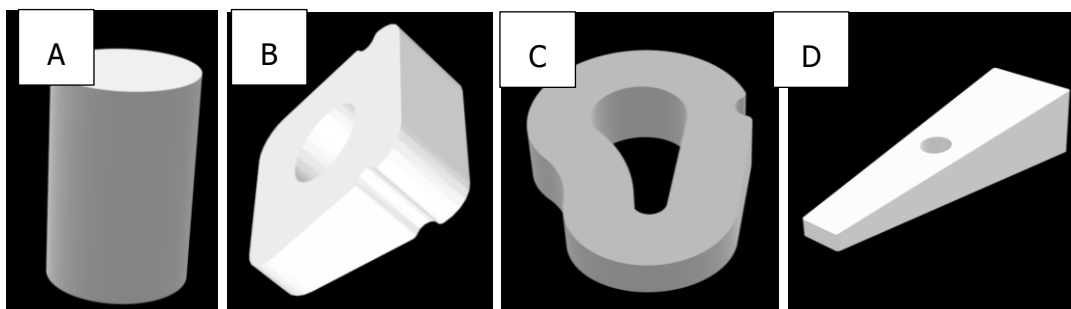


Figura 3.10 Modelos 3D de las piezas estándar para las pruebas de impresión. A) Cilindro de 10x15 mm, B) y C) cuñas para osteotomías en humano (Evans y Cotton) y D) cuña veterinaria.

3.4 IMPRESIÓN 3D, OBTENCIÓN DE PIEZAS EN VERDE

El proceso de impresión 3D desarrollado en esta tesis se basa en la fabricación aditiva en estado sólido, no directa; es decir primero se obtiene la pieza en verde mediante la impresión 3D y, a continuación, se sinteriza. Dentro de este tipo de tecnología se ha optado por la microextrusión de filamentos con carga metálica, proceso conocido como Fiber deposition (3DF) o Direct ink writing (DIW), donde las tintas o pastas se introducen en jeringas colocadas verticalmente, eje Z, y se inyectan por medio de una boquilla (ésta puede ser de distintos diámetros; desde 100 μ m hasta 1mm) para ser depositados encima de una plataforma, ejes XY.

La empresa AMES se ha caracterizado por, en la medida de lo posible, desarrollar tecnología propia, para así tener el *know how* del proceso y mayor control de la fabricación. Se ha decidido apostar por esta técnica de impresión 3D ya que la introducción en la línea de producción es más sencilla. Además, el coste de máquina y de proceso es muy inferior al de otras técnicas como Laser Powder Bed Fusion (LPBF), Electron Beam Melting (EBM), o Binder Jetting (BJ). En cuanto al material de partida; también es más económico, ya que el tratarse de una tecnología de deposición y no de lecho de polvo, los requerimientos de este son menores, debido que no es necesario que fluya y se disperse bien. En comparación con la extrusión de filamento fundido (FFF) con las tintas no es necesario fundir, no hay problemas por desgaste del material y proceso de preparación es mucho más sencillo y económico.

El objetivo de este apartado era fabricar una impresora de extrusión 3D que se adecuara a las características de la tinta formulada. Para conseguirlo se comenzó realizando pruebas preliminares con la impresora BCN3D+ dual paste extruder, para identificar los requerimientos principales del equipo y proceso. Una vez hecho, se mandó a fabricar la impresora prototipo, la cual fue testada para identificar y corregir los posibles errores hasta obtener la impresora final.

3.4.1 Pruebas previas con la impresora piloto

La impresora piloto era la BCN3D+ dual paste extruder, que no es más que una modificación (realizada por la fundació CIM) de la impresora comercial BCN3D+ (de BCN3D technologies) basada en deposición de filamento fundido (figura 3.11).

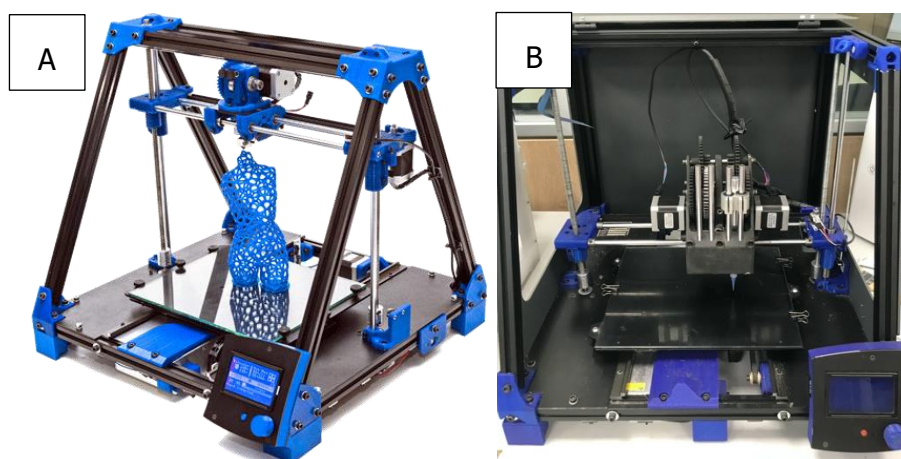


Figura 3.11 Impresoras 3D A) BCN 3D+ y B) dual paste extruder.

Tabla 3.8 Principales componentes de la impresora prototipo.

Elemento/pieza
Estructura (chasis) de la impresora.
Plataforma de impresión.
Panel de mando o <i>display</i> .
Conjunto extrusor.
Motor del conjunto extrusor.
Barras guía del conjunto extrusor sobre las cuales se desliza el pistón.
Pistón que transmite la fuerza al émbolo que hay en el interior de la jeringa
Fuente de alimentación.
Correas y poleas para transmitir el movimiento (utilizado en ejes X y Y).
Barras/guías de desplazamiento (flecha amarilla representa eje Z, verde el eje X y roja el eje Y).
Adaptador tarjeta SD.
Finales de carrera (ejes X y Z).
Tornillo sin fin de regulación/calibración manual del eje Z.

La carga de las jeringas y preparación de la impresión 3D se realiza siguiendo estos pasos:

1. Con una espátula se introduce la tinta la jeringa de 3 ml (Nordson EFD), hasta llenar aproximadamente tres cuartas partes de su capacidad
2. Se inserta el émbolo (Nordson EFD) y el pistón extrusor dentro de la jeringa. Se enrosca la punta cónica (Nordson EFD) con orificio interno de salida de 410 μm (punta azul) en la abertura de salida de la jeringa.
3. La jeringa ensamblada se coloca en el conjunto extrusor asegurando que los dientes del engranaje del tren reductor y del pistón estén alineados y engranados. Se enrosca los 3 tornillos para fijar firmemente el conjunto extrusor.
4. Se ajusta la distancia entre la punta de la boquilla y la plataforma de impresión, o sustrato. Si esta distancia no es la adecuada, no hay un buen asentamiento del filamento extruido, por lo que se debe calibrar manualmente mediante el tornillo de calibración del eje Z.
5. Se sitúa el conjunto extrusor en la posición de origen seleccionando *Autohome*. Se extruye la tinta a través de la boquilla, para confirmar que no haya aire dentro de la

boquilla o que esté obstruida (seleccionar: *Prepare > Move axis > Move 0.1mm > Extruder*).

Una vez finalizadas las etapas de carga de la tinta, ajuste y comprobación, la impresora se encuentra lista para imprimir (figura 3.12). Una vez finalizada la impresión no es necesario volver a realizar todos los pasos, únicamente retirar la muestra y seleccionar *Autohome*.

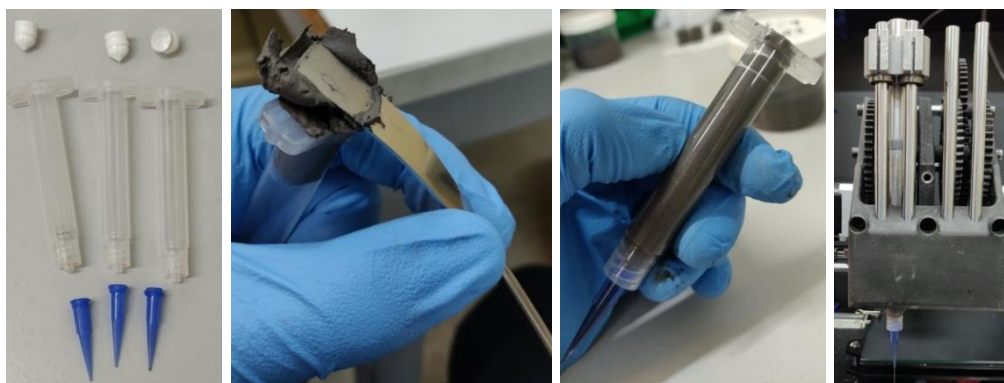


Figura 3.12 Descripción gráfica de la carga de jeringas y preparación de la impresora.

Los diseños y modelos 3D se realizaron con el software de diseño asistido por computadora (CAD) SolidWorks. Los archivos generados se guardan en formato .stl y mediante el software Slic3r se procesan (se introducen los parámetros de impresión) para obtener el gcode, en donde se almacena la secuencia de código que describe los puntos en el espacio tridimensional que trazará el extrusor para imprimir la pieza (figura 3.13). La placa electrónica reconoce y ejecuta la secuencia de código implementada en estos archivos .gcode

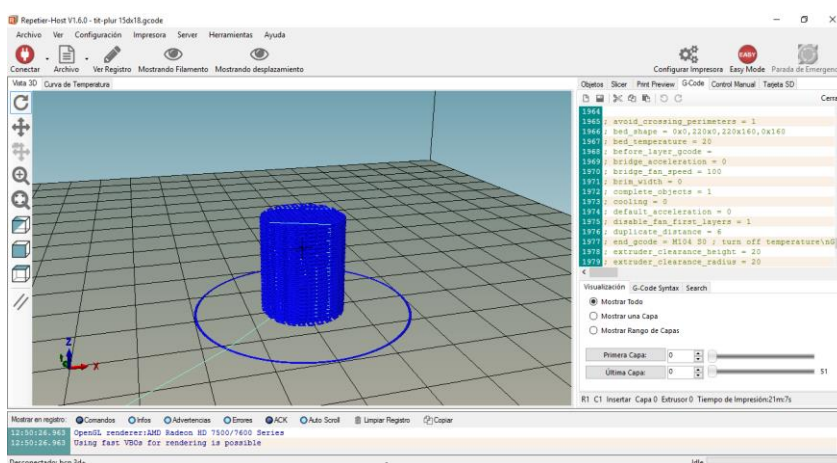


Figura 3.13 Ejemplo de preparación de los parámetros de impresión.

El estudio con las pruebas de impresión se dividía principalmente en tres partes: el equipo, ajustes, modificaciones y rediseño de componentes mecánicos; parámetros, optimización del gcode; y condiciones de impresión, básicamente influencia de la temperatura y % humedad.

3.4.2 Pruebas impresora prototipo

A partir de la información recogida con la impresora inicial (BCN3D+ dual paste extruder), se trabajó conjuntamente con CIM UPC para diseñar y fabricar un prototipo industrial de impresora 3D de extrusión de pastas (figura 3.14). En el anexo 2 se detallan las características de la impresora y las mejoras obtenidas respecto a la preliminar.

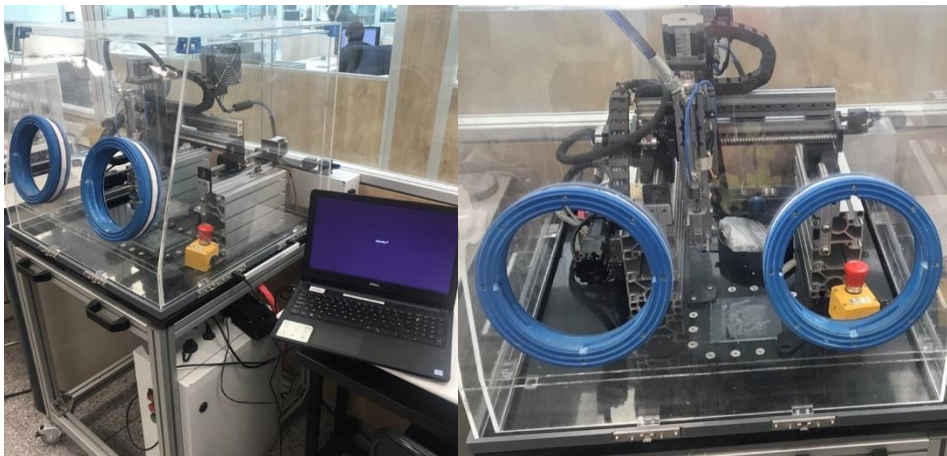


Figura 3.14 Impresora 3D prototipo.

Sobre la impresora prototipo se llevaron a cabo diversas pruebas de impresión, para valorar y evaluar el estado del equipo y el proceso. De igual forma que con la BCN3D+ dual paste extruder, durante las pruebas se fueron detectando fallos, posibles mejoras y/o nuevos requerimientos, y algunos de estos se podían solucionar o aplicar realizando algún pequeño ajuste o modificación.

A nivel general la metodología de impresión 3D sigue siendo prácticamente la misma y la mayoría de procesos iguales a los descritos en el apartado anterior; como la carga de jeringas, y la preparación de la impresión. Sin embargo, la impresora prototipo tiene la posibilidad de ser controlada y monitorizada in situ vía Ethernet con el ordenador.

Desde la aplicación se pueden generar funciones (macros), que no son más que cortas líneas de código (en lenguaje de programación G) que se pueden ejecutar directamente; aprovechando esto, se fueron creando diferentes macros en función de las necesidades que se iban observando, para así facilitar el uso de la impresora. Por otra parte, hay funciones ya instaladas dentro de la aplicación, no son macros, son como botones de acceso rápido para aquellas acciones básicas que se utilizan con frecuencia antes (mover los ejes y extruir) y durante la impresión (modificar flujo y velocidad). Si una función creada es muy necesaria, como por ejemplo extruir menos cantidad de la preestablecida, se puede pedir de incorporar como una función preinstalada. Algunas de estas funciones son muy generales para el 3D y se han modificado para adaptarlas a las necesidades del tipo de equipo e impresión. En cuanto a modificaciones sobre el equipo, al tratarse de un prototipo prácticamente no se han realizado cambios en el diseño o modificaciones sobre las piezas. Únicamente se realizaron modificaciones necesarias para el funcionamiento del equipo, sencillas de aplicar y que no interfieran o modifiquen el diseño de la impresora final.

El proceso de generación del gcode sigue siendo el mismo (mediante el software slic3r); sin embargo, ciertos parámetros de la configuración ya no eran válidos y/o generaban problemas, por lo que se tuvo que modificar y optimizar el código para este equipo.

3.4.3 Equipos y técnicas utilizados para la caracterización de la impresión 3D

En este apartado no se ha realizado la caracterización típica con ensayos estandarizados; la evaluación del equipo y proceso se ha llevado a cabo mediante prueba y error, imprimiendo piezas estándar (figura 3.10) y en algún caso concreto realizando ensayos mecánicos a compresión.

3.4.3.1 Pruebas de impresión 3D

Las pruebas de impresión 3D consistían en imprimir piezas estándar como un cilindro poroso de 10x15mm y estructuras porosas tipo cuña (figura 3.10) y valorar la impresión mediante inspección visual. No solo se analizaba la calidad y el acabado de la pieza sino también el comportamiento durante la extrusión; si había sido constante, o se habían producido fallos durante la impresión.

3.4.3.2 Ensayos mecánicos a compresión de cilindros impresos (en verde)

Las piezas cilíndricas también se pudieron comparar mediante ensayos mecánicos a compresión. Se seleccionaron y rompieron a compresión 10 cilindros impresos (en verde) con cada impresora (piloto y prototipo), obteniendo la carga máxima a rotura. De esta manera es posible valorar la influencia del aspecto (defectos de forma) en la resistencia a compresión de la pieza. En el apartado de procesado en verde se entrará en más detalle en la caracterización de la resistencia en verde, en este caso solo se pretende obtener la carga máxima para comparar y evaluar mejor las piezas impresas con una u otra impresora.

3.5 PROCESADO PIEZAS EN VERDE

La etapa principal y crítica del procesado en verde es la eliminación del ligante, se ha de realizar sin contaminar ni distorsionar la pieza. Sin embargo, tal y como se ha ido comentando, para conocer realmente las limitaciones e inconvenientes de un proceso novedoso es necesario llevarlo a cabo y valorar el resultado; de esta manera se puede evaluar mejor el grado de importancia de un problema y/o detectar alguno no previsto. Por lo tanto, primero se procesaron piezas impresas con la tinta preliminar y luego se optimizaron las etapas con la tinta final.

3.5.1 Estudios previos con la tinta preliminar base Pluronic.

Se procesaron las piezas estándar (figura 3.10) fabricadas durante las pruebas de impresión con la tinta base Pluronic. Por las características de la tinta y de las piezas obtenidas, las únicas etapas del procesado en verde eran el secado y la eliminación del ligante.

3.5.1.1 Secado de las piezas

Tras la impresión, las piezas presentaban la consistencia de un hidrogel y era necesario esperar cierto tiempo hasta poder manipularlas sin deformarlas. A esto se le llamó etapa de secado y en un principio no se le dio mayor importancia, ya que se estableció como protocolo dejar toda pieza impresa overnight.

Al principio no se detectaron problemas con los cilindros; sin embargo, en muestras tipo cuña, especialmente en las de veterinaria (más alargadas) se observaron grandes distorsiones (pandeo) durante el secado, quedando en evidencia la necesidad de controlar este proceso. Se estudiaron diferentes factores (detallados en la tabla 3.9) para conocer su influencia sobre el secado y poder implementar un proceso de evite las distorsiones.

Tabla 3.9 Parámetros y condiciones que pueden afectar en la distorsión durante el secado.

Parámetros	Condiciones	Observaciones
Temperatura	Frio	En nevera a 10°C
	Ambiente	En la misma zona de impresión
	calor	En estufa entre 40 y 50°C
Porosidad	estándar	Entre 50 y 60%
	Alta	80%
Diseño	Cuñas estándar	Sin modificar el diseño
	Cuñas sobredimensionadas en Z	Añadiendo un 20% más de altura
Impresión 3D	estándar	Sin modificaciones
	Con soporte	Se añade una estructura entre el plato y la pieza

3.5.1.2 Eliminación térmica del ligante

Se estudió del comportamiento térmico del polvo de Pluronic, que es ligante polimérico de la tinta preliminar. La caracterización se llevó a cabo mediante análisis termogravimétricos con las siguientes líneas base:

- Calentamiento hasta 520°C a 5°C/min.
- Calentamiento hasta 300°C a 30°/min e isoterma 4 horas.

El objetivo era comprobar el efecto de la temperatura y el tiempo en la degradación del polímero para así diseñar un perfil de eliminación adecuado. A partir de la información obtenida del TGA se decidió replicar el tratamiento isotérmico a 300°C a escala laboratorio con muestras impresas (termogravimetría) y aumentando los tiempos (12, 24 y 72 horas). Para validar el proceso de eliminación se midió el porcentaje de carbono mediante un analizador elemental por combustión LECO SC832, asegurando obtener valores dentro de la norma ISO 5832-:1999 y ASTM F67-06.

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]	
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]

[Redacted]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

3.5.3 Equipos y técnicas de caracterización utilizados con las piezas en verde

3.5.3.1 Ensayo de inmersión en agua

Este proceso sirvió para evaluar el efecto del agua en la eliminación de parte del ligante en la tinta final. Consistía en sumergir muestras en agua (figura 3.16) bajo diferentes condiciones, sacar cada determinado tiempo, dejar secar overnight y calcular la pérdida de masa. La pérdida de masa debida al tratamiento en agua (Δ_{mh}) se calculaba según la ecuación:

$$(P_0 - P_{h+12}) - (P_0 - P_{12})$$

Donde P_0 es el peso justo después de la impresión, P_{h+12} es el peso tras el tratamiento en agua y overnight secando (12 horas) y P_{12} es la muestra sin tratamiento, únicamente secando.



Figura 3.16 Tratamiento de eliminación en agua sobre cilindros porosos.

Para conocer con mayor exactitud cuál es la composición de las muestras antes de llevar a cabo la inmersión en agua se midió la pérdida de masa (por evaporación de disolvente) desde que se prepara la tinta hasta que acaba una impresión estándar (5-15 min). Se consideró adecuado analizar 3 muestras por condición.

3.5.3.2 Análisis termogravimétrico (TGA)

Para conocer el comportamiento térmico de las piezas en verde obtenidas a partir de las diferentes tintas desarrolladas (base Pluronic, base PLA y mezcla) se utilizó un equipo de Análisis Térmico Simultáneo (STA) modelo 409 PC Netzsch (figura 3.17) con el fin de obtener el TGA (análisis termogravimétrico) correspondiente a cada tinta. También se utilizó este equipo para evaluar la influencia de la etapa de inmersión en agua en la eliminación total del ligante, realizando un TGA a muestras (impresas con la tinta final) con y sin dicha etapa. En la tabla 3.13 se detallan las condiciones usadas para un ciclo de calentamiento normal hasta 520°C y otro con isoterma a 300°C.



Figura 3.17 Equipo de Análisis Térmico Simultáneo (STA) modelo 409 PC Netzsch.

Tabla 3.13 Parámetros usados en el análisis térmico de descomposición.

Parámetros de la línea base		
	Ciclo normal	Isoterma 4 horas
Rango de temperaturas (°C)	520	300
Velocidad de calentamiento (°C/min)	5	30
Atmósfera del ensayo	aire	aire
Masa ensayada (mg)	5,0	5,0
Tipo de crisoles usados	Al ₂ O ₃ (40 µl)	Al ₂ O ₃ (40 µl)

3.5.3.3 Termogravimetría (escala laboratorio)

Este ensayo consiste en replicar el modelo del análisis termogravimétrico (TGA) pero en una escala más real (laboratorio); es decir medir la pérdida de masa que se produce para un ciclo térmico (temperatura y tiempo). Como se puede ver en la tabla 3.8 con el TGA únicamente se puede analizar muestras de miligramos, mientras que con la termogravimetría se analiza la muestra entera (figura 3.18).

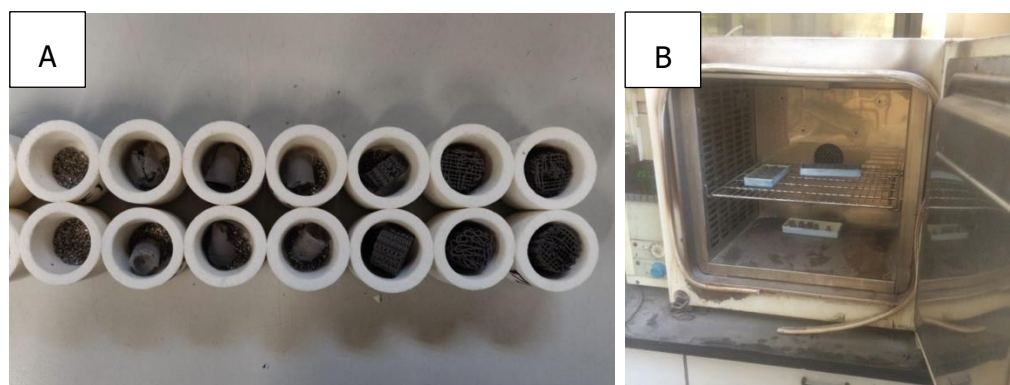


Figura 3.18 A) Preparación de muestras y B) estufa Heraeus Instrument 1000 para la termogravimetría.

Para la correcta manipulación de las muestras estas se colocaban en crisoles, previamente tarados; a continuación, se introducían en la estufa, y cada determinado tiempo se extraían, dejaban enfriar y pesaban. Con el peso de antes y después de introducir los crisoles en la estufa se calculaba la pérdida de masa del tratamiento. A modo control se introducían crisoles vacíos y con polvo de Ti. Como en la mayoría de ensayos se consideró suficiente con analizar 3 muestras por condición.

3.5.3.4 Contenido intersticiales (oxígeno y carbono)

El porcentaje de carbono se analizó en un LECO-CS 200 (figura 3.3 A) que detecta el carbono y el azufre por gasometría y el porcentaje de oxígeno se midió con un LECO ON736 (figura 3.3 B). Como norma general, para medir el contenido de intersticiales (%O y %C) siempre se realizan 3 análisis por muestra y 3 muestras por condición. En este caso se analizaron tanto muestras en verde como polvo de Ti a modo control.

3.5.3.5 Resistencia en verde

Flexión a 3 puntos

Hay muy poca información sobre las propiedades en verde de piezas metálicas impresas en 3D y menos aún de la posibilidad de mecanizarlas. De ser posible, el mecanizado en verde sería una etapa que aportaría gran valor añadido al proceso desarrollado en la tesis. Para valorar la posibilidad de mecanizar primero es necesario conocer la resistencia de las piezas en verde.

Históricamente, la resistencia en verde ha sido evaluada mediante ensayos de flexión a 3 o 4 puntos, en los ensayos de tracción de materiales elásticos las tensiones no deseadas de los dispositivos de agarre evitan mediciones precisas. La compresión diametral ha ganado popularidad debido a la simplicidad de preparación de las piezas. Sin embargo, finalmente se decidió caracterizar las piezas mediante flexión a 3 puntos, ya que los valores que se obtienen son ligeramente más altos que con otras las otras técnicas [257]. Además, así es posible utilizar como guía el procedimiento de establecido en AMES (num.8.0.10 determinación resistencia en verde de polvos, similar a las normas ASTM B 312-82 y ISO 2739).

La resistencia en verde se determinó mediante ensayo de flexión a 3 puntos sobre 10 probetas macizas de 31x12mm de base y 6 mm de altura. La caracterización se realizó, con la máquina universal de ensayo mecánicos AG-IS SHIMADZU 100 kN (figura 3.19).

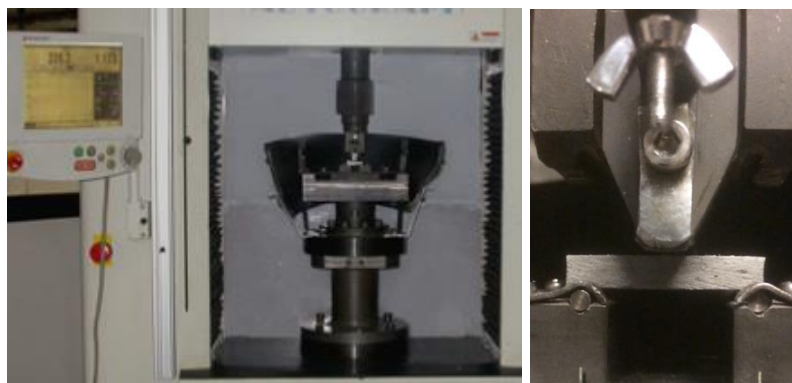


Figura 3.19 Equipo de ensayos mecánicos (AG-IS SHIMADZU 100 kN) adaptado con el utillaje para el ensayo flexión a 3 puntos.

En la empresa (AMES), para determinar la resistencia en verde de un polvo se fabrican (prensan) entre 3 y 5 probetas; en este caso al no disponer de muestras de referencia fabricadas con la misma tecnología para comparar, se decidió fabricar y ensayar el doble (10 probetas).

Compresión

De manera complementaria se llevó a cabo una caracterización de la resistencia en verde a compresión. La caracterización se realizó, con la máquina universal de ensayos mecánicos AG-IS SHIMADZU 100 kN, sobre 4 cilindros macizos y porosos ($\sim 70\%$) de 10 mm de diámetro y 15 mm de altura, fabricados con la tinta preliminar base Pluronic y la tinta final (figura 3.20). El objetivo principal del estudio no es la comparación entre tintas, lo que se pretende es obtener valores y asociarlos a una muestras manipulables y no manipulables. La caracterización se realizó con la máquina universal de ensayo mecánicos AG-IS SHIMADZU 100 kN, sobre cilindros y cubos porosos acorde a las dimensiones establecidas por la norma.

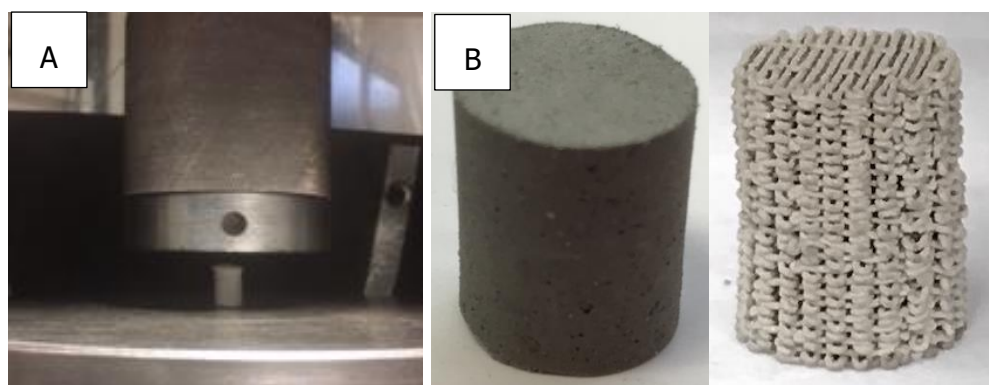


Figura 3.20 A) Equipo de ensayos mecánicos (AG-IS SHIMADZU 100 kN) adaptado para el ensayo a compresión. B) Muestras para la caracterización mecánica a compresión.

3.5.3.6 Mecanizado en verde

Una vez comprobado que las piezas contarán con suficiente resistencia como para ser mecanizadas en verde, se realizaron pruebas de mecanizado con procesos más comunes:

Materiales y métodos

corte, desbaste, taladrado y torneado (figura 3.22). Las muestras a mecanizar se obtuvieron a partir de la tinta final. Para el corte y taladrado se utilizaron cilindros de $\varnothing 12\text{mm}$ y longitud 50mm obtenidos a partir de dejar secar la tinta final en un molde, y para el torneado se aprovecharon los cilindros resultantes del corte ($\varnothing 12\text{mm}$ y longitud $\sim 20\text{mm}$). En cuanto al desbaste, para evaluar mejor el resultado se fabricaron cubos de $15 \times 15\text{mm}$ mediante impresión 3D, ya que en este caso no solo se pretendía valorar la posibilidad de efectuar el proceso sino también la mejora del acabado superficial, es decir conseguir eliminar las líneas características de la impresión 3D (cada capa de deposición de material). De manera complementaria mediante un rugosímetro–perfilómetro MITUTOYO Sv C3200 se midió la rugosidad media (R_a) de las muestras antes y después del desbaste.



Figura 3. 21 Rugosímetro–perfilómetro MITUTOYO Sv C3200.

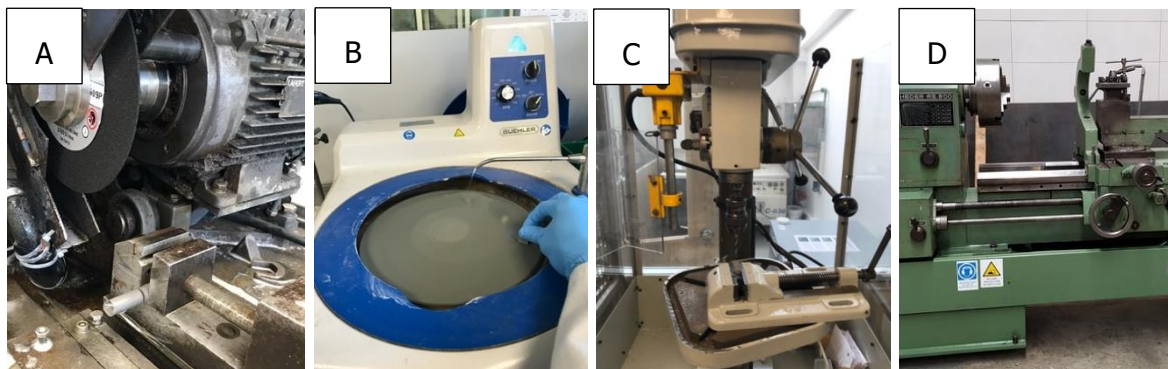


Figura 3.22 Equipos de mecanizado: A) cortadora, B) pulidora, C) taladro y D) torno.

El objetivo principal era confirmar las piezas se podían mecanizar sin romperse ni generar grietas. Se utilizaron piezas cilíndricas y macizas (en el apartado de escalado industrial se realiza sobre piezas porosas) y se llevó a cabo una caracterización del acabado por medio de inspección visual y análisis de imagen.

3.6 SINTERIZACIÓN Y ACABADO FINAL

Todas las muestras han sido sinterizadas en el horno tubular Carbolite con mufla cerámica de alúmina (Hobersal) y sistema de alto vacío ($\sim 10^{-5}$ mbar).

3.6.1 Estudios previos (con la tinta preliminar base Pluronic)

3.6.1.1 Control dimensional y acabado superficial tras el sinterizado

Uno de los problemas identificados son las distorsiones debidas a la contracción del sinterizado. En el apartado de secado de los estudios previos (anexo 1) se observó que las estructuras tipo cuña, concretamente de veterinaria tipo MMP (apartado 2.3.2.1), se distorsionan con mayor facilidad debido a su diseño, al ser alargadas y al haber menor cantidad de material en la punta esta se deforma más respecto a otras zonas. Por lo tanto, se fabricaron cuñas estándar, pero se escogió la cuña veterinaria como "Gold standard" de pieza a fabricar, dada su dificultad.

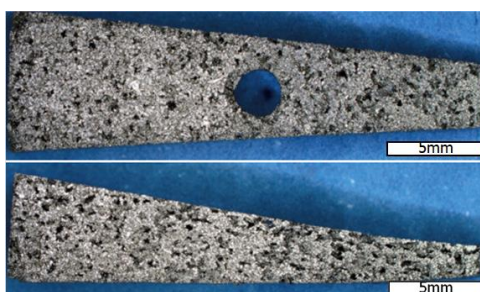


Figura 3.23 Ejemplo cuña veterinaria fabricada de OsteoSinter® (Ames Medical).

Se valoraron distintos parámetros que pudiesen influir en el sinterizado de las piezas, en cuanto a distorsión dimensional y acabado superficial (tabla 3.14).

Tabla 3.14 Parámetros que pueden influir en el acabado de las piezas sinterizadas

Parámetros	Condiciones	Observaciones
Sinterizado	1350°C 3h (normal)	Mismos parámetros OsteoSinter®
	1350°C 3h al revés	Posición contraria al secado
Porosidad	estándar	Entre 50 y 60%
	Alta	80%
Diseño	Cilindros	Piezas con más altura que base
	Cuñas estándar	Cotton, Evans, Veterinaria
	Cuñas sobredimensionadas en Z	Añadiendo un 20% más de altura
Mecanizado	Corte	En verde o después de sinterizar
	Desbaste	En verde o después de sinterizar

Materiales y métodos

El corte se realizó por medio de la cortadora de precisión Buheler Isomet4000 y el desbaste con papel abrasivo de carburo de silicio. Las muestras se evaluarán mediante inspección visual realizando fotos por medio de la lupa electrónica Olympus SZ61.

3.6.1.2 Caracterización previa

Se fabricaron cuñas veterinarias según diferentes condiciones (tabla 3.12) y se verificó el acabado final mediante inspección visual. Por otra parte; se imprimieron cilindros de 40% de porosidad (según el Gcode) y se sinterizaron a 1350°C durante 3 horas (mismo ciclo de sinterización que OsteoSinter®); a continuación, se observó su microestructura mediante microcopia electrónica de barrido (SEM), se realizaron ensayos mecánicos a compresión y se analizó el contenido de elementos intersticiales (%C y %O).

3.6.2 Estudio sobre el efecto del ciclo térmico (temperatura y tiempo)

Como se comentó en el apartado 2.5.4 del capítulo 2, la temperatura y el tiempo influyen directamente en el grado de sinterización y, en consecuencia, en las propiedades mecánicas de la pieza. Aproximadamente el 30% de los estudios encontrados en la bibliografía sinterizan el titanio puro a 1250°C [166]; por lo tanto, se decidió evaluar el sinterizado a dicha temperatura y a $\pm 100^\circ\text{C}$ (1150, 1250 y 1350°C). Según Qian y colaboradores [171], a nivel industrial el tiempo idóneo de sinterización para el titanio es de 2 horas; por lo tanto, se decidió evaluar el sinterizado al mismo tiempo y a ± 1 hora (1, 2, 3 horas). Como constantes se fijaron la velocidad, porosidad, patrón de impresión y el número de perímetros. En la tabla 3.15 se recogen los parámetros del estudio y la justificación de su elección.

Tabla 3.15 Parámetros variables y constantes del estudio sobre el ciclo térmico

Parámetro		Justificación de la elección
Variables a estudiar		
Temperatura (°C)	1350	+100°C respecto a la literatura
	1250	Según la literatura
	1150	-100°C respecto a la literatura
Tiempo (horas)	3	+1hora respecto a la literatura
	2	Según la literatura
	1	-1 hora respecto a la literatura
Constantes		
Velocidad del ciclo(°C/min)	2.5	Misma velocidad que OsteoSinter®
Porosidad del Gcode (%)	70	Máxima porosidad procesable, para valores > las muestras pierden consistencia y colapsan al procesarlas en verde
Patrón de impresión	Lineal	Patrón estándar y el más sencillo de imprimir
Número de perímetros	0	Porosidad lo más abierta e interconectada posible

Para evaluar el efecto del ciclo térmico se sinterizaron cilindros porosos estándar (tabla 3.15); se observó el tamaño de grano mediante microscopía óptica (MO) y la microestructura del sinterizado mediante microscopía electrónica (SEM), se calculó el porcentaje de contracción midiendo antes y después los cilindros, y se realizó la caracterización mecánica a compresión.

Debido a la dispersión de resultados que conlleva la sinterización del titanio en alto vacío se decidió fabricar 12 muestras por condición, sinterizadas como mínimo en dos series.

3.6.3 Estudio sobre efecto de la velocidad de calentamiento y enfriamiento

En la etapa inicial de la sinterización intervienen diferentes mecanismos, el principal es el movimiento de los átomos por difusión, fenómeno activado por la temperatura. Si se produce una difusión superficial no hay aproximación entre partículas, la masa parte de la superficie y se coloca en la superficie; esto se conoce como transporte superficial (figura 3.24 A) y no produce contracción. Si por contrario hay difusión en volumen, a través de límite de grano, la masa se mueve del interior y se deposita en el cuello; esto se conoce como transporte a través de volumen (figura 3.24 B) y sí produce contracción [258].

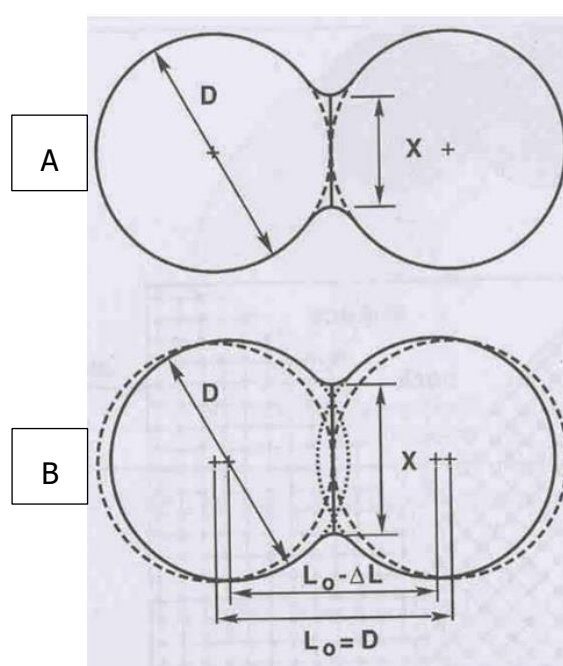


Figura 3.24 Transporte A) superficial y B) a través de volumen [258].

Con el fin de conseguir un transporte superficial y así evitar o reducir la contracción se probó de modificar la velocidad del ciclo térmico, calentando lo más rápido posible hasta la temperatura definida para, a continuación, enfriar rápidamente (tiempo 0 horas). Dado que se trata de una mufla cerámica de alúmina, no se puede calentar a más de 4°C/min. Los resultados del apartado anterior no fueron suficientes como elegir una sola temperatura; por lo tanto, se decidió proseguir el estudio con los valores extremos, descartado 1250°C. El tiempo de sinterizado se fijó en 2 horas.

En este apartado la variable del estudio fue la velocidad del ciclo (2.5°C/min y 4°C/min), y como constantes se fijaron temperatura, tiempo (2 horas si se calienta a 2,5°C/min y 0 horas si se calienta a 4°C/min) para, porosidad, patrón de impresión y el número de perímetros. En la tabla 3.16 se recogen los parámetros del estudio y la justificación de su elección

Tabla 3.16 Parámetros variables y constantes del estudio de la velocidad del ciclo térmico.

Parámetro	Justificación de la elección	
Variables a estudiar		
Velocidad del ciclo (°C/min)	2.5	Control
	4	Máxima posible
Temperatura (°C)	1350	Máxima estudiada
	1150	Mínima estudiada
Constantes		
Tiempo (horas)	0	Evitar difusión volumétrica en el ciclo de 4°C/min
	2	Estándar establecido
Porosidad del Gcode (%)	70	Máxima procesable, para valores > las muestras pierden consistencia y colapsan al procesarlas en verde
Patrón de impresión	Lineal	Patrón estándar y el más sencillo de imprimir
Número de perímetros	0	Porosidad lo más abierta e interconectada posible

Para evaluar el efecto de la velocidad del ciclo térmico se sinterizaron cilindros porosos estándar (tabla 3.16); se observó la microestructura del sinterizado mediante microscopía electrónica (SEM), se calculó el porcentaje de contracción, y se realizó la caracterización mecánica a compresión. Debido a la dispersión de resultados que conlleva la sinterización del titanio en alto vacío se decidió fabricar 12 muestras por condición, sinterizadas como mínimo en dos series.

3.6.4 Estudio sobre efecto de la porosidad

La porosidad es el parámetro más importante a tener en cuenta; de hecho, tal como se ha comentado a lo largo del capítulo 2, el poder controlarla y diseñarla es uno de los principales motivos de valorar la fabricación aditiva. Es necesario que la estructura obtenida tenga suficiente porosidad interconectada y tamaños de poro adecuados para promover la actividad biológica (la infiltración y migración celular, la vascularización, el flujo de nutrientes y oxígeno, etc...) sin comprometer las propiedades mecánicas y así poder soportar las cargas externas [258]. Por lo tanto, en este estudio se decidió evaluar el sinterizado de muestras con diferentes porcentajes de porosidad (50, 60 y 70 predefinidos y establecidos en el Gcode), teniendo como referencia OsteoSinter® que tiene alrededor de un 60% de porosidad. Se decidió continuar el estudio con los valores extremos de temperatura (1150 y 1350°C) y valorar si es posible reducir la temperatura de sinterización ajustando la porosidad. En cuanto al tiempo de sinterización, se decidió fijar en 2 horas ya que, según Qian y colaboradores [171], a nivel industrial es el tiempo idóneo de sinterización. Como constantes se fijaron tiempo, velocidad, patrón de impresión y el número de perímetros. En la tabla 3.17 se resumen los parámetros del estudio y la justificación de su elección.

Tabla 3.17 Parámetros variables y constantes del estudio de la porosidad

Parámetro	Justificación de la elección	
Variables a estudiar		
Porosidad predefinida en el Gcode (%)	50	Baja, menor porosidad que OsteoSinter®
	60	Similar a OsteoSinter®
	70	Alta, menor porosidad que OsteoSinter® y máxima posible
Temperatura (°C)	1350	Máxima estudiada
	1150	Mínima estudiada
Constantes		
Tiempo (horas)	2	Según la literatura
Velocidad del ciclo (°C/min)	2.5	Misma velocidad que OsteoSinter®
Patrón de impresión	Lineal	Patrón estándar y el más sencillo de imprimir
Número de perímetros	0	Porosidad lo más abierta e interconectada posible

Antes de proceder a valorar el efecto de la porosidad se caracterizó y cuantificó la porosidad real de las muestras tras el sinterizado. Se utilizaron diferentes métodos descritos en el apartado 3.6.6

Para evaluar el efecto de la porosidad se sinterizaron cilindros porosos estándar (tabla 3.17); se calculó el porcentaje de contracción, y se realizó la caracterización mecánica a compresión. Además, se llevó a cabo un análisis del contenido de oxígeno y carbono por medio de los analizadores elementales LECO. Debido a la dispersión de resultados que conlleva la sinterización del titanio en alto vacío se decidió fabricar 12 muestras por condición, sinterizadas como mínimo en dos series.

3.6.5 Estudio sobre el efecto de la estructura (patrón de impresión)

Algunos materiales de titanio poroso pueden comportarse de manera frágil debido a la estructura de poros desfavorable [259]. Por lo tanto, no solo es importante estudiar y optimizar el porcentaje de porosidad, también se tendrá que evaluar la estructura (el patrón de impresión). Una de las principales ventajas de la fabricación aditiva precisamente es la libertad y facilidad que ofrece en el diseño de la estructura porosa mediante el patrón de impresión. Se han reportado diversos estudios de la influencia del tipo de porosidad o estructura en piezas obtenidas mediante fabricación aditiva [260]–[267]. En este caso se decidió evaluar dos tipos de estructuras: la lineal, que es la estructura estándar que viene por defecto en el software de impresión 3D; y la honeycomb (HC), que es una de las estructuras más estudiadas en materiales porosos [268]. Se ha reportado la importancia del tipo de porosidad en la anisotropía de propiedades mecánicas [269]; por lo tanto, se fabricaron cubos, en lugar de cilindros, para poder evaluar las propiedades mecánicas a compresión aplicando la carga paralela (II) o perpendicular (\perp) a la dirección del patrón de impresión. En la figura 3.25 se presentan ejemplos de las muestras ensayadas.

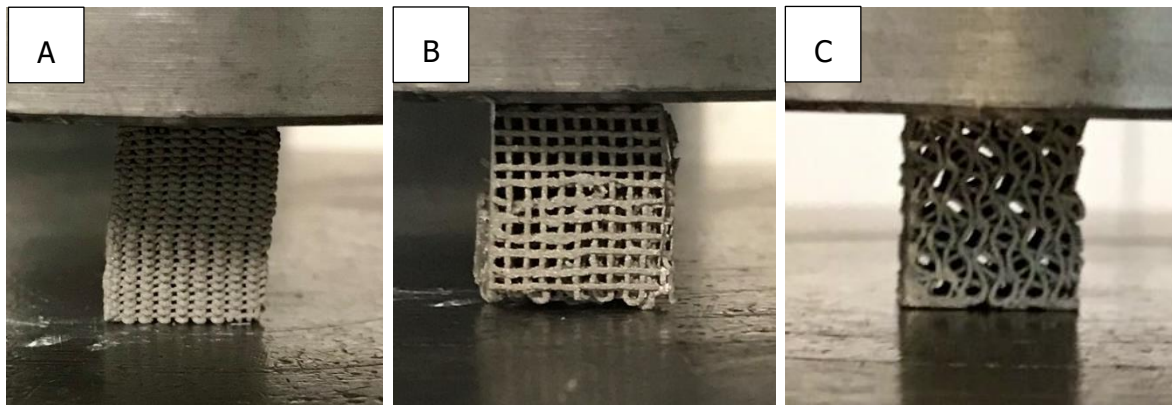


Figura 3.25 Ejemplos de muestras cúbicas para el ensayo de compresión. A) Aplicación de la carga paralela a la dirección de impresión. Aplicación de la carga perpendicular al patrón de impresión B) Lineal y C) Honeycomb.

Se mantuvieron las mismas porosidades que en el estudio anterior (50, 60 y 70% predefinida en el Gcode), para comprobar si al cambiar de estructura es posible aumentar el porcentaje. Como constantes se fijaron temperatura (1150°C, mínima), tiempo, velocidad, y el número de perímetros. En la tabla 3.18 se resumen los parámetros del estudio de la estructura y la justificación de su elección

Tabla 3.18 Parámetros variables y constantes del estudio de la estructura

Parámetro	Justificación de la elección	
Variables a estudiar		
Porosidad predefinida en el Gcode (%)	50	Baja, menor porosidad que OsteoSinter®
	60	Similar a OsteoSinter®
	70	Alta, menor porosidad que OsteoSinter® y máxima posible
Patrón de impresión	Lineal	Patrón estándar y el más sencillo de imprimir
	HC	Una de las estructuras más estudiadas en porosos
Carga respecto a la impresión	II	Aplicación de cargas normal
	⊥	Evaluar la anisotropía
Constantes		
Temperatura (°C)	1150	
Tiempo (horas)	2	Según la literatura
Velocidad del ciclo (°C/min)	2.5	Misma velocidad que OsteoSinter®
Número de perímetros	0	Porosidad lo más abierta e interconectada posible

En el apartado 2.3 se describieron los tipos de implantes a fabricar, entre ellos se puede ver como algunos son completamente porosos; sin embargo, otros presentan zonas selectivas sin porosidad abierta. Esto es debido a requerimientos especiales como los siguientes:

- Mecánicos: reforzar el implante según la aplicación de cargas previstas
- biológicos favorecer zonas preferentes de osteointegración o evitarlas
- quirúrgicos: facilitar el uso de instrumentos concretos para la técnica o para el implante. Permitir la posibilidad de añadir una placa de fijación primaria.
- Otros: reducir el coeficiente de fricción en una zona concreta para evitar rozadoras con tejidos blandos como tendones y ligamentos.

A diferencia de las tecnologías convencionales, la fabricación aditiva sí que permite fabricar piezas con porosidad selectiva. En el caso de los tipos de implantes a fabricar (apartado 2.3) requieren porosidad abierta (osteointegración) principalmente en las caras superior e inferior, por lo que las caras exteriores podrían ser densas, reforzando así las propiedades y evitando zonas de rozadura con tejidos blandos. Por no tanto, se llevó a cabo un estudio complementario con muestras porosas con diferente número de perímetros. Para tener más información y conocer, en cierta medida, el valor máximo de propiedades mecánicas que es posible obtener, se minimizó la porosidad (40% predefinida en el Gcode) y maximizó la temperatura (1350°C). En la tabla 3.19 se resumen los parámetros del estudio complementario sobre el efecto de perímetros y la justificación de su elección.

Tabla 3. 19 Parámetros variables y constantes del estudio sobre los perímetros.

Parámetro	Justificación de la elección
-----------	------------------------------

Variables a estudiar		
Número de perímetros	0	Porosidad lo más abierta e interconectada posible
	1	1 perímetro del tamaño del hilo de impresión
	2	Doble que la anterior condición
Constantes		
Temperatura (°C)	1150	
Tiempo (horas)	2	Según la literatura
Velocidad del ciclo (°C/min)	2.5	Misma velocidad que OsteoSinter®
Patrón de impresión	Lineal	Patrón estándar y el más sencillo de imprimir
Número de perímetros	0	Porosidad lo más abierta e interconectada posible

3.6.6 Técnicas y equipos utilizados en la caracterización de las muestras sinterizadas

3.6.6.1 Microscopia óptica (MO)

Con las muestras del estudio del ciclo térmico se llevó a cabo una preparación metalográfica de las muestras y se observaron mediante microscopia óptica (MO) con el microscopio Olympus GX51 (figura 3.26). Mediante el análisis de imagen ImageJ se pudo cuantificar la porosidad y el tamaño de grano.



Figura 3.26 Microscopio Olympus GX51

En cuanto a la preparación metalográfica, las muestras se embutieron en baquelita conductora con la embutidora BUEHLER SimpliMet 4000; se desbastaron con papel abrasivo de SiC (P800, P1200, P2500 y P4000, Struers, España) en la pulidora semiautomática EcoMet 30 BUEHLER; se pulieron con suspensión de sílice coloidal (0,5µm de tamaño de partícula, ATM GmbH, Alemania) en la pulidora automática MetaServ 250 BUEHLER; y finalmente se atacaron con reactivo Kroll.

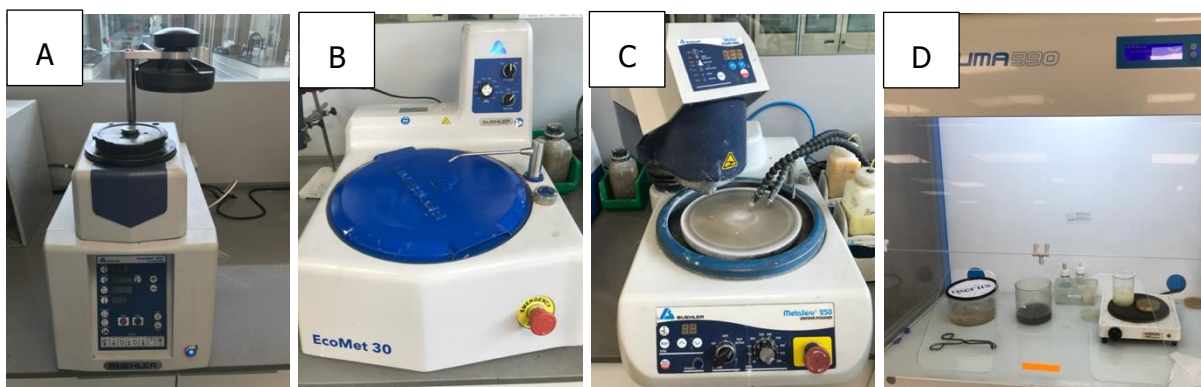


Figura 3.27 Equipos de preparación metalográfica: A) embutidora, B) equipo de desbaste semiautomático C) pulidora automática y D) campana de ataque.

3.6.6.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para caracterizar el grado de sinterización (formación de cuellos de soldadura) se observó la microestructura de las muestras de los estudios del ciclo térmico y de la velocidad del ciclo con el microscopio electrónico Zeiss EVO MA25 (figura 3.2).

3.6.6.3 Cálculo de la contracción

Para calcular la contracción tras el sinterizado se midieron, con un micrómetro digital Mitutoyo, (figura 3.28 A) todos los cilindros utilizados en los tres primeros estudios (ciclo térmico, velocidad del ciclo y efecto de la porosidad) antes y después del sinterizado. Se realizaron 6 mediciones de diámetro: 2 del superior, 2 del interior y 2 del inferior; y 3 mediciones de altura 2 por los exteriores y 1 en el interior (figura 3.28 B).

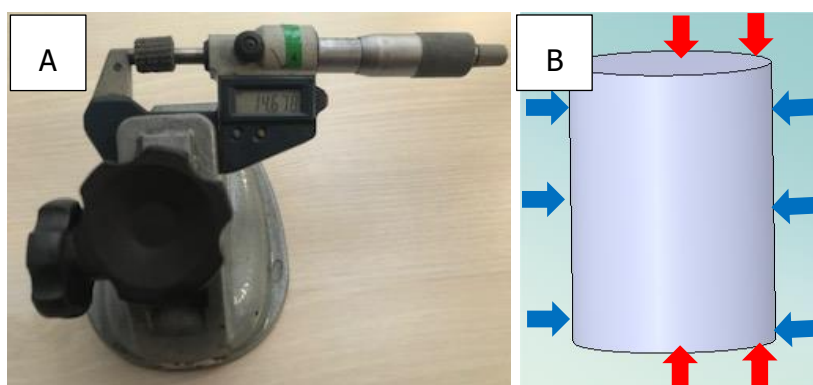


Figura 3.28 A) Micrómetro (palmer) digital Mitutoyo. B) Esquema de las mediciones.

Dado que no se trata de un ensayo destructivo se analizaron el máximo de muestras disponibles (12 cilindros porosos por condición).

3.6.6.4 Porosidad

En el estudio del efecto de la porosidad (apartado 3.6.4) se valoraron diferentes métodos y equipos de caracterización para obtener la porosidad de las muestras sinterizadas.

Método tradicional (porosidad teórica calculada)

Este es el método más rápido y sencillo para obtener la densidad de piezas porosas. Se fabricaron cilindros porosos y se midió el diámetro y altura tras el sinterizado (figura 3.28). A partir de estos valores se calculó el volumen (cm^3) y con el peso (g) se calculó la densidad (ρ en g/cm^3). Sabiendo que la densidad del macizo es $\sim 4.5 \text{ g}/\text{cm}^3$ se obtiene el porcentaje de porosidad con la siguiente fórmula: $\left(\frac{4.5-\rho}{4.5}\right) * 100$. Al tratarse de un ensayo no destructivo, sencillo y rápido se decidió utilizar un elevado número de muestras; 12 cilindros (10x15mm) y 12 discos (10x5mm) porosos.

Mediante análisis de imagen

Se realizó una preparación metalográfica, pero sin llegar a atacar a atacar las muestras, se observaron con el microscopio Olympus GX51 (figura 3.26) y se procesaron con el software Olympus Stream Essentials. En donde se seleccionaban zonas concretas de análisis o región de interés (ROI) y se diferenciaba por colores la zona de material y no material (poros); a continuación, se calculaba el porcentaje de cada color obteniendo así el porcentaje de porosidad de dicha región. No se analizó un número elevado de muestras dado que con los primeros resultados ya quedó en evidencia que la técnica no era la adecuada.

Porosimetría por intrusión de mercurio (MIP)

Este método permite la determinar la fracción de volumen total de poros, el diámetro medio de poro, y la distribución de tamaño de poro. Las muestras analizar se colocan en un penetrómetro en el cual se introduce mercurio a presión, este es forzado a pasar a través de los poros de las muestras. Cuanto más pequeño es el poro se requiere de mayor presión para rellenar el volumen de poro con mercurio; por lo tanto, con las presiones aplicadas se obtiene una distribución de la porosidad [270]. El ensayo se llevó a cabo mediante el Porosímetro AutoPore IV9500 Micrometrics (figura 3.29A) del grupo de biomateriales (BBT) de la Universidad Politécnica de Catalunya (UPC). Antes de la realización del ensayo, con la lupa electrónica Olympus SZ61 (figura 3.29B), se verificó que el tamaño de poro de las muestras cumpliera con el límite de detección del MIP.

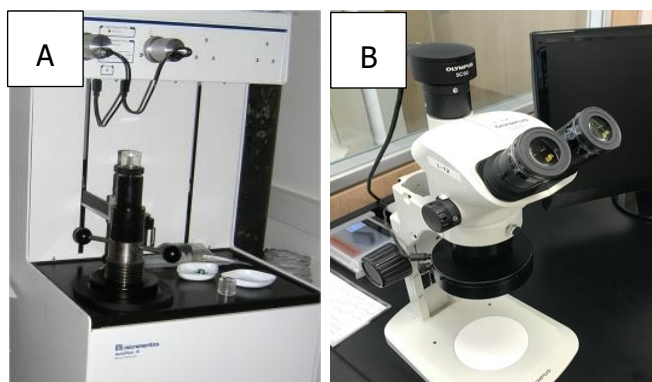


Figura 3.29 A) Porosímetro AutoPore IV9500 Micrometrics.
B) Lupa electrónica Olympus SZ61.

Al tratarse de un ensayo caro, destructivo, y bastante tóxico (utilización de mercurio) únicamente se realizó un análisis por condición; sin embargo, como es necesario rellenar al máximo el penetrómetro se pudieron introducir y medir alrededor de 12 discos porosos en un mismo análisis.

Microtomografía computarizada (MicroCT)

Esta técnica consiste en irradiar la muestra a analizar con Rayos X, y con el mapeo del coeficiente de atenuación lineal de los rayos X realizar una reconstrucción 3D de alta definición del volumen de la muestra, así como cortes (slices) en 2D de la sección transversal [271]. La atenuación depende de la composición de los materiales de la muestra, que en este caso se trata de titanio. Las muestras se analizaron con el equipo de microCT SkyScan 1272 de Bruker con $3\mu\text{m}$ de resolución, 0.2° de paso rotación, promedio de 3 fotogramas, 360° de ángulo de rotación y filtro de Cu de 0.11mm.



Figura 3.30 MicroCT Skyscan 1272 de Bruker. Fuente: Centro de Investigación en Ciencia e Ingeniería Multiescala.

Con la ayuda del software asociado es posible analizar las imágenes del modelo 3D para calcular porosidad, espesor de la estructura o volumen del objeto. Para la reconstrucción 3D se utilizó el software NRECOM de Bruker y para el procesado de los datos el software DATA VIEWER de Extron. En la figura 3.31 se presentan ejemplos de procesado en donde se alinea la muestra y selecciona el volumen de interés adecuado (VOI), para el cálculo de la porosidad.

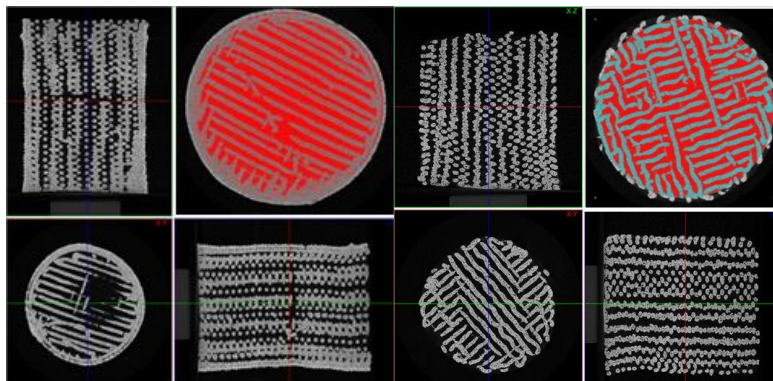


Figura 3.31 Ejemplos de procesado de imagen con el software DATA VIEWER de Extron, en rojo se indica el volumen de interés (VOI).

Para poder analizar cilindros porosos de 10x15mm con la resolución adecuada era necesario consumir demasiadas horas de equipo, técnico y procesado de imagen; sin embargo, reduciendo el volumen de análisis utilizando discos porosos de 10x5mm se facilitaba y agilizaba la caracterización. Por lo tanto, se decidió analizar un cilindro y entre 3 y 6 discos por condición.

3.6.6.5 Contenido en intersticiales

Como se ha comentado en el apartado 2.5.4.1 del capítulo 2, algunos materiales de titanio poroso pueden comportarse de manera frágil debido a la estructura de poros desfavorable y / o su alto contenido intersticial (O, N, C). Por lo tanto, deben controlarse estrictamente las impurezas intersticiales [259]. Se utilizaron dos tipos de testigos; placas y polvo.

- **Testigos placa (figura 3.32 A):** mismo polvo utilizado para la fabricación de las piezas (Ti... tabla) presado lo mínimo para ser manipulable. Se introducía en la misma gaveta con las piezas y se le realizaba el mismo tratamiento de eliminación a 350°C 2 horas y sinterizado (1350°C o 1150°C 2 horas).
- **Testigos polvo (figura 3.32 B):** mismo polvo utilizado para la fabricación de las piezas (Ti... tabla) que se introducía únicamente en la etapa de sinterización (1350°C o 1150°C 2 horas). En este caso hace de ánodo de sacrificio y a la vez de testigo del sinterizado.

Con estos testigos se puede identificar, de donde proviene el exceso de intersticiales (en el caso de haberlo), si bien de las muestras debido a una mala formulación de la tinta que hace que no se haya eliminado correctamente el ligante; o bien del proceso de eliminación o del propio sinterizado. La norma ASTM F67-06 establece para un titanio grado 2-4 (grado médico) el límite de contenido en oxígeno en 0.25 y 0.40 (% en masa) respectivamente [174].

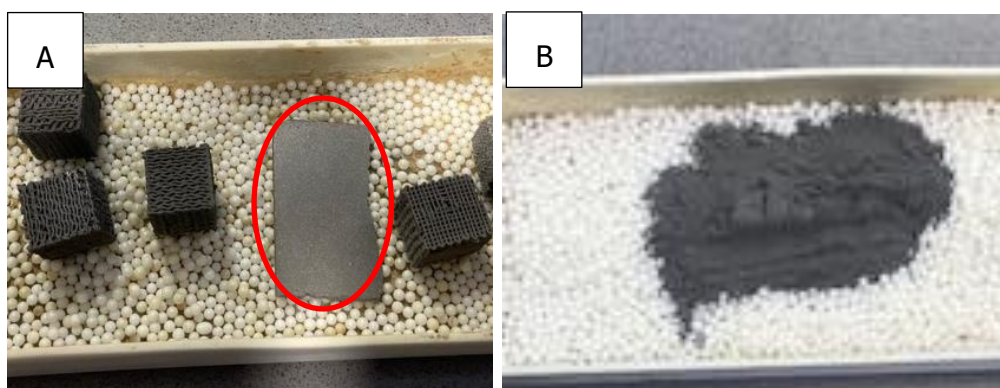


Figura 3.32 A) Testigo del proceso, placa en la misma gaveta que las muestras. B) testigo del sinterizado, polvo de sacrificio.

3.6.6.6 Resistencia a compresión

Se eligió realizar la caracterización mecánica a compresión dado que es el tipo de esfuerzo al que están sometidos los de implante a fabricar; además, los datos disponibles de propiedades mecánicas de la referencia OsteoSinter® también son a compresión.

Se llevaron a cabo ensayos de compresión según la norma ISO 13314 para metales porosos. La caracterización se realizó a temperatura ambiente mediante la máquina universal de ensayos mecánicos AG-IS SHIMADZU con una célula de carga de 100 kN y utillajes específicos para compresión (figura 3.33 A); aplicando carga a 2.5 mm/min sobre cilindros y/o cubos porosos acorde a las dimensiones establecidas por la norma (figura 3.33 B). El software utilizado para la recolección y tratamiento de datos fue el TRAPEZIUM2.

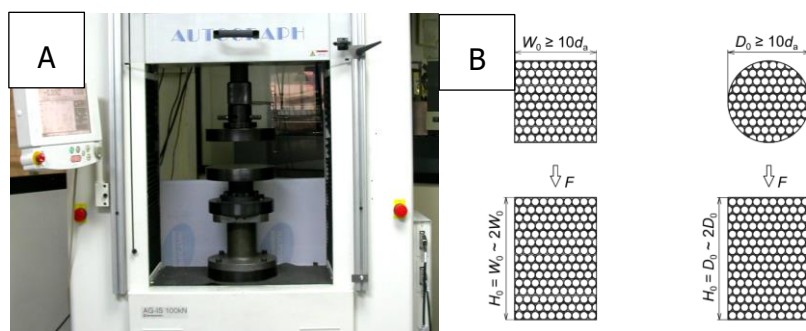


Figura 3.33 A) Equipo de ensayos mecánicos (AG-IS SHIMADZU 100 kN) adaptado con el utillaje para el ensayo a compresión. B) Dimensiones establecidas por la norma.

Para validar los diferentes resultados se compararon los valores de resistencia máxima a compresión en MPa (σ_c o $\sigma_{m\acute{a}x.}$) y módulo elástico en GPa (E) con los de referencia de OsteoSinter® ($E = 3 \pm 0.5 \text{ GPa}$ y $\sigma_c = 45 \pm 0.5 \text{ MPa}$). Tal y como especifica la norma ISO 13314 para obtener correctamente el módulo elástico primero es necesario conocer la resistencia Plateau (σ_{pl} figura 3.34A); a continuación, se ensayan las muestras aplicando carga hasta un 70% de este valor (σ_{70}), luego se descarga hasta el 20% (σ_{20}), y finalmente se vuelve a aplicar carga hasta rotura (figura 3.34B).

Materiales y métodos

La caracterización se llevó a cabo con muestras cilíndricas para todos los estudios, a excepción del estudio sobre la estructura; donde se utilizaron muestras cúbicas para poder evaluar también la isotropía de propiedades.

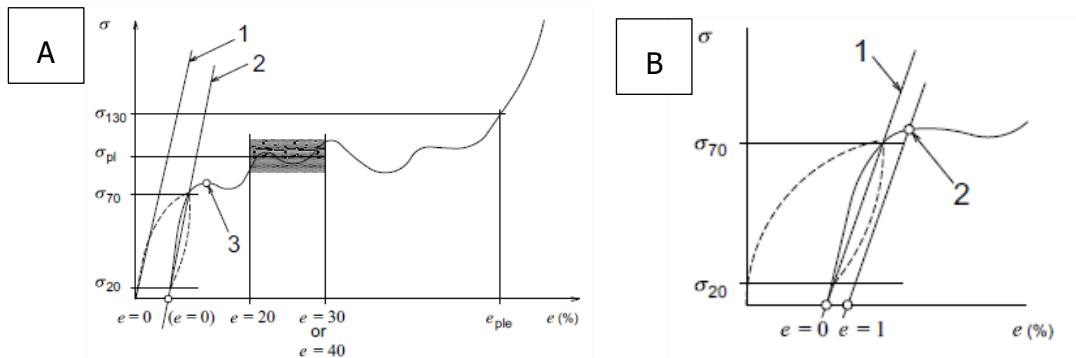


Figura 3.34 Curvas tensión-deformación para determinar los valores característicos del ensayo de compresión en metales porosos. A) Determinación región de Plateau (σ_{pl}). B) Metodología para calcular el módulo elástico. Fuente: ISO 13314:2011(E).

Para conocer el valor de σ_{pl} se utilizaron 3 muestras por condición y para el ensayo de compresión (figura 3.34 B) entre 6 y 9, dependiendo de la repetitividad de los resultados.

3.7 TRATAMIENTO TÉRMOQUÍMICO SOBRE MUESTRAS POROSAS

Como se ha comentado anteriormente la tesis se divide en dos bloques, en el primero se desarrolló y optimizó un proceso de fabricación de prótesis porosas y en el segundo un tratamiento termoquímico para mejorar sus propiedades biológicas. Primero se empezó valorando la viabilidad de aplicar en las estructuras 3D el tratamiento termoquímico convencional desarrollado por T. Kokubo [67]; a partir de aquí se realizaron hasta 4 modificaciones del proceso para añadir diferentes iones y mejorar la funcionalidad. Los tratamientos serán identificados como:

1. Tratamiento Kokubo convencional o tratamiento Na
2. Tratamiento Ca
3. Tratamiento Ag
4. Tratamiento Ga
5. Tratamiento Ag-Ga

3.7.1 Preparación de muestras

Se ha demostrado la eficacia del tratamiento termoquímico desarrollado por T. Kokubo [67], permitiendo generar una capa de apatita en las superficies tratadas, tras las inmersión de las muestras en SBF (simulated body fluid) [66]. La mayoría de estudios se han llevado a cabo sobre superficies lisas y hay menos información sobre muestras porosas [68]–[70]. En esta tesis los tratamientos y ensayos de caracterización se realizaron sobre muestras porosas (figura 3.35 A), añadiendo dificultad, pero a la vez valor al estudio. Debido a las características y limitaciones de algunas técnicas, también se trataron y caracterizaron muestras lisas (figura 3.35 B).

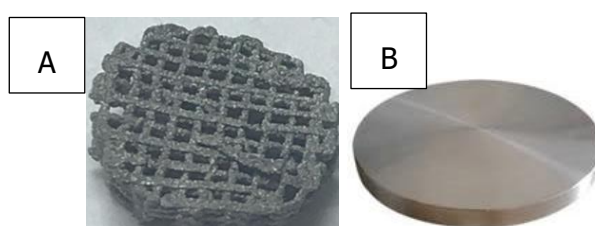


Figura 3.35 Muestra porosa y lisa.

Las muestras porosas eran discos de 10x3mm fabricados con el proceso desarrollado: extrusión 3D de tinta de Ti, eliminación del ligante y sinterizado. Las lisas eran discos de 10x3mm de Ti cp, debidamente desbastados con papel abrasivo de SiC (P800, P1200, P2500 y P4000, Struers, España) y luego pulidos con suspensión de sílice coloidal (0,5 μ m de tamaño de partícula, ATM GmbH, Alemania). En total se fabricaron más de 500 muestras porosas y se prepararon alrededor de 50 lisas. En los siguientes apartados, correspondientes a los diferentes tratamientos, se presentarán tablas que detallarán el número de muestras utilizadas para cada tratamiento y ensayo.

3.7.2 Tratamiento Kokubo convencional o tratamiento Na

En este apartado se realizó el tratamiento termoquímico desarrollado por T. Kokubo (identificado como tratamiento Na o Kokubo convencional) sobre las estructuras porosas fabricadas mediante impresión 3D (extrusión de tinta). El principal objetivo era validar el tratamiento generando titanatos de sodio sobre estructuras 3D; sin embargo, también se intentó optimizar el proceso para aumentar la productividad, reduciendo el tiempo en la etapa de ataque alcalino (tabla 3.36). A continuación, se describe la metodología para la preparación y realización del tratamiento Na:

- 0. Limpieza de las muestras** mediante ultrasonidos. Siempre por duplicado con Acetona (5'), con 2-propanol (5') (productos Sigma Aldrich), y finalmente con agua destilada (7'). Secado mediante nitrógeno (N_2).
- 1. ataque alcalino:** Se usan 10mL¹⁹ de hidróxido de sodio [NaOH] 5M²⁰ por cada muestra porosa. Durante 24h a 60°C y 250rpm. Tras finalizar, lavado en ultrasonidos con agua destilada durante 1' para eliminar el exceso de NaOH.
- 2. Tratamiento térmico**²¹: 5°C/min durante hasta 600°C, se mantiene durante 1 hora y enfriamiento en el mismo horno.

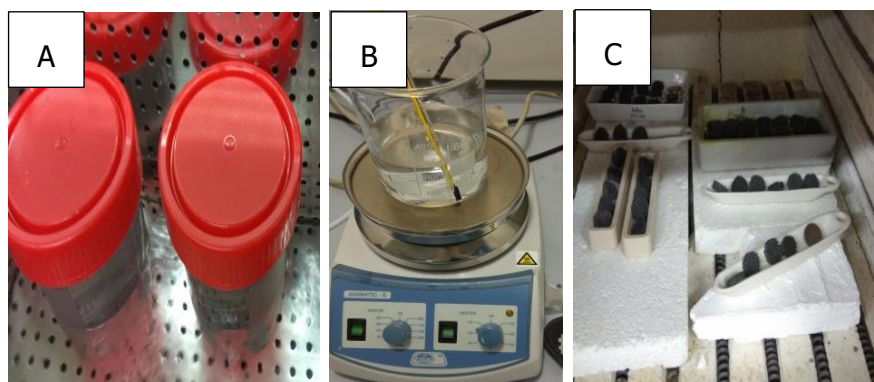


Figura 3.36 Etapas tratamiento Na: A) limpieza, B) ataque NaOH y C) tratamiento térmico.

¹⁹ Se utilizan 10mL por muestra NO 5mL como en la literatura, ya que las muestras son porosas, y así se asegura la reactividad de la solución. Se llevó a cabo un estudio previo con diferentes cantidades y se vio que con poner el doble ya es suficiente para asegurar la reactividad.

²⁰ 5M de NaOH = 200g NaOH en 1L

²¹ Muy importante, no limpiar las muestras tras el tratamiento térmico, pueden perder reactividad

Tabla 3.20 Identificación de las muestras tratadas con Kokubo.

Muestras			
	K6	K10	K24 (convencional)
Etapa 1	Ataque NaOH 6 horas	Ataque NaOH 10 horas	Ataque NaOH 24 horas
Etapa 2	T. Térmico	T. Térmico	T. Térmico

En todas las técnicas en las que fue posible realizar el análisis sobre estructuras porosas se analizó tanto el interior como el exterior de dichas estructuras. Para poder observar la estructura interior se rompieron las muestras, fragilizándolas previamente con nitrógeno líquido. A no ser que haya diferencias entre el interior y el exterior que valga la pena destacar únicamente se presentarán los resultados del interior.

Se analizó la superficie, tanto del exterior como de interior, de las muestras porosas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). El análisis fisicoquímico se completó mediante espectroscopia Raman y la difracción de rayos X (DRX). La caracterización por Raman se pudo realizar sobre las muestras porosas, tanto el exterior como el interior. Se analizaron las muestras antes y después del tratamiento térmico, ya que, tras el tratamiento térmico la intensidad de los picos de anatasa y rutilo aumenta y no es posible observar si se ha formado el titanato de sodio. Debido a las características y limitaciones de la técnica, no fue posible llevar a cabo el DRX sobre muestras porosas, en su lugar se analizaron discos de titanio.

Para verificar la capacidad de formación de apatita se siguió la norma ISO 23317:2014 (evaluación in vitro de la capacidad de formación de apatita de los materiales de implantes). Se sumergieron las muestras porosas tratadas (K6, K10 y K24) en un fluido corporal simulado (SBF) con concentraciones de iones similares a las del plasma sanguíneo humano [181]. Después de distintos días de inmersión en SBF (7, 5 y 3), se observaron las superficies tanto del exterior como del interior mediante microscopía electrónica de barrido. El espesor de la capa se midió a partir de las imágenes SEM por medio del software ImageJ. Para asegurar que los precipitados obtenidos son cristales de apatita se realizó una caracterización mediante análisis elemental EDS y espectroscopia Raman. En la tabla 3.21 se resumen los ensayos realizados y se recoge el número, y tipo (porosa o lisa), de muestras utilizadas en cada uno de ellos.

Tabla 3.21 Número de muestras utilizadas en el tratamiento Na.

	Condiciones	Controles	x3	Ensayo	N	Observaciones
SEM/DRX/Raman	3	0	3	3	27	3 ensayos
Apatita en SBF	3	0	3	3	27	3 días
N Total porosas					54	
N lisas					3	DRX

3.7.3 Modificación del tratamiento para añadir calcio

Una vez demostrado que es posible aplicar el tratamiento termoquímico convencional sobre la superficie y el interior de las muestras de titanio poroso; se llevó a cabo una modificación del tratamiento convencional, añadiendo dos etapas más, para introducir iones Ca^{2+} y generar así titanatos de calcio [187]. Se exploraron dos vías utilizando dos reactivos diferentes para añadir el calcio, acetato de calcio ($\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$) y cloruro de calcio (CaCl_2), ya que, si era posible generar titanatos de calcio sobre estructuras porosas, se aprovecharía el tratamiento para introducir iones Ag^+ [74] y Ga^{3+} [75], y si se utiliza CaCl_2 los iones Cl^- pueden reaccionar con los iones Ag^+ formando precipitados de AgCl . A continuación, se describe la metodología para la preparación y realización del tratamiento Ca:

- 0. Limpieza de las muestras** mediante ultrasonidos. Siempre por duplicado con Acetona (5'), con 2-propanol (5') (productos Sigma Aldrich), y finalmente con agua destilada (7'). Secado mediante nitrógeno (N_2).
- 1. ataque alcalino:** Se usan 10mL de hidróxido de sodio [NaOH] 5M por cada muestra porosa. Durante 24h a 60°C y 250rpm. Tras finalizar, lavado en ultrasonidos con agua destilada durante 1' para eliminar el exceso de NaOH .
- 2. Inmersión en solución con Ca:** Se usan 20mL²² por muestra de una solución 100mM cloruro de calcio (CaCl_2)²³ o acetato de calcio ($\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$)²⁴. Durante 24h a 40°C y 250rpm, luego lavado en ultrasonidos con agua destilada durante 1' y secado con nitrógeno.
- 3. Tratamiento térmico:** $5^\circ\text{C}/\text{min}$ durante hasta 600°C , se mantiene durante 1 hora y enfriamiento en el mismo horno.
- 4. Tratamiento con agua caliente**²⁵: Se sumergen en agua destilada (20mL por muestra) durante 24h a 80°C y 250rpm. Posterior secado con nitrógeno.

²² Se utilizan 20mL por muestra NO 10mL como en la literatura, ya que las muestras son porosas, y así se asegura la reactividad de la solución. Se llevó a cabo un estudio previo con diferentes cantidades y se vio que con poner el doble ya es suficiente para asegurar la reactividad

²³ 100mM CaCl_2 = 11.1g de CaCl_2 en 1L

²⁴ 100mM $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$ = 15.81g de $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$ en 1L

²⁵ Si hay pocas muestras habrá poca agua y es posible que se evapore, en este caso poner en exceso.

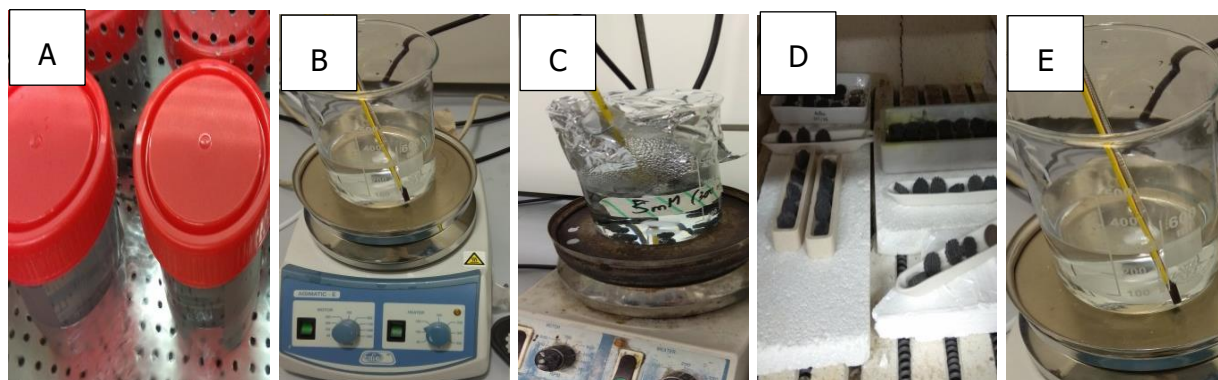


Figura 3.37 Etapas tratamiento Ca: A) limpieza, B) ataque NaOH, C) inmersión en solución con Ca, D) tratamiento térmico y E) tratamiento con agua.

Como se ha comentado, también se exploraron dos vías utilizando dos reactivos diferentes para añadir el calcio, acetato de calcio ($C_4H_6CaO_4$) y cloruro de calcio ($CaCl_2$). En la tabla 3.22 se resume el proceso e identifican las muestras.

Tabla 3.22 Identificación de las muestras del tratamiento Ca

	Muestras	
	KAc	KCa
Etapa 1	Ataque NaOH	Ataque NaOH
Etapa 2	Solución $C_4H_6CaO_4$	Solución $CaCl_2$
Etapa 3	T. Térmico	T. Térmico
Etapa 4	T. en agua	T. en agua

Se observó la superficie de las muestras mediante microscopia electrónica, para comprobar que la microestructura no cambia al modificar el tratamiento. Además, se llevó a cabo un análisis elemental por EDS, para confirmar la incorporación del calcio en la superficie (exterior e interior).

Se llevó a cabo un análisis mediante espectroscopia Raman para comprobar si se formaron titanatos de calcio. De igual manera que con el Kokubo convencional, únicamente se caracterizaron muestras sin tratamiento térmico (etapa 1 y 2 tabla 3.22).

Para la capacidad de formación de apatita de los titanatos de calcio, se sumergieron las muestras KAc y KCa en SBF durante 7 días y se observó la superficie exterior y de rotura mediante microscopia electrónica de barrido. En la tabla 3.23 se resumen los ensayos realizados y se recoge el número, y tipo (porosa o lisa), de muestras utilizadas en cada uno de ellos.

Tabla 3.23 Número de muestras utilizadas en el tratamiento Ca.

	Condiciones	Controles	x3	Ensayo	N	Observaciones
SEM/DRX/Raman	2	0	3	3	18	3 ensayos
Apatita en SBF	2	0	3	1	6	3 días
N total porosas					24	

3.7.4 Modificación del tratamiento para añadir plata

Con la formación de titanatos de calcio, es posible añadir ciertos iones que son efectivos para la promoción del crecimiento óseo, tales como Mg^{2+} [72], Sr^{2+} [72]+ y Zn^{2+} [73], y otros como Ag^+ [74] y Ga^{3+} [75], que presentan actividad antibacteriana. Gracias a la porosidad interconectada y la formación de titanatos las muestras presentan una buena bioactividad. Por lo tanto, se ha considerado de mayor interés centrar el estudio en añadir iones que mejoren la capacidad antibacteriana. En este apartado optó por la plata, ya que desde hace años se conoce que tanto la plata metálica (Ag^0) como los iones de plata (Ag^+) tienen fuertes efectos inhibitorios y bactericidas, así como un amplio espectro de actividades antimicrobianas [191]–[196].

Inoue y colaboradores [214], generaron titanatos de sodio y, a continuación, utilizaron una solución de acetato de plata para introducir la plata por intercambio de iones de Na^+ con Ag^+ , obteniendo titanatos de plata con buenas propiedades antibacterianas pero menor bioactividad por la falta de liberación de iones Na^+ y Ca^{2+} . Kizuki y colaboradores [74], lograron desarrollar capas de titanato de calcio con plata, que además de generar apatita en SBF, mostraba actividad antibacteriana. Sin embargo, para conseguirlo se veían obligados a seguir un proceso secuencial con NaOH, $CaCl_2$, tratamiento térmico y $AgNO_3$, aplicando el $CaCl_2$ y el $AgNO_3$ en dos etapas diferentes para evitar que la precipitación de $AgCl$. En este caso, el principal problema radicaba en que la incorporación de la plata era muy superficial, y, por tanto, los valores de liberación eran muy bajos.

En este apartado se intentaron generar titanatos de calcio con plata utilizando una solución de $AgNO_3$ y $C_4H_6CaO_4$, sin la necesidad de dividir el tratamiento en dos etapas para evitar la formación de precipitados. A continuación, se describe la metodología para la preparación y realización del tratamiento Ca-Ag:

- 0. Limpieza de las muestras** mediante ultrasonidos. Siempre por duplicado con Acetona (5'), con 2-propanol (5') (productos Sigma Aldrich), y finalmente con agua destilada (7'). Secado mediante nitrógeno (N_2).
- 1. ataque alcalino:** Se usan 10mL de hidróxido de sodio [NaOH] 5M por cada muestra porosa. Durante 24h a 60°C y 250rpm. Tras finalizar, lavado en ultrasonidos con agua destilada durante 1' para eliminar el exceso de NaOH.
- 2. Inmersión en solución con Ca y Ag:** Se usan 20mL por muestra de una solución mixta 1:1 de 10ml de acetato de calcio ($C_4H_6CaO_4$) 100mM y 10mL de nitrato de plata

(AgNO₃)²⁶ 1mM. Durante 24h a 40°C y 250rpm, luego lavado en ultrasonidos con agua destilada durante 1' y secado con nitrógeno.

3. Tratamiento térmico: 5°C/min durante hasta 600°C, se mantiene durante 1 hora y enfriamiento en el mismo horno.

4. Tratamiento con agua caliente: Se sumergen en agua destilada (20mL por muestra) durante 24h a 80°C y 250rpm. Posterior secado con nitrógeno.

Únicamente se utilizó una concentración de Ag, la más adecuada en base a los datos de la literatura [74], [214], [215], ya que el principal reto era comprobar si era posible generar titanatos de calcio con plata sin la necesidad de añadir otra etapa, dado que con poca cantidad de iones liberados es suficiente para exhibir actividad antibacteriana [41]. Además, igual que se ha demostrado que la liberación de iones Ag⁺ tiene un efecto antibacteriano, también hay evidencias de que a partir de ciertas concentraciones pasa a ser citotóxica y muy perjudicial para el organismo [216], [217]. En la tabla 3.24 se resume el proceso e identifican las muestras.

Tabla 3.24 Identificación de las muestras del tratamiento Ag

Muestras	
KAg	
Etapa 1	Ataque NaOH
Etapa 2	C ₄ H ₆ CaO ₄ + AgNO ₃ 1mM
Etapa 3	T. Térmico
Etapa 4	T. en agua

Se observó la superficie de las muestras mediante microscopia electrónica, para asegurar que la microestructura haya cambiado al modificar el tratamiento para añadir Ag, y comprobar que no se hayan producido precipitados. Además, se llevó a cabo un análisis elemental por EDS.

Para confirmar la generación de titanatos se utilizó la espectroscopia Raman. De igual manera que con el Kokubo convencional, únicamente se caracterizaron muestras sin tratamiento térmico (etapa 1 y 2 tabla 3.24). Es posible que la plata esté presente en otros estados que no puedan ser detectados por esta técnica; por lo tanto, se utilizaron otros métodos como DRX. No fue posible llevar a cabo el análisis sobre muestras porosas (demasiado ruido de fondo y error por la rugosidad de las muestras), en su lugar se analizaron discos de titanio.

²⁶ 1mM AgNO₃ = 0,17g AgNO₃ en 1L

Materiales y métodos

Para validar la capacidad de formación de apatita se incubaron 7 días en SBF las muestras tratadas (KAg) y se observó la superficie exterior y de rotura mediante microscopia electrónica de barrido. Además, se realizó un análisis elemental EDS para comprobar si sigue habiendo Ag en las muestras tras la incubación.

Se llevó a cabo un ensayo de liberación por plasma de acoplamiento inductivo (ICP) con muestras porosas (3D) y lisas (2D), en solución de Hanks (HBSS, Hanks Balanced Salt Solution). El ensayo se realizó de manera acumulativa, es decir, la muestra se sumergía en la solución y a cada determinado tiempo (1, 8, 24 y 48 horas) se absorbía el líquido (para hacer la medida) y se renovaba la solución

Para caracterizar la respuesta antibacteriana se llevó a cabo el ensayo del halo de inhibición. Se utilizaron las cuatro cepas más comunes y estudiadas en infecciones de implantes protésicos, dos gram positivas (+) y dos gram negativas (-), Staphylococcus epidermidis (S. epi), Staphylococcus aureus (S. aureus), pseudomona aeruginosa (P. aeru) y escherichia coli (E. coli). Como control se usaron muestras porosas de Ti sin tratar (Ti) y con el tratamiento completo con $C_4H_6CaO_4$, pero sin $AgNO_3$ (KAc).

Se realizó un ensayo in vitro de citotoxicidad siguiendo la norma UNE-EN ISO 10993-5:2009, utilizando como controles muestras porosas de Ti sin tratar (Ti) y con el tratamiento completo con $C_4H_6CaO_4$, pero sin $AgNO_3$ (KAc).

En la tabla 3.25 se resumen los ensayos realizados y se recoge el número, y tipo (porosa o lisa), de muestras utilizadas en cada uno de ellos.

Tabla 3.25 Número de muestras utilizadas en el tratamiento Ag.

	Condiciones	Controles	x3	Ensayo	N	Observaciones
SEM/DRX/Raman/XPS	1	0	3	4	12	4 ensayos
Apatita en SBF	1	0	3	1	3	3 días diferentes
Liberación ICP	1	0	3	1	3	Acumulativa
Halo de inhibición	1	2	3	4	36	4 cepas
Citotoxicidad	1	2	3	1	9	
N total porosas					63	
N lisas					9	DRX, XPS e ICP

3.7.5 Modificación del tratamiento para añadir galio

El galio ofrece una doble funcionalidad, el efecto inhibitorio de los iones de galio sobre la resorción ósea y su actividad antibacteriana. S. Yamaguchi y colaboradores [75], lograron desarrollar capas de titanato de calcio con galio, con capacidad de formar apatita en SBF y actividad antibacteriana. Sin embargo, para conseguirlo utilizaron GaCl_3 , que es un producto muy peligroso, altamente reactivo y prácticamente imposible de procesar a nivel industrial. Se intentaron hacer pruebas dentro de campana extractora y con atmosfera controlada, pero no fue posible manipular el producto de una manera segura e industrializable. Por lo tanto, se buscaron alternativas para incorporar el galio, como el $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ que está aprobado por la FDA y ya ha sido utilizado en tratamientos similares. M.D. Wadge y colaboradores [228], consiguieron generar titanatos de galio por intercambio de iones de Na^+ con Ga^{3+} a través del proceso termoquímico secuencial; NaOH , $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y tratamiento térmico a 700°C .

En este apartado se estudió la posibilidad de generar titanatos de calcio con galio utilizando una solución de CaCl_2 y diferentes concentraciones de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$. A continuación, se describe la metodología para la preparación y realización del tratamiento Ga:

- 0. Limpieza de las muestras** mediante ultrasonidos. Siempre por duplicado con Acetona (5'), con 2-propanol (5') (productos Sigma Aldrich), y finalmente con agua destilada (7'). Secado mediante nitrógeno (N_2).
- 1. ataque alcalino:** Se usan 10mL de hidróxido de sodio [NaOH] 5M por cada muestra porosa. Durante 24h a 60°C y 250rpm. Tras finalizar, lavado en ultrasonidos con agua destilada durante 1' para eliminar el exceso de NaOH .
- 2. Inmersión en solución con Ca y Ga:** Se usan 20mL por muestra de una solución mixta 1:1 de 10ml de cloruro de calcio (CaCl_2) 100mM y 10mL nitrato de galio ($\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$) XmM²⁷. Durante 24h a 40°C y 250rpm. Durante 24h a 40°C y 250rpm, luego lavado en ultrasonidos con agua destilada durante 1' y secado con nitrógeno.
- 3. Tratamiento térmico:** $5^\circ\text{C}/\text{min}$ durante hasta 600°C , se mantiene durante 1 hora y enfriamiento en el mismo horno.
- 4. Tratamiento con agua caliente:** Se sumergen en agua destilada (20mL por muestra) durante 24h a 80°C y 250rpm. Posterior secado con nitrógeno.

En esta ocasión se ha decidido probar diferentes concentraciones de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ (cada vez más elevadas) dado que, a diferencia de la plata, el galio exhibe efectos antibacterianos sin producir citotoxicidad [220]–[222]. En la tabla 3.26 se resume el proceso e identifican las muestras.

²⁷ Se evaluaron diferentes concentraciones: 5, 10, 50 y 100mM; 5mM $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 = 1,27\text{g Ga}(\text{NO}_3)_3$ en 1L; 100mM $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 = 25\text{g Ga}(\text{NO}_3)_3$ en 1L.

Tabla 3.26 Identificación de las muestras del tratamiento Ga

Muestras				
	KGa5	KGa10	KGa50	KGa100
Etapa 1	Ataque NaOH	Ataque NaOH	Ataque NaOH	Ataque NaOH
Etapa 2	CaCl ₂ +Ga(NO ₃) ₃ 5mM	CaCl ₂ +Ga(NO ₃) ₃ 10mM	CaCl ₂ +Ga(NO ₃) ₃ 50mM	CaCl ₂ +Ga(NO ₃) ₃ 100mM
Etapa 3	T. Térmico	T. Térmico	T. Térmico	T. Térmico
Etapa 4	T. en agua	T. en agua	T. en agua	T. en agua

Se observó la superficie de las muestras mediante microscopia electrónica, con el fin de asegurar que la microestructura no haya cambiado al modificar el tratamiento para añadir Ga. Además, se llevó a cabo un análisis elemental por EDS, para confirmar la deposición del calcio y galio en la superficie (exterior e interior).

Para confirmar la generación de titanatos se utilizó la espectroscopia Raman, pero únicamente se caracterizaron muestras sin tratamiento térmico (etapa 1 y 2 tabla 3.26. Para corroborar los resultados y completar la caracterización realizó un DRX.

La capacidad de formación de apatita se evaluó se incubando en SBF durante 7 días muestras porosas, tratadas con las diferentes concentraciones de Ga(NO₃)₃ (5, 10, 50 y 100mM). A continuación, se observó la superficie exterior y de rotura mediante microscopia electrónica de barrido. Para valorar el efecto del galio en la capacidad de formación de apatita se incubaron 5 y 3 días en SBF las muestras las muestras con tratadas con la menor y mayor concentración de Ga(NO₃)₃ (KGa5 y KGa100). Además, se realizó un análisis elemental EDS en la muestra de menor concentración para comprobar si sigue habiendo Ga tras la incubación.

Se realizó un ensayo de liberación por plasma de acoplamiento inductivo (ICP), en solución de Hanks con muestras porosas (3D) y lisas (2D) tratadas con la menor y mayor concentración de Ga(NO₃)₃. Debido al elevado número de muestras necesarias, la complejidad (tiempos y repetitividad de las muestras) y el coste del ensayo, se decidió caracterizar primero únicamente las muestras tratadas con la menor y mayor concentración de Ga(NO₃)₃, y en virtud de los resultados continuar con las demás.

Se llevó a cabo el ensayo del halo de inhibición para evaluar la capacidad antibacteriana. Se utilizaron las cuatro cepas más comunes y estudiadas en infecciones de implantes protésicos: S. epi, S. aureus, P. aeru y E. coli. El ensayo se realizó con las muestras porosas, tratadas con las diferentes concentraciones de Ga(NO₃)₃ (todas), como control se usaron muestras de Ti sin tratar (Ti) y con el tratamiento completo con CaCl₂, pero sin Ga(NO₃)₃ (KCa).

Se realizó un ensayo de citotoxicidad siguiendo la norma UNE-EN ISO 10993-5:2009, sobre muestras porosas tratadas con la menor y mayor concentración de Ga(NO₃)₃. Se utilizaron como control muestras de Ti sin tratar (Ti) y con el tratamiento completo con CaCl₂, pero sin Ga(NO₃)₃ (KCa).

El galio proporciona una doble funcionalidad, ofrece capacidad antibacteriana y aumenta la bioactividad; en este caso, se decidió focalizar el estudio en la mejoría de la parte biológica ya que, en comparación con la plata el galio presenta peores propiedades antibacterianas. Se llevaron a cabo ensayos *in vitro* de adhesión (6h), proliferación (6h, 7, 14, 21 y 28 días), diferenciación (28 días) y mineralización (28 días), sobre muestras porosas tratadas con la menor y mayor concentración de $Ga(NO_3)_3$, utilizando como control negativo muestras de Ti sin tratar (Ti) y como control positivo muestras con el tratamiento termoquímico convencional de Kokubo (K24).

En la tabla 3.27 se resumen los ensayos realizados y se recoge el número, y tipo (porosa o lisa), de muestras utilizadas en cada uno de ellos.

Tabla 3.27 Número de muestras utilizadas en el tratamiento Ga.

	Condiciones	Controles	x3	Ensayo	N	Observaciones
SEM/DRX/Raman/XPS	4	0	3	4	48	4 ensayos
Apatita en SBF	4	0	3	3	36	3 días diferentes
Liberación ICP	2	0	3	1	6	Acumulativa
Halo de inhibición	4	2	3	4	72	4 cepas
Citotoxicidad	2	2	3	1	12	
más <i>in vitro</i>	2	2	3	6	72	5 días + mineralización
N total porosas					246	
N lisas					30	DRX, XPS e ICP

3.7.6 Modificación del tratamiento para añadir conjuntamente galio y plata

Siguiendo con la idea de la doble funcionalidad, se decidió añadir conjuntamente Ag y Ga para aprovechar las características y beneficios de ambos elementos. La acción conjunta de ambos iones puede potenciar la capacidad de inhibición de las muestras, debido a la sinergia de actividades antibacterianas. De hecho, el concepto de sinergia antibacteriana no es algo reciente, desde hace años en farmacología ya se implementan terapias con el uso sinérgico de antibióticos para aumentar la eficacia del tratamiento [232], [233]. El sistema Ag-Ga puede ofrecer buenos resultados ya que los iones de plata desestabilizan la matriz del biofilm aumentando la posibilidad de que otros iones (en este caso de galio) penetren y actúen sobre la bacteria [235]. Esta acción sinérgica es una gran ventaja, principalmente para el Ga, ya que por su mecanismo de acción necesita entrar en la bacteria para matarla. Se tomaron como referencia las muestras KAg (AgNO_3 1mM) y KGa5 ($\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ 5mM) y a partir de estas se propusieron diferentes combinaciones (tabla 3.28). A continuación, se describe la metodología para la preparación y realización del tratamiento Ag-Ga:

- 0. Limpieza de las muestras** mediante ultrasonidos. Siempre por duplicado con Acetona (5'), con 2-propanol (5') (productos Sigma Aldrich), y finalmente con agua destilada (7'). Secado mediante nitrógeno (N_2).
- 1. ataque alcalino:** Se usan 10mL de hidróxido de sodio [NaOH] 5M por cada muestra porosa. Durante 24h a 60°C y 250rpm. Tras finalizar, lavado en ultrasonidos con agua destilada durante 1' para eliminar el exceso de NaOH .
- 2. Inmersión en solución con Ca, Ag y Ga:** Se usan 20mL (por muestra) de una solución mixta 1:1 10ml de acetato de calcio ($\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$) 100mM, 5mL de nitrato de galio ($\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$) XmM ($X= 5$ o 10) y 5mL de nitrato de plata (AgNO_3) YmM ($Y = 1, 2$ o 5). Durante 24h a 40°C y 250rpm Durante 24h a 40°C y 250rpm. Durante 24h a 40°C y 250rpm, luego lavado en ultrasonidos con agua destilada durante 1' y secado con nitrógeno.
- 3. Tratamiento térmico:** $5^\circ\text{C}/\text{min}$ durante hasta 600°C , se mantiene durante 1 hora y enfriamiento en el mismo horno.
- 4. Tratamiento con agua caliente:** Se sumergen en agua destilada (20mL por muestra) durante 24h a 80°C y 250rpm. Posterior secado con nitrógeno.

Tabla 3.28 Identificación de las muestras del tratamiento Ag-Ga

Muestras				
	KGA51	KGA52	KGA55	KGA102
Etapa 1	Ataque NaOH	Ataque NaOH	Ataque NaOH	Ataque NaOH
Etapa 2	Ga(NO ₃) ₃ 5mM + AgNO ₃ 1mM + C ₄ H ₆ CaO ₄	Ga(NO ₃) ₃ 5mM + AgNO ₃ 2mM + C ₄ H ₆ CaO ₄	Ga(NO ₃) ₃ 5mM + AgNO ₃ 5mM + C ₄ H ₆ CaO ₄	Ga(NO ₃) ₃ 10mM + AgNO ₃ 2mM + C ₄ H ₆ CaO ₄
Etapa 3	T. Térmico	T. Térmico	T. Térmico	T. Térmico
Etapa 4	T. en agua	T. en agua	T. en agua	T. en agua

La concentración de Ga(NO₃)₃ y AgNO₃, en realidad es la mitad de lo indicado, ya que las muestras se sumergen en una mezcla 1:1. Por ejemplo, para las muestras KGA102 se preparan soluciones de Ga(NO₃)₃ 10mM y AgNO₃ 2mM y al realizar la mezcla estas se diluyen a 5, y 1mM respectivamente.

Al volver a trabajar con iones de plata se utilizó C₄H₆CaO₄ en lugar de CaCl₂ para evitar la precipitación de AgCl. Sin embargo, antes de empezar con el desarrollo del estudio fue necesario llevar a cabo un análisis preliminar con la mezcla de C₄H₆CaO₄ con Ga(NO₃)₃ 5mM (KAcGa5) para asegurar que no se producen cambios en el tratamiento del galio al cambiar el cloruro por acetato.

Se observó la superficie de las muestras mediante microscopia electrónica, para comprobar si la microestructura cambia al modificar el tratamiento para añadir Ga y Ag conjuntamente. Además, se llevó a cabo un análisis elemental por EDS, para confirmar la deposición del calcio, galio y plata en la superficie (exterior e interior).

Para confirmar la generación de titanatos se utilizó la espectroscopia Raman, pero únicamente se caracterizaron muestras sin tratamiento térmico (etapa 1 y 2 tabla 3.28). Para corroborar los resultados y completar la caracterización realizó un DRX.

Para validar la capacidad de formación de apatita de las superficies con galio y plata se sumergieron en SBF durante 7 días muestras porosas, tratadas con las diferentes concentraciones de Ga(NO₃)₃ y AgNO₃ (tabla 3.28). A continuación, se observó la superficie exterior y de rotura mediante microscopia electrónica de barrido.

Se llevó a cabo un ensayo de liberación por plasma de acoplamiento inductivo (ICP) en solución de Hanks, con muestras porosas (3D) y lisas (2D) tratadas con las diferentes concentraciones de Ga(NO₃)₃ y AgNO₃ (tabla 3.28, todas). Se realizó de manera acumulativa, es decir, la muestra se sumergía en la solución y a cada determinado tiempo (1, 8, 24 y 48 horas) se absorbía el líquido (para hacer la medida) y se renovaba la solución.

Para asegurar que la liberación de iones Ga³⁺ y Ag⁺ es suficiente como para producir una respuesta antibacteriana se llevó a cabo el ensayo del halo de inhibición. Se utilizaron las cuatro cepas más comunes y estudiadas en infecciones de implantes protésicos: S. epi, S. aureus, P. aeru y E. coli. El ensayo se realizó con las muestras porosas, tratadas con las

Materiales y métodos

diferentes concentraciones de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y AgNO_3 (tabla 3.28, todas), y como control se usaron muestras de Ti sin tratar (Ti).

El ensayo de citotoxicidad se realizó siguiendo la norma UNE-EN ISO 10993-5:2009, sobre muestras porosas tratadas con las diferentes concentraciones de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y AgNO_3 (tabla 3.28, todas). Se utilizaron como control únicamente muestras de Ti sin tratar (Ti), ya que todas las muestras (a excepción de la KGA55) se han tratado con la misma, o inferior, concentración de AgNO_3 y tampoco deberían ser citotóxicas.

Para valorar el efecto de la sinergia antibacteriana del sistema Ga-Ag, mediante un ensayo de adhesión bacteriana, se evaluó el porcentaje de bacterias que mueren al estar en contacto con las muestras. Se utilizaron las mismas cepas que en el halo de inhibición (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*). El ensayo se realizó con las muestras porosas, tratadas con diferentes concentraciones de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y AgNO_3 , exceptuando la muestra KGA55 (tabla 3.28, KGA51, KGA52 y KGA102), y como control se usaron muestras de Ti sin tratar (Ti).

En la tabla 3.29 se resumen los ensayos realizados y se recoge el número, y tipo (porosa o lisa), de muestras utilizadas en cada uno de ellos.

Tabla 3.29 Número de muestras utilizadas en el tratamiento Ag-Ga.

	Condiciones	Controles	x3	Ensayo	N	Observaciones
SEM/DRX/Raman/XPS	4	0	3	4	48	4 ensayos
Apatita en SBF	4	0	3	3	36	3 días diferentes
Liberación ICP	4	0	3	1	12	Acumulativa
Halo de inhibición	4	1	3	4	60	4 cepas
Citotoxicidad	4	1	3	1	15	
Adhesión bacteriana	3	1	3	4	48	4 cepas
N total porosas					219	
N lisas					36	DRX, XPS e ICP

3.7.7 Técnicas y equipos utilizados en la caracterización de las muestras tratadas termoquímicamente

3.7.7.1 Caracterización microestructural y físico-química

Para la observación topográfica de las muestras tratadas se utilizó el microscopio de haz de iones focalizados (FIB) Zeiss Neon40 del Centro de Investigación en Ciencia e Ingeniería Multiescala de Barcelona (Figura 3.38). El FIB es casi idéntico a un microscopio electrónico de rastreo (SEM), pero en lugar de electrones utiliza iones que interaccionan con la muestra y contribuyen en la formación de la imagen. Para el análisis químico se utilizó el detector EDS (INCAPentaFETx3 detector, 30mm², ATW2 ventana).

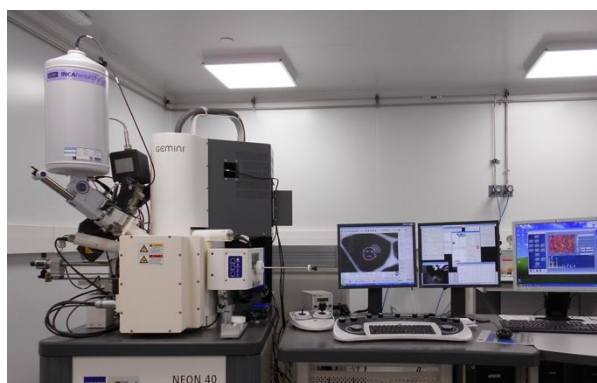


Figura 3.38 Microscopio de haz de iones focalizados (FIB) Zeiss Neon40.

Para la caracterización fisicoquímica se utilizó la espectroscopia Raman y la difracción de rayos X (DRX)-La espectroscopía Raman analiza la señal de la luz dispersa por el efecto Raman y deduce de ella la composición química y la estructura de la muestra. Se utilizó el equipo Renishaw's inVia Qontor Raman (figura 3.39 A) y el software Raman Environment (Wire™). La difracción de rayos (DRX) es una técnica muy conocida para la identificación de fases en muestras cristalinas. Se utilizó el difractómetro D8 Advance de Bruker (figura 3.39 B) con medidas de ángulo rasante.

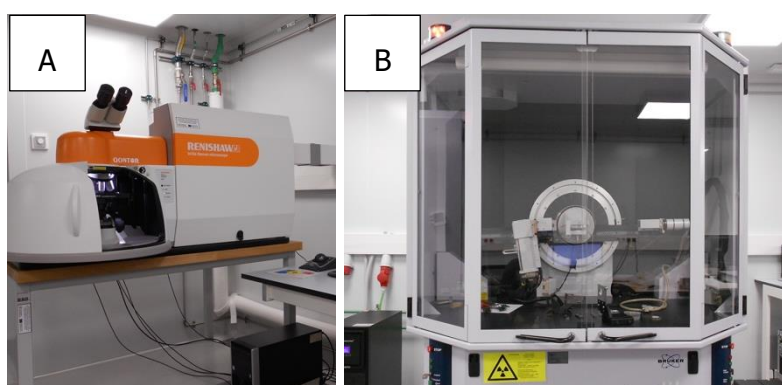


Figura 3.39 Equipos utilizados para la cara caracterización fisicoquímica: A) Renishaw's inVia Qontor (Raman) y B) difractómetro D8 Advance de Bruker (DRX).

3.7.7.2 Formación de apatita

Para caracterizarla bioactividad de las muestras tratadas se evaluó la capacidad de formación de apatita tras inmersión en SBF (simulated body fluid), siguiendo la norma ISO 23317:2014. El proceso de preparación del SBF es el siguiente:

1. Se lavan todos los elementos que serán usados en la preparación del SBF con ácido clorhídrico 1M, después con detergente neutro y, finalmente, se aclaran con agua destilada.
2. Se añaden 700mL de agua destilada en el vaso de precipitados (de plástico) de 1L y se agita con el agitador magnético (figura 3.40 B).
3. Se van añadiendo los reactivos siguiendo el orden de la tabla 3.30.
4. Una vez disueltos, se coloca el vaso de precipitados dentro del recipiente usado para realizar el baño térmico a $36.5 (\pm 1.5) ^\circ\text{C}$.
5. Mediante un pHmetro se controla el pH de la disolución mientras se añade gota a gota HCl 1M, en caso de ser necesario, hasta lograr pH de 7.4.
6. Una vez logrado un pH de $7.42 (\pm 0.01)$ a $36.5 (\pm 0.2) ^\circ\text{C}$ se guarda el contenido de la disolución en el matraz aforado hasta que llegue a los 20°C .
7. Finalmente, se ajusta el volumen total a 1L mediante agua destilada y se traspasa a la botella de plástico que posteriormente se conservará en la nevera.

Tabla 3.30 Reactivos preparación SBF.

Orden	Cantidad	Reactivo
1	8,036g	Cloruro de sodio (NaCl)
2	0.352g	Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)
3	0.225g	Cloruro de Potasio (KCl)
4	0.23g	Fosfato de Potasio trihidratado ($\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$),
5	0.311g	Magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$),
6	40mL	Ácido clorhídrico (HCl) 1M
7	0.293g	Cloruro de Calcio (CaCl_2)
8	7.2mg	Sulfato de sodio (Na_2SO_4)
9	6.063g	tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) ($(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$)

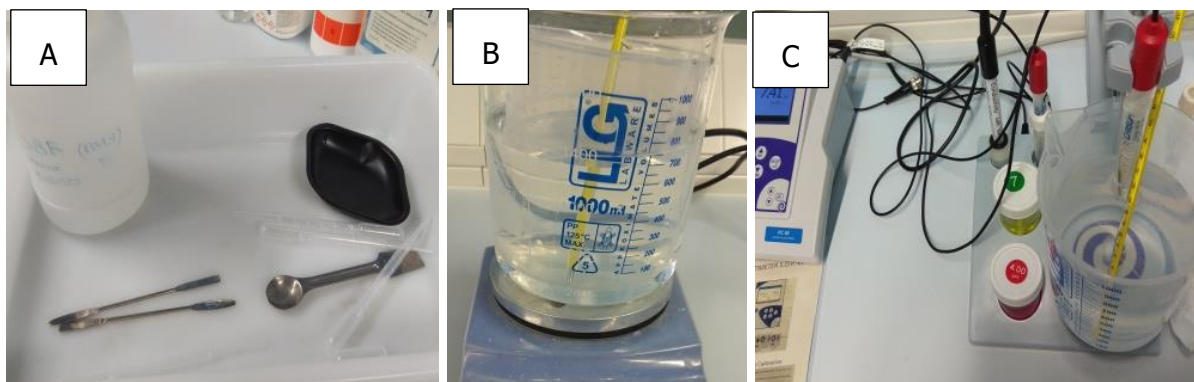


Figura 3.40 A) Materiales utilizados, B) mezcla de todos los componentes para la elaboración del SBF y C) control del PH de la solución.

Una vez preparado, el proceso de inmersión en SBF es el siguiente:

1. Filtrar el SBF para eliminar las posibles bacterias presentes en el medio.
2. Dentro de una campana, se introducen las muestras en botes estériles y se añaden 25ml de SBF.
3. Dejar incubar a 37°C el tiempo establecido para el ensayo.
4. Cada 48h renovar el SBF (previamente filtrado).
5. Extraer muestras, aclarar suavemente con agua destilada y dejar secar en estufa a 40°C.

Finalizado el proceso de inmersión, las muestras se analizan mediante SEM y Raman.

3.7.7.3 Liberación de iones

La técnica de ICP-MS (Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente), permite estimar cuantitativamente la liberación de iones en ppm (parte por millón). Para la cuantificación de los iones liberados se utilizó el equipo 7800 ICP-MS del centro Multiscale (figura 3.41). A continuación, se describe el protocolo a seguir para la realización del ensayo:

1. Colocar 3,5 ml de solución de Hanks en falcons (3 por condición) de 15ml, 2ml en el caso de que las muestras sean discos. Volumen establecido acorde con la norma EN ISO 10993.
2. Introducir las muestras dentro de los falcons, tapar y sellar con parafilm, y guardar en incubadora a 37°C.
3. Cuando toque, según se haya establecido, retirar la solución y renovar (acumulativa).
4. Guardar la solución retirada en otro falcon debidamente sellado en la nevera.

Materiales y métodos

5. Una vez se dispone de todas las muestras, filtrar una a una todas las soluciones de los falcon, cambiando el filtro para cada uno.
6. Preparar los falcons especiales (de vidrio) para ICP. Limpiar con ácido nítrico del 2% aclara con agua miliQ (ultra pura), y secar en estufa.
7. Se añade 1ml de cada muestra y 9ml de ácido nítrico del 2% en los falcons para ICP.
8. Entregar la bandeja con las muestras y especificar los elementos esperados, el tipo de medio y el factor de dilución.
9. Al tratar los resultados recordar multiplicarlos por 10 debido al factor de dilución.

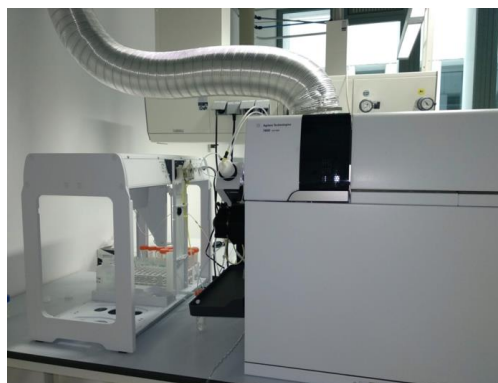


Figura 3.41 Equipo 7800 ICP-MS del centro Multiscale.

3.7.2.4 Actividad antibacteriana

Se realizaron dos tipos de ensayos para evaluar la capacidad antibacteriana de las muestras tratados, el halo de inhibición (más visual) y la adhesión bacteriana (más cuantitativo).

Metodología halo de inhibición:

Día 1: Preparación del medio agar-agar para el cultivo bacteriano y sembrado de bacterias.

- Se necesitan 3 placas por cada condición y cepa. Además, se reservan 3 placas/cepa para el control y 1 placa/cepa para hacer el sembrado de las bacterias.
- Para preparar el agar-agar, se vierten 20g de TSA (Trytone Soy Agar, PanReac) en 0.5L de agua destilada y se autoclava durante 30' a 121°C y 1bar de presión.
- Rellenar con aproximadamente 25mL cada placa para que al colocar la muestra quede encajada, es decir, el grosor del medio sea lo más próximo al grosor de la muestra.
- Dejar enfriar las placas hasta que solidifiquen.
- Sellar todas ellas con parafilm e guardarlas en nevera, excepto las placas donde se van a sembrar las bacterias (1placa/cepa).
- Se usa el método de sembrado en zigzag y por desgaste.
- Se esteriliza el asa de kolle, con etanol y quemándola hasta verla roja.

- Deja enfriar hacer un pase. Con el asa se recogen colonias de bacterias (sin coger agar) y se esparce en la nueva placa haciendo 4 líneas, se gira 90° la placa y se repite el proceso.
- Incubar las placas con las bacterias pasadas.

Día 2: Preparación de la dilución y sembrado de las bacterias en las placas con las muestras

- Esterilizar las muestras 20' por cada cara mediante la luz UV de la campana.
- Preparar cuatro falcons con 10ml de PBS (Tampón fosfato salino) y en otros cuatro con 5ml. En los primeros se prepara el stock de bacterias y en los últimos las diluciones.
- De las placas con el pase de bacterias del día anterior de las bacterias se recoge una porción de bacterias con el asa de kolle y se vierte en el falcon de 10ml (proceso por cepa)
- Agitar el falcon con el vortex con stock de bacterias para diluir bien las bacterias en el PBS.
- Extraer 1ml del stock y colocarlo en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600nm. Se mide la absorbancia y repite el proceso anterior hasta alcanzar un valor de 0.19. Este valor es indicativo de que hay una concentración de 10^8 UFC/ml (unidades formadoras de colonias).
- Realizar la dilución 1:1. En el falcon de 5ml de PBS se añaden 5ml del stock con bacterias (0,19 de absorbancia).
- Con una pipeta se añaden 100µl de la dilución a cada placa y se distribuye por toda la placa con la ayuda de la lanza. Hay que ir agitando con vortex entre para mantener una concentración de bacterias uniforme.
- Se procede a troquelar las placas. Se hace un agujero en el agar y se incrusta la muestra. Se añaden 10µl de PBS encima de la muestra con tal de garantizar cierto grado de difusión desde el interior.
- Se sellan las placas y se almacenan en la incubadora.

Día 3: Medición de los halos.

Metodología adhesión bacteriana:

Día1: Preparación del medio

- Introducir 17,5g de BHI (Brain Heart Infusion, Merck) en 500mL de agua destilada y autoclavar durante 20min a 121°C. Cuando termine, esperar a que baje a 50°C y 0 bar para abrir la compuerta y guardar en nevera.
- Preparación de PBS: Introducir una pastilla de PBS efervescente en 500mL de agua destilada y realizar el mismo procedimiento que con el BHI.
- Preparación de placas: Introducir 17,5g de BHI en polvo y 7,5 de Agar bacteriológico en 500mL de agua destilada y autoclavar. Cuando termine, esperar a que baje a 80°C y 0bar para poder sacar el recipiente.
- Depositar en cada placa el medio con agar de manera rápida ya que a 50°C el medio con agar gelidifica.
- Dejar enfriar las placas hasta gelificar, sellar con parafilm y guardar en la nevera.

Materiales y métodos

Día 2: Preparación del inóculo

- Sacar del congelador bacteria y descongelar (frotando la placa con la mano)
- Añadir en el falcon 10mL del medio
- Añadir 50µL de bacteria y resuspender
- Cerrar y etiquetar con el tipo de bacteria, el nombre y la fecha
- Dejar incubando a 37°C.

Día 3: Ensayo

- Encender la campana y limpiarla con etanol
- Esterilizar las muestras 10 minutos por lado con luz UV.
- Calcular la cantidad de disolución de inóculo que se necesitará: nº de muestras por 1ml y redondear en exceso (Ejemplo: 10 muestras->10ml->15ml de BHI).
- Coger 1ml de medio y medir la absorbancia con el espectrofotómetro para fijar la referencia (hacer un blanco). Añadir la disolución de bacterias del inóculo en el falcon con 15ml de BHI y medir absorbancia hasta obtener valores 0.19-0.21.
- Colocar las muestras en una placa estéril
- Lavar las muestras 3 veces con 1ml de PBS. (Para meter PBS se puede utilizar la misma punta, pero cambiar entre lavados)
- Añadir 1mL de la disolución de 0,19-0,2 en cada muestra.
- Colocar las placas con las muestras en la incubadora a 37°C durante 2h.
- Ir preparando los eppendorfs para las diluciones, son 4 eppendorfs por muestra (4 disolución).
- Colocar 900µl de PBS en cada eppendorf.
- Preparar las placas de agar identificando la zona D2, D3, D4, con sus triplicados (en total 9 zonas)
- Pasadas las 2 horas sacar las muestras y aspirar el líquido con las bacterias (cambiar de punta entre cada aspiración).
- Mover las muestras a otra placa. Al pasar cada muestra esterilizar la pinza con etanol y quemándola.
- Hacer dos lavados con PBS (el segundo dejarlo)
- Poner las placas en ultrasonidos 1 minuto.
- Pasar rápidamente 100µl de muestra al eppendorf D1.
- Hacer las disoluciones: Vortear D1 y pasar 100uL a D2. Vortear D2 y con una punta de 5uL introducir en la placa en la zona correspondiente, aplanar con la punta. Con una punta nueva coger 5u más... hasta hacer las 3 plantaciones. Vortear D2 y pasar 100uL a D3...
- Al finalizar tapar y girar la placa
- Cuando estén todas, dejar incubando 24h a 37°C.

Día 4: contar las colonias (figura 3.42).

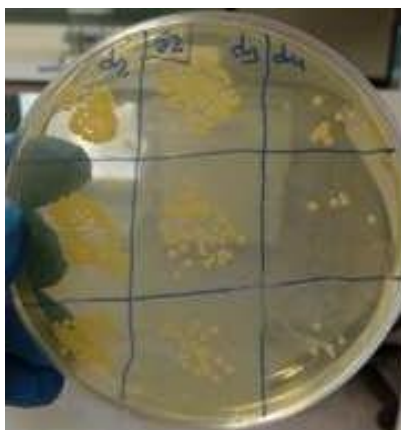


Figura 3.42 Ejemplo de placa tras la incubación, lista para el conteo de colonias .

3.7.7.5 Evaluación biológica in vitro

Ensayo de citotoxicidad:

Se realizó según la norma UNE EN ISO1993-5:2009. En dicha norma se estipula la cantidad de medio a preparar según las características de la muestra, en este caso fueron necesario 3,5ml por muestra. A continuación, se detalla la metodología del ensayo:

Día 1: Preparación de medio y descongelado de células

Preparación de medio:

- 42.5ml de medio McCoy's 5A (Amino ácidos, azúcares, ...),
- 1ml HEPES (Solución tampon),
- 500 µl Piruvato de Sodio (fuente de C),
- 500 µl de L-glutamina (Amino ácidos poco estable en el medio),
- 500µl de Penicilina/Estreptomicina (antibióticos) ,
- Y 5ml de Suero Fetal Bovino (FBS) (Factores de crecimiento para estimular la proliferación).

Descongelado de células (Saos-2):

- Encender el baño y ponerlo a 37°C.
- Descongelar el criotubo en el baño hasta que esté en un estado intermedio entre congelado y líquido.
- Poner 5ml de medio en el Falcon de 15ml.
- Pipeteando extraer 5ml de células y colocarlas en el Falcon anterior.
- Mezclar bien mediante el pipeteo.
- Centrifugar a 1500 rpm durante 5' para separar el pellet de células del medio.
- Absorber y tirar el sobrenadante.
- Resuspender el pellet en 6ml de medio. Pipeteamos para mezclarlo bien.
- Trasladar el contenido del Falcon en un Frasco de cultivo celular.
- Añadir 6ml de medio en el Falcon de células y mezclarlo bien para recoger las que se hayan podido quedar allí.
- Añadir el contenido al frasco (deberían haber 12ml).

Materiales y métodos

- Incubar las células a 37°C durante 48h para que proliferen.

Día 2 (48h después): Cambio de medio y preparación de las muestras

Cambio de medio

- Antes de comenzar comprobar con el microscopio el estado de las células. Estas deben estar enganchadas/estiradas en el fondo del frasco. Si están flotando o son redondas están muertas. Si la mayoría están muertas será necesario volver a descongelar.
- Si la cantidad de células es normal aspirar el medio del frasco desde la esquina inferior y añadir 12ml de medio contra la pared lateral para no desenganchar las células.

Si hay demasiadas, hay que pasarlas, es decir, separarlas en varios frascos.

- Calentar 2ml de tripsina en un Falcon a 37°C.
- Absorber el medio del frasco.
- Lavar las células con 10ml de PBS y aspirar.
- Colocar 2ml de tripsina y golpear fuerte el frasco para desenganchar las células (comprobar con el microscopio).
- Añadir 3ml de medio en el frasco para diluir la tripsina y mezclar bien mediante el pipeteo.
- Trasladar a un falcón de 15ml y centrifugar a 1500 rpm durante 5'.
- Aspirar el sobrenadante y resuspender el pellet en 6ml de medio.
- Mezclar bien y repartir el contenido en 2 frascos, es decir, 3ml en cada uno.
- Añadir 6ml en el falcon y mezclar bien para recoger las células que puedan quedar.
- Volver a repartir 3ml en cada frasco. Añadir 6ml de medio en cada frasco hasta tener 12ml en total, en cada uno.

Preparación de las muestras

- Esterilizar las muestras mediante UV. 3 muestras por condición
- Calcular el medio necesario (3.5ml por muestra, según la norma).
- Colocar las muestras en un well plate de 18 pocillos y rellenarlos con 3,5ml de medio.
- Sellar el well plate con parafilm y dejar en la incubadora durante 72h.

Día 3 (48h después del día 2): Sembrado de células.

- Calentar 2ml de tripsina en un Falcon a 37°C.
- Absorber el medio del frasco.
- Lavar las células con 10ml de PBS y aspirar.
- Colocar 2ml de tripsina y golpear fuerte el frasco para desenganchar las células
- Comprobar con el microscopio óptico.
- Añadir 3ml de medio en el frasco para diluir la tripsina y mezclar bien con la pipeta.
- Trasladar a un falcon de 15ml.
- Añadir 5ml de medio en el frasco y trasladar el contenido al falcon anterior.
- Centrifugar a 1500 rpm durante 5'.
- Aspirar sobrenadante y resuspender el pellet en 6ml de medio.

- Mediante la cámara de Neubauer (figura 3.43) se realiza el conteo de células. Para ello, se colocan 10µl dentro de la cámara y se procede a contar el número de células en cada cuadrante exterior, donde sólo se tiene en cuenta dos paredes de cada uno de ellos.

•

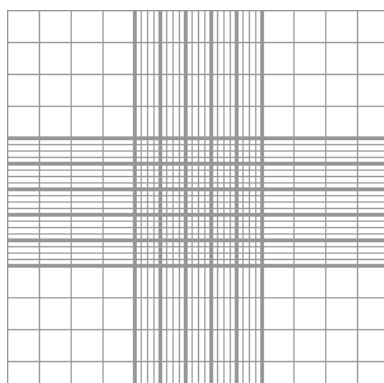


Figura 3.43 Cuadrantes cámara de Neubauer.

- Una vez se tiene el número de células de cada cuadrante se hace la media entre los cuatro para obtener $n \cdot 10^4$ células/ml.
- Se procede a calcular el factor de dilución con tal de tener $10 \cdot 10^4$ células/ml.
- El factor de dilución X será $X = \frac{n^{\circ} \text{ medio de células} \cdot 10^4}{10 \cdot 10^4 \text{ células}} * \frac{\text{ml}}{\text{ml}} \rightarrow X = \frac{n^{\circ} \text{ medio de células}}{10}$
- Por lo tanto, se coge 1ml del medio con células y (X-1) del medio de cultivo.
- En un well plate de 96 pocillos añadir 100µl de la dilución en cada pocillo. Por lo que se sembrarán $10 \cdot 10^3$ células por pocillo.
- Son 3 pocillos por cada condición, más tres pocillos extras para el control positivo donde únicamente se sembrarán células con cultivo normal.

Día 4: Diluciones y cambio de medio de las células

- Sacar el well plate con las muestras de la incubadora.
- Mezclar en falcons de 15ml el contenido de los pocillos con la misma condición, es decir, juntar los triplicados en un mismo falcon
- Preparar las 5 diluciones (1, 1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000) para cada condición en eppendorfs
- 1 → Sólo medio de la muestra
- 1:1 → 170µl de medio de cultivo + 170µl medio de las muestras.
- 1:10 → 300µl de medio de cultivo + 30µl medio de las muestras.
- 1:100 → 400µl de medio de cultivo + 4µl medio de las muestras.
- 1:1000 → 1ml de medio de cultivo + 1µl medio de las muestras.
- En el well plate donde se han sembrado las células aspirar el medio y añadir 100µl/pocillo de cada una de las diluciones.
- En el control negativo (sin células) y positivo añadir medio normal
- Si solo hay una condición debería haber 21 pocillos rellenos (3*5 diluciones + 3*2 controles = 21).

Día 5: comprobación de resultados:

- Aspirar el medio de los pocillos y añadir 100 µl de M-PER para lisar las células.
- Utilizar el kit LDH (Roche, USA). para obtener el número de células vivas.
- Leer la absorbancia a 492nm con un lector multimodo HTX (Bio-Tek)

Para los demás ensayos *in vitro* la mayoría de proceso son el mismo o prácticamente iguales por lo que no será necesario describirlos paso a paso:

1. Descongelar células.

2. Sembrar células. En este caso se introducen las muestras (siempre 3 por condición) en los pocillos del well plate y se siembran las células encima. Todo el proceso es el mismo, pero al tratarse de muestras porosas se prepara una disolución con 100×10^3 células/ml (recomendable para poder hacer disoluciones más fácilmente) y se añaden 0,5ml a cada pocillo (50×10^3 células sembradas en cada muestra). La cantidad líquido y células utilizados se optimizó en estudios previos a la tesis.

3. Sembrar la recta patrón: a partir la solución disponible (100×10^3 células/ml) sembrar disoluciones de 0, 20, 40, 60, 80 y 100×10^3 células.

4. Incubar.

Ensayo de adhesión (6h):

- Aspirar el medio, pasar las muestras a una placa nueva y añadir 300 µl de M-PER para lisar las células
- Utilizar el kit LDH para obtener el número de células vivas.
- Con la recta patrón se sabrá el número de células adheridas.

Ensayo de proliferación celular: lo mismo que adhesión, pero más días.

- Cada dos días cambiar el medio
- El día que toca análisis (igual que adhesión) Aspirar el medio, pasar las muestras a una placa nueva y añadir 300 µl de M-PER para lisar las células
- Identificar y congelar a -8°C
- Una vez finalizado el ensayo (día 28) Utilizar el kit LDH para obtener el número de células vivas.
- Las SAOS proliferan mucho y es posible que el valor de absorbancia quede fuera de la recta patrón. En este caso hacer disoluciones (depende mucho del resultado, se ha de ver en el momento), por ejemplo, en este caso se hicieron día 14 1:5 (20 µl y 80 µl de M-PER); día 14 1:10 (10 µl y 90 µl de M-PER); día 14 1:20 (5 µl y 95 µl de M-PER).

Ensayo de diferenciación: todo el proceso igual que adhesión y proliferación.

- En lugar de lisar con M-PER, fijar con paraformaldehído (75% de PBS y 25% paraformaldehído)

- Añadir 0,5 ml por muestra y esperar 15 min
- 2 lavados con agua miliQ
- Utilizar el kit SensoLyte pNPP Alkaline Phosphatase Assay Kit (AnaSpec Inc., USA)
- Realizar la curva de calibración utilizando ALP purificado del kit
- Medir la absorbancia a 405nm con un lector multimodo HTX (Bio-Tek).

Ensayo de mineralización: todo el proceso igual que adhesión y proliferación.

- En lugar de lisar con M-PER, fijar con paraformaldehído (75% de PBS y 25% paraformaldehído)
- Añadir 0,5 ml por muestra y esperar 15 min
- 2 lavados con agua miliQ
- 0,5 ml de alizarín red 40mM para tinción (20 min de agitación suave).
- Se añade 10% Cloruro de cetilpiridinio (CPC) en 10 mM NaH₂PO₄.
- Medir espectrofotométricamente a 570nm con un lector multimodo HTX (Bio-Tek).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. FABRICACIÓN

4.1 SELECCIÓN DEL POLVO DE PARTIDA

Se valoraron 4 tipos de polvos diferentes (apartado 3.2.1 de materiales y métodos); esférico (Ti_E), irregular grano fino (Ti), irregular de grano grueso (Ti_G) y de Ti6Al4V (Ti64). A excepción del polvo esférico (Ti_E) todos los polvos caracterizados (apartado 8.1.1 del anexo 1) se consideraron válidos para la formulación de tintas para el proceso DIW. A nivel de composición cumplen con la normativa de grado médico (ISO 5832-:1999 y ASTM F67-06) y se ha comprobado que se pueden procesar y extruir independientemente de la composición, de la distribución de tamaño de partícula y de la morfología del polvo. De entre dichos polvos se eligió el polvo (Ti) para llevar a cabo la optimización del proceso.

Utilizando el polvo Ti_G se pierde precisión, puesto que al tener una granulometría más gruesa se requiere de una punta dosificadora de al menos 1,19 mm, hecho que no ocurre con los polvos Ti y Ti64 que se pueden extruir con puntas de 0,41 mm.

Entre los polvos finos, se selecciona el polvo Ti por ser un polvo de Ti cp sin elementos de aleación. El Ti6Al4V es ampliamente utilizado tanto en fabricación aditiva como convencional para el desarrollo de implantes dentales y prótesis ortopédicas, debido a sus propiedades mecánicas, especialmente la resistencia a fatiga, y la resistencia a corrosión; sin embargo, ha habido muchas controversia respecto a los elementos aleación por la liberación de iones que puede generar citotoxicidad, entre otros problemas [272]–[275]. Debido a los requerimientos mecánicos y al tipo de prótesis a fabricar, no es necesario la utilización de Ti₆Al₄V, además la certificación del producto es más sencilla con el Ti cp, evitando la justificación de la liberación de iones.

Por otra parte, a día de hoy la mayoría de prótesis que se fabrican por AM con técnicas de sinterización por láser son de Ti6Al4V. Sólo las máquinas de EBM de Arcam pueden procesar correctamente el Ti químicamente puro (Ti cp). Por tanto, poder desarrollar un método que permita fabricar prótesis de Ti cp es un valor añadido al proyecto.

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[REDACTED]				
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]



[Redacted text block consisting of 14 horizontal black bars]

[Redacted text block consisting of 6 horizontal black bars]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

Muy inestable: [Redacted text block]

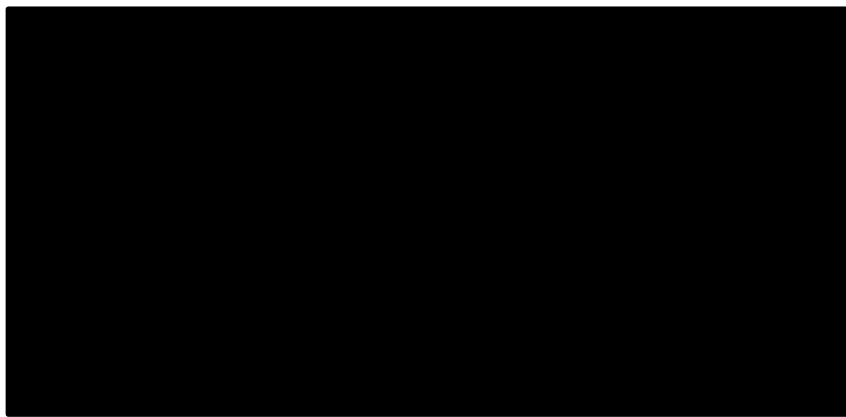
Temperatura (frío) y %HR: [Redacted text block]

Tiempo de manipulación: [Redacted text block]

Resistencia en verde:
[Redacted text block]

Resistente al agua:
[Redacted text block]

Impresión en un líquido:
[Redacted text block]



[Redacted caption text]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text]

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	9	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	SI	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	SI	[Redacted]	[Redacted]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text]

[Redacted text]

[Redacted text]

[Redacted text]

[Redacted text]

[Redacted text]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

²⁸ Por encima de la Tg los enlaces secundarios de las moléculas son mucho más débiles que el movimiento térmico de las mismas, por ello el polímero se torna gomoso y adquiere cierta elasticidad y capacidad de deformación plástica sin fractura.

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text line]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

Dependencia de parámetros de impresión

[Redacted text block]

Temperatura (Frío):

[Redacted text block]

Humedad Relativa (%HR):

[Redacted text block]

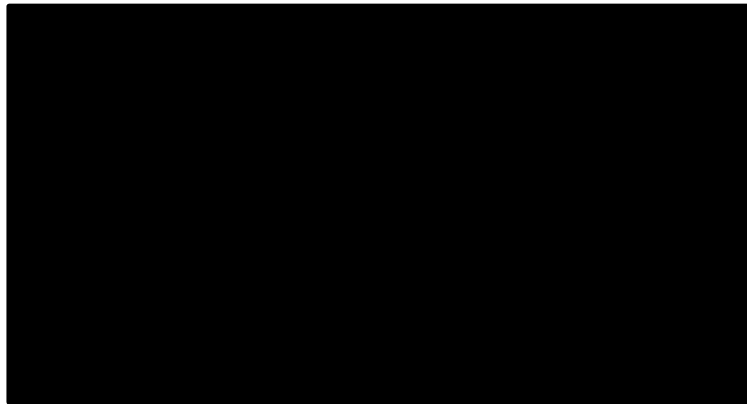
Adherencia al plato:

[Redacted text block]

[Redacted text block]

Tiempo de manipulación:

[Redacted text]



[Redacted text]

Consistencia y resistencia en verde:

[Redacted text]

Material de soporte:

[Redacted text]

[Redacted text]

4.3 IMPRESIÓN 3D

4.3.1 Desarrollo de la impresora 3D

Tras la finalización de la tesis se ha conseguido diseñar un equipo a medida según los requerimientos de las tintas y el proceso. Se empezó trabajando con la impresora piloto BCN3D+ dual paste extruder, la cual se fue modificando y reajustando a medida que iban surgiendo necesidades o problemas; sin embargo, se vio la necesidad de rediseñar por completo el equipo y el sistema de extrusión. A partir de las pruebas realizadas con la impresora piloto se elaboró una lista preliminar con los principales requerimientos para el desarrollo del nuevo equipo. Con esta información la Fundació CIM fabricó una impresora prototipo industrial. Con el prototipo se procedió igual que con la impresora piloto, se llevaron a cabo diferentes pruebas (en esta ocasión ya con la tinta optimizada), se hicieron algunos ajustes y se elaboró una lista final con los errores detectados y requerimientos finales. Con todo esto se pudo obtener un equipo a medida (impresora final), el cual fue validado mediante pruebas de impresión. En el anexo 2 se describe con detalle todo el proceso (pruebas y reajustes de la impresora piloto y prototipo) hasta la obtención del equipo final.

4.3.2 Optimización códigos (Gcode) y parámetros de impresión

4.3.2.1 Optimización con la impresora preliminar

Mediante pruebas de impresión e inspección visual de las piezas se ha ido ajustando el código de impresión (Gcode) para maximizar la calidad de la impresión. Sin embargo, no ha sido necesario realizar demasiados reajustes respecto al Gcode que viene predefinido. En la tabla 4.3 se resumen los parámetros más característicos del Gcode.

Tabla 4.3 Resumen de los parámetros más relevantes del gcode

Parámetro	Valor	Unidad
Altura de capa (<i>Layer height</i>)	0,35	mm
Altura de la primera capa (<i>First layer height</i>)	100	%
Evitar cruzar perímetros (<i>Avoid crossing perimeters</i>)	activado	-
Densidad de llenado (<i>Fill density</i>)	30-50	%
Patrón de llenado, o estructura (<i>Fill pattern</i>)	Rectilinear/HC	-
Número de perímetros	0-4	-
Velocidad de llenado/impresión (<i>Infill speed</i>)	10	mm/s
Velocidad de desplazamiento (<i>Travel speed</i>)	20	mm/s
Velocidad de la primera capa (<i>First layer speed</i>)	100	%
Impresión pieza a pieza (<i>Complete individual objects</i>)	activado	-
Diámetro de la jeringa (<i>Diameter</i>)	9,55	mm
Diámetro interno boquilla (<i>Nozzle diameter</i>)	0,41	mm

Resultados y discusión. Fabricación

Los parámetros que se modifican durante la impresión sí que se han optimizado para la tinta final, siendo el flujo 100 y la velocidad 150 los valores con los que se obtuvieron mejores resultados.

Por otra parte, se ha comprobado que si se modifica el diámetro de la jeringa o boquilla no es necesario realizar ningún reajuste en el código, únicamente introducir el nuevo valor en la configuración y el software regula los demás parámetros automáticamente.

4.3.2.2 Modificación código de impresión (Gcode) para la impresora prototipo y final

No ha sido necesario crear un nuevo Gcode desde cero para las piezas fabricadas con la impresora prototipo, ni tampoco realizar cambios en la mayoría de los parámetros más relevantes (tabla 4.3). Sin embargo, debido a las nuevas características del equipo (dimensiones, sistema de extrusión, etc...) y la metodología de impresión se han realizado modificaciones concretas en el código.

El origen de la impresora prototipo esta fuera del plato: En la impresora prototipo las dimensiones de la cama de impresión son menores y, en consecuencia, el origen queda fuera del plato (figura 4.13). Es necesario modificar las dimensiones del nuevo equipo en el código, para "avisar" que el origen está fuera de la zona de impresión y así evitar que se imprima fuera del plato. Mediante el software Repetier Host, que permite simular la impresión 3D y modificar de manera básica el stl (posición, orientación y tamaño) y el gcode, se ha configurado la nueva impresora con las características adecuadas.

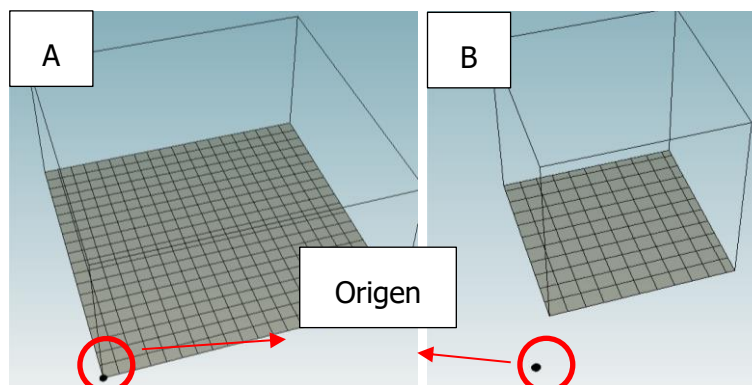


Figura 4.13 Configuración de la zona de impresión de A) Impresora piloto B) impresora prototipo.

Aumento de flujo: Tanto para las jeringas de 3cc como las de 5cc se observó que el flujo de extrusión era insuficiente. Se ha duplicado el flujo del gcode (figura 4.14), mediante el software Slic3r, y durante la impresión se trabaja al 150% para poder extruir correctamente.

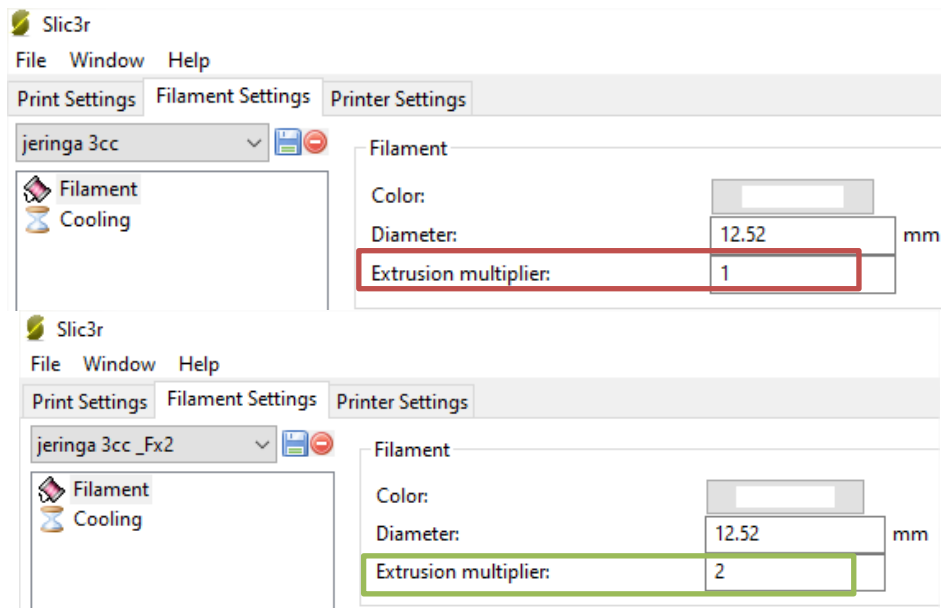


Figura 4.14 Aumento del flujo x2 en el Gcode.

El parámetro de flujo no es más que la distancia que se desplaza el embolo para extruir el material. Para asegurar que el movimiento del extrusor coincide con los parámetros del Gcode, se midió la distancia que se desplazaba en émbolo. En la impresora prototipo la distancia establecida en el código coincide con el desplazamiento real. Sin embargo, en la impresora BCN3D+ dual paste extruder no, es aproximadamente el doble, lo cual explica porque al utilizar el mismo código el valor del flujo es insuficiente.

Velocidad: No se ha modificado la velocidad en el Gcode, pero si en el equipo durante la impresión, y se ha demostrado que es posible trabajar a una velocidad de 300% sin comprometer la calidad de la impresión. Es mejor no modificar el código y cambiar la velocidad durante la impresión, ya que en función del diseño o tipo de impresión en preferible acabar de ajustar la velocidad manualmente. Por ejemplo, para piezas cilíndricas que no se imprimen dentro de un líquido, las primeras capas se extruyen a menor velocidad para asegurar la correcta adhesión al plato.

Eliminación comandos G28 y M84: En la mayoría de Gcodes de las impresoras convencionales suele haber un comando G28 al inicio y al final de la impresión y un M84 únicamente al final. El G28 es la acción *Autohome*, que hace que todos los ejes (indicados tras el comando) retrocedan a la posición de origen y M84 apaga los motores. Debido a la versatilidad del proceso (imprimir dentro de un recipiente con gel o no) es preferible eliminar el comando G28 del Gcode y efectuar los movimientos manualmente (con el programa del equipo). Por otra parte, a veces cuando se desconectan los motores se pierde la posición del eje Z y es necesario volver a calibrar utilizando la macro *set z0*, por lo que es más sencillo eliminar el comando M84 del Gcode.

4.4 PROCESADO DE LAS PIEZAS EN VERDE

El procesado en verde es la etapa que transcurre desde que finaliza la impresión 3D de la pieza hasta que se introduce en el horno de sinterizado, siendo la eliminación del ligante (debinding) la parte más característica. En este apartado se presentan los resultados de la optimización de la eliminación de ligante de las muestras impresas con la tinta final base PLA/Pluronic, así como un estudio de resistencia y mecanizado en verde.

4.4.1 Estudios previos con la tinta base Pluronic

Los estudios previos sirvieron (apartado 8.1.3 del anexo 1) para reforzar la importancia de la formulación de la tinta, así como para identificar la problemática de las distorsiones en el secado para las muestras porosas tipo cuña veterinaria. Además, se evidenció la repercusión que tiene la eliminación del aglutinante en el %C y la necesidad de buscar vías alternativas o complementarias a la eliminación térmica.

4.4.2 Optimización proceso de eliminación del ligante

Al formular la tinta final base PLA/Pluronic, las características y propiedades de las piezas impresas cambian, y, en consecuencia, se abre un abanico de posibilidades en cuanto al procesado de las piezas en verde. En el caso de la eliminación, surge la posibilidad de aplicar una etapa previa al tratamiento térmico, disolviendo parte del ligante en agua.

4.4.2.1 Eliminación por inmersión en agua

Para valorar el efecto del agua en la eliminación del ligante se sumergieron las muestras en agua bajo diferentes condiciones, se dejaron secar overnight para poder pesar correctamente y se calculó la pérdida de masa para cada condición. Los parámetros y condiciones del proceso están detallados en el apartado 3.5.2.1 de materiales y métodos.

Efecto del tiempo de inmersión de agua

Se sumergieron las muestras a diferentes tiempos (0.25, 0.5, 1, 2, y 4 horas) renovando el agua cada 15 minutos y sin renovar (volumen de agua constante). En la figura 4.15 se presentan los resultados.

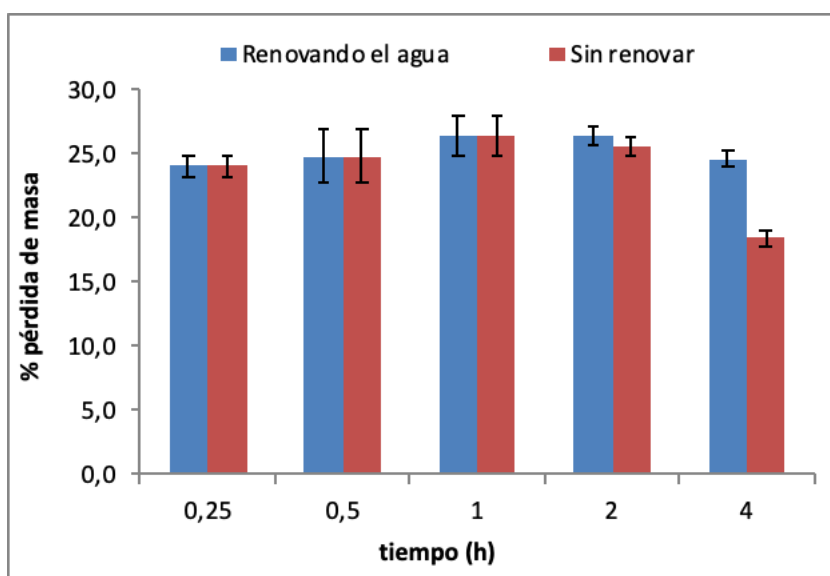


Figura 4.15 Resultados de la inmersión en agua a temperatura ambiente y diferentes tiempos (0.25, 0.5, 1, 2 y 4 horas). Renovando el agua y manteniendo el volumen constante.

Como se puede ver en el gráfico (figura 4.15) a parte del tiempo se aplicaron dos condiciones: renovando el agua y sin renovar. En los primeros ensayos (sin renovar el agua) se observó que a partir de las 2 horas la pérdida de masa disminuía. Se consideró que podría ser por dos motivos; que el agua se saturase del producto de la eliminación y los residuos se depositasen en las muestras, o que el PLA al ser un polímero muy higroscópico empezase a adsorber agua. Al repetir el ensayo de inmersión renovando el agua cada 15 minutos la pérdida de masa se mantuvo constante, lo cual indica que la disminución de la pérdida de masa era debida a la saturación del agua.

Efecto de la temperatura de inmersión en agua

La tinta final está compuesta de dos polímeros: Pluronic y PLA. El primero es un polímero termo reversible, por lo que al bajar la temperatura se hace más soluble [143]. Por otra parte, el PLA no es soluble en agua, pero sí susceptible a degradación hidrolítica [281], algo que se puede acelerar aplicando temperatura. Por lo tanto, con el fin de disminuir el tiempo o aumentar porcentaje de eliminación se repitió el ensayo para tiempos cortos en agua fría (10°C) y caliente (40°C). Los resultados se muestran en la figura 4.16.

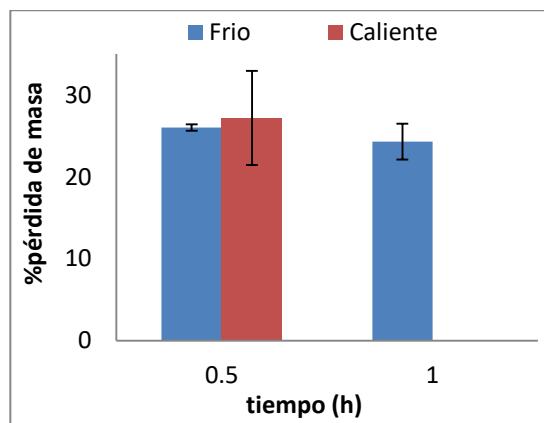


Figura 4.16 Resultados de la inmersión en agua fría (10°C) y caliente (40°C), a 0,5 y 1 hora.

Los resultados indican que no hay diferencias al aplicar frío ni calor. En este último caso los resultados son incluso peores ya que hay más dispersión en los mismos. Además, si se dejan las muestras más de media hora en caliente estas colapsan, seguramente debido a la degradación del PLA y/o la generación excesiva de burbujas por la rápida evaporación del disolvente. Por lo tanto, sumergiendo las muestras en agua durante una hora se consigue pérdida de masa máxima (~25%), sin necesidad de aplicar temperatura ni renovar el agua.

Efecto de la inmersión en agua sobre las muestras

Se ha demostrado que con la inmersión en agua se pierde alrededor de un 25% en masa. Sin embargo, falta corroborar a qué se debe esta pérdida. El titanio no se ve afectado por el agua y tampoco se observaron restos de polvo, desprendimientos de partículas o desmoronamiento de las muestras. El PLA tampoco se ve afectado al ser sumergido en agua durante una hora ya que no se disuelve ni se degrada. Por lo tanto, pérdida de peso únicamente puede ser a causa de la eliminación del acetato de etilo y parte del Pluronic. El porcentaje real de acetato de etilo que tienen las muestras en el momento de ser sumergidas en agua es inferior al de la tinta inicial, ya que, como se ha comentado en anteriores apartados, se trata de un compuesto volátil y se evapora una gran parte durante la impresión. Además, observando las muestras durante la inmersión en agua se puede ver claramente cómo se está liberando (eliminado) algo más que el disolvente. En la figura 4.17 se muestra una fotografía de una muestra porosa segundos después de ser sumergida en agua.



Figura 4.17 Imagen de una muestra durante la inmersión en agua a temperatura ambiente.

En la imagen de la figura 4.17 se ve cómo, al ser sumergida en agua, la muestra comienza a desprender una sustancia blanquecina. El acetato de etilo es un líquido incoloro (ficha de seguridad), por lo tanto, lo que se observa podría ser parte del Pluronic que se está disolviéndose en el agua.

Para conocer con mayor exactitud cuál es la composición de las muestras antes de llevar a cabo la inmersión en agua, se calculó la pérdida de masa (evaporación del acetato de etilo) durante una impresión, pesando desde que se prepara la tinta hasta que acaba una impresión estándar (5-15 min). Como resultado se obtuvo que la tinta pierde en pocos minutos $\sim 9\%$ de masa y se mantiene estable, pasados 15 min la pérdida sigue siendo la misma. En la tabla 4.4 se recogen los resultados de este ensayo y de la inmersión en agua (más secado overnight), recalculando los porcentajes tras cada etapa.

Tabla 4.4 Evolución del % en masa de los componentes hasta la inmersión en agua. Composición inicial de la tinta, después del tiempo de impresión y tras la inmersión en agua (más secado overnight).

Composición	%Titanio	%PLA	%Acetato	%Pluronic	% Agua
Tinta final					
1	60,0	6,0	24,0	3,0	7,0
Evaporación del acetato durante la impresión (5-15 min) $\approx 9\%$					
2	65,9	6,6	16,5	3,3	7,7
Inmersión en agua (más secado): pérdida de un 25% al eliminar acetato, parte del Pluronic y agua					
3	87,9	8,8	0,0	2,9	0,4

La tinta final esta compuesta por 60% de polvo de titanio, 30% disolución de PLA del 20% (6% de PLA y 24% de acetato de etilo) y 10% de hidrogel de Pluronic al 30% (3% de Pluronic y 70% de agua). Tras la inmersión en agua (más secado overnight) se pierde un 25% en masa, dado después de la impresión únicamente queda un 16,5% de acetato de etilo el 8.5% restante de pérdida debería ser parte de Pluronic (disuelto) y agua (del secado).

El Pluronic es un copolímero en bloque formado por polietilenglicol (PEG) y propilenglicol (PPG), donde PPG es el segmento hidrofóbico que contribuye a un 30% del bloque y el PEG es el segmento hidrofílico que conforma el otro 70% [144]. La parte hidrofílica del Pluronic se

Resultados y discusión. Fabricación

disuelve rápidamente después de entrar en contacto con la fase acuosa [142]. En consecuencia, es factible que durante la etapa de inmersión en agua una parte del Pluronic se haya disuelto y eliminado.

Por otra parte, es posible que el PLA se mezcle con parte del PEG impidiendo la liberación del mismo, de hecho, la combinación PLA/PEG se utiliza en impresión 3D de scaffolds en ingeniería de tejidos [282].

Con todo esto, se ha considerado que un tercio del Pluronic se disuelve y elimina durante la etapa de inmersión en agua, obteniendo muestras con la composición 3 de la tabla 4.4. En el siguiente apartado (eliminación por degradación térmica) se podrá comprobar si los cálculos tras la inmersión en agua son correctos.

Distorsiones durante la inmersión en agua (más secado overnight)

Tal y como se vio en los estudios previos (apartado 8.4 del anexo 1), uno de los problemas a tener en cuenta son las distorsiones generadas durante el secado. En este caso, la etapa de inmersión en agua no sólo se utiliza para la eliminación de parte del ligante, sino que también para conseguir un secado uniforme y reducir distorsiones. El disolvente mayoritario es el acetato de etilo, y al eliminarse las muestras se endurecen. Al introducir las muestras en agua se disuelve parte del disolvente, acelerando la eliminación y asegurando que se lleve a cabo de manera homogénea en toda la pieza.

Por otra parte, dado que las muestras presentan una buena resistencia en verde (se entrará en profundidad más adelante) es posible eliminar el agua y el disolvente dentro de un molde impidiendo la deformación. Se diseñaron moldes a medida para cada tipo de cuña y se fabricaron mediante impresión 3D de plástico (FDM). En la figura 4.18 se muestra un ejemplo del diseño en 3D de un molde, así como el resultado eliminar el agua y disolvente de la pieza.

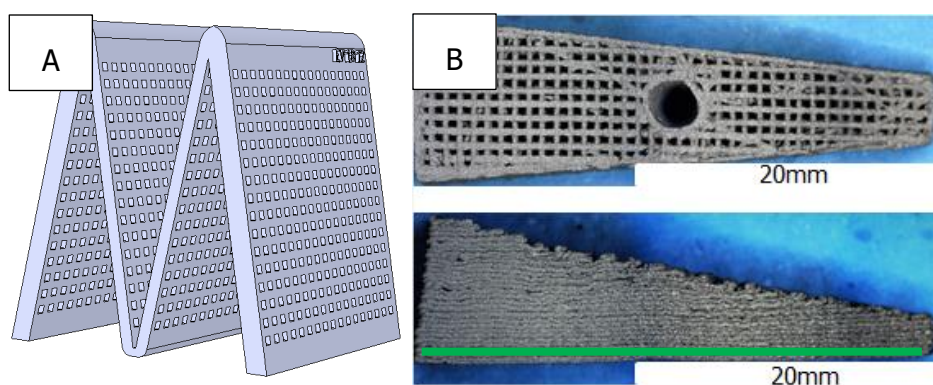


Figura 4.18 A) Diseño en 3D de un molde para colocar la muestra durante la inmersión en agua y B) muestra tras la inmersión con el uso del molde.

Como se aprecia en la imagen, al eliminar el disolvente y secar en el molde la cuña no presenta deformaciones en forma de pandeo. Conviene recordar que se eligió este tipo de muestra (cuña veterinaria) ya que, debido a su diseño alargado y con poca altura, era la más problemática durante el secado (figura 8.24 del anexo 1). Por lo tanto, se puede afirmar que

se ha conseguido solucionar el problema de las distorsiones de una manera eficiente e industrialmente viable.

4.4.2.2 Eliminación por degradación térmica

Para conocer el comportamiento de las muestras en verde frente a la temperatura (degradación), y así poder diseñar un tratamiento térmico para la eliminación del ligante, primero se llevó a cabo un estudio mediante análisis termogravimétrico (TGA).

Estudio mediante TGA del efecto de la composición de la tinta en la degradación térmica

El estudio se ha realizado sobre las tres tintas desarrolladas (base Pluronic, base PLA y base PLA/Pluronic) buscando una reducción en la temperatura de eliminación al mezclar los dos polímeros. Las tintas preliminares base PLA y base Pluronic se dejaron al aire overnight antes de realizar el ensayo para evaporar el disolvente o el agua (etapa de secado). Con la tinta final base PLA/Pluronic se realizó el mismo proceso como si se tratase de una pieza: impresión estándar (5-15 min al aire), 1h de inmersión en agua a temperatura ambiente (más secado overnight) y eliminación térmica (análisis termogravimétrico). En la figura 4.19 se los resultados de las tres tintas.

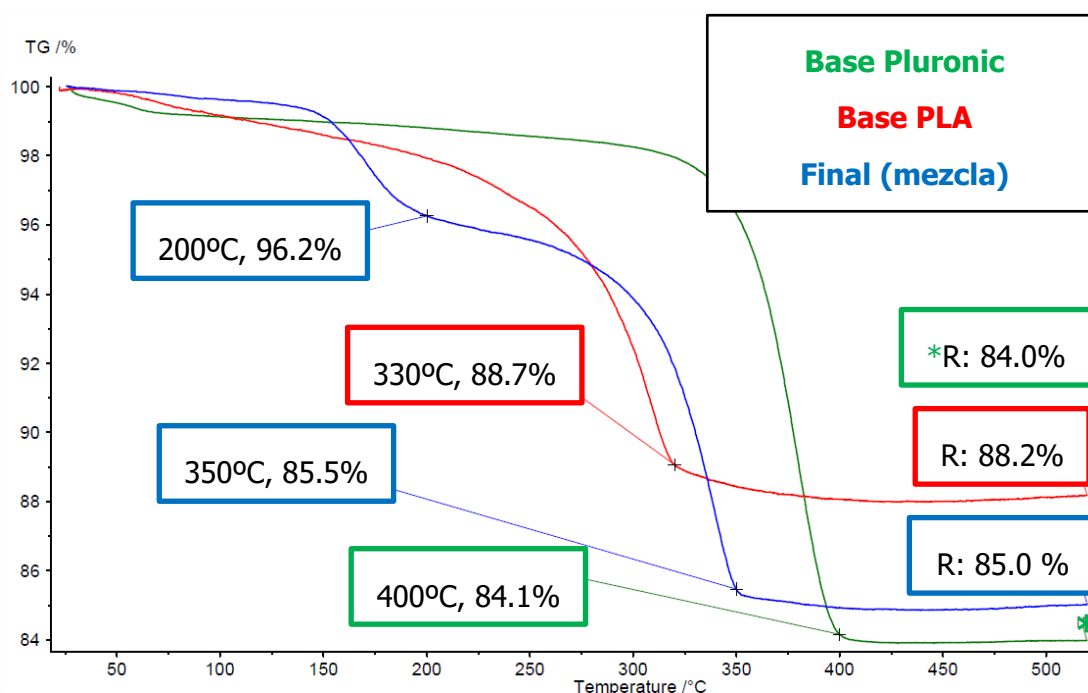


Figura 4.19 Comportamiento térmico de las tintas preliminares base Pluronic y base PLA y de la tinta final base PLA/Pluronic. Análisis termogravimétrico calentando a 5°C/min hasta 520°C.

En la figura 4.19 se observa como la tinta base Pluronic (en verde) presenta el mayor porcentaje de pérdida de masa (final de la curva) a 400°C dejando un 84,1% en masa, y tras la finalización del ensayo (a 520°C) sigue quedando un 84,0%. La tinta base PLA (en rojo) presenta el mayor porcentaje de pérdida de masa a 330°C dejando un 88,7% de masa, y tras la finalización del ensayo (a 520°C) sigue quedando un 88,2%. En cuanto a la tinta final (en

Resultados y discusión. Fabricación

azul), se observan dos curvas; a 200°C se produce la primera eliminación dejando un 96,2% en peso (final de la curva 1), y el mayor porcentaje de pérdida de masa ocurre a 350°C (final de la curva 2) dejando un 85,5%, que tras finalizar en ensayo quedará en 85,0% (a 520°C).

Para entender mejor el comportamiento de las tintas (pérdida de masa) durante el proceso, en las tablas 4.5 y 4.6 se recogen los resultados del TGA (figura 4.19), junto con el cálculo de porcentajes por etapa (restando el porcentaje de los componentes que se eliminan y recalculando el de los demás). Primero se valorarán las tintas preliminares base PLA y base Pluronic (tabla 4.5) y después se discutirán los resultados de la final PLA/ Pluronic (tabla 4.6).

Tabla 4.5 Evolución del % en masa de los componentes de la tinta base Pluronic y base PLA. Composición inicial de las tintas, después del secado (Pluronic) / evaporación del disolvente (PLA) y resultado del análisis termogravimétrico (TGA).

Composición	%Titanio	%Pluronic	% Agua	%Titanio	%PLA	%CHCl ₃
	Tinta base Pluronic			Tinta base PLA		
1	60,0	12,0	28,0	60,0	8,0	32,0
	secado (eliminación de agua)			evaporación (eliminación del CHCl ₃)		
2	83,3	16,7	0,0	88,2	11,8	0,0
	Resultado TGA			Resultado TGA		
-	84,0	16,0	-	88,2	11,8	-

La tinta preliminar base Pluronic esta compuesta por 60% de polvo de Ti y 40% de hidrogel de Pluronic del 30% (12% de Pluronic y un 28% de agua). Tras la impresión se dejan reposar las tintas durante la noche, para eliminar el contenido de agua y asegurar que sean manipulables (etapa de secado).

Considerando que únicamente se elimina el agua (por completo), tras el secado se perdería el 28% de agua quedando así un 16,7% de Pluronic y 83,3% de titanio (tabla 4.5 composición 2 tinta base Pluronic). Los resultados del TGA (figura 4.19) indican que tras aplicar temperatura se pierde un 16% de masa (eliminación parte polimérica) y queda un 84% de residuo (parte metálica), coincidiendo con los valores esperados tras el secado, teniendo en cuenta el error del propio equipo y el de medida en la etapa de secado.

La tinta base PLA esta compuesta por 60% de polvo de Ti y un 40% de disolución de PLA del 20% (8% de PLA y 32% de cloroformo). Tras la impresión se dejan las muestras toda la noche para asegurar que todo el disolvente (en este caso cloroformo) se evapora. Al tratarse de un disolvente volátil las muestras se pueden manipular prácticamente al instante; sin embargo, se dejaron suficiente tiempo para asegurar la eliminación total.

Considerando que tras dejar toda la noche al aire únicamente evapora el disolvente (por completo), tras este proceso se perdería un 32% de masa de cloroformo quedando así un 11,8% de PLA y 88,2% de Ti (tabla 4.5 composición 2 tinta base PLA). Esto coincide con los resultados del TGA (figura 4.19), que indican que a 330°C se elimina prácticamente todo el ligante, quedando un 88,2 % tras finalizar el análisis.

Con la tinta final, al tratarse de una mezcla (tabla 4.6) e intervenir más etapas en la eliminación, el control de la pérdida de masa es más complejo. En la tabla 4.4 se recogieron los porcentajes teóricos de cada componente hasta la etapa de inmersión en agua, en la tabla

4.6 se añaden los resultados del TGA para comprobar si los valores de eliminación térmica coinciden.

Tabla 4.6 Evolución del % en masa de los componentes de la tinta final base PLA/Pluronic. Composición inicial de la tinta, después del tiempo de impresión, tras la inmersión en agua (más secado overnight) y el resultado del análisis termogravimétrico (TGA).

Composición	%Titanio	%PLA	%Acetato	%Pluronic	% Agua
Tinta final					
1	60,0	6,0	24,0	3,0	7,0
Evaporación del acetato durante la impresión (5-15 min) \approx 9%					
2	65,9	6,6	16,5	3,3	7,7
Inmersión en agua (más secado): pérdida de un 25% al eliminar acetato, parte del Pluronic y agua					
3	87,9	8,8	0,0	2,9	0,4
Resultado TGA					
-	85,5	11,3	-	2,8	0,9

Los valores del TGA coinciden con los supuestos tras la inmersión en agua (con secado overnight). En la figura 4.19 se puede ver como el porcentaje de Pluronic que se elimina a 200°C (2,8%) es prácticamente el mismo al esperado tras la inmersión en agua y secado (2,9%). Respecto al PLA, se calculó que tras la inmersión en agua y secado quedaría un 8,8% de PLA mientras que el resultado del TGA indica que se elimina un 11,3%. Estas diferencias en los valores son asumibles considerando la dispersión de resultados y el error asociado a las medidas.

Tras la inmersión en agua (más secado) se consideró que no se eliminaba por completo el contenido de agua de las muestras ya que el PLA es muy higroscópico, algo que se confirma con el TGA. Se calculó que tras la inmersión y secado quedaría un 0,4% de agua y según el resultado del TGA queda un 0,9%.

En el gráfico del TGA (figura 4.19) se observa cómo, al realizar la mezcla, el comportamiento térmico de ambos compuestos cambia. El Pluronic es un copolímero en bloque formado por PPG y PEG, y estos se pueden combinar con solventes, homopolímeros y otros copolímeros. Según las fichas de seguridad de ambos polímeros (PPG y PEG) las temperaturas de ebullición coinciden con el primer tramo de eliminación (\sim 200°C). Por lo tanto, todo indica que al hacer la mezcla el copolímero ha cambiado dando lugar a otros compuestos.

En el PLA se observa un ligero cambio en el comportamiento térmico, dónde la temperatura de eliminación pasa de 330°C a 350°C (figura 4.19). Se han llevado a cabo diversos estudios con mezclas de PLA con PPG, PEG e incluso con diferentes tipos de Pluronic [283]–[286] pero no se observaron diferencias en la T_g ni la T_m [283]. Pinese y colaboradores [284], desarrollaron scaffolds base copolímeros de PLA-Pluronic y no observaron diferencia entre la T_m de los diferentes copolímeros y la del PLA. Por lo tanto, en el caso que al mezclar las tintas parte del Pluronic hubiese formado un copolímero con el PLA, no explicaría el incremento de temperatura de eliminación. Por otra parte, al degradarse el PLA, aumenta el grado de cristalinidad y, en consecuencia las propiedades térmicas pueden variar [252]. Se ha demostrado que la degradación hidrolítica puede incrementar la T_g y T_m del PLA [253]. Las

Resultados y discusión. Fabricación

soluciones agua-disolvente (en este caso agua-acetato de etilo) pueden inducir cristalización y degradación hidrolítica sobre el PLA [281]. Por lo tanto, el efecto del agua y/o acetato de etilo sí permite explicar el cambio del comportamiento térmico.

Estudio mediante TGA del efecto del tratamiento de inmersión en agua en la degradación térmica

Para estudiar el efecto del agua en la degradación térmica y corroborar los cálculos de la pérdida de masa tras la inmersión en agua se realizó un TGA sobre la tinta final PLA/Pluronic con y sin la etapa de inmersión en agua. A una tinta se le realizó el mismo proceso como si se tratase de una pieza: impresión estándar (5-15 min al aire), 1h de inmersión en agua a temperatura ambiente (más secado overnight) y eliminación térmica (análisis termogravimétrico). A la tinta sin inmersión en agua únicamente se dejó al aire overnight antes de realizar el ensayo para evaporar el disolvente y el agua (etapa de secado). En la figura 4.20 se presentan los resultados.

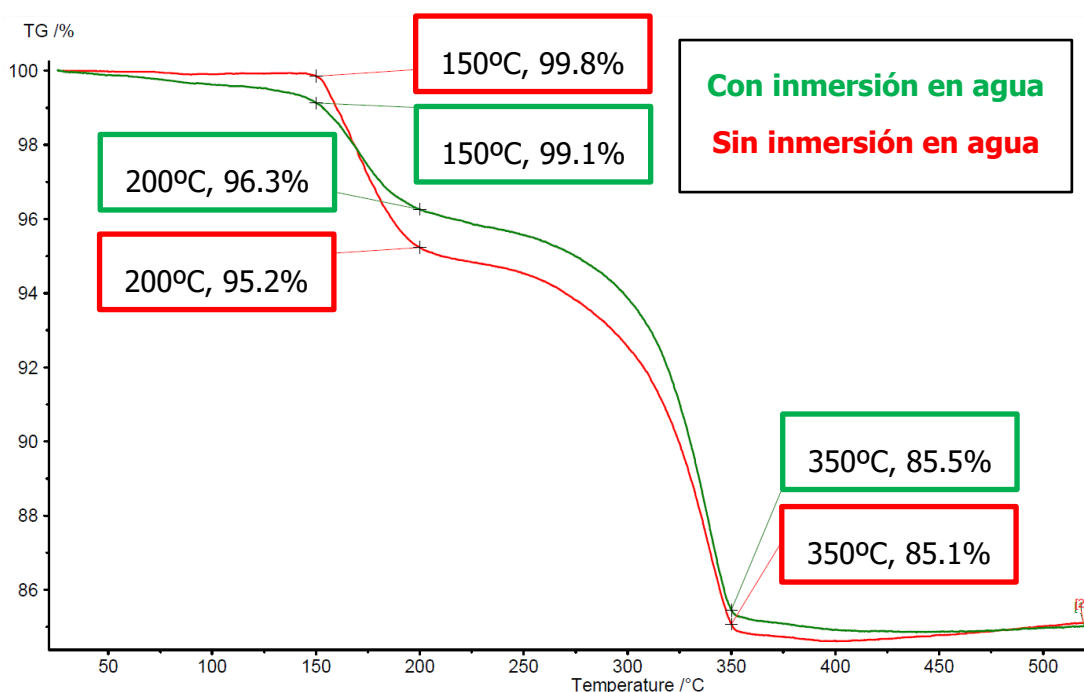


Figura 4.20 Efecto de la inmersión previa en agua en el comportamiento térmico de la tinta base PLA/Pluronic mediante análisis termogravimétrico. 5°C/min hasta 520°C.

Los resultados del TGA de la figura 4.20 confirman que con el tratamiento en agua se elimina parte del Pluronic. La muestra con el tratamiento de inmersión en agua (en verde) a 150°C presenta un 99,1% de masa y a 200°C pasa a tener un 96,3% (2,8% de pérdida de masa), mientras que la muestra sin el tratamiento previo (en rojo) a 150°C presenta un 99,8 y a 200°C pasa a tener un 95,2% (4,6% de pérdida de masa).

En ambos casos la temperatura de eliminación del PLA es la misma; el mayor porcentaje de pérdida de masa ocurre a 350°C, dejando un 85,5% en el caso del tratamiento con inmersión y un 85,1% en el de sin inmersión. Por lo tanto, la etapa de inmersión no le influye en el comportamiento térmico, y, como se ha explicado antes, es al realizar la mezcla de polímeros cuando se produce el cambio de comportamiento del PLA.

En la tabla 4.7 se recoge la evolución del % en peso de todo el proceso sin llevar a cabo la etapa de inmersión en agua. En su lugar se dejaron las muestras durante la noche (como en las tintas base PLA y Pluronic) para asegurar el secado y evaporado de todo el acetato de etilo.

Tabla 4.7 Evolución del % en masa de los componentes de la tinta base PLA/Pluronic sin la etapa de inmersión en agua. Composición inicial de la tinta, después de la evaporación de disolventes y resultado del análisis termogravimétrico (TGA).

Composición	%Titanio	%PLA	%Acetato	%Pluronic	% Agua
Tinta final					
1	60,0	6,0	24,0	3,0	7,0
Evaporación del acetato durante la impresión (5-15 min) ≈ 9%					
2	65,9	6,6	16,5	3,3	7,7
Sin inmersión en agua, únicamente secado/evaporación (eliminación de disolventes)					
3	87,0	8,7	0,0	4,4	0,0
Resultados TGA					
	85,1	10,1	0,0	4,6	0,0

De igual manera que con las tintas base Pluronic y PLA se ha considerado que en la etapa de evaporación se eliminado todo el disolvente (en este caso agua y acetato de etilo). Teniendo en cuenta esto, tras el secado y sin la etapa de inmersión en agua queda un 4.4% de Pluronic (tabla 4.7, composición 3). El valor calculado coincide con los resultados del TGA, en donde a 200°C se elimina un 4.6% de Pluronic (figura 4.84, 99,8% - 95,2%). Por otra parte, el resultado del TGA de la muestra con etapa de inmersión en agua indica que a 200°C se elimina un 2,8% de Pluronic (figura 4.20, 99,1% - 96,3%). Por lo tanto, si se lleva a cabo el tratamiento en agua se elimina por vía térmica alrededor de un tercio menos de Pluronic.

Estudio del comportamiento térmico a escala laboratorio (termogravimetría)

A partir de los estudios previos, realizados con la tinta base Pluronic (apartado 8.1.3 del anexo 1), y de los datos del TGA de la tinta final (tabla 4.6), se decidió replicar el tratamiento isotérmico a 300°C sobre muestras reales impresas. La eliminación del ligante se evaluó mediante el porcentaje de peso perdido durante el tratamiento térmico y el análisis del %C. Dicho valor está relacionado con la cantidad de ligante y, por lo tanto, es un buen indicador del estado de la eliminación comparando el %C del polvo inicial. En la figura 4.21 se presentan los resultados de la termogravimetría.

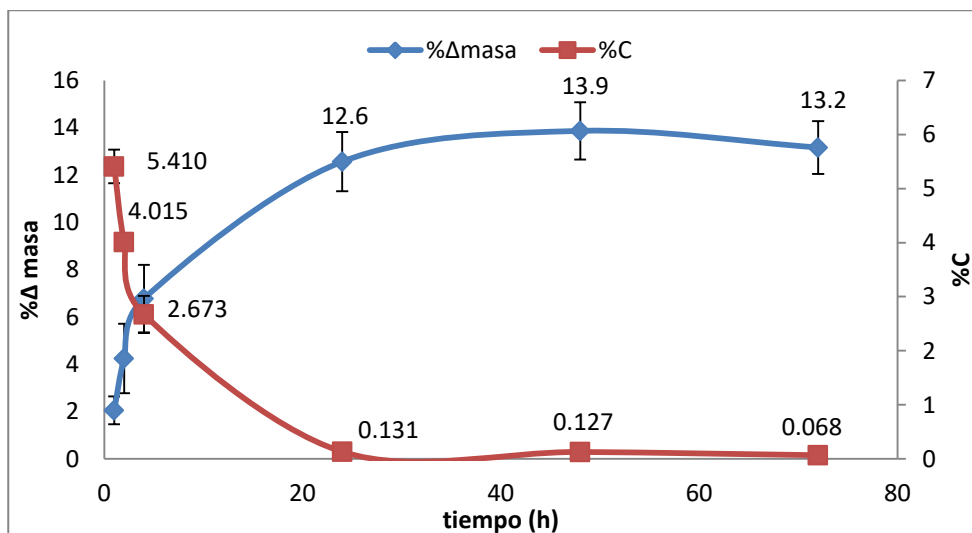


Figura 4.21 Porcentaje de carbono y de pérdida de masa a 300°C durante 1, 2, 4, 24, 48 y 72 horas.

Los resultados confirman la relación entre el %C y la pérdida de masa (son inversamente proporcionales) validando el %C como indicador del estado de eliminación del polímero. Como se observa en el gráfico (figura 4.21), a partir de 24h se estabiliza la pérdida de masa debido a la eliminación de la mayor parte del polímero. Sin embargo, no es hasta pasadas 72h cuando se consigue reducir el %C por debajo del 0,08%C (valor máximo permitido por las normas ISO5832:1999 y ASTM-F67-06) y, por lo tanto, eliminar del todo el polímero. En la tabla 4.8, se recoge la evolución del % en peso de los componentes durante todas las etapas del proceso, para así entender mejor los componentes y porcentajes que se han eliminado en cada etapa del proceso.

Tabla 4.8 Evolución de los componentes de la tinta final en cada una de las etapas de eliminación del ligante PLA/Pluronic. Composición inicial de la tinta, después del tiempo de impresión, tras 1 hora de inmersión en agua (más secado overnight) y tras 72 horas de tratamiento térmico a 300°C.

Composición	%Titanio	%PLA	%Acetato	%Pluronic	% Agua
Tinta final					
1	60,0	6,0	24,0	3,0	7,0
Evaporación del acetato durante la impresión (5-15 min) ≈ 9%					
2	65,9	6,6	16,5	3,3	7,7
Inmersión en agua (más secado): pérdida de un 25% al eliminar acetato, parte del Pluronic y agua					
3	87,9	8,8	0,0	2,9	0,4
Tratamiento térmico a 300°C: pérdida de un ≈13% que coincide con la carga polimérica					
4	87	0,0	0,0	0,0	0,0

Los resultados de la termogravimetría indican que tras 72 horas a 300°C se pierde un 13% de la masa debido a la completa eliminación de la parte polimérica sin dejar residuos (0,068% de C); por lo tanto, el 87% restante es 100% titanio. Este valor concuerda con el porcentaje de

ligante que se calculó que quedaría tras la inmersión y secado (8,8% de PLA + 2,9% de Pluronic + 0,4% de agua, composición 3, tabla 4.8).

El %C obtenido se mantiene dentro de la normativa (0,08%C); por lo tanto, el tratamiento térmico a 300°C y 72 horas para la eliminación del ligante se considera válido.

Estudio del efecto de la temperatura en la oxidación del polvo de Ti

Como se ha demostrado antes, el %C es un buen indicador para validar el ciclo de eliminación térmica. Sin embargo, es necesario tener en cuenta de igual manera el %O, ya que su contenido también está limitado por la normativa (ISO5832:1999 y ASTM-F67-06), además de influir considerablemente en las propiedades mecánicas. En el titanio a temperatura ambiente se forma espontáneamente una película de óxido en su superficie, pero es a altas temperaturas (alrededor de 300°C y 400°C) cuando se induce la formación de una capa de óxido más gruesa que va acompañada de la disolución del oxígeno. Dicha temperatura es la temperatura de oxidación, o de trabajo dependiendo de la aplicación [254]–[256]. La mayoría de estudios hacen referencia al titanio macizo, pero en estudios previos se ha visto que con el polvo puede ser diferente, especialmente con el de granulometría fina (Ti, tabla 8.1), el cual se ha estudiado y confirmado que es mucho más reactivo (figura 8.4, apartado 8.1 del anexo 1). Por lo tanto, se llevó a cabo un estudio para conocer la influencia de la temperatura en la oxidación del polvo de titanio utilizado. Se midió el %O del polvo de titanio calentado 1 hora a diferentes temperaturas (figura 4.22). También se observó el aspecto de los polvos con el fin de asociar el cambio de coloración a un grado de oxidación (figura 4.23).

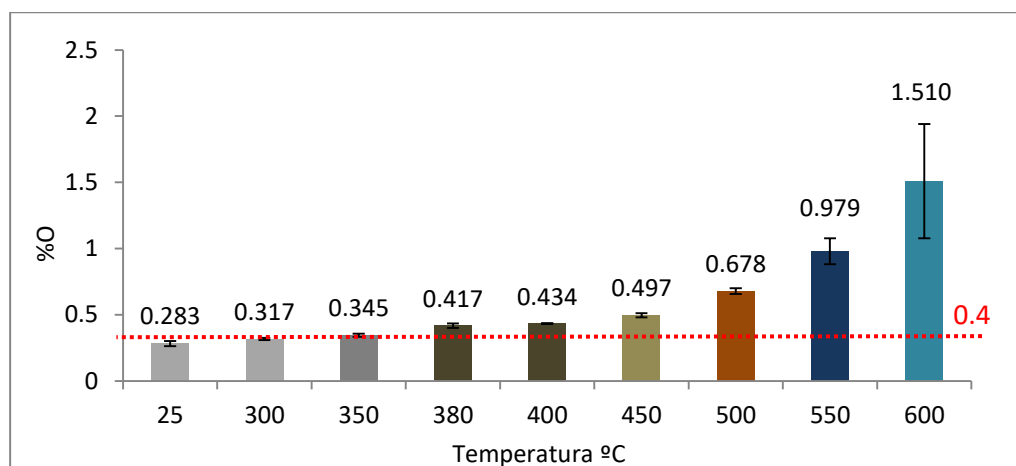


Figura 4.22 Porcentaje de Oxígeno presente en el polvo después de tratamientos térmicos a diferentes temperaturas durante 1h.

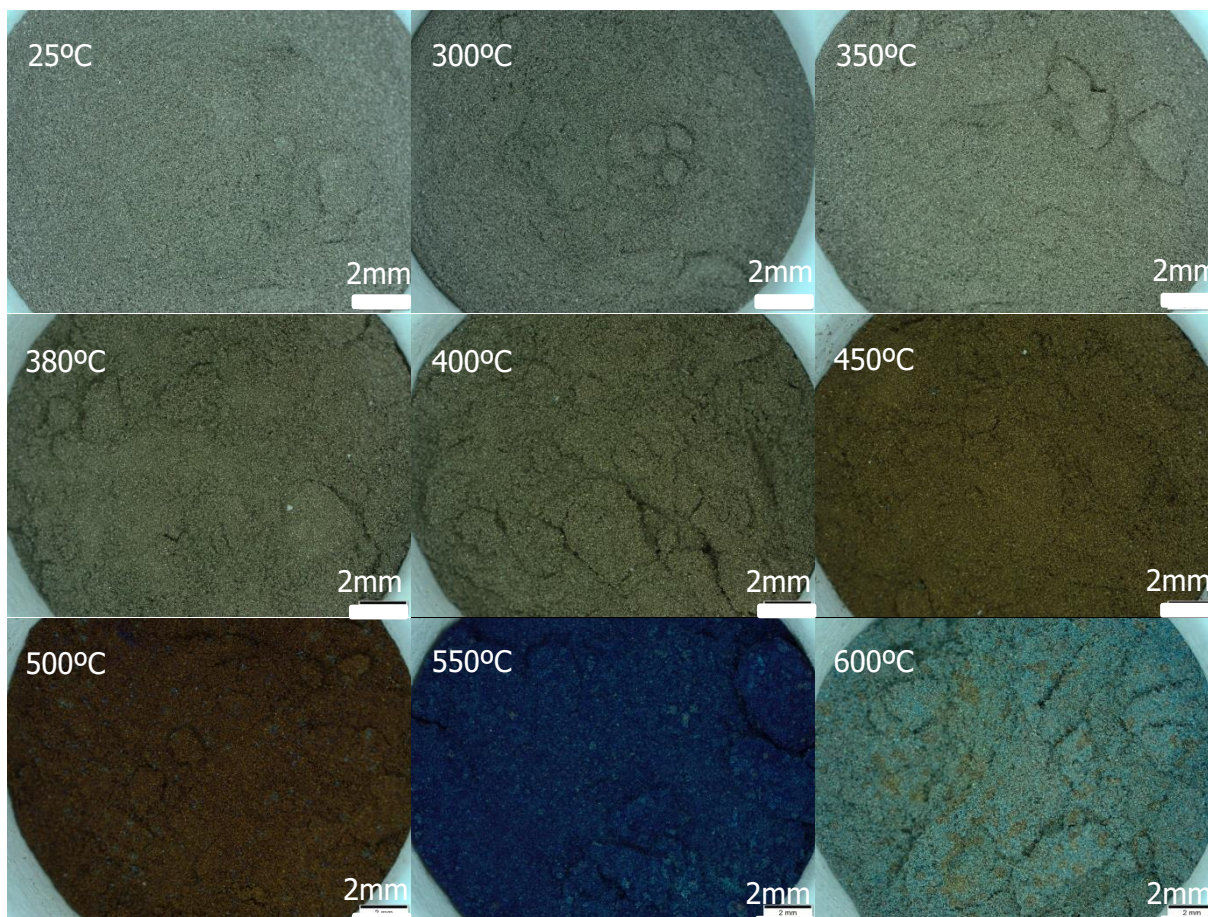


Figura 4.23 Superficie del polvo tras calentar 1 hora a diferentes temperaturas.

Como se observa, en la gráfica de la figura 4.22, el %O del polvo de titanio aumenta con la temperatura, siendo 350°C el límite ya que a 380°C se excede el contenido máximo permitido por la norma (0,4%) para materiales de aplicación médica. Paralelamente, también se analizó el contenido en carbono de los diferentes polvos y no se observaron cambios con la temperatura. Todas las muestras presentaron valores inferiores al 0,08%C, prácticamente iguales al polvo de partida.

Por otra parte, en las imágenes del polvo (figura 4.23) se puede ver como hay un evidente cambio de coloración en función del contenido de oxígeno. Esto puede ser de gran ayuda como un indicador del estado del proceso, detectando fácilmente altos contenidos de oxígeno en las muestras, sin necesidad de realizar un análisis cuantitativo.

A día de hoy, se han hecho diferentes estudios sobre la coloración del titanio, la mayoría por oxidación anódica o por láser. Es un tema de gran interés con aplicaciones en distintos campos como; la identificación de tallas en implantes, la estética dental e incluso en joyería [287]–[290]. Sin embargo, en la bibliografía no hay suficiente información sobre el contenido de oxígeno, ni la coloración por oxidación térmica, para polvos de titanio de una granulometría concreta, por lo que el estudio que se ha llevado a cabo era necesario y de gran valor tanto a nivel industrial como científico.

Efecto de la temperatura y el tiempo en el contenido de O y C

En la termogravimetría se demostró que a 300°C y 72h (figura 4.21) se elimina la mayoría de ligante sin generar contaminación (%C dentro de norma). En el estudio sobre el efecto de la temperatura en la oxidación (figura 4.22) se vio que a 300°C el polvo tiene un %O que está dentro de los valores permitidos. Sin embargo, dicho porcentaje aumenta respecto al polvo de partida (temperatura ambiente), lo cual indica que a esta temperatura el oxígeno difunde en el polvo de Ti y, en consecuencia, es posible que con el tiempo el contenido de oxígeno aumente hasta quedar fuera de norma. A partir de estos datos se propusieron y evaluaron diferentes tratamientos térmicos (TT) para la eliminación del ligante. En tabla 3.11 del apartado 3.5.2.2 de materiales y métodos se detallan las condiciones de los tratamientos propuestos.

Para conocer la influencia del tiempo a 300°C se analizó el contenido de oxígeno del polvo (a modo control) y de carbono y oxígeno en muestras en verde (impresas con la tinta final base PLA/Pluronic) a 1, 24, 48 y 72 horas. En la tabla 4.9 se recogen los resultados de los análisis. Como se ha comentado anteriormente, el %C del polvo no cambia con la temperatura, por lo que no se han incluido.

Tabla 4.9 Resultados del análisis del %O y %C del polvo de titanio y de las muestras impresas tras los tratamientos térmicos a 300°C durante 1, 24, 48 y 72 horas.

	300°C							
	1h		24h		48h		72h	
	Media	Desv.	Media	Desv.	Media	Desv.	Media	Desv.
%O polvo	0,317	± 0,01	0,373	± 0,01	0,375	± 0,01	0,388	± 0,01
%O muestra	4,313	± 0,62	0,501	± 0,01	0,496	± 0,01	0,395	± 0,02
%C muestra	5,410	± 0,31	0,131	± 0,02	0,127	± 0,09	0,068	± 0,02

Al analizar la muestra (cilindro en verde) y el polvo es posible diferenciar de donde proviene el oxígeno, si es debido al ciclo térmico o al ligante. En los resultados del polvo (O polvo, tabla 4.9), se ve como el %O aumenta, pero siempre obteniendo valores permitidos por la norma. Por lo tanto, si las muestras presentan mayor porcentaje de intersticiales bajo las mismas condiciones será debido a una eliminación incompleta del ligante. Efectivamente existe una relación entre el contenido de O y C a causa del ligante polimérico, y únicamente a 300°C y 72h se obtienen valores aceptables.

En los estudios mediante TGA se demostró que la parte del ligante proveniente del Pluronic se elimina alrededor de 200°C, por lo tanto, lo que se pretende eliminar a 300°C es el PLA, y, en consecuencia, el residuo proviene de la descomposición de dicho polímero. La degradación térmica del PLA es muy compleja debido a que varias reacciones ocurren simultáneamente ya que depende de varios factores. Kopinke y colaboradores [151] indicaron que tiene lugar a temperaturas superiores a 200°C. Los resultados obtenidos por Gang y colaboradores [154] demostraron que el PLA empieza a descomponerse a partir de 200°C, siendo el rango de temperatura 300-370°C a partir del cual se elimina la mayor parte. El PLA comercial está compuesto principalmente por O y C (Sigma Aldrich, 49.85%C, 5.6%H, 44,4%O y 0.25%N), por debajo de 200°C, en presencia de oxígeno, se produce la descomposición térmica del PLA

Resultados y discusión. Fabricación

(combustión), donde las moléculas se rompen parcialmente a moléculas más pequeñas o fragmentos inestables (lactida, acetaldehído, n-Hexaldehído y CO₂). Al aumentar la temperatura (>200°C) se produce la oxidación de estos fragmentos obteniendo mayoritariamente CO₂ e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) en forma de gas o partícula, dependiendo de la temperatura de reacción [291]. Por lo tanto, es evidente que, si no se elimina el PLA por completo, y adecuadamente, el %O y %C será mayor respecto al polvo de partida.

Los resultados obtenidos coinciden con la literatura. Realizando el tratamiento térmico a 300°C y 72h, se consigue eliminar el ligante sin contaminar ni oxidar las muestras. Sin embargo, a pesar de obtener valores aceptados por la norma, el %O está prácticamente en el límite, por lo que es conveniente modificar y optimizar el tratamiento para reducir este valor al máximo. Hay dos posibilidades disminuir la temperatura y aumentar el tiempo, o al revés. Se ha demostrado que temperatura influye considerablemente en la oxidación del polvo de Ti, por lo que primero se realizaron tratamientos por debajo de 300°C aumentando el tiempo. En la tabla 4.10 se presentan los resultados obtenidos a 220°C y 270°C durante 24h y una semana.

Tabla 4.10 Resultado del análisis del %O y %C del polvo de titanio y de las muestras impresas tras los tratamientos térmicos a 220°C y 270°C durante 24horas y una semana.

	220°C				270°C			
	24h		1 semana		24h		1 semana	
	Media	Desv.	Media	Desv.	Media	Desv.	Media	Desv.
%O polvo	0,316	± 0,01	0,327	± 0,01	0,367	± 0,03	0,376	± 0,00
%O muestra	3,650	± 0,65	1,397	± 0,10	0,582	± 0,03	0,398	± 0,03
%C muestra	4,037	± 0,02	1,257	± 0,14	0,342	± 0,02	0,091	± 0,01

Al reducir la temperatura el contenido de oxígeno del polvo disminuye, incluso manteniéndolo una semana con respecto al obtenido en el anterior tratamiento propuesto a 300°C durante 72h. Esto refuerza aún más la idea de que la temperatura influye mucho más en el proceso de oxidación. En la muestra en verde, con el tratamiento térmico a 270°C y una semana se obtienen valores de C y O aceptados por la norma, pero similares al anterior tratamiento propuesto. Al aumentar tanto el tiempo el proceso de producción es mucho menos eficiente, y no hay una mejora evidente que justifique modificar el ciclo térmico.

Dado que la opción de aumentar el tiempo del tratamiento no fue válida, se procedió a realizar ensayos subiendo la temperatura hasta 350°C (tratamiento térmico 4). El resultado del TGA de la tinta final (figura 4.19, segundo cambio de pendiente de la curva azul) indica que a 350°C se produce la mayor pérdida de masa, y los resultados del estudio de oxidación (figura 4.22) confirman que a dicha temperatura el %O sigue estando dentro de los valores aceptados. En la tabla 4.11 se recogen los resultados de los tratamientos a 350°C y 1, 2, 3, 12 horas.

Tabla 4.11 Resultado del análisis del %O y %C. del polvo de titanio y de las muestras impresas tras los tratamientos térmicos a 350°C durante 1, 2, 3, 12 horas.

350 °C								
	1h		2h		3h		12h	
	Media	Desv.	Media	Desv.	Media	Desv.	Media	Desv.
%O polvo	0,329	± 0,03	0,381	± 0,01	0,411	± 0,01	0,446	± 0,01
%O muestra	0,465	± 0,01	0,388	± 0,01	0,401	± 0,01	0,466	± 0,02
%C muestra	0,272	± 0,00	0,013	± 0,00	0,012	± 0,00	0,015	± 0,00

Como se observa en la tabla 4.11, al subir la temperatura el %O del polvo aumenta y a partir de 3 horas el contenido de oxígeno está por encima del permitido. Sin embargo, los resultados de las muestras son prometedores, a partir de 2 horas el %C es el mismo que el polvo de partida (eliminación del ligante sin contaminación), y el %O es inferior al obtenido con el anterior tratamiento propuesto (300°C y 72h, tabla 4.9). Por otra parte, a nivel de productividad industrial es preferible calentar más (50°C es asumible) durante menos tiempo, en este caso se reduce 36 veces el tiempo de tratamiento (de 72 a 2 horas). Por lo tanto, el tratamiento térmico para la eliminación del ligante consistirá en calentar las muestras a 350°C durante 2h.

4.4.3 Resistencia en verde

A simple vista las muestras impresas con la tinta final base PLA/Pluronic parecen tener mayor resistencia en verde que las obtenidas con la tinta preliminar base Pluronic, presentan mayor consistencia, no se desmoronan y son mucho más manipulables. A continuación, se caracterizará la resistencia en verde (sin eliminar los ligantes poliméricos, únicamente dejando las piezas al aire overnight) de las muestras mediante diferentes métodos y se estudiará la viabilidad del mecanizado en verde.

4.4.3.1 Flexión

La resistencia en verde se determinó mediante ensayo de flexión a 3 puntos sobre 10 probetas macizas de 31x12mm de base y 6 mm (procedimiento interno AMES num.8.0.10 determinación resistencia en verde de polvos, similar a las normas ASTM B 312-82 y ISO 2739). En la tabla 4.12 se recogen los resultados y en la figura 4.24 las imágenes del ensayo.

Tabla 4.12 resultados flexión a 3 puntos sobre muestras en verde.

Fuerza (N)			σ (MPa)		
Media		Desv.	Media		Desv.
53,4	±	7,9	5,0	±	0,7

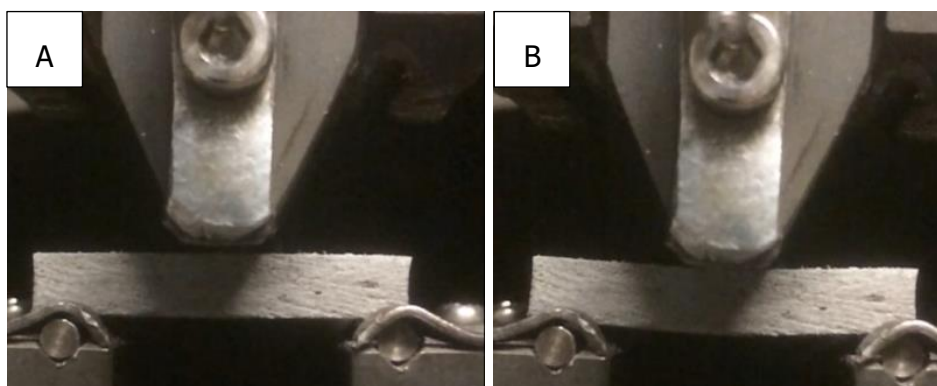


Figura 4.24 Flexión a 3 puntos de muestras en verde (sin eliminar los ligantes poliméricos, únicamente dejando las piezas al aire overnight): A) sin aplicar carga B) aplicando carga.

Se ha considerado interesante mostrar también las imágenes del ensayo como resultados, ya que en estas se puede ver como las piezas se deforman antes de romper (figura 4.24 B). Según el procedimiento de AMES (num.8.0.10 determinación resistencia en verde de polvos, similar a las normas ASTM B 312-82 y ISO 2739), los valores relevantes son los que se detallan en la en la tabla 4.12, no es necesario representar la carga-desplazamiento o tensión-deformación.

No es posible comparar los resultados del ensayo con los valores de resistencia en verde de piezas fabricadas en AMES, ya que la resistencia en verde viene dada por principios diferentes. En AMES se prensa polvo (normalmente buscando la mayor densidad posible) y es el

mecanismo de deformación del polvo el que otorga la resistencia (~10MPa es aceptable), mientras que en este caso la resistencia la ofrece el ligante. En este caso se buscan valores elevados de resistencia en verde principalmente para poder expulsar de la matriz las piezas prensadas sin dañarlas (generación de grietas en verde) [292]. Para poder validar los resultados es más adecuado hacer la comparativa con otras tecnologías, que utilicen binders o ligantes poliméricos, como meltal injection molding (MIM) o binder jetting (BJ). La resistencia en verde depende del tipo y sobre todo del porcentaje de ligante utilizado. En MIM se utiliza alrededor de un 35-45% en volumen de ligante, se obtienen resistencias en verde de entre 4 y 11 MPa, y se considera ideal a partir de 5MPa [293], [294]. Wet powder pouring (WWP) es un método desarrollado como alternativa al MIM, donde se consigue una resistencia en verde aceptable (2-6 MPa) con menos cantidad de ligante [295]. En la tecnología BJ se utiliza muy poca cantidad de ligante en comparación con las otras técnicas citadas, ya que no se hace una mezcla polvo-ligante sino que se inyectan selectivamente micro gotas del ligante en las zonas requeridas, por lo que las piezas impresas presentan poca resistencia en verde (0,5-1,5MPa) [296]. Santacruz y colaboradores [297], consideran que a partir de 2 MPa la resistencia es suficiente como poder mecanizar las piezas en verde. Por lo tanto, en base a los valores obtenidos (tabla 4.12) se confirma que con la tinta final base PLA/Pluronic se consigue una buena resistencia en verde y se puede valorar el mecanizado en verde.

4.4.3.2 Compresión

De manera complementaria se ha llevado a cabo una caracterización de la resistencia en verde a compresión sobre cilindros macizos y porosos (aprovechando los fabricados como pieza estándar en las pruebas de impresión 3D). Se ha considerado de interés ensayar también cilindros porosos, dado que el producto final se trata de implantes porosos. En la figura 4.25, se presenta el gráfico de tensión deformación de cilindros macizos fabricados con la tinta final base PLA/Pluronic, y con la preliminar base Pluronic.

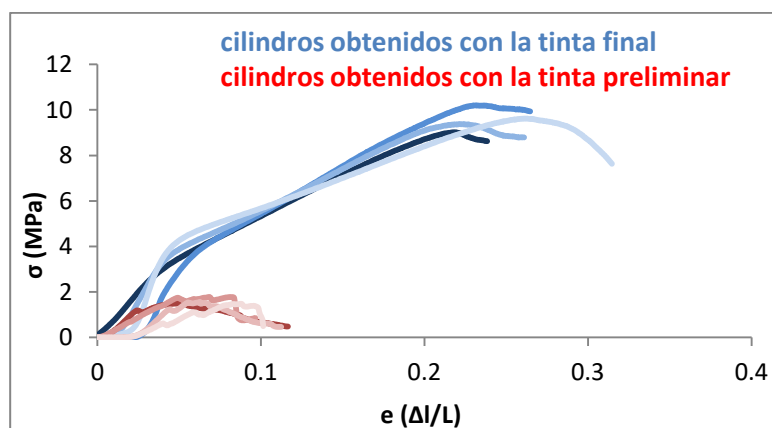


Figura 4.25 Gráfico tensión deformación de los cilindros macizos en verde (sin eliminar los ligantes poliméricos, únicamente dejando las piezas al aire overnight).

En el gráfico de la figura 4.25 se observa la evidente mejora al utilizar la tinta final respecto a la preliminar. La resistencia a compresión de las piezas en verde es mayor y el

Resultados y discusión. Fabricación

comportamiento es visiblemente diferente. A pesar de la carga metálica, los cilindros fabricados con la tinta final se comportan como un plástico flexible, donde se distingue una primera región lineal elástica (hasta aproximadamente 4MPa) y, a continuación, una zona plástica con endurecimiento por deformación. Este comportamiento es similar al del PLA puro (sin cargas o aditivos), que tiene una resistencia a compresión de 58 MPa, que va decreciendo conforme el % de aditivo aumenta [298]. Conviene recordar que el PLA no es el único componente del binder, también hay un porcentaje en peso de Pluronic. En la literatura hay diversos estudios sobre mezclas de PLA/PBS (Succinato de polibutileno) y PLA/PEG para fabricación de espumas y scaffolds 3D con valores de resistencia a compresión de entre 3MPa y 9 MPa [282], [299], valores similares a los que presentan las muestras obtenidas con la tinta final compuesta por la mezcla de PLA/Pluronic. En cuanto a los resultados de las muestras porosas, en la tabla 4.13 se recogen los valores de la resistencia en verde a compresión de los cilindros, tanto macizos como porosos.

Tabla 4.13. Resistencia máxima a compresión en verde.

	Media (MPa)	Desv.	
Cilindros macizos obtenidos con la tinta final	9	±	1
Cilindros porosos obtenidos con la tinta final	0,9	±	0,2
Cilindros macizos obtenidos con la tinta preliminar	1,6	±	0,1
Cilindros porosos obtenidos con la tinta preliminar	0	±	0

Al aumentar la porosidad la resistencia a compresión disminuye de manera drástica, independiente del ligante utilizado (en el apartado 4.5.4 se explica con más detalle el efecto de la porosidad en la resistencia a compresión). Teniendo en cuenta la elevada porosidad y carga metálica (~85% en peso) las muestras obtenidas con la tinta final presentan buena resistencia en verde a compresión. Por el contrario, las muestras porosas de Pluronic presentan valores prácticamente nulos de resistencia. Aun así, para poder hacer una correcta caracterización se necesitaría acudir a una máquina de ensayos con una célula de carga menor, algo que se consideró innecesario. En la figura 4.26, se muestra una imagen de un cilindro poroso tras la realización del ensayo para la muestra con tinta final.



Figura 4.26 Cilindro poroso (impreso con la tinta final) tras el ensayo de compresión.

En la imagen de la figura 4.26 se ve claramente como el cilindro, a pesar de la elevada porosidad y carga metálica, sufre una deformación plástica severa, sin liberar partículas o fragmentos durante el ensayo. No se han adjuntado imágenes de cilindros poros impresos con la tinta preliminar (base Pluronic) ya que al aplicar carga se desmoronaban por completo. Esto confirma que las muestras fabricadas con la tinta final adquieren características mecánicas similares a las del PLA, lo cual facilita el mecanizado en verde.

4.4.4 Estudio del mecanizado en verde

En el apartado anterior se demostró que las piezas cuentan con suficiente resistencia como para ser mecanizadas en verde, con la evidente reducción de costes que esto conlleva. A continuación, se presentan los resultados de realizar los principales procesos de mecanizado sobre piezas en verde. Se mostrarán imágenes del proceso también como resultado, ya que de esta manera se puede demostrar que las piezas no tienen problemas durante el mecanizado. En el apartado 3.5.3.6 de materiales y métodos se explican los procesos de mecanizado en verde con más detalle.

4.4.4.1 Corte

Se llevó a cabo el corte sobre cilindros macizos, tanto con la cortadora de precisión como la tronadora. En la figura 4.27 se muestran las imágenes del proceso de corte.

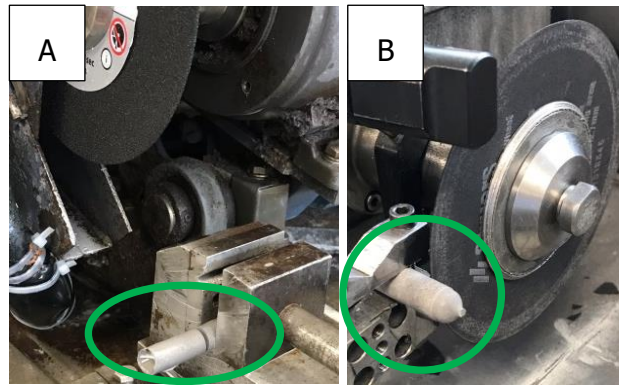


Figura 4.27 Proceso de corte con A) la tronadora y B) cortadora de precisión.

Como se puede ver en la figura 4.91 las piezas son lo suficientemente resistentes y rígidas para soportar las cargas de las mordazas de sujeción sin deformarse tanto elástica como plásticamente. En la figura 4.28 se muestran imágenes de las piezas tras el corte.

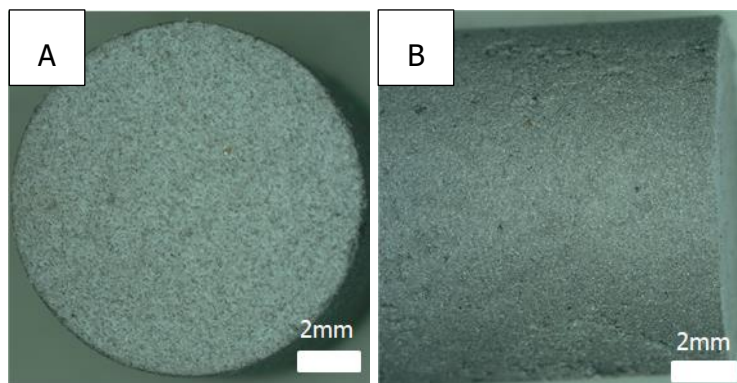


Figura 4.28 Sección A) transversal y B) longitudinal de la muestra tras el corte.

En la figura 4.28 se puede ver como se han conseguido cortar las muestras sin problema. El acabado superficial es bueno tras el corte y la superficie es homogénea, es decir, no ha habido desprendimientos de material durante el proceso. Tampoco se observan grietas ni marcas a causa de las mordazas de sujeción.

4.4.4.2 Desbaste

Se ha utilizado una pulidora semiautomática BUHELER y las condiciones del proceso de desbaste de las muestras en verde ha sido igual que si se tratase de una muestra ya sinterizada; sujeción de la pieza manual, dispensación de agua, giro de plato entre 200 y 300 rpm. En la figura 4.29 se muestra el proceso de pulido de una pieza en verde.



Figura 4.29 Proceso de desbaste de una muestra en verde.

Se ha conseguido desbastar la muestra en verde de igual manera que una sinterizada; se puede sujetar la pieza con los dedos y aplicar presión contra el plato sin que esta se deforme o agriete. Como se observa en la figura 4.29, gracias a las características de la tinta final, a partir de la cual se han obtenido las piezas, también es posible aplicar una corriente de agua al plato sin que se desmorone, diluya o pierda consistencia en la pieza. En la figura 4.30 se muestran imágenes de la superficie de las piezas antes y después del desbaste.

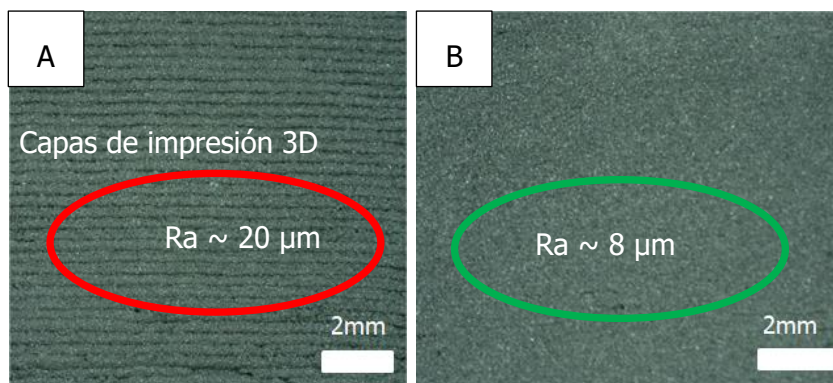


Figura 4.30 Imagen de la superficie de una muestra A) antes y B) después del desbaste.

Las imágenes de la figura 4.30 muestran el efecto del desbaste en la superficie de las piezas impresas (en verde). En la muestra no mecanizada (figura 4.30 A) se distinguen unas líneas que indican cada una de las capas generadas durante el proceso de impresión 3D. Esto coincide con el valor medio de la rugosidad ($R_a \sim 20$), siendo bastante inferior en las superficies mecanizadas ($R_a \sim 8$).

4.4.4. Taladrado

Se han mecanizado agujeros con la broca de $\varnothing 3$ sobre la sección longitudinal de cilindros macizos de $\varnothing 12\text{mm}$ y longitud 50mm. En la figura 4.31 muestran las imágenes del proceso.



Figura 4.31 Proceso de taladrado en verde.

Taladrar el lateral de un cilindro es más complicado que en una zona plana como una placa, tanto por la inestabilidad de la sujeción de las mordazas como por el movimiento de la broca; sin embargo, como se observa en la figura 4.31 ha sido posible sujetar adecuadamente las muestras cilíndricas con la mordaza sin que se deformaran ni agrietaran. Como es normal las piezas desprenden viruta al ser taladradas, esto no quiere decir que se estén desmoronando o rompiendo. Además, no se producen chispas durante el proceso, lo cual es un indicador de que la broca no se calienta y prácticamente no sufre desgaste. En la figura 4.32 se muestran imágenes de la superficie de las piezas tras ser taladradas.

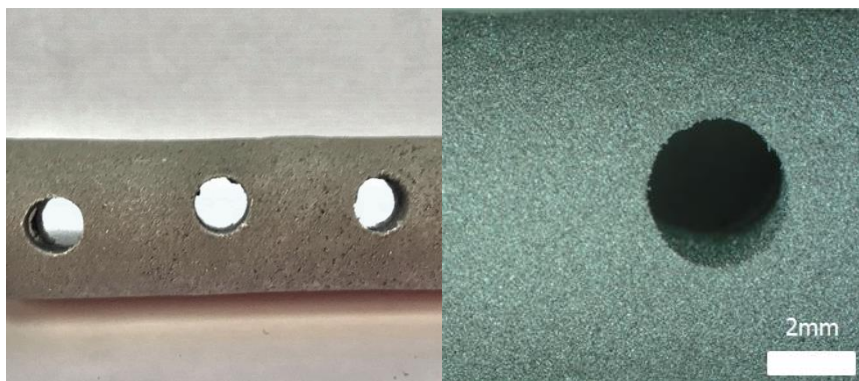


Figura 4.32 Imágenes de la superficie taladrada.

Como se puede ver en la figura 4.32, se han podido mecanizar correctamente diferentes agujeros en la sección longitudinal de cilindros en verde sin dañar la estructura o generar grietas. Además, el diámetro de los agujeros es uniforme, por lo cual, tanto la sujeción de la muestra como el desplazamiento de la broca han sido adecuados. Se aprecian rebabas en el contorno de los agujeros que se tendrán que eliminar tras el sinterizado.

4.4.4.4 Torneado

En este proceso la parte más crítica es la correcta colocación y sujeción de la pieza, ya que, si no se realiza adecuadamente, esta se hunde o salta en el momento del contacto con la punta. En la figura 4.33 se muestra la sujeción del cilindro en verde para el torneado



Figura 4.33 Proceso de torneado de cilindro en verde.

Como se puede ver en la figura 4.33, la muestra soporta las cargas de la mordaza de sujeción sin agrietarse ni deformarse. En consecuencia, se han torneado (reducción de \varnothing) y refrentado (aplanar o pulir la cara transversal) con éxito los cilindros en verde. En la figura 4.34 se muestran los resultados del torneado y refrentado de las piezas en verde.

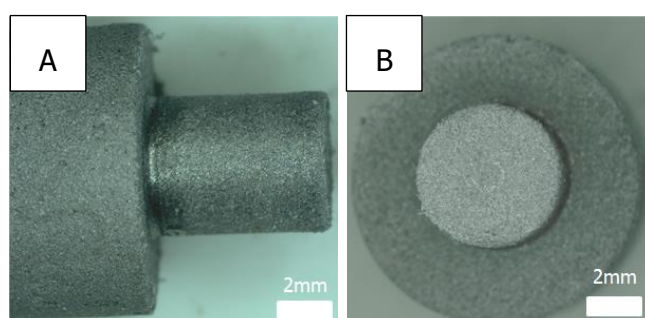


Figura 4.34 Sección A) longitudinal y B) transversal del cilindro torneado y refrentado en verde.

En la imagen de la sección longitudinal del cilindro (figura 4.34 A) se observa como se ha podido tornear sin problemas, reduciendo el diámetro sin romper ni agrietar la pieza. Por otra parte, la sección transversal (figura 4.34 B) muestra el acabado de la superficie tras el refrentado, similar a los obtenidos mediante corte (figura 4.28 A) o desbaste (figura 4.30 B).

4.4.4.5 Mecanizado en verde de una pieza estándar

Se ha conseguido realizar los principales procesos de mecanizado sobre muestras en verde obtenidas a partir de la tinta final.

Los procesos de mecanizado se han llevado a cabo sobre muestras macizas para demostrar de manera cualitativa (visual) que con la tinta final PLA/Pluronic se obtienen piezas con suficiente resistencia en verde como para poder ser mecanizadas. En cuanto la posibilidad de aplicar estos mecanizar en verde en verde piezas concretas, dependerá como en todos los procesos de las características de la pieza a fabricar (porosidad, tamaño, forma, etc.). Sin embargo, la tecnología propuesta (extrusión 3D) favorece que las piezas se puedan mecanizar en verde ya hay una gran libertad en cuanto a diseño, lo que permite las modificar zonas concretas que se pretende mecanizar. Por ejemplo, en el caso de los implantes porosos tipo cuña, a veces interesa que la porosidad esté tapada por lo exteriores, para ello se añaden perímetros en la impresión y el número de perímetros se puede modificar fácilmente para adaptarse al mecanizado en verde. A continuación, en la figura 4.35 se presentan imágenes de un implante poroso tipo cuñas con y sin mecanizado en verde.

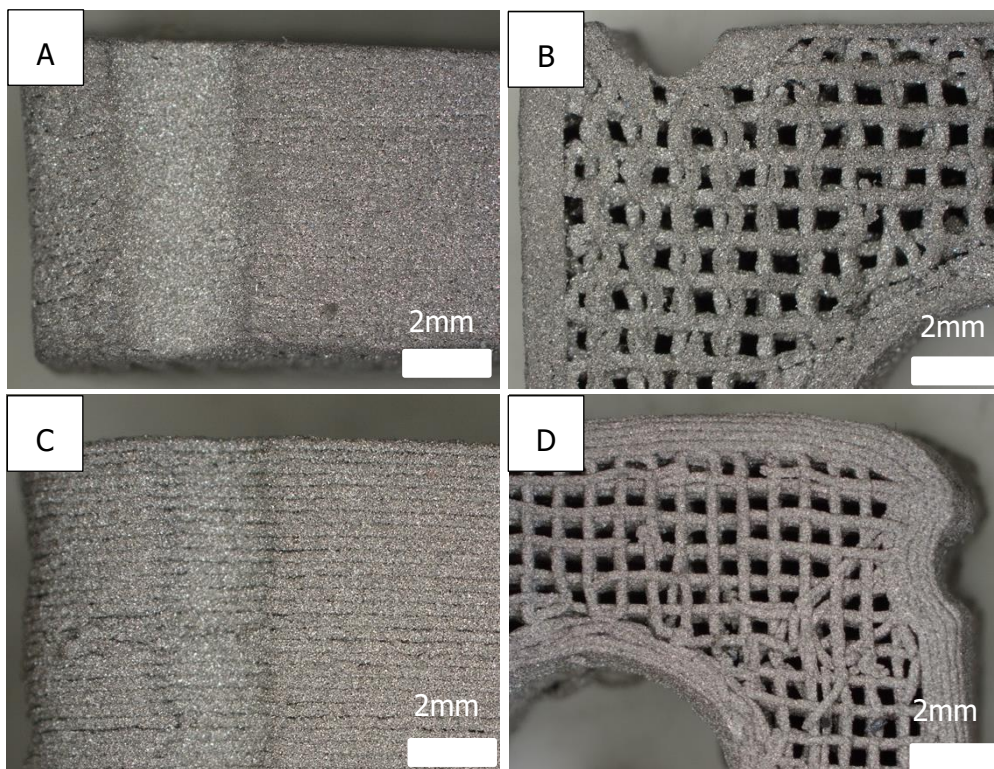


Figura 4.35 Implante poroso tipo cuña. A) Superficie lateral (perímetro) mecanizada en verde, B) superficie superior mecanizada en verde, C) superficie lateral sin mecanizar y D) superficie superior sin mecanizar.

4.5 PROCESO DE SINTERIZACIÓN

4.5.1 Estudios previos (con la tinta preliminar)

Los estudios previos (apartado 8.1.4 del anexo 1) reforzaron la importancia de la formulación de la tinta y el procesado en verde en el acabado final (distorsiones) y contenido de O y C (muy por encima de norma).

En cuanto a la caracterización mecánica, se vio que las muestras con un 40% de porosidad de impresión (la que viene predefinida por defecto en el gcode) y sinterizadas a 1350°C presentaban buenas propiedades mecánicas en comparación con el "Gold estándar" Osteosinter®. Estos resultados son un buen punto de partida para acabar de definir el ciclo térmico, porcentaje de porosidad y patrón de impresión de las piezas a sinterizar, teniendo como referencia Osteosinter®.

4.5.2 Estudio del ciclo térmico: temperatura y tiempo.

En este apartado se estudiaron 3 temperaturas y tiempos para el sinterizado de las estructuras porosas (cilindros) obtenidas mediante el proceso desarrollado (extrusión 3D con la tinta final PLA/Pluronic, inmersión 1h en agua, secado y eliminación térmica a 350°C 2h). En la tabla 4.14 se identifican las muestras y se indican las condiciones de fabricación en cada caso.

Tabla 4.14 Identificación de las muestras utilizadas para el estudio del ciclo térmico.

ID	Ciclo de sinterizado	Velocidad del ciclo	%Porosidad (Gcode)	Patrón de impresión	Número de perímetros
13_3	1350°C 3h	2,5°C/min	70	Lineal	0
13_2	1350°C 2h	2,5°C/min	70	Lineal	0
13_1	1350°C 1h	2,5°C/min	70	Lineal	0
12_3	1250°C 3h	2,5°C/min	70	Lineal	0
12_2	1250°C 2h	2,5°C/min	70	Lineal	0
12_1	1250°C 1h	2,5°C/min	70	Lineal	0
11_3	1150°C 3h	2,5°C/min	70	Lineal	0
11_2	1150°C 2h	2,5°C/min	70	Lineal	0
11_1	1150°C 1h	2,5°C/min	70	Lineal	0

4.5.2.1 Efecto del ciclo térmico en el tamaño de grano

A partir del procesamiento de las imágenes obtenidas mediante microscopía óptica (MO) se midió el tamaño de grano de las muestras sinterizadas (tabla 4.14). La figura 4.36 es un ejemplo de una imagen MO de una muestra sinterizada a 1150°C y 1350°C, en donde se pueden distinguir los límites de grano. En la figura 4.37 se representa el área media de grano y el diámetro máximo ($\varnothing_{\text{máx}}$) para cada una de las condiciones estudiadas (temperatura y tiempo), y en la tabla 4.15 se recogen los valores medios con las desviaciones estándar.

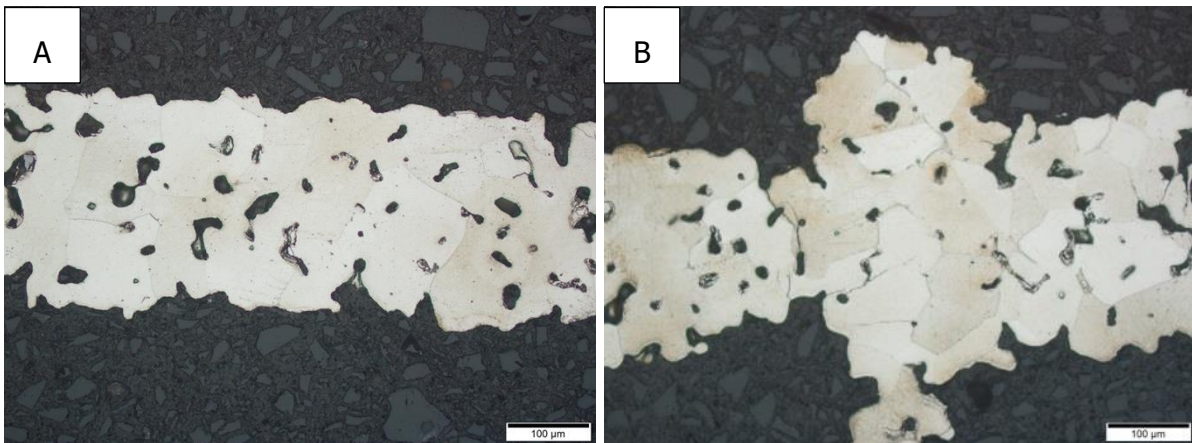


Figura 4.36 Imagen MO a X50 aumentos de la microestructura de una muestra sinterizada A) 1150°C y B) 1350°C).

Tras atacar la muestra se revela la microestructura y se pueden distinguir los límites de grano; sin embargo, debido a la elevada porosidad (tanto micro como macro) resulta difícil realizar una correcta caracterización y cuantificación.

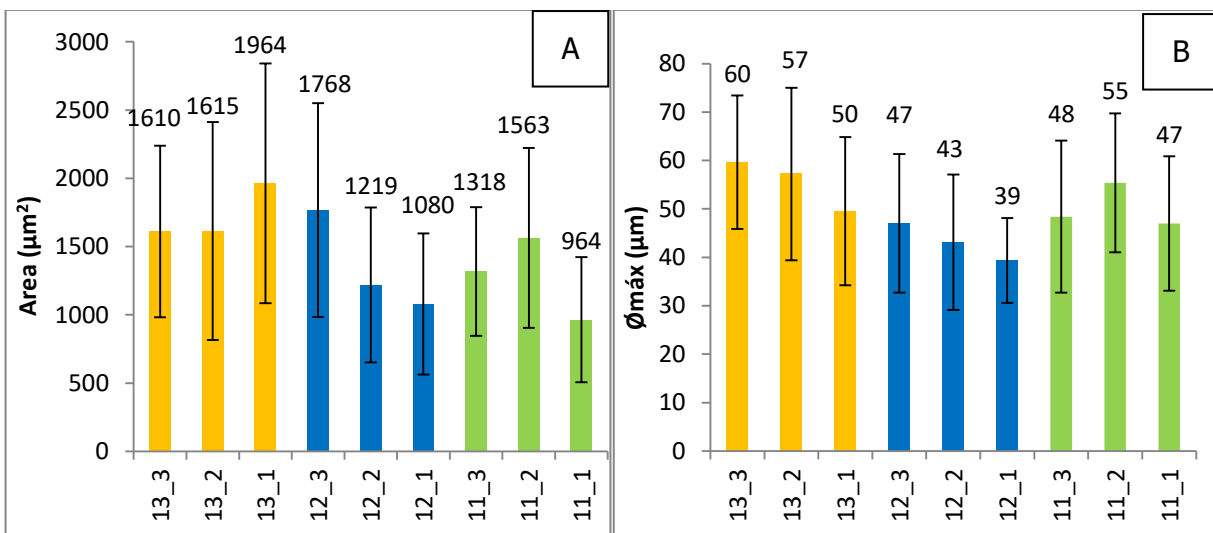


Figura 4.37 Representación gráfica del tamaño de grano de las muestras sinterizadas a diferentes temperaturas y tiempos; expresado como A) Área media y B) diámetro máximo.

Tabla 4.15 Identificación de las muestras con el promedio y la desviación estandar del area y diámetro de grano.

ID	Ciclo de sinterizado	Área (μm^2)		\varnothing máx.(μm)	
		Media	Desv.	Media	Desv.
13_3	1350°C 3h	1610	± 628	60	± 14
13_2	1350°C 2h	1615	± 798	57	± 18
13_1	1350°C 1h	1964	± 877	50	± 15
12_3	1250°C 3h	1768	± 783	47	± 14
12_2	1250°C 2h	1219	± 567	43	± 14
12_1	1250°C 1h	1080	± 517	39	± 9
11_3	1150°C 3h	1318	± 471	48	± 16
11_2	1150°C 2h	1563	± 659	55	± 14
11_1	1150°C 1h	964	± 459	47	± 14

No se aprecian diferencias significativas entre las diferentes muestras caracterizadas. Sí que se observa una ligera tendencia de crecimiento de grano con la temperatura; sin embargo, con la desviación de resultados no se puede asegurar que la temperatura y/o el tiempo influyan en el tamaño de grano.

Por otra parte, los diámetros obtenidos son del mismo orden que la distribución media de partículas del polvo (apartado 8.1.1.2 del anexo 1); por lo tanto, es posible que en realidad no se este midiendo el grano metalográfico sino las partículas de polvo. En cualquier caso, debido a la porosidad (tanto macro como micro) no es posible caracterizar correctamente el tamaño de grano de este tipo de muestras.

4.5.2.2 Efecto del ciclo térmico en el grado de sinterización.

En las figuras 4.38, 4.39 y 4.40 se presenta el resultado de la caracterización microestructural mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) de las muestras sinterizadas a diferentes temperaturas y tiempos. En la figura 4.41 se presenta una imagen de una muestra en verde.

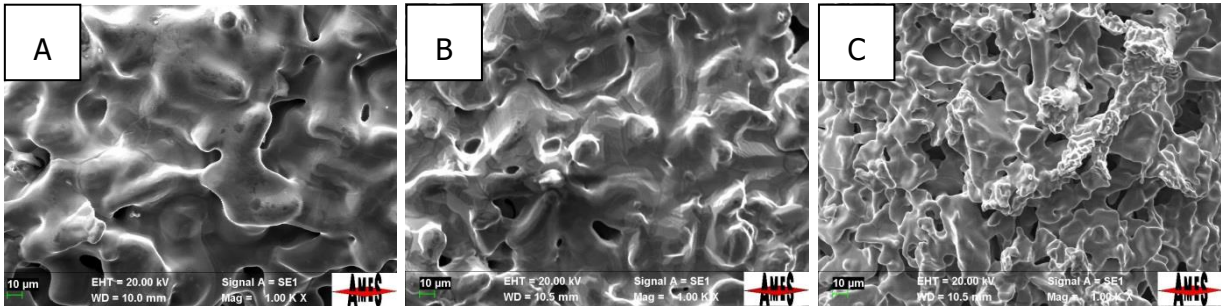


Figura 4.38 Imágenes SEM a X1000 aumentos de las muestras sinterizadas a 1350°C durante A) 3 horas, B) 2 horas, C) 1 hora.

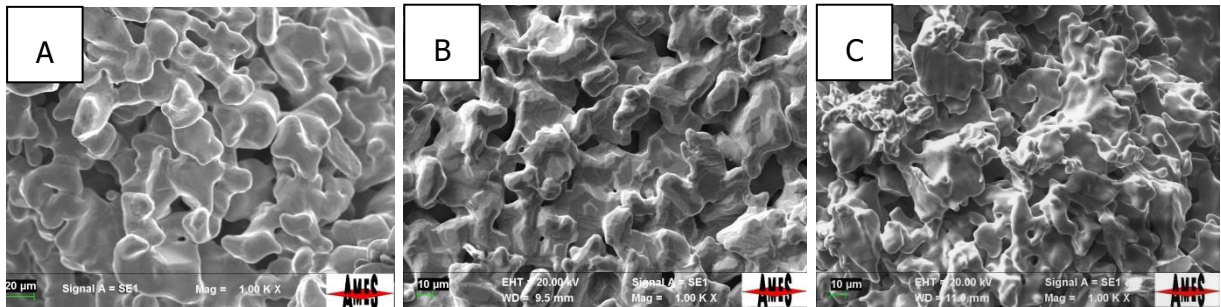


Figura 4.39 Imágenes SEM a X1000 aumentos de las muestras sinterizadas a 1250°C durante A) 3 horas, B) 2 horas, C) 1 hora.

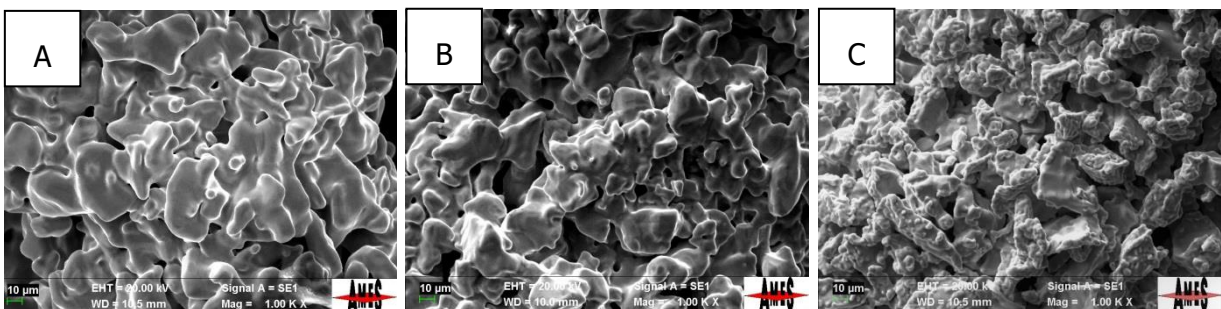


Figura 4.40 Imágenes SEM a X1000 aumentos de las muestras sinterizadas a 1150°C durante A) 3 horas, B) 2 horas, C) 1 hora.

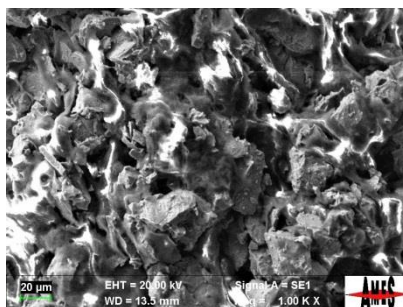


Figura 4.41 Imágen SEM a X1000 aumentos de una muestra en verde.

En todas las imágenes de las muestras sinterizadas (figuras 4.38, 4.39 y 4.40, se observan cuellos de sinterización o "cuellos de soldadura" entre las partículas, lo cual confirma una correcta sinterización de las muestras para todos las temperaturas y tiempos estudiados contrastando con la figura 4.41. En las muestras sinterizadas a 1350°C durante 3 y 2 horas (figura 4.38 A y B) se aprecia un mayor grado de sinterización; mayor tamaño de cuello y menor microporosidad (la generada entre partículas). Para una misma temperatura prácticamente no se evidencian diferencias entre 2 y 3 horas (figuras 4.38, 4.39 y 4.40, A y B), pero al reducir el tiempo a 1 hora sí que parece no ser suficiente y disminuir el grado de sinterización (figuras 4.38, 4.39 y 4.40, C).

4.5.2.3 Efecto del ciclo térmico en la contracción

A partir de las dimensiones de las muestras antes y después del sinterizado se calculó la contracción. En la figura 4.42 se representa el % de contracción en diámetro (\emptyset) y en altura (H) para cada una de las condiciones estudiadas (temperatura y tiempo), y en la tabla 4.16 se recogen los valores medios con las desviaciones estándar.

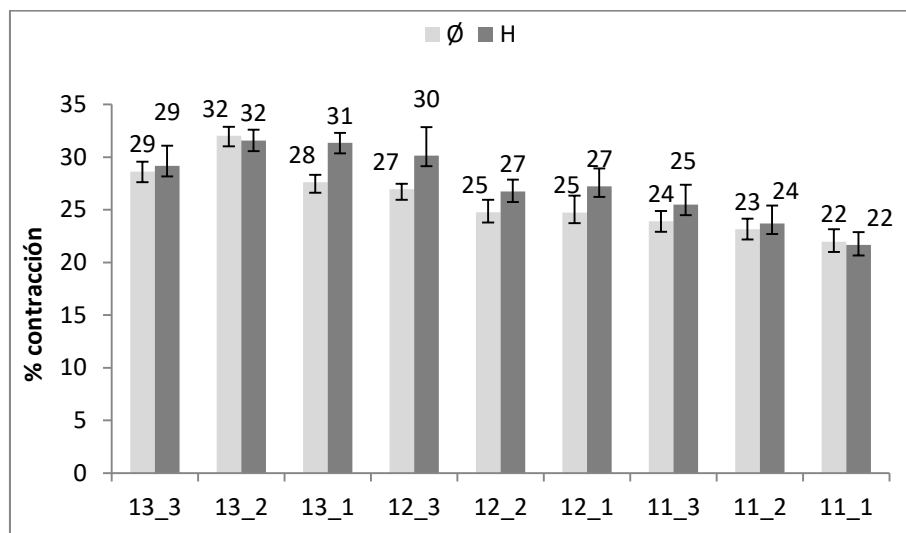


Figura 4.42 Representación gráfica de la contracción de las muestras sinterizadas a diferentes temperaturas y tiempos.

Tabla 4.16 Identificación de las muestras con el promedio y la desviación estándar de la contracción.

ID	Ciclo de sinterizado	$\Delta \emptyset$ (%)			Δ altura (%)	
		Media	Desv.		Media	Desv.
13_3	1350°C 3h	28,6	± 1,0		29,2	1,9
13_2	1350°C 2h	32,0	± 0,9		31,6	1,1
13_1	1350°C 1h	27,6	± 0,7		31,4	0,9
12_3	1250°C 3h	26,9	± 0,5		30,1	2,7
12_2	1250°C 2h	24,8	± 1,2		26,7	1,1
12_1	1250°C 1h	24,7	± 1,6		27,2	1,7
11_3	1150°C 3h	23,9	± 1,0		25,5	1,9
11_2	1150°C 2h	23,2	± 1,0		23,7	1,7
11_1	1150°C 1h	22,0	± 1,2		21,7	1,2

Como se puede ver no hay diferencias notables entre la contracción del diámetro y la de la altura, lo cual indica que las muestras contraen de una manera bastante uniforme. No se observa un efecto significativo del tiempo en la contracción; sin embargo, sí que se aprecia una tendencia a aumentar la contracción con la temperatura. Entre sinterizar a 1350°C o 1150°C hay una diferencia de alrededor de un $7 \pm 2\%$. Esto coincide con los resultados del apartado anterior, en donde se vio que las muestras sinterizadas a 1350°C presentaban

mayores cuellos de soldadura y menos microporosidad; por lo tanto, la pieza densifica y se contrae más.

4.5.2.4 Efecto del ciclo térmico en las propiedades mecánicas

A continuación, se presentan los resultados del ensayo a compresión según la norma ISO 13314 para metales porosos. En la figura 4.43 se representa el módulo elástico (E) y la resistencia (σ_c) para cada una de las condiciones estudiadas (temperatura y tiempo), y en la tabla 4.17 se recogen los valores medios con las desviaciones estándar.

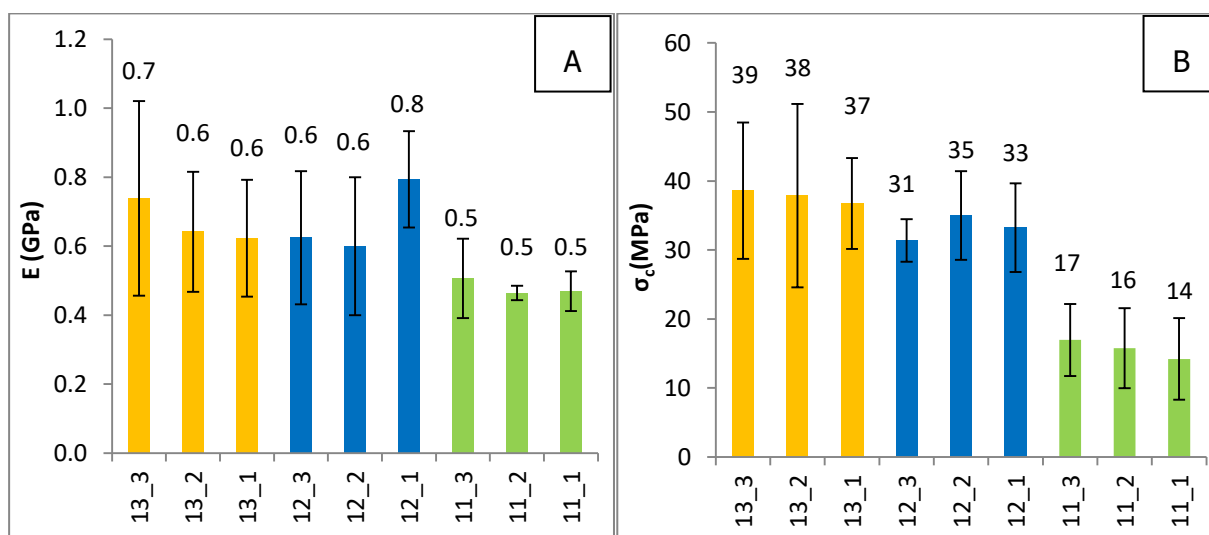


Figura 4.43. Representación gráfica del A) módulo elástico y B) resistencia a compresión de las muestras sinterizadas a diferentes temperaturas y tiempos.

Tabla 4.17 Identificación de las muestras con el promedio y desviación estándar del módulo elástico y la resistencia a compresión

ID	Ciclo de sinterizado	E (GPa)		σ_c (MPa)	
		Media	Desv.	Media	Desv.
13_3	1350°C 3h	0,7	± 0,3	39	± 10
13_2	1350°C 2h	0,6	± 0,2	38	± 13
13_1	1350°C 1h	0,6	± 0,2	37	± 7
12_3	1250°C 3h	0,6	± 0,2	31	± 3
12_2	1250°C 2h	0,6	± 0,2	35	± 6
12_1	1250°C 1h	0,8	± 0,1	33	± 6
11_3	1150°C 3h	0,5	± 0,1	17	± 5
11_2	1150°C 2h	0,5	± 0,1	16	± 6
11_1	1150°C 1h	0,5	± 0,1	14	± 6

En la figura 4.43 A) se observa como módulo elástico prácticamente no se ve afectado por el ciclo térmico. Esto coincide con lo descrito en la literatura ya que el módulo se ve principalmente afectado por la porosidad total (macro porosidad), de hecho, tal y como se ha comentado en el apartado 2, una de las principales estrategias para evitar el stress shielding

de los implantes es reducir el módulo elástico aumentado la porosidad [9], [300]. En cuanto a la resistencia a compresión, sí que se aprecia la influencia del ciclo térmico en el sinterizado, concretamente en la temperatura. En la figura 4.43 B) se puede ver como las muestras sinterizadas a 1350°C (~40MPa) presentan mayor resistencia a compresión que las sinterizadas a 1150°C (~15MPa). Este incremento en las propiedades mecánicas es debido a que al aumentar la temperatura del tratamiento se producen mayores cuellos de soldadura y se reduce la microporosidad [167], [259]; coincidiendo con los resultados del apartado 4.5.2.2, en donde en las imágenes SEM (figuras 4.38, 4.39 y 4.40) se observan los efectos mencionados. En la tabla 4.17 se puede ver que, teniendo en cuenta el valor de la desviación estándar, no hay diferencia alguna al modificar únicamente el tiempo de sinterización, ni diferencias significativas al aumentar la temperatura de 1250 a 1350°C.

4.5.2.5 Conclusiones del estudio del ciclo térmico

- En muestras muy porosas (en este caso ~70%) es difícil llevar a cabo una correcta caracterización del tamaño de grano. Por lo tanto, con la enorme dispersión de resultados no se puede afirmar que el ciclo térmico influya en el tamaño de grano.
- Sinterizando a 1350°C se consiguen cuellos de soldadura mayores y menor microporosidad que a 1150°C.
- Cuanto mayor es la temperatura de sinterización mayor es el porcentaje de contracción de la pieza. A 1350°C el grado de contracción es el 7% superior con respecto a las muestras sinterizadas a 1150°C.
- Las muestras de alto grado de porosidad (en este caso ~70%) no experimentan cambios apreciables en el módulo elástico al modificar el ciclo térmico ya que la rigidez de la estructura depende básicamente del grado de macroporosidad.
- La temperatura influye en la resistencia a compresión. Las muestras sinterizadas a 1350°C presentan mayor resistencia a compresión (~40MPa) que las sinterizadas a 1150°C (~15MPa).
- El efecto del tiempo de sinterización es despreciable en comparación con el de la temperatura.

4.5.3 Estudio de la velocidad del ciclo térmico

Como se comentó en el apartado 3.6.3 para reducir la contracción se intentó promover la difusión superficial, evitando la volumétrica, durante la sinterización. Para conseguirlo se aumentó al máximo la velocidad del ciclo térmico (calentamiento y enfriamiento) sin la etapa isoterma (apagando el horno al llegar a la temperatura de sinterización). Se valoraron dos velocidades de calentamiento: 2,5°C/min (estándar) y 4°C/min (máxima posible). En base a los resultados del apartado anterior se decidió continuar el estudio con las temperaturas de los extremos (1350°C y 1150°C) y fijar el tiempo de sinterizado en 2 horas (0 horas en el caso de las muestras calentadas a 4°C/min). En la tabla 4.18 indican las características de las muestras y de los parámetros del ciclo de sinterización.

Tabla 4.18 Identificación de las muestras utilizadas para el estudio de la velocidad ciclo térmico.

ID	Velocidad del ciclo	Ciclo de sinterizado	%Porosidad (Gcode)	Patrón de impresión	Número de perímetros
13_2	2,5°C/min	1350°C 2h	70	Lineal	0
13_R	4°C/min	1350°C 0h	70	Lineal	0
11_2	2,5°C/min	1150°C 2h	70	Lineal	0
11_R	4°C/min	1150°C 0h	70	Lineal	0

4.5.3.1 Efecto de la velocidad del ciclo térmico en el grado de sinterización

En las figuras 4.44 y 4.45 se presenta el resultado de la caracterización microestructural de las muestras sinterizadas a diferentes velocidades y temperaturas.

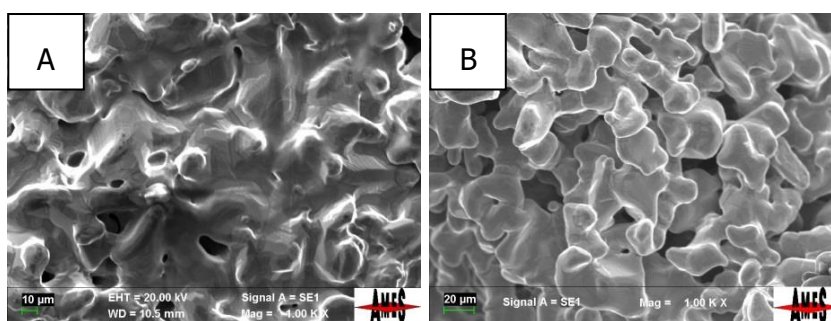


Figura 4.44 Imágenes SEM a X1000 aumentos de las muestras sinterizadas a 1350°C A) 2.5°C/min y 2 horas, B) 4°C/min y 0 horas.

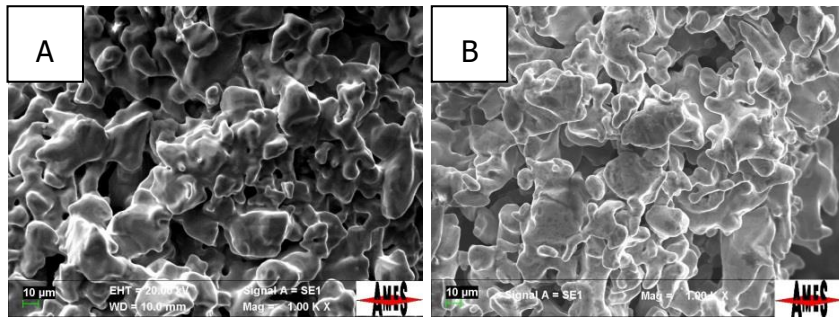


Figura 4.45 Imágenes SEM a X1000 aumentos de las muestras sinterizadas a 1150°C A) 2.5°C/min y 2 horas, B) 4°C/min y 0 horas.

Como se puede ver en las figuras 4.44 y 4.45 todas las muestras se han sinterizado correctamente. Independientemente de la temperatura y la velocidad se han formado cuellos de unión entre partículas. Prácticamente no hay diferencias en la superficie de las muestras sinterizadas a 1150°C (figura 4.45), pero sí a 1350°C, en la figura 4.44 A se observa menor microporosidad y mayor tamaño de cuello respecto a las demás muestras (figura 4.44 B y 4.45).

4.5.3.2 Efecto de la velocidad del ciclo térmico en el grado de contracción

Para comprobar si al aumentar la velocidad del ciclo de sinterización se conseguía reducir la contracción se midieron las muestras antes y después sinterizar. En la figura 4.46 se representa el porcentaje de contracción en diámetro (\emptyset) y en altura (H) de las muestras sinterizadas a diferentes velocidades y temperaturas. En la tabla 4.19 se recogen los valores medios con las desviaciones estándar.

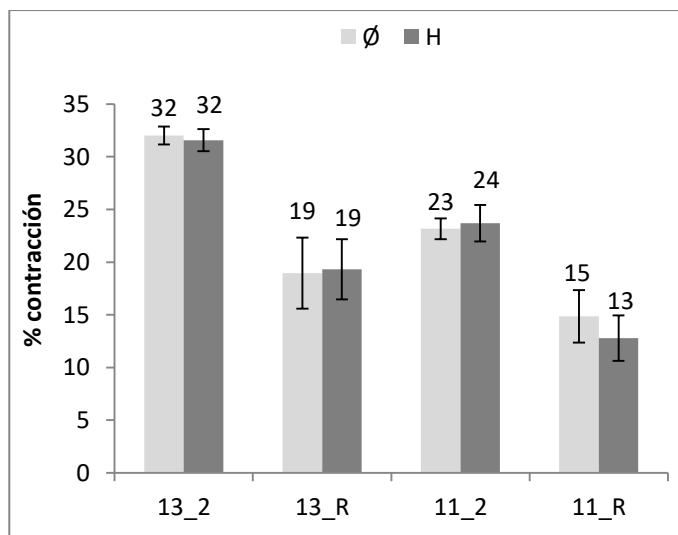


Figura 4.46 Representación gráfica de la contracción de las muestras sinterizadas a diferentes velocidades y temperaturas.

Tabla 4.19 Identificación de las muestras con el promedio y la desviación estandar la contracción.

ID	Velocidad del ciclo	Ciclo de sinterizado	$\Delta \phi$ (%)			Δ altura (%)		
			Media	Desv.		Media	Desv.	
13_2	2,5°C/min	1350°C 2h	32	± 1		32	± 1	
13_R	4°C/min	1350°C 0h	19	± 3		19	± 3	
11_2	2,5°C/min	1150°C 2h	23	± 1		24	± 2	
11_R	4°C/min	1150°C 0h	15	± 3		13	± 2	

Los resultados indican que al aumentar la velocidad del ciclo se reduce el porcentaje de contracción, tanto para 1350°C como para 1150°C (figura 4.46). Esto podría confirmar la hipótesis (apartado 3.6.3 de materiales y métodos) de que, al calentar rápidamente hasta la temperatura de sinterización, y a continuación, enfriar se promueve más la difusión superficial y menos la volumétrica reduciendo así la contracción. Por otra parte, en la tabla 4.19 se puede ver que al realizar el ciclo rápido la desviación estándar aumenta; por lo tanto, la repetitividad de del tratamiento disminuye.

4.5.3.3 Efecto de la velocidad del ciclo térmico en las propiedades mecánicas

A continuación, se presentan los resultados del ensayo a compresión. En la figura 4.47 se representa el módulo elástico (E) y la resistencia (σ_c) de las muestras sinterizadas a diferentes velocidades y temperaturas. En la tabla 4.20 se recogen los valores medios con las desviaciones estándar.

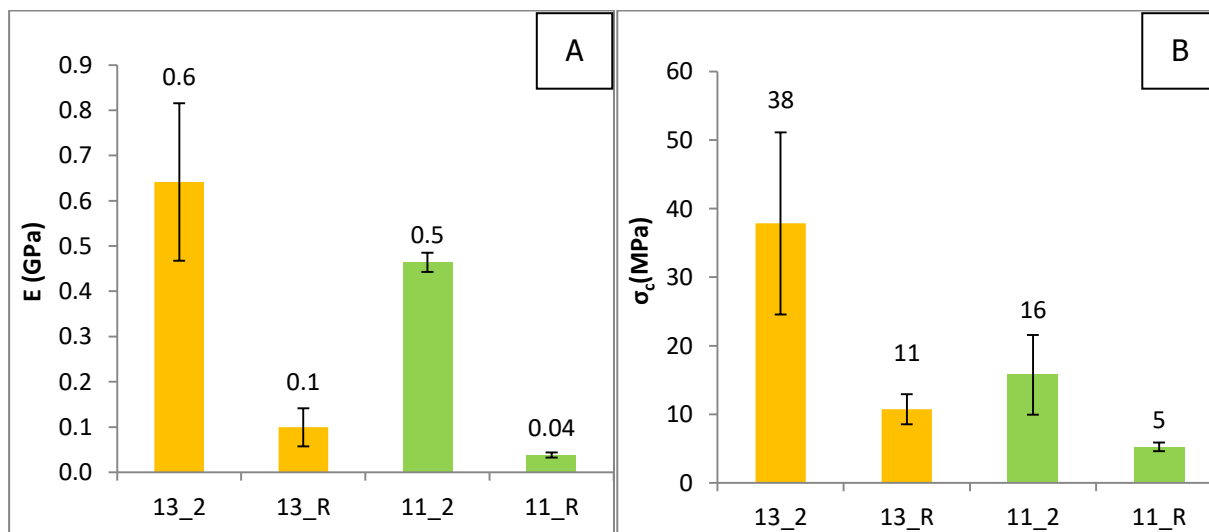


Figura 4.47 Representación gráfica de A) módulo elástico y B) resistencia a compresión de las muestras sinterizadas a diferentes velocidades y temperaturas.

Tabla 4.20 Identificación de las muestras con el promedio y la desviación estándar del módulo elástico y la resistencia a compresión

ID	Velocidad del ciclo	Ciclo de sinterizado	E (GPa)			σ_c (MPa)		
			Media		Desv.	Media		Desv.
13_2	2,5°C/min	1350°C 2h	0,6	±	0,2	38	±	13
13_R	4°C/min	1350° 0h	0,1	±	0,04	11	±	5,5
11_2	2,5°C/min	1150°C 2h	0,4	±	0,1	16	±	6
11_R	4°C/min	1150°C 0h	0,04	±	0,01	5	±	0,6

Los resultados del ensayo de compresión muestran como al aumentar la velocidad del ciclo se produce una disminución considerable de las propiedades mecánicas, tanto en el módulo elástico como en la resistencia a compresión; en consecuencia, queda descartado el tratamiento propuesto (aumentar la velocidad del ciclo).

Por otra parte, conviene recordar que se han sinterizado muestras muy porosas, de alrededor de un 70%, y seguramente este tipo de muestras necesiten tener una mayor densificación de los hilos para mantener un mínimo de propiedades mecánicas. Por lo tanto, es posible que el tratamiento sea válido para otro tipo de piezas menos porosas en donde interese más evitar al máximo la contracción y tener un mayor control dimensional.

4.5.3.4 Conclusiones del estudio sobre la velocidad del ciclo térmico

- A pesar de aumentar la velocidad de calentamiento al máximo (4°C/min) y enfriar rápidamente se obtuvo la estructura característica de una muestra sinterizada, se observaron los cuellos de soldadura entre partículas.
- Aumentando la velocidad del ciclo térmico se ha conseguido reducir considerablemente la contracción; sin embargo, las propiedades mecánicas disminuyen demasiado.
- En futuros trabajos sería conveniente estudiar el efecto de la velocidad de calentamiento en muestras de menor grado de porosidad (<20%).

4.5.4 Estudio de la porosidad

En este apartado se evaluaron muestras sinterizadas con diferentes porcentajes de porosidad (50, 60 y 70 predefinida en el Gcode). Se decidió llevar a cabo el estudio sinterizando a 1150 y 1350°C para valorar si es posible reducir la temperatura de sinterización ajustando la porosidad. En la tabla 4.21 se identifican las muestras y condiciones de fabricación.

Tabla 4.21 Identificación de las muestras utilizadas para el estudio de la porosidad.

ID	%Porosidad (Gcode)	Ciclo de sinterizado	Velocidad del ciclo	Patrón de impresión	Número de perímetros
50_13	50	1350°C 2h	2,5°C/min	Lineal	0
50_11	50	1150°C 2h	2,5°C/min	Lineal	0
60_13	60	1350°C 2h	2,5°C/min	Lineal	0
60_11	60	1150°C 2h	2,5°C/min	Lineal	0
70_13	70	1350°C 2h	2,5°C/min	Lineal	0
70_11	70	1150°C 2h	2,5°C/min	Lineal	0

4.5.4.1 Medida de la porosidad

Para conocer la porosidad real de las muestras una vez sinterizadas se valoraron diferentes técnicas y métodos de caracterización.

Método gravimétrico

A partir de las dimensiones y el peso de las diferentes muestras sinterizadas se calculó la porosidad teórica (calculada). En la tabla 4.22 se muestran los resultados obtenidos en cada caso.

Tabla 4.22 Identificación de las muestras con el promedio y la desviación estándar del peso, volumen (calculado) y porosidad calculada

ID	%Porosidad (Gcode)	Ciclo de sinterizado	Peso (g)		Volumen (mm ³)			Porosidad (%)	
			Media	Desv.	Media	Desv.	Media	Desv.	
50_13	50	1350°C 2h	0,43	± 0,05	429	± 31	78	± 2	
50_11	50	1150°C 2h	0,5	± 0,03	439	± 24	75	± 3	
60_13	60	1350°C 2h	0,6	± 0,01	426	± 17	81	± 1	
60_11	60	1150°C 2h	0,39	± 0,01	417	± 28	79	± 2	
70_13	70	1350°C 2h	0,32	± 0,01	439	± 10	84	± 1	
70_11	70	1150°C 2h	0,34	± 0,03	421	± 25	82	± 2	

Con los equipos disponibles (micrómetros) no es posible medir con precisión el volumen de este tipo de piezas, estas no son completamente cilíndricas, no tienen perímetros, son irregulares y, por lo tanto, el error de medida es demasiado alto. El volumen calculado es superior al real por lo que la porosidad calculada también lo es y dista demasiado de la

Resultados y discusión. Fabricación

porosidad diseñada inicialmente (porosidad del Gcode). No se ha podido obtener resultados lógicos ni concluyentes, el error en el volumen es tan alto que impide distinguir correctamente las diferencias entre condiciones.

Se ha demostrado que, con los equipos de medida utilizados para obtener el volumen, este método no es válido para calcular la porosidad de este tipo de muestras. Sin embargo, no queda completamente descartado, ya que, con un sistema de medida más preciso, como un escáner 3D, sí que se podría tener en consideración.

Mediante análisis de imagen

Tras las primeras caracterizaciones con las muestras de 70% se vio que no es un método adecuado para este tipo de muestras, al prepararlas se modifica el resultado, ya que los hilos se rompen por la presión de embutición, se agrietan, se cierran poros, la baquelita oculta hilos, etc...(figura 4.48). Por lo tanto, la dispersión de resultados es muy elevada y los datos obtenidos no son fiables.

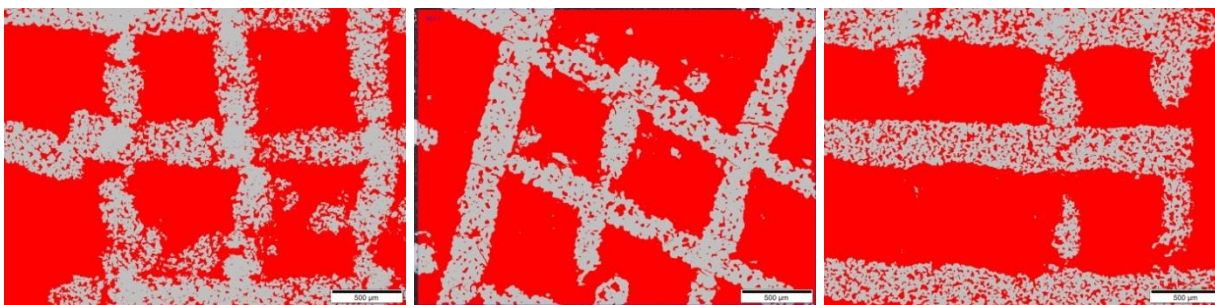


Figura 4.48 Imágenes de MO tratadas de diferentes muestras con 70% de porosidad.

En las imágenes de MO de la figura 4.47 se aprecia la poca repetitividad que ofrece la técnica. El software de análisis de imagen colorea (rojo) la zona que considera que no pertenece al material y calcula la porosidad. Observando estas imágenes queda claro que no será posible obtener resultados fiables mediante esta técnica.

Por otra parte, tras observar diferentes muestras se llegó a la conclusión de que para caracterizar correctamente la porosidad lo más adecuado es utilizar una tecnología que analice en volumen la totalidad de la pieza, ya que las imágenes pueden resultar engañosas dependiendo de la zona que se analice. Por el ejemplo, en la figura 4.49 se presentan imágenes de muestras en verde impresas con diferente porcentaje de porosidad (50%, 60% y 70% según gcode), y en todas ellas el porcentaje de porosidad parece mayor si se observa la sección transversal en lugar de la longitudinal.

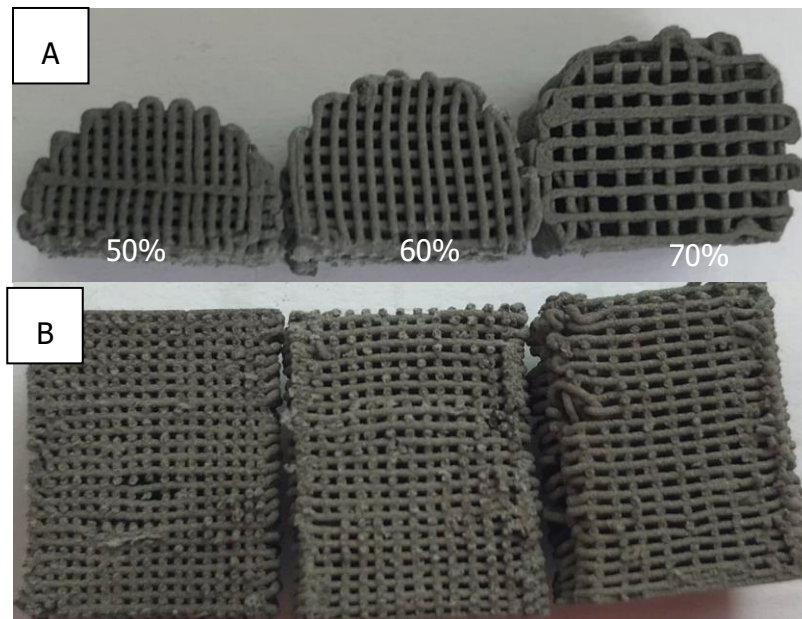


Figura 4.49 Imagen la sección A) transversal y B) longitudinal de muestras en verde impresas con 50%, 60% y 70% de porosidad (según el gcode).

Se han presentado imágenes de muestras en verde ya que se pueden mecanizar más fácilmente sin tapar la porosidad, al romper las sinterizadas (incluso fragilizándolas con nitrógeno líquido) no queda una zona plana y uniforme para analizar.

Si se observa la sección transversal (figura 4.49 A) hay mucha más diferencia de porosidad entre muestras que si se observa el corte longitudinal (figura 4.49 B). Por lo tanto, para conocer la diferencia real entre muestras lo ideal es utilizar un método que analice todo el volumen.

Porosimetría por intrusión de mercurio (MIP)

A continuación, en la tabla 4.23, se recogen los resultados de la caracterización mediante MIP.

Tabla 4.23 Identificación de las muestras con el promedio de la porosidad obtenida por MIP

ID	%Porosidad (Gcode)	Ciclo de sinterizado	Porosidad (%) media MIP
50_11	50	1150°C 2h	57
60_11	60	1150°C 2h	-
70_11	70	1150°C 2h	-

En la tabla únicamente se presenta la porosidad media sin las desviaciones estándar. Debido a la metodología del ensayo se caracterizaron todas las muestras (de cada condición) en un solo análisis; por lo tanto, el valor obtenido en realidad es la porosidad de todas ellas, y al tener un único valor no es posible calcular la desviación.

Resultados y discusión. Fabricación

En las muestras 50_11 la porosidad total obtenida por MIP es 7% superior a la porosidad diseñada inicialmente (establecida en el Gcode), mientras que en las muestras 60_11 y 70_11 no se ha podido cuantificar el porcentaje de porosidad total. Representado la intrusión de mercurio frente al diámetro del poro (figura 4.50) y observado la superficie de las muestras (figura 4.51) se pueden explicar estos resultados. Al representar la intrusión de mercurio en función del diámetro de poro se obtiene la distribución de porosidad interconectada o abierta (canal de poro). En dicha distribución se deberían distinguir claramente dos picos asociados a la micro y macroporosidad. Como se puede ver en la figura 4.50, las muestras de 60% y 70% no han sido correctamente analizadas, ya que no se distingue el pico de la macroporosidad. Esto se debe al límite de detección del equipo, que no detecta poros con longitudes superiores a un valor determinado (alrededor de 400 μm), y como se observa en la figura 4.51, las muestras del 60% y 70% tienen poros que están fuera del límite.

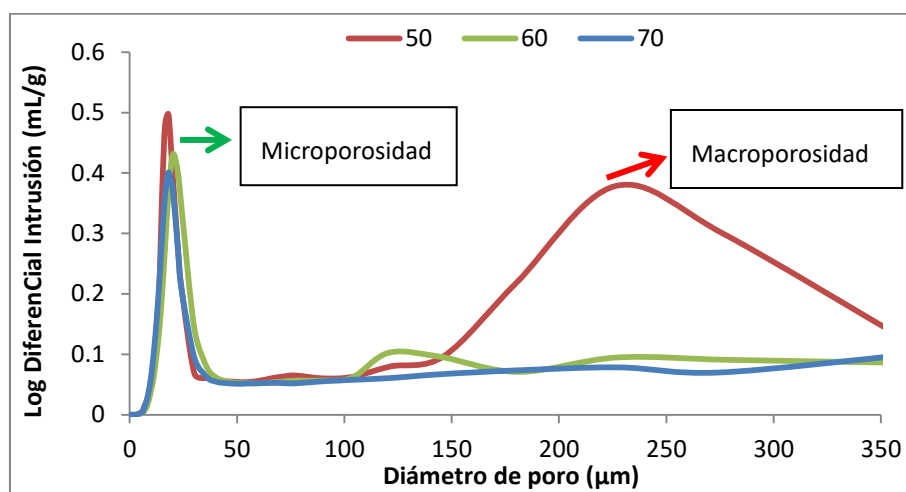


Figura 4.50 Gráfico de la intrusión de mercurio según el diámetro del poro (canal de poro).

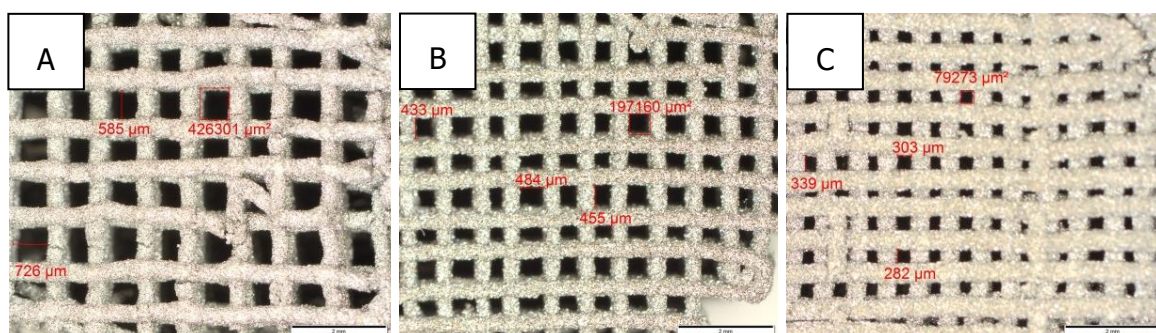


Figura 4.51 Imágenes a 1.25 aumentos de muestras sinterizadas. A) 70% B) 60% C) 50%.

Se decidió llevar a cabo la caracterización por MIP sabiendo que en las muestras 60_11 y 70_11 los poros de entrada superaban el límite del equipo, ya que normalmente el canal de poro suele ser inferior, y aunque el porcentaje total de porosidad no fuese correcto se esperaba poder obtener el tamaño del canal de poro; sin embargo, únicamente se consiguió el de las muestras 50_11, que mide alrededor de 220 μm .

Por otra parte, el MIP es una técnica idónea para medir a la microporosidad, asociada a los espacios entre partículas que quedan tras la eliminación del ligante y principalmente al grado de sinterización, en este caso todas las muestras presentan un canal de microporosidad del alrededor de 20 μm .

Por lo tanto, el MIP no es el método adecuado para caracterizar la porosidad este tipo de muestras, ya que debido al límite de detección no se puede cuantificar la porosidad total. Sin embargo, es una herramienta útil para los estudios más focalizados en la microporosidad.

Microtomografía computarizada (MicroCT)

En la figura 4.52 se presenta las imágenes de la reconstrucción 3D de muestras de diferentes porosidades (50, 60, 70%) tras la sinterización.

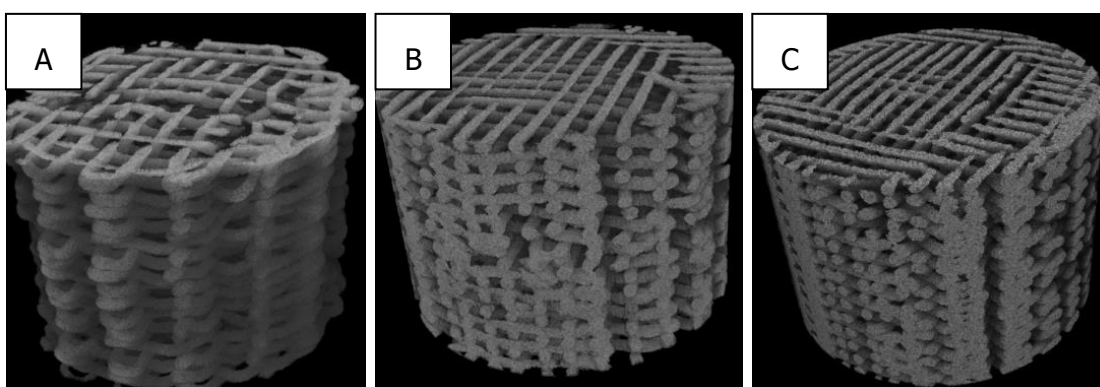


Figura 4.52 Reconstrucción 3D de las muestras sinterizadas. A) 70% B) 60% C) 50 %

Como se ha comentado en el apartado 3.6.4 de materiales y métodos, a partir de la reconstrucción 3D se obtienen y procesan imágenes 2D (de manera similar al tratamiento de imágenes MO), calculando así la porosidad total de las muestras. En la tabla 4.24 se recoge la media y desviación estándar de la porosidad, obtenidas con microCT, de las diferentes condiciones estudiadas.

Tabla 4.24 Identificación de las muestras con el promedio y la desviación estándar de la porosidad obtenida mediante microCT

ID	%Porosidad (Gcode)	Ciclo de sinterizado	Porosidad MicroCT (%)		
			Media		Desv.
50_13	50	1350°C 2h	64	±	2
50_11	50	1150°C 2h	65	±	4
60_13	60	1350°C 2h	68	±	1
60_11	60	1150°C 2h	69	±	3
70_13	70	1350°C 2h	74	±	3
70_11	70	1150°C 2h	78	±	3
70_V	70	en verde	78	±	1

Resultados y discusión. Fabricación

Como se puede ver en la tabla 4.24, los resultados del microCT indican que tras el sinterizado todas las muestras presentan una porosidad superior a la diseñada inicialmente (predefinida en el Gcode), algo similar a lo que sucedía con las muestras 50_11 analizadas por MIP (tabla 4.23), siendo mayor la porosidad del microCT debido a las limitaciones de la técnica (en el MIP no se detectan poros superiores a 400 μm).

La explicación de la diferencia entre la porosidad diseñada y la real podría estar en la metodología de impresión 3D; tal y como se comentó en el apartado 4.3.2, se optimizaron parámetros durante la impresión, concretamente flujo (100%) y velocidad (150%). Esto se traduce en que durante la impresión el movimiento del cabezal en XYZ es 50% más rápido que lo estipulado en el Gcode, mientras que la extrusión de material es la misma; en consecuencia, el tamaño de los hilos es ligeramente inferior al previsto.

A simple vista no se apreció esta diferencia y no se tuvo en consideración, pero en viendo los resultados del microCT (tabla 4.24) queda claro que la suma de los errores en los hilos ha afectado a la porosidad total de las muestras. Esto también explicaría porque cuanto mayor es la porosidad del Gcode menor es la diferencia respecto a la real, ya que las muestras más porosas tienen menos hilos y, por lo tanto, el error acumulado es menor.

Por otra parte, el software utilizado para generar el código de impresión (Slic3r) está diseñado para FDM, en donde lo normal es imprimir piezas con al menos un perímetro y es posible que al quitarlos el software no lo haya tenido en cuenta para recalcular la porosidad de impresión (densidad de llenado).

Para corroborar la hipótesis del error asociado a la impresión se realizó un análisis por microCT de una muestra en verde (tras secado overnight) del 70% de porosidad (70_V tabla 4.24) y el resultado coincide con los de las muestras sinterizadas a 1150°C (70_11); por lo tanto, se confirma que la diferencia entre la porosidad inicial (Gcode) y la final (tras sinterizado) es principalmente debida al proceso de impresión 3D.

La versatilidad de la fabricación aditiva permite que, una vez detectados, errores como este puedan ser corregidos con facilidad. Sabiendo la diferencia que se produce al sinterizar únicamente será necesario modificar la porosidad del Gcode para que coincida con la deseada.

En los resultados del MIP (figura 4.50) se vio que el tamaño de microporosidad era de alrededor de 20 μm y en la caracterización mediante microCT se utilizó una resolución de 3 μm ; por lo tanto, la microporosidad también ha sido considerada en el cálculo de la porosidad total.

No se aprecian diferencias significativas en la porosidad total al variar la temperatura (entre un 1% y un 4%), esto tiene sentido ya que ésta afecta principalmente a la microporosidad y, teniendo en cuenta los valores tan altos de macroporosidad y el error de medida (entre un 1% y un 4%), la variación de la microporosidad prácticamente no modifica el valor de la porosidad total.

4.5.4.2 Efecto de la porosidad en el grado de contracción

En la figura 4.53 se representa el % de contracción en diámetro (\emptyset) y en altura (H) de las muestras con diferentes porosidades (50, 60 y 70%) sinterizadas a 1350°C y 1150°C durante 2 horas. En la tabla 4.36 se recogen los valores medios con las desviaciones estándar.

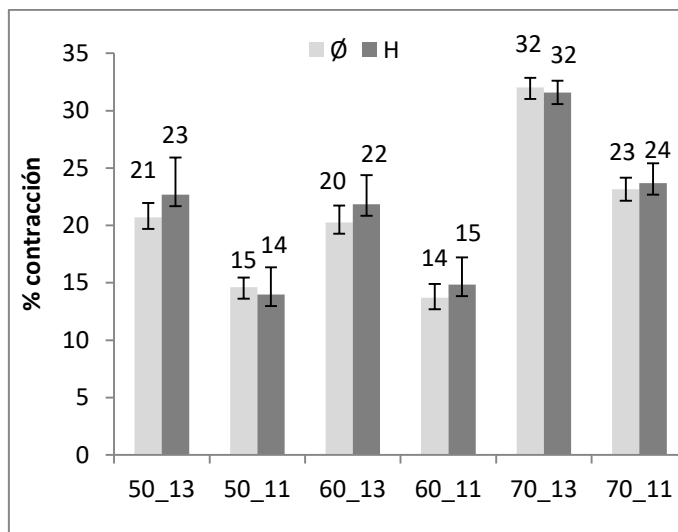


Figura 4.53 Contracción de las muestras sinterizadas a diferentes porosidades y temperaturas.

Tabla 4.25 Identificación de las muestras con el promedio y la desviación estandar la contracción

ID	%Porosidad (Gcode)	%Porosidad (MicroCT)	Ciclo de sinterizado	$\Delta \emptyset$ (%)			Δ altura (%)	
				Media	Desv.		Media	Desv.
50_13	50	64	1350°C 2h	21	± 1		23	± 3
50_11	50	65	1150°C 2h	15	± 1		14	± 2
60_13	60	68	1350°C 2h	20	± 1		22	± 2
60_11	60	69	1150°C 2h	14	± 1		15	± 2
70_13	70	74	1350°C 2h	32	± 1		32	± 1
70_11	70	78	1150°C 2h	23	± 1		24	± 2

En el gráfico de la figura 4.53 se distingue de manera general como aumenta la contracción con la porosidad y con la temperatura. Entre las muestras del 50 y el 60% de porosidad (según Gcode) prácticamente no hay diferencias en la contracción; sin embargo, en las del 70% sí. Esto coincide con los resultados del apartado anterior, en donde, el análisis mediante microCT indicó que no había tanta diferencia en la porosidad real (tras el sinterizado) de las muestras del 50 y 60%.

4.5.4.3 Efecto de la porosidad en las propiedades mecánicas

A continuación, se presentan los resultados del ensayo de compresión. En la figura 4.54 se representa el módulo elástico (E) y la resistencia (σ_c) de las muestras con diferentes porosidades (50, 60 y 70%) sinterizadas a 1350°C y 1150°C durante 2 horas. En la tabla 4.26 se recogen los valores medios con las desviaciones estándar.

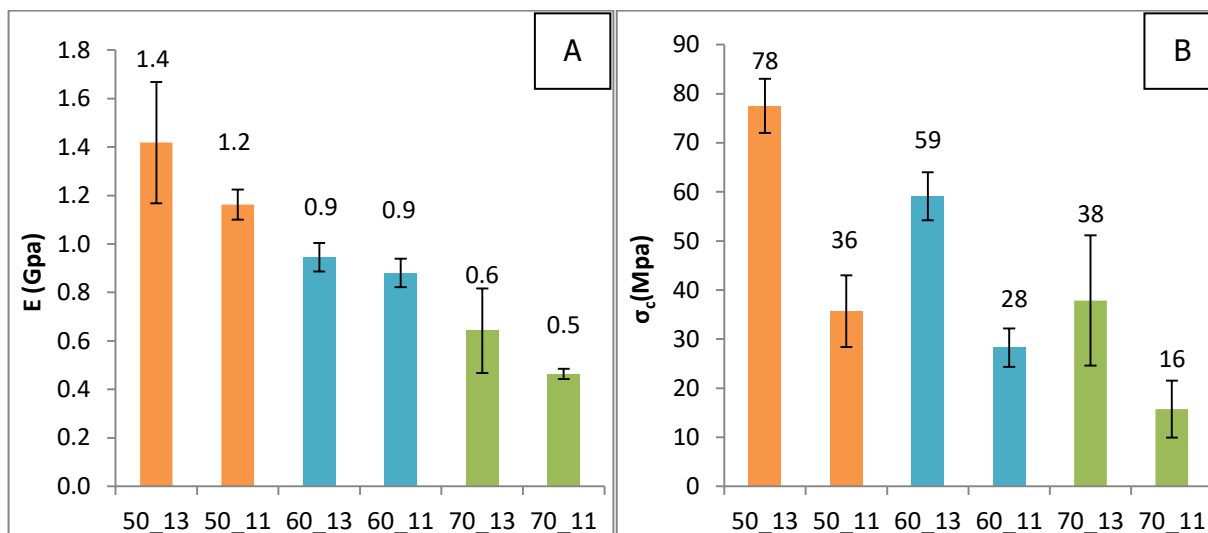


Figura 4.54 Representación gráfica de A) módulo elástico y B) resistencia a compresión de las muestras con diferentes porosidades sinterizadas a 1350°C y 1150°C.

Tabla 4.26 Identificación de las muestras con el promedio y la desviación estándar del módulo elástico y la resistencia a compresión.

ID	%Porosidad (Gcode)	%Porosidad (MicroCT)	Ciclo de sinterizado	E (GPa)			σ_c (MPa)	
				Media	Desv.		Media	Desv.
50_13	50	64	1350°C 2h	1,4	± 0,3		78	± 6
50_11	50	65	1150°C 2h	1,2	± 0,1		36	± 7
60_13	60	68	1350°C 2h	0,9	± 0,1		59	± 5
60_11	60	69	1150°C 2h	0,9	± 0,1		28	± 4
70_13	70	74	1350°C 2h	0,6	± 0,2		38	± 13
70_11	70	78	1150°C 2h	0,5	± 0,1		16	± 6

Los resultados del ensayo de compresión confirman la influencia de la porosidad en las propiedades mecánicas que, a diferencia de la temperatura, afecta tanto al módulo elástico (figura 4.54 A) como a la resistencia a compresión (figura 4.54 B). Esto coincide con lo reportado en la literatura, ya que en la actualidad unas de las estrategias para evitar el apantallamiento de tensiones (stress-shielding) es reducir el módulo elástico manipulando la porosidad de los implantes porosos [259], [301], [302]. Rodríguez-Contrera y colaboradores [166], publicaron un review muy reciente (2020) sobre implantes porosos de titanio, en el cual al hablar de las propiedades mecánicas únicamente se tiene en consideración el efecto de la porosidad. En la figura 4.55 se presentan datos de la literatura sobre el módulo de Young y

resistencia a la compresión frente a la porosidad para muestras de titanio obtenidas mediante diferentes métodos de fabricación (convencional y aditiva) [171].

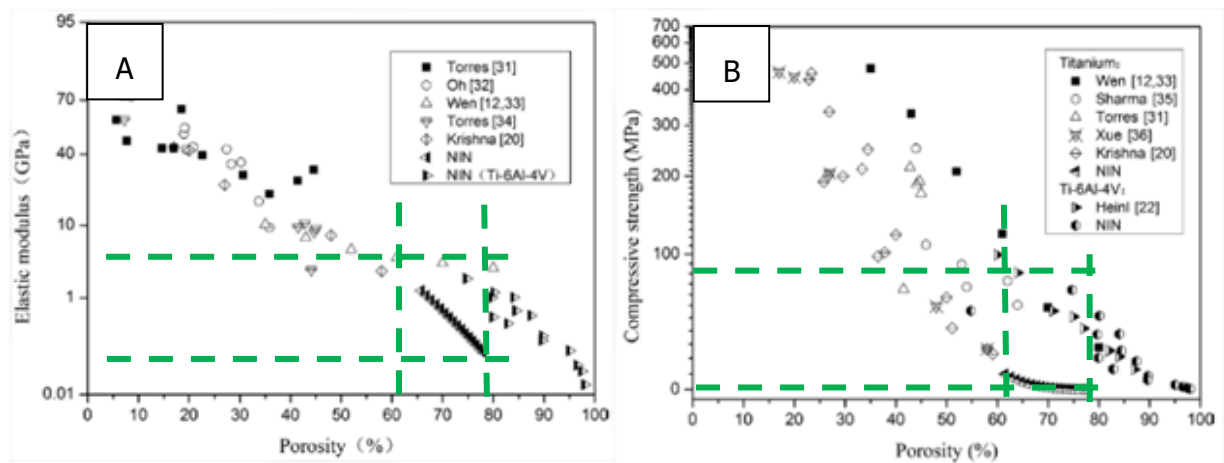


Figura 4.55 Propiedades mecánicas a compresión en función de la porosidad A) Módulo elástico B) Resistencia a compresión. (fuente: Northwest Institute for Nonferrous Metal Research, China).

En las gráficas de la figura 4.55 se ha indicado el rango de porosidades en el que se encuentran las muestras sinterizadas según los resultados de microCT (tabla 4.24), y se puede ver como las propiedades mecánicas obtenidas (tabla 4.26) coinciden con los datos de la literatura.

Por otra parte, en la empresa se llevó a cabo un estudio similar con espumas porosas de titanio fabricadas mediante space holder.(método explicado con más detalle en el capítulo 2) En la figura 4.56 se presentan las propiedades mecánicas a compresión en función de la porosidad real (medida con microCT) de muestras fabricadas vía space holder y DIW.

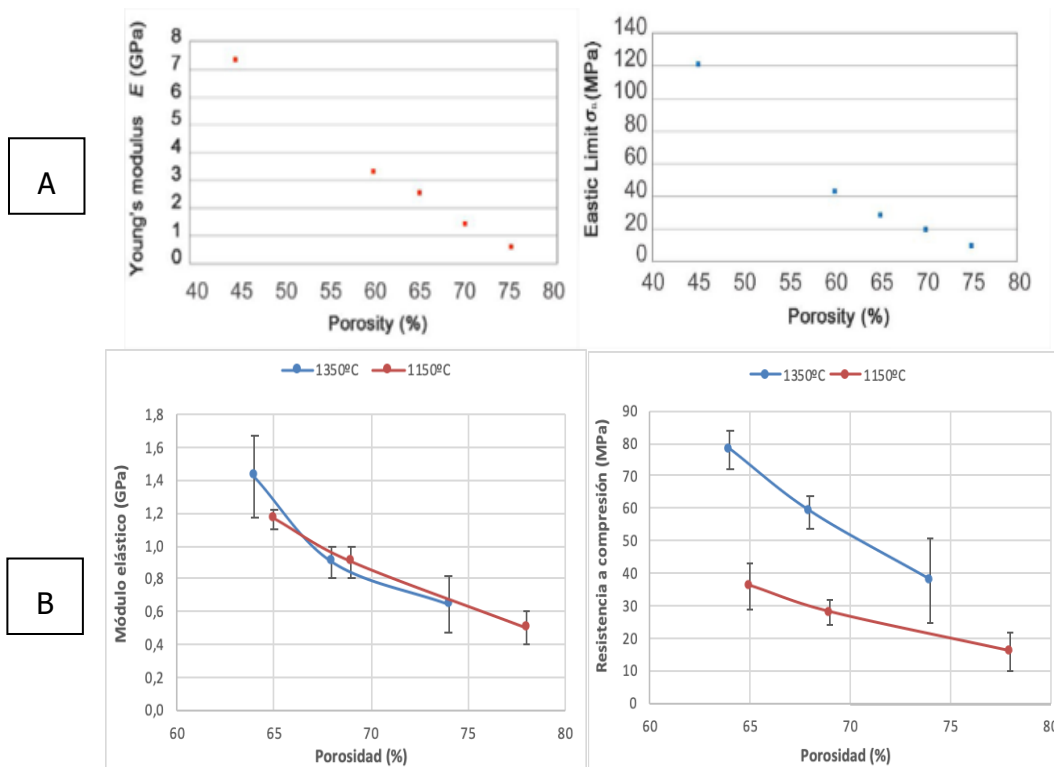


Figura 4.56 Propiedades mecánicas a compresión en función de la porosidad A) obtenida mediante space holder a 1350°C (fuente: Grupo AMES), B) mediante DIW a 1350°C y 1150°C.

Los valores correspondientes a las muestras de referencia (OsteoSinter®) serían el módulo elástico y la resistencia a compresión para una porosidad del 65%; es decir, $E \sim 2\text{GPa}$ y $\sigma_c \sim 30\text{MPa}$ (figura 4.56 A), siendo este último el valor a tener más en cuenta ya que ninguna de las condiciones presenta un módulo superior a la referencia. Hay varias condiciones que ya se aproximan a estos 30MPa, como las muestras 50_11 o 70_13 (tabla 4.26). Por lo tanto, ajustando la porosidad de la impresión (Gcode) se podrían desarrollar estructuras de titanio con porosidad y propiedades mecánicas similares a Osteosinter®, o incluso mejores (mayor resistencia y menor módulo).

Por otra parte, en la figura 4.56 B se puede ver como a pesar de tener una porosidad total similar, las muestras sinterizadas a 1350°C presentan mayor resistencia a compresión que las muestras sinterizadas a 1150°C. Esto podría ser debido a múltiples factores como el grado de sinterización, el porcentaje de microporosidad, (aunque no es suficiente para modificar la porosidad total posiblemente sí lo sea para influir en las propiedades mecánicas), el canal de poro (tanto micro como macro), o mecanismo de formación de cuello de sinterizado entre partículas (es posible que a 1350°C haya intervenido el mecanismo de evaporación condensación). Para corroborar esto se requiere de un estudio más profundo sobre el sinterizado de titanio poroso en alto vacío, el cual se aleja del principal objetivo que es obtener muestras con propiedades similares Osteosinter®; además, se ha demostrado que no es necesario sinterizar a 1350°C para conseguirlo.

4.5.4.4 Efecto de la temperatura y la porosidad en el contenido de oxígeno y carbono

A continuación, se presentan los resultados del análisis de elementos intersticiales. En la figura 4.57 se grafica el porcentaje en peso de oxígeno y carbono de las muestras con diferentes porosidades (50, 60 y 70%) sinterizadas a 1350°C y 1150°C durante 2 horas; así como de los testigos palca (testigo del proceso) y polvo (testigo de la sinterización). En la tabla 4.27 se recogen los valores medios con las desviaciones estándar.

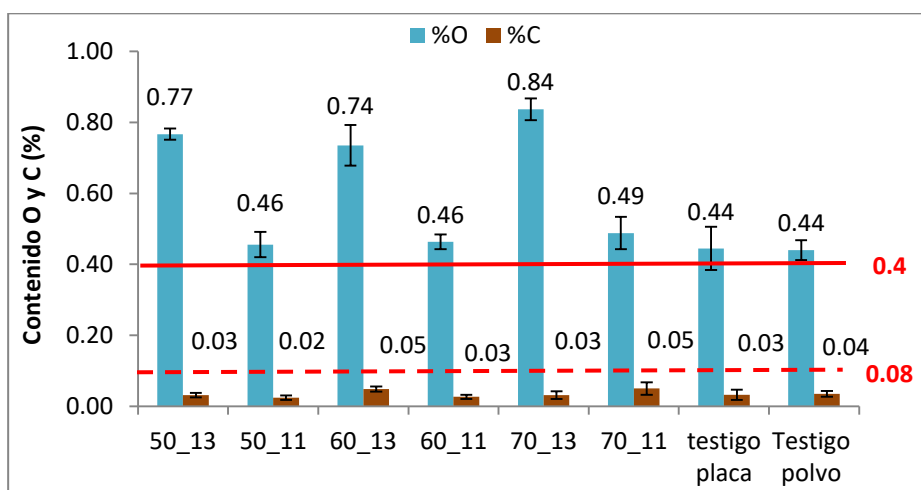


Figura 4.57 Representación gráfica de del %C y %O de las muestras con diferentes porosidades sinterizadas a 1350°C y 1150°C, así como de los testigos. Límites de O (0.4%) y C (0.1%) según la norma ASTM F67-06.

Tabla 4.27 Identificación de las muestras con el promedio y la desviación estándar del contenido de intersticiales.

ID	%Porosidad (Gcode)	Ciclo de sinterizado	O (%)		C (%)	
			Media	Desv.	Media	Desv.
50_13	50	1350°C 2h	0,77	± 0,02	0,03	± 0,01
50_11	50	1150°C 2h	0,46	± 0,04	0,02	± 0,01
60_13	60	1350°C 2h	0,74	± 0,06	0,05	± 0,01
60_11	60	1150°C 2h	0,46	± 0,02	0,03	± 0,01
70_13	70	1350°C 2h	0,84	± 0,03	0,03	± 0,01
70_11	70	1150°C 2h	0,49	± 0,05	0,05	± 0,02
Testigo placa	Eliminación + sinterizado 1150°C 2h		0,44	± 0,06	0,03	0,01
Testigo polvo	Sinterizado 1150°C 2h		0,44	± 0,03	0,04	0,01

Como se puede ver en la figura 4.57, en todos los casos el %C es bajo, cumpliendo la normativa independientemente de la porosidad o temperatura; a pesar de esto, es necesario tenerlo en consideración e ir controlándolo ya que un aumento inusual (aun estando dentro de normativa) puede ser un indicativo de contaminación en alguna de las etapas.

En cuanto al oxígeno, se observa una clara tendencia a aumentar con la temperatura de sinterización y poca influencia de la porosidad. Todos los valores de las muestras están por encima del límite establecido por la norma; siendo las sinterizadas a 1150°C las que más se

aproximan. Sin embargo, tal y como se muestra en la tabla 4.27 prácticamente no hay diferencias significativas entre las muestras porosas sinterizadas y los testigos, lo cual indica que el contenido de oxígeno no proviene de las tintas o de la eliminación, sino de la calidad del propio sinterizado. Como se ha comentado en apartados anteriores (4.1.1 y 4.4.2) en el polvo utilizado (Ti tabla 3.1) el contenido de oxígeno aumenta prácticamente de manera instantánea al abrir el envase del proveedor, y tras la eliminación se mantiene en valores permitidos por la norma. En el apartado 2.5.4.1 del capítulo 2 se explicó la importancia de la atmósfera de sinterización en el contenido de elementos intersticiales, especialmente en el oxígeno; por lo tanto, con un sistema de vacío más robusto es muy posible que se reduzca el %O y se puedan fabricar implantes porosos que cumplan la normativa.

Por otra parte, en cuanto a los límites del contenido de oxígeno, la norma ASTM F67-06 establece para un titanio grado 2-4 (grado médico) el límite de contenido en oxígeno en 0.25 y 0.40 (% en masa) respectivamente; sin embargo, estos valores se fijan debido a la fragilidad que pueden provocar [303]. Esto tiene sentido si se piensa en titanio macizo, pero no al tratarse de piezas con más de un 50% de porosidad, en este caso lo que regula las propiedades mecánicas, incluyendo la fragilidad, será el diseño de la porosidad. Conviene recordar que a nivel de regulación estas son normas armonizadas, pero no de obligado cumplimiento; es decir, si se consiguen valores que estén dentro de la norma se hace referencia y esto facilitaría los aspectos regulatorios, pero en el caso contrario, simplemente no se hace mención de esta norma y se demostraría mediante otros métodos que las piezas fabricadas son válidas. Además, la tecnología desarrollada está más focalizada en la fabricación de implantes a medida, y en este caso la regulación no es tan restrictiva; por ejemplo, no es necesario la obtención de un marcado CE para vender un implante a medida.

4.5.4.5 Conclusiones del estudio de la porosidad

- Para conocer la porosidad total del tipo de muestras a fabricar microCT es la técnica más adecuada y fiable. El MIP es ideal para medir la microporosidad, pero no la macroporosidad. Mejorando la medición del volumen de las muestras, con un equipo tipo escáner 3D, se podría considerar el método gravimétrico.
- Hay una diferencia considerable entre la porosidad inicial (la que se establece en el Gcode) y la porosidad real del sinterizado, independientemente de la técnica utilizada. Conociendo el valor de dicha diferencia se puede reajustar y solucionar el problema.
- La contracción se ve más influenciada por la temperatura que por la porosidad.
- A diferencia de la temperatura, la porosidad afecta tanto al módulo elástico como a la resistencia a compresión.
- Ajustando la porosidad no es necesario aumentar tanto la temperatura de sinterización para conseguir propiedades mecánicas adecuadas.
- Se podrían desarrollar estructuras de titanio con porosidad y propiedades mecánicas similares o incluso superiores a Osteosinter®.
- A diferencia de la porosidad la temperatura influye considerablemente en el contenido de intersticiales.
- Se consiguen porcentajes de carbono dentro de norma, el oxígeno está encima; sin embargo, mejorando el sistema de vacío es posible llegar a estos valores.

4.5.5 Estudio del patrón de impresión

En este apartado se evaluaron muestras sinterizadas fabricadas con diferentes tipos de estructura de porosa. Se utilizaron los patrones de llenado o impresión lineal (L) y Honeycomb (HC), con diferentes porcentajes de porosidad (50, 60 y 70 según el Gcode). Además, para conocer el comportamiento isotrópico de las muestras se realizaron ensayos de compresión aplicando la carga en la misma dirección de impresión (paralela) y en dirección perpendicular. En la tabla 4.28 se identifican las muestras y condiciones de fabricación.

Tabla 4.28 Identificación de las muestras utilizadas para el estudio del patrón de impresión.

ID	%Porosidad (Gcode)	Patrón de impresión	Carga respecto a la impresión	Número de perímetros	Ciclo de sinterizado	Velocidad del ciclo
I150HC	50	HC	Paralela	0	1150°C 2h	2,5°C/min
I150L	50	Lineal	Paralela	0	1150°C 2h	2,5°C/min
⊥150HC	50	HC	Perpendicular	0	1150°C 2h	2,5°C/min
⊥150L	50	Lineal	Perpendicular	0	1150°C 2h	2,5°C/min
I160HC	60	HC	Paralela	0	1150°C 2h	2,5°C/min
I160L	60	Lineal	Paralela	0	1150°C 2h	2,5°C/min
⊥160HC	60	HC	Perpendicular	0	1150°C 2h	2,5°C/min
⊥160L	60	Lineal	Perpendicular	0	1150°C 2h	2,5°C/min
I170HC	70	HC	Paralela	0	1150°C 2h	2,5°C/min
I170L	70	Lineal	Paralela	0	1150°C 2h	2,5°C/min
⊥170HC	70	HC	Perpendicular	0	1150°C 2h	2,5°C/min
⊥170L	70	Lineal	Perpendicular	0	1150°C 2h	2,5°C/min

Por otra parte, de manera complementaria, se llevó a cabo un estudio sobre el efecto de añadir perímetros a las muestras. Para tener más información y conocer, en cierta medida, el valor máximo de propiedades mecánicas que es posible obtener, se minimizó la porosidad (40% según el Gcode) y maximizó la temperatura (1350°C). En la tabla 4.29 se identifican las muestras y condiciones de fabricación.

Tabla 4.29 Identificación de las muestras utilizadas para el estudio complementario sobre efecto de añadir perímetros a la estructura.

ID	Número de perímetros	%Porosidad (Gcode)	Patrón de impresión	Carga respecto a la impresión	Ciclo de sinterizado	Velocidad del ciclo
40	0	40	Lineal	Paralela	1150°C 2h	2,5°C/min
40_1P	1	40	Lineal	Paralela	1150°C 2h	2,5°C/min
40_2P	2	40	Lineal	Paralela	1150°C 2h	2,5°C/min

4.5.5.1 Efecto del patrón de impresión (Lineal vs Honeycomb)

En la figura 4.58 se presentan los resultados de los ensayos a compresión y en la tabla 4.30 se recogen los valores medios con las desviaciones estándar.

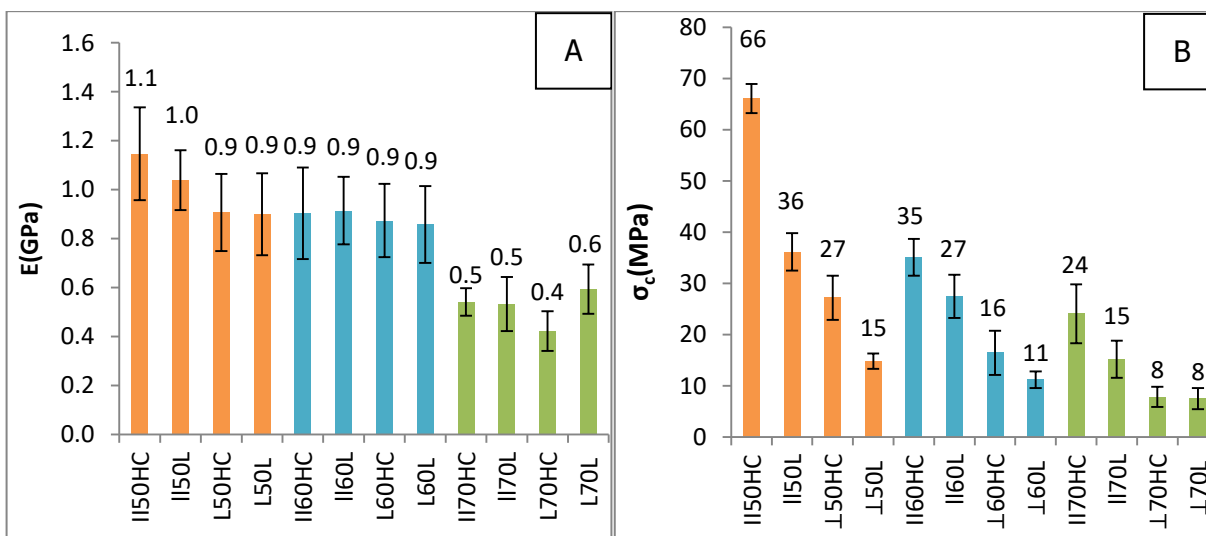


Figura 4.58 Representación gráfica de A) módulo elástico y B) resistencia a compresión de las muestras con diferentes estructuras y porosidades.

Tabla 4.30 Identificación de las muestras con el promedio y la desviación estándar del módulo elástico y la resistencia a compresión

ID	%Porosidad (Gcode)	Estructura	Carga respecto a la impresión	E (GPa)		σ _c (MPa)	
				Media	Desv.	Media	Desv.
I150HC	50	HC	Paralela	1,1	± 0,2	66	± 3
I150L	50	Lineal	Paralela	1,0	± 0,1	36	± 4
L50HC	50	HC	Perpendicular	0,9	± 0,2	27	± 4
L50L	50	Lineal	Perpendicular	0,9	± 0,2	15	± 1
I160HC	60	HC	Paralela	0,9	± 0,2	35	± 4
I160L	60	Lineal	Paralela	0,9	± 0,1	27	± 4
L60HC	60	HC	Perpendicular	0,9	± 0,1	16	± 4
L60L	60	Lineal	Perpendicular	0,9	± 0,2	11	± 2
I170HC	70	HC	Paralela	0,5	± 0,1	24	± 6
I170L	70	Lineal	Paralela	0,5	± 0,1	15	± 4
L70HC	70	HC	Perpendicular	0,4	± 0,1	8	± 2
L70L	70	Lineal	Perpendicular	0,6	± 0,1	8	± 2

Como se puede ver en la figura 4.58 A, el valor del módulo elástico únicamente varía con la porosidad; no hay diferencias modificar el patrón de impresión (lineal o honeycomb) y es independiente de la dirección de aplicación de carga (paralela o perpendicular a la impresión).

En cuanto a la resistencia a compresión, en la figura 4.58 B se observa cómo influye la estructura, la dirección de aplicación de carga y el porcentaje de porosidad. Las muestras con estructura honeycomb presentan mayor resistencia a compresión en todo el rango de

porosidades. Esto coincide con lo esperado, ya que las estructuras honeycomb son ampliamente estudiadas, entre otros motivos, por su capacidad de absorción de energía y resistencia a compresión, que podría explicarse por el modo celular de Gibson y Ashby [268]. Choy y colaboradores [260], realizaron un estudio similar comparando diferentes diseños y orientaciones, llegando a conclusiones similares: las estructuras honeycomb mejor comportamiento a compresión. No es posible comparar los resultados de manera cuantitativa ya que estos autores fabricaron muestras de Ti6Al4V mediante SLM (selective laser Melting).

Independientemente del porcentaje de porosidad y del tipo de estructura las muestras presentan un comportamiento anisotrópico, siendo considerablemente superior la resistencia a compresión al aplicar la carga en la misma dirección de fabricación. Maurath y colaboradores [264], estudiaron las propiedades de muestras cerámicas impresas en 3D con estructura honeycomb, llegando a la conclusión de que dicha estructura presenta anisotropía en la resistencia a compresión. Choy y colaboradores [260], reportaron un comportamiento anisotrópico independientemente del diseño de la porosidad en muestras de Ti6Al4V obtenidas por fabricación aditiva (SLM). Zhang y colaboradores [265], llevaron a cabo un estudio del comportamiento de espumas de titanio que imitan la estructura trabecular y vieron una evidente comportamiento anisotrópico a compresión.

Coincidiendo con los resultados del estudio anterior sobre muestras cilíndricas (figura 4.54) al reducir la porosidad aumenta la resistencia a compresión. Sin embargo, se ha demostrado que se puede conseguir el mismo nivel de propiedades mecánicas modificando el patrón de impresión, sin sacrificar porosidad. Por ejemplo, tal y como se observa en la tabla 4.30, las muestras II50L y II60HC presentan prácticamente los mismos valores de módulo y resistencia a compresión (1,0 y 0,9 GPa, y 36 y 35 MPa), siendo el módulo la mitad y la resistencia similar a las muestras de referencia OsteoSinter® ($E \sim 2\text{GPa}$ y $\sigma_c \sim 30\text{Mpa}$).

Se observó la morfología de las muestras tras finalizar el ensayo. En las figuras 4.59 y 4.60 se presentan imágenes de las muestras II70L, II70HC, $\perp 70\text{L}$ y $\perp 70\text{HC}$ (tabla 4.30) tras el ensayo de compresión. No se apreciaron diferencias al cambiar el porcentaje de porosidad por lo que únicamente se presentan imágenes de las muestras del 70%(según gcode).

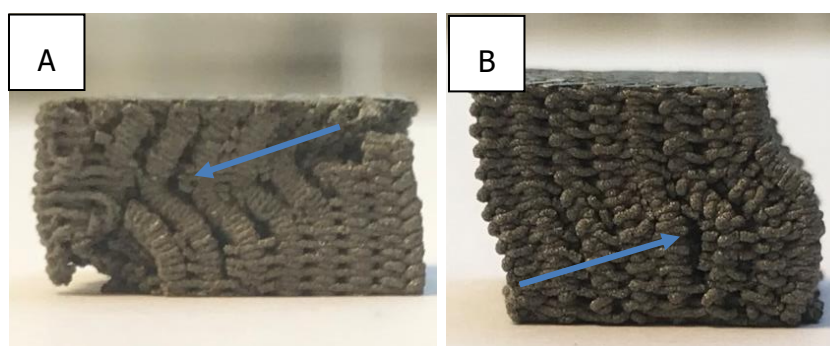


Figura 4.59 Imágenes de las muestras tras el ensayo de compresión. Aplicación de carga paralela a la impresión A) estructura lineal B) estructura honeycomb.

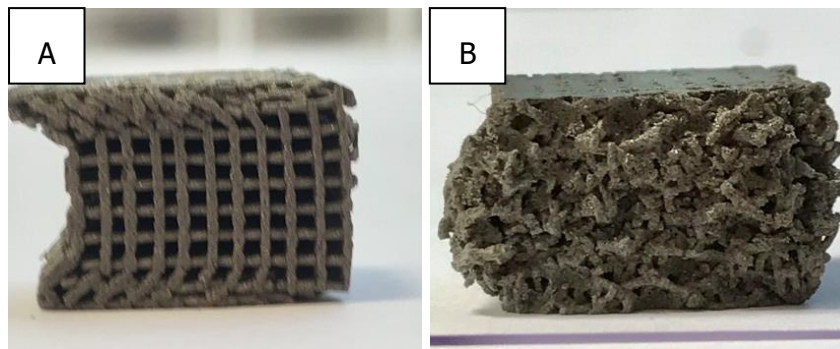


Figura 4.60 Imágenes de las muestras tras el ensayo de compresión. Aplicación de carga perpendicular a la impresión A) estructura lineal B) estructura honeycomb.

En las muestras en las que se aplicó la carga en el mismo sentido de impresión (figura 4.59) se observa un tipo de rotura en forma de cizalla, se puede distinguir la propagación de la deformación hacia uno de los laterales. Según diversos autores este tipo de fractura con una inclinación de 45° es de las más comunes en espumas metálicas obtenidas por fabricación aditiva [260], [265], [266]. En la muestra con estructura honeycomb (figura 4.59 B) además se observa una deformación plástica, las columnas se van pandeando hasta colapsar.

Por otra parte, en las muestras en las que se aplicó la carga perpendicular al patrón de impresión (figura 4.60) se observa un mecanismo de deformación totalmente distinto, los poros se van colapsando capa a capa hasta densificar la pieza.

4.5.5.2 Efecto del número de perímetros

A continuación, se presentan los resultados del ensayo de compresión. En la figura 4.61 se representa el módulo elástico (E) y la resistencia a compresión (σ_c) de las muestras con 40% de porosidad (según Gcode) y diferente número de perímetros (0, 1 y 2) sinterizadas a 1350°C 2 horas. En la tabla 4.31 se recogen los valores medios con las desviaciones estándar además de la porosidad obtenida mediante MicroCT.

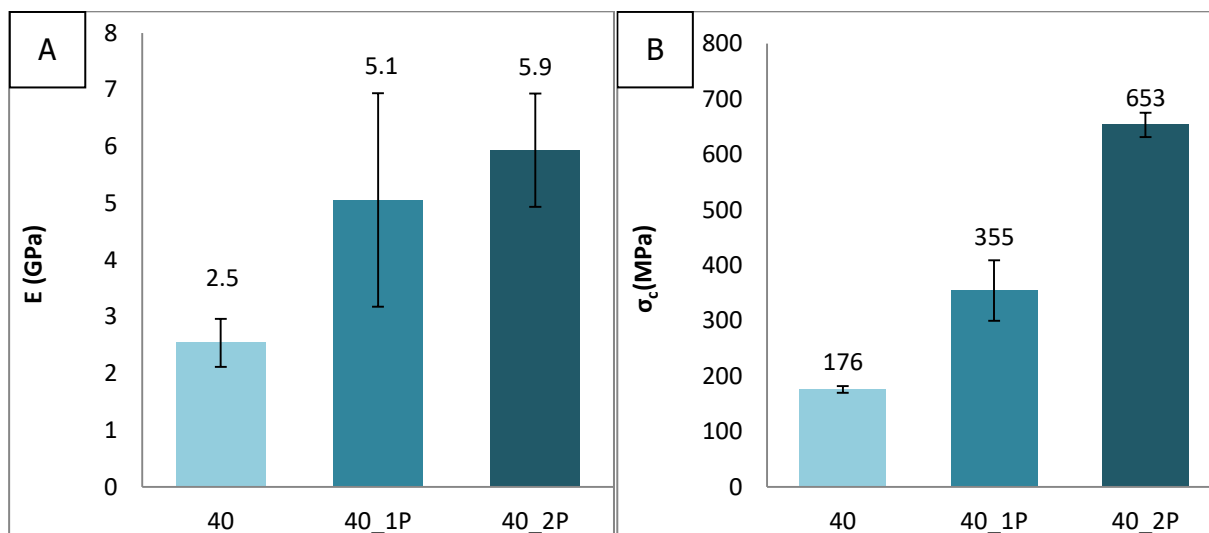


Figura 4.61 Representación gráfica de A) módulo elástico y B) resistencia a compresión de las muestras con diferente número de perímetros.

Tabla 4.31 Identificación de las muestras con el promedio y la desviación estándar del módulo elástico y la resistencia a compresión.

ID	%Porosidad (Gcode)	Porosidad MicroCT (%)	Perímetros	E (GPa)		σ_c (MPa)	
				Media	Desv.	Media	Desv.
40	40	52	0	2,5	± 0,5	176	± 6
40_1P	40	42	1	5,1	± 1,9	355	± 54
40_2P	40	42	2	5,9	± 1,0	653	± 22

En la tabla 4.31 se puede ver como en las muestras en las que se han añadido perímetros la porosidad inicial (establecida en el Gcode) se asemeja más a la porosidad real obtenida tras el sinterizado. Esto concordaría con lo comentado en el apartado anterior, en donde se atribuyó esta diferencia de porosidad a la impresión 3D. Para generar los códigos de impresión (gcode) se utilizó un software libre (Slic3r) que, como la gran mayoría, está diseñado para las impresoras convencionales de extrusión de plástico (FDM), y en este tipo de impresiones se suele utilizar al menos un perímetro; por lo tanto, es posible que al eliminar los perímetros del código el software no lo tenga en consideración al recalcular la porosidad y esta sea mayor.

En cuanto a las propiedades mecánicas, en la figura 4.61 se observa un evidente efecto al añadir perímetros en las estructuras porosas, tanto el módulo elástico como la resistencia a compresión aumentan considerablemente (prácticamente de doble) con el número de perímetros. En parte se podría asociar con la reducción de la porosidad; sin embargo, las

Resultados y discusión. Fabricación

muestras con dos perímetros tienen la misma porosidad que las de uno solo, y aun así casi el doble de resistencia a compresión. Al observar las muestras tras el ensayo (figura 4.62) se puede explicar mejor a que se debe este incremento de propiedades.

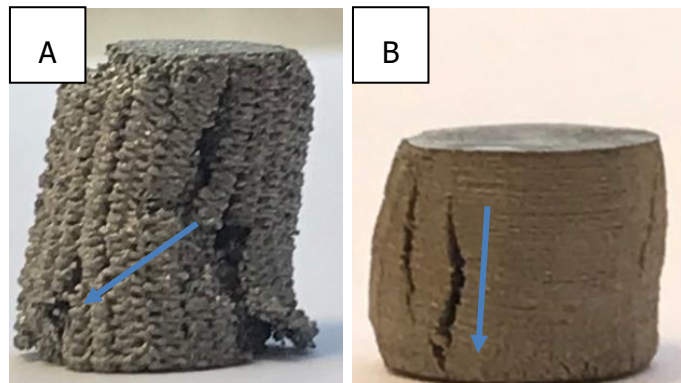


Figura 4.62 Imágenes de las muestras tras el ensayo de compresión: A) sin perímetro, B) con perímetro

Como se puede ver la muestra sin perímetros (figura 4.62 A) presenta la fractura típica en este tipo de piezas, una propagación de la grieta en diagonal, similar a la que se observó en las muestras cúbicas (figura 4.59). En cambio, en la muestra con perímetros la grieta es totalmente horizontal, además, tampoco se aprecia una inclinación en la pieza. Esto es debido a que al añadir perímetros estos impiden el pandeo de los pilares y hacen que la distribución de tensiones sea más homogénea.

4.5.5.5 Conclusiones del estudio sobre la estructura

- Al cambiar la estructura lineal por la honeycomb se aumenta la resistencia a compresión y se mantiene el módulo elástico.
- Las muestras presentan un comportamiento anisotrópico independientemente de la estructura. Con mayor resistencia a compresión si la carga se aplica en la misma dirección que la impresión.
- Al añadir 1 perímetro reduce la diferencia entre la porosidad inicial (la que se establece en el Gcode) y la porosidad real del sinterizado; además, prácticamente se duplica el módulo elástico y la resistencia a compresión.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. FUNCIONALIZACIÓN

5.1 FORMACIÓN DE TITANATOS DE CALCIO E INCORPORACIÓN DE PLATA, CON PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS, SOBRE ESTRUCTURAS POROSAS DE TITANIO.

Las infecciones relacionadas con dispositivos médicos representan una de las principales causas de fallo del implante en odontología y ortopedia. La mayoría de estas infecciones son producidas por biopelículas o biofilms, que son comunidades complejas y sésiles de bacterias que se encuentran adheridas a una superficie o en el interior de una matriz extracelular como agregados [304]. En España se realizan 30.000 artroplastias al año, con una tasa media de infección del 34%, lo que conlleva un coste adicional sanitario de 46 M€ [17]. Por este motivo, existe un gran interés de diseñar nuevos implantes con capacidad de inhibir la formación de biofilms antibacterianos.

Se ha visto con el tratamiento termoquímico para la formación de titanatos de calcio (apartado anterior) es posible añadir ciertos iones que son efectivos para la promoción del crecimiento óseo, tales como Mg^{2+} [72], Sr^{2+} [72]+ y Zn^{2+} [73], y otros como Ag^+ [74] y Ga^{3+} [75], que presentan actividad antibacteriana. En este apartado se optó por introducir iones plata, ya que desde hace años se conoce que tanto la plata metálica (Ag^0) como los iones de plata (Ag^+) tienen fuertes efectos inhibitorios y bactericidas, así como un amplio espectro de actividades antimicrobianas [191]–[196].

El principal problema de incorporar la plata en los recubrimientos de titanatos de sodio o calcio era que la plata en presencia de los iones cloruros tiende a precipitar. Por esos motivos, algunos autores han intentado su incorporación en la etapa final del proceso. En este caso, el principal problema radicaba en que la incorporación de la plata era muy superficial, y, por tanto, los valores de liberación eran muy bajos.

Inoue y colaboradores [214], generaron recubrimientos de titanato de sodio con Ag sumergiendo el Ti, que previamente se le había realizado el tratamiento con NaOH 5M, en una solución 0.05M de acetato de plata durante 3 horas con el fin de facilitar el intercambio de los iones de Na^+ por Ag^+ . En este caso los iones Ag^+ se incorporaron (vía intercambio iónico con Na^+) con éxito en la capa de titanato de sodio con algunos precipitados de partículas de plata. El producto resultante exhibió una gran capacidad antibacteriana (más del 99% de reducción) en *S. aureus*. En contrapartida las muestras presentaban una menor bioactividad por la falta de liberación de iones Na^+ . V. Prabu y colaboradores [215], demostraron que los iones Ag^+ se podían incorporar en el titanato de sodio hidrogenado sin formar precipitados de plata, sumergiendo las muestras en una solución de $Ag(NO_3)_3$ 0.01-100mM tras el tratamiento con NaOH. Sin embargo, al realizar el tratamiento térmico vuelven a aparecer precipitados de plata. Kizuki y colaboradores [74], consiguieron generar un titanato de calcio con Ag libre de precipitados añadiendo la plata tras el después del tratamiento térmico, siguiendo el proceso secuencial: NaOH, $CaCl_2$ (100mM a 40°C 24h), tratamiento térmico y $AgNO_3$ (0.001-25mM a 80°C 24h). El producto resultante exhibió una gran capacidad antibacteriana (más del 99% de reducción) en *S. aureus*, además de generar apatita tras inmersión en SBF.

En estudios previos (anexo 3 apartado 8.3.2) se demostró que era posible incorporar iones calcio tanto con $CaCl_2$ como $C_4H_6CaO_4$ formando titanatos de calcio. Por lo tanto, para evitar la precipitación de AgCl, sin necesidad de añadir la plata en una etapa posterior al tratamiento térmico (más superficial), se sustituyó el $CaCl_2$ por $C_4H_6CaO_4$ en el tratamiento termoquímico con el siguiente proceso secuencial: NaOH, $CaCl_2 + AgNO_3$, tratamiento térmico y tratamiento

en agua (tabla 5.1). En el apartado 3.7.4 de materiales y métodos se detallan cada una de las etapas del proceso.

Tabla 5.1 Identificación de las muestras con el tratamiento para añadir Ag

Muestras	
KAg	
Etapa 1	Ataque NaOH
Etapa 2	$C_4H_6CaO_4 + AgNO_3$ 1mM
Etapa 3	Tratamiento térmico
Etapa 4	Tratamiento en agua

Únicamente se utilizó una concentración de $AgNO_3$, la más adecuada (presenta propiedades antibacterianas sin ser citotóxica) en base a los datos de la literatura [74], [214], [215], ya que el principal reto era incorporar iones Ag^+ en las estructuras porosas de Ti generando titanatos de calcio con plata, evitando la formación de precipitados sin tener que añadir la plata después del tratamiento térmico. Además, con poca cantidad de iones Ag^+ (1-5 ppm) liberados es suficiente para exhibir actividad antibacteriana [41]. Por otra parte, de igual modo que se ha demostrado el efecto antibacteriano de los iones Ag^+ , también hay evidencias de que a partir de ciertas concentraciones (<10 ppm) pasa a ser citotóxica y muy perjudicial para el organismo [216], [217].

5.1.1 Estructura superficial

Se observó la superficie de las muestras mediante microscopía electrónica, para asegurar que la microestructura haya cambiado al modificar el tratamiento para añadir Ag, y verificar que no se hayan producido precipitados (figura 5.11). Además, se llevó a cabo un análisis elemental por EDS, para confirmar la deposición del calcio y plata en la superficie (exterior e interior). A continuación, se presentan las micrografías obtenidas (KAg).

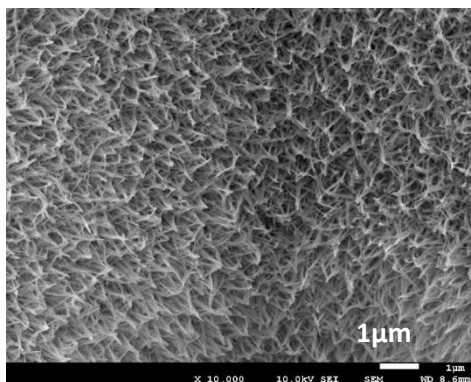


Figura 5.1 Imagen SEM a 10k aumentos de la superficie de la muestra tratada con acetato de calcio y nitrato de plata (KAg).

Como se puede ver en la figura 5.1, se obtiene la microestructura característica, acicular o tipo pluma. No se observan diferencias respecto a las micrografías de los tratamientos realizados en los estudios previos (figuras 8.65 y 8.72) ni con las encontradas en la literatura [74], [214], [215]. En la tabla 5.2 se recogen los resultados de la cuantificación del EDS.

Tabla 5.2 Análisis elemental EDS (%at.) de las muestras KAg.

	O	Ca	Ag	Ti
KAg	36,2±0,3	2,6±0,2	1,6±0,6	59,9±0,9

Los resultados confirman la presencia de plata y calcio en la superficie (interior y exterior) de las muestras, obteniendo valores de Ag, en % atómico, similares a los obtenidos por Kizuki y colaboradores [74], quienes consiguieron formar una capa de titanato de calcio con Ag libre de precipitados en la superficie del titanio. V. Prabu y colaboradores [215], realizaron un tratamiento termoquímico que consistía en sumergir las muestras de Ti en una solución de $\text{Ag}(\text{NO}_3)_3$ 0.01-100mM tras el tratamiento con NaOH 5M, seguido del tratamiento térmico (600°C 1h); y demostraron que la incorporación de iones de plata (%at.) aumenta con la concentración de la solución de AgNO_3 , pero que prácticamente se satura en ~2%at. a una concentración de 10mM. A efectos de este trabajo de tesis doctoral, se ha escogido una concentración de 1mM de AgNO_3 con la que se ha conseguido introducir un 1,5%Ag, valor próximo al máximo de saturación encontrado por otros autores para concentraciones de nitrato de plata dos órdenes superiores.

5.1.2 Análisis fisicoquímico

Para conocer de qué manera se ha incorporado la plata en la superficie se realizó una caracterización fisicoquímica mediante diferentes técnicas de análisis. En la figura 5.2 se presentan los resultados del análisis mediante espectroscopia Raman, únicamente de las muestras sin tratamiento térmico (etapa 1 y 2 tabla 5.1)

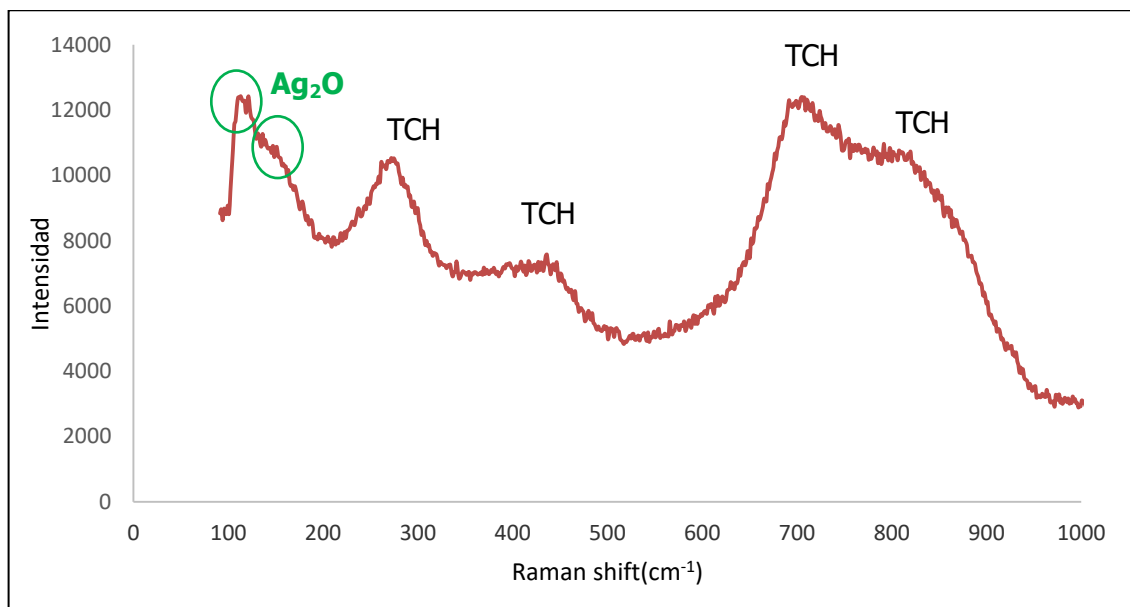


Figura 5.2 Espectro Raman de las muestras tras la inmersión en acetato de calcio y nitrato de plata (antes del tratamiento térmico). TCH: titanato de calcio hidrogenado.

En la imagen se identifican los picos 276, 435, 703, y 875 cm^{-1} , característicos del titanato de calcio hidrogenado [305], igual que en las muestras KAc y KCa de los estudios previos en donde se aplicó el mismo tratamiento pero sin incorporar iones de plata (figura 8.73 del anexo 3). También se pueden distinguir dos picos alrededor de 100 cm^{-1} y 150 cm^{-1} que son representativos del modo reticular vibratorio Ag para el Ag_2O (95 cm^{-1} y 148 cm^{-1}), o bien para el AgCH_3COO (acetato de plata, 102 cm^{-1} y 140 cm^{-1}) [306]. Dado que no se detectó C en el análisis por EDS se puede descartar la presencia de acetato. Además, Inoue y colaboradores [214], utilizaron el acetato de plata (50mM) como reactivo para introducir Ag en titanatos de sodio y no identificaron restos de acetato tras el tratamiento.

Es posible que la plata esté presente en otros estados que no puedan ser detectados por esta técnica. La espectroscopia Raman solo detecta cambios de polarización con el modo de enlace de vibración y no puede detectar la plata en estado metálico. Por lo tanto, para corroborar los resultados y completar la caracterización fue necesario utilizar otros métodos como DRX. A continuación, en la figura 5.3 se presentan el diagrama obtenido.

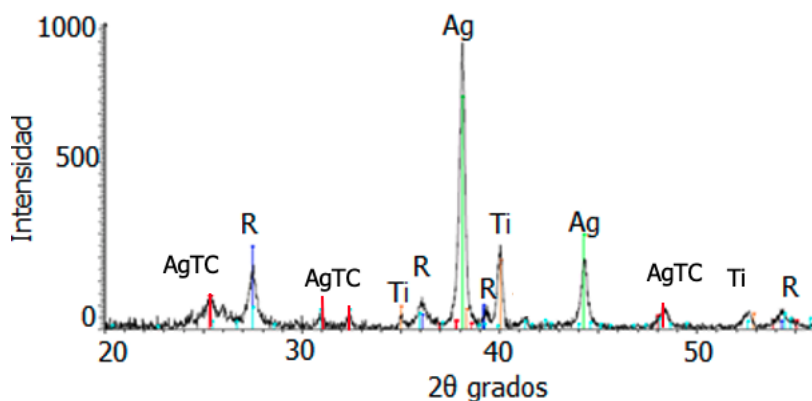


Figura 5.3 Diagrama de DRX tras el tratamiento termoquímico completo con acetato de calcio y nitrato de plata (KAg). AgTC: titanato de calcio con plata, R: rutilo, Ti: titanio, Ag: plata.

Se distinguen dos picos 2θ a 38 y 44 grados que se pueden indexar a los nanocristales cúbicos de plata (JCPDS no. 04-0783), es decir plata metálica, y que corresponden a los planos (111) y (200) [307]. Esto coincide con los resultados del Raman (figura 5.2), donde se identificó Ag_2O , que a $T > 623\text{K}$ (350°C) en aire y a presión atmosférica se descompone en Ag y O_2 , con una energía de activación de 283.4 kJ/mol [308]. Waterhouse y colaboradores [309], llevaron a cabo un estudio mediante DRX sobre la descomposición térmica del Ag_2O , y reportaron la formación de plata metálica a partir de 623K (350°C), con picos 2θ a 38 y 44 grados. Por lo tanto, tras el tratamiento térmico a 600°C los iones Ag^+ dan lugar a Ag [215].

Tras comparar el diagrama de DRX de figura 5.3 con los de diferentes estudios sobre tratamientos termoquímicos, [74], [187], [214], y con el DRX de la muestra con el tratamiento convencional (K24, figura 5.4 C) se han identificado los picos AgTC como titanatos de calcio con plata. T. Kizuki y colaboradores [187], generaron titanatos de calcio y afirmaron que tras el tratamiento con CaCl_2 los iones de Na^+ son remplazados por Ca^{2+} en el titanato sin modificar la posición de los picos en el DRX. Los mismos autores, en un estudio posterior [74], atribuyeron un ligero desplazamiento de los picos de titanato de sodio a la incorporación de plata. Y. Inoue y colaboradores [214], coinciden con la hipótesis del estudio anterior, y aseguran haber conseguido formar titanato de plata por transformación del titanato de sodio. Por lo tanto, con el tratamiento propuesto se ha conseguido incorporar Ag en las estructuras porosas de Ti en forma de plata metálica y de titanato de calcio con plata.

5.1.3 Formación de apatita

Para validar la bioactividad de los titanatos de calcio con plata, se sumergieron las muestras tratadas (KAg) en SBF durante 7 días y se observó la superficie exterior y de rotura mediante microscopía electrónica de barrido. En la figura 5.4 se presentan las micrografías obtenidas.

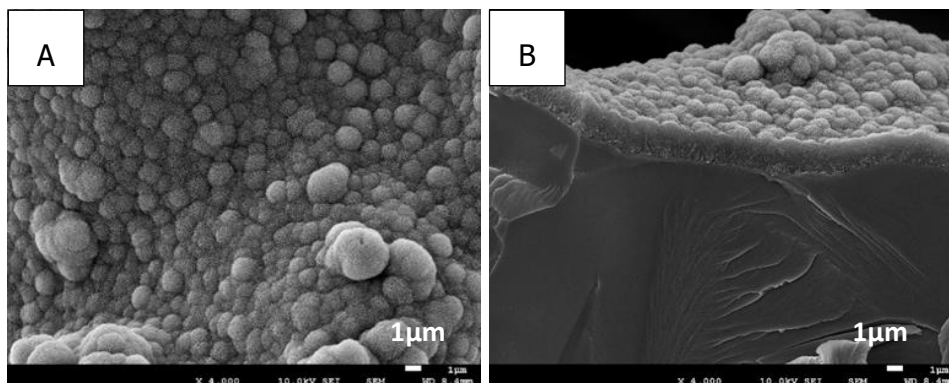


Figura 5.4 Imágenes SEM a 4K aumentos de A) la superficie y B) la sección de la capa generada tras incubar las muestras KAg 7 días en SBF.

Las micrografías coinciden con los resultados de la literatura sobre titanatos de calcio con plata [74]. En el anterior apartado 5.1.3 se caracterizaron estos precipitados esféricos y se demostró que se tratan de cristales de hidroxiapatita. En cuanto al espesor de la capa, no se aprecian diferencias respecto a las muestras con titanatos de calcio (figura 5.1).

En este caso, se realizó un análisis elemental EDS para comprobar si tras 7 días de incubación sigue habiendo Ag en las muestras. En la tabla 5.3 se presenta la cuantificación del EDS.

Tabla 5.3 Análisis elemental EDS (%at.) de capa de precipitados generada en la muestra KAg tras 7 días de inmersión en SBF

	O	Ca	P	Ti	Ca/P	Ag
Superficie precipitados	45,0±1	18,2±0,5	11,3±0,6	22,4±1	1,7±0,5	1,5±0,6

Se confirma que tras 7 días de incubación sigue habiendo cierto %at. de Ag en las muestras, de hecho, prácticamente no cambia respecto al inicial (tabla 5.2). Además, el ratio Ca/P coincide con el de la muestra con el tratamiento convencional (tabla 8.11 del anexo 3) y con el de la apatita [310]. Por lo tanto, la incorporación de Ag por medio del tratamiento propuesto no interfiere negativamente en la formación del recubrimiento de hidroxiapatita, confirmando la bioactividad de las superficies de tratadas (KAg).

5.1.4 Liberación de iones

Con la caracterización fisicoquímica se ha demostrado que se ha podido incorporar Ca y Ag en la superficie de las muestras porosas 3D. Es importante que dichos iones no queden retenidos y se liberen de manera controlada, para realizar las funciones esperadas. La formación de apatita indica que se ha producido un intercambio iónico con el medio (SBF) y que, por lo tanto, ha habido liberación de iones, al menos de Ca^{2+} .

Para cuantificar los iones liberados se llevó a cabo un ensayo de liberación con muestras porosas (3D) y lisas (2D), en solución de Hanks (HBSS, Hanks Balanced Salt Solution). El ensayo se realizó de manera acumulativa, es decir, la muestra se sumergía en la solución y a cada determinado tiempo (1, 8, 24 y 48 horas) se extraía el líquido (para hacer la medida) y se renovaba la solución (en el apartado 3.8.2.3 de materiales y métodos se describe en detalle el procedimiento). En la figura 5.5 se presentan los gráficos obtenidos.

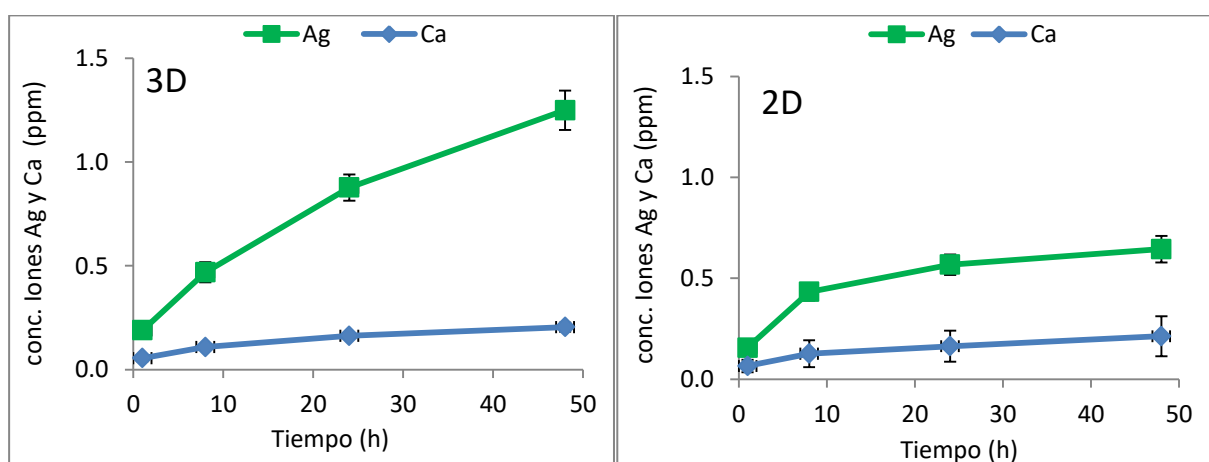


Figura 5.5 Liberación de iones Ag^+ y Ca^{2+} de muestras porosas (3D) y lisas (2D).

Los resultados confirman la difusión de iones de plata y calcio en muestras lisas y porosas, siendo mayor la liberación en estas últimas. Esto era de esperar, dado que las estructuras porosas abiertas permiten un intercambio iónico más rápido y una liberación más pronunciada [311]. Por ejemplo, Z. Sun y colaboradores [312], observaron mayor concentración plata liberada en fibras porosas, asegurando que la estructura porosa promueve la liberación de iones.

La liberación de iones de calcio es significativamente inferior a la de plata, sin embargo, ya se ha demostrado (figura 5.4) que es suficiente para formar apatita por intercambio iónico en SBF. Estos resultados coinciden con la literatura, donde a 48h la concentración de iones Ca es de alrededor de 0,2 ppm [74].

En cuanto a los iones de plata, las muestras porosas liberaron alrededor de 0,87 ppm tras las primeras 24 horas, aumentando la concentración hasta 1,25 ppm tras 48 horas. Esta concentración es inferior al MIC (minimum inhibition concentration) de las cepas bacterianas más comunes en infecciones de implantes (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*) [313]–[315]. Sin embargo, hay estudios que han reportado capacidad antibacteriana contra la cepa *Staphylococcus aureus* con concentraciones similares a las obtenidas (1-4 ppm) [74], [215].

Resultados y discusión. Funcionalización

Conviene destacar que las muestras continúan liberando iones Ag^+ al medio pasadas 24 horas. En otros estudios, que aprovechan la formación de titanatos para incorporar y liberar iones Ag^+ , esto no sucede. Bien sea mediante titanatos de sodio con plata [215], titanatos de plata [214], o titanatos de calcio con plata [74], la mayor liberación se produce entre las 3 y 10 horas. Además, aunque haya más liberación de iones pasadas 48 horas, la plata sigue estando presente en la estructura de las muestras porosas, tal y como se vio en el apartado anterior (tabla 5.3).

5.1.5 Halo de inhibición bacteriana

Para asegurar que la liberación de iones Ag^+ es suficiente como para provocar una respuesta antibacteriana se llevó a cabo el ensayo del halo de inhibición. En el apartado de materiales y métodos se detalla el protocolo y condiciones del ensayo. A modo resumen, se trata de un ensayo muy visual, que se utiliza normalmente para validar la liberación de fármacos y consiste en introducir las muestras en agar, sembrar las cepas bacterianas alrededor y pasadas 24 y 48h observar si se ha formado o no halo. Se utilizaron las cuatro cepas más comunes y estudiadas en infecciones de implantes protésicos: dos gram positivas (+) (*Staphylococcus epidermidis* (S. epi), *Staphylococcus aureus* (S. aureus)) y dos gram negativas (-), (*pseudomona aeruginosa* (P. aeru) y *escherichia coli* (E. coli)) respectivamente. Como control se usaron muestras porosas de Ti sin tratar (Ti) y de Ti con el tratamiento completo con $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$, pero sin AgNO_3 (KAc). En la figura 5.6 se presentan las imágenes de las muestras control.

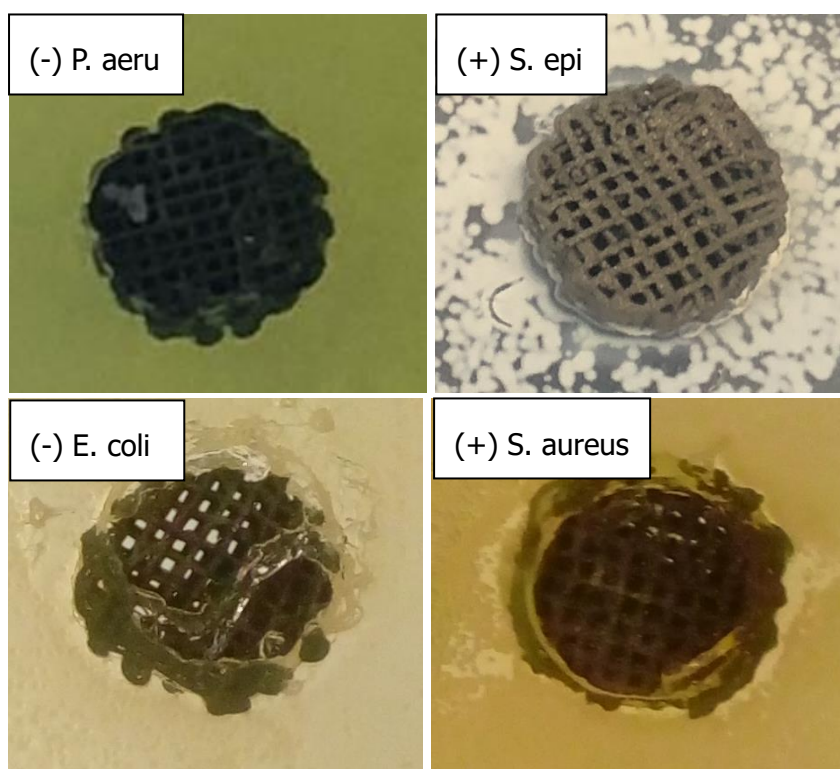


Figura 5.6 Halo de inhibición bacteriana en las muestras control (KAc). *Staphylococcus epidermidis* (S. epi), *Staphylococcus aureus* (S. aureus), *pseudomona aeruginosa* (P. aeru) y *escherichia coli* (E. coli).

Como era de esperar no se observa halo en ninguna de las muestras control. A continuación, en la figura 5.7, se presentan las imágenes de las muestras KAg.

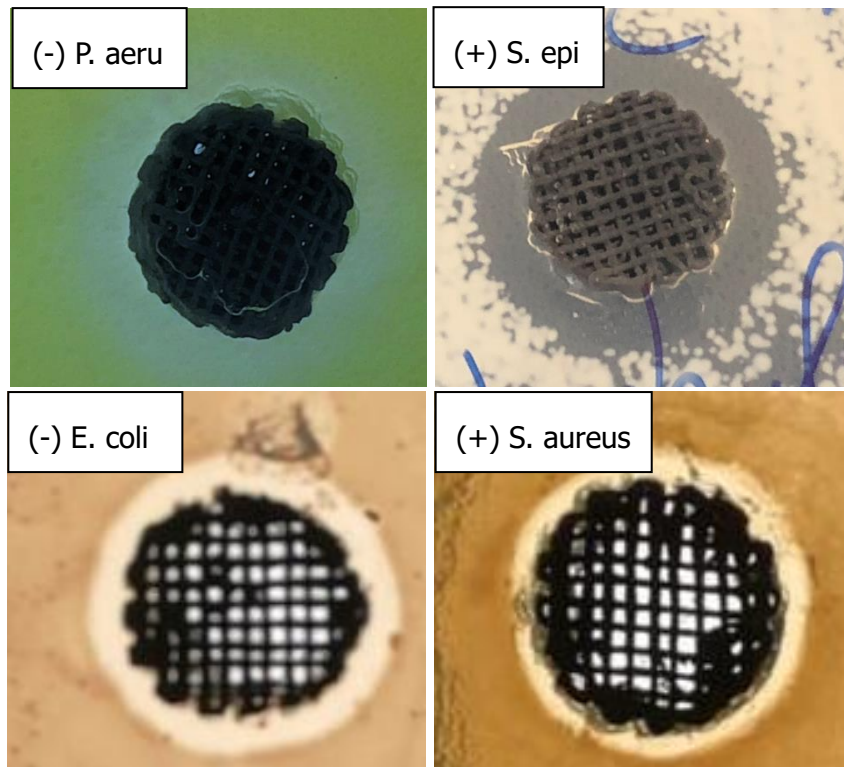


Figura 5.7 Halo de inhibición bacteriana en las muestras KAg. Staphylococcus epidermidis (S. epi), Staphylococcus aureus (S. aureus), pseudomona aeruginosa (P. aeru) y escherichia coli (E. coli).

Como se puede ver no hay crecimiento bacteriano de ninguna de las cepas alrededor de las muestras tratadas. Se puede distinguir el halo de inhibición en todas las imágenes. Aunque se trate de un ensayo cualitativo (formación o no de halo), el diámetro del halo puede dar una medida y una idea de la actividad antibacteriana. Esto puede servir como una herramienta útil para realizar comparaciones entre muestras o, en como en este caso, entre cepas. En la tabla 5.5 se recogen los diámetros de los halos obtenidos.

Tabla 5.4 Diámetro del halo de inhibición en las muestras tras 24 y 48 horas de incubación.

	Ø halo (mm)							
	P. aeru		E. Coli		S. epi		S. aureus	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Ti	10±1	10±1	10±1	10±1	10±1	10±1	10±1	10±1
KAc	10±1	10±1	10±1	10±1	10±1	10±1	10±1	10±1
KAg	13±1	18±1	13±1	13±1	16±1	16±1	12±1	12±1

Las muestras Ti y KAc son los controles, por lo que el valor que se recoge es el diámetro aproximado de las muestras. Como se puede ver, la pseudomona aeruginosa (P. aeru) es con

Resultados y discusión. Funcionalización

la única cepa que el halo crece pasadas las 24h, siendo el de mayor diámetro y, en principio, la cepa más vulnerable a la plata.

Por lo tanto, las muestras KAg presentan capacidad antibacteriana sin necesidad de liberar concentraciones de Ag superiores al MIC. Esto se puede explicar con el mecanismo de acción de la plata, que principalmente actúa sobre la membrana de las células. Los iones Ag^+ reaccionan con las proteínas que contienen azufre o grupos sulfhidrilo (o grupos tiol, SH^-) entre las membranas bacterianas, causando lisis celular [202], [203]. Si se presenta en forma de plata metálica, normalmente como nanopartículas, éstas tienden a acumularse en la membrana bacteriana y formar agregados, provocando una disminución de la integridad de la membrana bacteriana y perforaciones, que conducen a la muerte celular [195], [198], [199].

5.1.6 Citotoxicidad

Como se ha comentado anteriormente, es necesario determinar la citotoxicidad de las muestras. El ensayo se realizó siguiendo la norma UNE-EN ISO 10993-5:2009, con células de osteosarcoma similares a osteoblastos humanos (SAOS-2) y el kit de LDH (lactato deshidrogenasa) de cuantificación celular, utilizando como controles muestras porosas de Ti sin tratar (Ti) y con el tratamiento completo con $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$, pero sin AgNO_3 (KAc). En la siguiente figura se presentan los resultados del ensayo.

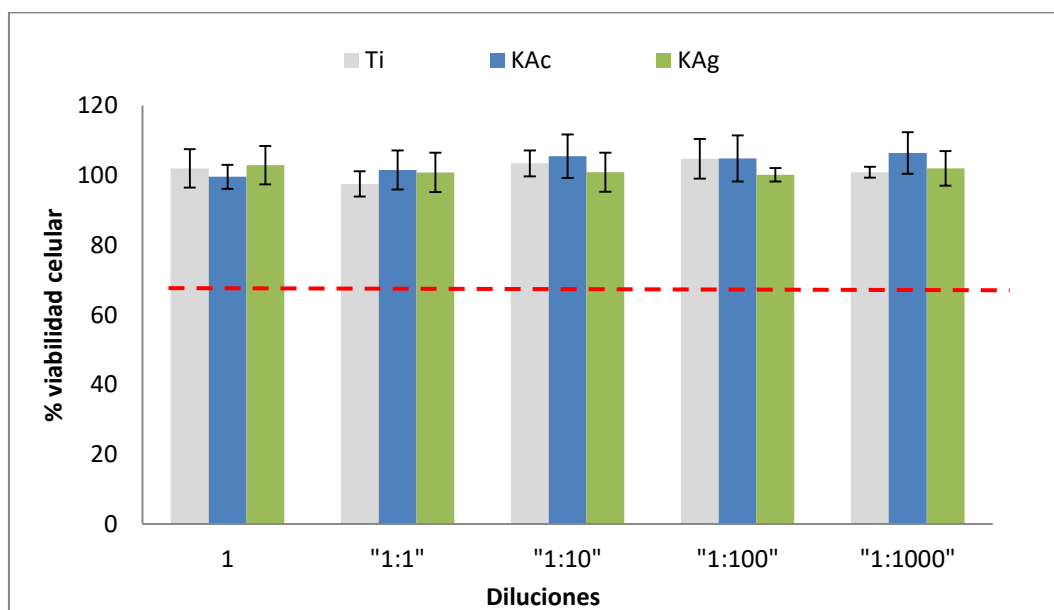


Figura 5.8 Citotoxicidad de muestras porosas Ti, KAc y KAg.

Como se puede ver no hay diferencias significativas entre las muestras, todas presentan más de un 70% de viabilidad celular, en consecuencia, ninguna es citotóxica.

Por lo tanto, con el tratamiento propuesto se han conseguido generar titanatos de calcio con plata, en la superficie (exterior e interior) de las muestras porosas de Ti, con capacidad formar apatita en 7 días en SBF y con actividad antibacteriana.

5.2 FORMACIÓN DE TITANATOS DE CALCIO E INCORPORACIÓN DE GALIO, CON PROPIEDADES BIOACTIVAS Y ANTIBACTERIANAS, SOBRE ESTRUCTURAS POROSAS DE TITANIO.

Para introducir capacidad antibacteriana, en el anterior apartado, se añadió Ag a las muestras porosas, modificando el tratamiento termoquímico para la formación de titanatos de calcio. El galio ofrece una doble funcionalidad, el efecto inhibitorio de los iones de galio sobre la resorción ósea y su actividad antibacteriana. Por lo tanto, se buscó un tratamiento termoquímico para introducir iones de galio en las estructuras porosas de Ti.

En los estudios preliminares (apartado 8.3.2 del anexo 3) se demostró que era posible obtener titanatos de calcio tanto con $C_4H_6CaO_4$ como con $CaCl_2$. A continuación (apartado 5.1) se consiguió introducir Ag modificando una etapa y añadiendo $AgNO_3$. En este apartado se muestra la generación de titanatos de calcio con galio, utilizando una solución de $CaCl_2$ y diferentes concentraciones de $Ga(NO_3)_3$. En capítulo de materiales y métodos se detallan cada una de las etapas del proceso, y en la tabla 5.5 se recoge un resumen del mismo.

Tabla 5.5 Identificación de las muestras con el tratamiento para introducir Ga.

Muestras				
	KGa5	KGa10	KGa50	KGa100
Etapa 1	Ataque NaOH	Ataque NaOH	Ataque NaOH	Ataque NaOH
Etapa 2	$CaCl_2 + Ga(NO_3)_3$ 5mM	$CaCl_2 + Ga(NO_3)_3$ 10mM	$CaCl_2 + Ga(NO_3)_3$ 50mM	$CaCl_2 + Ga(NO_3)_3$ 100mM
Etapa 3	Tratamiento térmico	Tratamiento térmico	Tratamiento térmico	Tratamiento térmico
Etapa 4	Tratamiento en agua	Tratamiento en agua	Tratamiento en agua	Tratamiento en agua

En esta ocasión se decidió probar diferentes concentraciones de $Ga(NO_3)_3$ (cada vez más elevadas) para valorar tanto la capacidad antibacteriana como la citotoxicidad, dado que, a diferencia de la plata, no están tan contrastadas [220]–[222].

5.2.1 Estructura superficial

Se observó la superficie de las muestras mediante microscopía electrónica, con el fin de asegurar que la microestructura no haya cambiado al modificar el tratamiento para añadir Ga. Además, se llevó a cabo un análisis elemental por EDS, para confirmar la deposición de calcio y galio en las estructuras porosas. A continuación, en la figura 5.9 se presentan las micrografías obtenidas para las muestras con diferentes concentraciones $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$.

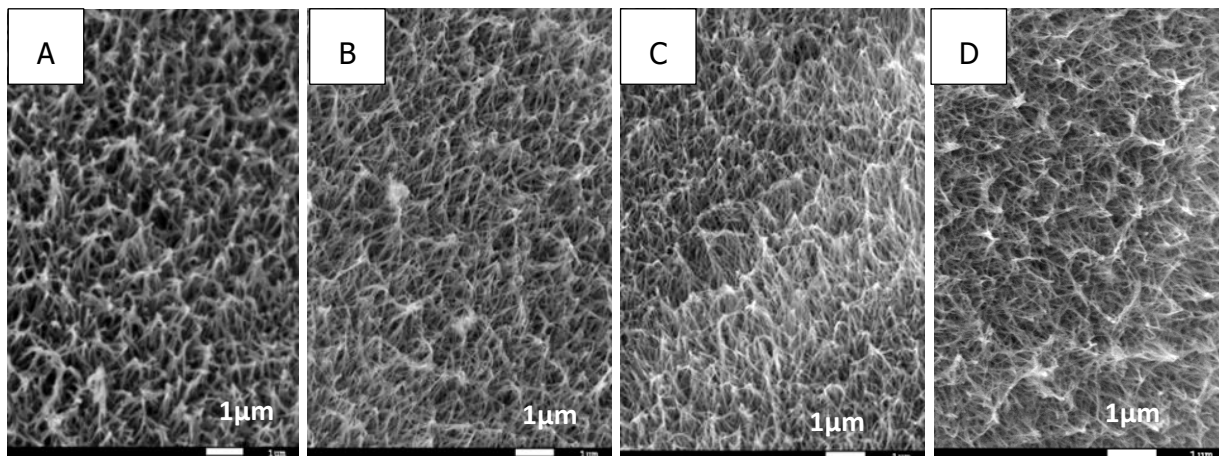


Figura 5.9 Imágenes SEM a 10k aumentos de la superficie de las muestras tratadas con cloruro de calcio y diferentes concentraciones de nitrato de galio. A) KGa5, B)KGa10, C) KGa50, D) KGa100.

Como se puede ver en las imágenes, todas las muestras presentan la microestructura típica acicular o tipo pluma. No se observan diferencias respecto a las micrografías del tratamiento para incorporar iones de plata (figura 5.1), ni a las de los estudios previos (figuras 8.65 y 8.72 del anexo 3) y tampoco con las encontradas en la literatura [74], [75], [214], [215]. En la tabla 5.6 se recogen los resultados de la cuantificación del EDS.

Tabla 5.6 Análisis elemental EDS (%at.) de las muestras tratadas con cloruro de calcio y diferentes concentraciones de nitrato de galio.

	O	Ca	Ga	Ti
KGa5	34,6±0,1	2,0±0,6	5,3±0,4	59,1±1,1
KGa10	32,6±0,4	2±0,1	5,6±0,3	59,9±0,5
KGa50	34,7±0,1	1,6±0,1	6,8±0,6	56,8±0,5
KGa100	36,4±0,1	1,1±0,1	9,2±1,0	53,4±1,1

Los resultados confirman la presencia de galio y calcio en las muestras porosas, obteniendo valores de Ga, en % atómico, similares a los encontrados en la literatura. S. Yamaguchi y colaboradores [75], utilizaron una solución 100mM de GaCl_3 para formar titanatos de galio y obteniendo un 8,1%at. de Ga. M.D. Wadge y colaboradores [228] también generaron

titanatos de galio, pero utilizando una solución 4mM de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, obteniendo un 4,1%at. de Ga.

Por lo tanto, se confirma que con el tratamiento propuesto es posible incorporar Ca y Ga en la superficie. Por otra parte, en la tabla 5.6, se puede ver como el contenido de galio aumenta ligeramente con la concentración de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ pero no de manera proporcional; al pasar de una solución de 5mM (KGa5) a otra de 100mM (KGa100) el porcentaje de galio no llega ni a duplicarse. Sin embargo, antes de descartar muestras, se valoraron todos los resultados ya que es posible que un ligero incremento de porcentaje sea suficiente para dotar de mejores propiedades biológicas y antibacterianas.

5.2.2 Análisis fisicoquímico

Para conocer de qué manera se ha incorporado el galio en la superficie se llevó a cabo una caracterización fisicoquímica mediante diferentes técnicas de análisis. Para confirmar la generación de titanatos se utilizó la espectroscopia Raman (figura 5.10), pero únicamente se caracterizaron muestras sin tratamiento térmico (etapa 1 y 2 tabla 5.5).

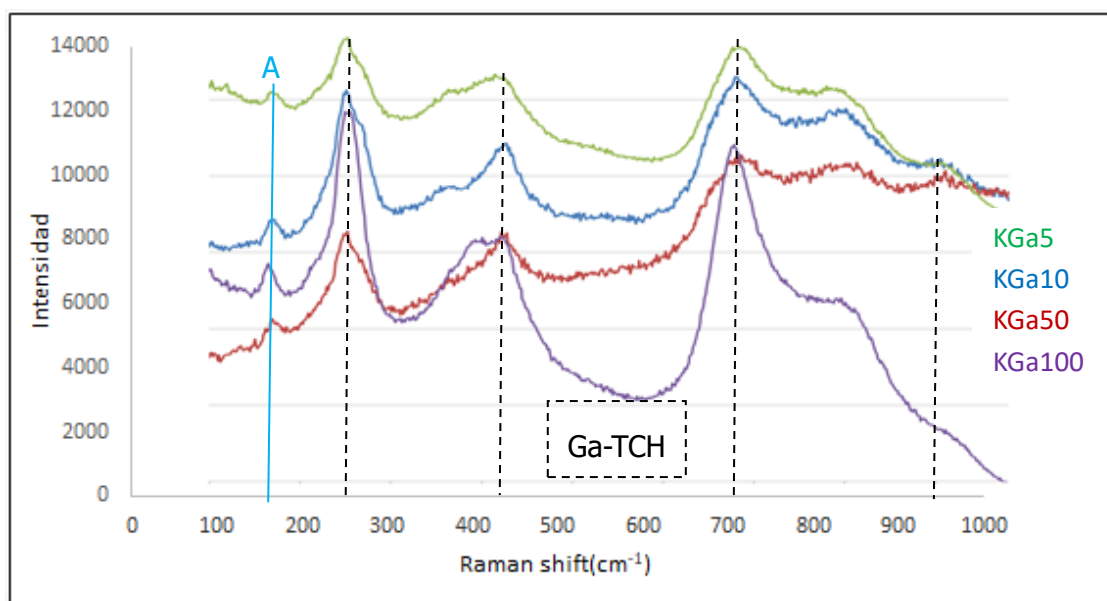


Figura 5.10 Espectro Raman de las muestras tras la inmersión en cloruro de calcio y nitrato de galio a diferentes concentraciones (5, 10, 50 y 100mM). A: anatasa, Ga-TCH: titanato de calcio hidrogenado con galio.

En la imagen se identifican los picos característicos del titanato de calcio hidrogenado con galio, acorde con la literatura [75]. El tratamiento inicial (etapa 1, tabla 5.5) produce los picos de Raman atribuidos al titanato de sodio hidrogenado, $\text{Na}_x\text{H}_{2-x}\text{Ti}_y\text{O}_{2y+1}$ (TSH, figura 8.66 anexo 3). Al realizar la inmersión en cloruro de calcio y nitrato de galio las posiciones de los picos permanecen sin cambios, excepto un ligero desplazamiento en el pico de 920 cm^{-1} (Ga-TCH, figura 5.10). Esto indica que el titanato de sodio hidrogenado se ha transformado en titanato hidrogenado de calcio con galio, $\text{Ga}_x\text{Ca}_y\text{H}_{2-(3x+2y)}\text{Ti}_3\text{O}_7$ sustituyendo los iones Na por iones Ca

Resultados y discusión. Funcionalización

y Ga. Por lo tanto, con el tratamiento propuesto se consigue incorporar Ga en las estructuras porosas mediante la formación de titanatos de calcio con galio.

La espectroscopia Raman no puede detectar el galio en estado metálico, como sucedía con la plata, por lo tanto; para completar la caracterización se realizó un DRX. Se analizaron las muestras KGa5, KGa10, KGa50 y KGa100, al final del proceso y no se observaron diferencias en la intensidad y posición de los picos. A continuación, en la figura 5.11 se presenta el diagrama DRX de la muestra de menor concentración (KGa5).

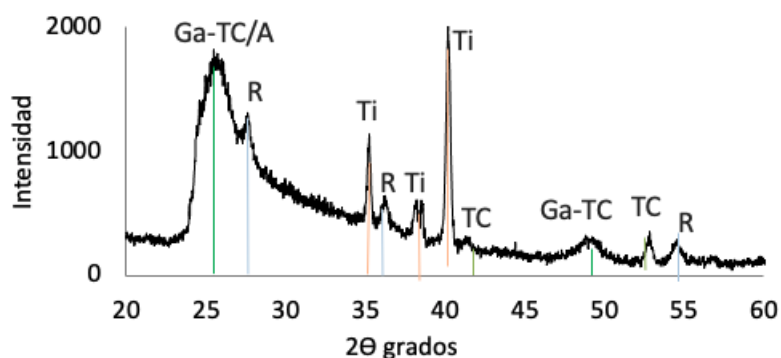


Figura 5.11 Diagrama de DRX de una muestra tras el tratamiento termoquímico completo con cloruro de calcio y nitrato de galio 5mM (KGa5). A: anatasa, Ga-TC: titanato de calcio con galio, TC: titanato de calcio, R: rutilo, Ti: titanio.

En el diagrama se distinguen dos picos alrededor de 25 y 48 grados que según la literatura pertenecen al titanato de calcio con galio [75]. Esto indica que el titanato hidrogenado de calcio con galio se ha transformado en titanato de calcio con galio (Ga-TC), como $Ga_xCa_{1-x}Ti_2O_4$, $Ga_xCa_{1-x}Ti_2O_5$ y $Ga_xCa_{1-x}Ti_4O_9$. En las bases de datos de difracción no hay archivos de titanato de calcio con galio, aunque sí de titanato de galio (JCPDS no. 00-020-0447), coincidiendo algunos picos con los obtenidos [228].

Los resultados de la caracterización fisicoquímica confirman incorporación de galio en la estructura porosa de titanio, mediante la formación de titanatos de calcio con galio y titanatos de galio.

5.2.3 Formación de apatita

Para validar la bioactividad se incubaron 7 días en SBF las muestras porosas (KGa5, KGa10, KGa50 y KGa100) tratadas con las diferentes concentraciones de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ (5, 10, 50 y 100mM). A continuación, se observó la superficie exterior y de rotura mediante microscopía electrónica de barrido. En las figuras 5.12, 5.13, 5.14 y 5.15 se presentan las micrografías.

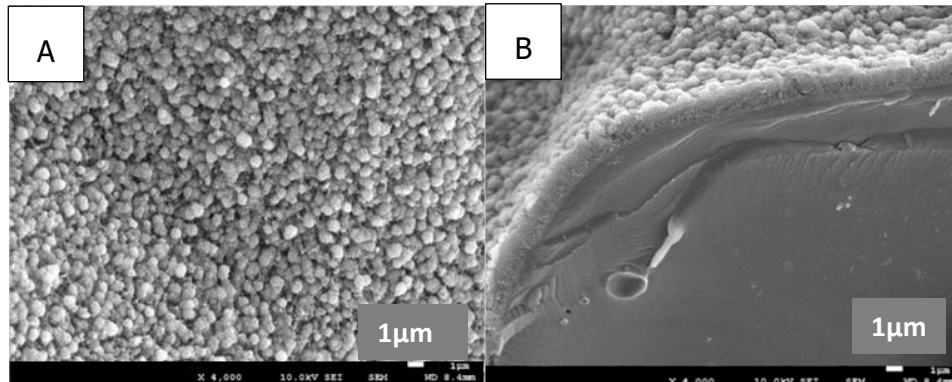


Figura 5.12 Imágenes SEM a 4K aumentos de A) la superficie y B) la sección de la capa generada tras incubar las muestras KGa5 7 días en SBF.

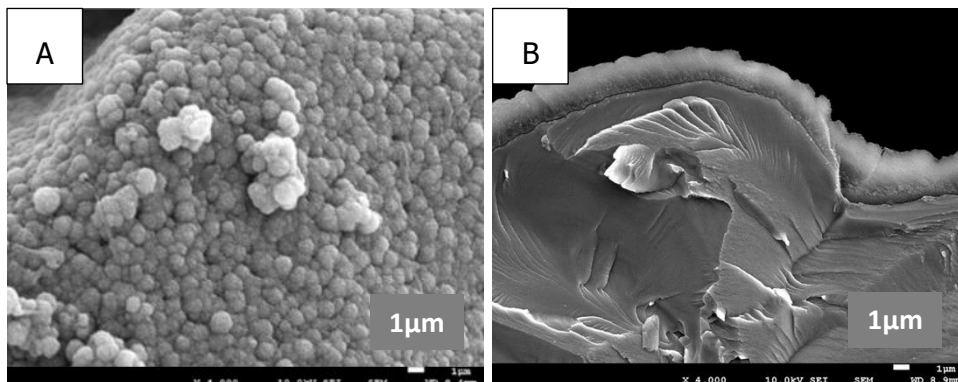


Figura 5.13 Imágenes SEM a 4K aumentos de A) la superficie y B) la sección de la capa generada tras incubar las muestras KGa10 7 días en SBF.

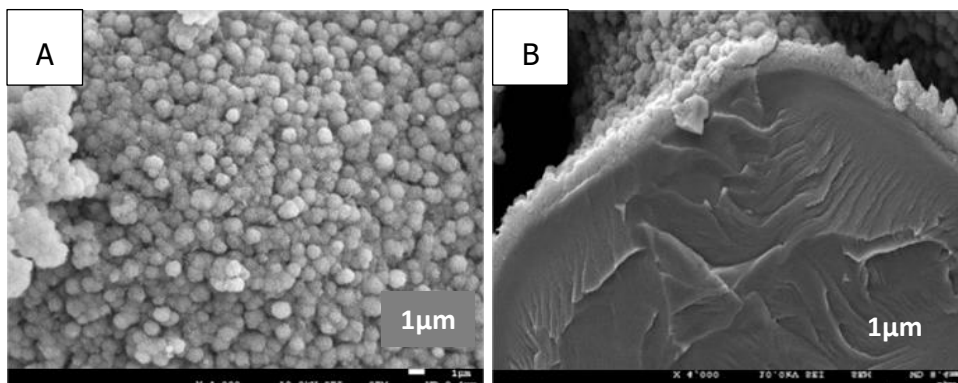


Figura 5.14 Imágenes SEM a 4K aumentos de A) la superficie y B) la sección de la capa generada tras incubar las muestras KGa50 7 días en SBF.

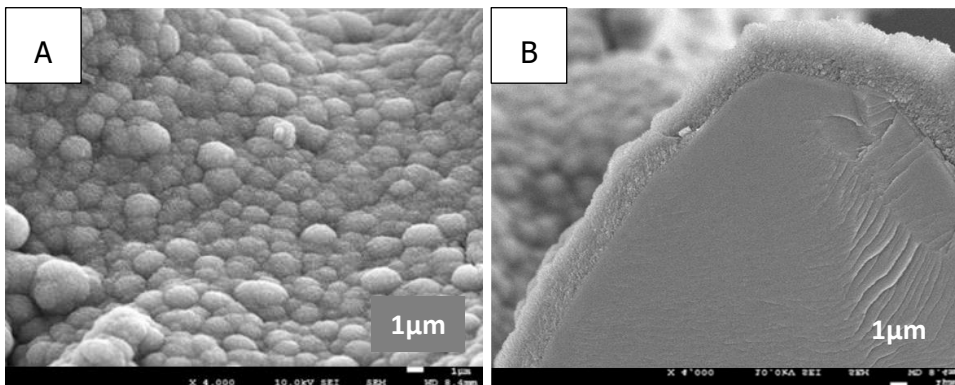


Figura 5.15 Imágenes SEM a 4K aumentos de A) la superficie y B) la sección de la capa generada tras incubar las muestras KGa100 7 días en SBF.

Las micrografías coinciden con los resultados de la literatura sobre titanatos de calcio con galio [75]. En las figuras 5.12, 5.13, 5.14 y 5.15 puede distinguirse la capa de cristales de apatita recubriendo toda la superficie de las diferentes muestras. Igual que sucede en las muestras con titanatos de sodio y de calcio (figuras 8.68 y 8.74 del anexo 3). Por lo tanto, todas las muestras presentan bioactividad, independientemente de la concentración de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ (5, 10, 50 y 100 mM) utilizada en el tratamiento.

Por otra parte, en la muestra KGa100, tratada con mayor concentración de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ (figura 5.15), se observan precipitados de mayor tamaño, así como un espesor de capa ligeramente superior. El galio es conocido por su efecto inhibitorio sobre la liberación de calcio del tejido óseo, que es eficaz para prevenir la resorción ósea [218], por lo que es posible que favorezca a la capacidad de formación de apatita. Para valorar el efecto del galio se incubaron 5 y 3 días en SBF las muestras con menor y mayor %at. de Galio (KGa5 y KGa100, tabla 5.6). En la figura 5.16 se presentan las micrografías de las muestras KGa5 y KGa100 tras 5 y 3 días de incubación en SBF.

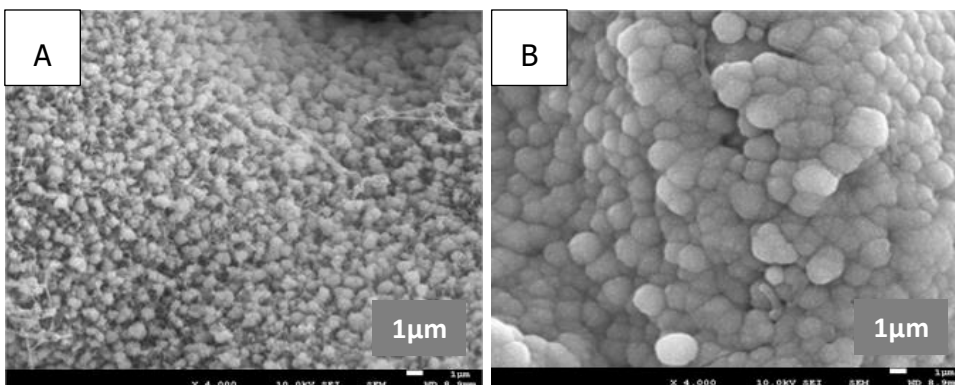


Figura 5.16 Imágenes SEM a 4K aumentos de la superficie de la capa generada tras incubar en SBF las muestras A) KGa5 durante 5 días y B) KGa100 durante 3 días.

En la muestra de menor contenido (KGa5) tras 5 días de incubación se empiezan a distinguir finos precipitados sin acabar de formar una capa densa (figura 5.16 A), mientras que en la de mayor contenido en galio (KGa100) a los 3 días se observa una superficie completamente recubierta por cristales de apatita (figura 5.16 B). Estudios preclínicos llevados a cabo por

Bockman y colaboradores [316] mostraron que el galio se acumula en las regiones metabólicamente activas del hueso, alterando favorablemente las propiedades de mineralización para mejorar la cristalización de hidroxiapatita y reducir la solubilidad de la fase mineral. Por lo tanto, se confirma que la adición de galio mejora la bioactividad favoreciendo la capacidad de formación de apatita

De manera complementaria, igual que con la plata, se realizó un análisis elemental EDS sobre la muestra con menor %at. de Ga (KGa5, tabla 5.6) para comprobar si tras 7 días de incubación sigue habiendo Ga. En la tabla 5.7 se presenta la cuantificación del EDS.

Tabla 5.7 Análisis elemental EDS (%at.) de capa de precipitados generada en la muestra KGa5 tras 7 días de inmersión en SBF.

	O	Ca	P	Ti	Ca/P	Ga
Superficie precipitados	48,0±1	19,0±0,5	11,0±0,6	20,3±1	1,7±0,5	1,8±2

Se confirma que tras 7 días de incubación sigue habiendo Ga en la estructura de las muestras porosas.

5.2.4 Liberación de iones

Con la caracterización fisicoquímica se ha demostrado que se ha podido incorporar Ca y Ga en la estructura porosa de las muestras. Es importante que dichos iones no queden retenidos y se liberen de manera controlada, para realizar las funciones esperadas. La formación de apatita indica que se ha producido un intercambio iónico con el medio (SBF), por lo tanto, de manera indirecta confirma que ha habido liberación de iones.

Para cuantificar estos iones liberados se llevó a cabo un ensayo de liberación, con muestras porosas (3D) y lisas (2D), en solución de Hanks (HBSS, Hanks Balanced Salt Solution). El ensayo se realizó a 1, 8, 24 y 48 horas, únicamente con las muestras de menor y mayor %at. de Galio (KGA5 y KGA100). En la figura 5.17 se presentan los gráficos obtenidos.

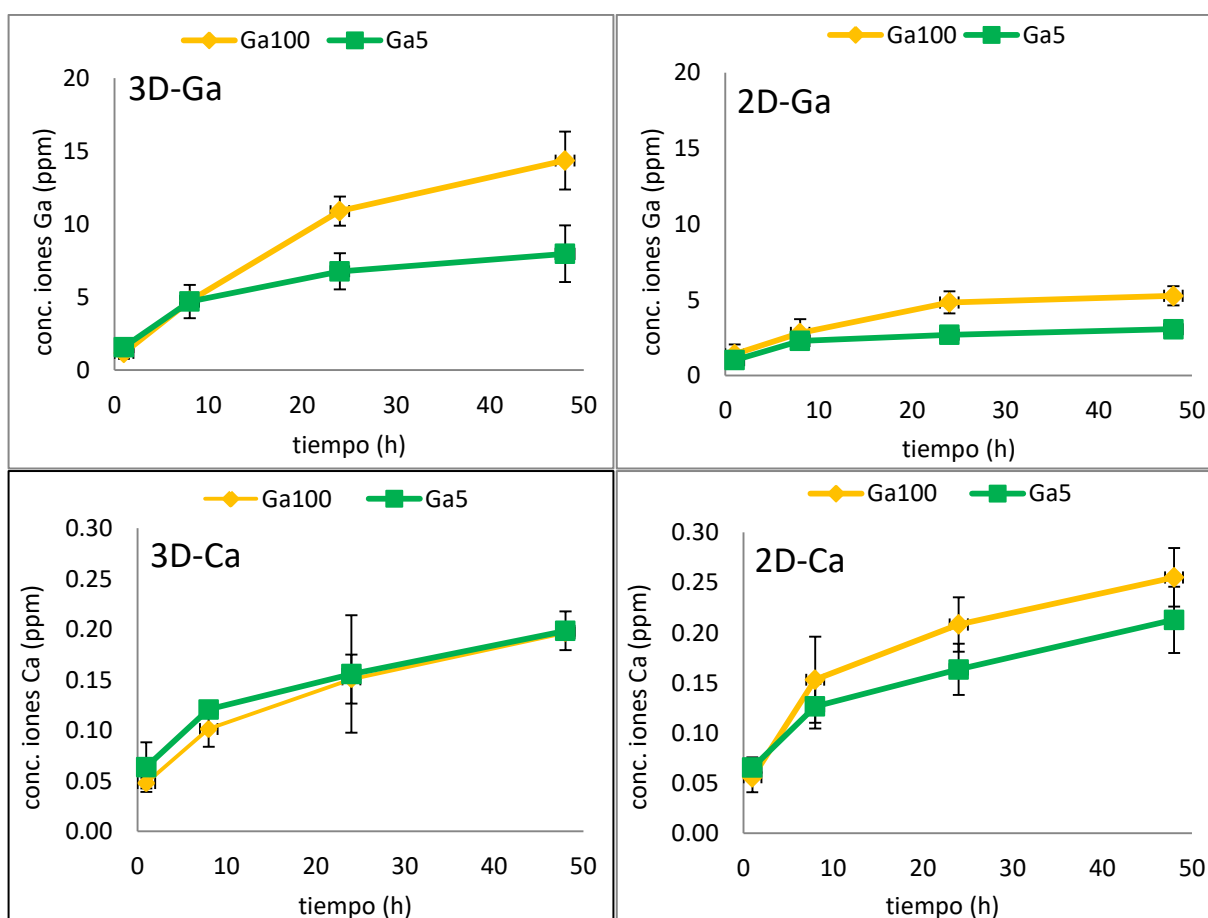


Figura 5.17 Liberación (acumulativa) de iones Ga³⁺ y Ca²⁺ de muestras porosas (3D) y lisas (2D), tratadas con la menor y mayor concentración de nitrato de galio.

Los resultados indican que se ha producido liberación de iones de galio y calcio en muestras lisas y porosas, siendo mayor la liberación en estas últimas (igual que ocurría con los iones de plata). Las estructuras porosas abiertas permiten un intercambio iónico más rápido y una liberación más pronunciada [311]. Por lo tanto, se confirma que la porosidad favorece la liberación de iones (tanto Ag como Ga), coincidiendo con Z. Sun y colaboradores, que observaron mayor concentración de plata liberada en fibras porosas, asegurando que la estructura porosa promueve la liberación de iones [312].

La liberación de iones de calcio es notablemente inferior a la de galio, similar lo que ocurría con las muestras con plata (figura 5.5). En ambos casos se ha comprobado que es suficiente como para formar apatita por intercambio iónico. Además, los resultados coinciden con la literatura, donde a 48h la concentración de iones Ca es de alrededor de 0,2 ppm [75].

En cuanto al galio, las curvas acumulativas de liberación de iones (figura 5.17) mostraron una rápida liberación de iones de Ga dentro de las primeras 10 horas, seguida de una fase de estabilización de alrededor de 24 y 48 horas. Estos resultados coinciden con los reportados en la literatura, donde los iones Ga se liberan en gran medida en una fase inicial y poco después alcanza una fase estable donde prácticamente deja de liberarse [75], [228]. M.D. Wadge y colaboradores [228], generaron titanatos de galio utilizando una solución 4mM de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y consiguieron liberar 2,76 ppm iones de Ga en 3 días, pero sin llevar a cabo la etapa de tratamiento térmico, al realizarlo este valor disminuyó a 0,68 ppm en 7 días. S. Yamaguchi y colaboradores [75], también generaron titanatos de Galio, en este caso utilizando una solución 100mM de GaCl_3 , liberando un total de 3,75ppm en 14 días, 1,58ppm de los cuales fueron liberados en la primera hora.

Como era de esperar la muestra con mayor %at. de Ga (KGa100, tabla 5.6) libera más cantidad de iones Ga^{3+} . Sin embargo, se tendrá que comprobar si esta diferencia es significativa en cuanto a propiedades antibacterianas.

En la mayoría de referencias el galio se aplica en forma de sales (nitrato o maltolato) y/o complejos (citrato, deferoxamina, protoporfirina o transferrina) de galio [226], [317], [318]. A diferencia de la plata, el mecanismo de acción el galio obliga a que éste tenga que penetrar hasta el interior de la bacteria para poder actuar, proceso comúnmente conocido en bacteriología como la estrategia del "caballo de Troya" [227], [218]. Por este motivo, se utilizan complejos sideróforos de galio, como el citrato de galio, para favorecer la entrada [319]. Debido a esto, es difícil encontrar valores de MIC exclusivos para el Ga o iones de Ga^{3+} . Sin embargo, Banin y colaboradores [320], demostraron que el Ga y el complejo Ga-DFO (deferoxamina) presentan valores similares de MIC para la *Pseudomona aeruginosa*, alrededor de $32\mu\text{M}$ (~2,5 ppm). Por otra parte, S. Yamaguchi y colaboradores [75], generaron titanatos de calcio con galio y reportaron capacidad de formación de apatita y actividad antibacteriana (sobre la *Acinetobacter baumannii*) con valores de liberación inferiores a los obtenidos (0,03 ppm de Ca y 0,23ppm de Ga).

5.2.5 Halo de inhibición bacteriana

Para asegurar que la liberación de iones Ga^{3+} es suficiente como para producir una respuesta antibacteriana se llevó a cabo el ensayo del halo de inhibición (en el apartado 3.8.2.4 de materiales y métodos se detalla el protocolo y condiciones del ensayo). El ensayo se realizó con las muestras porosas KGa5, KGa10, KGa50 y KGa100 (tabla 5.5), como control se usaron muestras de Ti sin tratar (Ti) y con el tratamiento completo con $CaCl_2$, pero sin $Ga(NO_3)_3$ (KCa). En la tabla 8 se recogen los diámetros de los halos obtenidos.

Tabla 5.8 Diámetro del halo de inhibición en las muestras tras 24 y 48 horas de incubación.

	Ø halo (mm)							
	P. aeru		E. Coli		S. epi		S. aureus	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Ti	10±1	10±1	10±1	10±1	10±1	10±1	10±1	10±1
KCa	10±1	10±1	10±1	10±1	10±1	10±1	10±1	10±1
KGa5	13±1	18±1	10±1	10±1	10±1	10±1	10±1	10±1
KGa10	13±1	18±1	10±1	10±1	10±1	10±1	10±1	10±1
KGa50	13±1	18±1	10±1	10±1	10±1	10±1	10±1	10±1
KGa100	13±1	18±1	13±1	13±1	10±1	10±1	10±1	10±1

Las muestras Ti y KCa son los controles y no presentaron actividad antibacteriana, por lo que el valor que se recoge es el diámetro aproximado de las muestras. Como se puede ver, la *Pseudomonas aeruginosa* (P. aeru) es la única cepa vulnerable a todas las muestras con galio, independientemente de la concentración. Esto se puede relacionar y explicar con los resultados de liberación (figura 5.17) y el MIC, ya que la concentración de iones liberados por la muestra KGa5 (la de menor contenido en galio) es superior al MIC de la *Pseudomonas aeruginosa* [320].

La *Escherichia coli* también mostró inhibición del crecimiento cuando la contribución de Ga fue la más alta (KGa100). En este caso no se puede explicar ni justificar mediante el MIC, debido a la falta de datos sobre Ga y Ga^{3+} ; además los valores del MIC encontrados para sales y compuestos de galio son muy superiores a los liberados (alrededor de 200 ppm)[317][226]. Es posible que en las otras muestras (KGa5, KGa10 y KGa50) no haya habido la suficiente difusión de galio, a través del agar, como para formar el halo, pero sí picos de concentración en la superficie (interior y exterior) de las muestras lo suficientemente elevados como para matar un considerable porcentaje de bacterias.

En la figura 5.18 se presentan las imágenes de las muestras KGa100, que son las que exhiben mejores resultados y se puede distinguir mejor el halo. En la figura 5.6 se mostraron las imágenes de las muestras control (sin halo).

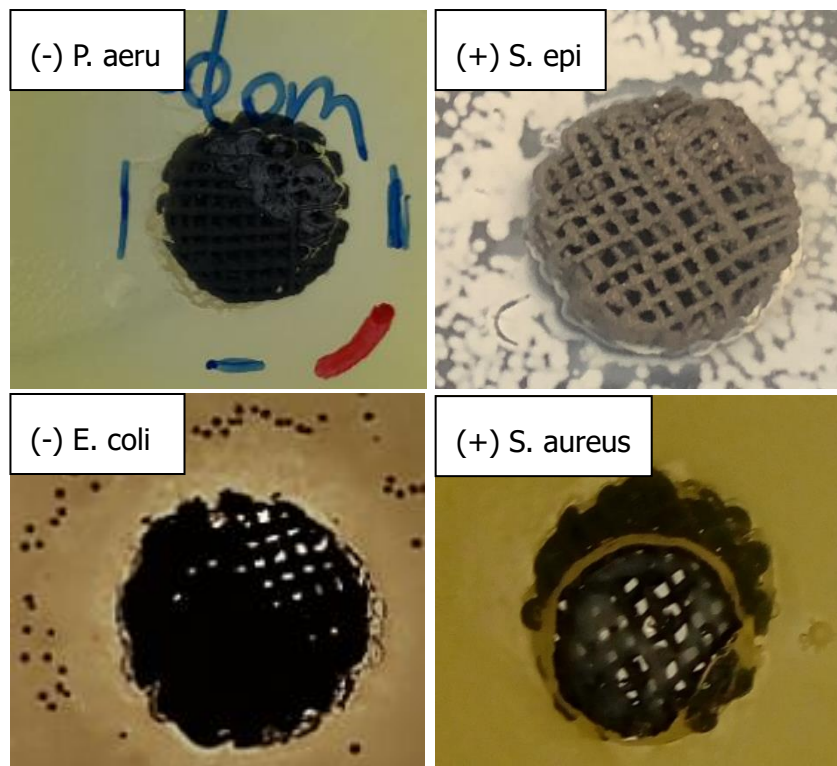


Figura 5.18 Halo de inhibición bacteriana en las muestras KGa100. *Staphylococcus epidermidis* (S. epi), *Staphylococcus aureus* (S. aureus), *Pseudomonas aeruginosa* (P. aeru) y *Escherichia coli* (E. coli).

Como se puede ver, no hay crecimiento bacteriano alrededor de las muestras KGa100 con las cepas Gram negativas, se aprecia el halo de inhibición en *Pseudomonas aeruginosa* (P. aeru) y en *Escherichia coli* (E. coli). Sin embargo, en las otras muestras (KGa5, KGa10 y KGa50) únicamente se distingue el halo con la *Pseudomonas aeruginosa*.

Este efecto del galio sugiere una protección de las estructuras porosas de Ti contra bacterias Gram negativas; la *Escherichia coli*, que es una de las primeras causas de infecciones por implantes ortopédicos [321], y *Pseudomonas aeruginosa*, que es agente etiológico frecuente asociado con infecciones de catéteres permanentes e implantes corporales. De hecho, la *Pseudomonas aeruginosa* representa el 10% de todos los microorganismos involucrados en la infección de prótesis de cadera [322].

5.2.6 Citotoxicidad

Existe la posibilidad de que para concentraciones muy elevadas los iones de Ga puedan ser perjudiciales para el organismo, por lo que es necesario determinar la citotoxicidad de las muestras tratadas.

El ensayo se realizó siguiendo la norma UNE-EN ISO 10993-5:2009, sobre muestras porosas tratadas con la menor y mayor concentración de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ (KGa5 y KGa100), con células de osteosarcoma similares a osteoblastos humanos (SAOS-2) y el kit LDH (lactato deshidrogenasa) para la cuantificación celular. Se utilizaron como control muestras de Ti sin tratar (Ti) y con el tratamiento completo con CaCl_2 , pero sin $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ (KCa). En la figura 5.19 se presentan los resultados del ensayo.

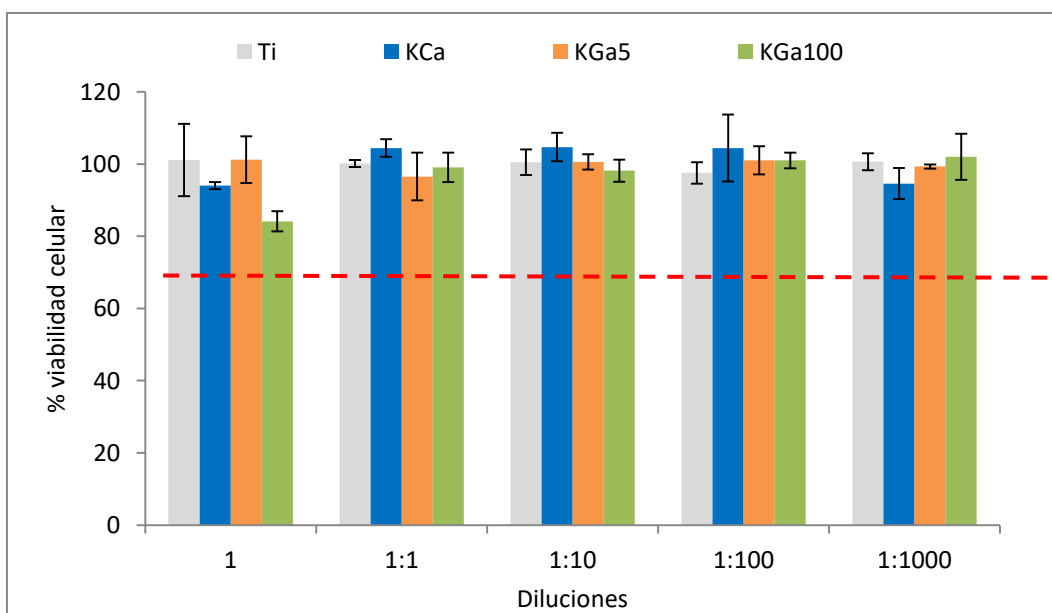


Figura 5.19 Citotoxicidad de muestras porosas Ti, KCa, KGa5 y KGa100.

Como se puede ver no hay diferencias significativas entre las muestras, todas presentan más de un 70% de viabilidad celular, en consecuencia, ninguna es citotóxica. Por lo tanto, es posible aumentar la concentración de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ en el tratamiento hasta 100mM sin que las muestras obtenidas produzcan efectos adversos en el organismo.

Hasta el momento en todas las muestras (tabla 5.5, KGa5, KGa10, KGa50 y KGa100), se ha obtenido la microestructura típica del tratamiento termoquímico convencional de Kokubo, se ha incorporado calcio y galio formando titanatos, y todas presentan buena bioactividad (formación de apatita tras 7 días en SBF) y capacidad antibacteriana frente a la pseudomona aeruginosa. La muestra con mayor cantidad de galio destaca (KGa100), por la formación de apatita en menos tiempo y una más rápida e intensa respuesta antibacteriana frente a E. coli. Sin embargo, se consideró que la información obtenida no era suficiente como para tener un buen criterio de selección o descarte, por lo que se realizaron más ensayos *in vitro* de caracterización biológica (adhesión, proliferación y mineralización celular).

5.2.7 Adhesión, proliferación y mineralización celular

Como se ha comentado anteriormente, el galio proporciona una doble funcionalidad, ofrece capacidad antibacteriana y aumenta la bioactividad. Se ha decidido focalizar el estudio en la mejoría de la parte biológica ya que, en comparación con la plata, el galio presenta peores propiedades antibacterianas.

Se llevaron a cabo ensayos *in vitro* de adhesión, proliferación y mineralización, sobre muestras porosas tratadas con la menor y mayor concentración de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ (KGa5 y KGa100), utilizando como control negativo muestras de Ti sin tratar (Ti) y como control positivo muestras con el tratamiento termoquímico convencional de Kokubo (K24). En el apartado de materiales y métodos se describe con más detalle el protocolo seguido para ensayo. Para la adhesión a 6 horas se sembraron células de osteosarcoma similares a osteoblastos humanos (SAOS-2) y se cuantificaron con el kit LDH (lactato deshidrogenasa). En la figura 5.20 se presentan los resultados de adhesión.

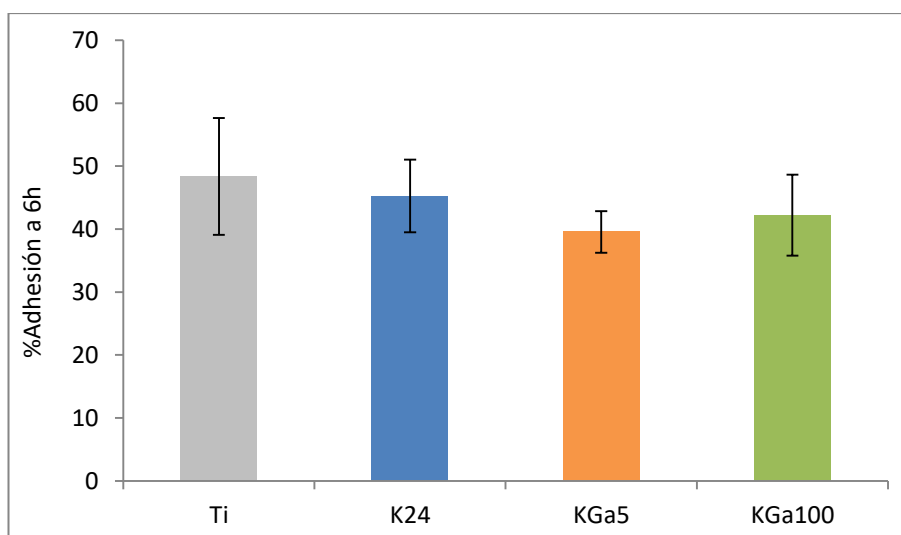


Figura 5.20 Adhesión celular a 6h de muestras porosas Ti, K24, KGa5 y KGa100.

El recuento celular mediante LDH no mostró diferencias significativas en la adhesión después de 6 horas de incubación, entre los controles (Ti y K24) y las muestras tratadas con las diferentes concentraciones (KGa5 y KGa100). Por lo tanto, el tratamiento termoquímico convencional de Kokubo, y la modificación de este para añadir Ca y Ga, no influyen en la adhesión celular sobre estructuras porosas de titanio.

Para evaluar el efecto de los tratamientos con el tiempo, se llevaron a cabo los ensayos de proliferación y mineralización celular. En la proliferación se sembraron las células, igual que en la adhesión, se incubaron durante diferentes periodos de tiempo (6 horas, 7, 14, 21 y 28 días) y se cuantificaron mediante LDH. La mineralización se realizó sobre las muestras del día 28, siguiendo el protocolo de tinción para Alizarin Red. En la figura 5.21 se representan los resultados de proliferación y mineralización celular.

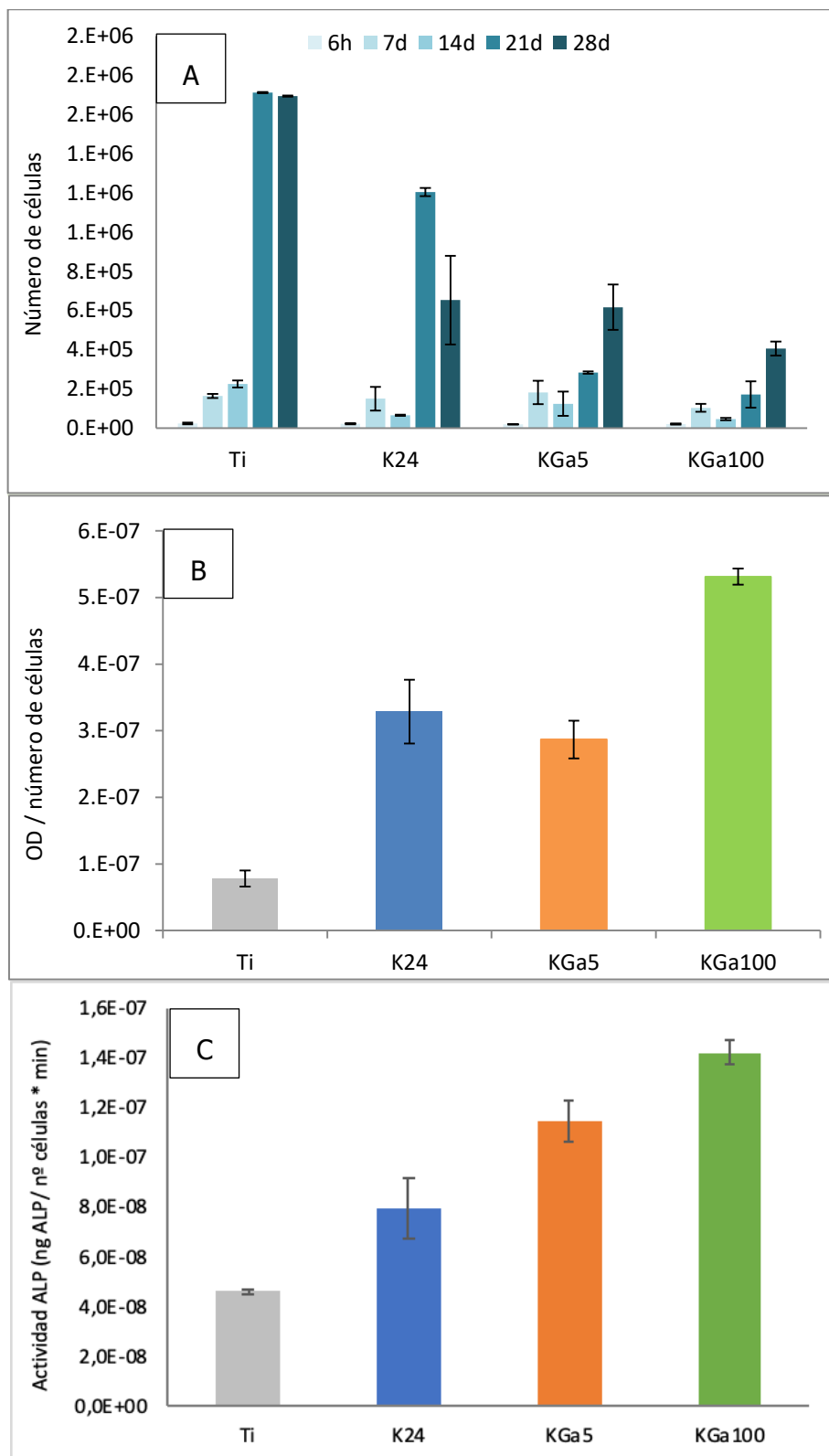


Figura 5.21 Resultados de los ensayos in vitro de muestras Ti, K24, KGa5 y KGa100. A) Proliferación celular a 6 horas, 7, 14, 21 y 28 días. B) Cuantificación de depósitos de calcio producidos por las células a 28 días. C) Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) 21 días.

La proliferación celular es igual en todas las muestras durante los primeros días (figura 5.21A). Sin embargo, después de 14 días de incubación se observan diferencias significativas entre las

muestras de titanio sin tratamiento (Ti) y las tratadas, tanto convencionalmente (K24) como con galio (KGa5 y KGa100). Aunque las células continúan creciendo a más días de incubación, en superficies dopadas con Ga, su velocidad de crecimiento disminuye, especialmente en KGa100 (la de mayor concentración)

En contraste con la proliferación, la capacidad de inducir mineralización en las muestras tratadas es muy superior al Ti control, siendo la KGa100 la más destacada (figura 5.21 B). No hay diferencias entre las muestras K24, y KGa5, lo cual no es negativo, ya que precisamente se escogió esta muestra como una referencia (control positivo), dado que el tratamiento termoquímico convencional de Kokubo ha sido ampliamente estudiado, validado e implementado en implantes protésicos [67]–[70], [177]–[180].

Diversos estudios afirman que existe una relación inversa entre la proliferación y la diferenciación celular [323], [324], mientras que la mineralización implica la diferenciación de osteoblastos en la etapa tardía [325]–[328]. Esto coincide con los resultados obtenidos, ya que a 28 días las muestras sin tratar (Ti) son las que presentan menor actividad de ALP (figura 5.21 C), un marcador temprano de diferenciación osteoblástica. Esto explica porque en las muestras tratadas (K24, KGa5 y KGa100) las células proliferan menos debido a una mayor diferenciación y mineralización.

Los resultados de mineralización también coinciden con la inmersión en SBF (apartado 5.2.3), confirmando que el galio promueve la formación de apatita mediante dos vías: el intercambio iónico con el medio y la mineralización de los osteoblastos. Esto unido al efecto antibacteriano hace que el proceso de adición de galio, mediante el tratamiento termoquímico presentado, sea una alternativa viable y prometedora para mejorar los implantes porosos actuales.

La muestra KGa100 es la que presenta mejores resultados en cuanto capacidad de formación de apatita (en menos días), actividad antibacteriana (inhibe a una cepa más), diferenciación celular y mineralización in vitro. Sin embargo, como se especifica en el apartado 3.7.5 de materiales y métodos, para incorporar el galio se utilizan 10 mL por muestra de una solución de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ XmM (X= 5, 10, 50 o 100). El coste de 10mL de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ 100mM (KGa100) es de 4,5€, esto comporta un incremento del que en muchos casos puede llegar a ser entre el 25% y el 30% en el coste de fabricación de cada implante poroso. Por lo tanto, los beneficios del tratamiento de las muestras KGa100 no son suficientes como para optar por este proceso a nivel industrial, ya que económicamente es menos favorable.

Las muestras tratadas con la menor concentración de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ (KGa5) ofrecen una respuesta inhibitoria frente a la bacteria gram negativa multirresistente pseudomona aeruginosa. Son bioactivas (formación de apatita tras 7 días de incubación en SBF), presentan resultados de mineralización similares al tratamiento convencional y muestran un mejor comportamiento con respecto a la diferenciación celular. En este caso el coste de 10mL de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ 5mM es de 0,23€, lo que comporta un incremento de aproximadamente un ~ 1 –1,5% en coste medio de cada implante poroso. Por lo tanto, la fabricación de piezas con el tratamiento de las muestras KGa5 es económicamente viable para proceder a escalar el proceso a nivel industrial.

5.3 FORMACIÓN DE TITANATOS DE CALCIO E INCORPORACIÓN DE PLATA Y GALIO, CON PROPIEDADES BIOACTIVAS Y ANTIBACTERIANAS, SOBRE ESTRUCTURAS DE TITANIO.

Para mejorar la capacidad antibacteriana, en el apartado 5.1, se consiguió añadir Ag a las muestras porosas, modificando el tratamiento termoquímico para la formación de titanatos de calcio (proceso desarrollado en el apartado 8.3.2 del anexo 3). En el apartado 5.2, se añadió Ga para provocar un doble efecto, mejora en la mineralización celular y actividad antibacteriana. Siguiendo con la idea de la doble funcionalidad, se decidió añadir conjuntamente Ag y Ga para aprovechar las características y beneficios de ambos elementos.

Por otra parte, la acción conjunta de ambos iones también puede potenciar la capacidad de inhibición de las muestras, debido a la sinergia de actividades antibacterianas. De hecho, el concepto de sinergia antibacteriana no es algo reciente, desde hace años en farmacología ya se implementan terapias con el uso sinérgico de antibióticos para aumentar la eficacia del tratamiento [232], [233]. El sistema Ag-Ga puede ofrecer buenos resultados ya que los iones de plata desestabilizan la matriz del biofilm aumentando la posibilidad de que otros iones (en este caso de galio) penetren y actúen sobre la bacteria [235]. Esta acción sinérgica es una gran ventaja, principalmente para el Ga, ya que por su mecanismo de acción necesita entrar en la bacteria para matarla.

Se tomaron como referencia las muestras KAg (AgNO_3 1mM) y KGa5 ($\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ 5mM) y a partir de estas se propusieron diferentes combinaciones para el desarrollo del estudio. En el apartado 3.7.6 de materiales y métodos se detallan las etapas del tratamiento. En la tabla 5.9 se resume del proceso e identificación de las muestras.

Tabla 5.9 Identificación del tratamiento en función de la concentración de nitrato de galio y de plata utilizada.

Muestras				
	KGAg51	KGAg52	KGAg55	KGAg102
Etapa 1	Ataque NaOH	Ataque NaOH	Ataque NaOH	Ataque NaOH
Etapa 2	$\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ 5mM + AgNO_3 1mM + $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$	$\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ 5mM + AgNO_3 2mM + $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$	$\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ 5mM + AgNO_3 5mM + $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$	$\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ 10mM + AgNO_3 2mM + $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$
Etapa 3	Tratamiento térmico	Tratamiento térmico	Tratamiento térmico	Tratamiento térmico
Etapa 4	Tratamiento en agua	Tratamiento en agua	Tratamiento en agua	Tratamiento en agua

En realidad, la concentración de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y AgNO_3 es la mitad de lo indicado en la tabla 5.9, ya que las muestras se sumergen en una mezcla 1:1. Por ejemplo, para las muestras KGAg102 se preparan soluciones de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ 10mM y AgNO_3 2mM y al realizar la mezcla estas se diluyen a 5 y 1mM respectivamente. Como se puede ver en la tabla 5.9 se utilizó

acetato en lugar de cloruro de calcio para poder introducir todos los elementos en una misma etapa sin que precipitara AgCl.

5.3.1 Sustitución del cloruro de calcio por acetato en la generación de titanatos de calcio con Galio.

En los estudios previos de funcionalización (apartado 8.3.2 del anexo 3) se demostró que el CaCl_2 (KCa) y el $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$ (KAc) eran válidos para la formación de titanatos de calcio bioactivos mediante el tratamiento termoquímico propuesto (tabla 8.12). En el apartado 5.1 se consiguió añadir Ag (KAg) mediante la mezcla de $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$ y AgNO_3 (tabla 5.1). Sin embargo, en el apartado 5.2 se utilizó CaCl_2 , en lugar $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$, con $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ para introducir el Ga.

En este apartado al volver a trabajar con iones de plata es necesario utilizar $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$ para evitar la precipitación de AgCl. Sin embargo, antes de empezar con el desarrollo del estudio es necesario llevar a cabo una prueba con la mezcla de $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$ con $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ 5mM (KAcGa5) para asegurar que no se producen cambios en el tratamiento del galio al cambiar el CaCl_2 (KCa) por $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$.

5.5.1.1 Estructura superficial

Se observó la superficie de las muestras (interior y exterior) mediante microscopía electrónica de barrido (figura 2.22) y se llevó a cabo un análisis por EDS (tabla 5.10).

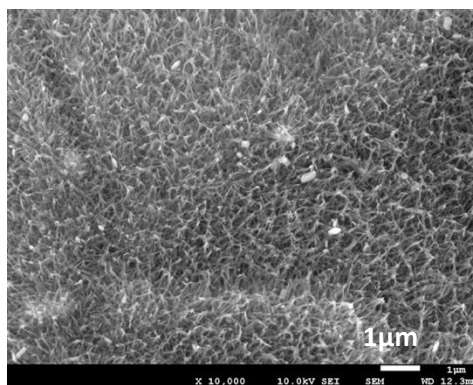


Figura 5.22 Imágenes SEM a 10k aumentos de la superficie de la muestra tratada con acetato de calcio y nitrato de galio 5mM (KAcGa5).

Se puede distinguir la estructura típica que se obtiene al realizar este tipo de tratamientos. No hay diferencias, respecto a la muestra referencia (KCa, figura 5.9 A).

Tabla 5.10 Análisis elemental EDS (%at.) de la muestra KAcGa5.

	O	Ca	Ga	Ti
KAcGa5	34,7±0,4	2,4±0,6	5±0,6	59,9±0,5

Resultados y discusión. Funcionalización

La cuantificación del EDS confirma la adición de galio y calcio en la superficie de la muestra mediante la mezcla de $C_4H_6CaO_4$ con $Ga(NO_3)_3$, sin haber diferencias significativas respecto al tratamiento con $CaCl_2$ (KGa5, tabla 5.6).

5.3.1.2 Análisis fisicoquímico

Para confirmar la formación de titanatos hidrogenados de calcio con Ga se analizaron las muestras porosas KAcGa5 (antes del tratamiento térmico) mediante espectroscopia Raman.

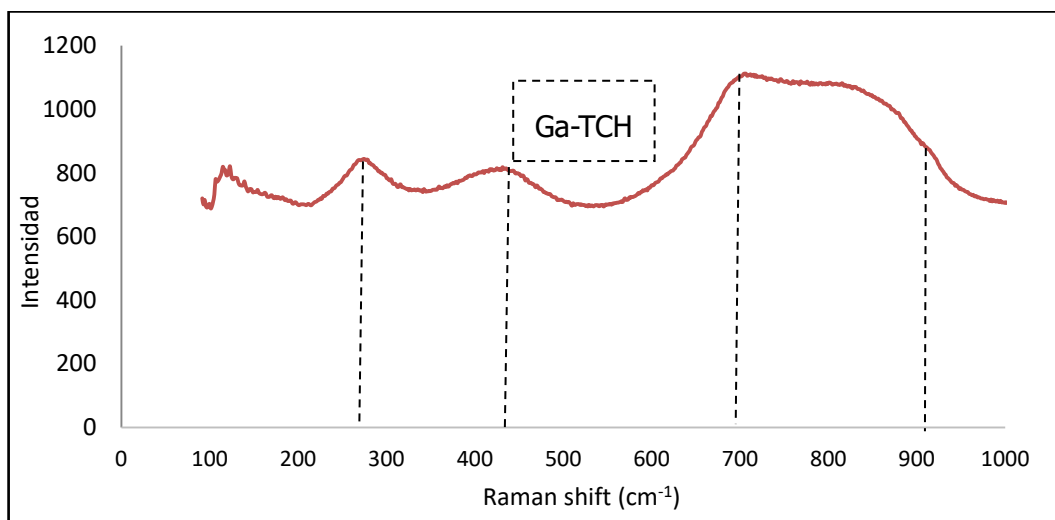


Figura 5.23 Espectro Raman de las muestras tras la inmersión en acetato de calcio y nitrato de galio 5mM (KAcGa5). Ga-TCH: titanato de calcio hidrogenado con galio.

En la figura 5.23 se identifican los picos característicos del titanato de calcio hidrogenado con galio, con acorde con la literatura [75]. Además, coincide con el espectro Raman de las muestras tras la inmersión en cloruro de calcio y nitrato de galio a diferentes concentraciones (figura 5.10).

5.3.1.3 Formación de apatita

Para completar el estudio preliminar se decidió evaluar la bioactividad mediante el ensayo de inmersión en SBF, ya que en este se sigue una norma ISO 22317. Además, este ensayo indica de manera indirecta que se ha habido liberación de iones.

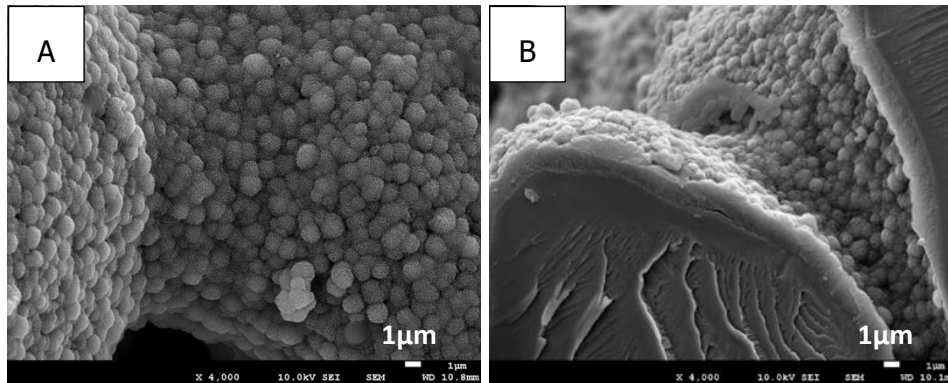


Figura 5.24 Imágenes SEM a 4K aumentos de A) la superficie y B) sección de la capa generada tras incubar las muestras KAcGa5 7 días en SBF.

En las micrografías se puede apreciar una capa densa de cristales de apatita que recubren toda la superficie (interior y exterior) de las muestras tratadas.

Por lo tanto, se confirma que cambiar el cloruro por acetato en el tratamiento con galio no se modifica la microestructura, ni la capacidad de formación de titanatos de calcio con galio bioactivos en consecuencia, es viable realizar la mezclas $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ XmM + AgNO_3 XmM + $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$ en una misma etapa (tabla 5.19).

5.3.2 Estructura superficial

Se observó la superficie de las muestras mediante microscopía electrónica, para comprobar si la microestructura cambia al modificar el tratamiento para añadir Ga y Ag conjuntamente. Además, se llevó a cabo un análisis elemental por EDS, para confirmar la deposición del calcio, galio y plata en la superficie (exterior e interior). En la figura 5.25 se presentan las micrografías obtenidas para las muestras con diferentes concentraciones $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y AgNO_3 .

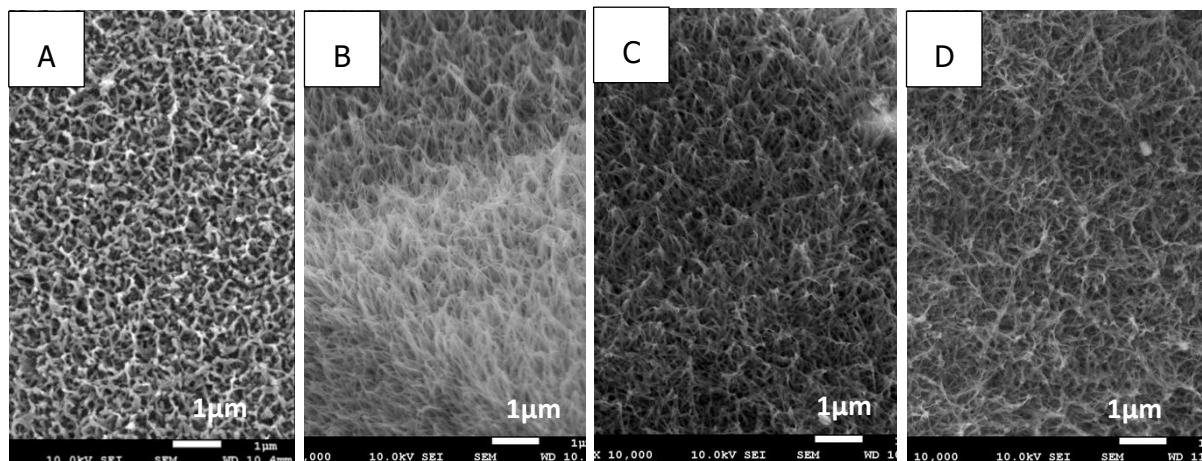


Figura 5.25 Imágenes SEM a 10k aumentos de la superficie de las muestras tratadas con acetato de calcio y diferentes concentraciones de nitrato de galio y plata. A) KGAg51, B) KGAg52, C) KGAg55, D) KGAg102.

En las micrografías de la figura se puede ver como todas las muestras presentan la topografía típica acicular o tipo pluma. No se observan diferencias respecto a la microestructura de los anteriores tratamientos únicamente con Ag o Ga (figuras 5.1 y 5.9) ni con las encontradas en la literatura para el tratamiento convencional [329], [182], el modificado con calcio [66], [187] y los de incorporación de iones de Ag [74] y Ga [75], [228]. En la tabla 5.11 se recogen los resultados de la cuantificación del EDS.

Tabla 5.11 Análisis elemental EDS (%at.) de las muestras con tratadas con acetato de calcio y diferentes concentraciones de nitrato de galio y plata. Muestras KGa5 ($\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ 5mM) y KAg(AgNO_3 1mM) como referencia.

	O	Ca	Ga	Ag	Ti
KGAg51	32,9±3	0,5±4	1±0,5	1,4±0,2	64,2±5
KGAg52	43,7±4	0,9±4	1,1±0,4	2,6±0,8	51,7±2
KGAg55	52,1±3	1±4	1,2±0,6	4,3±1	41,4±4
KGAg102	50,5±1	0,6±4	2,3±0,5	2,3±0,4	44,3±4
KGa5	34,6±0.1	2,0±0,6	5,3±0,4		59,1±1,1
KAg	36,2±0,3	2,6±0,2		1,6±0,6	59,9±0,9

Los resultados confirman la presencia de calcio, galio y plata en la superficie (interior y exterior) de las muestras, obteniendo valores de Ga, en % atómico, por debajo de la muestra referencia (KGa5). En el apartado anterior (tabla 5.6) se vio que el tratamiento para la incorporación del galio ofrece poco rendimiento, ya que es necesario aumentar 50 veces la concentración $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ (de 5mM a 100mM) para conseguir duplicar el % atómico. Respecto a la plata, la solución AgNO_3 ofrece mayor eficiencia en cuanto incorporación de iones, ya que, utilizando la mitad de concentración, se obtienen valores, en % atómico, similares que la referencia (KAg).

Es posible que al aplicar el tratamiento mediante la mezcla de ambos reactivos ($\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ + AgNO_3) los iones Ga^{3+} faciliten la incorporación de iones Ag^+ . Un estudio de Prabu y colaboradores [215], reportó que el %Ag se satura alrededor del 2% a una concentración 10mM de AgNO_3 ; sin embargo en la tabla 5.11 se puede ver que se han conseguido porcentajes superiores con menos concentración. Esto también explicaría porque la incorporación de galio es ligeramente menor cuando se aplica el tratamiento con la mezcla.

5.3.3 Análisis fisicoquímico

Para confirmar la generación de titanatos se utilizó la espectroscopia Raman, pero únicamente se caracterizaron muestras antes del tratamiento térmico (figura 5.26).

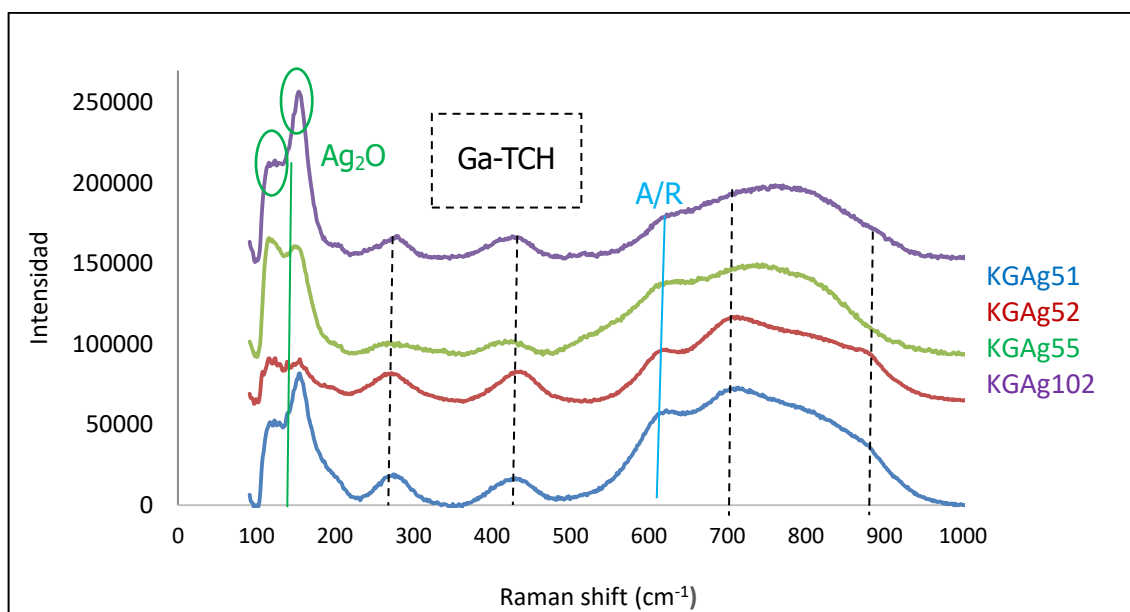


Figura 5.26 Espectro Raman de las muestras tras la inmersión en acetato de calcio y nitrato de galio y de plata a diferentes concentraciones (antes del tratamiento térmico). Ga-TCH: titanato de calcio hidrogenado con galio, A: anatasa, R: rutilo.

En la imagen se identifican los picos característicos del titanato de calcio hidrogenado con galio, acorde con la literatura [75]. También distinguen dos picos alrededor de 100cm^{-1} y 150cm^{-1} que son representativos del modo reticular vibratorio Ag para el Ag_2O (95cm^{-1} y 148cm^{-1}), o bien para el AgCH_3COO (acetato de plata, 102cm^{-1} y 140cm^{-1}) [306]. Sin embargo, en el apartado anterior se demostró que se trataba de Ag_2O que tras el tratamiento térmico se reduce formando Ag metálica. Por lo tanto, para corroborar los resultados y completar la caracterización fue necesario utilizar otros métodos como DRX.

No hay diferencias en los espectros al aumentar la concentración y relación de Galio y Plata por lo que solo se adjuntará el resultado de la muestra tratada con la menor concentración de ambos componentes. En la figura 5.27 se presenta el diagrama de la muestra KAg51.

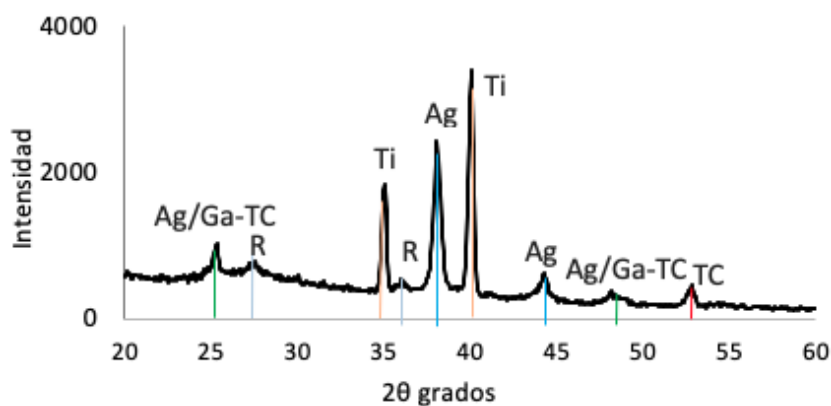


Figura 5.27 Diagrama de DRX de una muestra lisa tras el tratamiento termoquímico completo con $C_4H_6CaO_4$ y $Ga(NO_3)_3$ 5mM y $AgNO_3$ 1mM (KGag51). Ag/Ga-TC: titanato de calcio con galio y plata, R: rutilo, Ti: titanio, Ag: plata, TC: titanato de calcio.

En el diagrama se distinguen dos picos alrededor de 25 y 48 grados, ligeramente desplazados respecto los identificados como titanato de calcio con galio (Ga-TC figura 5.11), titanato de calcio con plata (AgTC figura 5.3) y titanato de galio (JCPDS no. 00-020-0447) [228]. Según la literatura el desplazamiento de los picos se atribuye al remplazo y/o adición de elementos en el titanato [74], [75]. Por lo tanto, en la figura 5.27 los picos Ag/Ga-TC se han identificado como titanato de calcio con galio y plata. También se aprecian dos picos a 38 y 44 grados que se pueden indexar a los nanocristales cúbicos de plata (JCPDS no. 04-0783), es decir plata metálica [307]. Igual que sucedía con el tratamiento para incorporar plata (apartado 5.1, KAg), tras el tratamiento térmico el Ag_2O (figura 5.27) da lugar a plata metálica.

Los resultados confirman la formación de titanatos de calcio con galio y plata, además de la presencia de Ag metálica.

5.3.4 Formación de apatita

Se incubaron 7 días en SBF muestras porosas, tratadas con diferente concentración de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y AgNO_3 . A continuación, se observó la superficie mediante microscopía electrónica de barrido (figuras 5.28, 5.29, 5.30 y 5.31).

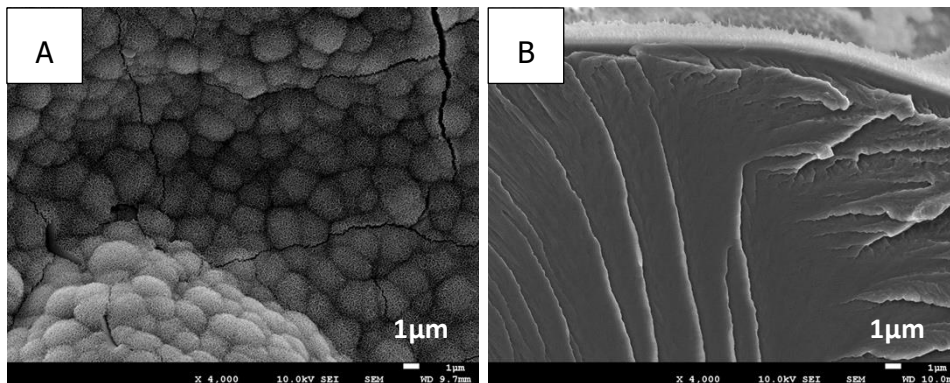


Figura 5.28 Imágenes SEM a 4K aumentos de A) la superficie y B) la sección de la capa generada tras incubar las muestras KGA51 7 días en SBF.

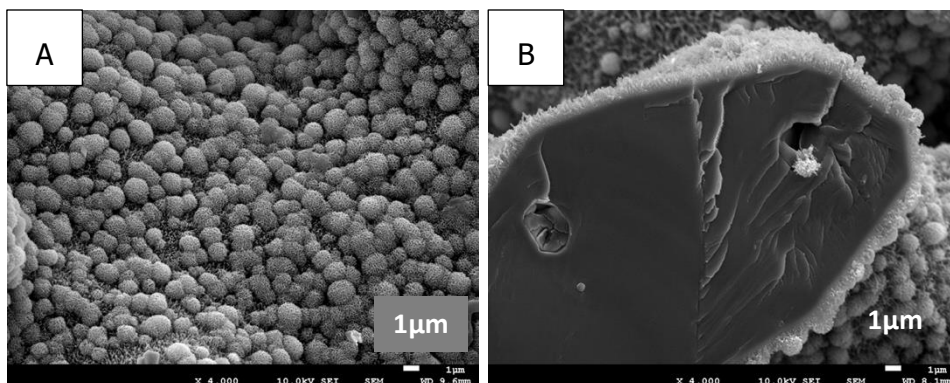


Figura 5.29 Imágenes SEM a 4K aumentos de A) la superficie y B) la sección de la capa generada tras incubar las muestras KGA52 7 días en SBF.

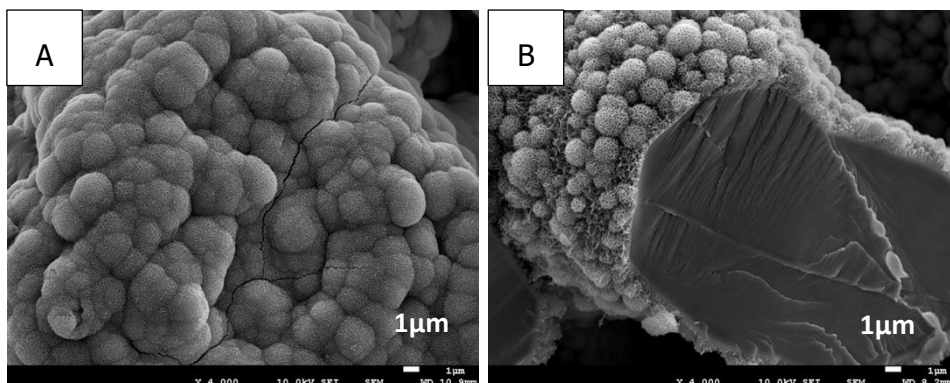


Figura 5.30 Imágenes SEM a 4K aumentos de A) la superficie y B) la sección de la capa generada tras incubar las muestras KGA55 7 días en SBF.

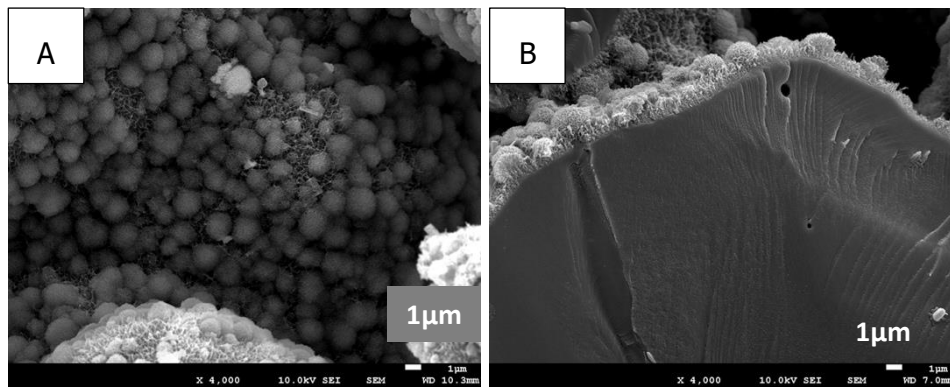


Figura 5.31 Imágenes SEM a 4K aumentos de A) la superficie y B) la sección de la capa generada tras incubar las muestras KGA102 7 días en SBF.

En todas las muestras se distingue la capa de cristales de apatita (figuras 5.28, 5.29, 5.30 y 5.31); igual que sucede en las muestras con titanatos de calcio con plata (figura 5.10) y titanatos de calcio con galio (figuras 5.12, 5.13, 5.14 y 5.15). Por lo tanto, se confirma la bioactividad de las superficies de tratadas con $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 + \text{AgNO}_3$, independientemente de la relación de concentraciones utilizada.

5.3.5 Liberación de iones

Se ha demostrado que se ha incorporado Ca, Ag y Ga en la superficie (exterior e interior); y que ha habido intercambio de iones para la formación de apatita. Además, se ha visto que el tratamiento conjunto con $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 + \text{AgNO}_3$ favorece la adición de iones Ag^+ , y es importante conocer si también influye en la liberación. Se llevó a cabo un ensayo de liberación en solución, con muestras porosas (3D) y lisas (2D). En la figura 5.32 se presentan los gráficos obtenidos.

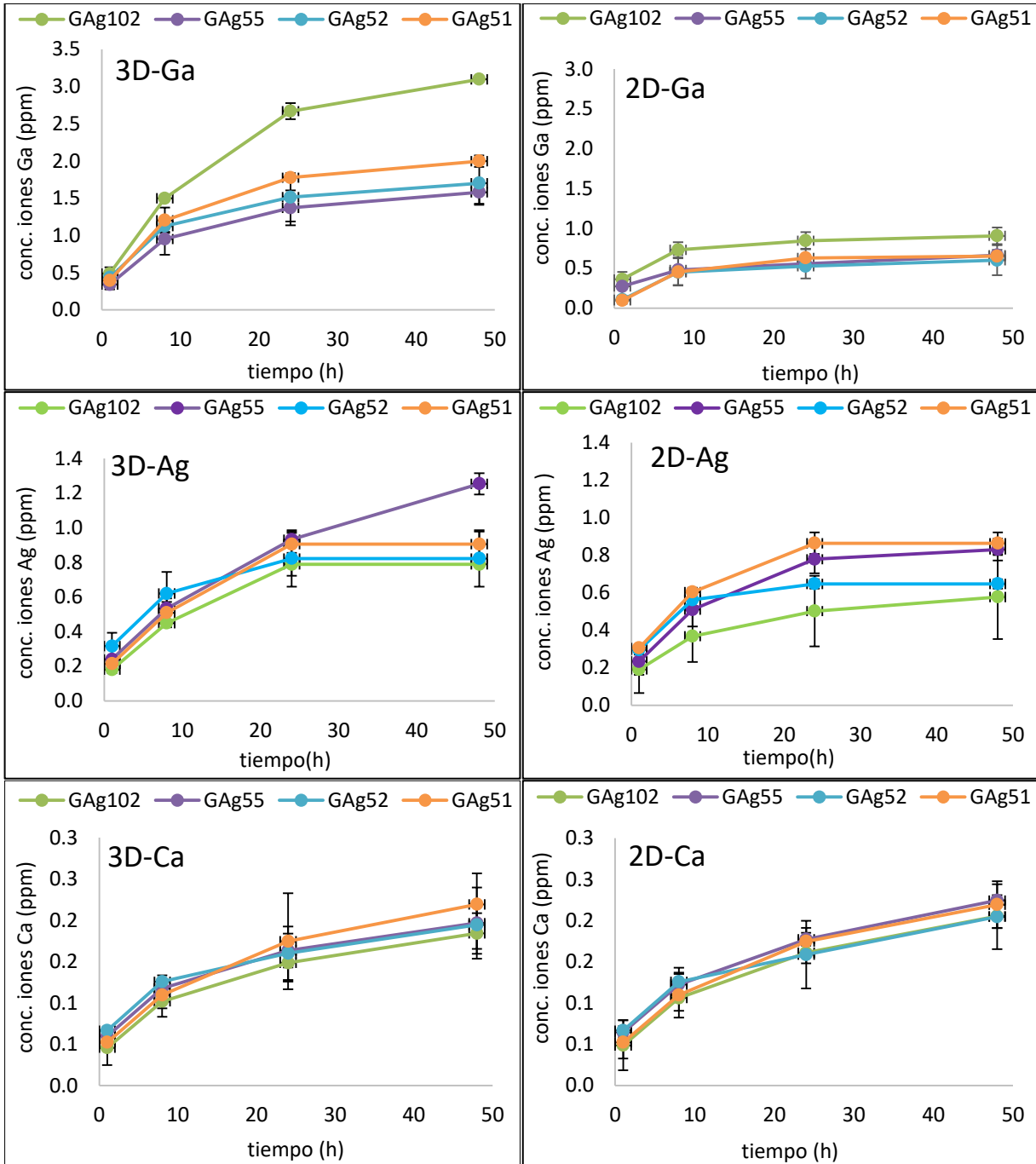


Figura 5.32 Liberación (acumulativa) de iones de Ga, Ag y Ca de las muestras porosas (3D) y lisas (2D) tratadas con diferentes concentraciones de nitrato de galio y de plata.

Los resultados confirman la difusión de iones de calcio, galio y plata en muestras lisas y porosas, siendo mayor la liberación en estas últimas. En los apartados 5.1 y 5.2 también se observó como las estructuras porosas favorecían la liberación de Ag y Ga, coincidiendo con la literatura [311], [312]. Por lo tanto, se constata que el tratamiento más eficaz sobre las estructuras 3D. Igual que sucedía en las muestras con los tratamientos para incorporar únicamente Ag (figura 5.5) y únicamente Ga (figura 5.17), la liberación de iones Ca^{2+} es notablemente inferior a la de Ag^+ y Ga^{3+} . Sin embargo, se ha comprobado que es suficiente para formar apatita por intercambio iónico en SBF (figuras 5.28, 5.29, 5.30 y 5.31).

Como era de esperar, la muestra con mayor %at. de Ga (KGA102) libera más cantidad de iones Ga^{3+} (figura 5.32), confirmando la relación directamente proporcional entre el %at. de Ga y la cantidad de iones liberados. Esto mismo se observó en el apartado anterior, donde la muestra KGa100 con un ~9,2%at. de Ga libera ~5 ppm tras 48h y la muestra KGa5 con un ~5,3%at. de Ga y libera ~5 ppm tras 48h (figura 5.17). Por lo tanto, el comportamiento en cuanto a la liberación de galio es independientemente de que haya o no plata en las muestras (KGA102 tiene un ~2,3%at. de Ga y libera ~3 ppm), lo que indica que la plata no interfiere en la liberación de galio (ni impide ni favorece).

La concentración de iones Ga^{3+} liberados al medio es suficiente para generar respuesta antibacteriana, ya que son similares al MIC del complejo Ga-DFO para la *Pseudomona aeruginosa* [320]. Yamaguchi y colaboradores [75], generaron titanatos de calcio con galio y reportaron capacidad de formación de apatita y actividad antibacteriana (sobre la *Acinetobacter baumannii*) con valores de liberación inferiores a los obtenidos (0,03 ppm de Ca y 0,23ppm de Ga).

En cuanto a la plata, parece haber un ligero descenso en la liberación respecto a la muestra referencia KAg (solo plata), ya que esta contiene un ~1,5%at. de Ag y libera ~1,2 ppm tras 48h (figura 5.5), mientras que las muestras KGA51, KGA52 y KGA102 tienen entre un 1,5 y un 2,5 % de Ag y liberan alrededor de 1 ppm (figura 5.32). Sin embargo, no es posible afirmar que las muestras con tratadas con $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 + \text{AgNO}_3$ liberan menos iones de Ag que las tratadas únicamente con AgNO_3 , dado que hay demasiada dispersión de resultados, debido al propio error de medida de las técnicas y equipos (especialmente el EDS) y a la variabilidad de resultados que se suelen dar en estructuras porosas (menos repetitivas). Si la comparativa se lleva a cabo con las muestras lisas (2D) no se encuentran diferencias.

Por otra parte, la muestra KGA55 con un ~4,3 %at. de Ag únicamente libera ~1,2 ppm, pero en este caso se evidencia que la curva de liberación no se ha estabilizado y que la muestra seguramente continúe liberando iones pasadas las 48h. Es posible que la incorporación de galio impida y prolongue la liberación de plata, algo similar a lo que sucede con el calcio en los titanatos de calcio. En el tratamiento para generar titanatos de calcio es necesario llevar a cabo una etapa final de inmersión en agua caliente, en donde los iones Ca^{2+} de la superficie del titanato son reemplazados parcialmente por iones H_3O^+ del agua, consiguiendo superficies deficientes en calcio que favorecen el intercambio iónico [187]. Yamaguchi y colaboradores [75], generaron titanatos de calcio con galio y reportaron la necesidad que al realizar la etapa final de inmersión en agua caliente la liberación de iones de Ca disminuía (de 0,34 ppm a 0,03 ppm) y la de iones Ga aumentaba (de 2,96 ppm a 3,75 ppm). En este caso el mecanismo es el mismo, pero ocurre lo contrario, la acumulación de iones Ga^{3+} en la superficie dificultan la liberación de Ag^+ , esto explicaría porque la liberación de Ga no se ve afectada por la plata, pero sí al revés. Prolongar la liberación de iones Ag es un avance es muy interesante ya, que

tal y como se comentó en el apartado 5.1, en la mayoría de estudios bien sea mediante titanatos de sodio con plata [215], titanatos de plata [214], o titanatos de calcio con plata [74], la mayor liberación se produce entre las 3 y 10 horas.

5.3.6 Halo de inhibición bacteriana

Para asegurar que la liberación de iones Ga^{3+} y Ag^+ es suficiente como para producir una respuesta antibacteriana se llevó a cabo el ensayo del halo de inhibición. Se utilizaron las cuatro cepas más comunes y estudiadas en infecciones de implantes protésicos, dos gram positivas (+) y dos gram negativas (-), *Staphylococcus epidermidis* (S. epi), *Staphylococcus aureus* (S. aureus), *Pseudomonas aeruginosa* (P. aeru) y *Escherichia coli* (E. coli). El ensayo se realizó con las muestras porosas, tratadas con diferentes concentraciones de $Ga(NO_3)_3 + AgNO_3$ (KGA51, KGA52, KGA55 y KGA102), y como control se usaron muestras de Ti sin tratar (Ti). En la tabla 5.12 se recogen los diámetros de los halos obtenidos.

Tabla 5.12 Diámetro del halo de inhibición en las muestras tras 24 y 48 horas de incubación.

	Ø halo (mm)							
	P. aeru		E. Coli		S. epi		S. aureus	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Ti	10±1	10±1	10±1	10±1	10±1	10±1	10±1	10±1
KGa5	13±1	18±1	10±1	10±1	10±1	10±1	10±1	10±1
KAg	13±1	18±1	13±1	13±1	16±1	16±1	12±1	12±1
KGA51	12±1	12±1	12±1	12±1	16±1	16±1	12±1	12±1
KGA52	13±1	13±1	14±1	14±1	16±1	16±1	12±1	12±1
KGA55	13±1	13±1	13±1	13±1	16±1	16±1	13±1	13±1
KGA102	12±1	12±1	13±1	13±1	16±1	16±1	13±1	13±1

Como se puede ver, no hay crecimiento bacteriano de ninguna de las cepas alrededor de las muestras tratadas con $Ga(NO_3)_3 + AgNO_3$ (KGA51, KGA52, KGA55 y KGA102). El control Ti no presenta actividad antibacteriana, por lo que el valor que se recoge en la tabla 5.12 es el diámetro aproximado de las muestras. Para facilitar la comparativa, también se han incluido los resultados de las muestras referencia KGA5 ($Ga(NO_3)_3$ 5mM) y KAg ($AgNO_3$ 1mM). Dado que en todas las muestras se distingue el halo de inhibición, en la figura 5.33 únicamente se presentan las imágenes de la muestra con el menor %at. de galio y plata (KGA51).

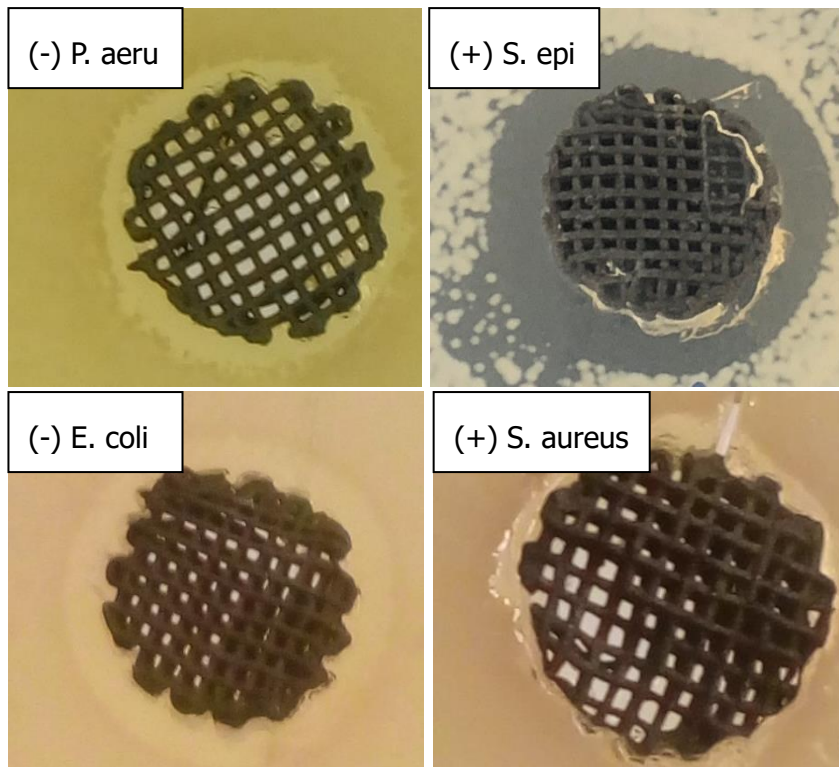


Figura 5.33 Halo de inhibición bacteriana de las muestras KGA51.

Al comparar los resultados del halo de inhibición de la muestra de menor %at. de Ga y Ag (KGA51) con la referencia de galio (KGA5), se confirma que al añadir Ag a las muestras que contienen Ga se amplía su carácter antibacteriano, ya que el espectro de inhibición bacteriana es mayor (pasa de 1 a 4 cepas).

En cuanto a la referencia de plata (KAg); no existen diferencias significativas entre las muestras únicamente con Ag y las de Ga + Ag (KGA51, KGA52, KGA55 y KGA102), todas presentan carácter antibacteriano. Sin embargo, en la muestra de menor %at. de Ga y Ag (KGA51) se ha utilizado mitad de concentración de AgNO_3 . Esto podría ser debido al efecto sinérgico de la plata y el galio, lo cual también explicaría la mejora en la capacidad antibacteriana del galio; sin embargo, es necesario llevar a cabo un estudio con mayor precisión para corroborarlo.

5.3.7 Citotoxicidad

Para comprobar que la acción conjunta de la plata con el galio no produce un efecto adverso se realizó un ensayo de citotoxicidad siguiendo la norma UNE-EN ISO 10993-5:2009. Se analizaron las muestras porosas tratadas con las diferentes concentraciones de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y AgNO_3 (KAg51, KAg52, KAg55 y KAg102) y como control se utilizaron muestras de Ti sin tratar (Ti). Dado que todas las muestras (a excepción de la KAg55) se han tratado con la misma, o inferior, concentración de AgNO_3 , que no resultó ser citotóxica, éstas en principio tampoco deberían serlo. En la figura 5.34 se presentan los resultados del ensayo.

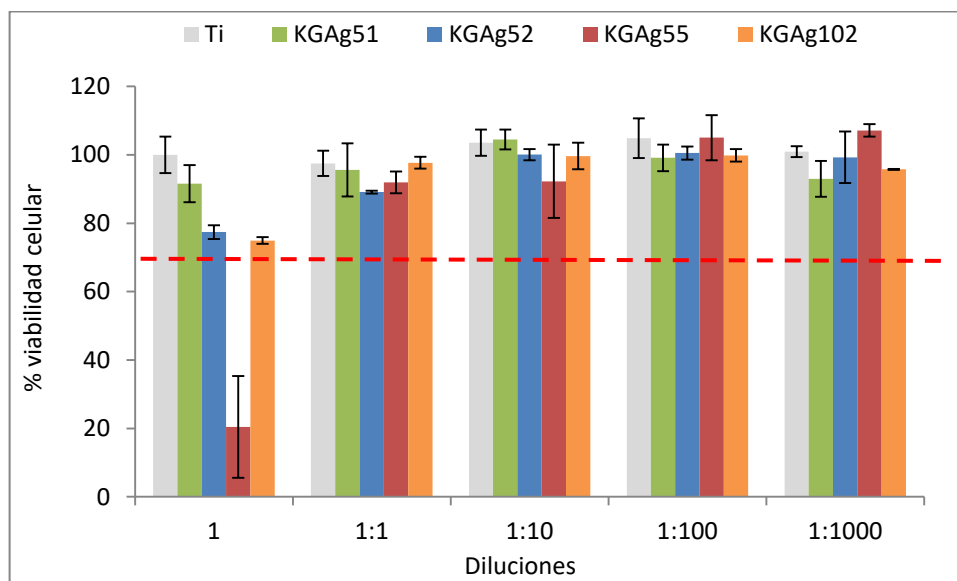


Figura 5.34 Citotoxicidad de muestras porosas tratadas con diferentes concentraciones de nitrato de plata y de galio, con Ti sin tratamiento como control.

Como se puede ver (figura 5.34), a excepción de la KAg55, todas las muestras presentan más de un 70% de viabilidad celular. Por lo tanto, acorde con la norma UNE-EN ISO 10993-5:2009 no se consideran citotóxicas. Esto coincide con los resultados de las muestras con solo plata (KAg, figura 5.8) ya que todas las muestras Ga + Ag no citotóxicas han sido tratadas con igual o menor concentración de AgNO_3 ($\leq 1\text{mM}$).

En la liberación de iones Ag no se observaron diferencias entre las muestras KAg y KAg55 a 48h (figura 5.15 y 5.36), teniendo esta última mayor porcentaje de plata. La hipótesis era que la curva de liberación no se ha estabilizado y que la muestra seguramente continúe liberando iones pasadas las 48h. Los resultados de citotoxicidad, de manera indirecta, confirman dicha hipótesis, ya que para la realización del ensayo las muestras se sumergen en el medio de cultivo celular durante 72 horas.

En base a los resultados obtenidos, se descarta la muestra KAg55. Sin embargo, en cuanto a las demás muestras, no hay información suficiente para tener un buen criterio de selección, por lo que se consideró necesario llevar a cabo un último ensayo.

5.3.8 Adhesión bacteriana

Hasta el momento no se han encontrado diferencias significativas entre las muestras KGA51, KGA52 y KGA102. En el ensayo del halo de inhibición se demostró que todas poseen capacidad antibacteriana frente a las cuatro cepas más comunes y estudiadas en infecciones de implantes protésicos (dos gram positivas y dos gram negativas). Sin embargo, al no ser un ensayo cuantitativo no fue posible distinguir entre muestras ni valorar el efecto de la sinergia antibacteriana del sistema Ga-Ag.

Para evaluar el porcentaje de bacterias que mueren al estar en contacto con las muestras, se llevó a cabo un ensayo de adhesión bacteriana. El procedimiento similar a la adhesión celular, se sumergen las muestras en el cultivo con bacterias y se incuban a 37°C 2h, después se aplican ultrasonidos para despegar las bacterias adheridas (tanto vivas como muertas), se extrae el líquido de cultivo y se siembran en una placa de agar, al día siguiente se cuentan las unidades formadoras de colonias (UFC) y se comparan con las de las muestras control (Ti). Se utilizaron las mismas cepas que en el halo de inhibición (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*). A continuación, en la figura 5.35 se representa el porcentaje de supervivencia bacteriana para cada cepa y muestra.

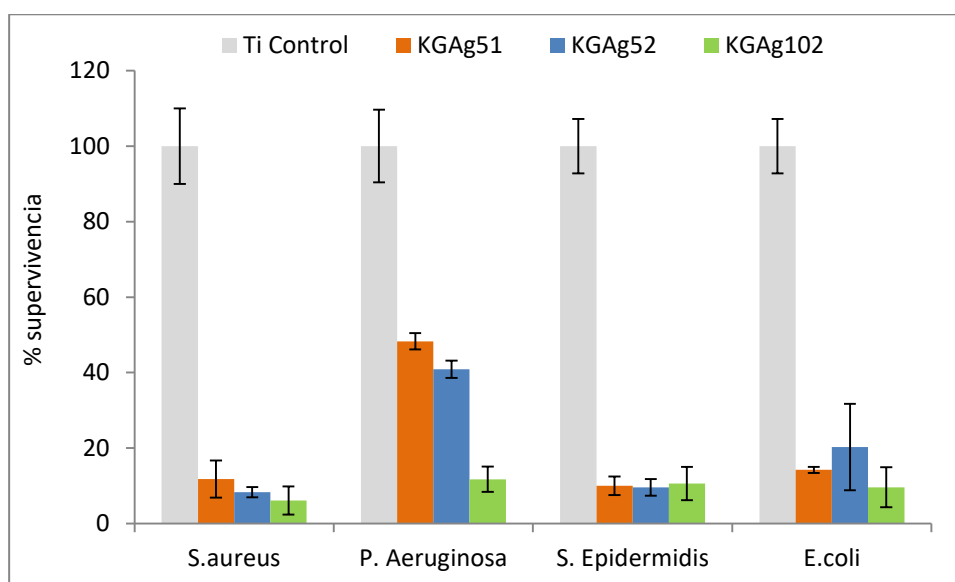


Figura 5.35 Resultados de adhesión bacteriana para las muestras porosas KGA51, KGA52 y KGA102, con Ti como control.

Se confirma la capacidad antibacteriana de todas las muestras tratadas, coincidiendo y corroborando los resultados del halo de inhibición (tabla 5.12).

En gráfico se observa que la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* es la más resistente. Sin embargo, diversos estudios han reportado la gran capacidad de antibacteriana del galio frente a dicha bacteria [219], [223]–[225], [320], [330]. Los resultados de adhesión bacteriana coinciden con la literatura y corroboran los del halo de inhibición del apartado 5.2 (solo galio) en donde se vio que esta cepa era vulnerable a muestras tratadas con bajas concentraciones $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$. Esto explicaría porqué con las muestras KGA102 se obtiene el menor porcentaje de supervivencia de *P. Aeruginosa*, ya que son las que liberan más cantidad de iones Ga^{3+} (figura 5.32).

Resultados y discusión. Funcionalización

Esta mejora de las propiedades antimicrobianas se puede atribuir a la acción sinérgica del sistema Ag-Ga, donde los iones Ag^+ desestabilizan la membrana facilitando que los iones Ga^{3+} penetren y actúen sobre la bacteria [235], o simplemente al aumento de iones antibacterianos, actuando estos por separado según su mecanismo de acción. Para confirmar el mecanismo sinérgico en futuros trabajos se deberían realizar ensayos de adhesión bacteriana con las muestras KGa5 y KAg (únicamente con galio o plata).

Independientemente del mecanismo de acción (sinérgico o por separado) se ha demostrado que la adición de ambos iones mejora la capacidad antibacteriana respecto a las muestras con un solo ion. La plata proporciona mayor espectro de inhibición y el galio mejor respuesta frente a la *P. Aeruginosa*, que representa el 10% de todos los microorganismos involucrados en la infección de prótesis de cadera [322].

6. CONCLUSIONES

6.1 CONCLUSIONES DE LA FABRICACIÓN

La formulación de tintas ad hoc para inyección 3D otorga flexibilidad en la utilización del polvo de partida: no hay limitaciones en cuanto a composición (temperatura de fusión o conductividad térmica), morfología y/o tamaño de partícula (fluencia). Únicamente se descartaron los polvos esféricos, pero no por problemas asociados a la impresión sino por el pos procesado.

Los estudios preliminares han evidenciado la importancia e influencia de la tinta en cada una de las etapas del proceso de fabricación; no solo afectando a las condiciones y parámetros de impresión, sino también al procesado en verde y a la calidad final de la pieza sinterizada.

Se ha formulado y desarrollado una tinta con la siguiente composición en peso: 60% de polvo de titanio (325 mesh), 30% de una disolución de PLA LX175 en acetato de etilo (20% en peso) y un 10% de hidrogel Pluronic F127 del 30% en peso. Con esta tinta se pueden imprimir correctamente implantes porosos tipo cuña, sin necesidad de aplicar temperatura ni cargas superiores a 100N. Además, presenta resistencia al agua lo que permite utilizar soportes solubles o imprimir dentro de hidrogel.

Identificando las problemáticas y requerimientos del proceso de inyección 3D, se ha podido contribuir en el desarrollo de un equipo a medida para imprimir la tinta final. Por otra parte, se han optimizado las condiciones y parámetros de impresión, generando un código de impresión específico en base a las características de la tinta y del equipo.

Se ha optimizado un proceso que permite eliminar el ligante de las piezas impresas (en verde) sin contaminarlas ni oxidarlas; es decir, el %C y %O obtenido está dentro de los límites establecidos por las normas ISO5832:1999 y ASTM-F67-06 (sector biomédico) al que está dirigido el potencial producto de esta tecnología. Dicho proceso se divide en dos etapas: introducir las piezas 1 hora en agua, eliminando el disolvente y parte de Pluronic, seguido de un tratamiento térmico de 2 horas a 350°C en aire. Por otra parte, se ha corroborado que las piezas impresas presentan una resistencia suficiente como para poder realizar los principales procesos de mecanizado (corte, desbaste, torneado y taladrado) en verde, facilitando la consecución de posibles formas complejas finales en estadios previos del procesado en el que, por las características mecánicas del compacto, son más fácilmente obtenibles.

Respecto al apartado de sinterización, para una mejor comprensión de los resultados obtenidos se han incluido conclusiones al final de cada estudio. Por lo tanto, en este capítulo se recogen las conclusiones generales y más relevantes que se pueden extraer:

- Las muestras sinterizadas a 1350°C presentan mayor resistencia a compresión que las sinterizadas a 1150°C (~40MPa y ~15MPa). Sin embargo, al incrementar la temperatura el porcentaje de contracción y de oxígeno es mayor. Es posible reducir alrededor de un tercio la contracción aumentando la velocidad del ciclo térmico, no obstante, las propiedades mecánicas se reducen a la mitad.
- La porosidad es una de las características más importantes a tener en cuenta, ya que se ha demostrado que es la que más influye en las propiedades mecánicas. Para el tipo de piezas a fabricar, la técnica más adecuada para caracterizarla es la microtomografía computarizada. Se ha detectado y calculado la diferencia que hay

Conclusiones

entre la porosidad predefinida y la de después del sinterizado y, dado la versatilidad que ofrece la impresión 3D, es posible reajustar el valor inicial para controlar la porosidad final. Regulando la porosidad (se obtienen propiedades mecánicas similares al implante de referencia, fabricado en AMES Medical (Osteosinter®), sinterizando a temperaturas inferiores a 1350°C.

- Por otra parte, se demostró que es posible mejorar las propiedades mecánicas sin necesidad de reducir el porcentaje de porosidad. Cambiando el patrón de impresión, de una estructura lineal a la honeycomb se obtiene mayor resistencia a compresión y se mantiene el módulo elástico. Además, al añadir 1 perímetro a la pieza prácticamente se duplica el módulo elástico y la resistencia a compresión facilitando el trabajo de los diseñadores de este tipo de productos.
- Con todo esto, y enfocado en los productos biomecánicos objeto de este desarrollo, la sinterización de muestras con 50% de porosidad predefinida y con estructura honeycomb a 1150°C durante 2h en alto vacío ($5 \cdot 10^{-5}$ mbar) resulta óptima desde el punto de vista funcional y operativo, permitiendo una menor contracción, mayor control dimensional y características similares (porosidad y propiedades mecánicas) a prótesis ya comercializadas. Además, respecto al sinterizado convencional la ventaja es evidente, no sólo por poder abarcar el nicho creciente de los implantes a medida, sino porque el proceso desarrollado facilita la regulación de la porosidad y estructura pudiéndose adaptar a las características 'deseadas' en cada caso, lo que le otorga de una alta flexibilidad y potencialidad.

Finalmente, en cuanto al escalado industrial, la tecnología se ha desarrollado, optimizado y validado pensando en todo momento en facilitar la implementación en la línea de producción, y teniendo en cuenta el sistema de gestión de calidad y demás aspectos regulatorios de los productos sanitarios. De esta forma se ha conseguido un conocimiento y un control de todo el proceso; desde la formulación de una tinta propia, la obtención de un equipo a media de impresión 3D, un proceso específico para la eliminación del ligante y, por su puesto la optimización del tratamiento térmico de sinterización.

6.2 CONCLUSIONES DE LA FUNCIONALIZACIÓN

Se ha verificado que es posible replicar el tratamiento termoquímico sobre superficie de material macizo desarrollado por T. Kokubo (NaOH y tratamiento térmico) en muestras porosas de titanio, generando titanatos de sodio, anatasa y rutilo, que promueven precipitación de cristales de hidroxiapatita tras 3 días de incubación en SBF (simulated body fluid).

Se ha conseguido formar titanatos de calcio bioactivos en las muestras porosas de titanio mediante el siguiente proceso secuencial: NaOH, CaCl_2 o $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$, tratamiento térmico y tratamiento en agua. Además, se han validado dos reactivos (CaCl_2 o $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$) para incorporar los iones Ca^{2+} .

Se ha desarrollado un tratamiento termoquímico que permite la formación de titanatos de calcio e incorporación de plata en las muestras porosas de titanio. El proceso secuencial es el siguiente: NaOH, $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4 + \text{AgNO}_3$, tratamiento térmico y tratamiento en agua. Con este proceso se evita la precipitación de AgCl y la necesidad añadir la plata en una etapa posterior al tratamiento térmico (más superficial). Las muestras tratadas presentaron capacidad de formación de apatita tras 7 días de incubación en SBF y actividad antibacteriana (contra las cepas *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *pseudomona aeruginosa* y *escherichia coli*) sin generar citotoxicidad.

Se ha desarrollado un tratamiento termoquímico que permite la formación de titanatos de calcio con galio en las muestras porosas de titanio. El proceso secuencial es el siguiente: NaOH, $\text{CaCl}_2 + \text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, tratamiento térmico y tratamiento en agua. Se han valorado diferentes concentraciones de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, siendo 100mM la que presenta mejores resultados en cuanto capacidad de formación de apatita (en menos días de inmersión en SBF), actividad antibacteriana (inhibe a una cepa más, *pseudomona aeruginosa* y *escherichia coli*), diferenciación celular y mineralización in vitro.

Finalmente se ha desarrollado un tratamiento termoquímico que permite la formación de titanatos de calcio con galio e incorporación de plata en las muestras porosas de titanio. El proceso secuencial es el siguiente: NaOH, $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 + \text{AgNO}_3 + \text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$, tratamiento térmico y tratamiento en agua. Se han valorado diferentes concentraciones de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y AgNO_3 , siendo 10mM y 2mM la mejor combinación, ya que es con la que se obtiene el menor porcentaje de supervivencia bacteriana para todas las cepas (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *pseudomona aeruginosa* y *escherichia coli*) sin causar citotoxicidad. Independientemente del mecanismo de acción (sinérgico o por separado) se ha demostrado que la adición de ambos iones mejora la capacidad antibacteriana respecto a las muestras con un solo ion. La plata proporciona mayor espectro de inhibición y el galio mejor respuesta frente a la *pseudomona aeruginosa*.

Conclusiones

7. TRABAJO FUTURO

7.1 TRABAJOS FUTUROS SOBRE LA FABRICACIÓN

- Estudiar el efecto de una estructura aleatoria, similar a la obtenida por pulvimetalurgia convencional, sobre las propiedades mecánicas.
- Estudiar el efecto de la estructura de las piezas (lineal, Honeycomb, aleatoria) en las propiedades biológicas mediante ensayos *in vitro*.
- Definida la estructura final y porosidad final, llevar a cabo una caracterización de la resistencia a fatiga, así como un ensayo *in vivo*.

7.2 TRABAJOS FUTUROS SOBRE LA FUNCIONALIZACIÓN

- Realizar ensayos de liberación iones de Ag, Ga y ambos, a periodos más prolongados (72h, 1 y 2 semanas).
- Corroborar el efecto sinérgico del conjunto Ag-Ga, repitiendo el ensayo de adhesión bacteriana con la muestra que presentó mayor porcentaje de inhibición (10mM de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ y 2mM de AgNO_3) y las muestras tratadas con la misma concentración de un único ion (Ag y Ga por separado).
- Comprobar el efecto beneficioso del galio en el conjunto Ag-Ga, realizando un ensayo *in vitro* (adhesión, proliferación, diferenciación y mineralización celular), con muestras tratadas únicamente con Ag y con ambos iones.
- Definido el tratamiento final, realizar un ensayo *in vivo* de osteointegración y otro de respuesta antibacteriana.

8. ANEXOS

8.1 ANEXO 1: ESTUDIOS PREVIOS DE FABRICACIÓN

8.1.1 Caracterización polvos de titanio

A continuación, se presentan los resultados de la caracterización de los polvos de titanio (tabla 8.1) seleccionados para el desarrollo y optimización de las tintas y del proceso de fabricación.

Tabla 8.1 Identificación de los polvos base Ti valorados

ID	Polvo
Ti	Ti grano fino
Ti_G	Ti grano grueso
Ti64	Ti ₆ Al ₄ V
Ti_E	Ti esférico

El polvo esférico (Ti_E) supone un reto debido a su morfología durante el proceso de eliminación del ligante (debinding), ya que existe un riesgo alto de desmoronamiento y dificultades de manipulación. Por este motivo antes de llevar a cabo la caracterización del polvo se realizó una prueba que consistía en fabricar y procesar una pieza estándar con polvo esférico y otro irregular.

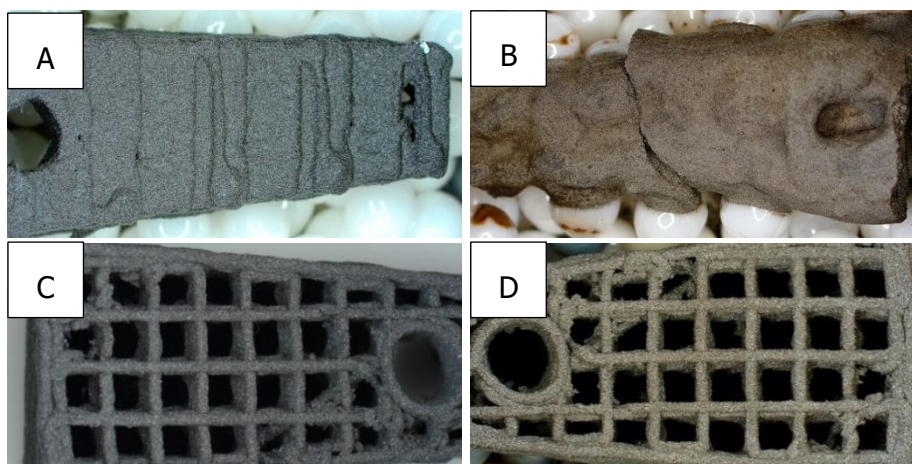


Figura 8.1 Muestra fabricada con polvo esférico (Ti_E), tras impresión 3D (A) y tras eliminación del ligante (B). Muestra fabricada con polvo irregular (Ti), tras impresión 3D (C) y tras eliminación del ligante (D).

En las imágenes de la figura 8.1 se observa cómo, tras realizar la eliminación del ligante la muestra fabricada con el polvo esférico se desmorona; por lo contrario, la muestra fabricada

Anexos

con el polvo irregular mantiene la estructura, incluso en muestras de elevada porosidad. Los polvos irregulares tienen más puntos de contacto entre partículas y pese a eliminar el ligante por completo mantienen la forma, bien por atracción electrostática o por anclaje entre partículas. Por lo tanto, se descartaron los polvos esféricos para el desarrollo del proceso.

8.1.1.1 Morfología y composición de los polvos

En la figura 8.2 se muestran las micrografías de los polvos estudiados.

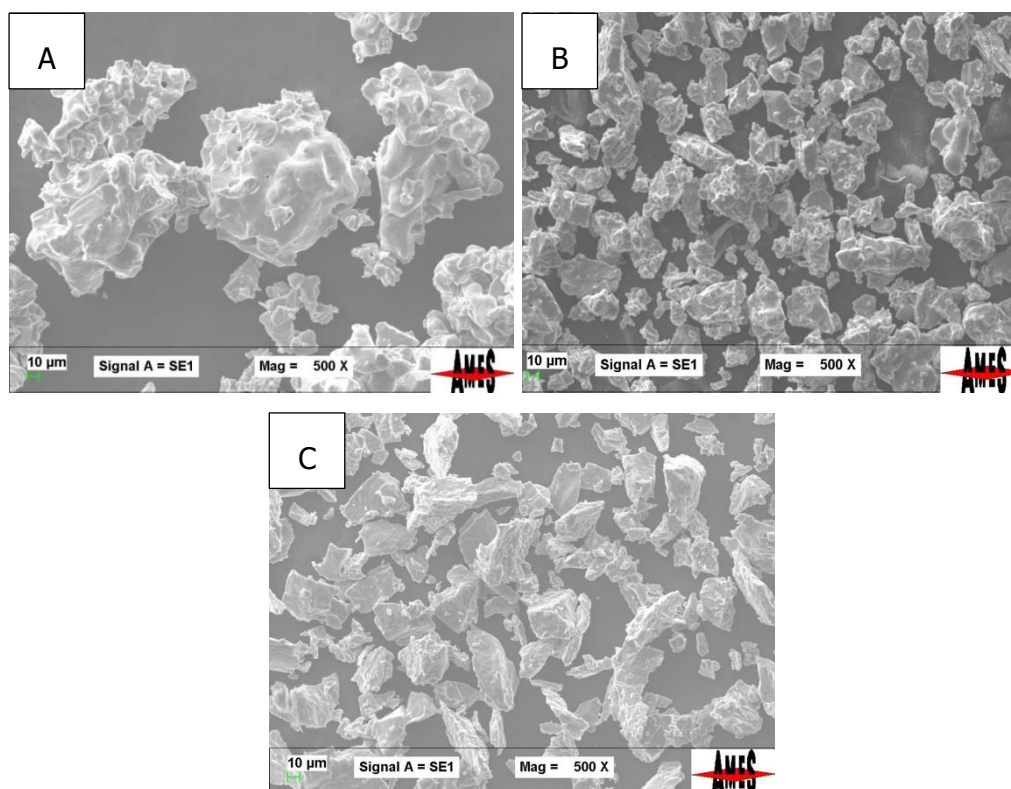


Figura 8.2 Micrografía de los polvos A)Ti_G, B) Ti y C) Ti64 a x500.

Todos los polvos muestran una estructura irregular, siendo el polvo Ti_G más parecido al polvo esponja (Figura 8.2 A), ya que ha sido obtenido mediante reducción con sodio. Los polvos Ti y Ti64, procedentes del mismo proveedor y obtenidos por HDH, presentan una morfología irregular más angulosa y sin porosidad interna.

La composición química de los polvos se ha determinado mediante dos técnicas: análisis cualitativo de los elementos mayoritarios mediante EDS y análisis cuantitativo de los elementos minoritarios intersticiales (C, O y N) con un equipo LECO. A continuación, se presentan los resultados obtenidos (Figuras 8.3 y 8.4).

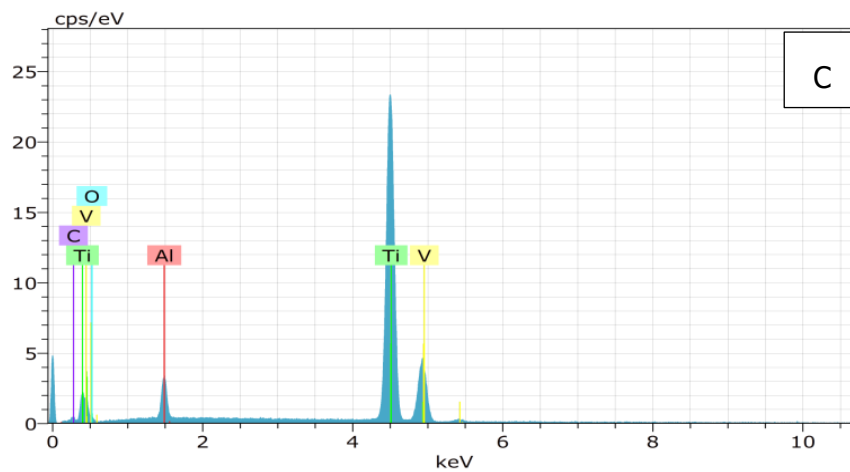
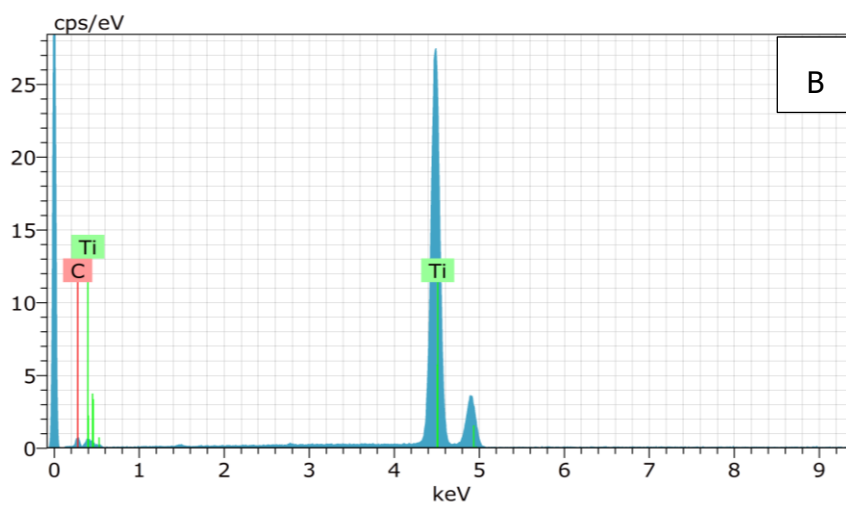
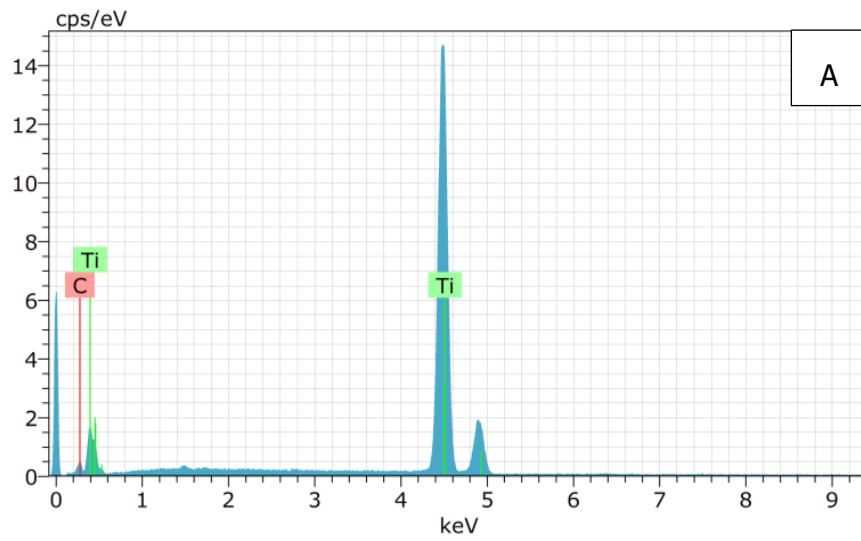


Figura 8.3 Análisis cualitativo mediante EDS de los polvos: A) Ti_G, B) Ti y C) Ti64.

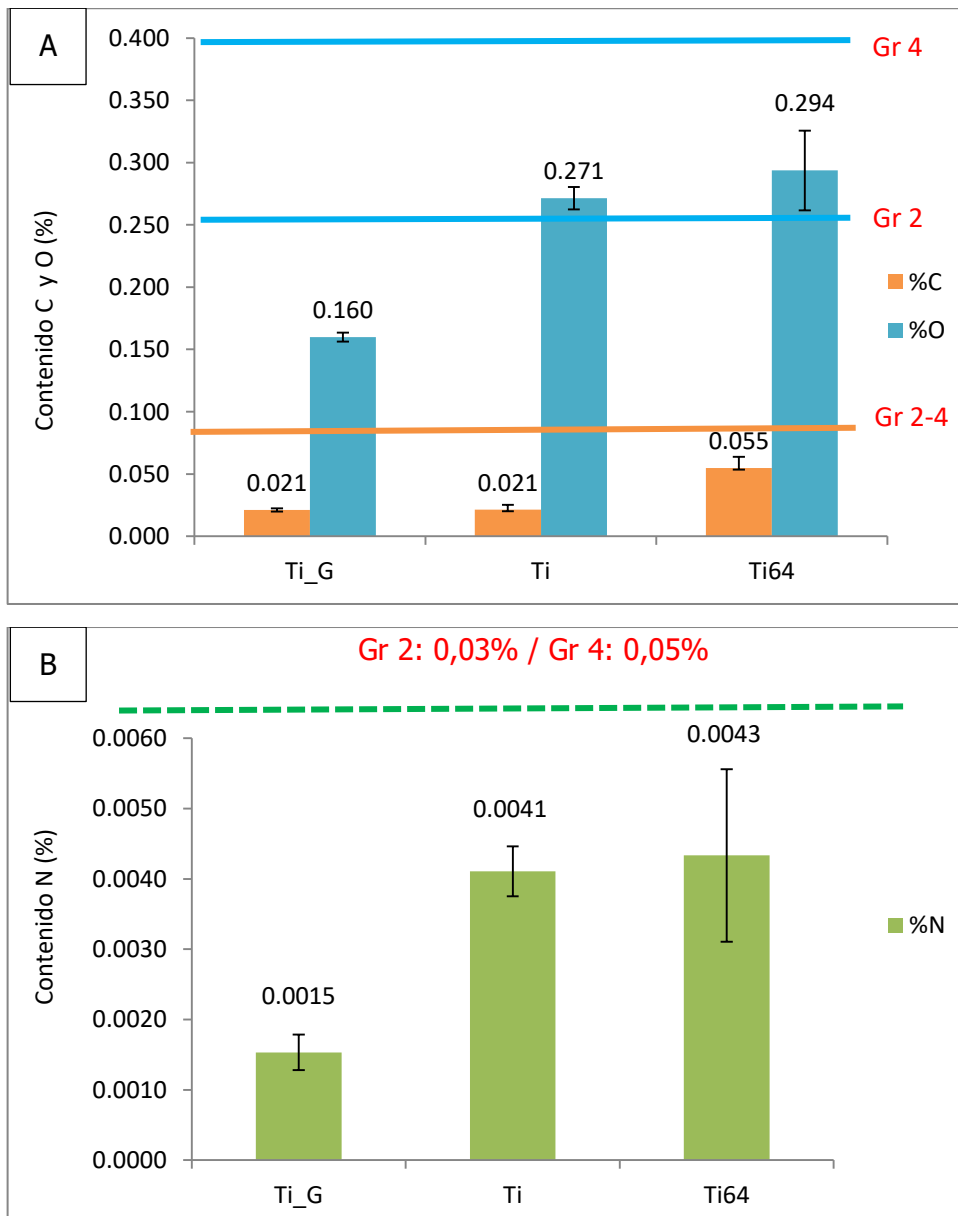


Figura 8.4 Análisis cuantitativo (% en peso) con un equipo LECO de los elementos intersticiales presentes en los polvos de titanio: A) contenido de C y O y B) contenido de N.

Los resultados de los análisis EDS confirman que Ti_G y Ti son polvos de titanio comercialmente puro mientras que el Ti64 se trata de polvo prealeado de Ti6Al4V.

Como se ha comentado en el capítulo 2 es necesario tener un control de los elementos intersticiales C, O y N; sin embargo, en la práctica el nitrógeno no tiene tanta importancia ya que en presencia de oxígeno este prácticamente no difunde. Tal y como se observa en el gráfico de la figura 8.4 B los niveles de N están muy por debajo de los límites de la norma para titanio de aplicaciones quirúrgicas (ASTM F67-06). A pesar de estos valores tan bajos, se puede distinguir una clara diferencia entre los polvos finos (Ti y Ti64) y el polvo grueso (Ti_G), en donde los finos se difunde mayor contenido de N, lo mismo ocurre con el O (figura 8.4 A). Cuanto menor es el tamaño de partícula mayor es el área superficial y difunde mayor cantidad de intersticiales N y O [331].

La norma ASTM F67-06 establece que para un titanio grado 2 y grado 4 (grado médico) se permiten contenidos en oxígeno de hasta 0,25 y 0,40% (en masa) respectivamente [174].

Como se observa en la figura 8.4, el polvo Ti_G está dentro de los límites del grado 2, mientras que los polvos más finos Ti y Ti64 han de ser considerados grado 4, aun así, todos los polvos son válidos. Sin embargo, se ha de tener en cuenta que se parte de un alto contenido de intersticiales (dentro de normativa para producto médico) y que a nivel industrial se debería llevar a cabo ciertas correcciones como por ejemplo empaquetar los polvos en argón o en alto vacío evitaría la oxidación de los mismos, al igual que una manipulación en atmósfera controlada (Inert Glove Box).

Respecto al contenido de C, no hay diferencias significativas entre polvos de diferente granulometría: el polvo Ti_G y el Ti presentan los mismos valores de C pese a la diferencia de tamaño de partícula. El polvo Ti64 muestra un porcentaje más elevado respecto a los otros dos, pero sigue estando dentro los límites de grado médico ($< 0,08\%$ C). En el análisis cualitativo mediante EDS (Figura 8.3) se detectaron picos de C en todos los polvos, sin embargo, el análisis cuantitativo ha confirmado que se trata de contaminación superficial ya que todos los polvos presentan valores de C aceptados por la norma.

8.1.1.2 Distribución de tamaños de partícula

A continuación, se presentan los resultados de granulometría de los polvos, obtenida por tamizado, análisis de imagen y difracción láser. En el apartado 3.2.1.2 de materiales y métodos se describen las técnicas de caracterización.

Granulometría por tamizado

En la figura 8.5 se representa el % en masa diferencial (gráfico de barras azul) y acumulado (curva roja) para diferentes rangos de tamaños. A partir de los gráficos obtenidos se han calculado los valores de granulometría D_{10} , D_{50} , y D_{90} (descritos en el apartado 3.2.1.2 de materiales y métodos) recogidos en la tabla 8.2.

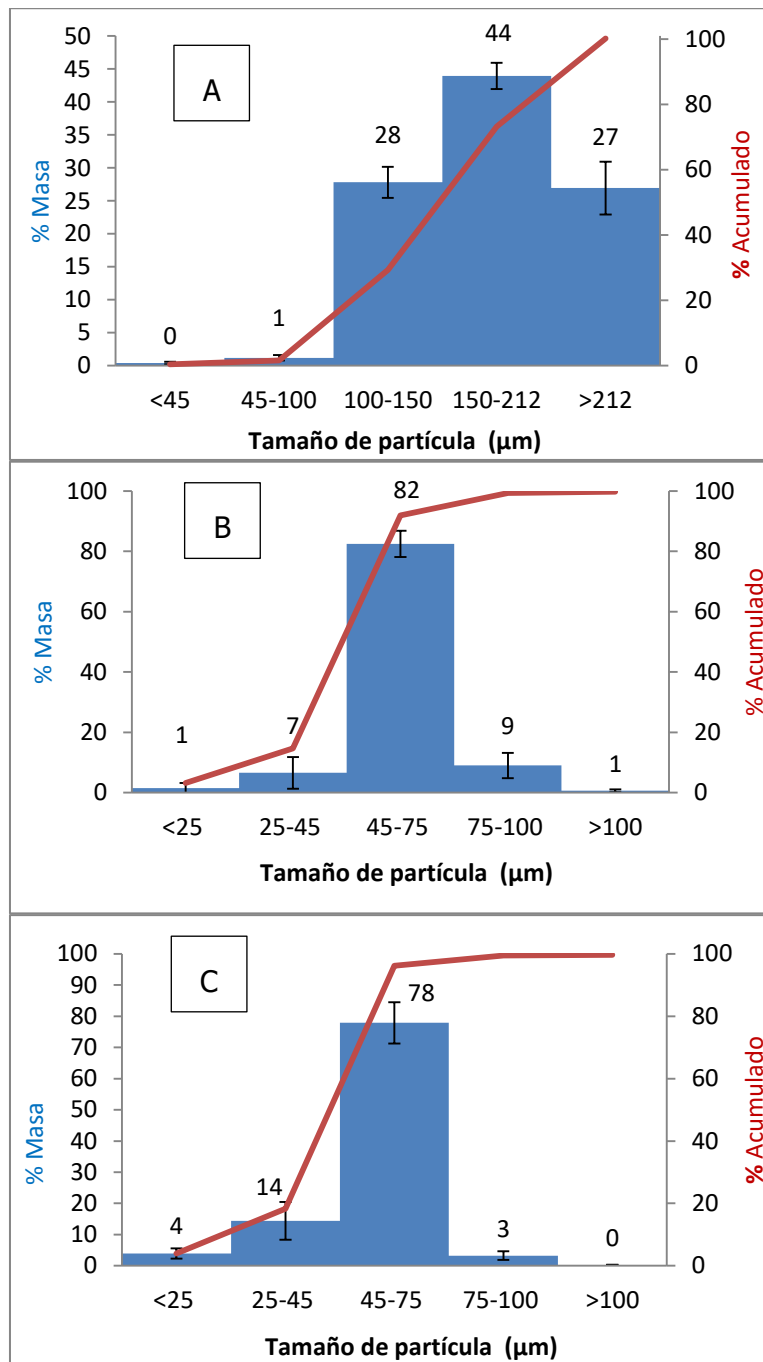


Figura 8.5 Distribución del % en masa y % masa acumulada para diferentes rangos de tamaños de partícula A) Ti_G, B) Ti y C) Ti64, medido por tamizado.

Tabla 8.2 Distribución de tamaño de partícula obtenida por tamizado de los polvos de titanio.

	D₁₀ (µm)	D₅₀ (µm)	D₉₀ (µm)
Ti_G	115	180	330
Ti	37	60	74
Ti64	33	60	73

Los resultados muestran como el polvo Ti_G tiene una distribución de partículas de mayor tamaño, siendo el valor (D_{50}) de 180 μm , mientras que para los polvos Ti y Ti64 es de 60 μm .

Granulometría por análisis de imagen.

Analizando las micrografías SEM mediante el software ImageJ, se han obtenido los histogramas de la distribución de tamaños de partículas por rangos (Figura 8.6), a partir de los cuales se han calculado los valores de granulometría D_{10} , D_{50} , y D_{90} recogidos en la tabla 8.3.

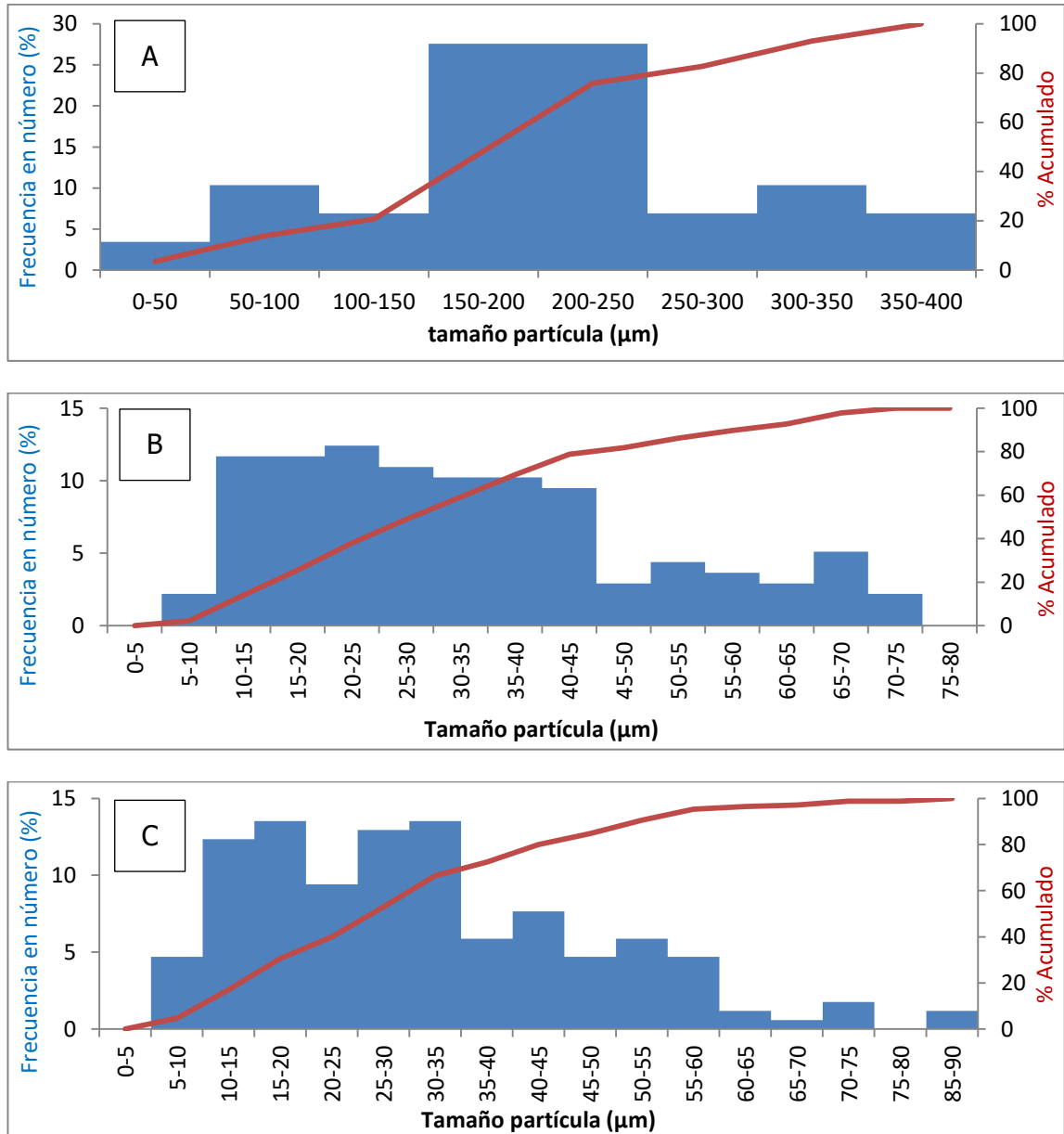


Figura 8.6 Histograma de distribución del tamaño de partícula y curva de frecuencia acumulada de los polvos A) Ti_G, B) Ti y C) Ti64.

Tabla 8.3 Distribución de tamaño de partícula obtenida por análisis de imagen de los polvos de titanio.

	D₁₀ (µm)	D₅₀ (µm)	D₉₀ (µm)
Ti_G	82	200	335
Ti	13	31	60
Ti64	12	30	55

Los resultados del análisis de imagen, recogidos en la tabla 8.3, confirman que el polvo Ti_G tiene un tamaño de partícula mayor respecto a los otros polvos. En cuanto a los polvos de granulometría más fina (Ti y Ti64) no hay prácticamente diferencia entre ellos, coincidiendo también con los resultados anteriores. Sin embargo, en los valores de D₁₀ y D₅₀ sí que hay diferencias entre ambas técnicas, siendo más bajos para el análisis de imagen. Los polvos finos tienden a aglomerarse debido a cargas electrostáticas [332], siendo esto una de las limitaciones del análisis por tamizado [242]. Por lo tanto, cuanto mayor es el tamaño de partícula menos diferencias hay entre ambas técnicas ya que el efecto de los aglomerados disminuye. Cuanto más pequeñas son las partículas de polvo más diferencias se observan en los valores de D₁₀ y D₅₀.

No obstante, también hay que tener en cuenta que con la técnica de análisis de imagen el tamaño de la muestra analizada es mucho menor, ya que sólo se analiza una porción muy pequeña del polvo (del orden de mg) mientras que con el tamizado se pueden analizar cientos de gramos. En consecuencia, es conveniente realizar otro análisis del polvo mediante difracción láser y comparar todos los resultados.

Granulometría por difracción láser.

En la figura 8.7 se presentan los gráficos de la distribución del tamaño de partículas de cada polvo (Ti_G, Ti y Ti64) analizado mediante la técnica de difracción láser, así como los valores D₁₀, D₅₀ y D₉₀.

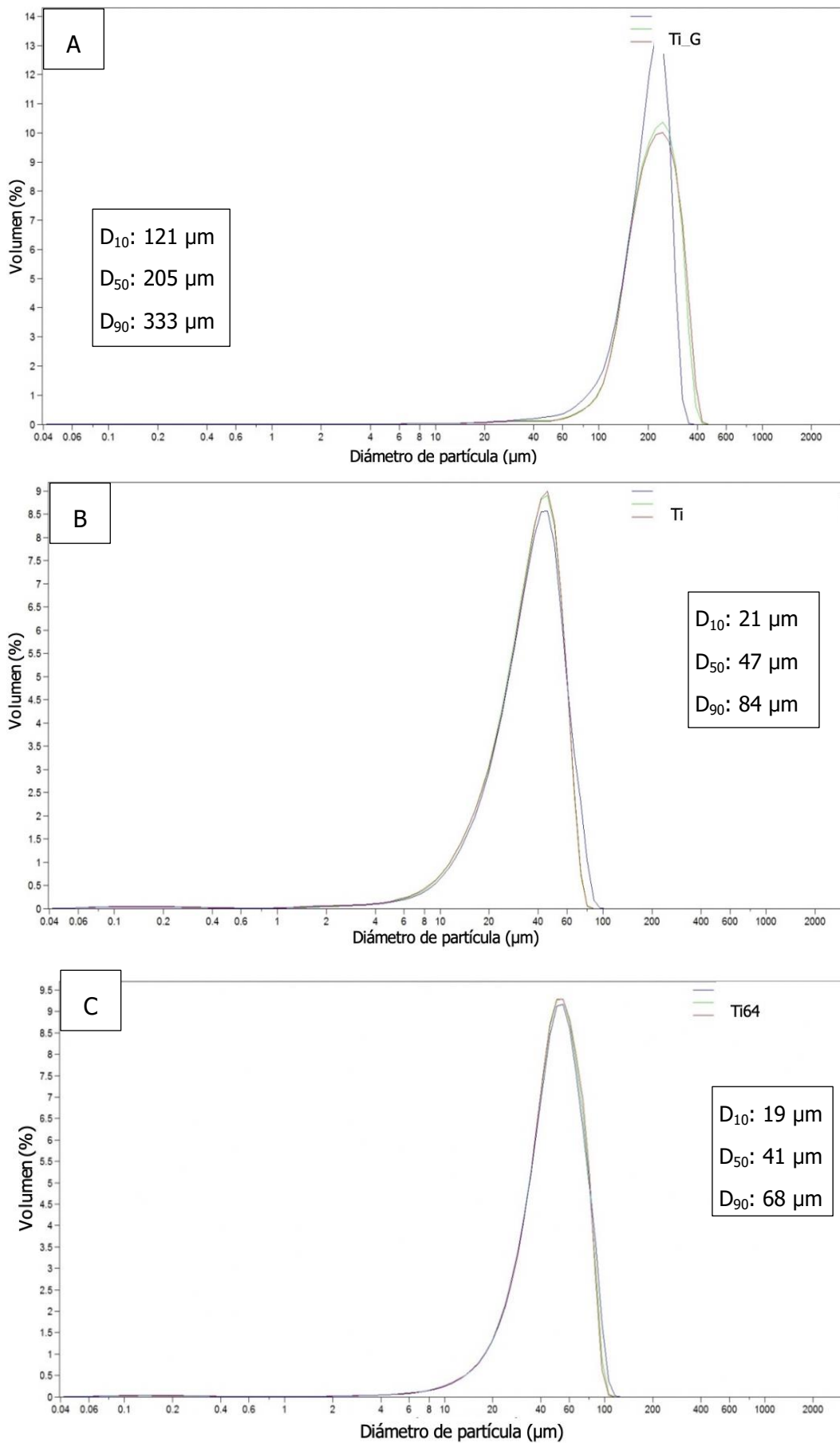


Figura 8.7 Distribución del tamaño de partícula de los polvos A) Ti_G, B) Ti y C) Ti64.

Anexos

En la figura 8.7 se observa como el polvo Ti_G presenta una distribución de tamaños de partícula superior a los polvos Ti y Ti64, el 10% de las partículas tienen un diámetro inferior a 121 μm (D_{10}), el 90% inferior a 333 μm (D_{90}), y el tamaño medio (D_{50}) es de 205 μm . Los polvos Ti y Ti64 presentan un tamaño medio similar (47 μm y 41 μm) que se aproxima al especificado por el proveedor (44 μm , tabla 8.1); sin embargo, el polvo Ti tiene más porcentaje de partículas con un tamaño superior; el 90% de las partículas de polvo Ti son inferiores a 84 μm (D_{90}), mientras que el 90% de las partículas de Ti64 son inferiores a 68 μm .

Comparación de resultados obtenidos con las diferentes técnicas

Para poder comparar resultados de los diferentes métodos de análisis, en la tabla 8.4 se recogen los valores de granulometría (D_{10} , D_{50} y D_{90}) obtenidos mediante tamizado, análisis de imagen y difracción.

Tabla 8.4 Distribución de tamaño de partículas según el método de análisis.

	Tamizado			Análisis de imagen			Difracción láser		
	D_{10}	D_{50}	D_{90}	D_{10}	D_{50}	D_{90}	D_{10}	D_{50}	D_{90}
Ti_G (μm)	115	180	330	82	200	335	121	205	333
Ti (μm)	37	60	74	15	31	60	21	47	84
Ti64 (μm)	33	60	73	12	30	55	19	41	68

Todos los resultados de la tabla 8.4 coinciden en que el polvo Ti_G tiene una granulometría más gruesa en comparación a los otros polvos, y que no hay diferencias en tamaño medio ni en la distribución de tamaño partícula de los Ti y Ti64, únicamente en difracción láser el D_{90} del polvo Ti es ligeramente superior.

Según las especificaciones de los proveedores (tabla 8.1) el tamaño medio del polvo Ti_G se sitúa entre 250-105 μm , coincidiendo con los resultados de todas las técnicas de medida, por lo que cualquiera es apta para validar el polvo. La granulometría por tamizado es la manera más económica, rápida y sencilla de caracterizar el polvo, además de analizar más cantidad de muestra por lo que el resultado es aún más fiable [332], [242], por lo tanto, para el polvo grueso es suficiente este método. Para los polvos Ti y T64 (finos) la técnica que más se aproxima a las especificaciones del proveedor (44 μm) es la difracción láser; por lo tanto, el tamizado y análisis de imagen pueden ser útiles para comparar entre diferentes polvos, pero para validar el tamaño medio y la distribución de tamaño de partícula de un polvo fino (~ 44 μm) la técnica más adecuada será la difracción láser.

8.1.1.3 Fluidez

Para poder validar y seleccionar el polvo de partida no es suficiente conocer las características principales como la composición, morfología, y distribución de tamaño de partícula. También es necesario conocer el comportamiento del polvo durante su procesado, es decir, saber si es posible obtener una tinta que pueda ser inyectada y procesada. Con tal fin se ha evaluado la fluidez e inyectabilidad de los tres tipos de polvo de Titanio.

En el apartado 3.2.1.1 de materiales y métodos se detalla el método para la caracterización de la fluidez de los polvos. En la tabla 8.5 se recogen los resultados del ensayo.

Tabla 8.5 Fluidez de los polvos de titanio.

	Fluidez Hall (s/50 g)	Fluidez Carney (s/50 g)
Ti_G		17.8
Ti	No fluye	No fluye
Ti_64	No fluye	No fluye

Como era de esperar, los polvos Ti y Ti64 no fluyen, ya que son polvos irregulares y de granulometría fina. Por otra parte, el polvo Ti_G sí fluye ya que, a pesar de no ser esférico, el tamaño medio de partícula es mucho mayor y cuanto más grandes son las partículas del polvo la fluidez mejora [241]. Según estos resultados los polvos Ti y Ti64 no serían indicados para tecnologías basadas en lecho de polvo tipo laser sintering o binder jetting, ya que es necesario que el polvo fluya para que pueda ser dispensado y esparcido con facilidad [115], [240], [241]. Sin embargo, podrían ser utilizados en la tecnología de impresión de pasta si éstos son inyectables.

8.1.1.4 Inyectabilidad de los polvos

Polvos Ti y Ti64

Uno de los requisitos imprescindibles que ha de cumplir un polvo para ser utilizado en la tecnología propuesta es presentar una inyectabilidad adecuada para obtener componentes. Para ello se fabricaron tintas estándar, según una formulación básica (3 g de polvo de Ti y 2 g de hidrogel de Pluronic al 30%, apartado 3.3.1 de materiales y métodos) desarrollada en anteriores proyectos [249], [250], y se llevó a cabo un ensayo de inyectabilidad, tal y como se describe en el método experimental (apartado 3.3.4.1 de materiales y métodos). En este ensayo se registra la fuerza necesaria para desplazar el pistón que empuja y extruye el material, obteniendo así las curvas de inyectabilidad (gráfica carga(N) / desplazamiento (mm)). Se realizaron 4 ensayos para cada tipo de tinta.

Las curvas obtenidas para las tintas fabricadas con polvos de granulometría fina, Ti y Ti_64, utilizando condiciones estándar de impresión (apartado 3.3.4.2 de materiales y métodos) se muestran en la figura. 8.8.

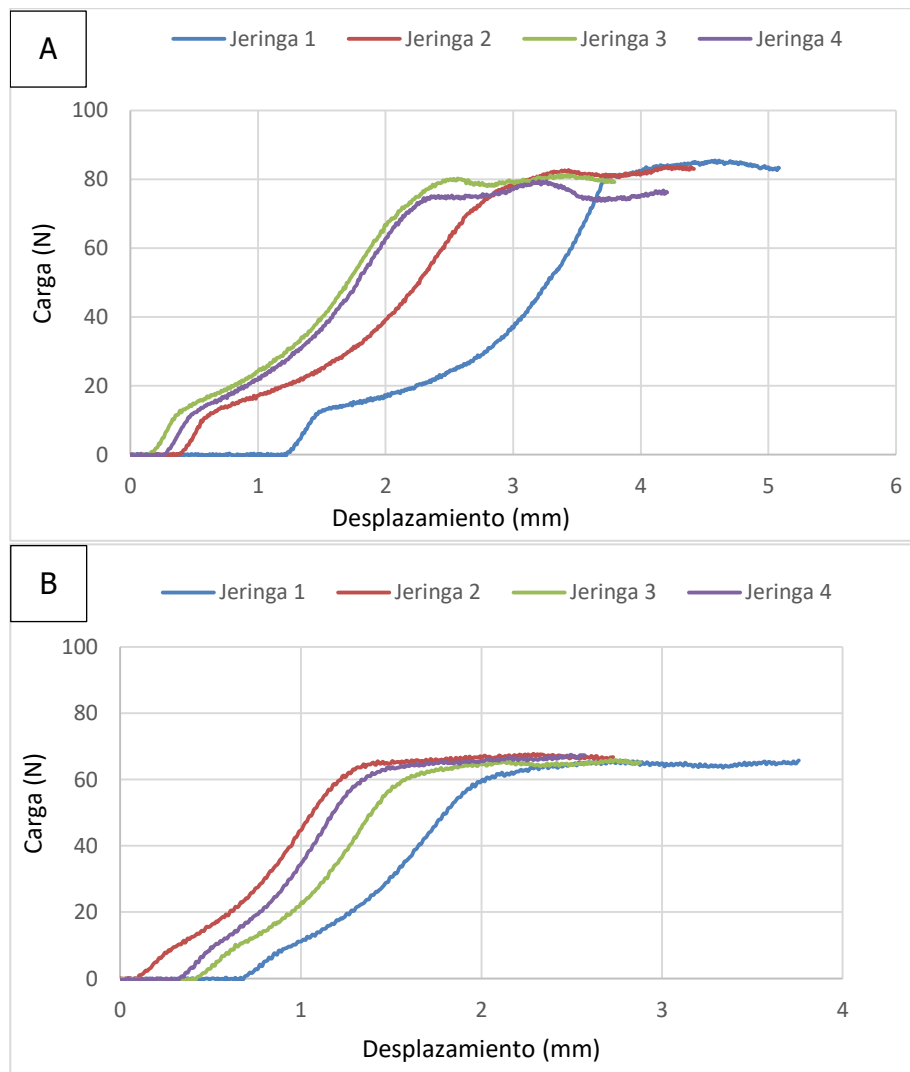


Figura 8.8 Curvas de inyectabilidad de las tintas fabricadas con los polvos A)Ti y B) Ti64.

El gráfico de inyectabilidad muestra como las tintas fabricadas con los polvos Ti y Ti64 se pueden inyectar bajo las mismas condiciones de impresión 3D (parámetros del ensayo), las tintas se extruyen durante más de 2 mm de desplazamiento de pistón, por lo que se considera que el porcentaje de inyectabilidad es el adecuado, ya que extruyen la cantidad suficiente como para imprimir una pieza estándar. A partir de los datos del ensayo de inyectabilidad se obtiene la carga máxima y la fuerza de impresión 3D (figura 8.9).

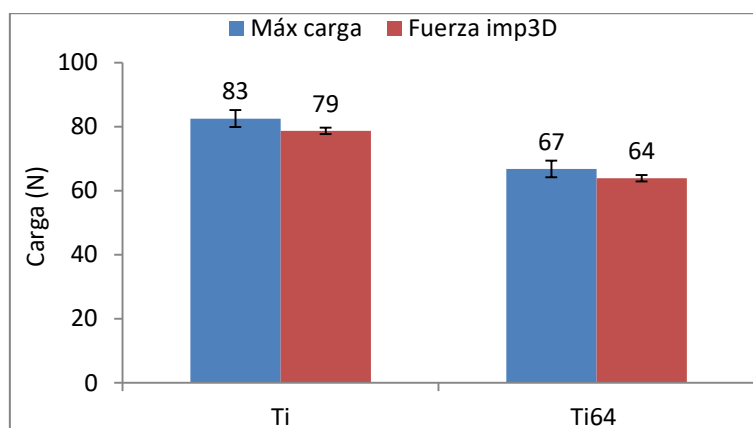


Figura 8.9 Carga máxima y fuerza de impresión 3D de cada tinta.

Como se observa en el gráfico (Figura 8.9), en el caso de los polvos de menor granulometría, Ti y Ti64, no ha sido necesario aplicar cargas excesivas para poder inyectar las tintas, no hay diferencias considerables entre carga máxima y fuerza de impresión y no hay una gran dispersión de resultados; por lo tanto, ambos polvos son válidos para la tecnología propuesta (DIW o 3DF).

Polvo Ti G

Respecto al polvo Ti_G, no se tenía información ni experiencia previa sobre la utilización de polvos de granulometría gruesa para la fabricación de tintas y extrusión 3D. Por lo tanto, se realizaron ensayos preliminares con diferentes puntas (tabla 3.7, apartado 3.3.4.1 de materiales y métodos) para conocer a partir de que diámetro de boquilla es posible inyectar la tinta, y a continuación se realizó el ensayo de inyectabilidad.

Con las puntas metálicas y cónicas de menor diámetro (0,61 y 0,58 mm) no ha sido posible extruir. Con las de diámetro 0,84 mm (verdes) tampoco es posible ya que se aprecia claramente el fenómeno de filtración, es decir, a medida que se aplica carga las partículas empiezan a aglomerarse y se separa la fase líquida (ligante) del polvo (figura 8.10). Por lo tanto, los ensayos de inyectabilidad para validar el polvo Ti_G se realizaron con puntas de diámetros superiores a 1mm. Los resultados se presentan en las figuras 8.11 y 8.12

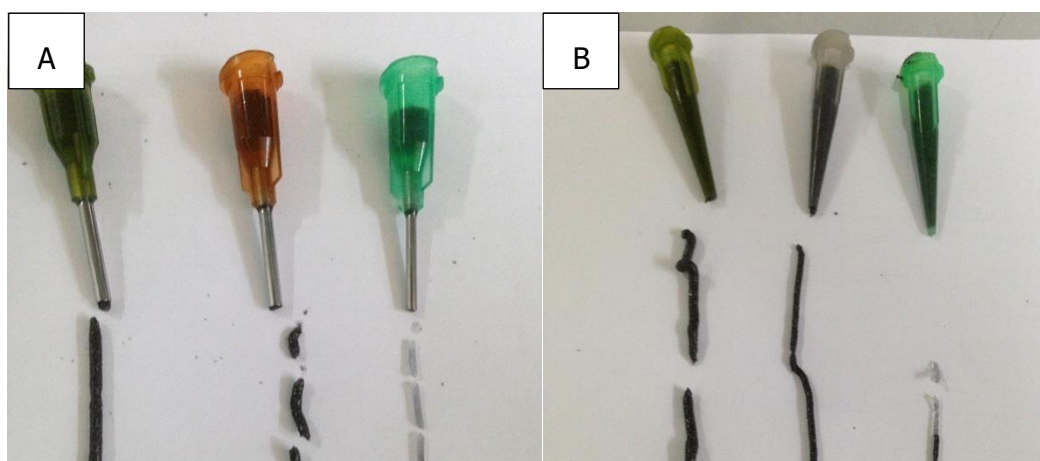


Figura 8.10 Resultados de la inyectabilidad del polvo Ti_G con: A) Puntas dosificadoras metálicas y B) puntas cónicas.

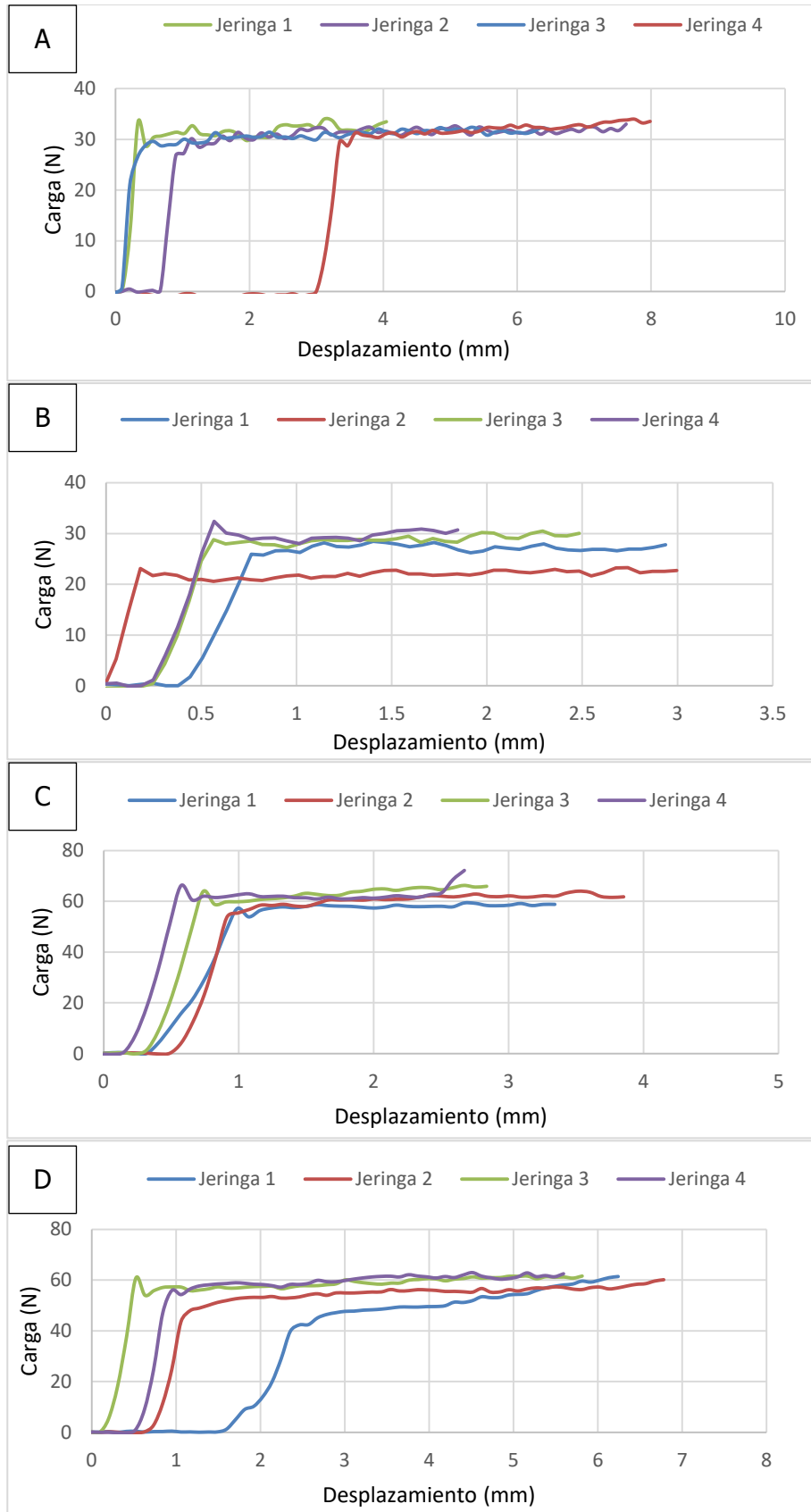


Figura 8.11 Curvas de inyectabilidad de la tinta de Ti_G con las puntas: A) cónica 1.6 mm, B) cónica 1.19 mm C) metálica 1.36mm y D) metálica 1.54m.

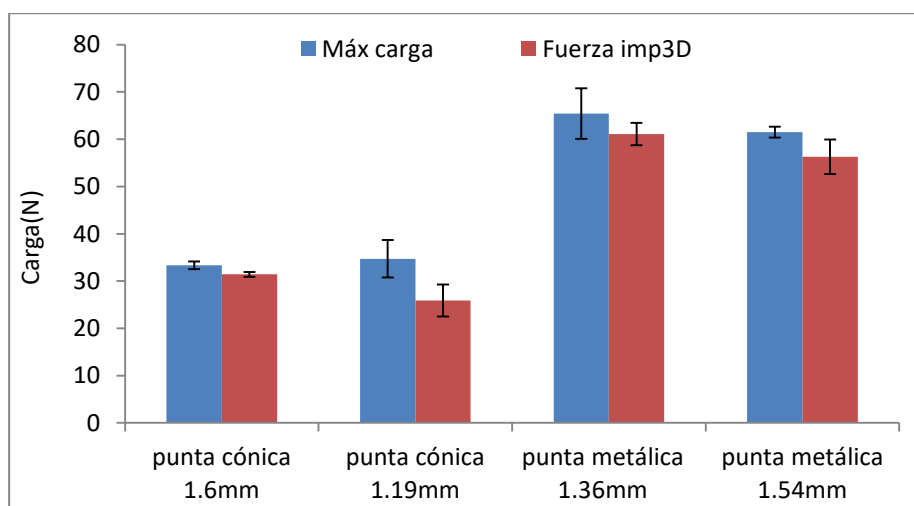


Figura 8.12 Carga máxima y fuerza de impresión 3D de la tinta de Ti_G para las diferentes puntas dosificadoras.

Los resultados indican que la tinta fabricada con el polvo Ti_G se puede inyectar bajo las condiciones de impresión 3D estándar con cualquiera de las puntas utilizadas, siendo la punta cónica de 1.19 mm la punta de menor diámetro de boquilla con la que se puede trabajar.

Se observa una diferencia evidente entre los dos tipos de puntas, las puntas metálicas requieren de más carga para poder inyectar la tinta, esto es debido a que la boquilla es más alargada y de sección constante (figura 8.10 A), mientras que el diseño de las puntas cónicas favorece el flujo de fluidos viscosos y aumenta el caudal, lo que permite disminuir la fuerza de extrusión. El efecto Venturi establece que el paso del fluido por un estrechamiento produce una reducción de presión y la diferencia de presión produce la fuerza necesaria para acelerar el fluido, este hecho justifica el por qué las puntas cónicas permiten extruir aplicando menor carga que en el caso de las metálicas. Conviene recordar que en el efecto Venturi se aplica la ecuación de Bernoulli, y si hay viscosidad, como es el caso de las tintas, la ecuación de Bernoulli no se cumple pues se pierde presión entre dos secciones del tubo debido a la fricción [333]. Por otra parte, la ley de Poiseuille relaciona el caudal con la caída de presión debida a la viscosidad y explica mejor el efecto del diseño [334]. La ecuación de Hagen-Poiseuille es:

$$Q = \frac{(p_1 - p_2)\pi R^4}{8\eta L}$$

Donde Q es el volumen de flujo por unidad de tiempo, $P_1 - P_2$ es la diferencia de presiones en los extremos del tubo, R es el radio interno del conducto, η es la viscosidad dinámica del fluido y L es la longitud del cilindro. Según la ecuación, cuanto mayor diferencia de presiones y menor longitud de conducto mayor caudal, por ese motivo el diseño de las puntas cónicas favorece la extrusión de las tintas.

[Redacted text block]

[Redacted Title]		
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

[Redacted text block]



[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted title]

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

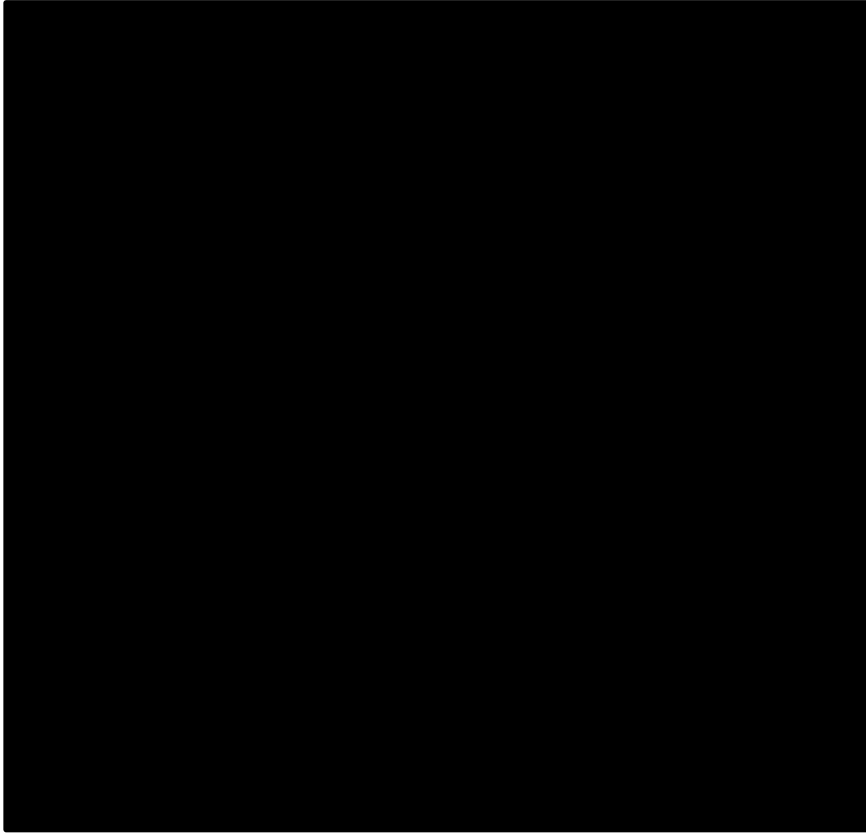
[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted text block]



[Redacted text line]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]



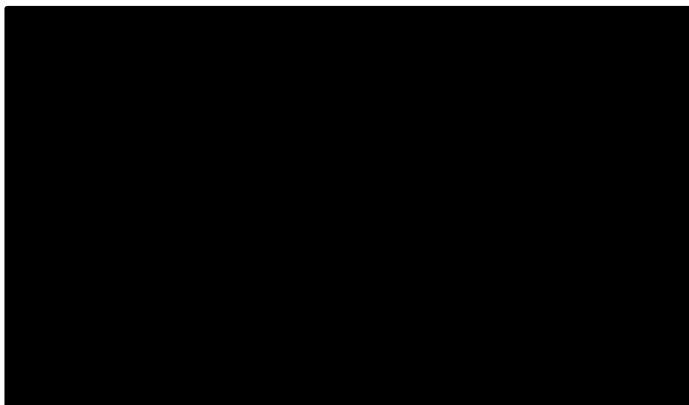
[Redacted]

Dependencia de parámetros de impresión
[Redacted]

Temperatura (Frío):
[Redacted]

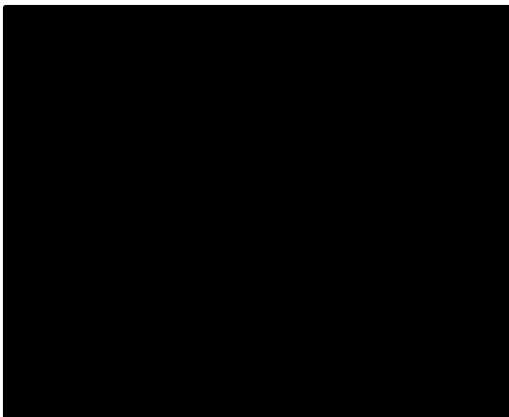
Humedad Relativa (%HR):
[Redacted]

[Redacted text block]



[Redacted text block]

Adherencia al plato: [Redacted text block]



[Redacted text block]

Tiempo de manipulación: [Redacted text block]

Poca consistencia y resistencia en verde:

[Redacted text block]

Material de soporte:

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

8.1.3 Estudios previos de procesado en verde

Para poder conocer realmente las limitaciones e inconvenientes de un proceso novedoso es necesario llevarlo a cabo y valorar el resultado. De esta manera se puede evaluar mejor el grado de importancia de un problema y/o detectar alguno no previsto. Por este motivo, se realizaron pruebas preliminares imprimiendo muestras estándar con la tinta base Pluronic (Ti/Plur30%) para estudiar el proceso de secado y de eliminación de ligante.

8.1.3.1 Secado

Se estudiaron diferentes factores (detallados en la tabla 3.10 de materiales y métodos) para conocer la influencia sobre el secado y poder implementar un proceso de evite las distorsiones (pandeo) en las piezas tipo cuña veterinaria figura 8.24.

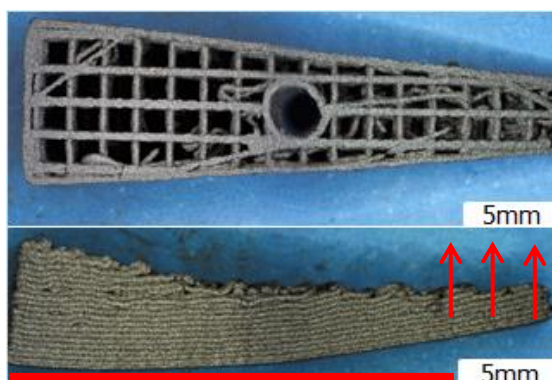


Figura 8.24 Ejemplo de distorsión tras el secado de una muestra porosa (80%) tipo cuña veterinaria.

Como se puede ver en la imagen, hay una gran distorsión en la cuña veterinaria tras el proceso de secado. El extremo de la cuña, en donde la relación superficie /altura es mayor, se deforma de manera evidente en dirección contraria a la zona de apoyo (figura 8.24). Este defecto es muy común en impresión 3D, tanto en filamento como en pastas, y se conoce como "warping". Normalmente tiene lugar durante la impresión, en las piezas que tienen mucha superficie, los extremos se deforman separándose del plato. Se suele solucionar cambiando parámetros y condiciones de impresión, como, por ejemplo, imprimiendo sobre un soporte tipo balsa o falda (parámetro conocido como *brim*), o bien calentando la cama de impresión. Ren y colaboradores [131], estudiaron la influencia de la temperatura del plato de impresión sobre la deformación de la pieza en verde, y observaron que a 90°C se evitaba el warping. En estos casos el calentamiento del sustrato resulta efectivo ya que como aglutinante se utilizan polímeros termoplásticos, que se funden para poder ser extruidos. Por lo tanto, al calentar a temperaturas cercanas a la temperatura de transición vítrea (T_g) del polímero se reduce la acumulación de tensiones internas [345].

En el método de extrusión 3D desarrollado no es necesario llegar a la temperatura de fusión (T_m) del polímero para inyectar las tintas, por lo que el mecanismo de deformación (warping) durante el secado es diferente. No es debido al enfriamiento, sino a la pérdida de disolvente (en este caso agua). Por lo tanto, primero se evaluó el efecto de la temperatura, se secaron

Anexos

muestras en frío (dentro de una nevera a 10°C), a temperatura ambiente y en caliente (dentro de estufa a 40°C y 50°C), observándose distorsiones en todos los casos (figura 8.24).

Al no reducir la distorsión con factores externos (temperatura) se optó por modificar la propia pieza, se bajó la porosidad de 80% a 50% y se aumentó un 20% la altura. La suma de estas dos modificaciones permitió reducir el grado de pandeo de las muestras (figura 8.25).

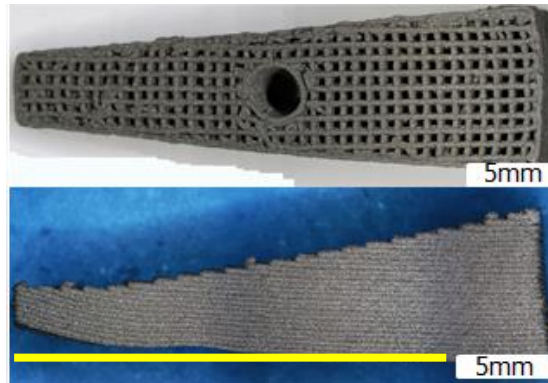


Figura 8.25 Muestra porosa (60%) sobredimensionada en el eje Z (20%) ligeramente distorsionada tras el secado overnight a temperatura ambiente.

En la imagen de la figura 8.25 se aprecia una leve deformación en la punta de la cuña tras el secado. Sin embargo, el grado de pandeo es bastante menor en comparación con la muestra de la figura 8.24. Al aumentar altura y reducir porosidad hay más volumen de material en la superficie, lo que provoca que las tensiones internas generadas en el secado deformen menos la pieza.

Cambiar parámetros como la altura y la porosidad no es una solución definitiva y no en todas las piezas se tiene libertad de diseño. Por lo tanto, se valoraron otras alternativas, como por ejemplo la impresión con estructuras de soporte (figura 8.26) o de sacrificio (posteriormente se han de eliminar, bien en verde o tras el sinterizado), algo muy utilizado en la mayoría de técnicas de fabricación aditiva.

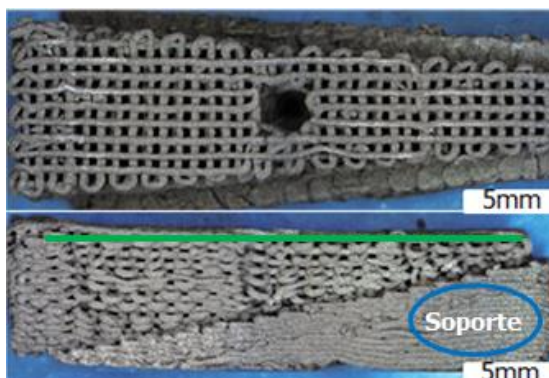


Figura 8.26 Muestra porosa tipo cuña veterinaria impresa sobre una estructura de soporte

En la imagen se puede ver como la estructura de soporte impide que se produzcan distorsiones durante la etapa de secado. Sin embargo, como se comentó en el apartado anterior la tinta base Pluronic no tiene suficiente resistencia en verde por lo que eliminar el soporte sin comprometer la integridad de la pieza no resulta sencillo.

8.1.3.2 Eliminación del aglutinante Pluronic

Estudio del comportamiento térmico mediante TGA

Se realizó un análisis termogravimétrico calentando polvo de Pluronic, desde 20°C hasta 520°C a una velocidad de calentamiento de 5°C/min, con el fin de conocer la temperatura a la que se consigue eliminar el polímero. En la figura 8.27 se presentan los resultados.

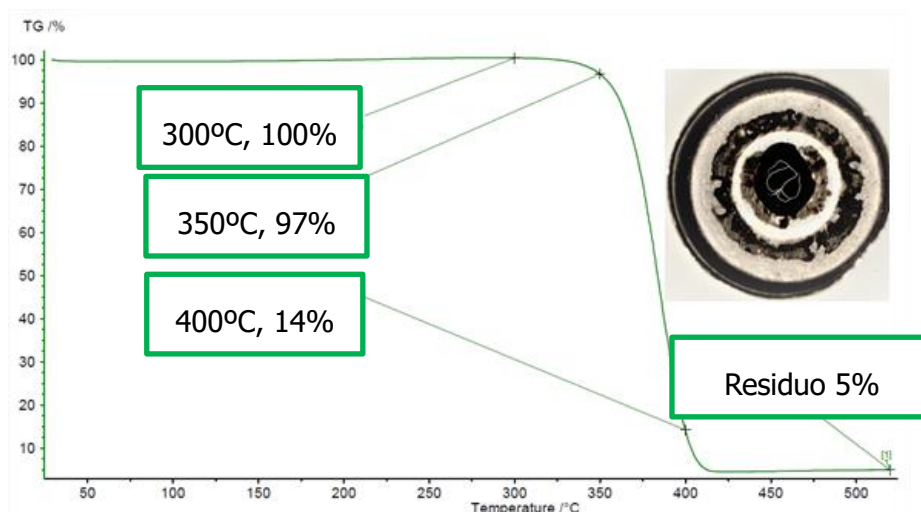


Figura 8.27 Análisis termogravimétrico del polvo de Pluronic (5°C/min hasta 520°C)

Como se puede ver en el gráfico, el mayor porcentaje de pérdida de masa se produce entre 350°C y 400°C; a 300°C hay un 100% de masa, a 350°C se inicia la eliminación con un 97% y a 400°C solo queda un 14%. Por lo tanto, la eliminación se debería llevar a cabo en este rango de temperaturas. Cabe destacar que tras la finalización del ensayo (a 520°C) no se

Anexos

consigue eliminar todo el polímero, quedando un 5% de residuo. Se realizó otro ensayo calentando a 30°C/min hasta 300°C e isoterma 4h (figura 8.28). De esta manera se estudia el efecto del tiempo, y se valora la posibilidad de bajar la temperatura de eliminación. Para evitar la oxidación del polvo de titanio presente en la tinta interesa eliminar el hidrogel de Pluronic a una temperatura inferior a 300°C.

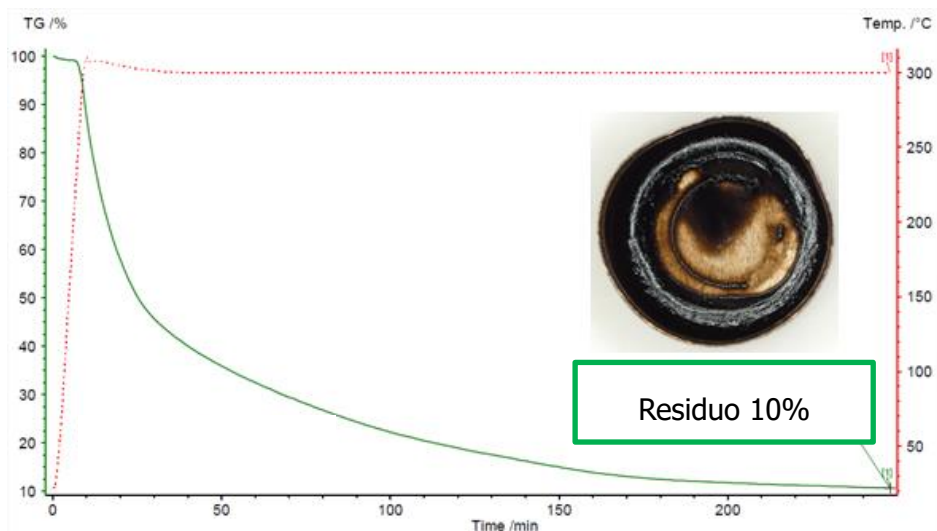


Figura 8.28 Análisis termogravimétrico de polvo de Pluronic a una temperatura constante de 300°C (velocidad de calentamiento 30°C/min).

El gráfico muestra que a 300°C es posible eliminar la mayor parte del Pluronic, quedando un 10% de residuo.

Optimización del tratamiento térmico de eliminación del ligante Pluronic

Sabiendo que a 300°C es posible eliminar gran parte del polímero, se decidió replicar el ensayo a escala laboratorio sobre muestras impresas obtenidas con tinta base Pluronic (Ti/PLUR30%). Se realizaron tratamientos térmicos a diferentes tiempos (12, 24 y 72h) para evaluar el grado de contaminación de las muestras una vez finalizado el tratamiento. Para ello se midió el porcentaje de carbono mediante un analizador elemental por combustión (LECO SC832). En la figura 8.29 se muestran los resultados.

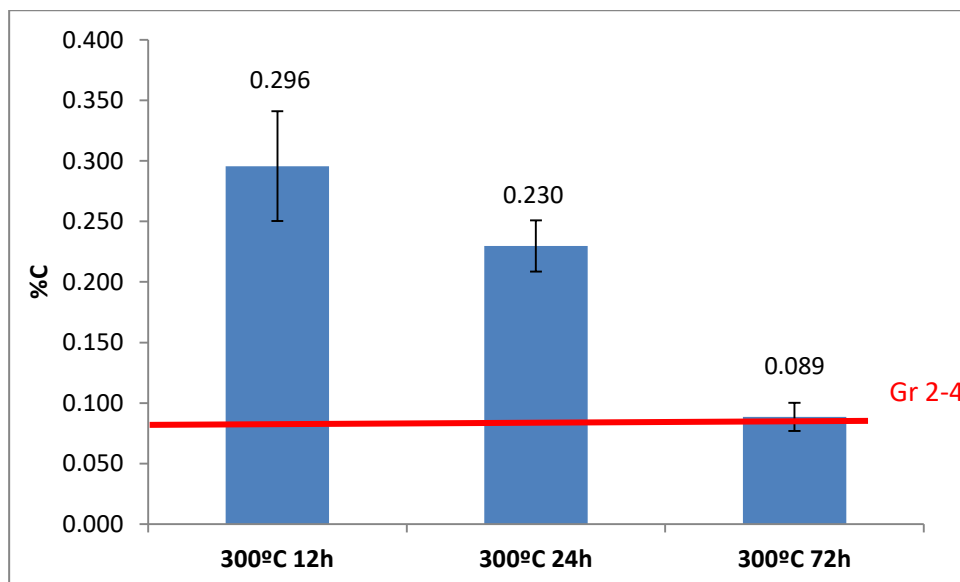


Figura 8.29 %C de las muestras tras los diferentes tiempos de tratamiento térmico.

El %C es un parámetro que sirve para verificar la completa eliminación del polímero sin contaminación. El polvo de titanio utilizado tiene alrededor de un 0,021%C, por lo tanto, si la eliminación es correcta, las muestras deberían presentar valores cercanos. En el gráfico de la figura 8.29 se puede ver como no es posible eliminar el polímero completamente sin contaminar algo las muestras. A pesar de esto, con el ciclo térmico de 300°C y 72h se obtienen valores de carbono muy cercanos a los permitidos por las normas aplicables a los productos objeto de desarrollo (<0,08%, norma ISO 5832-:1999 y ASTM F67-06).

Tanto en la etapa de secado como en la de eliminación se evidenció la necesidad de reformular la tinta. Se han mejorado las etapas hasta cierto punto, se ha reducido la distorsión utilizando estructuras de soporte y se ha conseguido eliminar el polímero obteniendo valores de %C muy próximos a los permitidos. Sin embargo, la principal limitación y margen de mejora radicaba en la composición de la tinta.

8.1.4 Estudios previos de sinterizado

8.1.4.1 Control dimensional y acabado superficial tras el sinterizado

En este apartado se estudiaron diferentes factores y condiciones que influyen en la distorsión de las piezas durante el sinterizado. Además, se valoraron tratamientos de mecanizado para obtener la pieza con las características dimensionales y el acabado deseado. Se escogió la cuña veterinaria como "Gold standard" de pieza a fabricar, para conseguirlo se llevaron a cabo diferentes pruebas. En la tabla 8.8 se identifican las condiciones y características de las muestras fabricadas hasta optimizar el proceso. En el apartado 3.6.1 de materiales y métodos se explica con mayor detalle cada una de las condiciones de la tabla.

Tabla 8.8 Identificación de las muestras fabricadas

ID	Sinterizado	Porosidad	Diseño	Mecanizado
V1	Normal	Alta	Cuña Veterinaria	No
V2	Normal	Alta	Cuña Veterinaria	Desbaste
V3	Normal	Estándar	Cuña Veterinaria	No
V4	Normal	Estándar	Cuña Veterinaria	Desbaste
V5	Al revés	Estándar	Cuña Veterinaria	No
V6	Al revés	Estándar	Cuña Veterinaria sobredimensionada	Corte
V7	Al revés	Estándar	Cuña Veterinaria sobredimensionada	Desbaste
V8	Al revés	Estándar	Cuña Veterinaria sobredimensionada	Desbaste en verde

En la imagen de la figura 8.30 se presenta la primera prueba de fabricación, la cuña V1.

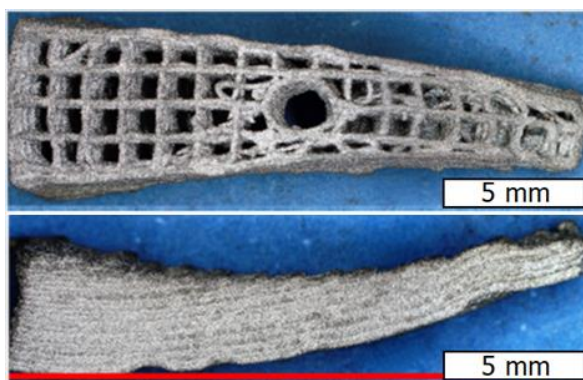


Figura 8.30 Cuña V1. Sinterizada a 1350°C, porosidad 80%, sin sobredimensionar ni mecanizar.

Se observa como hay una gran distorsión tras el proceso de sinterización la zona con menor concentración de material se deforma más. La cuña ha perdido la geometría inicial, ha adquirido una forma curva perdiendo la planitud de la zona inferior. Con el fin de corregir las distorsiones, conseguir mayor planitud y un mejor acabado se realizó un desbaste con papel abrasivo de carburo de silicio de 120p, obteniendo la cuña V2 de la figura 8.31.

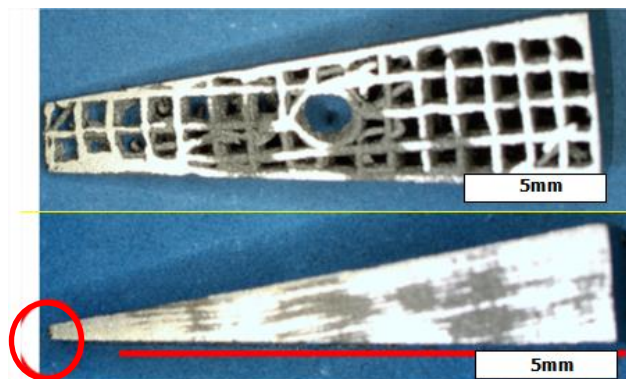


Figura 8.31 Cuña V2. Sinterizada a 1350°C, porosidad 80%, sin sobredimensionar, caras desbastadas.

Al realizar el pulido se consigue una superficie totalmente plana; sin embargo, en la figura 8.31 se puede ver como se ha desbastado bastante material hasta conseguir la forma deseada, reduciendo considerablemente las dimensiones de la cuña. Por otra parte, también ha sido necesario utilizar una gran cantidad de papel abrasivo y tiempo, por lo que este procedimiento no sería una solución eficiente. En la cuña V3 (figura 8.32) se bajó la porosidad con el fin de reducir las distorsiones.

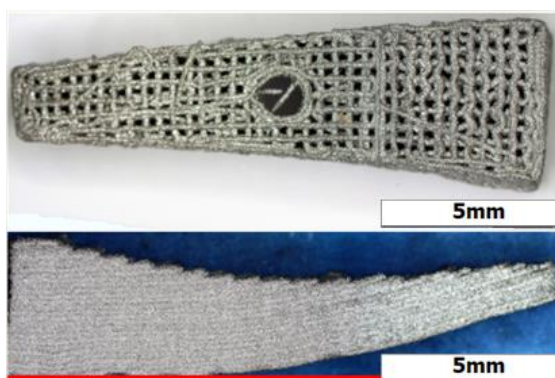


Figura 8.32 Cuña V3. Sinterizada a 1350°C, porosidad 50%, sin sobredimensionar ni mecanizar.

Las cuñas V3 también presentan una gran distorsión en la punta, sin embargo, esta no es tan pronunciada como en el caso de las V1, por lo tanto, al bajar la porosidad (de 80% a 60-50%) se reduce el grado de distorsión en las cuñas. También se ha probado de corregir la distorsión desbastando la superficie, cuña V4 figura 8.33.

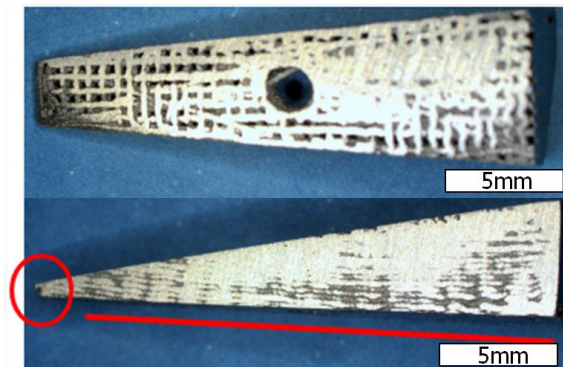


Figura 8.33 Cuña V4. Sinterizada a 1350°C, porosidad 50%, sin sobredimensionar, caras desbastadas.

Al igual que con la V2, se consigue eliminar la distorsión y se obtiene una superficie plana, pero las dimensiones de la muestra se ven excesivamente reducidas

La porosidad influye y se ha de tener en cuenta, pero no se puede modificar (reducir) demasiado. Por lo tanto, se han de buscar otras estrategias que permitan disminuir al máximo la distorsión. Como se ha comentado anteriormente (apartado 8.4.1 del anexo 1) con este tipo de piezas (cuñas veterinarias) durante la etapa de secado se generan tensiones internas que producen distorsiones, algunas apreciables tras el propio secado y otras tras el sinterizado. Con el fin de contrarrestar las tensiones generadas durante el secado, se probó de sinterizar las piezas al revés de cómo se imprimen (secan), es decir bocabajo, cuña V5 figura 8.34.

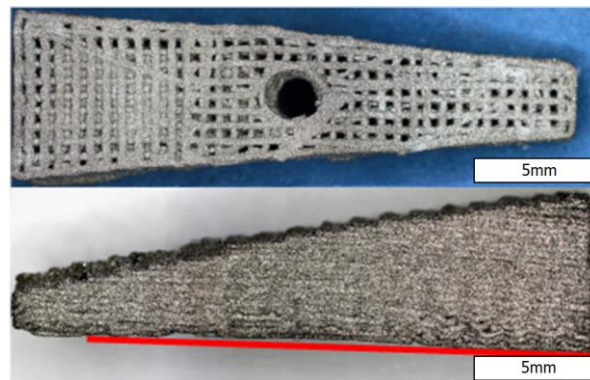


Figura 8.34 Cuña V5. Sinterizada a 1350°C al revés de cómo se ha secado, porosidad 50%, sin sobredimensionar ni mecanizar

En la imagen de la figura 8.34 se observa que la distorsión se reduce considerablemente al sinterizar la pieza al revés de como se ha secado.

Por otra parte, los requerimientos en el diseño de la cuña especifican que esta ha de tener una porosidad interconectada (porosidad abierta) para permitir vascularización y mejor osteointegración del material, para esto es necesario que tanto la parte superior como inferior de la cuña sea porosa. Con la tecnología de inyección 3D no se pueden conseguir cuñas con porosidad en ambas caras debido a la pendiente de la cuña, figura 8.35

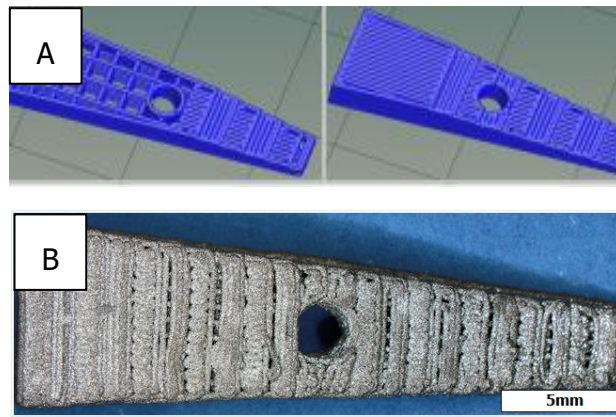


Figura 8.35 A) Secuencia de impresión de una cuña. B) Cara superior de una cuña sinterizada

Como se puede ver en la secuencia de impresión, dada la forma de cuña, con una cierta inclinación, y al tratarse de una tecnología de adición capa a capa, la porosidad de la cara superior de la pieza queda parcialmente tapada.

Para poder abrir la porosidad se decidió imprimir una pieza sobredimensionada en el eje Z (30% más de altura), sinterizarla y, a continuación, cortarla (cuña V6, figura 8.36) o desbastarla (cuña V7, figura 8.37).

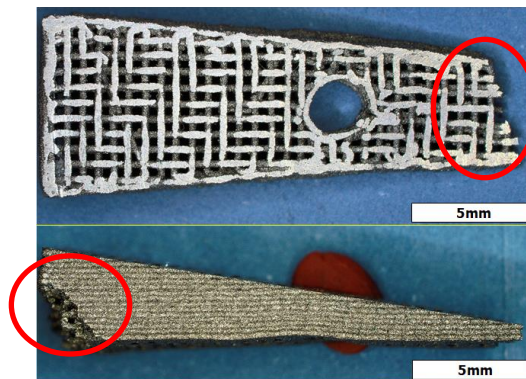


Figura 8.36 Cuña V6. Sinterizada a 1350°C al revés de cómo se ha secado, porosidad 50%, sobredimensiona y cortada por la cara superior.

Como se observa en la figura 8.36 resulta complicado cortar este tipo de piezas debido al material (titanio), la porosidad y el diseño. Es necesario sujetar firmemente la pieza con la mordaza para evitar desplazamientos durante el corte, al hacerlo esta se puede agrietar. Además, es difícil ajustar el corte, obteniendo poca repetitividad y eliminado más material del necesario.

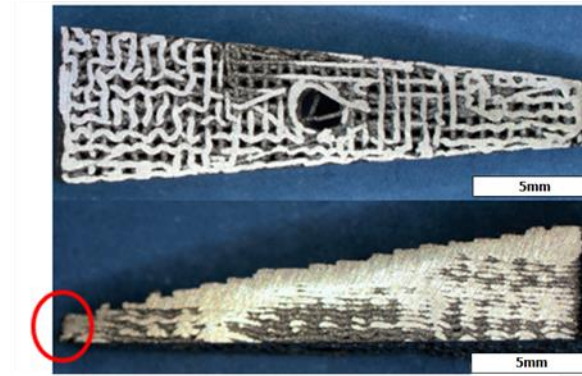


Figura 8.37 Cuña V7. Sinterizada a 1350°C al revés de cómo se ha secado, porosidad 50%, sobredimensiona y desbastada.

En la imagen de la figura 8.37 se puede ver como desbastando la pieza tras el sinterizado se consigue abrir la porosidad, además de corregir las distorsiones producidas durante la sinterización. Sin embargo, se elimina demasiado material y no se consiguen las dimensiones requeridas, además de seguir siendo un proceso poco productivo. Con el fin de reducir el tiempo de mecanizado se probó de desbastar la pieza en verde y, a continuación, sinterizar (cuña V8 figura 8.38).

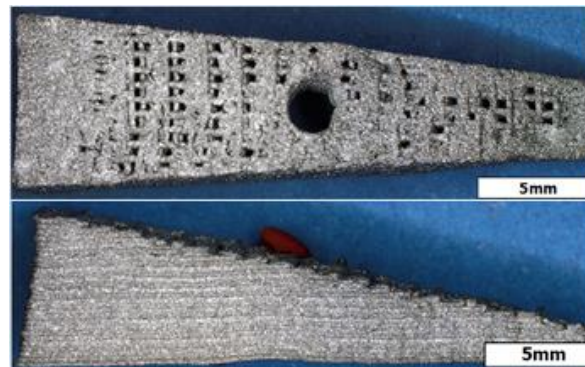


Figura 8.38 Cuña V8. Sinterizada a 1350°C al revés de cómo se ha secado, porosidad 50%, sobredimensiona y desbastada en verde.

Como se observa en la figura 8.38, al desbastar la pieza en verde se consigue destapar gran parte de la porosidad en un proceso que apenas consume recursos. Este resultado abre la puerta al procesado en verde y reafirma la necesidad de desarrollar una tinta que permita imprimir piezas con las características adecuadas para poder ser mecanizadas en verde.

8.1.4.2 Caracterización preliminar de muestras sinterizadas

Se llevó a cabo una caracterización a compresión de cilindros impresos con la tinta preliminar base Pluronic, con un 40% de porosidad (por defecto en el gcode) y sinterizados a 1350°C 3 horas. En la figura 8.39 se presentan las imágenes de microscopia electrónica de las muestras sinterizadas.

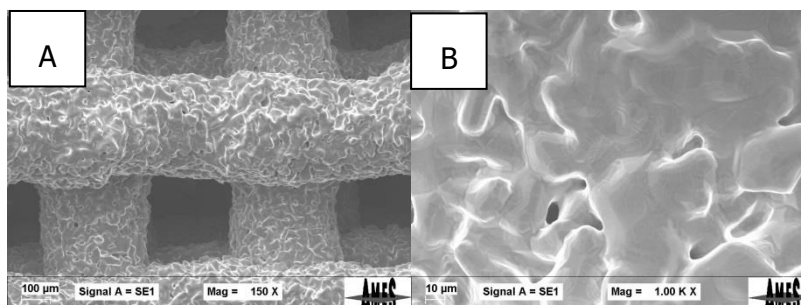


Figura 8.39 Imágenes SEM de las muestras sinterizadas a A) X150 y B) X1000 aumentos.

En la figura 8.30 B se observa los cuellos de unión o soldadura entre partículas, estructura característica de una pieza correctamente sinterizada. También se distinguen dos tipos de porosidades; la macroporosidad diseñada y obtenida mediante la impresión, y la microporosidad entre partículas sinterizadas. En la tabla 8.9 se recogen los resultados de la caracterización mecánica y química de las muestras sinterizadas.

Tabla 8.9 Resumen caracterización mecánica (a compresión) y química.

ID	E (GPa)		$\sigma_{\text{máx.}}$ (MPa)		O (%)		C (%)	
	Media	Desv.	Media	Desv.	Media	Desv.	Media	Desv.
Preliminar	2.5	± 0.05	176	± 6	0.89	± 0.03	0.15	± 0.04
OsteoSinter®	3	± 0.5	45	± 5	0.3	± 0.05	0.02	0.01

Las muestras preliminares prestan buenas propiedades mecánicas en comparación con el "Gold estándar" OsteoSinter®. Sin embargo, aún está por definir y optimizar la porosidad y perfil de sinterización, de momento la porosidad de impresión es 40% (OsteoSinter® ~65%) y la sinterización se lleva a cabo a 1350°C. En cuanto al contenido de O y C, el porcentaje de estos elementos está por encima del permitido por la norma ISO 5832-:1999 y ASTM F67-06. Para conseguir valores más cercanos a la norma no es suficiente con controlar el proceso de sinterizado, también es necesario controlar el proceso de eliminación del ligante polimérico (en este caso Pluronic) que está ligado a la formulación de la tinta.

8.2 ANEXO 2: DESARROLLO DE LA IMPRESORA 3D

8.2.1 Pruebas impresora piloto: BCN3D+ dual paste extruder

Las pruebas preliminares de impresión 3D se llevaron a la tinta inicial base Pluronic (Ti/Plur30%). Como se ha ido comentado, las características de esta tinta son adecuadas para evaluar, conocer y comprender mejor los requerimientos y limitaciones de cada una de las etapas del proceso de producción. Sin embargo, hay ciertas limitaciones o requerimientos propios de la tinta que se eliminan o solucionan al desarrollar la tinta final, por ejemplo, la necesidad de enfriar al sistema. Se diseñó un sistema en enfriamiento mediante efecto Peltier que finalmente no fue necesario desarrollar.

8.2.1.1 Ajustes y modificaciones del equipo

A partir de la impresora preliminar dual paste extruder, desarrollada por la fundación CIM, y con los modelos 3D en .SLRPDT (SolidWorks) se llevaron a cabo diferentes modificaciones sobre el equipo.

Extrusores comerciales

El primer problema se detectó sobre diseño de los extrusores. El engranaje, que está acoplado al extrusor, gira transmitiendo la fuerza del motor, si la tinta no es muy fluida y ofrece cierta resistencia se produce pandeo en el extrusor (figura 8.40), haciendo que constantemente salten pasos entre engranajes y no se pueda extruir el material.

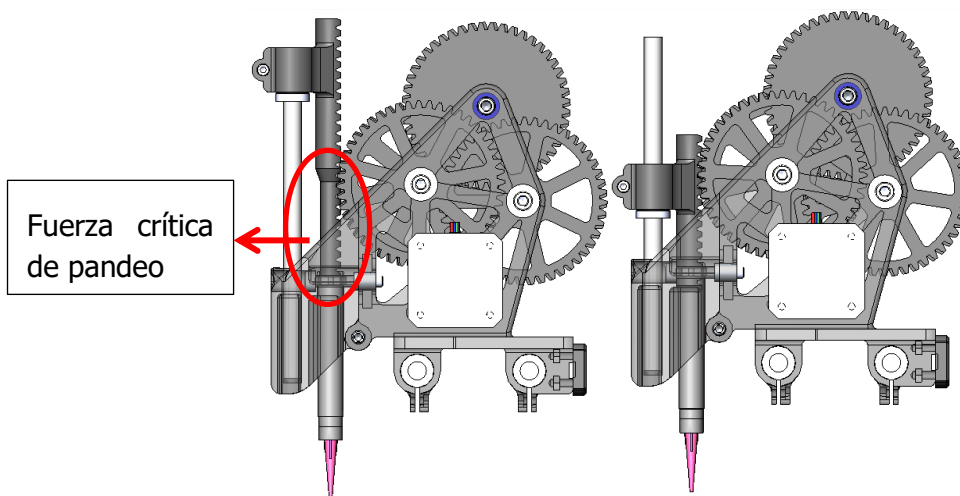


Figura 8.40 Esquema de del sistema de extrusión.

El problema no era debido a la resistencia de la tinta, ya que se había caracterizado previamente, por medio del ensayo de inyectabilidad, y los valores de carga requeridos no eran ni mucho menos excesivos (<100N). Además, esta tinta preliminar se podía extruir sin problemas con la versión anterior de la impresora, en donde no había sistema de doble extrusión y el extrusor era más corto. Por lo tanto, con el torno se mecanizaron los extrusores (figura 8.41) y tras verificar que funcionaban se modificó el diseño CAD.

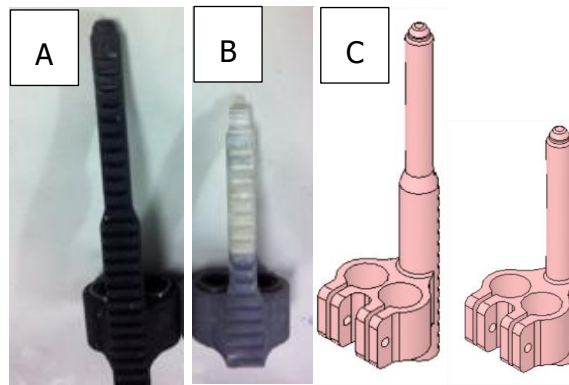


Figura 8.41 Imagen de los extrusores A) de serie y B) mecanizado. C) Diseño CAD de los extrusores.

Tras la modificación de los extrusores, se mejoró considerablemente el proceso, ya que con el diseño anterior prácticamente no se podía extruir ninguna tinta con consistencia. Sin embargo, debido a las características del material del extrusor se seguía produciendo pandeo (con menos frecuencia) e incluso en alguna ocasión rotura de la pieza. Muchas de los componentes de la impresora se fabrican por FDM, bien de PLA o de ABS, por lo que la resistencia mecánica es baja. En el caso de las partes más funcionales o críticas como los extrusores, engranajes y el sistema de sujeción, se fabrican mediante SLS de poliamida, obteniendo mayor precisión y propiedades mecánicas. En el caso de los extrusores las propiedades del material no son suficientes para soportar las cargas requeridas que, por otra parte, son bastante bajas en comparación con equipos industriales. Para mejorar el problema del pandeo se realizaron los planos de los dos diseños y se mecanizaron extrusores de aluminio.

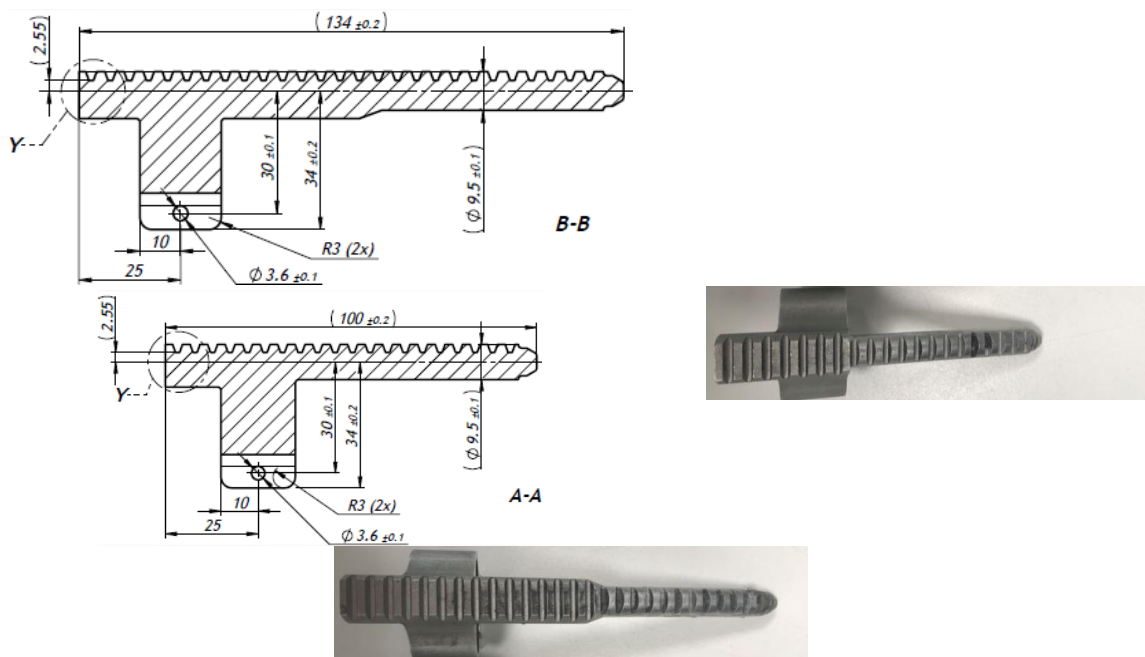


Figura 8.42 Planos y extrusores mecanizados en aluminio.

La carga crítica de pandeo viene dada por la fórmula de Leonhard Euler [346]:

$$F_{crit} = \pi^2 \frac{EI_{min}}{(\lambda L)^2}$$

Siendo: F_{crit} , la carga crítica; E , el Módulo de Young del material; I_{min} , momento de inercia mínimo de la sección transversal de la pieza; L , longitud de la barra y λ la esbeltez mecánica. Por lo tanto, aumentando el módulo y/o reduciendo la longitud se consigue disminuir el pandeo del extrusor.

Desgaste engranajes

Al modificar mecanizar los extrusores de aluminio se eliminó el efecto de pandeo sobre el extrusor, y por su puesto la rotura. Aunque con el uso y el tiempo los engranajes se van desgastando (figura 8.43), los que están en contacto con los extrusores de aluminio lo hacen más rápido.

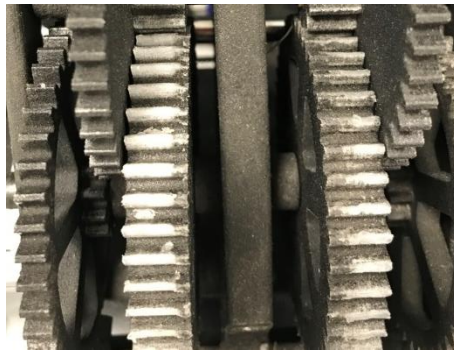


Figura 8.43 Desgaste de los engranajes.

Para evitar el desgaste se dibujaron los planos de los engranajes (figura 8.43) para poderlos mecanizar en aluminio.

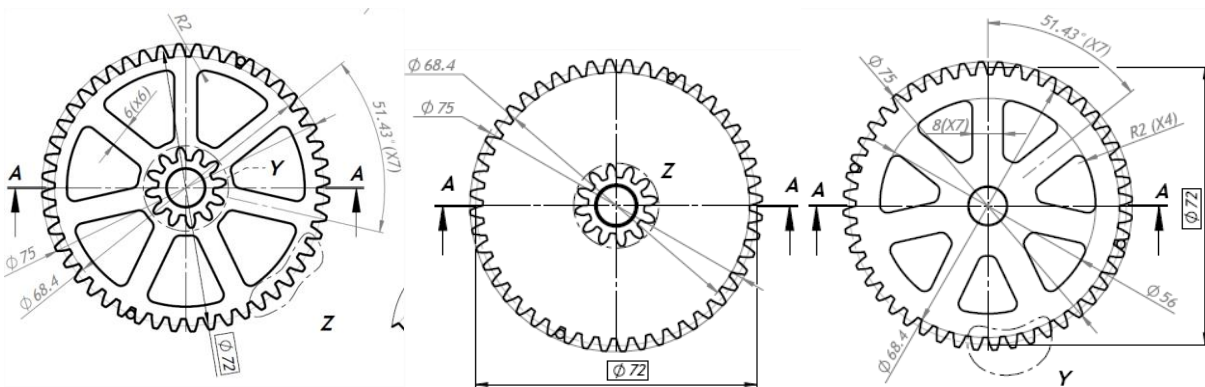


Figura 8.44 Planos de los engranajes

Finalmente, se optó por no mecanizar los engranajes aluminio, ya que, debido al número y diseño, el proceso se encarecía demasiado y el coste de las piezas casi duplicaba el del equipo entero. Como alternativa a partir de los diseños CAD se fabricaron recambios de Tereftalato de polietileno (PETG) mediante FDM con la impresora Ultimaker3 (figura 8.45).



Figura 8.45 Recambios de los engranajes impresos.

Unión soporte de jeringas y carro de impresión

Tras solucionar los problemas con los extrusores y engranajes, quedo visible otro de las limitaciones del equipo, debido al diseño del soporte de las jeringas y del carro de impresión. Para ciertos valores de carga (que deberían ser asumibles por un equipo), al impedir el pandeo del extrusor, el soporte de las jeringas se separa ligeramente del carro de impresión (figura 8.46) haciendo que los engranajes salen y la tinta no se extruye.

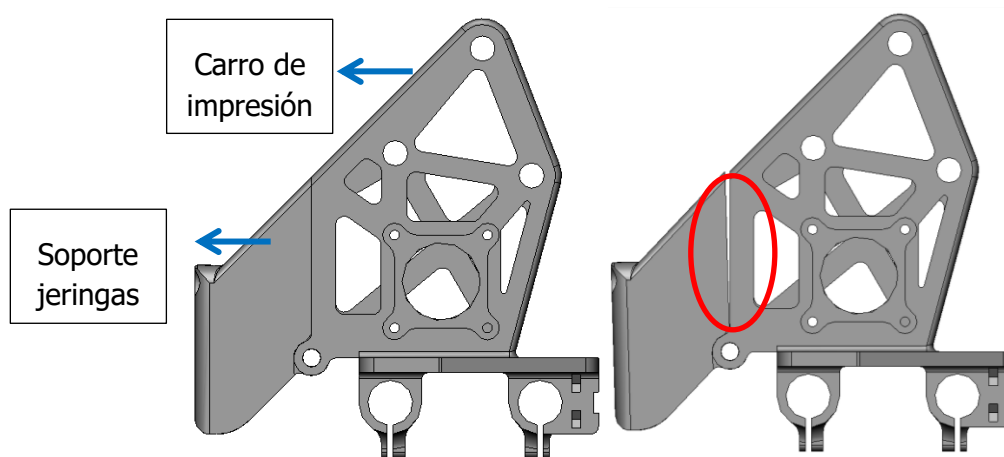


Figura 8.46 Esquema del ensamblaje soporte jeringas-carro de impresión.

Se llevaron a cabo diferentes modificaciones del diseño, especialmente sobre el soporte de jeringas (figura 8.47). Las piezas fueron impresas en Nylon, PLA y (PETG) mediante FDM y validadas en uso.

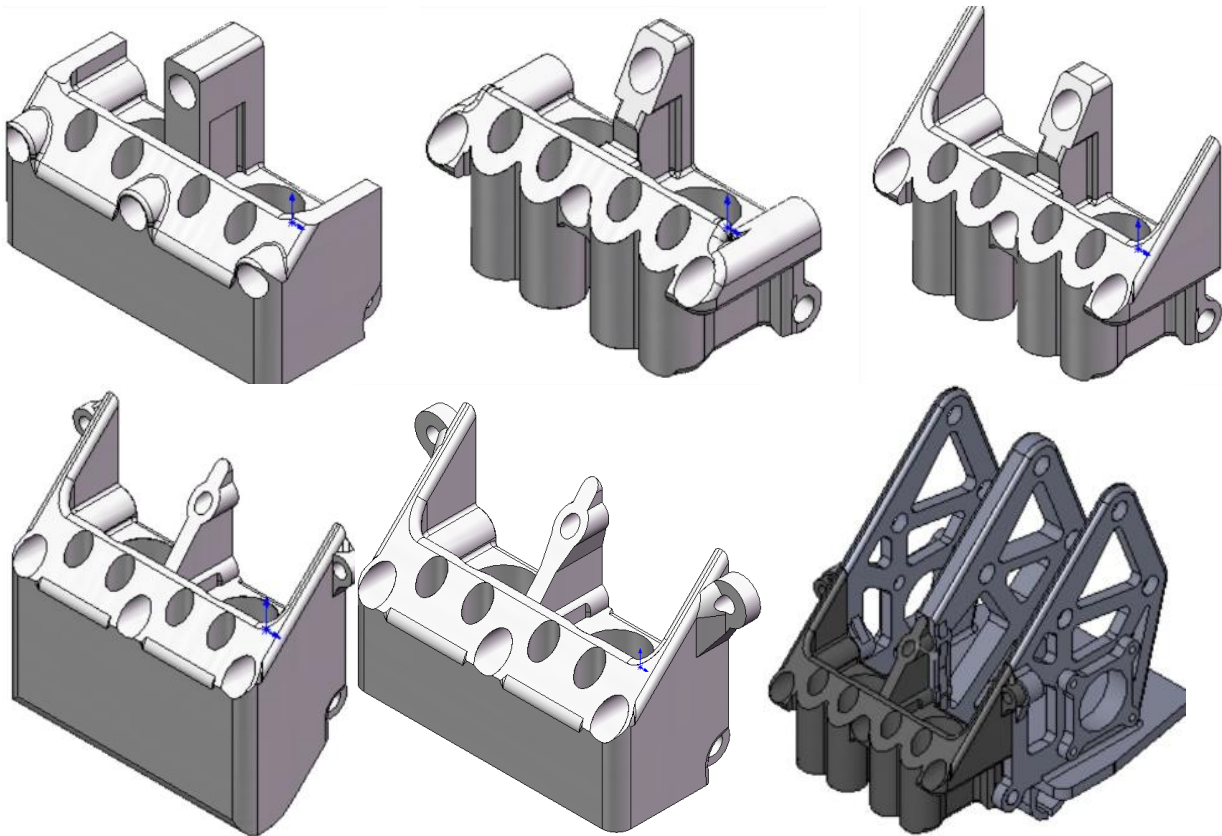


Figura 8.47 Ejemplo de diseños CAD del soporte de las jeringas y ensamblaje final.

Las muestras de PETG son las que presentaron mejor acabado y menor distorsión dimensional. En las modificaciones se buscaron sistemas para poder mejorar la unión entre ambos componentes, así como reducir el peso del conjunto. Conviene recordar que todos los modelos se fabricaban mediante FDM, por lo tanto, se ha tenido en consideración en el momento de rediseñar la pieza, pensando en la anisotropía del proceso, dirección de fabricación, ángulos, voladizos y redondeos [247].

Volumen máximo de inyección

Otra de las limitaciones del equipo está en el volumen de material que se puede inyectar. El equipo está diseñado para el uso exclusivo de jeringas de 3cc, esto condiciona y reduce considerablemente el tipo de piezas a fabricar. Con piezas de un determinado volumen y/o porosidad (densas) surgen complicaciones, ya que para poder fabricarlas se ha de diseñar por partes, o se ha de parar la impresión manualmente (o modificar el Gcode, para que lo haga automático) cambiar la jeringa y volver reanudar. Para tener mayor flexibilidad en el uso de jeringas, y aprovechando el rediseño del soporte, se amplió el diámetro por dónde se introducen las jeringas y se diseñaron adaptadores para cada medida, siendo así posible trabajar con jeringas de 3, 5 y 10cc. En la figura 8.48 se muestran las modificaciones realizadas para poder utilizar jeringas de mayor volumen.

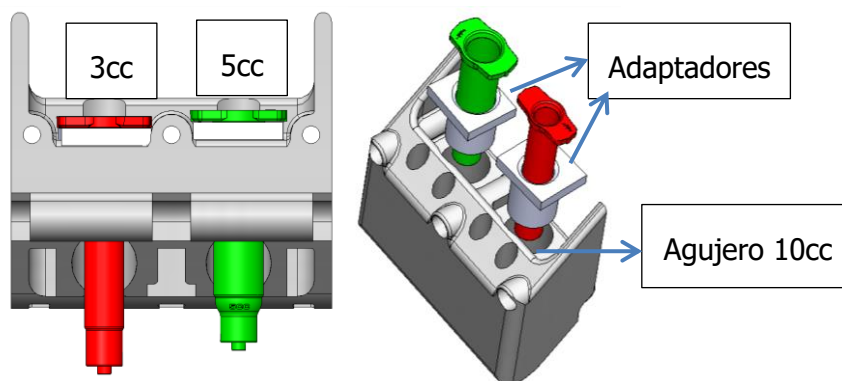


Figura 8.48 Ensamblaje soporte, jeringas 5cc y 3cc, y sus respectivos adaptadores.

Para poder utilizar las jeringas de mayor capacidad también fue necesario rediseñar los extrusores, es decir, hacer un extrusor para cada tamaño de jeringa. Con el fin de reducir el coste y facilitar la fabricación, tanto por FDM de PLA o mecanizado en aluminio, se diseñó una única guía y las tres tallas de extrusores por separado (figura 8.49).

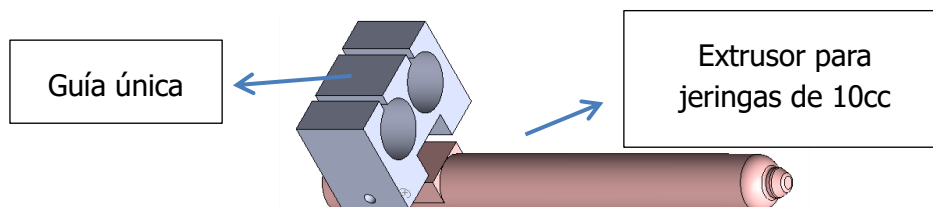


Figura 8.49 Ensamblaje guía y extrusor para la jeringa de 10cc.

Antes de dibujar los planos y fabricar las piezas en aluminio, se imprimieron por FDM los diferentes prototipos y se probaron sobre la impresora. Tras llevar a cabo el montaje e intentar extruir no fue posible validar el diseño de los extrusores, el proceso no era repetitivo, hay juego entre el extrusor y los engranajes, así como entre la guía y el extrusor.

En general, aún mecanizando los extrusores y llevando a cabo las diferentes modificaciones de diseño (ya implementadas), es evidente la falta de robustez y la necesidad desarrollar un equipo más industrial con otro concepto de extrusión.

8.2.1.2 Recopilación de datos, problemáticas y requerimientos

A partir de la experiencia e información adquirida con la impresora BCN3D+ dual paste extruder se ha elaborado una lista preliminar con los requerimientos, limitaciones, necesidades y propuestas de mejora para el desarrollo del nuevo equipo. A continuación, se detalla y comenta la lista; en rojo los requerimientos esenciales, en naranja los esenciales siempre y cuando no entren en conflicto con los primeros o encarezcan de considerablemente el equipo, y en azul aquellos de aportarían un valor extra.

Fuerza de extrusión de 1000N: Este valor es superior al necesario para extruir la tinta final sin problemas. Como se ha demostrado, a mayor porcentaje de carga metálica mayor fuerza de impresión. Por lo tanto, un equipo que pueda aplicar esta fuerza permitiría aumentar la carga metálica de futuras tintas.

Evitar el sistema de engranajes: El sistema de engranajes fabricados por sinterizado láser es un método utilizado en CIM-UPC para la impresión de pastas. No obstante, es un sistema que falla a partir de los 100N de fuerza de extrusión y, por tanto, no es el más adecuado para este proceso debido a las sollicitaciones mecánicas que se estiman para los materiales altamente cargados.

Evitar el pandeo del extrusor: Se plantea un diseño en el que el cabezal de extrusión se movería por los ejes XYZ, por ello es imprescindible evitar el pandeo del extrusor que pueda causar este movimiento. De lo contrario, la deposición de la pasta no se llevaría a cabo con la precisión que se requiere y podría haber una gran afectación en la geometría impresa.

Adaptable a diferentes tamaños de jeringas (3, 5, 10, 30 y 55cc): Es necesario que el sistema de adaptación sea lo más sencillo y versátil posible. Que el sistema de montaje sea fácil y rápido, y a poder ser que sea independiente de otras partes del equipo. Cuanta mayor capacidad de jeringas mejor, si no es posible adaptar todas las tallas (figura 8.50) a un mismo sistema de extrusión, minimizar al máximo el número. Es decir, que haya un sistema o kit de impresión para jeringas de poco volumen (3, 5 y 10cc) y otro para las de alto (30 y 55cc).

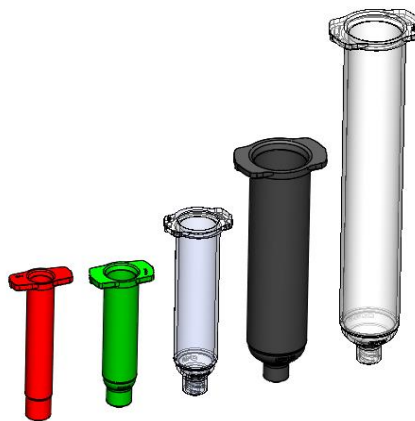


Figura 8.50 CAD de los diferentes tamaños de jeringas propuestos.

Múltiple extrusor: Crear una pieza impresa con dos o más materiales está siendo un requisito esencial para la construcción, ya sea para mezclar los materiales en una misma pieza impresa o para que uno de estos sea el soporte de la impresión.

Control de temperatura y humedad: Crear un ambiente donde la temperatura y la humedad estén controladas es un requisito básico para poder imprimir eficientemente las pastas/tintas desarrolladas. Para ello, se plantea un diseño con cabina de impresión cerrada, donde la temperatura y la humedad serán regulables a disposición del usuario. Respecto a la temperatura, los resultados de inyectabilidad en caliente mostraron que las mejores condiciones se dan entre 40 y 50°C. En cuanto al %HR no es necesario conseguir un rango de valores concreto, pero sí mantener el entorno lo más estable posible, si cambio bruscos y/o extremos.

Nivelado automático del cabezal: El posible desnivel en la cama de impresión puede causar desajustes en la impresión. Por ello, se propone un cabezal de impresión que se autorregule a la disposición de la cama de impresión.

Ejes XYZ: El equipo de impresión 3D de pastas debe disponer de un sistema de tres ejes XYZ para proporcionar un rango de movimiento tridimensional del cabezal. Estos ejes deberán de presentar la mayor rigidez y estabilidad posible, con una resolución adecuada para las impresiones requeridas.

Como se observa en la imagen, es el cabezal el que tiene el movimiento de todos los ejes, XYZ y extrusión, evitando así el movimiento de la cama. De esta manera es posible colocar un líquido o un gel en el plato de impresión sin importar el peso ni la velocidad. Además, al evitar el movimiento de la cama también se mejora la estabilidad de piezas con poca base y mucha altura (tipo cilindros), evitando que se despeguen y se tumben.

Estabilidad del equipo: El equipo debe de tener una estructura estable y robusta, evitando utilizar piezas de plástico impresas por FDM.

Limpieza: El proceso de impresión con tintas o pastas metálicas tiende a ensuciar la zona de trabajo, al hacer los primeros ajustes de extrusión, impresiones de prueba, utilizar perímetros extra en el código, balsas o bordes que ayudan a la adhesión, y al despegar las mismas piezas el equipo se ensucia considerablemente. Es necesario poder limpiarlo de una manera sencilla y eficiente, como un sistema de aspiración o permitir una entrada de aire comprimido. También es importante que haya un sistema de ventilación para la evaporación del disolvente.

8.2.2 Pruebas impresora prototipo industrial

A partir de la información recogida con la impresora piloto (BCN3D+ dual paste extruder), se trabajó conjuntamente con CIM UPC para diseñar y fabricar un prototipo industrial de impresora 3D de extrusión de pastas (figura 8.51).

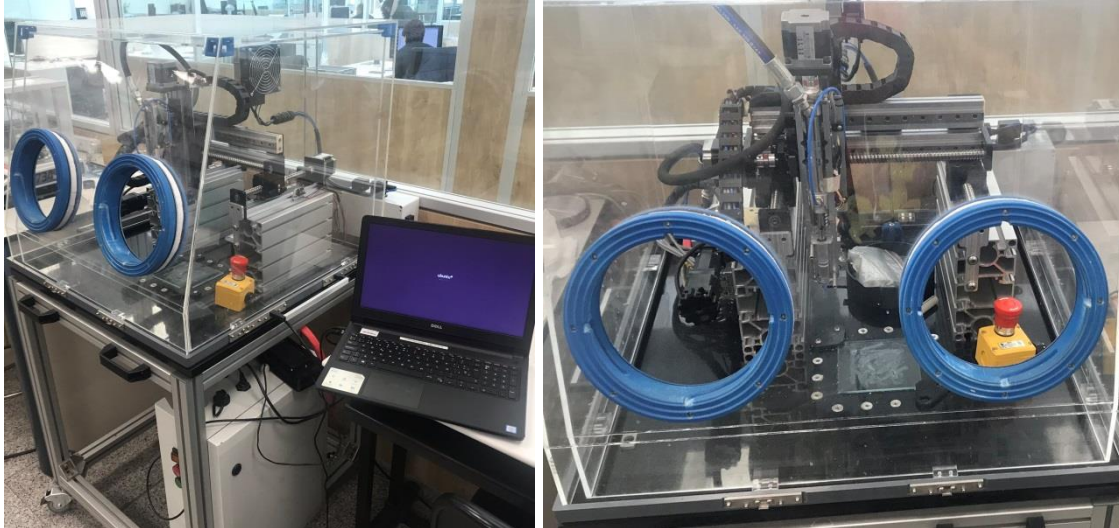


Figura 8.51 Impresora 3D prototipo

8.2.2.1 Mejoras respecto a la impresora piloto

Mejoras en el equipo

Este equipo es un prototipo de la impresora final, el cual falta por acabar y definir ciertas partes, que se comentarán en los siguientes apartados. Sin embargo, la estructura y el diseño general presentan notables mejoras en comparación con la impresora piloto. A continuación, se detallan las principales mejoras en cuanto al equipo; en verde las ya finalizadas y en azul las realizadas pero que están por mejorar o completar.

Fuerza de extrusión 1000N: La fuerza que se aplica es más que suficiente para extruir la tinta final, de hecho, ahora es posible extruir tintas que se han conservado más de 24h y fabricar piezas sin ningún problema.

Sistema de extrusión: Se ha evitado aplicar las cargas mediante transmisión de engranajes, evitando uno de los principales problemas del anterior equipo. La extrusión se lleva a cabo mediante un sistema hidráulico.

Adaptable a diferentes tamaños de jeringas: El sistema permite, mediante el uso de un adaptador, utilizar jeringas de 3 y 5cc, de manera rápida y sencilla. El diseño del prototipo está pensado poder ser modificado y que en la versión final se puedan adaptar dos sistemas, para jeringas de mayor y menor volumen (10 y 30 cc).

Control de temperatura y humedad: Como se observa en la figura 8.51 el equipo se encuentra en una cabina de impresión cerrada que permite regular la temperatura (entre 25 y 60°C) de la zona de impresión, mejorando la repetitividad y el control del proceso. Falta implementar un sistema de resistencias para calentar las jeringas durante la impresión, pero

el diseño del extrusor ya está pensado para que sea fácil de acoplar una camisa calefactora en la impresora final. En cuanto al sistema de humedad, de momento, no se puede regular, pero si mantener estable, pero en el diseño final se añadirá un sistema de humidificación de la punta del extrusor para así evitar que la pasta se seque son facilidad. Este sistema también permite humidificar el ambiente.

Ejes XYZ y estabilidad del equipo:

El equipo es más robusto, no tiene piezas funcionales fabricadas por FDM y la estructura es más estable. El cabezal extrusor es el que ejerce los movimientos en los ejes XYZ y, por lo tanto, se elimina el movimiento de la cama. Esto permite que la base del equipo, la zona de impresión, sea de mármol para absorber vibraciones y mejorar la calidad del proceso.

Mejoras sobre el proceso

Impresión 3D dentro de un líquido

Al evitar el movimiento de la cama, y debido a las características de la tinta final (resistencia en verde y al agua), es posible modificar y mejorar considerablemente el proceso imprimiendo dentro de un gel reutilizable (figura 8.52).

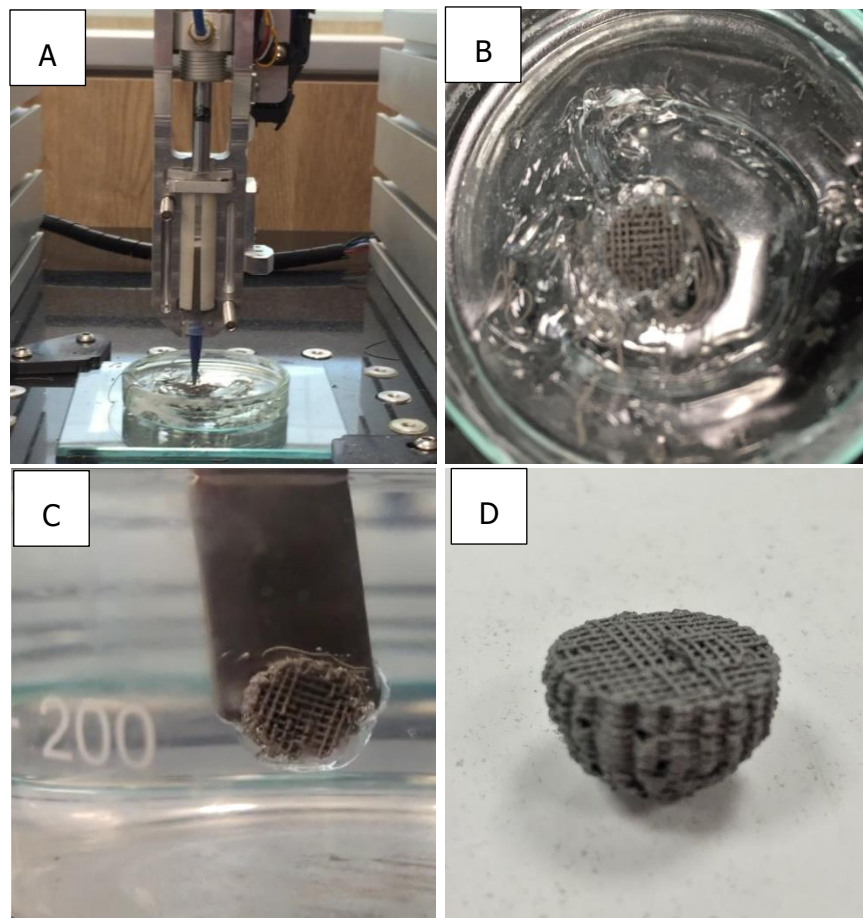


Figura 8.52 Secuencia de imagen para obtención de una pieza: A) proceso de extrusión 3D de titanio dentro de un gel, B) pieza impresa dentro del gel, C) inmersión de la pieza en agua para la eliminación del gel, D) pieza en verde.

Anexos

En la figura 8.52 se observa todo el proceso de impresión y manipulación de una muestra. El proceso principal es la extrusión de la tinta dentro del hidrogel, este ayuda a mantener las condiciones de la tinta y a la vez hace de estructura de soporte. A continuación, se extrae la muestra de una forma rápida, sencilla y automatizable, enfriando el gel a 10°C este se hace líquido al instante (menos de un minuto), lo que permite que se pueda filtrar y separar de la pieza. Finalmente, la muestra se recoge y se introduce en el agua para acabar de eliminar restos del soporte.

Con este método se evita el problema de la **adhesión al plato, la regulación de la distancia de la primera capa y la utilización de soportes** (comentados en las pruebas de impresión del apartado 8.1.2 del anexo 1). Por otra parte, al imprimir dentro de un gel **se controla y mantiene mejor la temperatura en toda la pieza y se ve menos afectada por el porcentaje de humedad relativa del entorno**. Además, a día de hoy no hay artículos ni patentes sobre extrusión de tintas metálicas dentro de hidrogel.

El gel que se utiliza como base de impresión es Pluronic del 20%, ya que en el capítulo anterior se demostró que con este porcentaje el hidrogel es muy sensible a los cambios de temperatura, algo que en este caso es beneficioso. La temperatura del interior de la cabina se mantiene constante a 30°C, por lo que el hidrogel presenta la consistencia justa que se pueda extruir dentro la tinta sin distorsionar la pieza y a su vez hacer de soporte. Para menores porcentajes de Pluronic el hidrogel es demasiado fluido y no puede sostener el material extruido (no ejerce de soporte), para mayores porcentajes es necesario más tiempo de enfriamiento para que sea líquido y se pueda separar de la pieza. Otra ventaja de poder utilizar Pluronic como hidrogel para la base de impresión es que no hay problemas en cuanto a contaminación o eliminación del soporte, ya que la tinta final ya tiene una parte de este polímero.

8.2.2.2 Ajustes y modificaciones de la impresora prototipo.

Creación de funciones (macros)

La impresora prototipo tiene la posibilidad de ser controlada y monitorizada in situ vía Ethernet con el ordenador. Desde la aplicación se pueden generar funciones (macros), que no son más que cortas líneas de código para facilitar el uso de la impresora.

Set z0: Manualmente se sitúa el cabezal a una distancia Z del plato y mediante este macro se establece que en el punto actual el eje Z es igual a 0, a continuación, se mueve a una posición XYZ cómoda para trabajar con él (extruir pasta, cambiar punta, etc.). En la figura 8.53 se detalla el código de la macro *set z0*.

Editing 0:/macros/Set z0

```
G92 Z0  
G1 Z70  
G1 X50  
G1 Y135
```

Figura 8.53 Función creada set z0.

Situar Encima Esquina: Esta función sitúa el extrusor sobre fuera de la zona de impresión para poder calibrar el $z=0$, ya que en el centro puede haber un recipiente con hidrogel o pegamento para mejorar la adhesión al plato. En la figura 8.54 se detalla el código de la macro *Situar Encima Esquina*.

Editing 0:/macros/Situar Encima Esquina

```
G28      ; return all axes the origin
G92 Z200      ; set the current Z value high in order to be able to set z=0
G1 X30 Y130   ; move X and Y above the corner to calibrate the Z value
```

Figura 8.54 Función creada Situar Encima Esquina.

Estas dos macros (figura 8.53 y 8.54) son útiles para calibrar correctamente la distancia que se deja entre la boquilla y el plato de impresión. La correcta impresión de la primera capa ($z=0$) es una etapa crítica en las técnicas de impresión 3D por deposición, bien sea de filamento (FFF) o tinta (DIW). Si no se deja suficiente distancia la primera capa sale aplastada y se puede sumar el error en las siguientes capas, también es posible tamponar o incluso romper la punta. Si por contrario, hay demasiada separación, puede haber falta de adhesión al plato y que el filamento es demasiado fino y/o poco continuo (serie de puntos).

Bajar más: corrige un problema y permite bajar el eje z a valores negativos. Por seguridad, cuando se alcanza el valor de 0 no se permite bajar más, sin embargo, conviene recordar que el valor $z=0$ es introducido por el usuario previamente, y es posible que este valor estuviese a una altura concreta para imprimir sobre otra pieza o superficie determinada. Por lo tanto, mediante esta función se "engaña" al equipo y se establece otra altura mayor, para así poder bajar más y poder trabajar. En la figura 8.55 se detalla el código de la macro *Bajar más*.

Editing 0:/macros/Bajar mas

```
G92 Z100
```

Figura 8.55 Función creada Bajar más.

Extruir 0.1: En las funciones preinstaladas del equipo el movimiento mínimo del extrusor es de 1mm. Esta función permite extruir 0.1 mm, que es más adecuado para para trabajar con las tintas y se pierde mucho menos material en la puesta en marcha de la impresión. En la figura 8.56 se detalla el código de la macro *Extruir 0.1*

Editing 0:/macros/Extruir 0.1

```
M83
G1 E0.1 F60
M82
```

Figura 8.56 Función creada Extruir 0.1.

Modificación de funciones generales

Por otra parte, hay funciones ya instaladas dentro de la aplicación, no son macros, son como botones de acceso rápido para aquellas funciones que se utilizan con frecuencia antes y durante la impresión. Si una función creada es muy necesaria, como Extruir 0.1, se puede pedir de incorporar como una función preinstalada. Algunas de estas funciones son muy generales y se han modificado para adaptarlas a las necesidades del tipo de impresión.

Pause: con este comando la impresión se detiene temporalmente, el extrusor hace una retracción para dejar de extruir material, y el cabezal vuelve a su posición de origen en los ejes XY. Se ha modificado esta función para que, antes de volver al origen, aumente la posición del eje Z y evitar, si fuese el caso, que choque con las paredes del recipiente donde se está imprimiendo. También se ha eliminado la retracción del extrusor, ya que es preferible que la extrusión de tinta sea continua. En la figura 8.57 se detalla el nuevo código de la función *Pause*.

```
; pause.g
; called when a print from SD card is paused
;
; generated by RepRapFirmware Configuration
estándar romance)
M83          ; relative extruder moves
G1 E-1 F3600 ; retract 1mm of filament
G91          ; relative positioning
G1 Z50 F360  ; lift Z by 50mm
G90          ; absolute positioning
G1 X0 Y0 F6000 ; go to X=0 Y=
```

Figura 8.57 Modificación de la función Pause.

Resume: Es una función ligada al pause, se utiliza para reanudar la impresión y por lo tanto hace los movimientos contrarios. En consecuencia, al modificar una se ha de modificar la otra. Primero se sitúa el cabezal encima de la pieza y, a continuación, se reanuda la impresión para evitar que choque con el recipiente. Se ha eliminado el paso de extrusión de 10mm (se ha cambiado por 0.1 mm) independientemente de que la función pause tenga o no retracción, ya que el principal motivo de pausar la impresión suele ser para cambiar la jeringa por una llena y si el extrusor vuelve a la posición inicial vacía la jeringa de inmediato. En la figura 8.58 se detalla el nuevo código de la función *Resume*.

```
; resume.g
; called before a print from SD card is resumed
;
; generated by RepRapFirmware Configuration Tool on Mon Feb 05 2018
estándar romance)
G1 R1 Z5 F6000 ; go to 5mm above position of the last print move
G1 R1          ; go back to the last print move
M83           ; relative extruder moves
G1 E0.1 F3600 ; extrude 0.1mm of filament
```

Figura 8.58 Modificación de la función Resume.

Modificaciones del equipo

Algunos de los requerimientos aún no se han implementado, pero sí que están considerados en la impresora final. Únicamente se han realizado modificaciones necesarias para el funcionamiento del equipo, sencillas de aplicar y que no interfieran o modifiquen el diseño de la impresora final.

Control volumen de tinta: se ha mecanizado una hendidura en la cara posterior del sistema que soporta la jeringa para poder controlar la cantidad de la tinta que queda en todo momento y cambiar la jeringa en el instante adecuado. Se ha podido llevar a cabo esta modificación ya que todo el sistema es metálico y suficientemente robusto.

Modificación posición ventilador: En la cabina que aísla el equipo, el ventilador que permite controlar la temperatura del interior choca con el cabezal de extrusión en un punto concreto XYZ. Por lo tanto, se ha desplazado el ventilador para evitar daños en los ejes (figura 8.59).

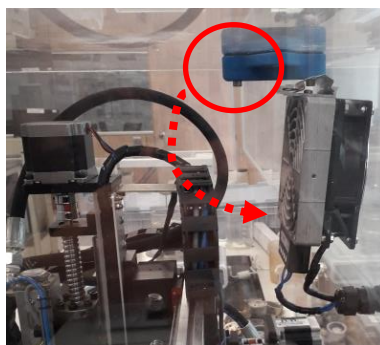


Figura 8.59 Modificación de la posición del ventilador de la cabina.

Eliminación cristal de impresión: Debido a las condiciones de trabajo y al uso, el cristal sobre el cual se imprime se puede ovalar o desgastar. Dado las características, tanto de la tinta como del nuevo equipo, no es necesario utilizar este cristal, ya que, si no se imprime sobre el hidrogel, se puede imprimir sobre el mismo mármol sin problema.

8.2.2.3 Recopilación de datos, problemáticas y requerimientos finales

Durante las pruebas de impresión para la validación del equipo se fueron detectando fallos, limitaciones y posibles mejoras para el desarrollo de la impresora final. A continuación, se detallan; en rojo los errores que implican una corrección o modificación del equipo, en naranja los requerimientos que aún no se han implementado, y en azul los errores independientes del equipo.

Sensor final de carrera eje Z: Durante alguna impresión se ha movido y no ejerce la función de límite; por lo tanto, el eje Z sube sin parar (se ha de frenar con la parada de emergencia). Este defecto no compromete la impresión, pero, con el tiempo puede dañar los motores y ejes del equipo.

Ondulaciones en el eje Z: En las piezas con cierta altura se observaron ondulaciones a lo largo del eje Z (figura 8.60 B). El rail guía del eje Z no es lo suficiente robusto y permite un

Anexos

cierto balanceo que se traduce en esta imprecisión. Se seleccionaron y rompieron a compresión 10 cilindros estándar impresos (en verde) con cada equipo (piloto y prototipo). En la figura 8.60 presenta la carga máxima asociada el tipo de cilindro.

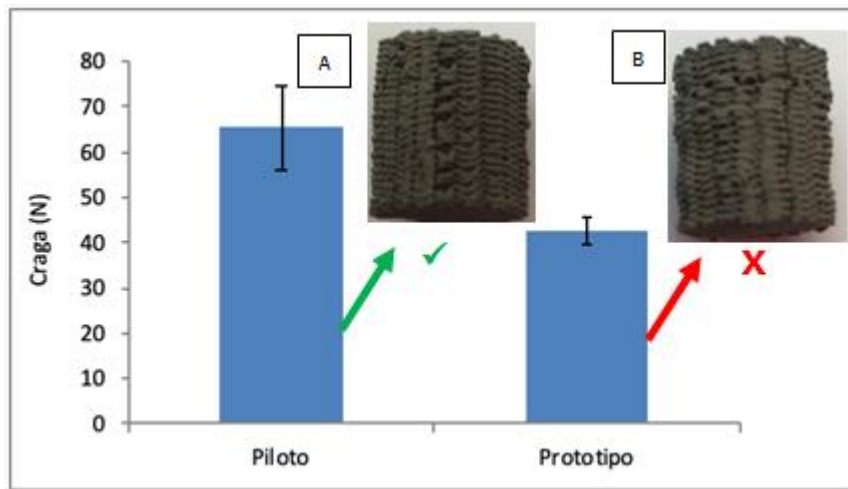


Figura 8.60 Carga máxima a compresión y cilindro obtenido (en verde) con la impresora A) piloto y B) prototipo.

Es imprescindible corregir ese defecto ya que, tal y como se observa la figura 8.60 B, en los cilindros que presentan ondulación en el eje Z la carga la carga máxima a compresión es menor.

Calentamiento jeringas (30-40°C), extrusor múltiple y adaptación para jeringas de mayor capacidad: Estos requerimientos son de vital importancia para el correcto desarrollo del proceso, así como para dar un valor añadido a la tecnología. Ya fueron definidos en la lista preliminar y, aunque no se hayan implementado en la impresora actual, se han de seguir teniendo en consideración para la final.

Cambio de jeringas: La cantidad de material que se imprime en las jeringas de 3cc y 5cc no es suficiente para muestras de cierto volumen, por lo que es necesario parar, cambiar de jeringas y reanudar la impresión. Este proceso no es del todo eficaz ya que, a veces, hay problemas de alineación y se generan escalones (figura 8.61).



Figura 8.61 Defecto escalón producido por el cambio de jeringa.

Se ha verificado y el error no es debido a que el extrusor no recupere la posición exacta del eje XY al reanudar la impresión. Por otra parte, se observó que las jeringas no quedan del todo encajadas en el soporte del cabezal de extrusión, por lo que al colocar la siguiente esta no se sitúa exactamente igual a la anterior. También se vio que al utilizar jeringas y puntas nuevas (no reutilizadas) el error era menos evidente.

La manera más eficiente de eliminar este problema es permitiendo que el equipo pueda trabajar con jeringas de mayor capacidad, hecho que ya está contemplando en la impresora final. Si fuese necesario realizar un cambio de jeringa, es imprescindible que estas queden completamente clavadas en el sistema extrusor.

Escape del material por la zona de los pistones: Este problema (figura 8.62) no es debido al diseño del equipo, es más una limitación de las jeringas y los pistones.

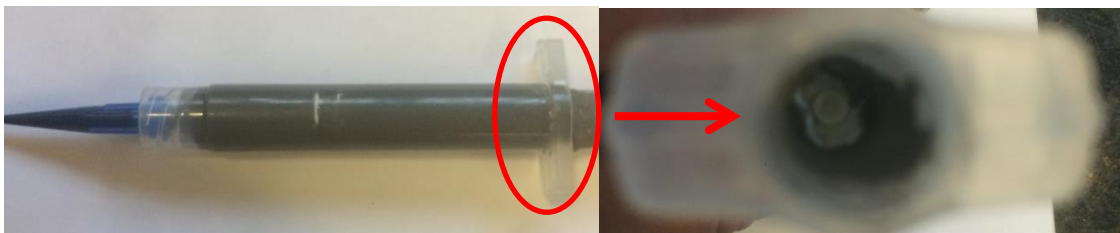


Figura 8.62 Jeringa con escape de material.

Colocando dos pistones nuevos (no reutilizados) se refuerza más la zona y se evita el problema. Otra posible solución sería mecanizar o imprimir pistones propios, de un material más resistente que se pueda limpiar y reutilizar fácilmente. Además, también se podría modificar el diseño que permita incluir unas juntas tóricas y mejorar el sellado de las jeringas.

8.2.3 Obtención y validación impresora final

A partir de la recopilación de datos de los apartados anteriores, la fundación CIM diseñó y fabricó la impresora final a medida para las tintas de AMES. Se llevaron a cabo diferentes pruebas de confirmación en el propio centro CIM para comprobar que el equipo cumple con todos los requerimientos previamente mencionados. En la figura 8.63 se presentan imágenes de la impresora final y un ejemplo de pruebas de impresión.

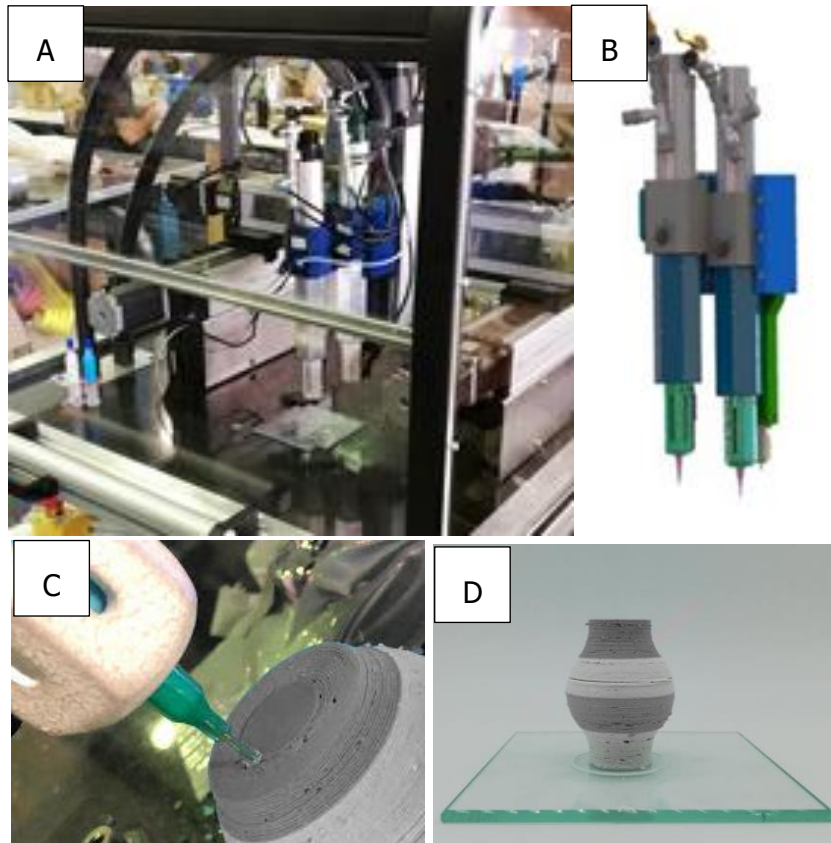


Figura 8.63 A) Fotografía general de la impresora final. B) imagen del sistema de doble extrusión. C) Ejemplo de impresión. D) Pieza modelo impresa con dos materiales.

Se han corregido los principales problemas mencionados en el apartado anterior, así como los requerimientos previos. Como se puede ver, la impresora tiene un sistema con dos extrusores que permite trabajar con jeringas de hasta 10cc (figura 8.63 A y B). Esto permite imprimir piezas de un volumen más que suficiente para el tipo de implantes a fabricar. Dado que las primeras pruebas se realizaron fuera de las instalaciones de AMES, por temas de confidencialidad, se prefirió buscar un modelo estándar de pieza y no utilizar unos de los modelos propios. Se utilizó la tinta desarrollada en la tesis con titanio y con polvo blanco con la misma granulometría para poder distinguir mejor los cambios de jeringas. Tal y como se observa en la figura 8.63 C y B, no se producen errores tipo escalón al cambiar de jeringa ni tampoco ondulaciones al imprimir en el eje Z, dos de los principales problemas detectados en la impresora prototipo. Por lo tanto, se ha conseguido desarrollar un equipo DIW a medida para la tinta formulada en esta tesis.

8.3 ANEXO 3: ESTUDIOS PREVIOS DE FUNCIONALIZACIÓN

8.3.1 formación de titanatos de sodio sobre estructuras porosas de titanio

En la literatura se ha demostrado la eficacia del tratamiento termoquímico desarrollado por T. Kokubo [67], permitiendo generar una capa de apatita en las superficies tratadas, tras las inmersión de las muestras en fluido corporal simulado o SBF (del inglés simulated body fluid) [66]. El titanio tratado químicamente mediante NaOH (5M) seguido de un tratamiento térmico (600°C, 1h), da lugar a la formación a una capa bioactiva de apatita que se une fuertemente al hueso. Aunque la mayoría de los estudios se han llevado a cabo sobre superficies metálicas lisas, existe menos información sobre muestras porosas [68]–[70]. En las estructuras porosas de titanio, el crecimiento del hueso en el interior de los poros está parcialmente limitado. Por este motivo es necesario buscar tratamientos sencillos que faciliten el crecimiento del hueso hacia su interior. *Toshiyuki Kawai et al*, [347] demostraron que dicho tratamiento termoquímico permite obtener una capa uniforme bioactiva de titanato de sodio que favorece la penetración del hueso hacia su interior y, por tanto, dotándolo de unas mejores propiedades mecánicas (anclaje mecánico) y osteoinductoras.

Por ejemplo, para el caso del reemplazo total de cadera (Total Hip Replacement), estos tratamientos se han aplicado sobre las estructuras porosas de titanio que recubren tanto la copa acetabular como el vástago de las prótesis de cadera con una gran tasa de éxito. Al cabo de dos semanas de implantación se apreciaba la formación de hueso nuevo íntimamente unida a la superficie metálica [348]

El primer objetivo de este apartado es aplicar este tratamiento termoquímico desarrollado por T. Kokubo (a partir de ahora identificado como Kokubo convencional) sobre las estructuras porosas fabricadas anteriormente mediante impresión 3D (extrusión de tinta).

Finalmente, y a la hora de aplicar este proceso de modificación a nivel industrial, un segundo objetivo ha sido reducir el tiempo del proceso para reducir tiempos y costes de fabricación. En este caso se ha estudiado la viabilidad de reducir el tiempo de ataque alcalino. En la tabla 8.10 se muestra la codificación de las muestras tratadas superficialmente, así como los tiempos de ataque alcalino utilizado en cada caso. En el apartado 3.7.2 de materiales y métodos se describe el tratamiento.

Tabla 8.10 Identificación de las muestras con el tratamiento termoquímico de Kokubo.

Muestras			
	K6	K10	K24 (convencional)
Etapa 1	Ataque NaOH 6 horas	Ataque NaOH 10 horas	Ataque NaOH 24 horas
Etapa 2	Tratamiento térmico	Tratamiento térmico	Tratamiento térmico

La validación del tratamiento sobre las estructuras porosas, así como la reducción del tiempo de ataque alcalino se llevó a cabo por medio de un estudio de la topografía, tanto en el exterior como en el interior de los poros, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), así como una caracterización físico-química superficial mediante espectroscopía Raman y

Anexos

difracción de rayos X. Finalmente, se evaluó la bioactividad de las diferentes muestras tratadas sumergiéndolas en una solución de SBF a diferentes tiempos.

8.3.1.1 Estructura superficial

Se analizó la superficie exterior e interior de las muestras (figura 8.64), para asegurar que el tratamiento penetra a través de los poros. No se observaron diferencias entre el interior y el exterior de las muestras por lo que únicamente se presentarán imágenes del interior

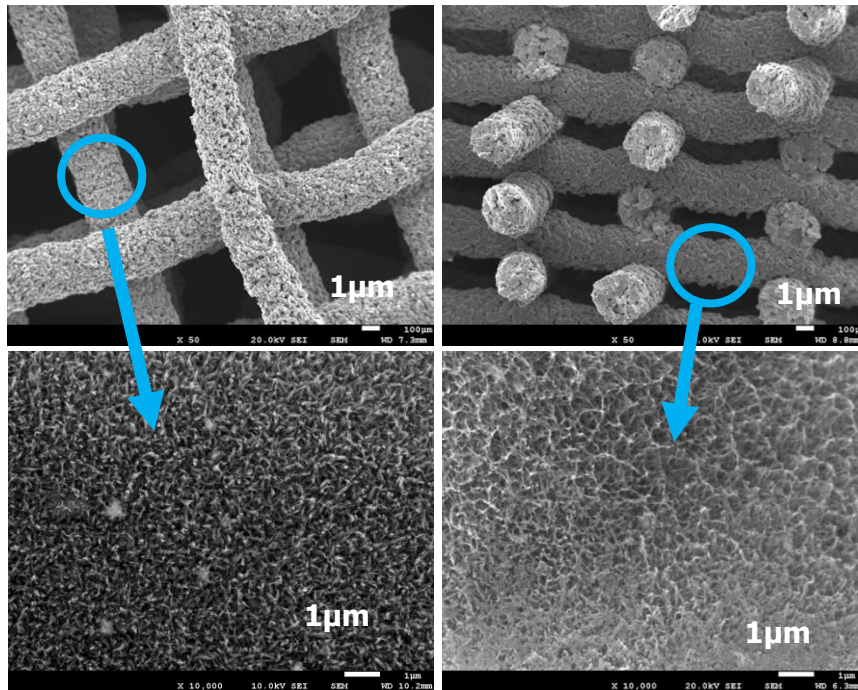


Figura 8.64 Imágenes SEM a 50 y 10k aumentos de la superficie exterior e interior de las muestras K24.

En la figura 8.65 se presenta el aspecto superficial de las muestras tratadas a 6, 10 y 24 horas de ataque alcalino, seguido del tratamiento térmico a 600°C durante una hora.

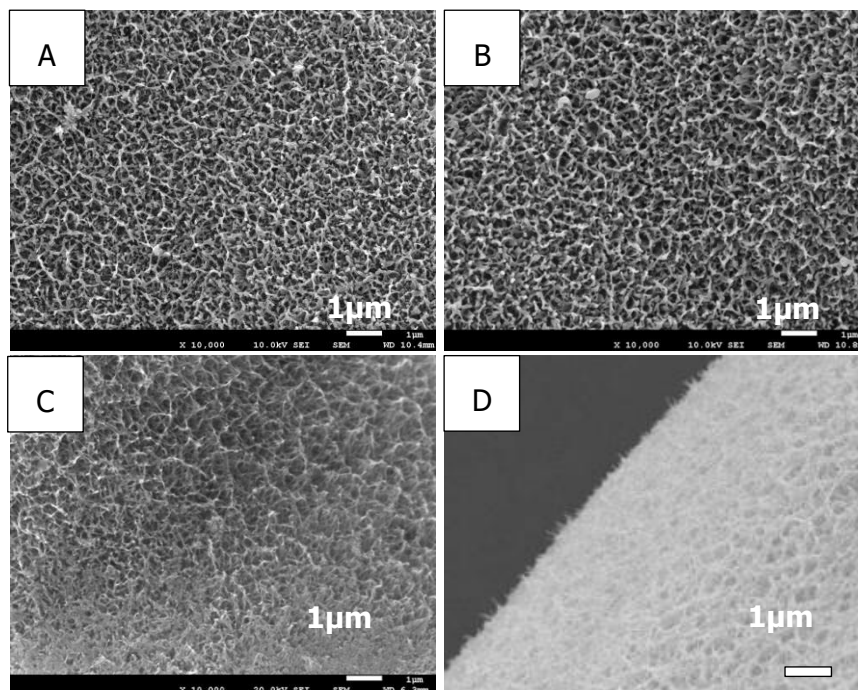


Figura 8.65 Imágenes SEM a 10k aumentos de la superficie de las muestras porosas A) K6, B) K10, C) K24. D) Imagen de la literatura de una muestra a la que se le ha realizado el mismo tratamiento que a K24 (control) [349].

Se puede ver claramente que no existen diferencias significativas al reducir el tiempo del ataque alcalino. En todas las micrografías se distingue una topografía acicular porosa (fases tipo pluma), estructura típica del titanato de sodio ($\text{Na}_2\text{Ti}_6\text{O}_{13}$) que está reportado en la literatura [329], [182].

8.3.1.2 Análisis fisicoquímico

Se ha utilizado la espectroscopia Raman ya que es una técnica espectroscópica molecular que proporciona información sobre las vibraciones intramoleculares e intermoleculares ("huella molecular") y que además puede proporcionar información adicional sobre los modos de frecuencia más baja que permiten estudiar la red cristalina. Por tanto, esta técnica conjuntamente con DRX son de gran utilidad para estudiar las fases cristalográficas que aparecen durante los diferentes tratamientos termoquímicos.

En la figura 8.66 se presentan los resultados de las muestras antes del tratamiento térmico, ya que tras el tratamiento térmico la intensidad de los picos de anatasa y rutilo aumenta y no es posible observar si se ha formado el titanato de sodio.

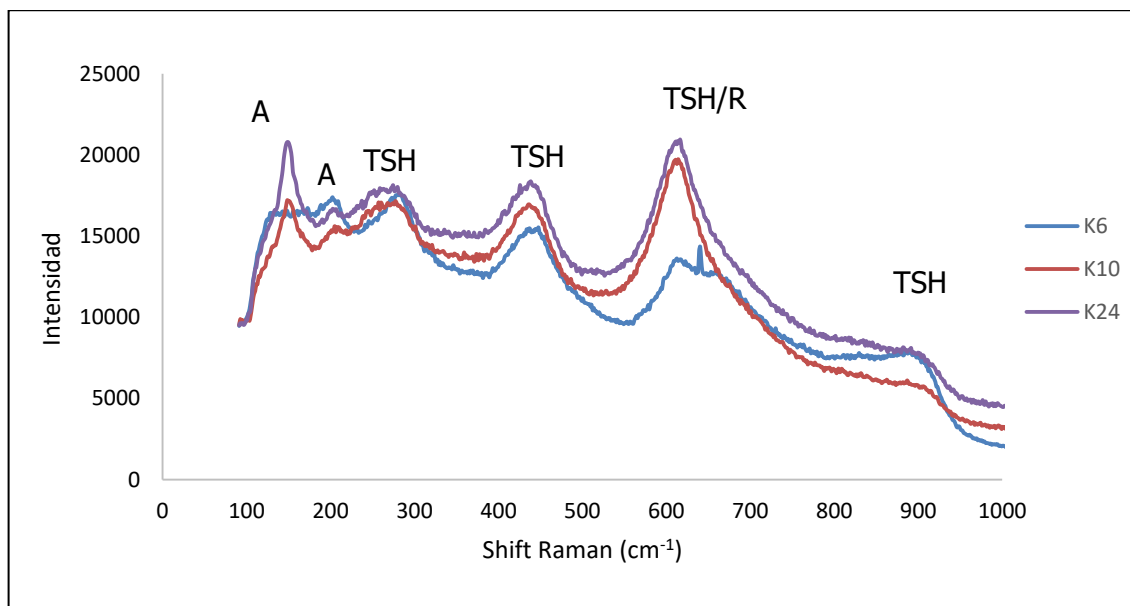


Figura 8.66 Espectro Raman de las muestras tras el ataque alcalino a diferentes tiempos (sin tratamiento térmico). A: anatasa, TSH: titanato de sodio hidrogenado, R: rutilo.

En la Figura 8.66 se pueden identificar los picos pertenecientes a los óxidos de titanio (TiO_2) en forma de anatasa y rutilo, así como el del titanato de sodio hidrogenado con estequiometría $\text{Na}_x\text{H}_{2-x}\text{Ti}_y\text{O}_{2y+1}$, donde $0 < x < 2$ e $y = 2, 3, \text{ o } 4$, coincidiendo con los resultados de la literatura [178], [179], [182], [350]. El ensayo confirma que para todos los tiempos ensayados se observa la presencia de las fases cristalográficas esperadas. Para el caso de óxido de titanio, tipo rutilo (R), los picos están en posiciones cercanas a los del titanato de sodio (TSH) por lo que es difícil determinar su presencia. Aunque se puede ver que cuanto mayor es el tiempo de ataque alcalino mayor es la intensidad de los picos, no se puede asociar a un porcentaje o medida cuantitativa; simplemente identifica la presencia de un componente.

Para completar la información obtenida de los resultados de Raman, se realizaron estudios mediante difracción de Rayos X después del tratamiento térmico. En este caso, los ensayos se realizaron sobre muestras lisas ya que no se pudo realizar directamente sobre las muestras porosas. Se considera que los espectros obtenidos (figura 8.67) sobre las muestras lisas son muy similares a los que se obtienen en las muestras porosas de titanio.

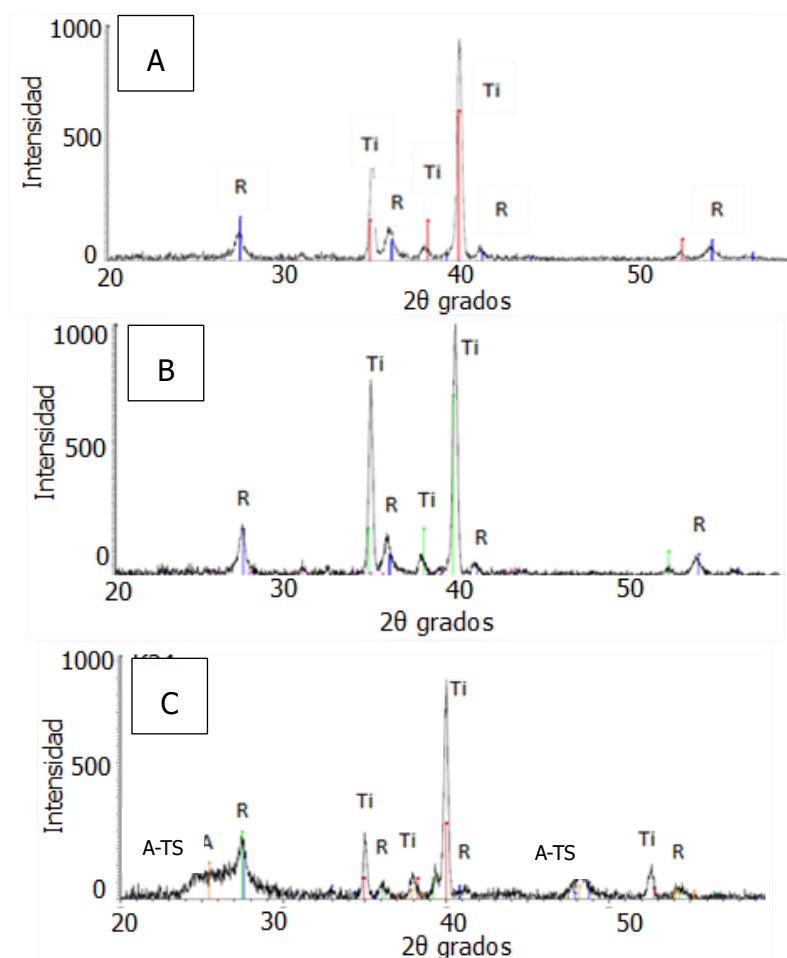


Figura 8.67 Diagrama de DRX de las muestras lisas A) K6, B) K10 y C) K24 (tratamiento completo). TS: titanato de sodio, R: rutilo, Ti: titanio.

En la figura 8.67 se observa como en todas las muestras se identifican los picos característicos del rutilo, formado tras el tratamiento térmico a 600°C.

Los resultados de Raman (figura 8.66) indicaron la formación de titanato de sodio hidrogenado ($\text{Na}_x\text{H}_{2-x}\text{Ti}_y\text{O}_{2y+1}$, donde $0 < x < 2$ e $y = 2, 3, \text{ o } 4$) en todas las muestras, que tras el tratamiento térmico debería dar lugar a titanato de sodio ($\text{Na}_2\text{Ti}_y\text{O}_{2y+1}$, donde $y = 5, 6, \dots$) y rutilo [182]. Sin embargo, únicamente en el diagrama de DRX de la muestra K24 (figura 8.67) se pueden distinguir dos picos alrededor de 24 y 48 grados, que acorde con la literatura pertenecen al titanato de sodio [178], [179], [182]. Esta podría ser debido a que en las muestras K6 y K10 no se genera titanato de sodio suficiente como para ser detectado por DRX. La espectroscopia Raman tiene una profundidad de penetración de análisis mayor.

8.3.1.3 Formación de apatita

Inmersión 7 días en SBF

Para verificar la bioactividad de las superficies tratadas se siguió la norma ISO 23317:2014 (evaluación in vitro de la capacidad de formación de apatita de los materiales de implantes). Se sumergieron las muestras porosas (K6, K10 y K24) en SBF. Después de distintos días de inmersión, se observaron las superficies tanto del exterior como del interior mediante microscopía electrónica de barrido. En la Figura 8.68. se presentan las micrografías de las muestras tras 7 días de incubación en SBF.

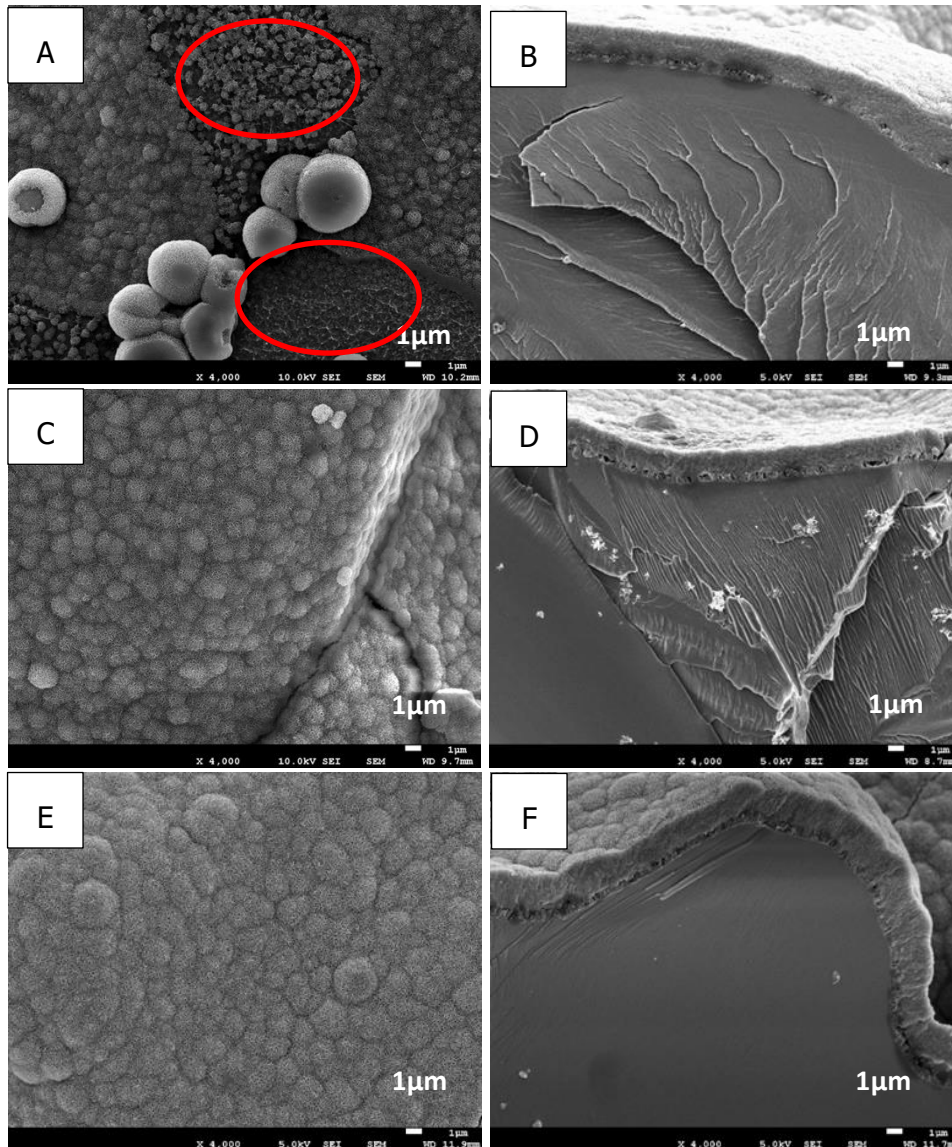


Figura 8.68 Imágenes SEM a 4K aumentos de la superficie y la sección de la capa generada tras sumergir las muestras A y B) K6, C y D) K10 y E y F) K24 en SBF durante 7 días.

Como se aprecia en las imágenes de la figura 8.68, tras sumergir las muestras 7 días en SBF se genera una capa en la superficie, formada por aglomeraciones de elementos de morfología esferoidal. Este tipo de precipitados son iguales a los descritos en la literatura, en donde se

identifican estas estructuras tipo "isla" como cristales de apatita [177]–[179], [182], [351]. Por lo cual, se puede asumir que las estructuras obtenidas son apatita.

Analizando la superficie de rotura (Figura 8.68 B, D y F) se puede ver la homogeneidad de la capa, con un espesor de aproximadamente 2 μm . Además, se confirma que la bioactividad se produce en toda la muestra, ya que se observa formación de apatita en el interior de los poros.

Comparando las micrografías obtenidas con las de la literatura se ha afirmado que la capa formada tras la inmersión de las muestras en SBF es apatita. Para corroborar esta afirmación y asegurar que estos precipitados esféricos son cristales de apatita se realizó una caracterización mediante análisis elemental EDS y espectroscopia Raman. En este caso no se pretende comparar condiciones, únicamente caracterizar los precipitados (que son idénticos en todas las muestras) para confirmar que se trata de apatita. En la tabla 8.11 se presentan la cuantificación del EDS.

Tabla 8.11 Análisis elemental EDS (%at.) de capa de precipitados generada en la muestra K24 tras la inmersión de las muestras en SBF

	O	Ca	P	Ti	Ca/P
Superficie precipitados	47,9 \pm 1	18,9 \pm 0,5	10,9 \pm 0,5	22,3 \pm 1	1,7 \pm 0,5

Los resultados del EDS indican que las muestras tras ser sumergidas en SBF generan una capa en la superficie que está compuesta por calcio y fósforo, seguramente en forma de fosfatos de calcio, con una ratio Ca/P de 1,7. Según la literatura esta ratio concuerda con la de la apatita [310]. En la figura 8.69 se presentan los resultados del análisis mediante Raman de los precipitados de la muestra K24 tras la inmersión 7 días en SBF.

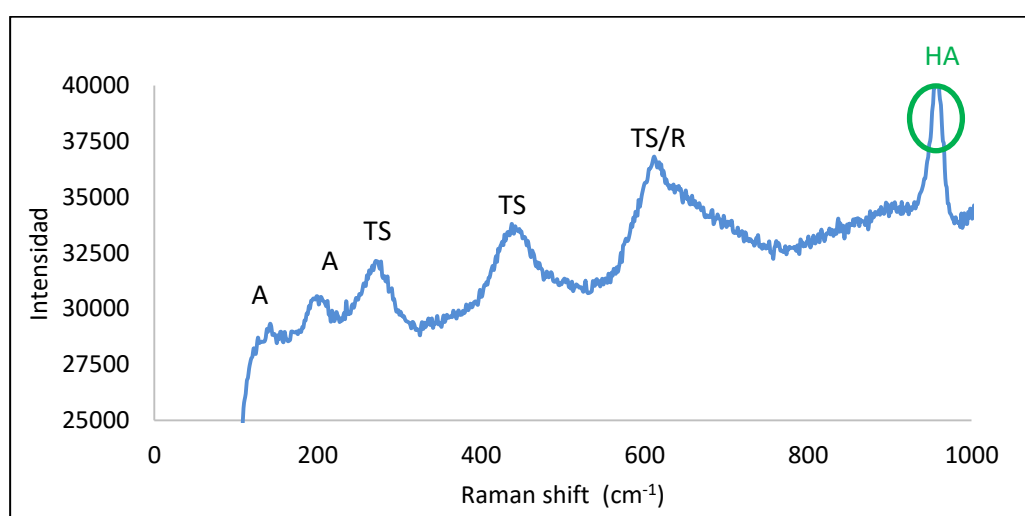


Figura 8.69 Espectro Raman de la capa de precipitados generada en la muestra K24 tras la inmersión en SBF durante 7 días. A: anatasa, TS: titanato de sodio, R: rutilo, HA: hidroxiapatita.

Anexos

En el espectro obtenido se distingue un pico pronunciado a 960 cm^{-1} , confirmando que se trata de hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$), un mineral del grupo de la apatita [352].

Inmersión 5 y 3 días en SBF

En todas las muestras se observaron precipitados; sin embargo, en las muestras K6 se vieron zonas de menos densidad y tamaño, e incluso sin precipitados (figura 8.68 A). Entre las muestras K10 y K24 no se observaron diferencias en la capacidad de formación de precipitados tras 7 días en SBF, por lo que se decidió reducir el tiempo de inmersión. En las figuras 8.70 y 8.71 se presentan las micrografías de las muestras K10 y K24 tras estar 5 y 3 días en SBF.

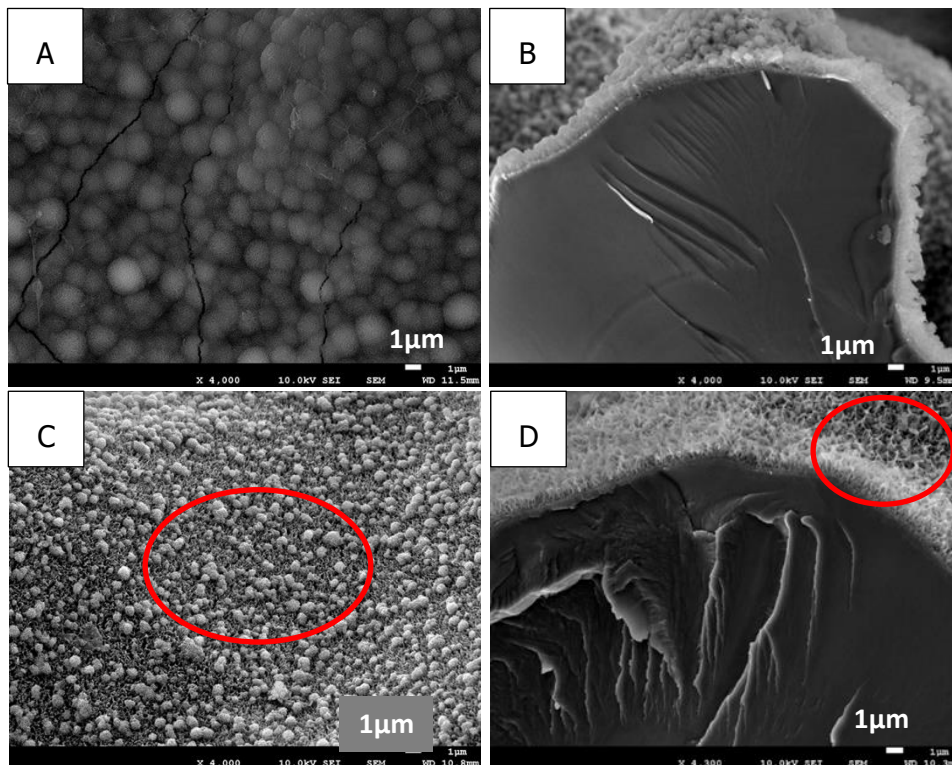


Figura 8.70 Imágenes SEM a 4K aumentos de superficie y sección tras sumergir en SBF: A y B) K10 5 días, C y D) K10 3 días.

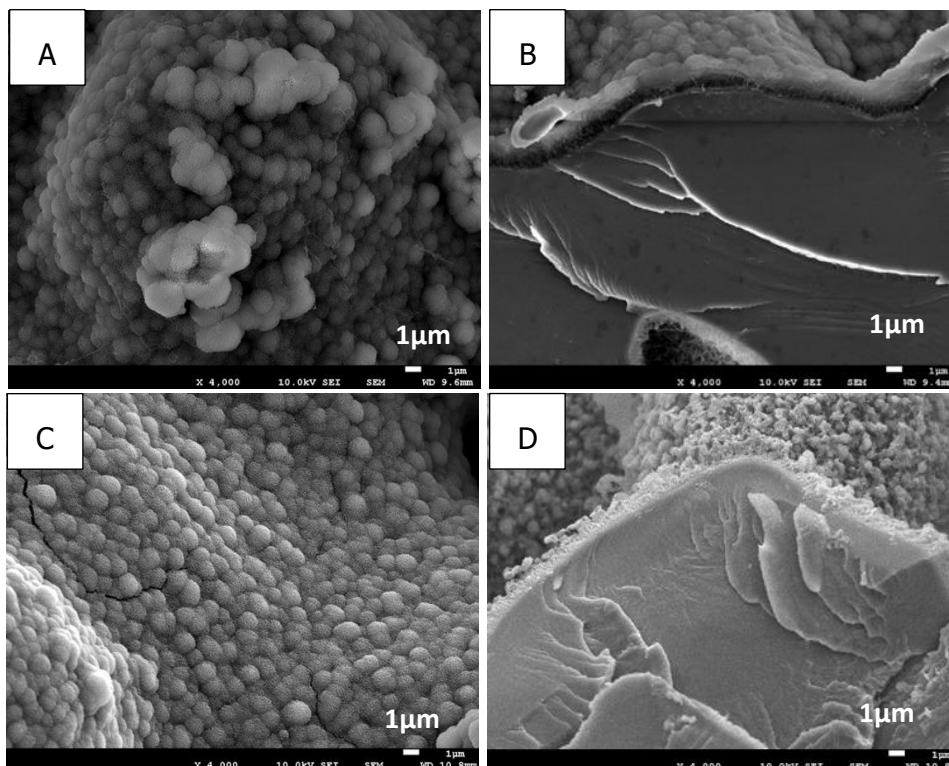


Figura 8.71 Imágenes SEM a 4K aumentos de superficie y sección tras sumergir en SBF: A y B) K24 5 días, C y D) K24 3 días.

En la figura 8.70 A y 8.71 A se puede ver como a pesar de reducir el tiempo de inmersión en SBF a 5 días, en las muestras K10 y K24 siguen presentando una superficie completamente recubierta por la capa de precipitados. Al mantener las muestras solo 3 días en SBF, la K10 presenta precipitados de menor tamaño dispersos sobre la superficie sin llegar a recubrirla por completo figura 8.70 C, mientras que la K24 muestra la estructura típica de la capa de precipitados de apatita [177]–[179], [182], [351] (figura 8.71 C). Si se observan las superficies de rotura (figura 8.68 B, D y F, figura 8.70 C y D y figura 8.71 B y D) de todas las muestras, se puede ver como el espesor de la capa de apatita disminuye al reducir el tiempo de inmersión SBF en todos los casos.

Como conclusión, es posible aplicar el tratamiento térmico convencional de T. Kokubo sobre las muestras porosas de titanio fabricadas mediante la técnica desarrollada (extrusión 3D de tintas). Con este tratamiento se consigue formar titanatos de sodio, anatasa y rutilo en la superficie y en el interior de las muestras, mejorando así la capacidad de formación de apatita. Al reducir la duración del ataque alcalino en 6 y 10 horas (K6 y K10) se observó la estructura típica del titanato de sodio, y se identificó anatasa y rutilo. Sin embargo, no fue posible confirmar la formación del titanato de sodio y el tiempo de formación de apatita en SBF es mayor en comparación con el tratamiento convencional (K24).

8.3.2 formación de titanatos de calcio sobre estructuras porosas de titanio.

A pesar de las ventajas descritas en el apartado anterior, el tratamiento termoquímico convencional (con Na) también presenta ciertos inconvenientes. Los iones Na^+ del titanato de sodio se liberan fácilmente, sobre todo cuando el Ti metal se almacena en un ambiente húmedo, debido al intercambio iónico con los iones H_3O^+ del entorno [180]. Además, los reactivos comerciales de NaOH contienen una pequeña cantidad de impurezas de Ca, y se ha demostrado que en soluciones de NaOH superiores a 30ml existe una contaminación de iones Ca^{2+} que sustituyen al Na^+ en las capas del titanato, provocando una disminución de la reactividad con el SBF [186]. Por otra parte, estos tratamientos no son efectivos para nuevos tipos de aleaciones de Ti tipo Ti-Zr-Nb-Ta [182], [185]. Es posible evitar estos problemas y mejorar el tratamiento reemplazando el titanato de sodio por titanato de calcio [66]. Además, al modificar el tratamiento convencional para sustituir Na por Ca en el titanato, es posible añadir ciertos iones que son efectivos para la promoción del crecimiento óseo, tales como Mg^{2+} [72], Sr^{2+} [72] y Zn^{2+} [73], y otros como Ag^+ [74] y Ga^{3+} [75], que presentan actividad antibacteriana.

T. Kizuki y colaboradores [187], realizaron una modificación del tratamiento termoquímico convencional de T. Kokubo para introducir iones de Ca^{2+} y generar titanatos de calcio. Añadieron dos etapas más: tras el ataque con NaOH una etapa de inmersión en cloruro de calcio (CaCl_2) y después del tratamiento térmico una etapa de inmersión en agua.

En el apartado anterior se demostró que, por medio del tratamiento termoquímico convencional de T. Kokubo, es posible generar titanatos de sodio sobre toda la superficie, tanto interna como externa, de las estructuras porosas de titanio. En este apartado se replicará la modificación del tratamiento convencional [187], con el objetivo de generar titanatos de calcio en las estructuras porosas de titanio. Además, se evaluó el acetato de calcio ($\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$) como reactivo sustituto al cloruro de calcio (CaCl_2) para introducir los iones de Ca^{2+} , ya que, si era posible generar titanatos de calcio sobre estructuras porosas, se aprovecharía el tratamiento para introducir iones Ag^+ [74] y Ga^{3+} [75], y si se utiliza CaCl_2 los iones Cl^- pueden reaccionar con los iones Ag^+ formando precipitados de AgCl . En el apartado 3.7.3 de materiales y métodos se describe con más detalle cada etapa del proceso. En la tabla 8.12 se resume el proceso y se definen las muestras.

Tabla 8.12 Etapas del proceso Kokubo modificado e identificación de las muestras.

	Muestras	
	KAc	KCa
Etapa 1	Ataque NaOH	Ataque NaOH
Etapa 2	Solución 100mM de $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$	Solución 100mM de CaCl_2
Etapa 3	Tratamiento térmico	Tratamiento térmico
Etapa 4	Tratamiento en agua	Tratamiento en agua

Todos los análisis se realizaron tanto en el exterior como en el interior de las muestras porosas, para asegurar que el tratamiento penetra y tiene efecto en de toda la superficie de la estructura.

La validación del tratamiento sobre estructuras porosas, así como la sustitución del cloruro de calcio por acetato de calcio se llevó a cabo por medio de un estudio de la topografía, tanto en el exterior como en el interior de los poros, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), así como una caracterización físico-química superficial mediante espectroscopia Raman. Finalmente, se evaluó la bioactividad de las diferentes muestras tratadas sumergiéndolas en una solución de SBF durante 7 días.

8.3.2.1 Estructura superficial

Se observó la superficie de las muestras mediante microscopía electrónica, para comprobar que la microestructura no cambia al modificar el tratamiento. Además, se llevó a cabo un análisis elemental por EDS, para confirmar la deposición del calcio en la superficie (exterior e interior). En la figura 8.72 se presentan las micrografías de las muestras tras el tratamiento modificado de Kokubo (tabla 8.12); tratadas con acetato (KAc) y cloruro (KCa) de calcio.

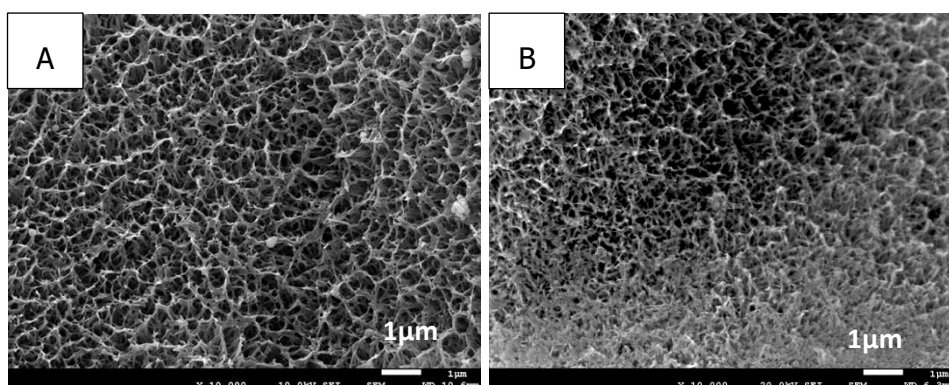


Figura 8.72 Imágenes SEM a 10k aumentos de la superficie de las muestras tratadas con: A) acetato (KAc) y B) cloruro de calcio (KCa).

No se aprecian diferencias entre muestras, las dos presentan la microestructura característica del tratamiento termoquímico de Kokubo (figura 8.64). T. Kizuki y colaboradores [187], realizaron una comparativa, mediante imágenes SEM, de las microestructuras obtenidas en cada una de las etapas del tratamiento convencional y del modificado con calcio, y al igual que en este trabajo, no encontraron diferencias. En la tabla 8.13 se recogen los resultados de la cuantificación de los análisis EDS.

Tabla 8.13 Análisis elemental EDS (%at.) de las muestras KAc y KCa.

	O	Ca	Ti
KAc	32,7±0,6	1,5±0,1	65,8±0,6
KCa	31,9±0,6	1,4±0,1	66,7±0,6

Anexos

Los resultados de los análisis representados en la tabla 8.13 indican la presencia de calcio en la superficie (exterior e interior) de las dos muestras sin diferencias significativas entre ellas. No se ha encontrado Na en las muestras, lo cual indica que los iones Ca^{2+} han desplazado y sustituido los de Na^+ .

8.3.2.2 Análisis fisicoquímico

Para saber de qué forma se ha incorporado el calcio en la estructura se realizó una caracterización físico-química. De igual modo que en el apartado anterior se llevaron a cabo los análisis mediante espectroscopia Raman (figura 8.73) de las muestras antes de la etapa de tratamiento térmico (etapa 1 y 2 tabla 8.12), ya que después los picos de anatasa y rutilo apantallan los del titanato.

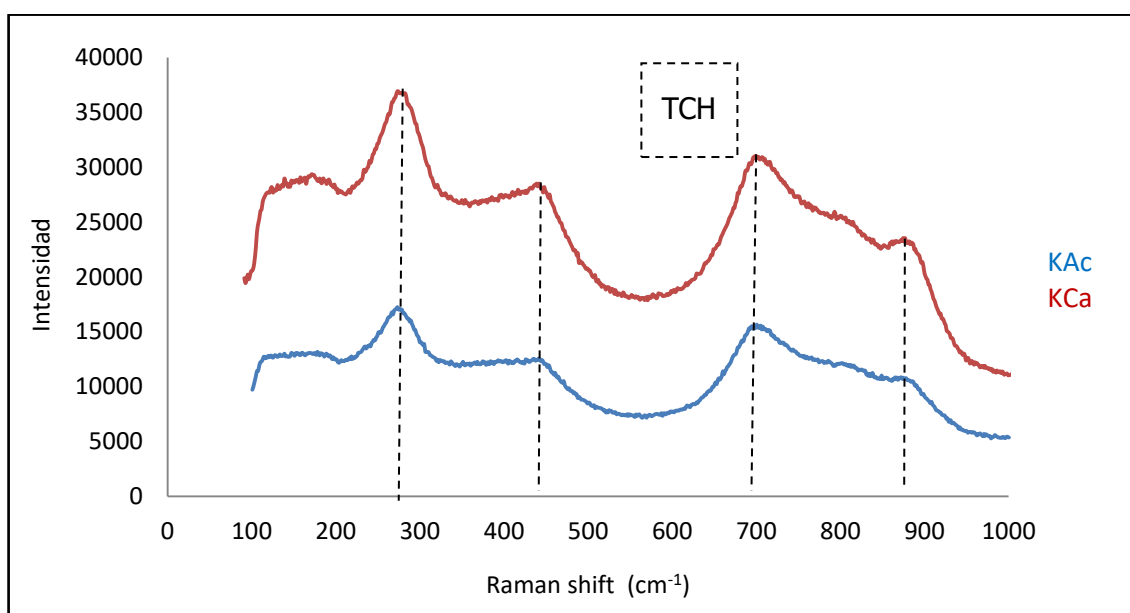


Figura 8.73 Espectros Raman de las muestras tras la inmersión en acetato (KAc) y cloruro (KCa) de calcio (antes del tratamiento térmico). TCH: titanato de calcio hidrogenado.

Los espectros que se obtienen con los tratamientos con $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$ (KAc) y CaCl_2 (KCa) son idénticos. En la figura 8.73 se pueden identificar en ambas muestras los picos pertenecientes al titanato de calcio hidrogenado; por lo tanto, se puede suponer que ha habido un intercambio de iones de Na por Ca, tal y como esta referenciado en la literatura [187].

Según lo publicado por T. Kokubo y colaboradores [66], el titanato de sodio hidrogenado, generado por el tratamiento con NaOH, tiene una estructura en capas y los iones de Na^+ , ubicados en los espacios intermedios, pueden ser reemplazados fácilmente por iones Ca^{2+} . Al sumergir el Ti en una solución que contiene Ca (soluciones de $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$ y CaCl_2), después del tratamiento con NaOH, el titanato de sodio hidrogenado se convierte por completo en titanato de calcio hidrogenado ($\text{Ca}_x\text{H}_{2-2x}\text{Ti}_3\text{O}_7$) mediante la sustitución de los iones Na^+ y H^+ por iones Ca^{2+} [66].

Por lo tanto, se ha conseguido replicar la modificación del tratamiento convencional con CaCl_2 de T. Kizuki [187] sobre muestras porosas de titanio y generar titanatos de calcio en toda la estructura. Además, confirma que el $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$ se puede utilizar como reactivo sustituto del

CaCl_2 para introducir los iones de Ca^{2+} . Con los resultados de Raman y la experiencia del apartado anterior, no se consideró necesario realizar una caracterización complementaria con otra técnica como DRX.

8.3.2.3 Formación de apatita

En la figura 8.74 se presentan las micrografías de las muestras tratadas con acetato y cloruro de calcio, tras 7 días de incubación en SBF.

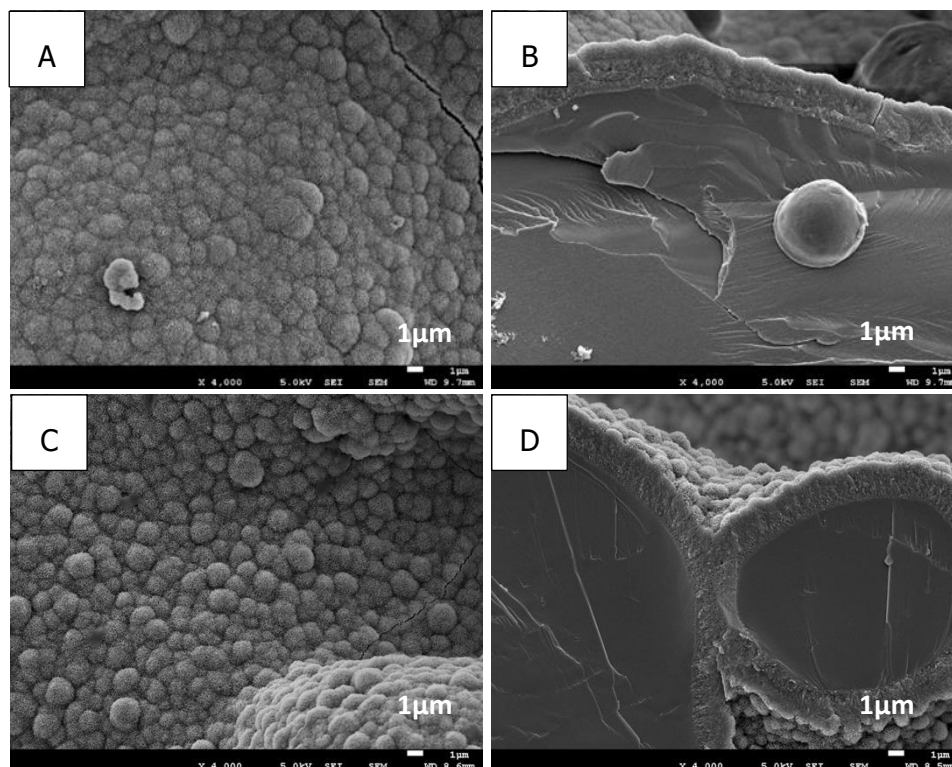


Figura 8.74 Imágenes SEM a 4K aumentos de la superficie y la sección de la capa generada tras sumergir las muestras 7 días en SBF. A) y B) Muestras tratadas con acetato de calcio (KAc) y C) y D) con cloruro de calcio (KCa).

En las imágenes se puede distinguir la capa de cristales de apatita recubriendo toda la superficie, como sucede en las muestras con el tratamiento convencional de Kokubo (figura 8.68), y coincidiendo con los resultados de la literatura [66], [187]. En el anterior apartado se caracterizaron estos precipitados esféricos que forman la capa y se confirmó mediante Raman que se trata de cristales de hidroxiapatita (figura 8.69). En las superficies de rotura de las muestras KAc y KCa (figura 8.47 B y D), se puede ver como los espesores de capa son iguales, ligeramente superiores en alguna zona concreta, a los obtenidos en las muestras con el tratamiento convencional (figura 8.68 F).

Con estos resultados no es posible afirmar que el tratamiento modificado para añadir calcio es mejor que el tratamiento convencional de T. Kokubo. Sin embargo, Kizuki y colaboradores [187], demostraron los iones Ca^{2+} promueven la formación de apatita de manera más efectiva que los iones Na^+ . El ion Ca^{2+} es uno de los componentes de la apatita y, por lo tanto, el intercambio iónico de este aumenta efectivamente la actividad de la apatita en el fluido circundante [66].

Anexos

No se consideró necesario realizar más ensayos a menos días de inmersión en SBF, ya que el objetivo principal del estudio era conseguir generar titanatos de calcio bioactivos sobre las estructuras 3D de titanio poroso, y con los experimentos realizados es suficiente para asegurar que se ha cumplido exitosamente, utilizando acetato o cloruro de calcio.

9. REFERENCIAS

- [1] J. E. Aubin and J. T. Triffitt, *Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation*. 2002.
- [2] "Tejido óseo. Atlas de Histología Vegetal y Animal." [Online]. Available: https://mmegias.webs.uvigo.es/guiada_a_oseo.php. [Accessed: 19-Jun-2017].
- [3] J. S. Walsh, "Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation," *Surg. (United Kingdom)*, vol. 33, no. 1, pp. 1–6, 2015.
- [4] C. Mandrycky, Z. Wang, K. Kim, and D. H. Kim, "3D bioprinting for engineering complex tissues," *Biotechnology Advances*, vol. 34, no. 4. Elsevier Inc., pp. 422–434, 2016.
- [5] X. Wang *et al.*, "Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: A review," *Biomaterials*, vol. 83. pp. 127–141, Mar-2016.
- [6] J. L. Ong, M. R. Appleford, and G. Mani, *Introduction to Biomaterials: Basic Theory with Engineering Applications*, vol. 2013. 2013.
- [7] F. Gil and J. Planell, "Aplicaciones biomédicas del titanio v sus aleaciones," *Biomecánica*, no. JANUARY 1993, pp. 34–42, 1993.
- [8] J. A. P. Estany, E. Tomàs, and A. Viladot, "Aliatges metàl·lics per a implantaments ossis i articulars," *Butlletí les Soc. Catalanes Física, Química, Matemàtiques i Tecnol.*, vol. VI, pp. 47–60, 1985.
- [9] K. Alvarez and H. Nakajima, "Metallic Scaffolds for Bone Regeneration," *Mater. 2009*, pp. 790–832, 2009.
- [10] V. Karageorgiou and D. Kaplan, "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 5474–5491, 2005.
- [11] S. F. Hulbert, S. J. Morrison, and J. J. Klawitter, "Tissue reaction to three ceramics of porous and non-porous structures," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 6, no. 5, pp. 347–374, Sep. 1972.
- [12] L. D. Zardiackas, D. E. Parsell, L. D. Dillon, D. W. Mitchell, L. A. Nunnery, and R. Poggie, "Structure, metallurgy, and mechanical properties of a porous tantalum foam," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 58, no. 2, pp. 180–7, 2001.
- [13] L. Duplomb, M. Dagouassat, P. Jourdon, and D. Heymann, "Differentiation of osteoblasts from mouse embryonic stem cells without generation of embryoid body," *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.*, vol. 43, no. 1, pp. 21–24, Mar. 2007.
- [14] V. K. Balla, S. Bodhak, S. Bose, and A. Bandyopadhyay, "Porous tantalum structures for bone implants: Fabrication, mechanical and in vitro biological properties," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 8, pp. 3349–3359, 2010.
- [15] J. D. Bobyng, G. J. Stackpool, S. A. Hacking, M. Tanzer, and J. J. Krygier, "Characteristics of bone ingrowth and interface mechanics of a new porous tantalum biomaterial," *J. Bone Joint Surg. Br.*, vol. 81, no. 5, pp. 907–14, Sep. 1999.
- [16] H. Yuan, K. Kurashina, J. D. De Bruijn, Y. Li, K. De Groot, and X. Zhang, "A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics," *Biomaterials*, vol. 20, pp. 1799–1806, 1999.
- [17] J. L. Del Pozo *et al.*, "The electricidal effect is active in an experimental model of Staphylococcus epidermidis chronic foreign body osteomyelitis," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 53, no. 10, pp. 4064–4068, 2009.
- [18] N. Brogini *et al.*, "Peri-implant In fl ammation De fi ned by the Implant-Abutment

Referencias

- Interface," *J Dent Res*, vol. 85, no. 5, pp. 473–478, 2011.
- [19] J. Mouhyi, D. M. Dohan Ehrenfest, and T. Albrektsson, "The Peri-Implantitis: Implant Surfaces, Microstructure, and Physicochemical Aspects," *Clin. Implant Dent. Relat. Res.*, vol. 14, no. 2, pp. 170–183, 2012.
- [20] S. Lischer *et al.*, "Antibacterial burst-release from minimal Ag-containing plasma polymer coatings," *J. R. Soc. Interface*, vol. 8, no. 60, pp. 1019–1030, Jul. 2011.
- [21] R. Wang, K. G. Neoh, Z. Shi, E. T. Kang, P. A. Tambyah, and E. Chiong, "Inhibition of escherichia coli and proteus mirabilis adhesion and biofilm formation on medical grade silicone surface," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 109, no. 2, pp. 336–345, 2012.
- [22] L. G. Harris and R. G. Richards, "Staphylococci and implant surfaces: a review," *Injury*, vol. 37, no. 2 SUPPL., 2006.
- [23] C. R. Arciola, D. Campoccia, P. Speziale, L. Montanaro, and J. W. Costerton, "Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials," *Biomaterials*, vol. 33, no. 26, pp. 5967–5982, 2012.
- [24] B. Gottenbos, H. C. Van Der Mei, and H. J. Busscher, "Initial adhesion and surface growth of Staphylococcus epidermidis and Pseudomonas aeruginosa on biomedical polymers," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 50, no. 2, pp. 208–214, 2000.
- [25] M. Walkowiak-Przybyło *et al.*, "Adhesion, activation, and aggregation of blood platelets and biofilm formation on the surfaces of titanium alloys Ti6Al4V and Ti6Al7Nb," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 100 A, no. 3, pp. 768–775, 2012.
- [26] D. Lindsay and A. von Holy, "Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know," *J. Hosp. Infect.*, vol. 64, no. 4, pp. 313–325, 2006.
- [27] P. Watnick and R. Kolter, "Biofilm, city of microbes," *J. Bacteriol.*, vol. 182, no. 10, pp. 2675–2679, 2000.
- [28] Y. H. An and R. J. Friedman, "Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 43, no. 3, pp. 338–348, 1998.
- [29] M. Godoy Gallardo, "Development of antibacterial coatings for titanium dental implants based on different strategies," *TDX (Tesis Dr. en Xarxa)*, Apr. 2015.
- [30] H. Chourifa, H. Bouloussa, V. Migonney, and C. Falentin-Daudré, *Review of titanium surface modification techniques and coatings for antibacterial applications*, vol. 83. Acta Materialia Inc., 2019, pp. 37–54.
- [31] A. Nouri and C. Wen, *Introduction to surface coating and modification for metallic biomaterials*. Elsevier Ltd, 2015.
- [32] T. P. Schaer, S. Stewart, B. B. Hsu, and A. M. Klibanov, "Hydrophobic polycationic coatings that inhibit biofilms and support bone healing during infection," *Biomaterials*, vol. 33, no. 5, pp. 1245–1254, 2012.
- [33] P. H. Chua, K. G. Neoh, Z. Shi, and E. T. Kang, "Structural stability and bioapplicability assessment of hyaluronic acid-chitosan polyelectrolyte multilayers on titanium substrates," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 87, no. 4, pp. 1061–1074, 2008.
- [34] L. G. Harris, S. Tosatti, M. Wieland, M. Textor, and R. G. Richards, "Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly(L-lysine)-grafted- poly(ethylene glycol) copolymers," *Biomaterials*, vol. 25, no. 18, pp. 4135–4148, 2004.
- [35] H. Jenssen and R. E. W. Hancock, "Antimicrobial properties of lactoferrin," *Biochimie*, vol. 91, no. 1, pp. 19–29, 2009.

- [36] I. A. García-Montoya, T. S. Cendón, S. Arévalo-Gallegos, and Q. Rascón-Cruz, "Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1820, no. 3, pp. 226–236, 2012.
- [37] L. Feller, Y. Jadwat, R. A. G. Khammissa, R. Meyerov, I. Schechter, and J. Lemmer, "Cellular responses evoked by different surface characteristics of intraosseous titanium implants," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, 2015.
- [38] Z. Qu, X. Rausch-fan, M. Wieland, M. Matejka, and A. Schedle, "The initial attachment and subsequent behavior regulation of osteoblasts by dental implant surface modification," pp. 7–9, 2007.
- [39] P. T. De Oliveira *et al.*, "Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 80, no. 3, pp. 554–564, Mar. 2007.
- [40] N. K. Awad, S. L. Edwards, and Y. S. Morsi, "A review of TiO₂ NTs on Ti metal: Electrochemical synthesis, functionalization and potential use as bone implants," *Materials Science and Engineering C*, vol. 76. Elsevier, pp. 1401–1412, 01-Jul-2017.
- [41] S. Spriano, S. Yamaguchi, F. Baino, and S. Ferraris, "A critical review of multifunctional titanium surfaces: New frontiers for improving osseointegration and host response, avoiding bacteria contamination," *Acta Biomater.*, vol. 79, pp. 1–22, 2018.
- [42] B. Ercan, E. Taylor, E. Alpaslan, and T. J. Webster, "Diameter of titanium nanotubes influences anti-bacterial efficacy," *Nanotechnology*, vol. 22, no. 29, p. 295102, Jul. 2011.
- [43] R. O. Darouiche, "Treatment of Infections Associated with Surgical Implants," *N. Engl. J. Med.*, vol. 350, no. 14, pp. 1422–1429, Apr. 2004.
- [44] T. E. Rams, J. E. Degener, and A. J. van Winkelhoff, "Antibiotic resistance in human peri-implantitis microbiota," *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 25, no. 1, pp. 82–90, Jan. 2014.
- [45] J. Grischke, J. Eberhard, and M. Stiesch, "Antimicrobial dental implant functionalization strategies—a systematic review," *Dent. Mater. J.*, vol. 35, no. 4, pp. 545–558, 2016.
- [46] D. Inoue, T. Kabata, K. Ohtani, Y. Kajino, T. Shirai, and H. Tsuchiya, "Inhibition of biofilm formation on iodine-supported titanium implants," *Int. Orthop.*, vol. 41, no. 6, pp. 1093–1099, 2017.
- [47] B. H. Zhao *et al.*, "Effect of Zn content on cytoactivity and bacteriostasis of micro-arc oxidation coatings on pure titanium," *Surf. Coatings Technol.*, vol. 228, no. SUPPL.1, pp. 428–432, 2013.
- [48] G. Jin, H. Cao, Y. Qiao, F. Meng, H. Zhu, and X. Liu, "Osteogenic activity and antibacterial effect of zinc ion implanted titanium," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 117, pp. 158–165, 2014.
- [49] J. Y. Deng, T. Arimoto, Y. Shibata, S. Omori, T. Miyazaki, and T. Igarashi, "Role of chloride formed on anodized titanium surfaces against an oral microorganism," *J. Biomater. Appl.*, vol. 25, no. 2, pp. 179–189, 2010.
- [50] D. A. Armitage *et al.*, "The oxidation of calcium implanted titanium in water: A depth profiling study," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 253, no. 8, pp. 4085–4093, 2007.
- [51] S. N. Nayab, F. H. Jones, and I. Olsen, "The ref for this paper is not attached to the PDF in mendeley," 2007.
- [52] T. R. Rautray, R. Narayanan, T. Y. Kwon, and K. H. Kim, "Surface modification of titanium and titanium alloys by ion implantation," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 93, no. 2, pp. 581–591, 2010.
- [53] L. M. Bjursten, L. Rasmusson, S. Oh, G. C. Smith, K. S. Brammer, and S. Jin, "Titanium

Referencias

- dioxide nanotubes enhance bone bonding in vivo," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 92, no. 3, pp. 1218–1224, 2010.
- [54] M. Diefenbeck *et al.*, "The effect of plasma chemical oxidation of titanium alloy on bone-implant contact in rats," *Biomaterials*, vol. 32, no. 32, pp. 8041–8047, 2011.
- [55] Y. Shibata *et al.*, "The characteristics of in vitro biological activity of titanium surfaces anodically oxidized in chloride solutions," *Biomaterials*, vol. 31, no. 33, pp. 8546–8555, 2010.
- [56] L. Zhao, S. Mei, P. K. Chu, Y. Zhang, and Z. Wu, "The influence of hierarchical hybrid micro/nano-textured titanium surface with titania nanotubes on osteoblast functions," *Biomaterials*, vol. 31, no. 19, pp. 5072–5082, 2010.
- [57] R. Zhou *et al.*, "Osseointegration of bioactive microarc oxidized amorphous phase/TiO₂ nanocrystals composited coatings on titanium after implantation into rabbit tibia," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 25, no. 5, pp. 1307–1318, 2014.
- [58] A. Sharma, A. J. McQuillan, L. A. Sharma, J. N. Waddell, Y. Shibata, and W. J. Duncan, "Spark anodization of titanium–zirconium alloy: surface characterization and bioactivity assessment," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 26, no. 8, 2015.
- [59] L. Xie *et al.*, "Preparation, characterization, in vitro bioactivity, and osteoblast adhesion of multi-level porous titania layer on titanium by two-step anodization treatment," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 98 A, no. 2, pp. 312–320, 2011.
- [60] Y. T. Sul, "The significance of the surface properties of oxidized titanium to the bone response: Special emphasis on potential biochemical bonding of oxidized titanium implant," *Biomaterials*, vol. 24, no. 22, pp. 3893–3907, 2003.
- [61] L. Zhang, Y. Ayukawa, R. Z. LeGeros, S. Matsuya, K. Koyano, and K. Ishikawa, "Tissue-response to calcium-bonded titanium surface," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 95, no. 1, pp. 33–39, 2010.
- [62] A. Valanezhad, K. Tsuru, and K. Ishikawa, "Fabrication of strongly attached hydroxyapatite coating on titanium by hydrothermal treatment of Ti–Zn–PO₄ coated titanium in CaCl₂ solution," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 26, no. 7, pp. 1–10, 2015.
- [63] J. W. Park, K. B. Park, and J. Y. Suh, "Effects of calcium ion incorporation on bone healing of Ti6Al4V alloy implants in rabbit tibiae," *Biomaterials*, vol. 28, no. 22, pp. 3306–3313, 2007.
- [64] J. W. Park, Y. J. Kim, J. H. Jang, T. G. Kwon, Y. C. Bae, and J. Y. Suh, "Effects of phosphoric acid treatment of titanium surfaces on surface properties, osteoblast response and removal of torque forces," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 4, pp. 1661–1670, 2010.
- [65] X. B. Chen, Y. C. Li, J. Du Plessis, P. D. Hodgson, and C. Wen, "Influence of calcium ion deposition on apatite-inducing ability of porous titanium for biomedical applications," *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 5, pp. 1808–1820, 2009.
- [66] T. Kokubo and S. Yamaguchi, "Novel bioactive materials developed by simulated body fluid evaluation: Surface-modified Ti metal and its alloys," *Acta Biomater.*, vol. 44, pp. 16–30, Oct. 2016.
- [67] P. Li, C. Ohtsuki, T. Kokubo, K. Nakanishi, N. Soga, and K. de Groot, "The role of hydrated silica, titania, and alumina in inducing apatite on implants," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 28, no. 1, pp. 7–15, 1994.
- [68] W. Xue, X. Liu, X. Zheng, and C. Ding, "In vivo evaluation of plasma-sprayed titanium coating after alkali modification," *Biomaterials*, vol. 26, no. 16, pp. 3029–3037, 2005.

- [69] D. K. Pattanayak, T. Matsushita, K. Doi, H. Takadama, T. Nakamura, and T. Kokubo, "Effects of oxygen content of porous titanium metal on its apatite-forming ability and compressive strength," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 29, no. 6, pp. 1974–1978, 2009.
- [70] A. Arifin, A. B. Sulong, N. Muhamad, J. Syarif, and M. I. Ramli, "Material processing of hydroxyapatite and titanium alloy (HA/Ti) composite as implant materials using powder metallurgy: A review," *Mater. Des.*, vol. 55, pp. 165–175, 2014.
- [71] Y. Tian, S. Fujibayashi, S. Yamaguchi, T. Matsushita, T. Kokubo, and S. Matsuda, "In vivo study of the early bone-bonding ability of Ti meshes formed with calcium titanate via chemical treatments," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 26, no. 12, 2015.
- [72] J. W. Park, H. J. Ko, J. H. Jang, H. Kang, and J. Y. Suh, "Increased new bone formation with a surface magnesium-incorporated deproteinized porcine bone substitute in rabbit calvarial defects," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 100 A, no. 4, pp. 834–840, 2012.
- [73] K. Alvarez, M. Fukuda, and O. Yamamoto, "Titanium implants after alkali heating treatment with a $[Zn(OH)_4]^{2-}$ complex: analysis of interfacial bond strength using push-out tests," *Clin. Implant Dent. Relat. Res.*, vol. 12, no. SUPPL. 1, pp. 114–125, 2010.
- [74] T. Kizuki, T. Matsushita, and T. Kokubo, "Antibacterial and bioactive calcium titanate layers formed on Ti metal and its alloys," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 25, no. 7, pp. 1737–1746, Jul. 2014.
- [75] S. Yamaguchi *et al.*, "Two-in-One Biointerfaces—Antimicrobial and Bioactive Nanoporous Gallium Titanate Layers for Titanium Implants," *Nanomaterials*, 2017.
- [76] G. Duarri Lladó, R. Busquets Net, and I. Maled Garcia, "Doble osteotomía de calcáneo," *Rev. del Pie y Tobillo*, vol. 29, no. 2, pp. 101–107, Jul. 2015.
- [77] "Patología de los pies," pp. 1–6, 2016.
- [78] M. T. Meléndez Valladar, V. Vicent Carsi, J. M. Gutiérrez Carrera, X. Gascó Adrien, J. P. García Paños, and J. E. Galeote Rodríguez, "Comentario a Doble osteotomía de calcáneo," *Rev. del Pie y Tobillo*, vol. 29, no. 2, pp. 107–108, Jul. 2015.
- [79] "Ankle Technology | Unite3D™ Reconstructive Wedge | Zimmer Biomet." [Online]. Available: <http://www.zimmerbiomet.com/medical-professionals/foot-and-ankle/product/unite3d-reconstructive-wedge.html>. [Accessed: 15-Jun-2017].
- [80] S. C. Sartoretto, M. J. Uzeda, F. B. Miguel, J. R. Nascimento, F. Ascoli, and M. D. Calasans-Maia, "Sheep As an Experimental Model for Biomaterial Implant Evaluation.," *Acta Ortop. Bras.*, vol. 24, no. 5, pp. 262–266, 2016.
- [81] T. Osseoti, "OsseoTi™ Porous Metal For Enhanced Bone Integration an Animal Study," no. August, pp. 2012–2013, 2012.
- [82] "Porous metal device for regenerating soft tissue-to-bone interface," Nov. 2012.
- [83] D. A. Shimko, V. F. Shimko, E. A. Sander, K. F. Dickson, and E. A. Nauman, "Effect of porosity on the fluid flow characteristics and mechanical properties of tantalum scaffolds.," *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, vol. 73, no. 2, pp. 315–24, May 2005.
- [84] J. Black, "Biological performance of tantalum.," *Clin. Mater.*, vol. 16, no. 3, pp. 167–73, 1994.
- [85] B. Levine, "A New Era in Porous Metals: Applications in Orthopaedics," *Adv. Eng. Mater.*, vol. 10, no. 9, pp. 788–792, Sep. 2008.
- [86] R. Anderson, O. Charlotte, and T. Lee, "BIOFOAM Wedge System® BIOFOAM® Wedge System."

Referencias

- [87] P. Classification, "(2) Patent Application Publication (10) Pub. No.: US 2013/0284069 A1," vol. 1, no. 19, 2013.
- [88] P. H. Dong, H. Takahashi, Y. Morikawa, and K. Hayano, "Mechanical characteristics of," vol. 165, pp. 613–619, 2012.
- [89] "Integra ® Titanium Bone Wedge Technical Sheet Integra Cotton Titanium Bone Wedges."
- [90] K. Wong and R. Obert, "BioSync ® Anatomic Reconstruction Wedge Mechanical Characteristics of BioSync ® Reconstruction Wedge – Arthrex Whitepaper," *Brownhill J Biofoam Tech. Monogr. Wright Med. Doc.*, vol. 3, pp. 23–109, 2010.
- [91] A. I. Álvarez López, D. I. García Lorenzo, C. Casanova Morote III, and A. Muñoz Infante, "Luxación traumática de la rodilla, diagnóstico y tratamiento Luxation traumatique du genou, diagnostic et traitement Traumatic luxation of the knee, diagnosis and treatment."
- [92] M. Must, "Análisis comparativo de la rigidez al desplazamiento antero-posterior de la rodilla canina completa, rodilla con rotura del ligamento cruzado anterior y rodilla reparada con la técnica de avance de la tuberosidad tibial," p. 191, 2013.
- [93] B. Dyll and H. Schmelkel, "Tibial tuberosity advancement in small-breed dogs using TTA Rapid implants: complications and outcome," *J. Small Anim. Pract.*, vol. 58, no. 6, pp. 314–322, Jun. 2017.
- [94] "MMP OrthoFoam™ | Canine Cruciate Repair System | Orthomed." [Online]. Available: <https://www.orthomed.co.uk/eu/systems/mmp-canine-cruciate-repair-system/>. [Accessed: 09-Jun-2017].
- [95]: Malcolm G. Ness, "Cuña OrthoFoam MMP para la rotura del ligamento cruzado craneal en perros." p. 35, 2011.
- [96] R. I. D. S. C. DÍAZ-BERTRANA, "Dispositivo para guiar una herramienta de osteotomía u osteotomía," 2006.
- [97] "Dog TTA Rapid Technique - PET DEGREE® Hospital." [Online]. Available: <https://petdegree.com/veterinarian-buffalo-ny/dog-tta-rapid/>. [Accessed: 13-Jun-2017].
- [98] R. J. BOUDRIEAU, "Tibial Plateau Leveling Osteotomy or Tibial Tuberosity Advancement?" *Vet. Surg.*, vol. 38, no. 1, pp. 1–22, Jan. 2009.
- [99] Y. Samoy *et al.*, "TTA Rapid: Description of the Technique and Short Term Clinical Trial Results of the First 50 Cases," *Vet. Surg.*, vol. 44, no. 4, pp. 474–484, May 2015.
- [100] "TTA Rapid Overview."
- [101] A. Sidambe, "Biocompatibility of Advanced Manufactured Titanium Implants—A Review," *Materials (Basel)*, vol. 7, no. 12, pp. 8168–8188, 2014.
- [102] R. German, "Progress in Titanium Metal Powder Injection Molding," *Materials (Basel)*, vol. 6, no. 8, pp. 3641–3662, 2013.
- [103] E. Rupérez, J. M. Manero, K. Riccardi, Y. Li, C. Aparicio, and F. J. Gil, "Development of tantalum scaffold for orthopedic applications produced by space-holder method," *Mater. Des.*, vol. 83, pp. 112–119, 2015.
- [104] B. Arifvianto and J. Zhou, "Fabrication of metallic biomedical scaffolds with the space holder method: A review," *Materials (Basel)*, vol. 7, no. 5, pp. 3588–3622, 2014.
- [105] M. Qian, W. Xu, M. Brandt, and H. P. Tang, "Additive manufacturing and postprocessing of Ti-6Al-4V for superior mechanical properties," *MRS Bull.*, vol. 41, no. 10, pp. 775–784, Oct. 2016.
- [106] J. Yin *et al.*, "High-power laser-matter interaction during laser powder bed fusion," 2019.

- [107] K. Osakada and M. Shiomi, "Flexible manufacturing of metallic products by selective laser melting of powder," *Int. J. Mach. Tools Manuf.*, vol. 46, no. 11 SPEC. ISS., pp. 1188–1193, 2006.
- [108] D. a. Hollander, T. Wirtz, M. Von Walter, R. Linker, A. Schultheis, and O. Paar, "Development of individual three-dimensional bone substitutes using 'Selective laser melting,'" *Eur. J. Trauma*, vol. 29, no. 4, pp. 228–234, 2003.
- [109] F. E. Wiria, J. Y. M. Shyan, P. N. Lim, F. G. C. Wen, J. F. Yeo, and T. Cao, "Printing of Titanium implant prototype," *Mater. Des.*, vol. 31, no. SUPPL. 1, pp. S101–S105, 2010.
- [110] T. Billiet, M. Vandenhaute, J. Schelfhout, S. Van Vlierberghe, and P. Dubruel, "A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 33, no. 26, pp. 6020–6041, 2012.
- [111] M. Lee and B. M. Wu, "Recent advances in 3D printing of tissue engineering scaffolds," *Methods Mol. Biol.*, vol. 868, pp. 257–267, 2012.
- [112] K. S. Boparai and R. Singh, "Advances in Fused Deposition Modeling," in *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, Elsevier, 2017.
- [113] "Desktop Metal launches lower cost 3D printers," *Met. Powder Rep.*, vol. 72, no. 4, p. 283, Jul. 2017.
- [114] "Fisher teams up with Desktop Metal," *Met. Powder Rep.*, vol. 72, no. 6, p. 438, Nov. 2017.
- [115] C. T. Schade, T. F. Murphy, and C. Walton, "Development of atomized powders for additive manufacturing," *Adv. Powder Metall. Part. Mater. - 2014, Proc. 2014 World Congr. Powder Metall. Part. Mater. PM 2014*, pp. 215–225, 2014.
- [116] A. Rogalsky, I. Rishmawi, L. Brock, and M. Vlasea, "Low cost irregular feed stock for laser powder bed fusion," *J. Manuf. Process.*, vol. 35, no. March, pp. 446–456, 2018.
- [117] P. G. Esteban, L. Bolzoni, and E. M. R. E. Gordo, "Introducción al procesado pulvimetalúrgico del titanio," vol. 47, no. 2, 2011.
- [118] M. Güden, E. Çelik, A. Hizal, M. Altindiş, and S. Çetiner, "Effects of compaction pressure and particle shape on the porosity and compression mechanical properties of sintered Ti6Al4V powder compacts for hard tissue implantation," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 85, no. 2, pp. 547–555, 2008.
- [119] Y. Torres, J. J. Pavón, and J. a. Rodríguez, "Processing and characterization of porous titanium for implants by using NaCl as space holder," *J. Mater. Process. Technol.*, vol. 212, no. 5, pp. 1061–1069, 2012.
- [120] X. B. Chen, Y. C. Li, P. D. Hodgson, and C. Wen, "The importance of particle size in porous titanium and nonporous counterparts for surface energy and its impact on apatite formation," *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 6, pp. 2290–2302, 2009.
- [121] W. S. Khan, M. Agarwal, A. A. Malik, A. G. Cox, J. Denton, and E. M. Holt, "Chromium, cobalt and titanium metallosis involving a Nottingham shoulder replacement," *J. Bone Joint Surg. Br.*, vol. 90-B, no. 4, pp. 502–505, Apr. 2008.
- [122] S. Dalal, M. Holt, and J. Denton, "Titanium Metallosis in a Cobalt-chrome-polyethylene Bipolar Shoulder Replacement," *Shoulder Elb.*, vol. 4, no. 1, pp. 30–32, Jan. 2012.
- [123] J. E. Smay, J. Cesarano, and J. A. Lewis, "Colloidal inks for directed assembly of 3-D periodic structures," *Langmuir*, vol. 18, no. 14, pp. 5429–5437, 2002.
- [124] D. B. Kolesky, R. L. Truby, A. S. Gladman, T. A. Busbee, K. A. Homan, and J. A. Lewis, "3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs," *Adv. Mater.*, vol. 26, no. 19, pp. 3124–3130, 2014.

Referencias

- [125] H. Y. He, J. Y. Zhang, X. Mi, Y. Hu, and X. Y. Gu, "Rapid prototyping for tissue-engineered bone scaffold by 3D printing and biocompatibility study," *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2015.
- [126] B. Webb, B. J. Doyle, and W. Australia, "Parameter optimization for 3D bioprinting of hydrogels," 2017.
- [127] R. D. Farahani, K. Chizari, and D. Therriault, "Three-dimensional printing of freeform helical microstructures: a review," *Nanoscale*, vol. 6, pp. 10470–10485, 2014.
- [128] Y. de Hazan, M. Thänert, M. Trunec, and J. Misak, "Robotic deposition of 3d nanocomposite and ceramic fiber architectures via UV curable colloidal inks," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 32, no. 6, pp. 1187–1198, 2012.
- [129] T. Schlordt, S. Schwanke, F. Keppner, T. Fey, N. Travitzky, and P. Greil, "Robocasting of alumina hollow filament lattice structures," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 33, no. 15–16, pp. 3243–3248, Dec. 2013.
- [130] C. Slots *et al.*, "Simple additive manufacturing of an osteoconductive ceramic using suspension melt extrusion," *Dent. Mater.*, vol. 33, no. 2, pp. 198–208, 2017.
- [131] L. Ren *et al.*, "Process parameter optimization of extrusion-based 3D metal printing utilizing PW-LDPE-SA binder system," *Materials (Basel)*, vol. 10, no. 3, 2017.
- [132] B. Michielsen *et al.*, "Preparation of porous stainless steel hollow fibers by robotic fiber deposition," *J. Memb. Sci.*, vol. 437, pp. 17–24, Jun. 2013.
- [133] A. E. Jakus, S. L. Taylor, N. R. Geisendorfer, D. C. Dunand, and R. N. Shah, "Metallic Architectures from 3D-Printed Powder-Based Liquid Inks," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 25, no. 45, pp. 6985–6995, 2015.
- [134] V. G. Rocha *et al.*, "Multimaterial 3D Printing of Graphene-Based Electrodes for Electrochemical Energy Storage Using Thermoresponsive Inks," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, no. 42, pp. 37136–37145, 2017.
- [135] L. Klouda and A. G. Mikos, "Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications -a review," *European J. Pharm. Biopharm.*, vol. 68, no. 1, pp. 34–45, Jan. 2008.
- [136] J. P. Li, J. R. De Wijn, C. A. Van Blitterswijk, and K. De Groot, "Porous Ti6Al4V scaffolds directly fabricated by 3D fibre deposition technique: Effect of nozzle diameter," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 16, no. 12, pp. 1159–1163, 2005.
- [137] J. P. Li, J. R. De Wijn, C. A. Van Blitterswijk, and K. De Groot, "The effect of scaffold architecture on properties of direct 3D fiber deposition of porous Ti6Al4V for orthopedic implants," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 92, no. 1, pp. 33–42, 2010.
- [138] J. P. Li, J. R. De Wijn, C. A. Van Blitterswijk, and K. De Groot, "Porous Ti6Al4V scaffold directly fabricating by rapid prototyping: Preparation and in vitro experiment," *Biomaterials*, vol. 27, no. 8, pp. 1223–1235, 2006.
- [139] J. P. Li *et al.*, "Bone ingrowth in porous titanium implants produced by 3D fiber deposition," *Biomaterials*, vol. 28, no. 18, pp. 2810–2820, 2007.
- [140] M.-K. Ahn, J.-B. Lee, Y.-H. Koh, and H.-E. Kim, "Rapid direct deposition of TiH₂ paste for porous Ti scaffolds with tailored porous structures and mechanical properties," 2016.
- [141] M. Müller, J. Becher, M. Schnabelrauch, and M. Zenobi-Wong, "Printing thermoresponsive reverse molds for the creation of patterned two-component hydrogels for 3D cell culture," *J. Vis. Exp.*, vol. 99, no. 77, pp. 50–63, 2013.
- [142] M. S. H. Akash and K. Rehman, "Recent progress in biomedical applications of Pluronic (PF127): Pharmaceutical perspectives," *J. Control. Release*, vol. 209, pp. 120–138, 2015.

- [143] I. Jiménez-Pardo, "Hidrogeles termosensibles y fotopolimerizables derivados de Pluronic para aplicaciones biomédicas," p. 323, 2014.
- [144] K. Moebus, J. Siepmann, and R. Bodmeier, "Alginate–poloxamer microparticles for controlled drug delivery to mucosal tissue," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 72, no. 1, pp. 42–53, May 2009.
- [145] L. Zhang, "Development and in-vitro evaluation of sustained release Poloxamer 407 (P407) gel formulations of ceftiofur," *J. Control. Release*, vol. 85, no. 1–3, pp. 73–81, Dec. 2002.
- [146] J. Wenzel, "Pluronic® F127 gel formulations of Deslorelin and GnRH reduce drug degradation and sustain drug release and effect in cattle," *J. Control. Release*, vol. 85, no. 1–3, pp. 51–59, Dec. 2002.
- [147] S. Nie, W. L. W. Hsiao, W. Pan, and Z. Yang, "Thermoreversible Pluronic F127-based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel: in vitro drug release, cell cytotoxicity, and uptake studies," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 6, no. 1, pp. 151–66, Jan. 2011.
- [148] Y. Liu *et al.*, "Controlled delivery of recombinant hirudin based on thermo-sensitive Pluronic F127 hydrogel for subcutaneous administration: In vitro and in vivo characterization," *J. Control. Release*, vol. 117, no. 3, pp. 387–95, Feb. 2007.
- [149] C. C. Chang, E. D. Boland, S. K. Williams, and J. B. Hoying, "Direct-write bioprinting three-dimensional biohybrid systems for future regenerative therapies," *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, vol. 98B, no. 1, pp. 160–170, 2011.
- [150] J. ren, "Biodegradable poly(lactic acid): synthesis, modification, processing and applications /," *Biodegrad. Poly(Lactic Acid) Synth. Modif. Process. Appl.*, pp. 1–3, 2010.
- [151] M. P. Arrieta, "Films de PLA y PLA-PHB plastificados para su aplicación en envases de alimentos. Caracterización y análisis de los procesos de degradación," Universitat Politècnica de València, 2013.
- [152] R. Auras, B. Harte, and S. Selke, "An Overview of Polylactides as Packaging Materials," *Macromol. Biosci.*, vol. 4, no. 9, pp. 835–864, Sep. 2004.
- [153] M. Jamshidian, E. A. Tehrany, M. Imran, M. Jacquot, and S. Desobry, "Poly-Lactic Acid: Production, applications, nanocomposites, and release studies," *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 9, no. 5, pp. 552–571, 2010.
- [154] W. Gang and L. Aimin, "Thermal Decomposition and Kinetics of Mixtures of Polylactic Acid and Biomass during Copyrolysis," *Chinese J. Chem. Eng.*, vol. 16, no. 6, pp. 929–933, 2008.
- [155] R. E. Conn *et al.*, "Safety assessment of polylactide (PLA) for use as a food-contact polymer," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 33, no. 4, pp. 273–83, Apr. 1995.
- [156] Y. Ramot, M. Haim-Zada, A. J. Domb, and A. Nyska, "Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 107, pp. 153–162, 2016.
- [157] "Additive manufacturing of PLA structures using fused deposition modelling: Effect of process parameters on mechanical properties and their optimal selection," *Mater. Des.*, vol. 124, pp. 143–157, Jun. 2017.
- [158] "Improving the impact strength of Poly(lactic acid) (PLA) in fused layer modeling (FLM)," *Polymer (Guildf.)*, vol. 114, pp. 242–248, Apr. 2017.
- [159] "Measurements of the mechanical response of unidirectional 3D-printed PLA," *Mater. Des.*, vol. 123, pp. 154–164, Jun. 2017.
- [160] R. T. L. Ferreira, I. C. Amatte, T. A. Dutra, and D. Bürger, "Experimental characterization and micrography of 3D printed PLA and PLA reinforced with short carbon fibers,"

Referencias

Compos. Part B Eng., vol. 124, pp. 88–100, 2017.

- [161] A. M. Haaparanta *et al.*, "Preparation and characterization of collagen/PLA, chitosan/PLA, and collagen/chitosan/PLA hybrid scaffolds for cartilage tissue engineering," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 25, no. 4, pp. 1129–1136, 2014.
- [162] S. Eqtesadi, A. Motealleh, F. H. Perera, A. Pajares, and P. Miranda, "Poly-(lactic acid) infiltration of 45S5 Bioglass?? robocast scaffolds: Chemical interaction and its deleterious effect in mechanical enhancement," *Mater. Lett.*, vol. 163, pp. 196–200, 2016.
- [163] F. S. Senatov, K. V. Niaza, M. Y. Zadorozhnyy, A. V. Maksimkin, S. D. Kaloshkin, and Y. Z. Estrin, "Mechanical properties and shape memory effect of 3D-printed PLA-based porous scaffolds," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 57, pp. 139–148, 2016.
- [164] M. Barbeck *et al.*, "Analysis of the in vitro degradation and the in vivo tissue response to bi-layered 3D-printed scaffolds combining PLA and biphasic PLA/bioglass components – Guidance of the inflammatory response as basis for osteochondral regeneration," *Bioact. Mater.*, pp. 1–16, 2017.
- [165] C. M. Zou, Y. Liu, X. Yang, H. W. Wang, and Z. J. Wei, "Effect of sintering neck on compressive mechanical properties of porous titanium," *Trans. Nonferrous Met. Soc. China (English Ed.)*, vol. 22, no. SUPPL.2, pp. s485–s490, 2012.
- [166] A. Rodriguez-Contreras, M. doctorat industrial/dtg_3dti/01. bibliografia/t. poroso/bibliografía artículo ames/1-s2. 0-s1005030220309233-main. pdfique. Punset, J. A. Calero, F. J. Gil, E. Ruperez, and J. M. Manero, "Powder metallurgy with space holder for porous titanium implants: A review," *J. Mater. Sci. Technol.*, vol. 76, pp. 129–149, 2020.
- [167] B. Q. Li, Z. Q. Li, and X. Lu, "Effect of sintering processing on property of porous Ti using space holder technique," *Trans. Nonferrous Met. Soc. China (English Ed.)*, vol. 25, no. 9, pp. 2965–2973, 2015.
- [168] H. C. Hsu, S. C. Wu, S. K. Hsu, M. S. Tsai, T. Y. Chang, and W. F. Ho, "Processing and mechanical properties of porous Ti-7.5Mo alloy," *Mater. Des.*, vol. 47, pp. 21–26, 2013.
- [169] Z. Esen and S. B Bor, "Processing of titanium foams using magnesium spacer particles," *Scr. Mater.*, vol. 56, no. 5, pp. 341–344, Mar. .
- [170] Z. Esen and S. Bor, "Characterization of Ti-6Al-4V alloy foams synthesized by space holder technique," *Mater. Sci. Eng. A*, vol. 528, no. 7–8, pp. 3200–3209, 2011.
- [171] M. Qian and F. H. Sam Froes, *Titanium powder metallurgy: Science, technology and applications*. 2015.
- [172] H. Miura, H. G. Kang, and Y. Itoh, "High Performance Titanium Alloy Compacts by Advanced Powder Processing Techniques," *Key Eng. Mater.*, vol. 520, pp. 30–40, Aug. 2012.
- [173] H. Conrad, "The rate controlling mechanism during yielding and flow of α -titanium at temperatures below 0.4 T_M ," *Acta Metall.*, vol. 14, no. 11, pp. 1631–1633, Nov. 1966.
- [174] ASTM F67, "Standard specification for unalloyed titanium, for surgical implant applications," *ASTM Int.*, pp. 1–5, 2006.
- [175] L. Bolzoni, P. G. Esteban, E. M. Ruiz-Navas, and E. Gordo, "Mechanical behaviour of pressed and sintered titanium alloys obtained from prealloyed and blended elemental powders," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 14, pp. 29–38, 2012.
- [176] Y. F. Yang, S. D. Luo, C. J. Bettles, G. B. Schaffer, and M. Qian, "The effect of Si additions on the sintering and sintered microstructure and mechanical properties of Ti-3Ni alloy," *Mater. Sci. Eng. A*, vol. 528, no. 24, pp. 7381–7387, 2011.

- [177] H. Kim, F. Miyaji, T. Kokubo, and T. Nakamura, "Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment Hyun-Min," vol. 32, pp. 409–417, 1996.
- [178] H. M. Kim, F. Miyaji, T. Kokubo, S. Nishiguchi, and T. Nakamura, "Graded surface structure of bioactive titanium prepared by chemical treatment," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 45, no. 2, pp. 100–107, 1999.
- [179] S. Yamaguchi, H. Takadama, T. Matsushita, T. Nakamura, and T. Kokubo, "Cross-sectional analysis of the surface ceramic layer developed on Ti metal by NaOH-heat treatment and soaking in SBF," *J. Ceram. Soc. Japan*, vol. 117, no. 1370, pp. 1126–1130, 2009.
- [180] T. Kawai *et al.*, "Apatite formation on surface titanate layer with different Na content on Ti metal," *J. Ceram. Soc. Japan*, vol. 118, no. 1373, pp. 19–24, 2010.
- [181] T. Kokubo and H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?," *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–2915, May 2006.
- [182] T. Kokubo and S. Yamaguchi, "Novel Bioactive Titanate Layers Formed on Ti Metal and Its Alloys by Chemical Treatments," *Materials (Basel)*, vol. 3, no. 1, pp. 48–63, Dec. 2010.
- [183] M. Schmidt and S. G. Steinemann, "XPS studies of amino acids adsorbed on titanium dioxide surfaces," *Fresenius. J. Anal. Chem.*, vol. 341, no. 5–6, pp. 412–415, 1991.
- [184] H. M. Kim, T. Himeno, M. Kawashita, J. H. Lee, T. Kokubo, and T. Nakamura, "Surface potential change in bioactive titanium metal during the process of apatite formation in simulated body fluid," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 67, no. 4, pp. 1305–1309, 2003.
- [185] S. Yamaguchi, H. Takadama, T. Matsushita, T. Nakamura, and T. Kokubo, "Preparation of bioactive Ti-15Zr-4Nb-4Ta alloy from HCl and heat treatments after an NaOH treatment," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 97 A, no. 2, pp. 135–144, 2011.
- [186] T. Kizuki, H. Takadama, T. Matsushita, T. Nakamura, and T. Kokubo, "Effect of Ca contamination on apatite formation in a Ti metal subjected to NaOH and heat treatments," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 24, no. 3, pp. 635–644, 2013.
- [187] T. Kizuki, H. Takadama, T. Matsushita, T. Nakamura, and T. Kokubo, "Preparation of bioactive Ti metal surface enriched with calcium ions by chemical treatment," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 7, pp. 2836–2842, 2010.
- [188] S. Yamaguchi, H. Takadama, T. Matsushita, T. Nakamura, and T. Kokubo, "Apatite-forming ability of Ti-15Zr-4Nb-4Ta alloy induced by calcium solution treatment," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 21, no. 2, pp. 439–444, 2010.
- [189] S. Yamaguchi, T. Kizuki, H. Takadama, T. Matsushita, T. Nakamura, and T. Kokubo, "Formation of a bioactive calcium titanate layer on gum metal by chemical treatment," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 23, no. 4, pp. 873–883, 2012.
- [190] S. Yamaguchi *et al.*, "Chemical and heat treatments for inducing bone-Bonding ability of Ti-6Al-4V pedicle screw," *Key Eng. Mater.*, vol. 631, no. January, pp. 225–230, 2015.
- [191] M. Kawashita, S. Tsuneyama, F. Miyaji, T. Kokubo, H. Kozuka, and K. Yamamoto, "Antibacterial silver-containing silica glass prepared by sol-gel method," *Biomaterials*, vol. 21, no. 4, pp. 393–398, 2000.
- [192] G. Gosheger *et al.*, "Silver-coated megaendoprostheses in a rabbit model - An analysis of the infection rate and toxicological side effects," *Biomaterials*, vol. 25, no. 24, pp. 5547–5556, 2004.
- [193] H. J. Klasen, "A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver," *Burns*, vol. 26, no. 2, pp. 131–138, 2000.

Referencias

- [194] M. Bellantone, H. D. Williams, and L. L. Hench, "Broad-Spectrum Bactericidal Activity of Ag₂O-Doped Bioactive Glass," vol. 46, no. 6, pp. 1940–1945, 2002.
- [195] W. R. Li *et al.*, "Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria," *Electrochim. Acta*, vol. 275, no. 1, pp. 177–182, 2010.
- [196] Q. L. Feng, J. Wu, G. Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim, and J. O. Kim, "A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 52, no. 4, pp. 662–668, 2000.
- [197] B. Le Ouay and F. Stellacci, "Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight," *Nano Today*, vol. 10, no. 3, pp. 339–354, 2015.
- [198] W. R. Li, X. B. Xie, Q. S. Shi, H. Y. Zeng, Y. S. Ou-Yang, and Y. Ben Chen, "Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on Escherichia coli," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 85, no. 4, pp. 1115–1122, 2010.
- [199] K. H. Cho, J. E. Park, T. Osaka, and S. G. Park, "The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient," *Electrochim. Acta*, vol. 51, no. 5, pp. 956–960, 2005.
- [200] S. Kim and D. Y. Ryu, "Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues," *J. Appl. Toxicol.*, vol. 33, no. 2, pp. 78–89, 2013.
- [201] B. Uygur, G. Craig, M. D. Mason, and A. K. Ng, "Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanomaterials," *Tech. Proc. 2009 NSTI Nanotechnol. Conf. Expo, NSTI-Nanotech 2009*, vol. 2, no. 2, pp. 383–386, 2009.
- [202] P. Kurtycz, E. Karwowska, T. Ciach, A. Olszyna, and A. Kunicki, "Biodegradable polylactide (PLA) fiber mats containing Al₂O₃-Ag nanopowder prepared by electrospinning technique - Antibacterial properties," *Fibers Polym.*, vol. 14, no. 8, pp. 1248–1253, 2013.
- [203] B. Pant, M. Park, R. S. Jang, W. C. Choi, H. Y. Kim, and S. J. Park, "Synthesis, characterization, and antibacterial performance of Ag-Modified graphene oxide reinforced electrospun polyurethane nanofibers," *Carbon Lett.*, vol. 23, no. 3, pp. 17–21, 2017.
- [204] M. Yamanaka, K. Hara, and J. Kudo, "Bactericidal Actions of a Silver Ion Solution on Escherichia coli, Studied by Energy-Filtering Transmission Electron Microscopy and Proteomic Analysis," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, no. 11, pp. 7589–7593, 2005.
- [205] K. J. Woo, C. K. Hye, W. K. Ki, S. Shin, H. K. So, and H. P. Yong, "Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in Staphylococcus aureus and Escherichia coli," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 7, pp. 2171–2178, 2008.
- [206] W. Yang *et al.*, "Food storage material silver nanoparticles interfere with DNA replication fidelity and bind with DNA," *Nanotechnology*, vol. 20, no. 8, 2009.
- [207] S. Shrivastava, T. Bera, A. Roy, G. Singh, P. Ramachandrarao, and D. Dash, "Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles," *Nanotechnology*, vol. 18, no. 22, 2007.
- [208] K. Chaloupka, Y. Malam, and A. M. Seifalian, "Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications," *Trends Biotechnol.*, vol. 28, no. 11, pp. 580–588, 2010.
- [209] S. Di Nunzio *et al.*, "Silver containing bioactive glasses prepared by molten salt ion-exchange," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 24, no. 10–11, pp. 2935–2942, 2004.
- [210] W. Chen *et al.*, "In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-

- sputtered silver-containing hydroxyapatite coating," *Biomaterials*, vol. 27, no. 32, pp. 5512–5517, 2006.
- [211] A. J. Betts, D. P. Dowling, M. L. McConnell, and C. Pope, "The influence of platinum on the performance of silver-platinum anti-bacterial coatings," *Mater. Des.*, vol. 26, no. 3, pp. 217–222, 2005.
- [212] H. J. Jeon, S. C. Yi, and S. G. Oh, "Preparation and antibacterial effects of Ag-SiO₂ thin films by sol-gel method," *Biomaterials*, vol. 24, no. 27, pp. 4921–4928, 2003.
- [213] K. Yamamoto, S. Ohashi, M. Aono, T. Kokubo, I. Yamada, and J. Yamauchi, "Antibacterial activity of silver ions implanted in SiO₂ filler on oral streptococci," *Dent. Mater.*, vol. 12, no. 4, pp. 227–229, 1996.
- [214] Y. Inoue *et al.*, "Antibacterial properties of nanostructured silver titanate thin films formed on a titanium plate," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 92, no. 3, pp. 1171–1180, 2010.
- [215] V. Prabu, P. Karthick, A. Rajendran, D. Natarajan, M. S. Kiran, and D. K. Pattanayak, "Bioactive Ti alloy with hydrophilicity, antibacterial activity and cytocompatibility," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 63, pp. 50767–50777, 2015.
- [216] A. B. G. Lansdown, "A pharmacological and toxicological profile of silver as an antimicrobial agent in medical devices," *Adv. Pharmacol. Sci.*, vol. 2010, 2010.
- [217] H. Vik, K. J. Andersen, K. Julshamn, and K. Todnem, "Neuropathy Caused By Silver Absorption From Arthroplasty Cement," *Lancet*, vol. 325, no. 8433, p. 872, 1985.
- [218] A. Cochis *et al.*, "The effect of silver or gallium doped titanium against the multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*," *Biomaterials*, vol. 80, pp. 80–95, Feb. 2016.
- [219] S. P. Valappil *et al.*, "Controlled delivery of antimicrobial gallium ions from phosphate-based glasses," *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 4, pp. 1198–1210, 2009.
- [220] E. Verron *et al.*, "Gallium modulates osteoclastic bone resorption in vitro without affecting osteoblasts," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 159, pp. 1681–1692, 2010.
- [221] L. R. Bernstein, "Mechanisms of therapeutic activity for gallium," *Pharmacol. Rev.*, vol. 50, no. 4, pp. 665–682, 1998.
- [222] R. Niesvizky, "Gallium nitrate in multiple myeloma: Prolonged survival in a cohort of patients with advanced-stage disease," *Semin. Oncol.*, vol. 30, no. 2 SUPPL. 5, pp. 20–24, 2003.
- [223] Y. Kaneko, M. Thoendel, O. Olakanmi, B. E. Britigan, and P. K. Singh, "The transition metal gallium disrupts *Pseudomonas aeruginosa* iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity," *J. Clin. Invest.*, vol. 117, no. 4, pp. 877–888, 2007.
- [224] R. García-Contreras *et al.*, "Isolation and characterization of gallium resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants," *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 303, no. 8, pp. 574–582, 2013.
- [225] C. Bonchi, F. Imperi, F. Minandri, P. Visca, and E. Frangipani, "Repurposing of gallium-based drugs for antibacterial therapy," *BioFactors*, vol. 40, no. 3, pp. 303–312, 2014.
- [226] F. Minandri, C. Bonchi, E. Frangipani, F. Imperi, and P. Visca, "Promises and failures of gallium as an antibacterial agent," *Future Microbiol.*, vol. 9, no. 3, pp. 379–397, 2014.
- [227] L. Rimondini, C. Della Valle, A. Cochis, B. Azzimonti, and R. Chiesa, "The Biofilm Formation onto Implants and Prosthetic Materials May Be Contrasted Using Gallium (3+)," *Key Eng. Mater.*, vol. 587, no. May 2016, pp. 315–320, 2014.
- [228] M. D. Wadge, B. W. Stuart, K. G. Thomas, and D. M. Grant, "Generation and

Referencias

- characterisation of gallium titanate surfaces through hydrothermal ion-exchange processes," *Mater. Des.*, vol. 155, pp. 264–277, Oct. 2018.
- [229] A. Cochis *et al.*, "Data in support of Gallium (Ga³⁺) antibacterial activities to counteract *E. coli* and *S. epidermidis* biofilm formation onto pro-osteointegrative titanium surfaces," *Data Br.*, vol. 6, pp. 758–762, 2016.
- [230] F. Ravanetti *et al.*, "Osteogenic response and osteoprotective effects in vivo of a nanostructured titanium surface with antibacterial properties," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 27, no. 3, pp. 1–15, 2016.
- [231] A. Cochis, B. Azzimonti, C. Della Valle, R. Chiesa, C. R. Arciola, and L. Rimondini, "Biofilm formation on titanium implants counteracted by grafting gallium and silver ions," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 103, no. 3, pp. 1176–1187, 2015.
- [232] R. C. Owens, M. A. Banevicius, D. P. Nicolau, C. H. Nightingale, and R. Quintiliani, "In vitro synergistic activities of tobramycin and selected β -lactams against 75 gram-negative clinical isolates," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 41, no. 11, pp. 2586–2588, 1997.
- [233] T. H. E. Journal, O. F. Infectious, and R. C. Moel-, "Antimicrobial Synergism-An Elusive Concept," vol. 140, no. 4, pp. 4–6, 1979.
- [234] L. Zhang, Q. Gao, and Y. Han, "Zn and Ag Co-doped Anti-microbial TiO₂ Coatings on Ti by Micro-arc Oxidation," *J. Mater. Sci. Technol.*, vol. 32, no. 9, pp. 919–924, 2016.
- [235] S. P. Valappil *et al.*, "Role of gallium and silver from phosphate-based glasses on in vitro dual species oral biofilm models of *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus gordonii*," *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 5, pp. 1957–1965, 2012.
- [236] M. S. L. Brasil *et al.*, "Synergism in the antibacterial action of ternary mixtures involving silver nanoparticles, chitosan and antibiotics," *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 29, no. 10, pp. 2026–2033, 2018.
- [237] S. Z. H. Naqvi *et al.*, "Combined efficacy of biologically synthesized silver nanoparticles and different antibiotics against multidrug-resistant bacteria," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 8, pp. 3187–3195, 2013.
- [238] H. Deng *et al.*, "Mechanistic Study of the Synergistic Antibacterial Activity of Combined Silver Nanoparticles and Common Antibiotics Graphical abstract HHS Public Access Author manuscript," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 50, no. 16, pp. 8840–8848, 2016.
- [239] O. M. Goudouri, E. Kontonasaki, U. Lohbauer, and A. R. Boccaccini, "Antibacterial properties of metal and metalloid ions in chronic periodontitis and peri-implantitis therapy," *Acta Biomater.*, vol. 10, no. 8, pp. 3795–3810, 2014.
- [240] A. B. Spierings, M. Voegtlin, T. Bauer, and K. Wegener, "Powder flowability characterisation methodology for powder-bed-based metal additive manufacturing," *Prog. Addit. Manuf.*, vol. 1, no. 1–2, pp. 9–20, 2016.
- [241] P. Mellin, O. Lyckfeldt, P. Harlin, H. Brodin, H. Blom, and A. Strondl, "Evaluating flowability of additive manufacturing powders, using the Gustavsson flow meter," *Met. Powder Rep.*, vol. 72, no. 5, pp. 322–326, 2017.
- [242] Y. Eisen, W.B.; Ferguson, B.L.; German, R.M.; Iacocca, R.; Lee, P.W.; Madan, D.; Moyer, K.; Sanderow, H.; Trudel, *ASM Handbook Powder Metal Technologies and Applications*. 1998.
- [243] I. Anderson, "Mechanical Properties of Specimens 3D Printed with Virgin and Recycled Polylactic Acid."
- [244] S. Morales and A. Eduardo, "Modificación de las propiedades del ácido Poliláctico (PLA)," pp. 1–97, 2013.

- [245] D. C. Parada *et al.*, "Obtain Poly (L-lactic) Acid by Polycondensation with Catalyst Metallic Zinc," *Sci. Tech.*, vol. XIII, no. 36, pp. 267–272, 2007.
- [246] N. Valls Pepió, "Modificació de l'àcid polilàctic mitjançant compostos polifuncionals," *Proj. Final Carrera. Eng. Quim.*, no. Escola Tecnica superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona, p. 151, 2012.
- [247] S. G. González, *Impresión 3D*. Marcombo, 2016.
- [248] R. Schieber, S. Raymond, F. Mücklich, and M. Pegueroles, "3D printed bioresorbable stents by solvent-cast direct-write technique," in *European Conference on Biomaterials*, 2017, p. 1.
- [249] E. Vidal *et al.*, "Single-step pulsed electrodeposition of calcium phosphate coatings on titanium scaffolds for drug delivery," in *European Conference on Biomaterials*, 2017, p. 125.
- [250] E. Vidal *et al.*, "Functionalization of 3D-printed titanium with a fibronectin recombinant fragment guides osteoblast behaviour," in *European Conference on Biomaterials*, 2017.
- [251] E. Vidal *et al.*, "Titanium scaffolds by direct ink writing: Fabrication and functionalization to guide osteoblast behavior," *Metals (Basel)*, vol. 10, no. 9, pp. 1–18, 2020.
- [252] J. Ahmed and S. K. Varshney, "Polylactides-chemistry, properties and green packaging technology: A review," *Int. J. Food Prop.*, vol. 14, no. 1, pp. 37–58, 2011.
- [253] J. R. Rocca-Smith *et al.*, "Effect of the state of water and relative humidity on ageing of PLA films," *Food Chem.*, vol. 236, pp. 109–119, 2017.
- [254] E. Gemelli and N. H. A. Camargo, "Oxidation kinetics of commercially pure titanium," *Matéria (Rio Janeiro)*, vol. 12, no. 3, pp. 525–531, 2007.
- [255] J. Dai, J. Zhu, C. Chen, and F. Weng, "High temperature oxidation behavior and research status of modifications on improving high temperature oxidation resistance of titanium alloys and titanium aluminides: A review," *J. Alloys Compd.*, vol. 685, pp. 784–798, 2016.
- [256] R. Bansal, J. K. Singh, V. Singh, D. D. N. Singh, and P. Das, "Optimization of Oxidation Temperature for Commercially Pure Titanium to Achieve Improved Corrosion Resistance," *J. Mater. Eng. Perform.*, vol. 26, no. 3, pp. 969–977, 2017.
- [257] J. L. Amorós, V. Cantavella, J. C. Jarque, and C. Felú, "Green strength testing of pressed compacts: An analysis of the different methods," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 28, no. 4, pp. 701–710, 2008.
- [258] F. Castro, "Sintering Course." .
- [259] M. Qian and F. H. Sam Froes, *Titanium powder metallurgy: Science, technology and applications*, vol. 6, no. 2. 2015.
- [260] S. Y. Choy, C. N. Sun, K. F. Leong, and J. Wei, "Compressive properties of Ti-6Al-4V lattice structures fabricated by selective laser melting: Design, orientation and density," *Addit. Manuf.*, vol. 16, pp. 213–224, 2017.
- [261] R. Hedayati, M. Sadighi, M. Mohammadi-Aghdam, and A. A. Zadpoor, "Mechanical properties of additively manufactured octagonal honeycombs," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 69, pp. 1307–1317, 2016.
- [262] Z. Wang, "Recent advances in novel metallic honeycomb structure," *Compos. Part B Eng.*, vol. 166, no. August 2018, pp. 731–741, 2019.
- [263] K. Wang, X. Xie, J. Wang, A. Zhao, Y. Peng, and Y. Rao, "Effects of infill characteristics and strain rate on the deformation and failure properties of additively manufactured polyamide-based composite structures," *Results Phys.*, vol. 18, no. August, p. 103346,

Referencias

2020.

- [264] J. Maurath and N. Willenbacher, "3D printing of open-porous cellular ceramics with high specific strength," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 37, no. 15, pp. 4833–4842, 2017.
- [265] C. Zhang *et al.*, "Mechanical behavior of a titanium alloy scaffold mimicking trabecular structure," *J. Orthop. Surg. Res.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–11, 2020.
- [266] J. Wieding, A. Jonitz, and R. Bader, "The effect of structural design on mechanical properties and cellular response of additive manufactured titanium scaffolds," *Materials (Basel)*, vol. 5, no. 8, pp. 1336–1347, 2012.
- [267] Y. J. Yoon, S. K. Moon, and J. Hwang, "3D printing as an efficient way for comparative study of biomimetic structures — trabecular bone and honeycomb," *J. Mech. Sci. Technol.*, vol. 28, no. 11, pp. 4635–4640, 2014.
- [268] R. S. Lakes, "Cellular solids," *Journal of Biomechanics*, vol. 22, no. 4. p. 397, 1989.
- [269] H. Nakajima, H. Nakajima, and H. Nakajima, "Mechanical Properties of Lotus Metals and Alloys," in *Porous Metals with Directional Pores*, 2013, pp. 127–181.
- [270] Q. L. Loh and C. Choong, "Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size," *Tissue Eng. Part B. Rev.*, vol. 19, no. 6, pp. 485–502, Dec. 2013.
- [271] M. V. De Oliveira, A. C. Moreira, L. C. Pereira, W. S. De Medeiros, and C. R. Appoloni, "Porosity characterization of sintered titanium scaffolds for surgical implants," *Mater. Sci. Forum*, vol. 591–593, pp. 36–41, 2008.
- [272] J. C. Wataha, C. T. Hanks, and Z. Sun, "Effect of cell line on in vitro metal ion cytotoxicity," *Dent. Mater.*, vol. 10, no. 3, pp. 156–161, 1994.
- [273] S. Ichinose, T. Muneta, I. Sekiya, S. Itoh, H. Aoki, and M. Tagami, "The study of metal ion release and cytotoxicity in Co-Cr-Mo and Ti-Al-V alloy in total knee prosthesis - Scanning electron microscopic observation," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 14, no. 1, pp. 79–86, 2003.
- [274] T. Hanawa, "Metal ion release from metal implants," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 24, no. 6-8 SPEC. ISS., pp. 745–752, 2004.
- [275] E. Velasco-Ortega, A. Jos, A. M. Cameán, J. Pato-Mourelo, and J. J. Segura-Egea, "In vitro evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of a commercial titanium alloy for dental implantology," *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 702, no. 1, pp. 17–23, 2010.
- [276] L. Xiao, B. Wang, G. Yang, and M. Gauthier, "Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications," *Biomed. Sci. Eng. Technol.*, no. May 2014, 2012.
- [277] X. Chao, D. Therriault, L. Lebel, G. L'Esperance, and A. Bouchemit, "3D PRINTING OF METALLIC INKS AND SUBSEQUENT HEAT - TREATMENTS," US 2019/0054536 A1, 2019.
- [278] S.-Z. Guo, F. Gosselin, N. Guerin, A.-M. Lanouette, M.-C. Heuzey, and D. Therriault, "Solvent-Cast Three-Dimensional Printing of Multifunctional Microsystems," *Small*, vol. 9, no. 24, pp. 4118–4122, Dec. 2013.
- [279] K. Hajash, B. Sparrman, C. Guberan, J. Laucks, and S. Tibbits, "Large-scale rapid liquid printing," *3D Print. Addit. Manuf.*, vol. 4, no. 3, pp. 123–131, 2017.
- [280] M. Strano, K. Rane, F. Briatico Vangosa, and L. Di Landro, "Extrusion of metal powder-polymer mixtures: Melt rheology and process stability," *J. Mater. Process. Technol.*, vol. 273, no. May, p. 116250, 2019.
- [281] F. Iñiguez-Franco *et al.*, "Concurrent solvent induced crystallization and hydrolytic

- degradation of PLA by water-ethanol solutions," *Polymer (Guildf)*, vol. 99, pp. 315–323, 2016.
- [282] T. Serra, M. Ortiz-Hernandez, E. Engel, J. A. Planell, and M. Navarro, "Relevance of PEG in PLA-based blends for tissue engineering 3D-printed scaffolds," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 38, no. 1, pp. 55–62, 2014.
- [283] A. Leroy *et al.*, "PLA-ploxamer/ploxamine copolymers for ligament tissue engineering: sound macromolecular design for degradable scaffolds and MSC differentiation," *Biomater. Sci.*, vol. 3, no. 4, pp. 617–626, 2015.
- [284] C. Pinese, A. Leroy, B. Nottelet, C. Gagnieu, J. Coudane, and X. Garric, "Rolled knitted scaffolds based on PLA-pluronic copolymers for anterior cruciate ligament reinforcement: A step by step conception," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 105, no. 4, pp. 735–743, 2017.
- [285] J. Palacio, N. Agudelo, and B. Lopez, "PLA/Pluronic (R) nanoparticles as potential oral delivery systems: Preparation, colloidal and chemical stability, and loading capacity," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 133, May 2016.
- [286] R. Kunii, H. Onishi, and Y. Machida, "Preparation and antitumor characteristics of PLA/(PEG-PPG-PEG) nanoparticles loaded with camptothecin," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 67, no. 1, pp. 9–17, 2007.
- [287] V. Veiko *et al.*, "Laser coloration of titanium films: New development for jewelry and decoration," *Opt. Laser Technol.*, vol. 93, pp. 9–13, 2017.
- [288] E. Akman and E. Cerkezoglu, "Compositional and micro-scratch analyses of laser induced colored surface of titanium," *Opt. Lasers Eng.*, vol. 84, pp. 37–43, 2016.
- [289] M. J. Hwang, H. R. Choi, H. J. Song, and Y. J. Park, "Characterization and colorization of microarc-oxidized layers of binary titanium alloys," *J. Alloys Compd.*, vol. 732, pp. 95–106, 2018.
- [290] T. Wang, L. Wang, Q. Lu, and Z. Fan, "Changes in the esthetic, physical, and biological properties of a titanium alloy abutment treated by anodic oxidation," *J. Prosthet. Dent.*, vol. 121, no. 1, pp. 156–165, 2019.
- [291] Y. C. Chien, C. Liang, S. H. Liu, and S. H. Yang, "Combustion kinetics and emission characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons from polylactic acid combustion," *J. Air Waste Manag. Assoc.*, vol. 60, no. 7, pp. 849–855, 2010.
- [292] C. Artieda Guzmán, "Desarrollo y optimización de nuevos componentes lubricante y ligante para el procesamiento de aceros PM," *TDX (Tesis Dr. en Xarxa)*, Jul. 2017.
- [293] S. Li, B. Huang, Y. Li, X. Qu, S. Liu, and J. Fan, "A new type of binder for metal injection molding," *J. Mater. Process. Technol.*, vol. 137, no. 1-3 SPEC, pp. 70–73, 2003.
- [294] R. J. Khairur, M. Norhamidi, A. Sufizar, H. I. I. Mohd, H. M. N. Nor, and D. Yusof, "Injection moulding temperature and powder loading influence to the metal injection moulding (MIM) green compact," *Sci. Res. Essays*, vol. 6, no. 21, pp. 4532–4538, 2011.
- [295] R. Vassen, M. Koldewitz, and A. Ruder, "Influence of binder content and particle size on green strength of wpp parts," *Powder Metall.*, vol. 38, no. 1, pp. 55–58, 1995.
- [296] R. K. Enneti and K. C. Prough, "Effect of binder saturation and powder layer thickness on the green strength of the binder jet 3D printing (BJ3DP) WC-12%Co powders," *Int. J. Refract. Met. Hard Mater.*, vol. 84, no. June, p. 104991, 2019.
- [297] I. Santacruz, C. Baudín, R. Moreno, and M. I. Nieto, "Improved green strength of ceramics through aqueous gelcasting," *Adv. Eng. Mater.*, vol. 6, no. 8, pp. 672–676, 2004.
- [298] B. O. Baba and U. Özmen, "Preparation and Mechanical Characterization of Chicken

Referencias

- Feather/PLA Composites," *Polym. Polym. Compos.*, vol. 16, no. 2, pp. 101–113, 2008.
- [299] J. Zhou, Z. Yao, C. Zhou, D. Wei, and S. Li, "Mechanical properties of PLA/PBS foamed composites reinforced by organophilic montmorillonite," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 131, no. 18, Sep. 2014.
- [300] B. Dabrowski, W. Swieszkowski, D. Godlinski, and K. J. Kurzydowski, "Highly porous titanium scaffolds for orthopaedic applications," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 95, no. 1, pp. 53–61, 2010.
- [301] S. Ghouse *et al.*, "The design and in vivo testing of a locally stiffness-matched porous scaffold," *Appl. Mater. Today*, vol. 15, pp. 377–388, 2019.
- [302] S. Limmahakhun, A. Oloyede, K. Sittthiseripratip, Y. Xiao, and C. Yan, "Stiffness and strength tailoring of cobalt chromium graded cellular structures for stress-shielding reduction," *Mater. Des.*, vol. 114, pp. 633–641, 2017.
- [303] Z. Z. Fang *et al.*, "Powder metallurgy of titanium-past, present, and future," *Int. Mater. Rev.*, vol. 63, no. 7, pp. 407–459, 2018.
- [304] J. Haaber, M. T. Cohn, D. Frees, T. J. Andersen, and H. Ingmer, "Planktonic aggregates of *Staphylococcus aureus* protect against common antibiotics," *PLoS One*, vol. 7, no. 7, pp. 1–12, 2012.
- [305] T. Kizuki, H. Takadama, T. Matsushita, T. Nakamura, and T. Kokubo, "Preparation of bioactive Ti metal surface enriched with calcium ions by chemical treatment," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 7, pp. 2836–2842, 2010.
- [306] I. Martina, R. Wiesinger, and M. Schreiner, "Micro-Raman Characterisation of Silver Corrosion Products: Instrumental Set Up and Reference," *e-Preservation Sci.*, vol. 9, pp. 1–8, 2012.
- [307] W. Li, C. Sun, B. Hou, and X. Zhou, "Room Temperature Synthesis and Catalytic Properties of Surfactant-Modified Ag Nanoparticles," *Int. J. Spectrosc.*, vol. 2012, 2012.
- [308] X. Y. Gao *et al.*, "Effect of the oxygen flux ratio on the structural and the optical properties of silver-oxide films deposited by using the direct-current reactive magnetron sputtering method," *J. Korean Phys. Soc.*, vol. 58, no. 2, pp. 243–247, 2011.
- [309] G. I. N. Waterhouse, G. A. Bowmaker, and J. B. Metson, "The thermal decomposition of silver (I, III) oxide: A combined XRD, FT-IR and Raman spectroscopic study," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 3, no. 17, pp. 3838–3845, 2001.
- [310] L. Sequeda, J. Díaz, S. Gutiérrez, S. Perdomo, and O. Gómez, "Obtención de hidroxiapatita sintética por tres métodos diferentes y su caracterización para ser utilizada como sustituto óseo," *Rev. Colomb. Ciencias Químico - Farm.*, vol. 41, no. 1, pp. 50–66, 2012.
- [311] J. R. Jones, L. M. Ehrenfried, P. Saravanapavan, and L. L. Hench, "Controlling ion release from bioactive glass foam scaffolds with antibacterial properties," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 17, no. 11, pp. 989–996, 2006.
- [312] Z. Sun *et al.*, "Characterization and antibacterial properties of porous fibers containing silver ions," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 387, pp. 828–838, 2016.
- [313] A. Feng, J. Cao, J. Wei, F. Chang, Y. Yang, and Z. Xiao, "Facile synthesis of silver nanoparticles with high antibacterial activity," *Materials (Basel)*, vol. 11, no. 12, 2018.
- [314] X. Liu *et al.*, "Antibacterial activity and mechanism of linalool against *Pseudomonas aeruginosa*," *Microb. Pathog.*, vol. 141, pp. 1469–1487, 2020.
- [315] S. Sheikholeslami, S. E. Mousavi, H. R. Ahmadi Ashtiani, S. R. Hosseini Doust, and S. M. Rezayat, "Antibacterial activity of silver nanoparticles and their combination with zataria multiflora essential oil and methanol extract," *Jundishapur J. Microbiol.*, vol. 9, no. 10,

- 2016.
- [316] R. Bockman, "The effects of gallium nitrate on bone resorption.," *Semin. Oncol.*, vol. 30, no. 2 Suppl 5, pp. 5–12, Apr. 2003.
- [317] Z. Xu, X. Zhao, X. Chen, Z. Chen, and Z. Xia, "Antimicrobial effect of gallium nitrate against bacteria encountered in burn wound infections," *RSC Adv.*, vol. 7, no. 82, pp. 52266–52273, 2017.
- [318] D. Baldoni, A. Steinhuber, W. Zimmerli, and A. Trampuz, "In vitro activity of gallium maltolate against staphylococci in logarithmic, stationary, and biofilm growth phases: Comparison of conventional and calorimetric susceptibility testing methods," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 54, no. 1, pp. 157–163, 2010.
- [319] A. B. Kelson, M. Carnevali, and V. Truong-Le, "Gallium-based anti-infectives: Targeting microbial iron-uptake mechanisms," *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 13, no. 5, pp. 707–716, 2013.
- [320] E. Banin *et al.*, "The potential of desferrioxamine-gallium as an anti-*Pseudomonas* therapeutic agent.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 43, pp. 16761–16766, 2008.
- [321] L. Crémet *et al.*, "Pathogenic potential of *Escherichia coli* clinical strains from orthopedic implant infections towards human osteoblastic cells," *Pathog. Dis.*, vol. 73, no. 8, p. ftv065, 2015.
- [322] P. Brouqui, M. C. Rousseau, A. Stein, M. Drancourt, and D. Raoult, "Treatment of *Pseudomonas aeruginosa*-infected orthopedic prostheses with ceftazidime-ciprofloxacin antibiotic combination," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 39, no. 11, pp. 2423–2425, 1995.
- [323] B. Golding *et al.*, "Inverse relationship between proliferation and differentiation in a human TNP-specific B cell line. Cell cycle dependence of antibody secretion," *J. Immunol.*, vol. 141, no. 8, pp. 2564 LP – 2568, Oct. 1988.
- [324] S. Ruijtenberg and S. van den Heuvel, "Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression," *Cell Cycle*, vol. 15, no. 2, pp. 196–212, 2016.
- [325] Q. Huang *et al.*, "Effects of hierarchical micro/nano-topographies on the morphology, proliferation and differentiation of osteoblast-like cells," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 145, pp. 37–45, 2016.
- [326] G. S. Stein and J. B. Lian, "Molecular Mechanisms Mediating Proliferation/Differentiation Interrelationships During Progressive Development of the Osteoblast Phenotype," *Endocr. Rev.*, vol. 14, no. 4, pp. 424–442, Aug. 1993.
- [327] S. Meng, Z. Zhang, and M. Rouabhia, "Accelerated osteoblast mineralization on a conductive substrate by multiple electrical stimulation," *J. Bone Miner. Metab.*, vol. 29, no. 5, pp. 535–544, 2011.
- [328] X. Yin, Z. Chen, Z. Liu, and C. Song, "Tissue transglutaminase (TG2) activity regulates osteoblast differentiation and mineralization in the SAOS-2 cell line," *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, vol. 45, no. 8, pp. 693–700, Aug. 2012.
- [329] S. Fujibayashi, M. Neo, H. Kim, and T. Kokubo, "Osteoinduction of porous bioactive titanium metal," vol. 25, pp. 443–450, 2004.
- [330] S. Hijazi, P. Visca, and E. Frangipani, "Gallium-Protoporphyrin IX Inhibits *Pseudomonas aeruginosa* Growth by Targeting Cytochromes," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 7, no. January, pp. 1–15, 2017.
- [331] M. Qian and F. H. Sam Froes, *Titanium powder metallurgy: Science, technology and*

Referencias

applications, vol. 6, no. 2. 2015.

- [332] L. V. G. Nelkov, Oleg; Naboychenko, Stanislav; Murashova, Irina; Gopienko, Victor; Frishberg, Irina; Lotsko, Dina; Dowson, Gordon; Williams, Bernard; Tokhtuyev, Valerij; Nelkov, Ivan; Latysheva, *Handbook of Non-Ferrous Metal Powders: Technologies and Applications*, Elsevier. 2012.
- [333] J. W. Daily and D. R. F. Harleman, *Dinámica de los fluidos con aplicaciones en ingeniería*. 1975.
- [334] C. Loudon and K. Mcculloh, "Application of the Hagen-Poiseuille equation to fluid feeding through short tubes," *Ann. Entomol. Soc. Am.*, vol. 92, no. 1, pp. 153–158, 1999.
- [335] S. Cano *et al.*, "Additive manufacturing of zirconia parts by fused filament fabrication and solvent debinding: Selection of binder formulation," *Addit. Manuf.*, vol. 26, no. November 2018, pp. 117–128, 2019.
- [336] C. Kukla *et al.*, "Effect of particle size on the properties of highly-filled polymers for fused filament fabrication," vol. 190006, 2017.
- [337] Y. W. Sheng, Z. M. Guo, J. J. Hao, and D. H. Yang, "Effect of spheroidization of Ti-6Al-4V powder on characteristics and rheological behaviors of gelcasting slurry," *Procedia Eng.*, vol. 36, pp. 299–306, 2012.
- [338] P. K. Neghlani, "SLM additive manufacturing of Alloy 718 Effect of process parameters on microstructure and properties," no. August 2016, 2016.
- [339] T. Kurzynowski, E. Chlebus, B. Kuźnicka, and J. Reiner, "Parameters in selective laser melting for processing metallic powders," *High Power Laser Mater. Process. Lasers, Beam Deliv. Diagnostics, Appl.*, vol. 8239, no. February, p. 823914, 2012.
- [340] E. Feilden, E. G. T. Blanca, F. Giuliani, E. Saiz, and L. Vandeperre, "Robocasting of structural ceramic parts with hydrogel inks," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 36, no. 10, pp. 2525–2533, 2016.
- [341] J. Franco, P. Hunger, M. E. Launey, A. P. Tomsia, and E. Saiz, "Direct write assembly of calcium phosphate scaffolds using a water-based hydrogel," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 1, pp. 218–228, Jan. 2010.
- [342] M. Müller, J. Becher, M. Schnabelrauch, and M. Zenobi-Wong, "Nanostructured Pluronic hydrogels as bioinks for 3D bioprinting," *Biofabrication*, vol. 7, no. 3, p. 035006, 2015.
- [343] E. V Batrakova and A. V Kabanov, "Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers," *J. Control. Release*, vol. 130, no. 2, pp. 98–106, Sep. 2008.
- [344] F. D. E. D. E. Seguridad, "SIGMA-ALDRICH," no. 1907, pp. 1–6, 2015.
- [345] T. M. Wang, J. T. Xi, and Y. Jin, "A model research for prototype warp deformation in the FDM process," *Int. J. Adv. Manuf. Technol.*, vol. 33, no. 11–12, pp. 1087–1096, 2007.
- [346] M. Pérez Cacho and A. Lorenzana Iván, "Cálculo directo de la carga crítica de pandeo de pórticos," *Rev. Int. Metod. Numer. para Calc. y Disen. en Ing.*, vol. 26, no. 1, pp. 31–38, 2010.
- [347] T. Kawai *et al.*, "Osteoconduction of porous Ti metal enhanced by acid and heat treatments," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 24, no. 7, pp. 1707–1715, 2013.
- [348] K. So, A. Kaneuji, T. Matsumoto, S. Matsuda, and H. Akiyama, "Is the bone-bonding ability of a cementless total hip prosthesis enhanced by alkaline and heat treatments?," *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 471, no. 12, pp. 3847–3855, 2013.

- [349] S. Fujibayashi, M. Neo, H. M. Kim, T. Kokubo, and T. Nakamura, "Osteoinduction of Bioactive Titanium Metal," *Key Eng. Mater.*, vol. 254–256, pp. 953–956, 2004.
- [350] O. Frank, M. Zúkalová, B. Lasková, J. Kürti, J. Koltai, and L. Kavan, "Raman spectra of titanium dioxide (anatase, rutile) with identified oxygen isotopes (16, 17, 18)," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 14, no. 42, pp. 14567–14572, 2012.
- [351] H. M. Kim, T. Kokubo, S. Fujibayashi, S. Nishiguchi, and T. Nakamura, "Bioactive macroporous titanium surface layer on titanium substrate," 2000.
- [352] J. A. Stammeier, B. Purgstaller, D. Hippler, V. Mavromatis, and M. Dietzel, "In-situ Raman spectroscopy of amorphous calcium phosphate to crystalline hydroxyapatite transformation," *MethodsX*, vol. 5, no. October, pp. 1241–1250, 2018.

Referencias

10. PUBLICACIONES

10.1 PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

- Desarrollo de nuevos dispositivos biomiméticos mejorados superficialmente con nuevos recubrimientos y tratamientos físicos (DIRECT). CDTI IDI-20151241.
- Nuevos métodos de fabricación de componentes porosos sinterizados basado en técnicas de impresión 3D (AMFFED). MICIN RTC-2017-636
- Desarrollo de una prótesis de rodilla con alta capacidad de osteointegración y tratamiento de las infecciones intraoperatorias mediante campos eléctricos (OsteoBactiRod). IDI-20180936

10.2 CONGRESOS

- D. Torres, J.A. Calero, J.M. Manero, E. Rupérez, "Development and optimization of 3D paste extrusion for the manufacture of titanium scaffolds" *Congreso Europeo de Pulvimetalurgia*, (EURO PM), Maastricht 2019. Presentación oral.
- D. Torres, J.A. Calero, J.M. Manero, E. Rupérez, "Desarrollo y optimización del proceso de extrusión 3D de pastas para la fabricación de estructuras porosas de titanio" *VII Congreso Español de Pulvimetalurgia y II Congreso Iberoamericano de Pulvimetalurgia*, Madrid 2019. Presentación oral.
- D. Torres, J.A. Calero, J.M. Manero, E. Rupérez, "Titanium scaffolds fabricated by Direct Ink Writing and functionalized with dual-action coatings with osteoinductive and antibacterial properties" *Congreso Europeo de Pulvimetalurgia*, (EURO PM), Lisboa 2021. Presentación oral (candidato key note).

10.3 ARTÍCULOS

- E. Vidal, D. Torres, J. Guillem, G. Scionti, J.M. Manero, M. P. Ginebra, D. Rodriguez, E. Rupérez, "Titanium Scaffolds by Direct Ink Writing: Fabrication and Functionalization to Guide Osteoblast Behavior" *Metals*, 2020 (Publicado).
- A. Rodríguez, D. Torres, J.A. Calero, J.M. Manero, E. Rupérez, J. Guillem, P. Sereno, M. Ginebra, "Development of novel dual-action coatings with osteoinductive and antibacterial properties for 3D-printed titanium implants," *Surface and Coatings Technology*, 2020 (Publicado).
- A. Rodríguez, D. Torres, J.A. Calero, J.M. Manero, E. Rupérez, J. Guillem, B. Rafik, M. P. Ginebra, "Optimization of a thermochemical process to impart bioactivity and antibacterial properties to 3D printed prostheses of Titanium" *Surface and Coatings Technology*, 2021 (Publicado).
- A. Rodríguez, D. Torres, J.A. Calero, J.M. Manero, E. Rupérez, J. Guillem, L.I. Pérez, M. P. Ginebra, "Development of calcium titanate coatings with gallium and silver in porous structures of bioactive and antibacterial Titanium" *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2021 (en revision).
- A. Rodríguez, D. Torres, J.A. Calero, J.M. Manero, E. Rupérez, M. Punset, "Powder metallurgy techniques functional and biomedical Applications" *Capítulo de enciclopedia editorial Elsevier*, 2021 (Publicado).

