

# Proyecto Fin de Carrera

## Ingeniería de las Tecnologías Industriales

### Mejora de la osteointegración de piezas de titanio poroso: influencia del tipo de tratamiento de modificación superficial

Autora: Ana Rueda Flores

Tutoras: Ana María Beltrán Custodio

Luisa Marleny Rodríguez Albelo

**Dpto. de Ingeniería y Ciencia de los Materiales y  
del Transporte  
Escuela Técnica Superior de Ingeniería  
Universidad de Sevilla**

Sevilla, 2021





Proyecto Fin de Carrera  
Ingeniería en Tecnologías Industriales

# **Mejora de la osteointegración de piezas de titanio poroso: influencia del tipo de tratamiento de modificación superficial**

Autora:

Ana Rueda Flores

Tutoras:

Ana María Beltrán Custodio

Luisa Marleny Rodríguez Albelo

Dpto. de Ingeniería y Ciencia de los Materiales y del Transporte

Escuela Técnica Superior de Ingeniería

Universidad de Sevilla

Sevilla, 2021



Proyecto Fin de Carrera: Mejora de la osteointegración de piezas de titanio poroso: influencia del tipo de tratamiento de modificación superficial

Autora: Ana Rueda Flores

Tutoras: Ana María Beltrán Custodio  
Luisa Marleny Rodríguez Albelo

El tribunal nombrado para juzgar el Proyecto arriba indicado, compuesto por los siguientes miembros:

Presidente:

Vocales:

Secretario:

Acuerdan otorgarle la calificación de:

El Secretario del Tribunal

Fecha:



# Agradecimientos

---

*A mis padres y a mis hermanas, por confiar todos estos años en mí más que yo misma.*  
*A mis compañeros y profesores por enseñarme todo lo que necesitaba para llegar hasta aquí.*  
*A María, por ser mi mejor y mayor apoyo en este camino.*



En la actualidad, son muchos los implantes para sustitución total o parcial de tejido óseo que se fabrican de titanio c.p. y aleaciones del mismo. Debido a la biocompatibilidad que presenta dicho material y sus aleaciones, así como a sus excelentes propiedades mecánicas y químicas, se trata de unos de los biomateriales más empleados en el campo de la medicina. Sin embargo, las prótesis fabricadas de Ti y aleaciones presentan tres grandes problemas: el apantallamiento de tensiones, el mal comportamiento a fatiga y la pobre osteointegración.

A fin de mejorar los problemas señalados, en el siguiente trabajo se fabricaron una serie de sustratos de Ti porosos por pluvimeturgia haciendo uso de la técnica de espaciadores, usando como espaciador hidrogenocarbonato de amonio a distintos porcentajes (30%, 40%, 50% y 60%) y en distintos rangos de tamaño de partículas (100-200  $\mu\text{m}$ , 200-355  $\mu\text{m}$  y 355-500  $\mu\text{m}$ ).

Se presentarán posibles soluciones a los tres problemas anteriormente comentados, haciendo hincapié en algunas de las técnicas de modificación superficial existentes.

Por último, se caracterizarán todos los sustratos vírgenes, así como aquellos que hayan sido sometidos a una de las técnicas presentadas. En concreto, se analizarán sustratos modificados superficialmente por ataque químico, sustratos de aleación Ti- $\beta$  recubiertos con grafeno, sustratos recubiertos con nanopartículas de plata y sustratos recubiertos con vidrios bioactivos.



# Abstract

---

Nowadays, there are many implants for total or partial replacement of bone tissue that are made of titanium c.p. and alloys thereof. Due to the biocompatibility of this material and its alloys, as well as its excellent mechanical and chemical properties, it is one of the most widely used biomaterials in the field of medicine. However, prostheses made of Ti and alloys have three major problems: stress shielding, poor fatigue behavior and poor osseointegration.

In order to improve the problems mentioned, in the following work a series of porous Ti substrates were manufactured by pluvimetallurgy using the spacers technique. Using ammonium hydrogen carbonate as a spacer at different percentages (30%, 40%, 50% and 60%) and in different ranges of particle size (100-200  $\mu\text{m}$ , 200-355  $\mu\text{m}$  and 355-500  $\mu\text{m}$ ).

Possible solutions to the three problems discussed above will be presented, emphasizing some of the existing surface modification techniques.

Finally, all virgin substrates will be characterized, as well as those that have been subjected to one of the techniques presented. Specifically, substrates surface modified by chemical attack, Ti- $\beta$  alloy substrates coated with graphene, substrates coated with silver nanoparticles and substrates coated with bioactive glasses will be analyzed.



<b>Agradecimientos</b>	<b>vii</b>
<b>Resumen</b>	<b>ix</b>
<b>Abstract</b>	<b>xi</b>
<b>Índice</b>	<b>xiii</b>
<b>Índice de Figuras</b>	<b>xv</b>
<b>Índice de Tablas</b>	<b>xix</b>
<b>Notación</b>	<b>xxi</b>
<b>1 Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2 Estado del Arte</b>	<b>3</b>
2.1 <i>Biología Ósea</i>	3
2.1.1 Clasificación ósea según geometría y tamaño	3
2.1.2 Estructura ósea	4
2.2 <i>Biomateriales</i>	8
2.2.1 Contexto histórico	8
2.2.2 Definición y descripción de los biomateriales	9
2.2.3 Clasificación de los biomateriales	10
2.2.4 Aplicación de metales como biomateriales	10
2.3 <i>Problemática de los metales como biomateriales</i>	13
2.3.1 Apantallamiento de tensiones	13
2.3.2 Comportamiento a fatiga	16
2.3.3 Osteointegración	17
2.3.4 Ataque químico mediante soluciones ácidas	18
<b>3 Objetivos</b>	<b>24</b>
<b>4 Procedimiento Experimental</b>	<b>26</b>
4.1 <i>Materiales empleados</i>	27
4.1.1 Titanio	27
4.1.2 Hidrogenocarbonato de amonio	27
4.2 <i>Procedimientos experimentales</i>	28
4.2.1 Fabricación de probetas de Ti c.p. porosas	28
4.2.2 Fabricación de probetas de con pluvimetarlungia convencional (PM)	33
4.2.3 Preparación metalográfica	35
4.2.4 Caracterización de la porosidad	37
4.2.5 Técnicas de modificación superficial	40
4.2.6 Técnicas de caracterización superficial	43
<b>5 Resultados y Discusión</b>	<b>47</b>
5.1 <i>Caracterización sustratos de los sustratos porosos fabricados</i>	47
5.1.1 Macrofotografías	47
5.1.2 Análisis de imagen	48
5.2 <i>Caracterización de probetas sometidas a ataque químico</i>	51
5.2.1 Análisis de imagen	52
5.2.2 Ensayo de compresión uniaxial	53
5.2.3 Ensayo micromecánico	53
5.2.4 Ensayo de adhesión y proliferación celular	54

5.2.5	Medición de actividad de ALP	56
5.2.6	Rojo alizarina grabado químico	57
5.3	<i>Caracterización de probetas recubiertas con grafeno</i>	58
5.3.1	Análisis de imagen	58
5.3.2	Ensayo micromecánico sustratos no recubiertos	58
5.3.3	Caracterización del recubrimiento de grafeno	59
5.3.4	Ensayos de biocompatibilidad	60
5.3.5	Análisis bioestadístico	61
5.4	<i>Caracterización de probetas depositadas con AgNPs</i>	61
5.4.1	Análisis de imagen	61
5.4.2	Ensayos de comportamiento antibacteriano	62
5.5	<i>Caracterización de probetas recubiertas con vidrios bioactivos</i>	63
5.5.1	Caracterización macroscópica de recubrimientos monocapa	63
5.5.2	Análisis de imagen de los recubrimientos monocapa	64
5.5.3	Análisis de imagen de los recubrimientos bicapa	67
5.5.4	Ensayo micromecánico	68
5.5.5	Ensayos de bioactividad sobre la capa de BG 45S5	70
<b>6</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>71</b>
6.1	Sustratos no tratados:	71
6.2	Sustratos modificados con ataque químico:	71
6.3	Sustratos recubiertos con vidrios bioactivos:	71
6.4	Substratos recubiertos con grafeno:	72
6.5	Substratos recubiertos con nanopartículas de plata:	72
<b>7</b>	<b>Trabajos Futuros</b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>Referencias</b>	<b>75</b>

# Índice de Figuras

---

Figura 1	Gráfica piramidal de la población española en el tiempo [2]	1
Figura 2	Variación de la población entre 2020 y 2050 [4]	1
Figura 3	Esquema de las partes que conforman un hueso largo [8]	4
Figura 4	Estructura interna del hueso [11]	5
Figura 5	Osteoclastos [13]	6
Figura 6	Osteoblastos [14]	6
Figura 7	Morfología de osteocitos [15]	7
Figura 8	Célula de borde (BLC) pegada a una superficie ósea (B) [16]	7
Figura 9	Conjunto de instrumentos quirúrgicos de la Casa del Cirujano de Pompeya [19]	8
Figura 10	Ilustración de distintos implantes empleados para distintas finalidades [21]	9
Figura 11	Evolución de los valores de distintas propiedades en función del tipo de aleación	13
Figura 12	Comparación entre la distribución de cargas en el caso de un fémur intacto y un fémur implantado en los casos de A) mayor y B) menor valor de apantallamiento de tensiones [39]	14
Figura 13	Esquema de distintas técnicas de fabricación de matrices metálicas	16
Figura 14	Esquema clasificatorio de distintas técnicas de modificación de rugosidad superficial	18
Figura 15	Esquema de algunos métodos de recubrimientos bioactivos frecuentes	20
Figura 16	Métodos de aplicación de recubrimiento de grafeno	22
Figura 17	Esquema de los principales problemas presentes en implantes metálicos	24
Figura 18	Esquema de las diferentes técnicas y probetas fabricadas	26
Figura 19	Componentes empleados para la fabricación de los sustratos con espaciador	27
Figura 20	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> clasificado según el diámetro de partículas	28
Figura 21	Esquema ilustrativo de las probetas a fabricar	29
Figura 22	Diagrama de flujo del proceso a seguir para la fabricación de los sustratos	29
Figura 23	Mezcladora WAB Machiney, Túbula T2C	30
Figura 24:	(a) Plato vibratorio para proceso de tamizado, (b) tamices empleados	30
Figura 25	Rangos de tamaño de partículas resultantes del tamizado	31
Figura 26	Báscula empleada para el pesaje de los materiales	31
Figura 27	Horno Heaus modelo T5042E	33
Figura 28:	(a) Sustratos en verdes, (b) sustratos tras el proceso de sinterizado	33
Figura 29	Matriz, punzones y elementos para limpieza de los mismos	34
Figura 30	Prensa Suzpecar 600 kN	35
Figura 31	Granos de abrasivo por unidad de área de las lijas empleadas	36
Figura 32	Desbastadora STRUERS [70]	36

Figura 33: (a) Reactivos para mezcla del pulido [70], (b) Pulidora STRUERS	37
Figura 34 Proceso de limpiado con ultrasonidos	37
Figura 35 Métodos de caracterización de probetas	38
Figura 36 Calibre digital MITUTOYO [70]	38
Figura 37 Microscopio óptico empleado Nikon Epiphot con cámara Jenoptik Progress C3 acoplada	39
Figura 38 Ejemplos del proceso de análisis de imagen	40
Figura 39 Sustratos fabricados con tamaño de espaciador 100-200 $\mu\text{m}$ a distintos porcentajes de porosidad	47
Figura 40 Sustratos fabricados con tamaño de espaciador 200-355 $\mu\text{m}$ a distintos porcentajes de porosidad	47
Figura 41 Sustratos fabricados con tamaño de espaciador 355-500 $\mu\text{m}$ a distintos porcentajes de porosidad	48
Figura 42 Micrografía titanio macizo	48
Figura 43 Micrografía sustrato tamaño de poro 100-200 $\mu\text{m}$ 30% de porosidad	48
Figura 44 Micrografía sustrato tamaño de poro 100-200 $\mu\text{m}$ 60% de porosidad	49
Figura 45 Micrografía sustrato tamaño de poro 100-200 $\mu\text{m}$ 40% de porosidad [70]	49
Figura 46 Micrografía sustrato tamaño de poro 355-500 $\mu\text{m}$ 30% de porosidad	49
Figura 47 Micrografía sustrato tamaño de poro 355-500 $\mu\text{m}$ 40% de porosidad	50
Figura 48 Micrografía sustrato tamaño de poro 355-500 $\mu\text{m}$ 50% de porosidad	50
Figura 49 Micrografía sustrato tamaño de poro 355-500 $\mu\text{m}$ 60% de porosidad	50
Figura 50 Micrografía SEM de todas las superficies de titanio junto con una imagen macroscópica del sustrato [77]	52
Figura 51 Imagen SEM detallada de la estructura de la porosidad superficial [77]	52
Figura 52 Resultados del análisis estadístico sobre la viabilidad celular de la línea C2C12-GFP transcurrido un día de ensayo [77]	54
Figura 53 Microfotografías fluorescentes de: (A) adhesión celular y (B) proliferación de la línea celular [77]	55
Figura 54 Resultado del análisis estadístico de la viabilidad celular del cultivo de MC3T3E1 a A) 4 y B) 7 días [77]	56
Figura 55 Microfotografías obtenidas del cultivo celular de MC3T3E1 tras el estudio de fluorescencia [77]	56
Figura 56 Resultados de la evaluación de diferenciación celular con ALP [77]	57
Figura 57 Micrografías para evaluación de la mineralización celular a los 14 días aplicada la prueba de alizarina.[77]	57
Figura 58 Micrografías de los sustratos: a) cp Ti Tsint 1250°C, b) 4% en peso Mn- Tsint: 1200 °C c) 4% en peso de Mn- Tsint: 1300 °C [78]	58
Figura 59 Gráficas tensión deformación a las diferentes temperaturas de sinterizado [78]	59
Figura 60 Micrografía de la aleación con 4% en peso de Mn recubiertos con una SLG [78]	59
Figura 61 Imagen de la aleación con 4% en peso de Mn recubiertos con una SLG. Detalle de grafeno suspendido en los poros [78]	60
Figura 62 Espectros Raman de grafeno monocapa sobre sustratos: sobre una superficie	60
Figura 63 Crecimiento de células con extracto líquido y con contacto directo sobre material recubierto de grafeno [78]	61
Figura 64 Imágenes SEM de recubrimiento de nanopartículas de plata [79]	62
Figura 65 Halos inhibidores bacterianos señalando diámetros [79]	62
Figura 66 Resultados zona de inhibición para distinto tamaño de poro [79]	63

Figura 67	Macrografía de los sustratos de titanio con el recubrimiento dispuesto antes y después de ser sometidos a tratamiento térmico [80]	64
Figura 68	Imagen SEM de los recubrimientos monocapa [80]	64
Figura 69	Secciones transversales de los recubrimientos (a y b BG 45S5; c de BG 1393)[80]	65
Figura 70	Propiedades micromecánicas de los sustratos con recubrimiento de bioglass: (a,b) curvas P-h; (c,d) microdureza y E [80]	66
Figura 71	Propiedades micromecánicas de los sustratos vírgenes: (a) curva P-h; (b) microdureza y E [80]	67
Figura 72	Imágenes SEM de la sección transversal del recubrimiento bicapa [81]	67
Figura 73	Curvas P-h obtenidas para distinto porcentaje de porosidad y de tamaño de poro en caso de recubrimiento monocapa o bicapa [81]	69
Figura 74	Gráfica comparativa de los valores de penetración [81]	69
Figura 75	Espectro <sup>29</sup> SiMAS NMR para el BG 45S5 [81]	70



# Índice de Tablas

---

Tabla 1	Datos de la composición de los grados de Ti c.p.	12
Tabla 2	Propiedades mecánicas de varios biomateriales frente al hueso	14
Tabla 3	Composición (% en peso) polvo de titanio SE-JONG	27
Tabla 4	Rangos de tamaño de porosidad de los sustratos fabricados	28
Tabla 5	Distintos porcentajes de porosidad de los sustratos fabricados	28
Tabla 6	Clasificación de los sustratos fabricados en función de la porosidad	47
Tabla 7	Tabla resumen de las técnicas aplicadas a cada sustrato particular	51
Tabla 8	Resultados de la caracterización mecánica de los sustratos [77]	53
Tabla 9	Resultados de la caracterización micromecánica [77]	53
Tabla 10	Parámetros morfológicos de los poros [78]	58
Tabla 11	Propiedades mecánicas de las aleaciones porosas de Ti c.p. y Ti-Nb-Ta-Mn [78]	59
Tabla 12	Espesor de la capa y parámetros obtenidos con láser confocal [81]	68



# Notación

---

AgNP	Nanopartículas de plata
APS	Persulfato de amonio (Ammonium persulfate)
ASTM	American Society for Testing and Materials
BCC	Cúbica centrada en las caras (Body Centered Cubic)
c.p.	Comercialmente puro
CVD	Deposición química de vapor (Chemical Vapor Deposition)
E	Módulo de Young
Ed	Módulo de Young dinámico
EBM	Sinterizado por haz de electrones (Electron Beam Melting)
HA	Hidroxiapatita
HCP	Hexagonal compacta (Hexagonal Close Packed)
ISO	Organización Internacional de Normalización (International Organization for Standardization)
MAS NMR	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de estado sólido con giro de ángulo mágico (Magin Angle Spin Nuclear Magnetic Resonance)
NTC	Nanotubos de carbono
NP	Nanoparticulas
PMMA	Polimetacrilato
PBS	Tampón fosfato salino ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PFA	Paraformaldehido
PM	Pluvimeturgia
PVA	Acetato de polivinilo
RTA	<i>Rapid Termal Processing</i>
SEM	Microscopio electrónico de barrido ( <i>Scanning Electron Microscope</i> )
SLG	Capa única de grafeno ( <i>Single Layer Graphene</i> )



# 1 INTRODUCCIÓN

La ciencia ha realizado grandes avances en el campo de la salud durante los últimos años. Esto ha permitido aumentar la esperanza de vida de la población hasta el punto de ser necesario introducir el término de “población envejecida”.

La Organización Mundial de la Salud define la población envejecida o el “envejecimiento activo” como la serie de mejoras realizadas en la calidad de vida de las personas, sobre todo una vez alcanzada la vejez [1]. La población envejecida se caracteriza por ser una población en la que los grupos de edades avanzadas siguen creciendo frente a la situación estática o menguante de los grupos de edades menores. El envejecimiento de la población nacional se ve claramente reflejado en las cifras aportadas por el Instituto Nacional de Estadística: en 2021, nuestro país alcanzó su máximo valor histórico de envejecimiento con un 129%, es decir, más de 129 personas mayores de 64 por cada 100 personas menores de 16 años.

**Población a 1 enero 2021: 47.394.223**

**Pirámides de Población de España: ayer, hoy y mañana**

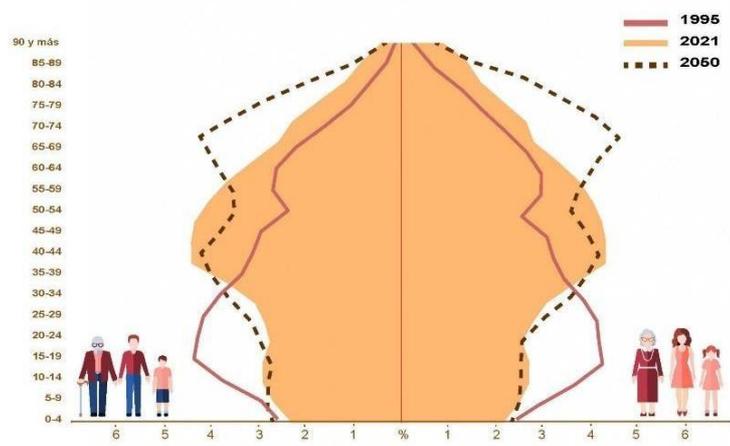


Figura 1 Gráfica piramidal de la población española en el tiempo [2]

Cabe señalar que, a pesar de la pandemia del Covid-19, la cual atacó más gravemente a la población de edad avanzada, se ha superado la cifra de envejecimiento del 2020, 125.7% [3].

Mundialmente, se prevé que más del 20% de la población, más de 2 millones de personas, pertenecerán a los grupos de edad mayores de 60 para el año 2050 [4].

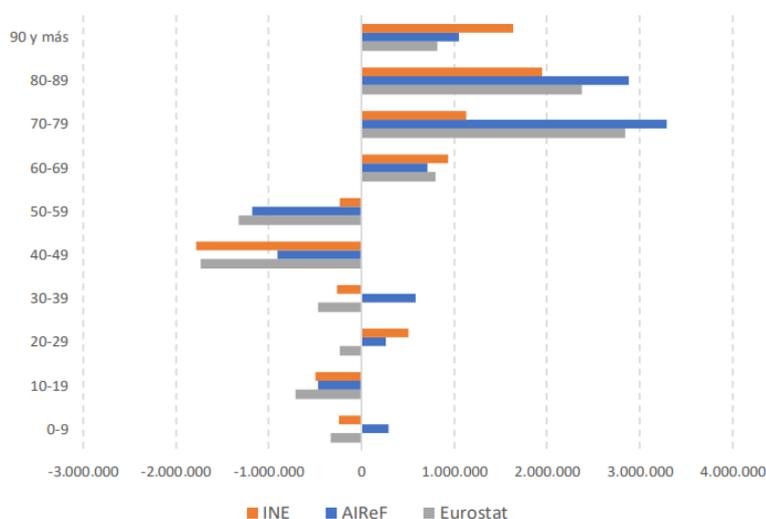


Figura 2 Variación de la población entre 2020 y 2050 [4]

De la mano del envejecimiento de la población viene la necesidad de otorgarles una calidad de vida digna, encontrando soluciones a problemas de salud derivados de la edad que los solventen por completo o que ayuden a mejorar sus efectos. Muchas de estas condiciones de salud están relacionadas con el sistema musculoesquelético, con consecuencias graves para el individuo afectado tanto a nivel físico como mental debido a la dependencia que un problema de esta índole puede ocasionar. Para afrontarlos, la ingeniería biomédica estudia distintos campos entre los cuales se encuentra el de los biomateriales.

Este campo es muy relevante para el desarrollo de prótesis, cada vez más necesarias en la sociedad actual, tanto por motivos estéticos como funcionales. Dichas prótesis, que engloban a los implantes dentales, necesitan presentar una serie de propiedades para que su inserción en el organismo humano sea exitosa. Entre estas se encuentran unas buenas propiedades mecánicas que a su vez sean compatibles con las propiedades óseas. También es necesaria una buena interacción de la prótesis con el medio, apareciendo en este punto términos como la osteointegración y la bioactividad, desarrollados a lo largo de este trabajo.

### 2.1 Biología Ósea

El sistema óseo está formado por los huesos, estructuras rígidas y duras que cumplen con seis funciones principales. La primera es la función estructural por la cual el esqueleto se encarga de dar sostén y soporte a los órganos y tejidos blandos que componen el organismo. Otra función importante es la de protección de los órganos internos como es el caso del cerebro, protegido por el cráneo o de los pulmones y el corazón, protegidos por la caja torácica. La función de locomoción consiste en asistir a los músculos a la hora de la realización de un movimiento, ayudando a transmitir cargas y sirviendo de puntos de anclaje. Una cuarta función sería la de almacenaje y liberación de minerales u homeostásis mineral como, por ejemplo, del calcio y del fósforo.

La producción de células sanguíneas y el almacenaje de triglicéridos son también dos funciones importantes del hueso debido a que en su interior puede alojar médula ósea roja o amarilla que servirán para la producción de ciertas células sanguíneas o como almacenamiento energético respectivamente.

#### 2.1.1 Clasificación ósea según geometría y tamaño

Un método de clasificación de los huesos es atendiendo a la forma y el tamaño de los mismos quedando agrupados de la siguiente manera [5] [6] [7].

- **Huesos largos**

Se denomina así a aquellos huesos cuya dimensión longitudinal es mucho mayor que su diámetro. Son alargados y duros y se encargan de soportar las cargas a las que esté sometido el cuerpo y son los principales contenedores de médula ósea amarilla. Principalmente se localizan en los brazos y piernas. Para evaluar la estructura del hueso largo, generalmente se plantea una visión macroscópica en la que es posible distinguir seis partes principales:

- **Diáfisis:** es la zona central del hueso, ubicada entre las dos zonas de crecimiento del mismo. Formada por hueso compacto y recubierta por periostio. Aloja la cavidad medular.
- **Epífisis:** corresponde a las dos zonas extremas del hueso y está principalmente formada por tejido esponjoso en la zona central cubierto por una capa de tejido compacto exteriormente. Sería en esta zona donde, en determinados huesos largos, se almacenaría la médula ósea roja.
- **Metáfisis:** se trata de la región ubicada a continuación de la epífisis, colindando también con la diáfisis. Aloja el cartílago hialino.
- **Cartílago articular:** ubicado en la epífisis recubriendo zonas de articulación entre distintos huesos.
- **Cavidad medular:** ubicada en el interior de la diáfisis y mayormente compuesta por células adiposas. También denominada médula ósea amarilla.
- **Endostio:** tejido conectivo que recubre a la cavidad medular.
- **Periostio:** se trata de un tejido conectivo que constituye la parte externa de la epífisis.

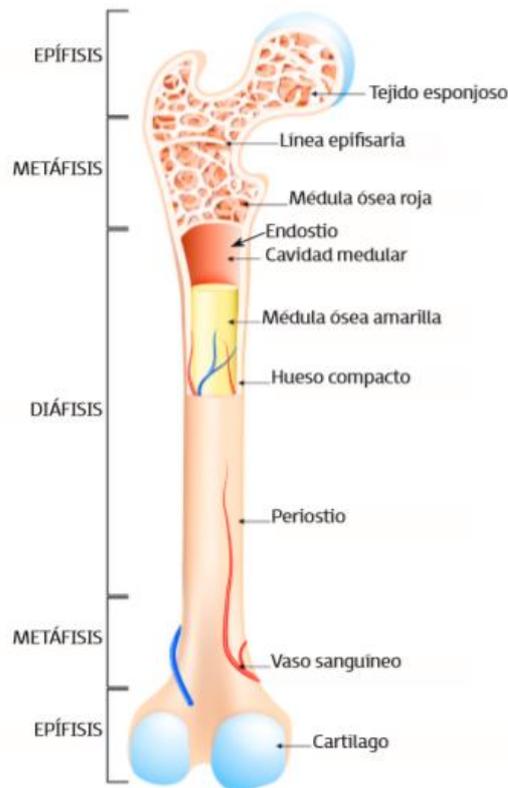


Figura 3 Esquema de las partes que conforman un hueso largo [8]

- **Huesos cortos**

Presentan generalmente una forma regular sin una dimensión dominante. Se encuentran principalmente agrupados en articulaciones como la muñeca. Exteriormente formado por periosteo, encierra hueso esponjoso que facilitará la absorción de cargas.

- **Huesos planos**

Son huesos de pequeño espesor con dos caras cuya función principal es la protección de los tejidos blancos. Ejemplos de este tipo de hueso son el omóplato y el esternón. También pueden servir de anclaje.

- **Huesos sesamoideos**

Se trata de unos huesos de un tamaño muy pequeño (salvedad de la rótula) y forma redondeada encargados principalmente de la transmisión de fuerzas. Generalmente adicionado a huesos de mayor tamaño. Muy presentes en manos y pies.

- **Huesos irregulares**

Abarca aquellos huesos que no es posible clasificar en ninguna de las otras categorías debido a que no cumplen las características de las mismas por causas mayormente morfológicas. Ejemplos de este grupo son las vértebras.

## 2.1.2 Estructura ósea

El tejido óseo tiende a clasificarse en dos grupos claramente diferenciados de manera macroscópica: el hueso trabecular y el hueso cortical [6] [9] [10].

- **Hueso esponjoso o trabecular**

Presenta una estructura porosa que suele conformar el interior de muchos tipos de huesos. Posee una porosidad de aproximadamente el 75-95%. Está compuesto por multitud de cavidades vasculares. Recibe el nombre de hueso trabecular debido al hecho de que este tipo de tejido está formado por una serie de trabéculas que no son sino unas barras y placas de tejido mineralizado. Las trabéculas se encuentran conectadas entre sí de forma aleatoria quedando huecos entre sí en los que se alojará la

médula ósea.

#### ▪ **Hueso compacto o cortical**

La porosidad que presenta es mucho menor que en el caso del hueso trabecular, tan solo de entre 5-10%. Esta porosidad es conformada por [5]:

- **Canales de Havers:** se encuentran situados longitudinalmente al hueso rodeados por osteona. Contienen vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas.
- **Canales de Volkmann:** son transversales a los canales de Havers, como ramificaciones de los mismos que los conectan entre sí, y atraviesan la osteona. También procuran la conexión de los canales de Havers con el periostio.
- **Cavidades de reabsorción:** cavidades provocadas por los osteoclastos en el proceso de remodelación ósea.

A los huesos de este grupo también se les denomina huesos densos por presentar una alta resistencia. Es por ello que una de sus funciones más relevantes es la protectora, pudiéndose encontrar formando las paredes de los huesos a modo de protección. Representa en torno al 80% de la totalidad del esqueleto.

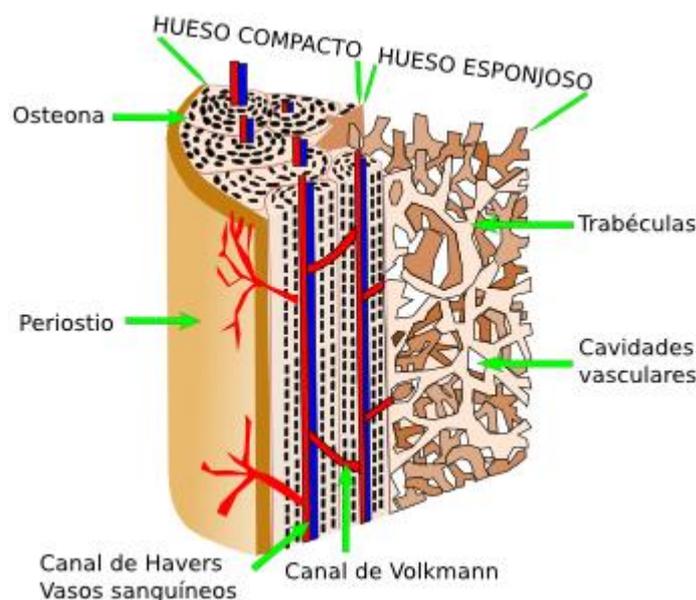


Figura 4 Estructura interna del hueso [11]

Por otro lado, el tejido óseo está formado por los siguientes elementos:

#### ▪ **Matriz ósea**

Formada por una fase orgánica que se encarga principalmente de aportar rigidez, tenacidad y elasticidad al tejido óseo, y por una fase mineral que sirve de refuerzo estructural. El resto del contenido de la matriz ósea, aproximadamente el 10% de la misma, es agua.

#### ▪ **Células óseas**

En el tejido óseo participan de manera general cuatro tipos de células pertenecientes a dos líneas celulares diferentes. Una de ellas está destinada a la creación de tejido óseo y en esta línea se encuentran los osteoblastos y los osteocitos y células de borde.

Por otro lado, están los osteoclastos, los cuales se encargan de degradar el hueso para llevar a cabo los procesos de regeneración ósea.

Será necesario que estas células trabajen en equipo de manera equilibrada para conseguir que el proceso de remodelación ósea sea constante: los osteoclastos destruyen el tejido óseo viejo o dañado, los osteoblastos reponen ese tejido eliminado y los osteocitos y las células de borde se encargan del mantenimiento del proceso. Un desequilibrio en el mismo puede desencadenar enfermedades como la osteoporosis, que consiste en una pérdida importante de masa ósea provocada, por ejemplo, por un exceso de actuación de osteoclastos o por una insuficiente de los osteoblastos [7] [12].

- **Osteoclastos:** Estas células se encargan de reabsorber tejido óseo. Son células de gran tamaño que poseen varios núcleos dado que se forman mediante la fusión de cierto número de osteoclastos anteriores. Una vez los osteoclastos están maduros, serán capaces de iniciar el proceso de reabsorción ósea. Lo llevarán a cabo mediante la producción de una serie de enzimas que disolverán la matriz ósea. Cuando termina el proceso de reabsorción ósea, los osteoclastos mueren por apoptosis (suicidio celular o muerte programada) encogiendo sus núcleos y dejando, finalmente, una serie de cavidades en la matriz ósea. El calcio que estaba presente en la matriz ósea destruida por estas células pasa de nuevo a la médula ósea [10].

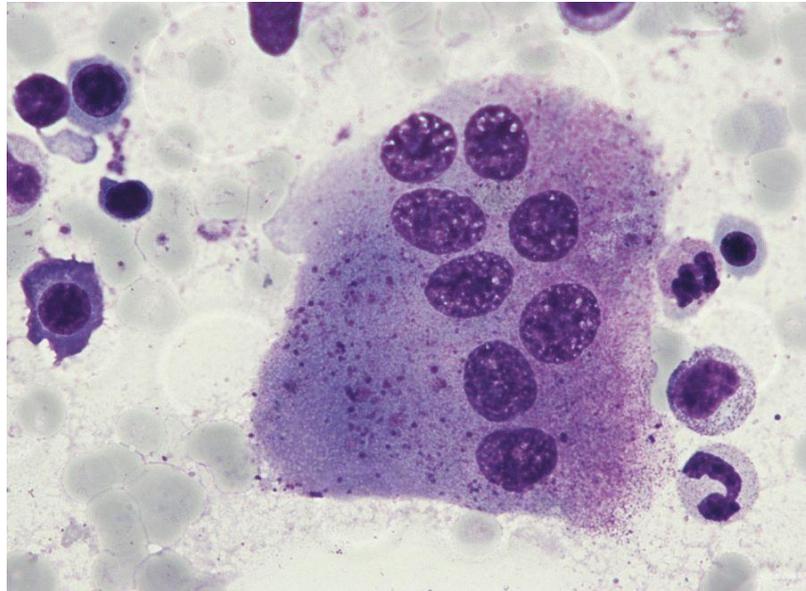


Figura 5 Osteoclastos [13]

- **Osteoblastos:** Su función es la de generar tejido óseo, así como procurar su crecimiento y mineralización. Estas pequeñas células mononucleadas actúan tras los osteoclastos, depositando osteoide tras un tiempo prudencial de aproximadamente 8 días a fin de que la cavidad sobre la que van a trabajar haya quedado lo más limpia posible de los restos de ácido dejados por los osteoclastos tras su actuación. El osteoide no es más que una mezcla de agua y fase orgánica de la matriz por lo que, para que la matriz esté completa, tendrá posteriormente lugar un proceso de mineralización. Se formará la fase inorgánica.

A la hora de morir, los osteoblastos tienen dos opciones: la apoptosis o la diferenciación. Los osteoblastos pueden diferenciarse en osteocitos o en células de borde [10].



Figura 6 Osteoblastos [14]

- **Osteocitos:** Este tipo de célula, la más común y que representan sobre el 95% de las células óseas, surge de la diferenciación de ciertos osteoblastos. Estos osteoblastos precursores, llegado su momento, fueron absorbidos por la matriz ósea y terminaron convirtiéndose en osteocitos sin llegar a morir.

El osteocito presentará un cuerpo llamado laguna y unas prolongaciones que discurrirán a través de los canaliculos (conductos existentes en la matriz ósea). Estas prolongaciones serán su principal herramienta ya que la función de los osteocitos, asegurar el mantenimiento de las actividades celulares llevadas a cabo por los osteoblastos y osteoclastos, requiere de una buena comunicación entre osteocitos. Mediante señales bioquímicas, los osteocitos informan a las células de borde de posibles alteraciones que requieran la presencia de osteoblastos u osteoclastos [10].

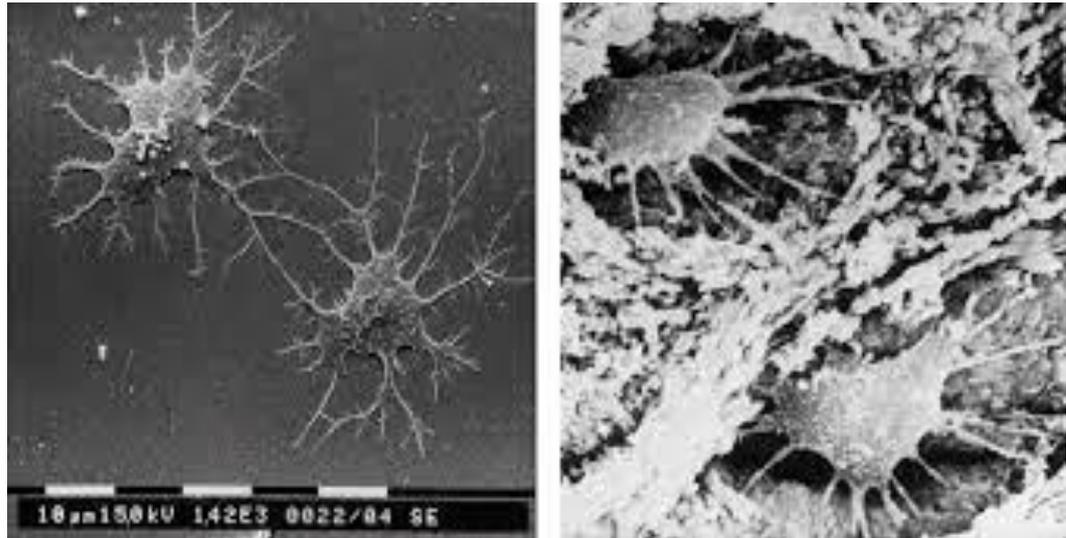


Figura 7 Morfología de osteocitos [15]

- **Células de borde:** Proviene de la diferenciación de osteoblastos maduros y adquieren una forma aplanada favorable para recubrir la interfaz ósea-médula a modo de protección. Como otra gran misión, tienen la de mantener el contacto con los osteocitos. Estos les enviarán una serie de señales bioquímicas en caso de alteraciones provocando que las células de borde generen otras señales bioquímicas que acaben con la puesta en marcha del proceso de regeneración ósea de nuevo [10].

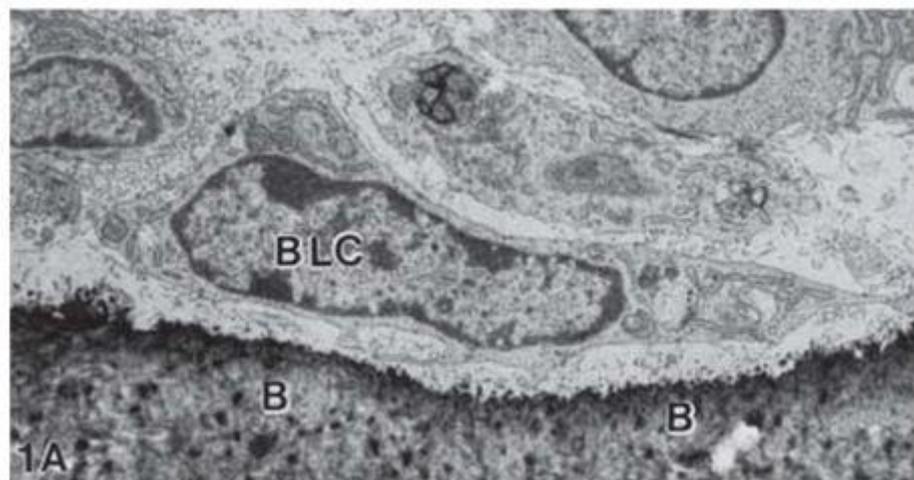


Figura 8 Célula de borde (BLC) pegada a una superficie ósea (B) [16]

## 2.2 Biomateriales

### 2.2.1 Contexto histórico

Desde sus orígenes, el ser humano ha tenido que enfrentarse a la enfermedad y a la muerte. Es por ello que, durante toda su existencia, ha tratado de descubrir y desarrollar métodos para evitarlas o paliarlas. La ciencia intenta reproducir a la naturaleza a fin de encontrar solución a problemas biológicos. Investigadores de todas las ramas trabajan en pos de conseguir dispositivos que cumplan las mismas funciones que aquellos que son creados por la propia naturaleza e incluso plagiar e imitar procesos biológicos, lo cual resulta una tarea difícil.

Ya desde la prehistoria se hacía uso de distintos materiales con este fin, destacando, en esta época, la piedra y la madera. Iniciada la Edad de los Metales, los cuchillos, sierras y leznas de piedra, madera, hueso, etc., empiezan a verse sustituidos por herramientas de bronce, oro, hierro y acero. Unas de las piezas metálicas para uso médico más antiguas conservadas en la actualidad son unos cuchillos de cobre, utilizados como elementos quirúrgicos en torno al año 300 a.C. por los sumerios. Del mismo modo, está recogido en el Código de Hammurabi de Babilonia, el uso de lancetas de bronce alrededor del 1700 a.C. [17], aunque no se conserven, así como se sabe que los antiguos egipcios (2500 a.C.) empleaban instrumentos de cobre para practicar incisiones y, muy frecuentemente, para retirar órganos durante el proceso de momificación.

El hecho de que practicar cortes, perforaciones o amputaciones sobre el cuerpo estuviese altamente criticado y rechazado por la mayoría de las religiones en la antigüedad, hace que estas prácticas quirúrgicas se desarrollasen de forma discreta e incluso clandestina por lo que no se tienen demasiados documentos que recojan información sobre las mismas. Supone una razón importante para que, durante muchos años, no se obtuviesen avances en el campo [18].

Instrumentos quirúrgicos de bronce como el bisturí, pinzas o tijeras fueron hallados en Pompeya. Una de las civilizaciones que más desarrollos obtuvo en este campo fue la hindú, ya que recogieron la mayoría de sus conocimientos textual y gráficamente, por lo que se sabe que hacían mucho uso del acero. Gracias a la sustitución del acero y el hierro por el bronce a lo largo de los años es, hoy en día, posible la conservación de los citados ejemplares, debido a su mayor resistencia a la corrosión.



Figura 9 Conjunto de instrumentos quirúrgicos de la Casa del Cirujano de Pompeya [19]

Con la llegada del Renacimiento se fue afinando el desarrollo de las prótesis, comenzándose a usar metales distintos al hierro, así como una tecnología superior. Metales preciosos como la plata y el oro [18] [20] comenzarían a ser usados en el campo de la medicina para la creación de “prótesis” en la antigüedad, aunque la función de éstas respondía más bien a cuestiones estéticas que médicas. No todo el mundo podía permitirse tales lujos, por lo que, con el tiempo, empezó a popularizarse el uso de prótesis de hierro y bronce, que conllevaban un coste mucho menor, y a buscar una mayor funcionalidad de las mismas. Algunos de estos metales siguen relativamente presentes en la medicina contemporánea, principalmente en el terreno de la odontología, aunque, gracias al desarrollo y descubrimiento de nuevos materiales con usos médicos, esta presencia no es destacable.

En la actualidad, la mayoría de restauraciones protésicas se crean máxime de aleaciones de aluminio, titanio, acero inoxidable y níquel entre otros.

El principal motivo de estos cambios reside en el hecho de que el ser humano tiende a buscar mejores soluciones ante situaciones médicas adversas. Su búsqueda persigue una mayor comodidad y mejora de la calidad de vida y, puesto que además la población tiende cada vez a vivir más años, se hace inevitablemente necesario solventar los problemas típicos de la edad como puedan ser el deterioro del tejido óseo y la no regeneración de tejidos. Los reemplazos más comunes hoy en día son los de cadera, rodilla y hombro puesto que se trata de zonas expuestas a muchas cargas y tienden a fallar primero. Es por esto que la función principal de las prótesis solía ser puramente mecánica, buscando que resistiera lo mejor posible ante situaciones de tracción, compresión, etc., que tuviesen alta tenacidad y ductilidad.

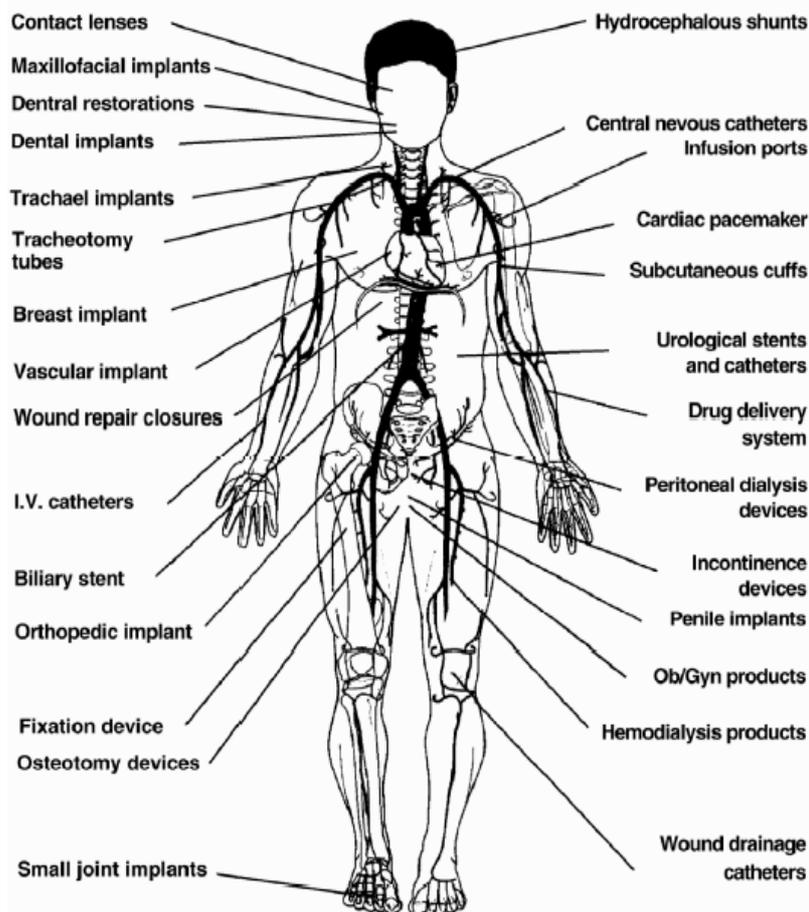


Figura 10 Ilustración de distintos implantes empleados para distintas finalidades [21]

Con los años se han ido añadiendo y mejorando sus propiedades hasta conseguir desarrollar unas prótesis mucho más sofisticadas. A día de hoy, en una prótesis se buscan, además de las mecánicas, propiedades como la bioactividad y la biocompatibilidad. No basta con que el material sea bioinerte, ya que así se obtiene una mejor respuesta del organismo ante la introducción de un cuerpo extraño en el mismo y su posterior asimilación e integración en el medio.

Con el fin de encontrar materiales compatibles con todas las solicitudes se empieza a desarrollar el campo de los biomateriales, siendo por 1920 cuando Reiner Erdle y Charles Prange, médico dentista y metalúrgico respectivamente, desarrollaron el primer biomaterial propiamente dicho, la aleación Vitallium [22] [23]. Actualmente, el campo de los biomateriales está en continuo auge, investigación y desarrollo.

## 2.2.2 Definición y descripción de los biomateriales

En 1991, la Sociedad Europea de Biomateriales, definió a los biomateriales como “materiales utilizados para evaluar, curar, corregir, o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo humano” [24].

El cuerpo humano está diseñado para rechazar elementos extraños que intenten invadirlo, pero los materiales biocompatibles son capaces de cumplir la función médica para la que fueron diseñados sin provocar reacciones alérgicas por parte del sistema inmunitario del receptor o paciente. Esto es lo que se denomina aceptación biológica.

La biocompatibilidad hace referencia a la capacidad que posee un material no vivo de coexistir con un medio biológico sin destruirlo ni corromperlo. Se trata de una cualidad indispensable para los materiales de uso médico en contacto directo con tejidos y fluidos corporales, independientemente de si se trata de un contacto temporal o prolongado en el tiempo. A fin de evaluar la biocompatibilidad se han desarrollado una serie de ensayos con los que es posible determinar el impacto que supondría el biomaterial ensayado para el organismo con el que tendría contacto (toxicidad, impacto químico, etc.) [24].

Los biomateriales deben cumplir, además, con una serie de requisitos mecánicos que solicitarán al material en cuestión unas propiedades mecánicas lo más similares posibles a las que presenta el tejido al que sustituye. El biomaterial debe presentar una buena resistencia a fatiga, buena resistencia mecánica, rigidez, cumplir con unos requisitos geométricos determinados y presentar un peso no muy elevado.

### 2.2.3 Clasificación de los biomateriales

Los biomateriales pueden ser clasificados de formas muy diversas en función de a qué propiedades o características se atiende [25] [26] [27]. Ejemplos de ellos son las siguientes posibles clasificaciones:

- Según su composición:
  - Metálicos
  - Compuestos
  - Poliméricos
  - Cerámicos
- Según su origen:
  - Natural
  - Artificial
- Según la duración del contacto con el organismo:
  - Temporal
  - Permanente
- Según la interacción con el organismo:
  - Bioinertes
  - Bioactivos
  - Bioabsorbibles
  - Biomiméticos
- Según su objetivo:
  - *Primera generación*: materiales lo más inertes posibles para reducir al máximo posible cualquier respuesta del sistema inmunológico.
  - *Segunda generación*: materiales bioactivos capaces de interactuar con el medio biológico.
  - *Tercera generación*: no solo son aceptados por el organismo e interactúan con él, sino que estimulan respuestas por parte del mismo.
  - *Cuarta generación*: conocidos como biomateriales inteligentes, persiguen ayudar en la autocuración del organismo mediante interacciones, provocación de respuestas y estimulación de tejidos, células y moléculas.

### 2.2.4 Aplicación de metales como biomateriales

El metal ha sido usado en el campo de la medicina desde la antigüedad como bien demuestran los restos arqueológicos hallados y los escritos conservados. Ambroise Paré, cirujano francés del siglo XVI considerado el padre de la ortopedia actual, comenzó en 1546 a utilizar placas de oro para ayudar en el proceso de reparación de fracturas de cráneo, así como hilos de oro para suturar. Evidentemente por desconocimiento, en esa época poco importaba la biocompatibilidad del material frente a su resistencia mecánica. Esto era uno de los principales motivos de que un gran número de intervenciones acabasen en infecciones importantes.

No fue hasta 1829 que H.S. Levert comenzó a estudiar la compatibilidad de los metales con el organismo. Concretamente estudió los efectos del platino, la plata, el plomo y el oro en un organismo vivo (concretamente un perro) [28].

El elevado uso de los biomateriales metálicos en el ámbito médico se debe a que estos presentan excelentes propiedades mecánicas además de las ya comentadas indispensables propiedades de biocompatibilidad. Las propiedades mecánicas de los materiales metálicos se pueden variar mediante aleaciones pudiéndose conseguir que estas se asemejen lo más posible a las del entorno biológico con el que vayan a interactuar. Cabe resaltar la presencia del acero inoxidable, el titanio y sus aleaciones, las aleaciones Cr-Co y el magnesio entre los biomateriales metálicos más empleados.

- **Acero inoxidable**

Una de las características del acero como material es que sus átomos se combinan fácilmente con los de oxígeno formando óxidos, proceso conocido como corrosión. Termina formándose una estructura muy porosa que permite que los átomos de oxígeno sigan entrando y reaccionando con los átomos de acero de modo que el proceso de corrosión continúe. La corrosión convierte al acero en un material no biocompatible debido a que se trata de un proceso extremadamente perjudicial para un entorno vivo por los productos liberados. El acero inoxidable, aleación de Fe, C y Cr con otros elementos que permiten la mejora de sus propiedades, por el contrario, sí que es considerado biocompatible.

Se trata de un material fácilmente deformable en frío y trabajable. Es soldable y permite tratamientos térmicos, mecánicos y superficiales. Entre sus principales desventajas (desde el punto de vista de su uso como biomaterial) se encuentran el elevado peso y su alta rigidez en comparación con las propiedades del hueso.

En general se empleará acero inoxidable como biomaterial en instrumental quirúrgico y, en prótesis, en implantes temporales, por lo que no supondrá un problema su baja, aunque existente, tendencia a la corrosión. Ejemplos de su uso en prótesis pueden ser aquellos elementos que requieran cierta resistencia, a saber: tornillos, instrumental quirúrgico o placas [29]. Problemas de corrosión y fatiga hacen que a día de hoy su uso se esté viendo relegado por otras aleaciones.

- **Cobalto-Cromo**

En general, las aleaciones de base cobalto presentan muy buena resistencia a la corrosión en solución salina, así como una elevada resistencia al desgaste. Son muy empleadas en el ámbito dental y ortopédico [30].

Al contrario que el acero inoxidable, la aleación Co-Cr presenta una alta resistencia al desgaste, lo que la convierte en el material idóneo para piezas que estarán sometidas a mucha fricción y a altas tensiones como puede ser una prótesis de rodilla o una prótesis de cabeza de fémur. Presenta, además, muy buena resistencia a la fatiga. Como punto negativo para su aplicación como biomaterial en procesos de regeneración ósea se presenta su elevada densidad, mayor incluso que en el caso del acero inoxidable, lo que conlleva que las piezas creadas sean altamente pesadas. El módulo de elasticidad de las aleaciones Co-Cr es también elevado en comparación con el hueso, siendo en comparación un material muy rígido que volvería a originar el problema de la absorción de hueso.

En el caso de las prótesis dentales no basta con estudiar su resistencia a la corrosión y sus propiedades mecánicas si no que se hace esencial tener en cuenta la soldabilidad del material debido a que, en un elevado número de casos, las piezas se fabrican por separado soldándose después en una única prótesis.

- **Titanio**

El titanio, material descubierto por W. Gregor en 1791, se encuentra entre los diez elementos más abundantes en la corteza terrestre. A partir de 1946, gracias al desarrollo del método de Kroll para la obtención de cantidades significativas del material, se comenzó a emplear fuera de los laboratorios. La técnica de Kroll se sigue empleando a día de hoy.

Este metal presenta unas excelentes propiedades entre las que se encuentran una baja densidad, elevada resistencia mecánica y a la corrosión, y un comportamiento muy bueno bajo condiciones de temperaturas elevadas. Estas propiedades, entre otras, son la razón por la que el titanio comenzó a ser empleado en el campo de la biomedicina [25]. Su uso es posible debido a que el titanio es un biomaterial, lo que supone biocompatibilidad. Además de ser un material bioinerte, que apenas si reacciona con el medio biológico, el titanio presenta una elevada capacidad de osteointegración. El término osteointegración, que hace referencia a la capacidad del metal para establecer conexiones con el hueso, se introdujo en 1964 por Branemark, “fenómeno por el que el titanio y sus aleaciones son capaces de

unirse quedando integrado en el hueso” [25] [31].

Con respecto a su resistencia a la corrosión debido a su elevada estabilidad química superficial, cabe señalar que es una propiedad que se alcanza gracias a su capacidad de pasivarse. La pasivación consiste en la formación de una serie de capas protectoras, compactas y muy delgadas, de óxido que reducen extremadamente la velocidad del proceso de corrosión en soluciones fisiológicas [28].

Las excelentes propiedades mecánicas del titanio en relación a su peso hacen idóneo al material para su uso en implantes. Los valores de su módulo elástico, límite elástico y resistencia a tracción (ver tabla 1) son aptos para hacer frente a las condiciones de tensión a las que se verá sometido el implante [31].

Según la pureza del titanio empleado, éste se clasifica en distintos tipos, grados normalizados (ASTM). Los cuatro primeros grados son los que se emplean comúnmente en implantología y se consideran titanio comercialmente puro (c.p.). El titanio c.p. contiene aproximadamente entre un 98.635 y un 99.5% en peso de titanio [9]. El resto de grados se consideran aleaciones.

Las impurezas de estos 4 grados pueden ser de O, N, C, H y Fe y controlan las propiedades mecánicas del material [29].

- El titanio de grado 1 es conocido como titanio puro y de entre sus propiedades destacan una baja resistencia mecánica y una elevada ductilidad.
- El titanio de grado 2 es el titanio puro más empleado ya que presenta una combinación de propiedades (resistencia mecánica, ductilidad y soldabilidad) mejor.
- El titanio de grado 3 y grado 4 presenta una elevada resistencia. Es un titanio muy fuerte siendo el de grado 3 el menos empleado de los cuatro grupos de titanio puro [28] [29].

Tabla 1 Datos de la composición de los grados de Ti c.p.

Grado (ASTM)	Grado I	Grado II	Grado III	Grado IV
$N_{max}$	0.03	0.03	0.05	0.05
$C_{max}$	0.10	0.10	0.10	0.10
$H_{max}$	0.015	0.015	0.015	0.015
$Fe_{max}$	0.20	0.30	0.30	0.50
$O_{max}$	0.18	0.25	0.35	0.40
$Ti_{min}$	99.5	99.2	99.1	99.0

En ocasiones se emplean aleaciones para fabricar implantes en lugar de titanio comercialmente puro. Esto puede deberse tanto a motivos de índole económica, puesto que el titanio aleado es mucho menos costoso, como a la necesidad de que la pieza a fabricar presente unas propiedades determinadas [32]. En el segundo caso, se aprovecha el hecho de que el titanio es un material alotrópico que puede presentar estructuras cristalinas HCP y BCC, identificadas como  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente. Estas estructuras cristalinas favorecen la adición de los elementos de aleación que se añadan en pos de realizar modificaciones en las propiedades. Los porcentajes de aleantes e impurezas deben controlarse de manera exhaustiva debido a la repercusión que su presencia tiene en las propiedades del material.

Las aleaciones de titanio pueden dividirse en:

- **Aleaciones  $\alpha$ :** caracterizadas por presentar mejoras en las propiedades mecánicas
- **Aleaciones  $\beta$ :** caracterizadas por su elevada resistencia mecánica como contrapunto de una soldabilidad limitada
- **Aleaciones  $\alpha$ - $\beta$ :** caracterizadas por presentar una elevada resistencia mecánica

De entre todas las aleaciones empleadas en el campo, la aleación Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V destaca notablemente (a pesar de que tan solo un 3% de la misma se destina a la fabricación de prótesis y el 80% de ella lo hace a la industria aeronáutica) [33].

Esta aleación se consigue principalmente empleando aluminio (entre un 5.5% y un 6.5%), que aumenta la fuerza del titanio considerablemente a la vez que disminuye su peso, y vanadio (3.5-4.5%).



Comienza una reabsorción ósea por la cual se transfiere el calcio presente en el hueso a la sangre y concluye en una disminución de densidad ósea. En este estado, el hueso será más débil y estará más expuesto a posibles fisuras, fracturas o lesiones [35] [37] [38].

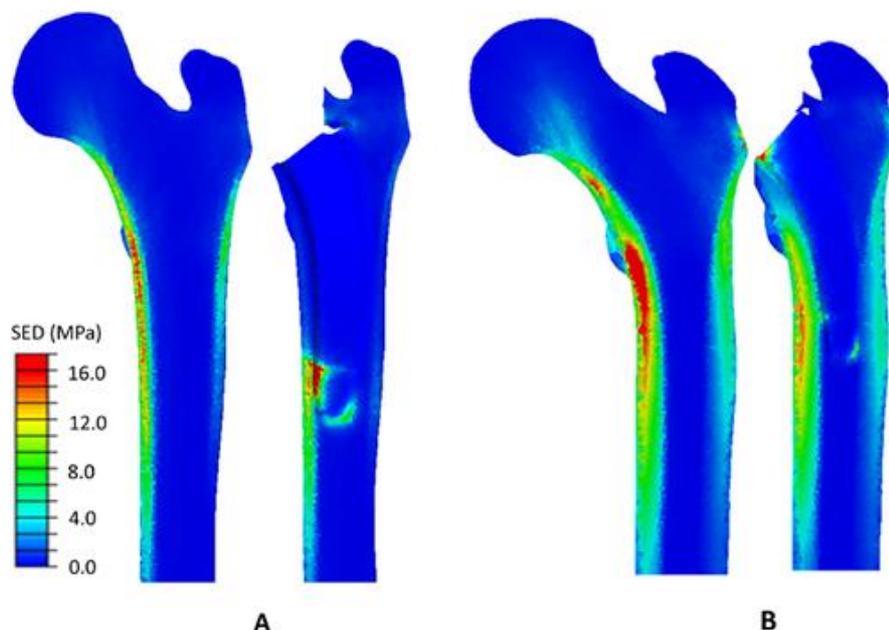


Figura 12 Comparación entre la distribución de cargas en el caso de un fémur intacto y un fémur implantado en los casos de A) mayor y B) menor valor de apantallamiento de tensiones [39]

No se trata en absoluto de un fenómeno exclusivo de los implantes de titanio si no que, por el contrario, la gran mayoría de los materiales empleados en sustitución ósea presentan este problema debido a los valores de sus módulos elásticos (ver tabla 2) [35].

Tabla 2 Propiedades mecánicas de varios biomateriales frente al hueso

	Hueso	Acero inoxidable	Titanio y aleaciones	Aleaciones Cr-Co	Magnesio
<b>Densidad (g/cm<sup>3</sup>)</b>	1.8-2.1	7.9-81	4.4-4.5	8.3-9.2	3.1
<b>Módulo de Young (GPa)</b>	3-20	189-205	55-117	200-253	41-45
<b>Tenacidad a fractura (MPa)</b>	3-6	50-200	55-115	100	15-40
<b>Resistencia a compresión (MPa)</b>	130-180	170-310	590-1117	450-1896	65-100

Consecuencias graves de este fenómeno como la fractura periprotésica, aflojamiento del implante, interferencias en la fijación del mismo o molestias crónicas [28] [40], intentan solventarse mediante diversas prácticas.

Para solventar este problema se plantean diversas soluciones que persiguen principalmente la disminución del módulo elástico del material del implante para reducir la diferencia con el del hueso [38].

Algunas de estas pueden ser los materiales compuestos de matriz polimérica, emplear aleaciones diseñadas con este fin como puedan ser aleaciones  $\beta$ -Ti o aleaciones de titanio que presenten estructura BCC, usar magnesio y sus aleaciones o emplear materiales porosos o espumas [34] [35] [41] [42] [43] [44].

Incidiendo en el control de la porosidad a fin de reducir tanto la densidad del implante como el módulo elástico, cabe decir que se han desarrollado un gran número de técnicas de fabricación. Con estas técnicas es posible

conseguir materiales que presenten la porosidad deseada que a la vez mantengan unas propiedades mecánicas aceptables. Además, se presenta la ventaja adicional de que el ser un material poroso favorece la infiltración del tejido óseo en el interior del implante de modo que se consigue una mejor adhesión.

Será posible no sólo controlar el porcentaje de porosidad presente en el material, sino también, con algunos métodos, el tipo de poro, su morfología y tamaño, así como la distribución de los mismos en el material.

Algunas de estas técnicas son [35]:

- Técnicas de sinterización:
  - Tradicional
  - Sin compactación anterior
  - Técnica de espaciadores
  - Eléctrica
  - Sinterizado por haz de electrones (EBM)
- Inyección de gases inertes en metal líquido
- Inyección de agentes gasificadores en metal sólido
- Técnica Freeze Casting de solidificación direccional
- Técnicas para obtener porosidad gradiente

Se profundizará en la técnica de sinterización con espaciadores puesto que esta técnica permite un mayor control de los parámetros de la porosidad. Es una técnica relativamente barata y sencilla en la que comúnmente se emplean como espaciadores PVA, carbamida o, como será el caso en este trabajo, bicarbonato de amonio [45].

## Mejora del apantallamiento de tensiones

Haciendo un resumen de lo visto en los anteriores apartados, podemos afirmar después de lo estudiado, que la posible mejor solución para la mejora del apantallamiento de tensiones, además de para conseguir un material morfológicamente similar al hueso humano, se debe conseguir un módulo de Young más bajo, debido a que esto implicaría una similitud en cuanto a los módulos se refiere tanto del titanio como del hueso humano.

Según los principales campos de estudio, se puede enunciar que, para realizar un cambio en una propiedad intrínseca del material, como es el módulo de Young del que hemos hablado, se puede optar la elección de una de las dos vías siguientes:

- **Fabricación de probetas con Titanio Beta**

El valor del módulo de Young es un factor muy importante a tener en cuenta a la hora de hablar de materiales para implantes debido a la problemática explicada con anterioridad. Módulos de Young muy distintos al del hueso provocarían el ya tratado “stress-shielding” con su consecuente reabsorción ósea.

Los implantes suelen tener un módulo de elasticidad bastante mayor al del hueso y, para reducirlo, se plantea el uso de aleaciones de titanio en fase  $\beta$ . La fase  $\beta$  presenta una estructura interna BCC. Esta estructura y la cristalinidad del material están muy ligados al valor del módulo de Young, siendo el de las aleaciones fase  $\beta$  inferior a 50 GPa (valor mucho menor que, por ejemplo, el del acero inoxidable, 200 GPa).

Las aleaciones de Ti  $\beta$  podrán contener una serie de elementos biocompatibles con una combinación de condiciones mecánicas adecuadas como el Zr, Nb, Sn, Mo o el Ta entre otros. Es preferible que los aleantes empleados sean estabilizadores de la fase  $\beta$ .

Otra característica a resaltar de este tipo de aleaciones es su buena resistencia a la corrosión en fluidos fisiológicos.

- **Fabricación de probetas de Titanio poroso.**

Ahora bien, en la siguiente figura 13 se describen las principales técnicas con las que fabricar titanio poroso con el módulo de Young requerido.

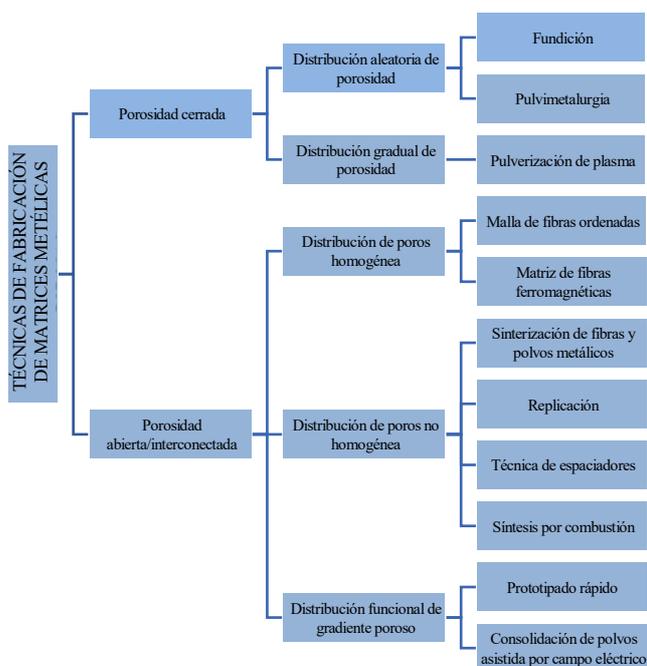


Figura 13 Esquema de distintas técnicas de fabricación de matrices metálicas

De entre todas las técnicas que se indican en la figura, se mencionará de forma muy breve la técnica de los espaciadores, pues será la desarrollada en este trabajo, siendo esta técnica permite la creación de una porosidad interconectada, que no solo produce una mejora de las propiedades mecánicas del material con respecto al hueso cortical, sino que permite mejorar la oseointegración del implante.

Posteriormente, en los siguientes apartados, se mencionarán otras técnicas importantes, además de una explicación en detalle de la técnica de los espaciadores.

### 2.3.2 Comportamiento a fatiga

Otro problema común a la hora de realizar un implante es el comportamiento a fatiga del mismo. La fatiga es un fenómeno que tiene lugar al someter al material a una serie de cargas cíclicas que acaban por dañar al elemento reduciendo su vida útil.

Este tipo de carga es muy común en implantes dentales debido a la acción de masticación. Esta acción supone una serie de ciclos de carga y descarga durante los cuales el implante va acumulando daño. Determinados implantes pueden terminar fallando debido a la fatiga acabando en rotura, lo que hace necesario el ensayo normalizado de los mismos (ISO14801 2007) [46].

El fallo por fatiga de un determinado elemento se produce en dos etapas principales: la formación de una grieta y la propagación de la misma. Mediante la realización de estos ensayos, será posible analizar la vida y respuesta del implante ante un estado de cargas cíclicas pudiéndose llegar a predecir la evolución de esa grieta. Se deberán repetir los ensayos al menos tres veces a distintos niveles de carga para obtener resultados válidos [47]. Estos niveles de carga deben representar situaciones extremas, las peores condiciones de trabajo. No se debe dejar de tener en cuenta que el proceso de masticación no es constante a lo largo de toda la vida y puede variar tanto en intensidad como en frecuencia, lo que complica el análisis de comportamiento.

Los implantes dentales consisten, de forma general, en dos piezas: implante y pilar protésico [48]. El implante se inserta en el hueso de la mandíbula mediante una intervención quirúrgica y, posteriormente, el pilar protésico se une al implante a fin de soportar la prótesis en cuestión. Durante la masticación, las cargas serán transmitidas por la prótesis al implante y al hueso perimetral, afectándole la fatiga [49]. A causa de la repetición de los ciclos de carga pueden darse un desajuste entre ambos componentes, se puede “aflojar”. Como consecuencia de esta alteración pueden producirse problemas de salud derivados de una acumulación excesiva de bacterias en la interfase como infección o inflamación [31].

### 2.3.3 Osteointegración

El término osteointegración fue propuesto por Brånemark en 1969 tras varios años estudiando la microcirculación sanguínea durante los procesos de reparación ósea tras una fractura. El científico sueco observó, tras diseñar un tornillo de titanio, que el elemento se integraba en el tejido óseo de forma biocompatible dificultando notablemente su retirada [49] [50].

Así pues, puede definirse la osteointegración como una “conexión funcional y estructural directa entre el hueso vivo, ordenado y la superficie de un implante endoóseo cargado funcionalmente; se produce una unión mecánica directa y estable, sin interposición de tejido conectivo, identificable con microscopio óptico y, por tanto, no hay movilidad” [51].

Para que la osteointegración pueda considerarse válida, el implante tiene que ser aceptado por el hueso de manera que no exista tejido conjuntivo en la interfase entre el implante-hueso al observar microscópicamente [52]. Esta interfase estará ocupada por algunas partículas de hueso en distintos estados, sangre, tejido conectivo y sustancias producidas a raíz de una respuesta inflamatoria por parte del organismo tras la implantación y que activarán el crecimiento celular en la zona [53].

Entre los factores que afectan a este proceso de osteointegración están los fenómenos de osteoinducción, osteoconducción y remodelación y formación ósea. El término osteoinducción hace referencia a la acumulación de células madres de las cuales algunas proliferan en células con la función de formación de matriz ósea. En el caso de que estas células en concreto colonicen la zona del implante se dice que la superficie es ahora osteoinductiva. El desplazamiento de las células formadoras de hueso a través de la superficie del implante es conocido como osteoconducción [25].

La morfología de la superficie del implante influye en gran medida en el proceso de osteointegración. Superficies rugosas favorecerán la adherencia celular y servirán de anclaje durante el proceso de osteogénesis. No ocurrirá lo mismo al tratarse de una superficie plana lisa, ya que ésta no prestará las rugosidades ni para ser empleadas como elementos de sujeción ni como modo de ampliar la superficie de contacto hueso-implante.

Tras descubrirse este hecho, la escuela de Brånemark comenzó a experimentar con implantes rugosos cuya rugosidad se obtenía mediante mecanizado. Desde entonces, se han ido desarrollando distintos métodos que persiguen la obtención de esa superficie rugosa deseada o la incrementación de la misma, como pueden ser el ataque con distintos ácidos (como ácido clorhídrico, nítrico o sulfúrico) para “grabar” esa rugosidad, la técnica de arenado o chorreado abrasivo, el recubrimiento de hidroxiapatita o el de deposición de plasma de titanio [52] [54] [55].

### Mejora de la osteointegración

La siguiente vía de estudio y actuación será la mejora de la osteointegración con la aplicación de técnicas de modificación superficial. En primer lugar, se debe aclarar que, la respuesta que ofrece un organismo ante un implante viene determinada por dos parámetros, la naturaleza y la textura del mismo. La rugosidad en la textura del material favorece la adhesión celular al implante, de la misma forma, un recubrimiento que favorece la bioactividad del material, también colabora en la mejora del crecimiento celular en la superficie, además, partiendo de estos dos principios mencionados, se puede afirmar que, la proliferación de bacterias superficiales provoca un deterioro superficial que, anula el efecto de la bioactividad del material.

Con estas afirmaciones, se describen tres vías claramente diferenciadas en la mejora de la adhesión de los osteocitos en el titanio utilizado en el implante.

#### Aumento de la rugosidad superficial del material

La primera vía desarrolla la creación de una superficie rugosa del material. Existe una gran diversidad de técnicas dependiendo del procedimiento utilizado. Aunque cada técnica lleva un proceso diferente, todas se basan en la modificación a nivel nano o microscópica de las partículas de la superficie, proporcionando una textura no lisa al material.

En la siguiente figura se observa un esquema de las técnicas de modificación más habituales.

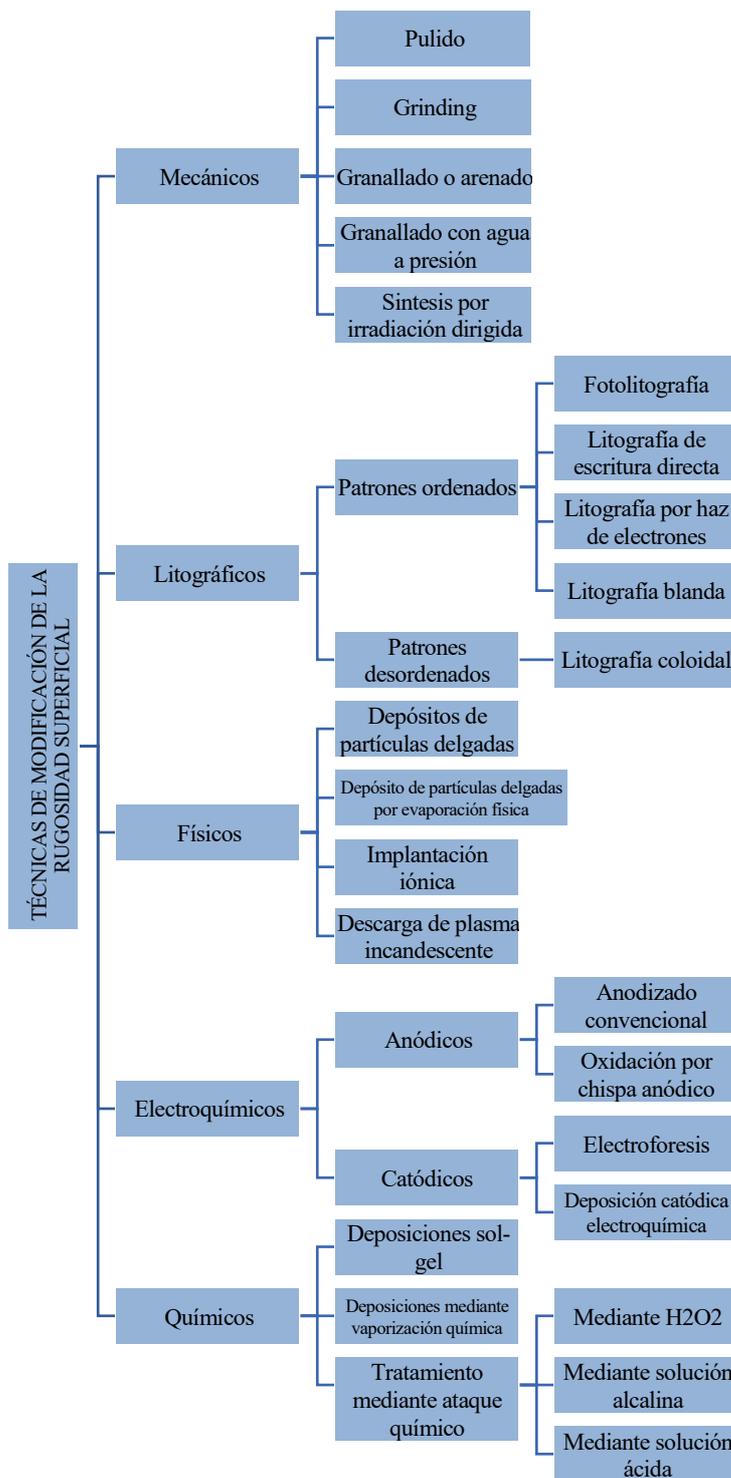


Figura 14 Esquema clasificatorio de distintas técnicas de modificación de rugosidad superficial

A pesar de mencionar este gran número de técnicas, a continuación, se describen aquellas técnicas más utilizadas y más interesantes de cara al estudio y desarrollo de este trabajo, además, se escogerán algunas de ellas para la realización del procedimiento experimental de ellas, para someterlas a un estudio biológico, con el que poder comparar según los criterios correspondientes, y obtener unos resultados y soluciones de acuerdo con los mismos.

### 2.3.4 Ataque químico mediante soluciones ácidas

El ataque químico tiene como objetivo eliminar la primera capa del material, incluyendo la capa de óxido, y generar una superficie rugosa. El compuesto o solución empleados (ácido, base, etc.) reacciona con el óxido produciendo la disolución de dicha capa.

Para la aplicación de esta técnica los ácidos más utilizados serían el ácido clorhídrico y el ácido sulfúrico. En el laboratorio se desarrollaron prácticas experimentales con ácido sulfúrico, por lo que el procedimiento y la técnica se explicarán con detalle en los apartados siguientes.

#### a) Arenado

El chorreado de arena o arenado es una técnica de modificación superficial cuyo objetivo es el de limpiar las superficies mediante la incisión a través de una boquilla de un abrasivo granulado mediante un chorro de aire comprimido. Este tratamiento retira posibles residuos presentes sobre la superficie, como corrosión o recubrimientos no deseado, sin dañar en exceso el material, aunque sí que deja marcada una rugosidad superficial a pequeña escala.

Dicha rugosidad es el fin por el cual se aplica esta técnica, conocida en inglés como “sandblast”, sobre los implantes óseos [56]. Una superficie rugosa ayuda a solventar el problema de la osteointegración al poder emplearse como anclaje para el crecimiento celular tras la inserción del implante en el organismo vivo [57].

También es ideal como tratamiento previo a aplicar un determinado recubrimiento ya que sigue favoreciendo la adhesión del mismo.

El éxito de esta técnica ha sido varias veces demostrado por estudios científicos realizados en conejos [58] [59] [60], concluyendo no sólo que los implantes cuya superficie hubiera sido sometida a un tratamiento de chorreado presentaban unos valores de contacto hueso-implante superiores que aquellos que no habían sido tratados sino que, al ser comparados con implantes cuya superficie hubiera sido mecanizada, también presentaban mejor adhesión.

Son varios los parámetros modificables a la hora de aplicar esta técnica a fin de obtener unos resultados u otros. Pueden modificarse el tamaño de los granos de arena, el abrasivo a emplear, la distancia entre la boquilla y la superficie sobre la que incide el chorro, la presión de salida del mismo, el ángulo de pulverización, etc. [61] [62].

#### b) Anodizado

Otro de los múltiples tratamientos de modificación superficial existentes es el anodizado. Se trata de un proceso electroquímico por el cual se forman una serie de capas de óxido en la superficie del metal tratado [63]. Al contrario de lo que sucede al aplicar técnicas de modificación superficial como el arenado, que retiran una capa de material para implementar la rugosidad del material persiguiendo la mejor integración de tejidos, con el anodizado, para aumentar la rugosidad se incrementa el espesor de la capa de óxido superficial mediante la circulación de una corriente eléctrica a través de un electrolito.

El procedimiento habitual consiste en sumergir el sustrato en el baño electrolítico adecuado conectado al ánodo de la fuente de alimentación. Se hace entonces circular una corriente por ese circuito promoviendo la migración de los cationes metálicos hacia el sustrato. Los iones formarán entonces la capa superficial buscada.

Las propiedades de estas capas se modifican controlando factores como la composición del electrolito, el potencial eléctrico aplicado, la temperatura y la densidad de corriente [64] [65] [66]. Puesto que los iones tendrán que circular por la capa de óxido, el valor de la corriente eléctrica que se aplique debe ser suficiente para permitir esta circulación.

Las capas de óxido que se obtienen al anodizar el titanio, poseen mejores propiedades que las que forma el material de manera natural al contacto con el aire debido a su pasividad. El espesor de estas capas de óxido artificiales será controlable y, por lo general, presentarán mayor resistencia a la corrosión. Otra ventaja será su mayor resistencia al desgaste debido a que las capas de óxido artificiales son más duras que la superficie el metal sin oxidar [6]. La presencia de estas capas reducirá el flujo de liberación de iones de metal al medio, disminuyendo su toxicidad. Por otro lado, el titanio anodizado tendrá un comportamiento más estable ante las variaciones de temperatura [65].

#### c) Femtosegundo

La técnica de femtosegundo es una técnica de texturizado por láser. Está basada en la ablación láser que elimina material superficial del sustrato, arrancándolo o vaporizándolo.

Existen distintos parámetros variables y controlables en el proceso de ablación láser entre los que se encuentran el modo de operación. La incidencia del láser puede ser continua o pulsada. En el primer caso,

el láser emite luz de manera continua mientras que en el segundo sólo lo hace durante determinados períodos, pulsos. La duración de estos pulsos es otro parámetro controlable que determina el “apellido” del láser: milisegundos, microsegundos, nanosegundos, picosegundos o femtosegundos [67].

El principal motivo por el cual se elige la técnica de femtosegundo es que, con esa pequeña duración de aplicación, el proceso de ablación será muy localizado en la zona en la que se incide, sin expandirse el calor por el material. Otros factores influyentes en el proceso son la longitud de onda, las condiciones ambientales, la densidad de energía, etc. [68].

Tras la aplicación del láser sobre el sustrato, el material residual emerge en forma de gas formando una estructura llamada comúnmente pluma de ablación.

Con esta técnica se conseguirá un texturizado muy preciso con la ventaja de no tener que emplear agentes externos, quedando la superficie final mucho más limpia.

## Potenciación de la bioactividad en la superficie de metales como el titanio

Para la mejora de la adhesión de los osteocitos al titanio y la estimulación del crecimiento celular en la superficie del mismo, creando, por lo mismo un incremento en la aceptación del implante por parte del cuerpo humano, se recurre al recubrimiento de la superficie del material con elementos que activen la bioactividad del titanio en este caso.

Se define fijación biológica como el proceso por el cual, los componentes protésicos se unen al hueso sin necesidad del uso de cementos [69]. Los cementos como el polimetacrilato de metilo, tienden a degradarse con el tiempo, provocando un aflojamiento de la prótesis, y siendo necesarias a largo plazo cirugías de revisión. Adicionalmente, la falta de oseointegración característica de los metales ha planteado otras vías para convertir la superficie de bioinerte a bioactiva. Los recubrimientos bioactivos son capaces de mejorar la estabilidad del implante, formando enlaces con el tejido óseo. Sin embargo, la biodegradabilidad de los recubrimientos bioactivos conlleva un problema a largo plazo, ya que, con el tiempo, el recubrimiento desaparece, lo que puede provocar inestabilidad del implante mecánico [70].

En la siguiente figura se observan algunos de los recubrimientos más utilizados e interesantes de cara al estudio realizado.

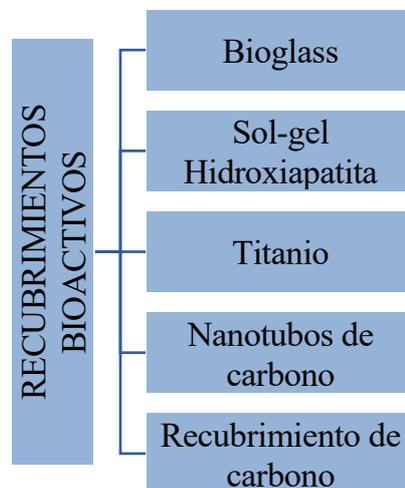


Figura 15 Esquema de algunos métodos de recubrimientos bioactivos frecuentes

A continuación, se explicarán las técnicas mencionadas para un entendimiento más claro de las mismas.

### a) Recubrimiento solgel

La técnica de recubrimiento sol-gel supone una transición de líquido a sólido de una solución, sol, a un gel o fase sólida. La solución estará formada por partículas sólidas precursoras de tamaño nanométrico, diluidas en un líquido. Una vez obtenida la solución, se añadirán a la misma una serie de catalizadores que favorecen la hidrólisis o la condensación polimérica en función de la naturaleza de los mismos. Así podrán obtenerse posteriormente un gel más o menos compacto y con mayor o menor porosidad. Como resultado se obtendrá un gel mediante un proceso de gelificación. Este gel, de baja consistencia, será sinterizado y pasará a ser la cerámica o el vidrio que se estuviese buscando conseguir.

Una de las grandes ventajas del método sol-gel es que permite preparar materiales cerámicos o vidrios

a unas temperaturas bastante bajas temperaturas en comparación con otros procesos convencionales. Este fenómeno se justifica con el pequeño tamaño de las partículas.

El uso de la técnica sol-gel para recubrimientos está a la orden del día. Es muy común la formación de recubrimientos de hidroxiapatita obtenida a partir de precursores de calcio y fósforo por este método debido a su alta biocompatibilidad y a la facilidad que presenta a la hora de ser depositada sobre el elemento a recubrir. Es posible depositarla en capas homogéneas de un espesor muy delgado y controlado de valores de unos pocos micrómetros.

El recubrimiento se realiza por lo general mediante inmersión, aunque se pueden emplear otras técnicas (ej: recubrimiento por centrifugado). Se sumerge el sustrato en la solución y se le añaden los catalizadores que formarán la capa de gel que, posteriormente, será sinterizado. Este método de recubrimiento hace posible trabajar con formas irregulares o complejas [71].

Por otra parte, otra ventaja reseñable es que, al estar trabajando a bajas temperaturas, se eliminan también los problemas derivados de sinterizar a altas temperaturas relacionados con los distintos coeficientes de expansión térmica que presentan el sustrato y el recubrimiento (tensiones residuales, agrietamiento, etc.).

La técnica de recubrimiento sol-gel permitirá cierto control sobre la porosidad, su tamaño y forma.

En el caso de recubrimiento de hidroxiapatita, las capas bioactivas formadas supondrán una mejora de la osteointegración y la osteoconducción ya que la HA es un material bioactivo, osteoconductor y biorreabsorbible.

#### **b) Vidrios bioactivos o bioglasses**

El vidrio bioactivo más utilizado es el Bioglass® 45S5. Esta técnica consiste en la creación de una capa del material en la superficie del titanio, dándole a este las siguientes propiedades: una unión rápida al hueso mediante la creación de hidroxiapatita, además de la estimulación del crecimiento más allá de la interfaz hueso-implante.

Los vidrios bioactivos pueden realizarse utilizando dos métodos diferentes: los métodos tradicionales de meltquenching route y la ruta sol-gel. Al contrario de lo que ocurre por los métodos tradicionales, en los que el recubrimiento es totalmente denso, los recubrimientos bioactivos realizados vía sol-gel presentan una nanoporosidad inherente [72]. Esta técnica será desarrollada experimentalmente, por lo que se explicará su procedimiento en profundidad en los apartados siguientes.

#### **c) Nanotubos de carbono**

Los nanotubos de carbono (NTC) son estructuras cilíndricas huecas conformadas por una serie de hojas enrolladas sobre la superficie de un cilindro. Estructuralmente, están formados por enlaces de carbono enlazados entre sí por un enlace covalente híbrido tipo sp<sup>2</sup>.

Dichas nanoestructuras presentan una serie de propiedades tanto mecánicas (resistencia y elasticidad) como eléctricas muy llamativas. Estas propiedades se justifican con la presencia de los enlaces de carbono, de naturaleza “naturaleza única cuasi-unidimensional, y su simetría cilíndrica” [73].

Los NTC pueden ser sometidos a un procedimiento de modificación superficial por el cual se les pegue moléculas o algún tipo de grupo funcional de un compuesto sufactantefuncionales de un surfactante [72]. Tras este procedimiento, los NTC se consideran funcionalizados y presentan una mejora de la miscibilidad en medios líquidos y en la biocompatibilidad.

De entre los métodos de síntesis de NTC más vanguardistas destacan el método de descarga de arco, el método de vaporización por láser y el método de deposición química de vapor (CVD) o pirólisis de hidrocarburos.

Como contrapunto del uso de nanotubos en ingeniería biomédica cabe señalar la falta de estudios exhaustivos en relación a su toxicidad y biocompatibilidad.

#### **d) Recubrimientos de grafeno**

El grafeno, estructura elemental de grafito, puede ser empleado como recubrimiento de sustratos. Presenta una serie de propiedades tanto mecánicas como térmicas, ópticas y electrónicas de elevada calidad, lo que lo hace interesante para su uso. Al emplearlo como recubrimiento, además de enfrentar problemas como es el caso de la corrosión, el desgaste mecánico, protegería la superficie de

microorganismos y del mismo medio al que estuviese expuesta [73].

A continuación, se observa una lista de las principales técnicas de aplicación del grafeno como recubrimiento.

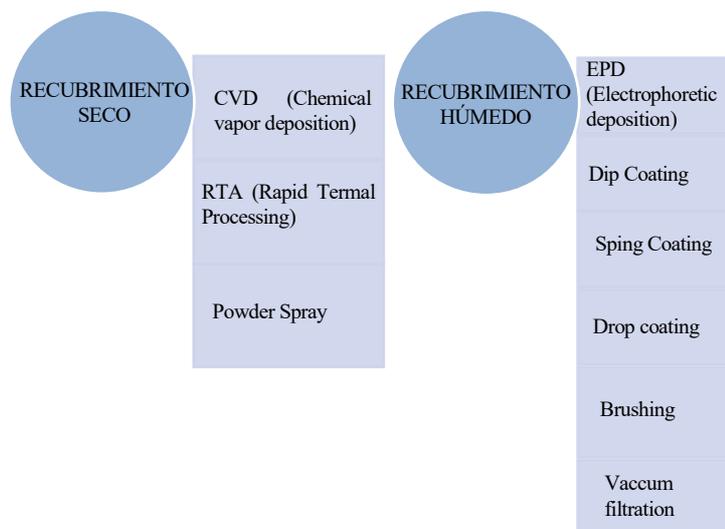


Figura 16 Métodos de aplicación de recubrimiento de grafeno

En este proyecto se ha desarrollado experimentalmente la técnica CVD, por lo que se explicará más adelante en detalle.

## Prevención de la proliferación de bacterias en la superficie

Como tercera y última línea de estudio, se pretende evitar la proliferación de bacterias en la superficie del material. Realmente, este apartado podría incluirse en cierto modo en el anterior, debido a que, el uso de recubrimientos para la prevención de la aparición de bacterias permite, a su vez una mejora en la adhesión celular al material en cuestión, y, con ello una estimulación del crecimiento celular y regeneración exitosa del hueso [31].

El grafeno, mencionado con anterioridad, así como recubrimientos sol-gel, además de fomentar la bioactividad del titanio, producen una capa protectora y antibacteriana, que, podría ser reforzada con la aplicación de técnicas como la deposición de nanopartículas de plata.

La nanotecnología se perfila como un nuevo campo interdisciplinario que combina la biología, la física, la química, la ingeniería y la ciencia de los materiales y ofrece soluciones nuevas y prácticas en diferentes áreas relacionadas con la medicina, desde un punto de vista divergente y más innovador.

Las nanopartículas (NP) son partículas de materia dentro del rango de nanómetros de diámetro, con una alta relación superficie / volumen, buena estabilidad en general y fácil modificación de la superficie. Todas estas características les confieren un comportamiento antibacteriano excepcional y potente, así como una baja toxicidad hacia las células de mamíferos. Además, se ha descrito que las nanopartículas metálicas, especialmente las nanopartículas de plata (AgNP), dañan las células bacterianas mediante la liberación prolongada de iones Ag<sup>+</sup> como modo de acción cuando se inmovilizan en la superficie. Por ello, se ha optado por la deposición de nanopartículas de plata en los sustratos de titanio poroso fabricados, con el fin de mejorar las propiedades y crear una barrera contra toda bacteria que pudiera afectar la aceptación del titanio por parte del osteocito.

El desarrollo experimental de la técnica será explicado más adelante, debido a que la aplicación de la técnica fue implementada y estudiada en el laboratorio.



### 3 OBJETIVOS

---

Analizados los datos anteriores, y, expuestos los principales problemas que, a día de hoy quitan el sueño en el mundo de la medicina, y más concretamente en el rango de las prótesis utilizadas para la curación de diversas enfermedades, queda centrar el punto de mira en las distintas soluciones que se proponen con el fin de paliar e incluso erradicar los distintos parámetros de las mismas que provocan la gravedad de la problemática.

Con una perspectiva general, el objetivo real y primordial del trabajo será encontrar, desarrollar y estudiar las posibles soluciones que producen una mejora morfológica y de propiedades de los materiales que, a día de hoy, se utilizan en la fabricación y producción de prótesis.

Desglosando el objetivo principal, describiremos las principales propuestas de mejora de las tres vías que causan los principales problemas metalúrgicos en las prótesis, quedando reflejados de una forma clara, los mismos en la siguiente figura.

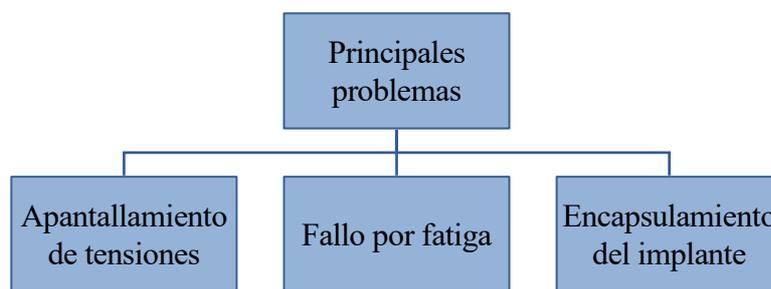


Figura 17 Esquema de los principales problemas presentes en implantes metálicos

Teniendo en cuenta los diferentes problemas, este trabajo presenta dos vías diferentes de investigación de las que se obtienen, otras vías diferentes de actuación para, proseguir con la definición, comprobación y comparación posterior de las técnicas utilizadas siguiendo dichas vías en los apartados próximos.



## 4 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Tras el estudio de la problemática y el hallazgo de la modificación de la porosidad del titanio como posible solución, el método de fabricación de las probetas a ensayar se convierte en el nuevo objeto de estudio en el proceso. Siguiendo los criterios aplicados en el trabajo de laboratorio realizado, se comenzará definiendo la fabricación como el conjunto de técnicas a llevar a cabo para la producción de objetos, probetas necesarias para la investigación en este caso.

Para reducir el módulo elástico del material, así como para favorecer la colonización y adherencia celular en el mismo, se propone la producción de un material con gradiente de porosidad [74].

Se han encontrado una inmensidad de técnicas utilizadas para este tipo de fabricación material, donde las líneas de investigación a destacar en rasgos generales son las técnicas de moldeo y las técnicas de sinterización, de las cuales se podrían citar, más concretamente alguna de las más interesantes de cara al proceso que se llevará a cabo de forma experimental como técnicas que emplea diferentes tamaños de partículas, técnicas con ausencia de presión de compactación y diferentes tamaños de partículas, técnica de Freeze-casting, Sinterización selectiva por láser [9].

De forma breve, se exponen las definiciones teóricas de las técnicas que, posteriormente, se caracterizarán según los procesos experimentales realizados. Se seguirá una ruta basada en la pulvimetalurgia, puesto que el punto de partida será el metal en polvo, que será seguida de un proceso de prensado de polvos y sinterización de los mismos [75]

En primer lugar, la técnica de espaciadores consiste en la mezcla de polvos metálicos con elementos, los espaciadores, que, en la proporción adecuada, consiguen alcanzar un determinado volumen. Este volumen será el del poro una vez eliminados los espaciadores mencionados. Esta técnica es especialmente utilizada para la obtención de un reparto homogéneo de porosidad en la pieza, así como para conservar de manera aproximada el tamaño y proporción del espaciador utilizado [31] [74].

Para continuar, el proceso de prensado consistirá en la inserción del material mezclado en moldes al que se le aplicará una presión determinada con el fin de producir una unión, con una escasa solidez, que será reforzada con un proceso de sinterización [75]. El proceso de sinterización se define como un proceso que se utiliza para la aglomeración de partículas previamente homogeneizadas. Esta aglomeración se consigue con la fusión parcial del material, el que, durante un enfriamiento posterior, cristaliza en varias fases [76]. Este fenómeno se consigue, sometiendo la probeta prefabricada a una temperatura y presión determinada según el material y propiedades requeridas en el mismo [74].

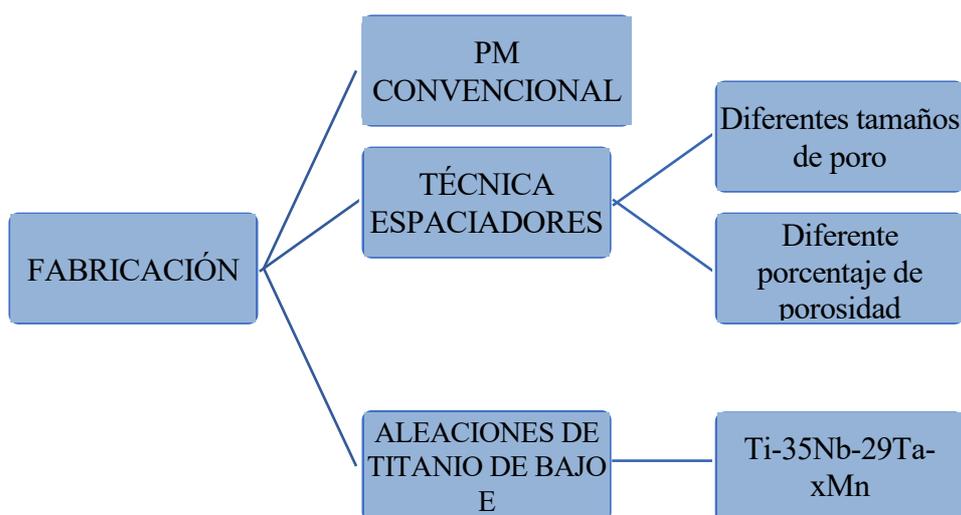


Figura 18 Esquema de las diferentes técnicas y probetas fabricadas

## 4.1 Materiales empleados

Los materiales utilizados para la fabricación de los sustratos porosos mediante la técnica de espaciadores han sido titanio e hidrogenocarbonato de amonio.

### 4.1.1 Titanio

Para la fabricación de los sustratos se han empleado polvos de titanio comercialmente puro.

Este titanio se ha obtenido mediante un proceso de hidrogenación/deshidrogenación y se ha adquirido a SE-JONG Materials Co. Ltd. (Seúl, Corea).

Tabla 3 Composición (% en peso) polvo de titanio SE-JONG

Ti	O	N	Fe	Si	Mg	Mn
>99.5	<0.45	<0.008	0.038	0.035	0.003	0.0006

Teniendo en cuenta la clasificación anteriormente expuesta del titanio comercialmente puro en grados en función de la cantidad de impurezas que presente, el titanio trabajado forma parte del grupo IV.

### 4.1.2 Hidrogenocarbonato de amonio

Los polvos de hidrogenocarbonato de amonio ( $NH_4HCO_3$ ) se emplearán como espaciadores en la fabricación de los sustratos porosos. Una de las razones principales para su uso es que se descompone a bajas temperaturas (de 35°C-60°C) en distintos vapores ( $NH_3$ ,  $CO_2$ ,  $H_2O$ ) dejando los huecos vacíos que se desean para conseguir porosidad. Este material lo suministró Cymit Química S.L. (España) y presenta una pureza del 99 %.



Figura 19 Componentes empleados para la fabricación de los sustratos con espaciador

El polvo será sometido a un proceso de tamizado por el cual se obtendrán distintos rangos de tamaño de las partículas, a saber: <100  $\mu m$ , 100-200  $\mu m$ , 200-355  $\mu m$ , 355-500  $\mu m$  y >500  $\mu m$ .



Figura 20  $NH_4HCO_3$  clasificado según el diámetro de partículas

## 4.2 Procedimientos experimentales

### 4.2.1 Fabricación de probetas de Ti c.p. porosas

La metodología de fabricación por espaciadores indicada con anterioridad se describirá según el procedimiento realizado en el laboratorio en el siguiente apartado.

Los materiales utilizados para la fabricación serán:

- Cloruro de sodio ( $NaCl$ ) con una concentración entre el 40% y el 70%
- Titanio con una pureza mayor del 99,5%

Para la realización de los diferentes ensayos realizados, se fabricaron probetas cilíndricas de titanio poroso, de 12 mm de diámetro y 5 mm de altura.

La distinción entre las probetas se realiza según las variables descritas y explicadas teóricamente en el apartado de fabricación, es decir, en base al tamaño de poro en micrómetros, y al porcentaje de concentración de porosidad en la probeta.

En la siguiente tabla (tabla 5) se observan los diferentes intervalos de tamaño de poro.

Tabla 4 Rangos de tamaño de porosidad de los sustratos fabricados

TAMAÑO DE PORO ( $\mu m$ )		
100-200	200-355	355-500

En la tabla 6, se clasifican los diferentes tipos de probetas según la cantidad de poro en la probeta en porcentaje.

Tabla 5 Distintos porcentajes de porosidad de los sustratos fabricados

PORCENTAJE DE POROSIDAD (%)			
30	40	50	60

En la figura 21 se muestra el esquema de la clasificación anteriormente explicada teniendo en cuenta las dos variables anteriores (tamaño de poro y porcentaje de porosidad).

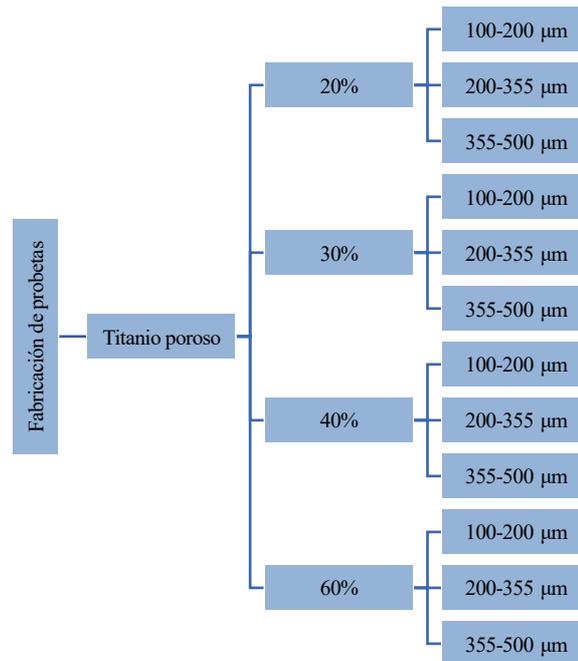


Figura 21 Esquema ilustrativo de las probetas a fabricar

Posteriormente, en el apartado de conclusiones se seleccionarán los intervalos y concentración de porosidad que más interesan en el estudio y el porqué de estas elecciones.

Los pasos a seguir en el proceso de fabricación de probetas serán los que, de forma esquematizada, se aprecian en el diagrama de flujo de procesos (figura 22).

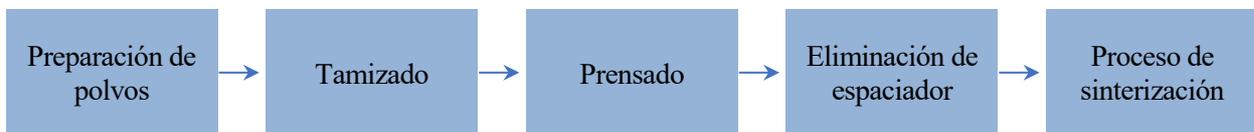


Figura 22 Diagrama de flujo del proceso a seguir para la fabricación de los sustratos

En los siguientes apartados se desarrollará con más profundidad los procesos del diagrama anterior.

#### a) Preparación de polvos

La preparación de polvos consiste en la obtención de las proporciones necesarias para la fabricación de cada tipo de probeta según los criterios anteriormente mencionados.

Para evitar el apelmazamiento de los polvos los mismos serán reservados en un lugar fresco y seco, consiguiendo unas condiciones óptimas.

#### b) Tamizado de polvos

El tamizado es un proceso que consiste en hacer pasar el polvo previamente mezclado según las proporciones necesarias para el tipo de probeta a fabricar, por una serie de tamices (ver figura 24 (b)), con el fin de homogeneizar la mezcla previa al prensado.

El proceso de tamizado consta de varias fases:

- Previamente, los tamices deben estar correctamente limpios y secos. Para ello deberán enjuagarse a presión y rociarse con etanol para un posterior secado al aire. Así se evitará la mezcla de polvos con cualquier partícula ajena a la mezcla necesaria.
- Para eliminar el posible apelmazamiento y conglomerado de los polvos, así como para conseguir una mezcla homogénea de los polvos, primeramente, se agitará durante unos cuarenta minutos el polvo de titanio, posteriormente, se agitará por diez minutos el espaciador. Transcurridos los cincuenta minutos mencionados, se mezclarán

cuidadosamente el titanio con el espaciador y se volverá a introducir en la mezcladora por otros cuarenta minutos.



Figura 23 Mezcladora WAB Machiney, Túrbulas T2C

- Una vez transcurrido el tiempo de mezclado, los polvos se harán pasar por los tamices, de mayor a menor tamaño de luz de malla, colocados en el plato vibratorio que se visualiza en la figura 24 (a) por unos diez minutos.

Al finalizar este tiempo, quedarán separados los polvos por rangos según el tamaño de los mismos.



Figura 24: (a) Plato vibratorio para proceso de tamizado, (b) tamices empleados



Figura 25 Rangos de tamaño de partículas resultantes del tamizado

Según los rangos anteriormente mencionados, los polvos se clasificarán y almacenarán en frascos de plástico previamente lavados y secados. Estos se mantendrán en un lugar fresco y alejado de la luz solar hasta el momento de la fabricación de las probetas.

Los tamices serán limpiados con agua a presión para eliminar los restos de polvos, posteriormente, serán introducidos en la máquina que los somete a ultrasonidos durante unos diez minutos con jabón. Al finalizar este tiempo, los tamices son enjuagados meticulosamente y rociados con etanol para finalizar con un secado suave con secador. Se dejarán secar al aire sobre papel durante 24 horas. Serán conservados en un lugar alejado de sustancias que puedan dañarlos.

### c) Mezclado del titanio y el espaciador

Como se ha mencionado previamente, el titanio junto con el espaciador será mezclado para para posteriormente ser agitado conjuntamente y conseguir la homogeneidad buscada.

Se medirán los porcentajes en masa de cada material necesario en la báscula de la figura 26.

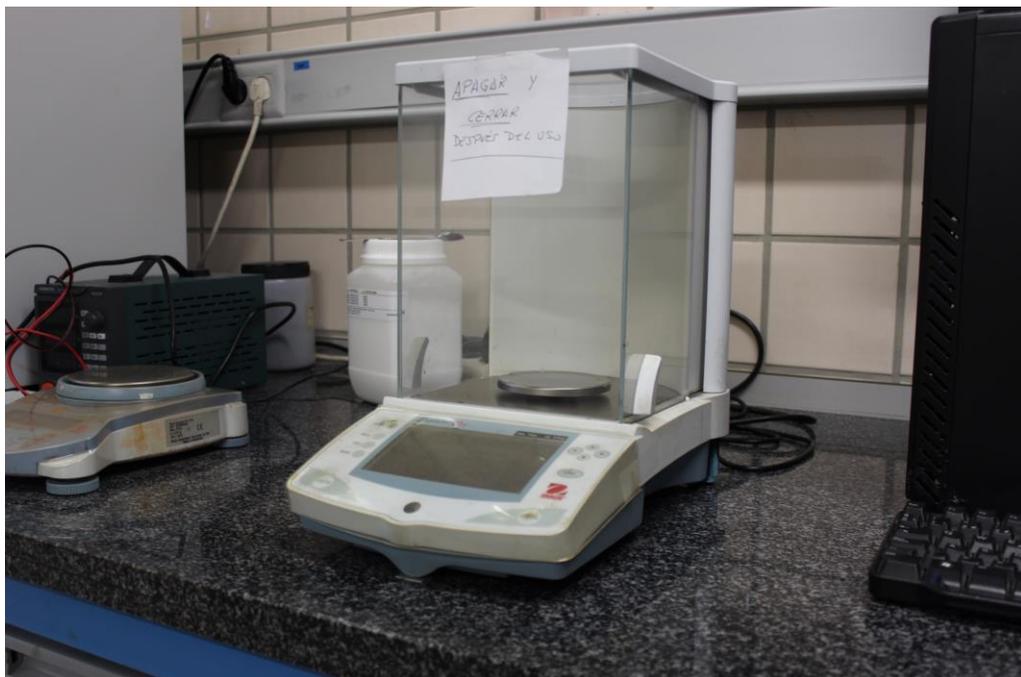


Figura 26 Báscula empleada para el pesaje de los materiales

### d) Prensado

Los diferentes elementos que se utilizarán para la compactación de los polvos serán los siguientes:

- Conjunto de matriz y punzones de diámetro
- Prensa SUZPECAR 600 kN

Para la extracción de las probetas una vez prensados los polvos metálicos mezclados con el espaciador se utilizará:

- Prensa hidráulica Malicet et Blin U30

El proceso de prensado y previa compactación de las probetas será precedido por la mezcla y aplicación de la sustancia utilizada con lubricante. Esta sustancia será resultado de la mezcla de 2g de cera por cada 10ml de acetona.

Este lubricante es utilizado para, en primer lugar, evitar que, tras el prensado, quede demasiado resto de polvo en las paredes de la matriz o de los elementos como la sufridera y los punzones. En segundo lugar, para facilitar la extracción de la probeta de la matriz y evitar posibles tensiones y roturas que se producen tanto en la compactación como en la extracción de la probeta en cuestión.

Antes de la aplicación del lubricante en la matriz, rociará acetona y se limpiará meticulosamente con papel la matriz y el conjunto de elementos utilizados para la fabricación. Se secará con metal y tras aplicar el lubricante se secará suavemente para la posterior introducción de la mezcla de metal y espaciador en la matriz.

Una vez colocados correctamente el conjunto de punzones necesarios, la matriz en cuestión se posicionará en el centro de la prensa y se modificarán los parámetros variables de la prensa:

- La presión en MPa
- La carga en KN
- La velocidad de compactación de la prensa N/s

Estos han sido definidos de esta forma puesto que, previos estudios y trabajos han determinado que, estos son los valores óptimos y eficientes para la fabricación de este tipo de probetas, dependiendo siempre del diámetro de la probeta, así como de la longitud de las mismas.

Transcurrido el tiempo de prensado, para la obtención de la probeta en verde, se procede a la manipulación manual de la prensa hidráulica, que, aplicando una determinada presión, se consigue la probeta sin roturas ni grietas.

### e) Proceso de eliminación del espaciador

Una vez obtenida la probeta en verde, y, para conseguir el poro del tamaño y proporción correcta, se procede a la eliminación del espaciador, para lo cual se someterá la probeta a unas condiciones de presión y temperaturas concretas.

Como herramienta se utilizará un horno, con el cual se realizarán dos ciclos de tratamiento térmico al vacío. Las variables del proceso será la temperatura, el tiempo y la presión a la que se someterá la pieza en el horno.

En la primera etapa del proceso, se somete la pieza a una temperatura de 60°C a una presión de vacío de unos  $10^{-2}$  mbar durante 12 horas.

La segunda y última etapa del proceso térmico consiste en elevar la temperatura a 110°C, manteniendo la misma presión durante otras 12 horas.

La constitución del horno, así como los valores establecidos de las variables permiten la eliminación del espaciador, sin una fusión del titanio y evitando que el espaciador pueda quedar como residuo del proceso en el horno.



Figura 27 Horno Heaus modelo T5042E

#### f) Sinterización de las probetas

La sinterización de las probetas se trata de un proceso de conformado de las probetas realizada en un horno cerámico horizontal. Este proceso consiste en el aumento paulatino de la temperatura en diferentes rangos a medida que transcurre el tiempo, sometiendo las probetas a una presión de vacío.

Al finalizar el proceso, transcurrirá un tiempo para poder manipular las probetas fabricadas.



Figura 28: (a) Sustratos en verdes, (b) sustratos tras el proceso de sinterizado

### 4.2.2 Fabricación de probetas de con pluvimetarlungia convencional (PM)

En este apartado se describirá en profundidad la fabricación del PM convencional que dará pie a la posterior comparación de las hipótesis de mejora del apantallamiento de tensiones con la adición de porosidad para una disminución del módulo de Young.

De la siguiente manera, se procede a la obtención de las probetas de titanio sin porosidad:

#### a) Preparación de polvos

En primer lugar, el titanio compacto se obtiene a partir de la preparación de polvos metalúrgicos convencionales, es decir polvo de titanio sin aditivos cuya designación es Ti -325 con un >99,5 de pureza. Estos polvos son obtenidos por un proceso de hidrogenación/deshidrogenación.

Los polvos pasarán por un proceso de agitación durante unos diez minutos para evitar la conglomeración de los mismos, así pues, los polvos serán guardados en un lugar seco para evitar problemas en la fabricación.

**b) Prensado**

El prensado se realizará mediante la máquina Instron 5505 de ensayos universales. Para comenzar se preparará el juego de matrices a utilizar para la fabricación de los discos probetas. Estas matrices (figura 28) se limpiarán para evitar que puedan quedar restos de otros procesados. A continuación, serán rociadas por un lubricante, compuesto por una suspensión de 2 gramos de cera por cada 10 ml de acetona, para evitar así que las partículas de titanio queden pegadas al borde de la matriz, además de evitar el posible daño en las paredes de la misma al aplicar la presión. Una vez lubricada la matriz, se colocará el punzón inferior, y el polvo de titanio ya preparado. Antes de colocar la sufridera e iniciar el prensado, se colocará en la máquina vibradora durante unos seis minutos. De esta forma, eliminaremos el espacio entre partículas y conseguiremos un disco denso y sin poros.



Figura 29 Matriz, punzones y elementos para limpieza de los mismos

Para terminar, se iniciará el proceso de prensado, que durará unos seis minutos y medio, y se alcanzará una presión de 1300 MPa.



Figura 30 Prensa Suzpecar 600 kN

#### c) Proceso de sinterización

Según lo descrito anteriormente en el proceso de sinterizado de las probetas de titanio poroso, se seguirán los mismos criterios, pero con diferentes Para el proceso de sinterización, horno utilizado cerámico de tubo horizontal CARBOLYTE STF 15/75/450. Las probetas, una vez obtenidas del prensado, serán introducidas en el horno. La duración total del procesado serán dos horas y la temperatura máxima que se alcanzará serán 1300°C. El horno someterá a las probetas a unas condiciones de vacío, pues la presión que se alcanzará estará entre 5 y 15 mbar.

### 4.2.3 Preparación metalográfica

La fabricación de probetas da como resultado unas piezas en bruto, las cuales necesitan un proceso de preparación metalográfica, para la caracterización y para próximos y posteriores ensayos los cuales necesitan realizarse en una superficie material lisa.

Esta preparación consta de tres fases:

#### a) Desbaste

El primer paso de la preparación es el desbaste de la superficie. Este desbaste se realiza mediante el uso de máquinas de desgaste, sobre las que se colocan discos de lijas. Las probetas irán pasando, desde un grano más grueso, hasta un grano más fino, por cinco tipos de lijas de números:



Figura 31 Granos de abrasivo por unidad de área de las lijas empleadas

Las probetas pasarán primeramente por los discos de grano 240, y serán lijadas realizando movimientos radiales desde el diámetro exterior hasta el centro, procurando no realizar planos o arañosos en la superficie de las probetas. Las piezas se lijarán en una misma máquina, es decir, a un mismo tamaño de grano hasta no encontrar protuberancias, siempre con el grifo de agua encendido para una mejor pasada, como para la eliminación de la viruta del lijado. Al pasar de una máquina a otra, se realizará un giro de la probeta de 90 grados, con el fin de eliminar cualquier posible dirección que haya podido crearse en la superficie, así como para eliminar los planos realizar el lijado de forma óptima.

Este proceso se repetirá de forma consecutiva pasando por los tamaños de grano anteriormente indicados, hasta llegar al 4000.

El tiempo es variable según el tipo de probeta, del estado en el que se encuentre y del propio técnico encargado de realizar el lijado de las probetas.



Figura 32 Desbastadora STRUERS [70]

## b) Pulido

El segundo paso para la preparación de las muestras es el pulido. Para este proceso se utiliza una máquina de pulido, a la que se le coloca un paño concreto para titanio poroso y al que se le aplica un fluido abrasivo compuesto por:

*9ml de sílice coloidal + 1ml de peróxido hidrógeno por muestra a pulir.*

Para realizar el pulido, se colocará el paño en la máquina. Se encenderá y se regulará la velocidad de giro del mismo hasta unas 200 r.p.m. El paño será mojado con abundante agua antes de comenzar a pulir la muestra. Posteriormente se añadirá el fluido abrasivo hasta que se cubra la superficie del paño.

El pulido se realizará haciendo girar la probeta, ejerciendo presión contra el paño, en la dirección contraria a la que gira el paño. A medida que el abrasivo se seque, se irá agregando más cantidad hasta completar los 10 ml de fluido. El tiempo necesario para conseguir un pulido óptimo será de unos 15 minutos, aunque esto dependerá del estado de la pieza, del propio técnico, así como del estado de los paños. Transcurrido este tiempo, para asegurar que no existen líneas o estrías procedentes del desbaste en la superficie, la pieza será enjuagada a presión y se comprobará con luz o, con microscopio si fuera necesario.

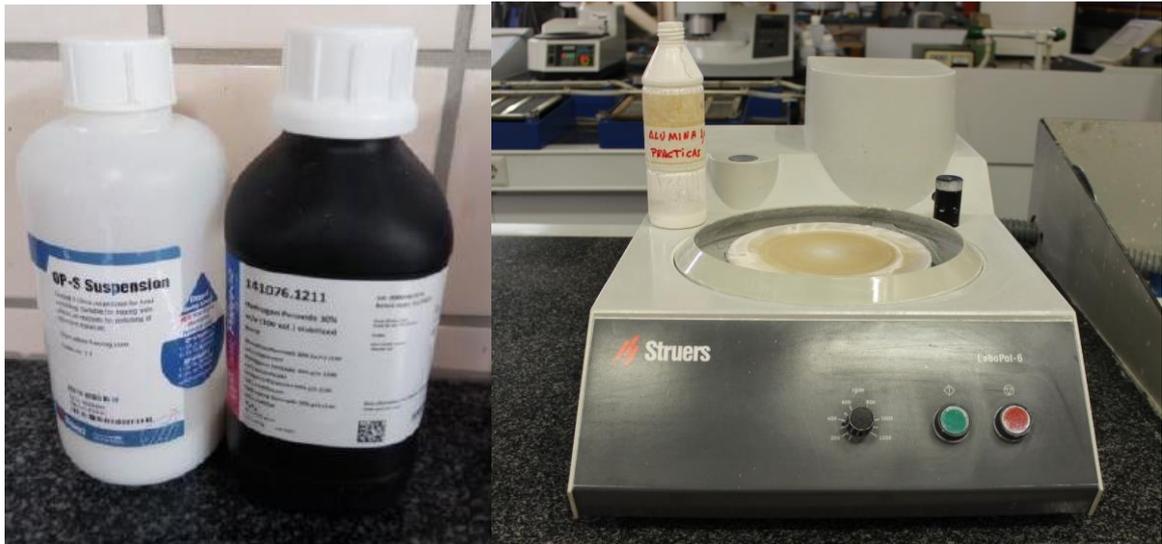


Figura 33: (a) Reactivos para mezcla del pulido [70], (b) Pulidora STRUERS

### c) Limpieza

Tras el pulido, la probeta recibe un enjuague a presión, para eliminar cualquier resto del proceso anterior. Para continuar se procede a una limpieza con ultrasonidos. Para ello se colocará la probeta en un vaso de precipitado en el que se ha colocado previamente un algodón. Con la cara pulida hacia arriba, se llenará el vaso de 100 ml de agua destilada, a lo que se le añadirá jabón hasta que la muestra quede sumergida en su totalidad, y se meterá en la máquina de ultrasonidos durante diez minutos.

Una vez transcurrido este tiempo, volverá a enjuagarse con agua para volver a colocar la muestra en un vaso de precipitado, solo cubierta con alcohol, para una posterior vuelta a la máquina de ultrasonidos por otros diez minutos. Para terminar, la muestra se secará con aire caliente mediante el uso de un secador, para quitar la humedad de forma correcta, y un secado al aire antes de reservar con la cara pulida hacia arriba.



Figura 34 Proceso de limpiado con ultrasonidos

## 4.2.4 Caracterización de la porosidad

Con la búsqueda de una convergencia entre cualidades mecánicas óptimas y un mayor crecimiento celular en el nuevo material poroso, las variables a tener en cuenta en la fabricación serán el porcentaje de porosidad en las probetas, así como el tamaño de poro, y la conjunción de ambas.

Con esta razón, la caracterización de probetas se vuelve fundamental en el proceso experimental. Esta

caracterización se realiza por el método de análisis de imagen, el cual consiste en un proceso de observación y clasificación de los diferentes tipos de probetas fabricadas, en base a los criterios establecidos con anterioridad con la ayuda de microscopio óptico. Además del método geométrico, con el cual se observa la contracción de las muestras tras el proceso de sinterizado, y del método de Arquímedes mediante el cual se calcula tanto la densidad de los sustratos como la porosidad de los mismos.

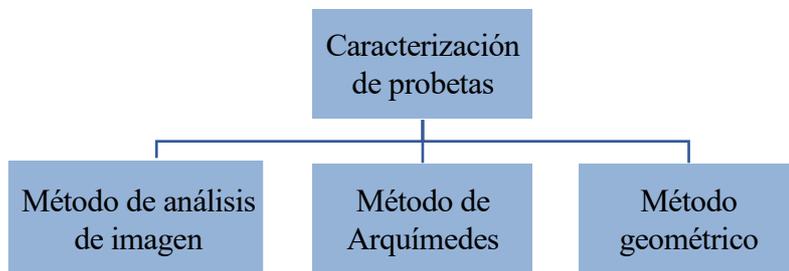


Figura 35 Métodos de caracterización de probetas

### a. Método geométrico

Las posibles contracciones que pudiera sufrir la pieza tras el sinterizado, se estudiaron cuidadosamente para ver la influencia en la densidad final de los sustratos. Siguiendo un procedimiento de pesado de los sustratos tanto antes como después del sinterizado de los mismos y eliminando posibles rebabas de las muestras con una lija de desbaste, las probetas quedarían listas para ser medidas mediante un calibre digital de la marca MITUTOYO. La apreciación del calibre es de 0.01 mm.

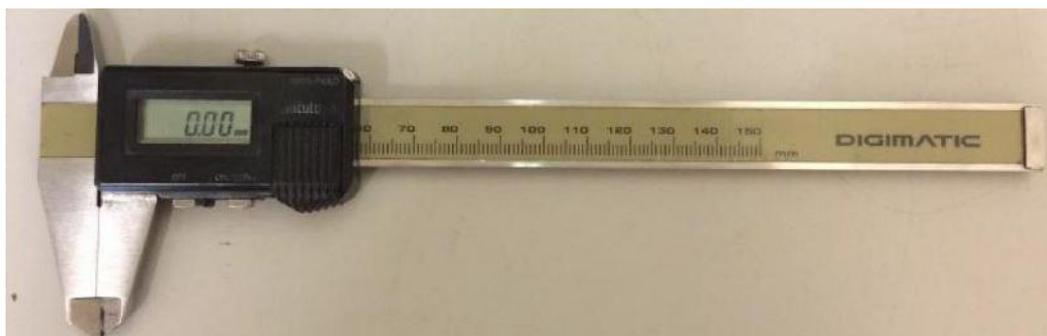


Figura 36 Calibre digital MITUTOYO [70]

En cada disco se ha medido su diámetro a tres alturas diferentes, tomando cuatro lecturas en cada zona (altura, cara superior y cara inferior). Todas estas medidas fueron tomadas pos-prensado y pos-sinterizado. Para los cálculos finales se ha usado el valor promedio de todas las medidas con aproximación centesimal.

### b. Método de Arquímedes

Basado en el principio de empuje de Arquímedes, mediante la aplicación de este método es posible caracterizar los sustratos, tanto su porosidad como su densidad. El método viene recogido de manera exhaustiva en la normativa ASTM C3737-88 de materiales porosos.

Los pasos a seguir para la realización del ensayo son:

- b.1.** Se pesan los sustratos en una balanza de alta precisión. Se obtiene  $D$ , valor del peso en seco.
- b.2.** Se introducen los sustratos bajo análisis en agua destilada a 80 °C un lapso de 5 horas. Será necesario tomar nota de la posición de cada sustrato para un control minucioso del procedimiento.
- b.3.** Las probetas se enfriarán en el recipiente contenedor de agua destilada de manera natural durante 24 horas.
- b.4.** Se realiza un pesaje del cómputo (en tres ocasiones) obteniéndose  $S$ , el peso sumergido.
- b.5.** Para finalizar, se sacan los sustratos del contenedor, eliminando el exceso de agua usando un paño. Se repite el pesaje tres veces y se obtiene  $M$ , valor del peso saturado.

Teniendo ya estos valores es posible calcular la densidad ( $\rho$ ), la porosidad interconectada ( $P_i$ ) y la

porosidad total (P) de las probetas:

$$\rho = \frac{D}{M-S} \cdot \rho_{agua}$$

$$Pi(\%) = \frac{M - D}{M - S}$$

$$P = \left(1 - \frac{\rho}{\rho_{Ti}}\right) \cdot 100$$

Con porosidad interconectada se hace referencia a los poros que se encuentran comunicados entre sí y también con la superficie exterior el sustrato. Con el valor de porosidad interconectada es posible conocer el porcentaje total de porosidad cerrada en la muestra si se le resta ese valor a la porosidad total.

### c. Método de análisis de imagen

El método de análisis de imagen se utiliza para, en primer lugar, realizar una clasificación de sustratos según el porcentaje de porosidad y tamaño de poro, y, en segundo lugar, para asegurar que las probetas en cuestión no se encuentran dañadas o con algún defecto superficial como estrías, arañazos u otros. Para poder realizar este procedimiento es necesario realizar la preparación metalográfica previamente descrita.

Como herramienta se ha utilizado para la toma de imágenes fue un microscopio óptico Nikon Epiphot, al que se ha acoplado una cámara Jenoptik Progress C3, y posteriormente se procesaron las imágenes haciendo uso del software Image-Pro-Plus 6.2 El aumento necesario para la óptima visualización de los poros de las muestras observadas será de 5x.



Figura 37 Microscopio óptico empleado Nikon Epiphot con cámara Jenoptik Progress C3 acoplada

La clasificación, posterior a la limpieza de la superficie, se realiza capturando diferentes fotografías de partes centrales de la probeta fabricada. Estas fotografías se someten a un proceso de discriminación del borde de imagen, así como la eliminación de las poblaciones menores de poros que no cumplen con las condiciones estipuladas de tamaño y forma, fruto del propio proceso de fabricación. Estas poblaciones son obviadas puesto que no representan realmente el tamaño y proporción de poro que se ha fabricado.

A estas fotografías se les agrega la escala correspondiente y se realiza un promedio del tamaño de los poros de la parte capturada. Con este cálculo se obtiene tamaño aproximado de la mayor parte de los poros.

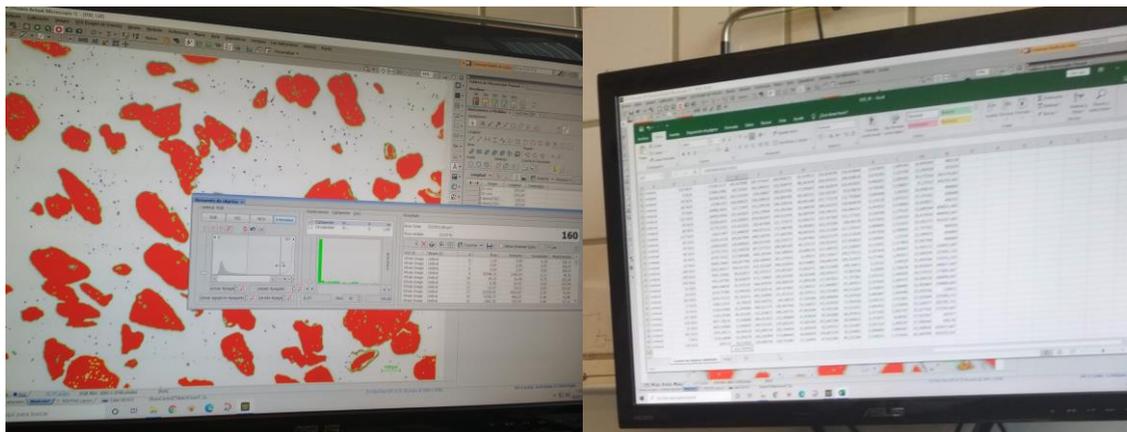


Figura 38 Ejemplos del proceso de análisis de imagen

Una vez calculado el tamaño de los mismos, también se estudia el poro morfológicamente. Viendo el factor forma, el cual nos indica cómo de irregulares son los poros en base a una circunferencia. Siendo 1 la circunferencia perfecta y 0, todo lo contrario, este factor indica el diámetro equivalente utilizado para el cálculo del tamaño y la proporción porosa en la probeta.

Mediante estos cálculos, se obtiene el porcentaje de porosidad que ocupa la imagen, por lo que, extrapolándose a la totalidad de la probeta en sí, se afirma con certeza el porcentaje de porosidad que se ha conseguido en la probeta tras el proceso de fabricación y, si este coincide con el que debería haber sido según el porcentaje másico de espaciador utilizado.

Este mismo procedimiento de capturas fotográficas es repetido cinco veces, según el estado de la probeta y la claridad con la que se obtengan los datos necesarios, en diferentes partes, como se ha especificado anteriormente, para una clasificación veraz y exenta de errores.

El proceso de verificación del estado y clasificación consiste en una previsualización de diferentes partes de la pieza, cercanas al centro de la misma, sin tener muy en cuenta los bordes, que se consideran fuente de errores y, por lo tanto, no necesitan la perfección que requiere la zona interna de esta en busca de imperfecciones del proceso de preparación, como son: arañazos, suciedad, grietas, humedades, pequeñas fibras o rastro de jabón o del fluido utilizado en el pulido.

Este proceso finaliza con una rápida visualización del tamaño de poro y del porcentaje de porosidad en la imagen, para confirmar que no ha habido ningún error, o la posible confusión de estos defectos como poros por parte del programa utilizado para estos cálculos.

Otro método de análisis de imagen superficial empleado ha sido la microscopía electrónica de barrido (SEM). Este tipo de microscopio usa un haz de electrones para la formación de imágenes en lugar de un haz de luz consiguiendo una mayor profundidad de campo.

De igual modo, en alguna ocasión se hizo uso de microscopía láser confocal (MLCF), que funciona principalmente eliminando la luz que provenga de zonas fuera del foco. Con él se consiguen imágenes de ese único plano confocal.

#### 4.2.5 Técnicas de modificación superficial

Realizada la fabricación de los sustratos, se ha conseguido, según hemos afirmado anteriormente, solventar uno de los principales problemas planteados, simular al máximo las características formales y las propiedades del hueso humano, disminuyendo el módulo de Young y creando un nuevo material más adecuado para el uso del mismo en prótesis.

En un nuevo intento de aumentar el grado de optimización de las probetas, se utilizarán recubrimientos realizados a partir de distintas técnicas, con el fin de paliar el segundo gran problema mencionado anteriormente, el problema del apantallamiento de tensiones. Estos recubrimientos suponen una capa de mejora superficial que, dependiendo de técnica aplicada, las propiedades y el grado de mejora será diferente.

A continuación, se desarrollará el proceso experimental seguido para la aplicación de las técnicas usadas para la

mejora superficial, que, posteriormente serán evaluadas y se obtendrán las diferentes decisiones y conclusiones a partir de los datos obtenidos.

#### **a. Modificación superficial por ataque químico**

Siguiendo la primera línea de modificación de la rugosidad superficial de las probetas fabricadas, una de las técnicas realizadas ha sido la modificación por ataque químico con el uso de ácido fluorhídrico. Esta es una forma de grabado húmedo que emplea ácido fluorhídrico para grabar superficies. Se denomina grabado húmedo debido a que utiliza sustancias químicas líquidas, obteniéndose un grabado isotrópico, esto quiere decir que resultan bordes redondeados de grabado por debajo de la máscara de grabado. Este proceso consigue una modificación de la superficie a gran velocidad. El proceso de modificación por ataque químico que se ha seguido se describe a continuación.

Para comenzar, se realiza la disolución del ácido fluorhídrico (HF, 45%) en agua destilada (22 ml/L) y un inhibidor orgánico (0,5 ml/L). Una vez obtenida la mezcla homogénea de los distintos componentes, las probetas fabricadas y previamente preparadas y caracterizadas, son sumergidas completamente en dicha disolución.

El proceso de grabado se realiza en dos ciclos: una primera inmersión a 50 ° C durante 125 segundos, y una posterior inmersión igualmente, a 50 ° C, durante 625 segundos. Estos tiempos son definidos según estudios anteriores de la misma línea.

Para finalizar el proceso, las probetas son enjuagadas con agua destilada para eliminar el ácido fluorhídrico, para terminar con la introducción de las probetas en la máquina de ultrasonidos sumergidas en agua destilada y etanol durante aproximadamente 15 minutos.

Las probetas se dejan secar al aire durante 24 horas para eliminar todo resto de etanol.

#### **b. Recubrimiento de grafeno**

Uno de los métodos más utilizados para alterar y mejorar las propiedades superficiales representado por el aumento de la rugosidad del titanio para prótesis es el recubrimiento de grafeno.

Para la deposición de grafeno se ha utilizado el grafeno de capa única (SLG) como recubrimiento debido a su potencial para producir una superficie bioactiva que promueve la adhesión inicial, el cultivo y el crecimiento celular, y su capacidad para suprimir el crecimiento de bacterias.

El SLG se cultivó por deposición química de vapor (CVD) en un 25 $\mu$  lámina de cobre de espesor con pureza > 99,8%. La técnica de deposición química de vapor emplea una reacción química con el fin de ayudar a la deposición de una delgada lámina sobre la superficie.

En el caso de deposición química de vapor de grafeno, éste es sintetizado directamente sobre la superficie del sustrato mediante un proceso térmico hasta que se alcance un estado transitorio. Mediante el flujo de gas inerte, se logrará la deposición del vapor de carbono sobre la superficie del sustrato.

El proceso se llevó a cabo usando  $CH_4$  y  $H_2$  como propulsores. La temperatura de crecimiento se fijó en 1050°C durante dos horas y la presión se mantuvo a 0,18mbar utilizando para ello un vacuómetro Pfeiffer. Una vez terminado el crecimiento, se deja enfriar al aire en una atmósfera de Argón.

El SLG se ha sido transferido a los sustratos porosos utilizando una variación del método asistido por polimetacrilato (PMMA). Dicho proceso consta de seis pasos descritos a continuación:

- b.1.** El grafeno es recubierto con una capa de PMMA (350000 Mw disueltos en tolueno al 7%) mediante el uso de la deposición por centrifugado. El recubrimiento mediante centrifugado consiste en la deposición de la sustancia sobre la superficie del sustrato en distintas etapas de velocidad: primero a alta velocidad para expandir correctamente la sustancia y después a menor velocidad para eliminar el excedente.
- b.2.** El recubrimiento de la parte superior del sustrato se lleva a cabo ahora por inmersión aprovechando la capilaridad de los sustratos. De manera general, el procedimiento pasa por la disolución de los materiales deseados sobre la misma superficie del sustrato, evaporando posteriormente el revestimiento húmedo sedimentario y obteniéndose una película seca. En este caso, se ha usado un 10% de  $HNO_3$  solución durante 1 minuto.

- b.3.** Se elimina la capa de grafeno que crece en la parte posterior de la lámina de Cu. El desprendimiento final de la capa de PMMA / grafeno de la hoja de cobre se llevó a cabo mediante ataque químico utilizando una solución acuosa de persulfato de amonio (APS) 0,1 M.
- b.4.** La capa de PMMA/grafeno previamente desprendida se limpia y enjuaga con agua destilada.
- b.5.** La deposición en el sustrato poroso se lleva a cabo de manera manual y, seguidamente se elimina la capa de PMMA. Para ello se utiliza 2-Propanol.
- b.6.** Por último, la muestra porosa revestida se horneó a 120° C durante 5 minutos mejorando así la adhesión del revestimiento de grafeno al sustrato.

### **c. Bicapa de vidrios bioactivos**

Con el fin de mejorar la bioactividad superficial del titanio, comentado anteriormente en la problemática, una de las técnicas utilizada es la del uso de ciertos materiales, en este caso, vidrios bioactivos, que mejoren la aceptación del titanio por parte de los osteocitos.

Esta técnica consiste en la aplicación de una capa de material al titanio poroso fabricado con anterioridad siguiendo el proceso descrito a continuación.

Los sustratos utilizados para el recubrimiento bicapa (ambos adquiridos a SCHOTT Vitrixx®) con su correspondiente composición química han sido:

- **Bioglass®45S5**

Con una composición química: 45% en peso de  $SiO_2$ , 24,5% en peso de  $CaO$ , 24,5% en peso de  $Na_2O$  y 6% en peso de  $P_2O_5$ .

- **Bioglass®1393**

Con una composición química: 53% en peso de  $SiO_2$ , 20% en peso de  $CaO$ , 6% en peso de  $Na_2O$ , 4% en peso de  $P_2O_5$ , 12% en peso de  $K_2O$  y 5% en peso de  $MgO$ .

Previo a la aplicación de la capa se ha comprobado la bioactividad de los materiales mediante la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de estado sólido con giro de ángulo mágico (MAS NMR). Esta técnica permite dilucidar los ambientes químicos, señalados como Qnorte, que rodean los átomos de silicio en la red tridimensional., utilizando un espectrofotómetro Bruker Avance III 600 MHz WB.

Las muestras de BG45S5 se centrifugaron a 10 kHz utilizando una longitud de pulso único de 75 ° con un tiempo de relajación de 15 s. El recubrimiento de los sustratos fue realizado mediante la técnica de sedimentación por goteo.

Antes de realizar el proceso de sedimentación las muestras fueron recubiertas de un polímero retráctil con el fin de obtener un recubrimiento más homogéneo ya que evita la pérdida de suspensión del vidrio por los bordes de los discos, teniendo en cuenta la previa preparación metalográfica, así como la caracterización del sustrato.

Para la preparación de la suspensión para cada biovidrio se añaden 0,1 g de polvo por cada 10 ml de etanol, agitando energicamente para evitar la sedimentación del polvo. Tras la agitación, la mezcla se somete a un baño de ultrasonidos por 15 minutos. Una vez conseguida la mezcla, se procede a la deposición de la misma en los discos. Este proceso se realiza mediante cuatro ciclos.

Primero se realizan dos ciclos de BG 1393 seguidos de otros dos ciclos de BG45S5. Después de cada ciclo, el disco reposará durante 24 horas, secándose al aire para eliminar el etanol antes de proseguir con el siguiente ciclo. Al terminar el último ciclo y esperar las 24 horas correspondientes, se realiza el tratamiento térmico de los sustratos. Dicho tratamiento se realiza con un horno Vita Vacumat 6000 M. El proceso consiste en, primero llegar a 600° C aumentando 20° C al minuto, y, posteriormente hasta 820° C aumentando 40° C al minuto y manteniendo la temperatura final por 5s, manteniendo en todo momento unas condiciones de vacío en el horno de aproximadamente 10-2 mbar.

Al finalizar el proceso, se realiza la caracterización de los sustratos con el recubrimiento bicapa.

### **d. Deposición de nanopartículas de plata**

Como se ha explicado con anterioridad, este proceso se ha desarrollado con el fin de mejorar la adhesión de los osteocitos a la pared material.

En este caso se han seguido dos técnicas diferentes en paralelo, las cuales quedan descritas en los siguientes párrafos.

- c.1. Ruta A: Se disuelve  $AgNO_3$  (2 mM) en agua deionizada, sometiendo la disolución a agitación constante con velocidad de 115 rpm y  $0^\circ C$ ,  $NaBH_4$  (1% en volumen) y la mezcla se dejó reaccionar durante 30 minutos.
- c.2. Ruta B: Para sintetizar  $AgNO_3$  se emplearon citrato trisódico (SC) y ácido tánico (TA), adquiridos de Sigma Aldrich, para hacer las veces de precursores. El  $AgNO_3$  se disolvió en DMSO (25 mM) a la vez que se prepararon soluciones acuosas de SC (1,1 M) y TA (0,012 mM). El proceso de agitado se realiza a  $80^\circ C$  dejando reposar posteriormente la disolución por 10 minutos.

Una vez obtenidos los nanocompuestos por las dos metodologías, el siguiente paso es la comprobación de la presencia de nanopartículas de plata en las disoluciones usando el espectrofotómetro AgilentCary 5000 a 298 K desde 300 hasta 600 nm con una precisión de longitud de onda de  $\pm 0,3$  nm y un ancho de banda espectral de 0,5 nm.[70].

El proceso de deposición de nanopartículas de plata se desglosa en tres partes: hidroxilación de sustratos de Ti, silanización superficial y sumersión en la suspensión de nanopartículas de plata.

En primer lugar, se realiza la inmersión de las muestras de titanio en una solución ácida compuesta por: 7 de  $H_2O_2$  (30% en volumen) y  $H_2SO_4$  (70% en volumen), a  $60^\circ C$  durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, las probetas fueron lavadas tres veces con agua y secadas con flujo de nitrógeno.

Las muestras ya hidroxiladas, se tratan con una solución 3-aminopro-pyltriethoxysilane (1% en volumen) en agua durante 15 minutos bajo agitación continua para un posterior secado en horno con flujo de aire convectivo a  $115^\circ C$  durante 1,5 horas. Nuevamente, fueron lavadas tres veces y secadas con flujo de nitrógeno.

Finalmente, para la deposición final de las nanopartículas de plata se realiza la inmersión de las probetas en el preparado de suspensión de nanopartículas durante 30 minutos. El proceso, termina con la comprobación y caracterización de las probetas una vez finalizada la deposición. Esta caracterización se realiza mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando un microscopio electrónico de barrido JEOL, modelo JSM 6490-LV.

Además, las comprobaciones antibacterianas de los sustratos de titanio recubiertos son evaluados con el método de difusión de Kirby-Bauer utilizando *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

En los siguientes apartados se analizará con detalle los resultados de los diferentes ensayos realizados a los sustratos, incluyendo la comprobación antibacteriana de la superficie entre demás pruebas.

## 4.2.6 Técnicas de caracterización superficial

### a. Técnicas de caracterización mecánica

#### - Compresión uniaxial

Mediante la realización de un ensayo de compresión uniaxial es posible determinar la resistencia uniaxial no confinada de un material ensayado (resistencia a compresión simple),  $\sigma_c$  (MPa), así como las constantes elásticas, módulo de Young, E (MPa), y Módulo de Poisson,  $\nu$ . Una vez ensayado el sustrato, podrán obtenerse datos de su resistencia y deformabilidad.

Para este ensayo se ha utilizado la máquina de prueba universal Instron 5505. Con esta, se le aplica una fuerza de compresión en la dirección longitudinal de la probeta.

#### - Técnica de ultrasonidos

A través de la aplicación de la técnica de ultrasonidos es posible obtener el módulo dinámico de Young (Ed) de una probeta. El procedimiento se basa en hacer pasar ondas de muy alta frecuencia a través de la probeta ensayada. Para la aplicación de dicha técnica se ha utilizado el (equipo KRAUTKRAMER USM 35).

- **Técnica de microindentación de Vickers**

Para estudiar el comportamiento micro-mecánico de las probetas se utiliza el método de la micro-indentación de Vickers. Para la aplicación de esta técnica se aplican dos cargas diferentes (HV0.3 y HV1), midiendo 10 veces por tipo de sustrato y condición de carga. Con este ensayo se observa la dureza del material, es decir, la resistencia del mismo a ser penetrado al aplicar una carga.

**b. Técnicas de caracterización por ensayos biológicos**

- **Cultivo celular**

Para estudiar la biocompatibilidad del material se realizan una serie de ensayos de cultivo celular empleando diferentes líneas celulares (como la línea celular C2C12-GFP o la línea celular RAW 264.7). Una vez realizado el cultivo se realizan una serie de ensayos descritos a continuación.

Las muestras de Ti se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 30 min y luego se colocaron cuidadosamente en placas de 24 pocillos (marca Corning Costar) para proceder a la realización del cultivo celular. Luego, las células se dispusieron sobre los sustratos de titanio en densidades celulares diferentes, dependiendo del experimento a realizar.

- **Ensayos de adhesión y proliferación celular**

Dependiendo de la línea celular cultivada en los diferentes tipos de probetas fabricadas y preparadas superficialmente, se aplicarán unos ensayos u otros, siempre con la finalidad de analizar el grado de adhesión y proliferación de las células en los sustratos.

- **Microscopía invertida de fluorescencia mediante AlamarBlue (DAL1100, Thermofisher, EE. UU.)**

La fluorescencia es un fenómeno físico usado de manera frecuente en los procesos de microscopía biológica y analítica, ya que con ella es posible realizar una serie de ensayos que midan la distribución molecular, la densidad molecular y la distribución molecular de manera sensible y precisa.

Los microscopios de fluorescencia aquí empleados están basados en un conjunto de filtros ópticos que se encargarán de seleccionar las longitudes de onda para la excitación del fluoróforo (tarea del filtro de excitación) y controlar que sólo pasen las longitudes de onda de interés (tarea del filtro de emisión). Las imágenes de fluorescencia se obtienen mediante una cámara (ej: Leica DFC450 C). Esta técnica ha sido aplicada a la línea celular C2C12-GFP usando el equipo Olympus IX51, además del software CellD.

Mediante la aplicación del reactivo AlamarBlue (método no tóxico y escalable) será posible obtener mediciones de la viabilidad celular y la citotoxicidad.

El proceso seguido ha sido el siguiente, en primer lugar, las muestras, previamente sembradas con células han sido colocadas en placas de 24 pocillos, a las que se les ha agregado un el 10% del volumen de cultivo del colorante AlamarBlue. Tras 90 minutos de incubación, se observa una señal fluorescente, cuya longitud de onda de excitación es de es de 530 nm y la longitud de onda de emisión es de 590 nm. Esta lectura se toma utilizando el lector de microplacas Synergy HT, Biotek. Los experimentos de adhesión celular se evaluaron a 1 día y los estudios de proliferación a los 4 y 7 días para C2C12-GFP y MC3T3E1 respectivamente.

- **Evaluación de la morfología celular**

Otro parámetro requerido para el estudio y comparación de la adecuación del material y del recubrimiento, será la morfología celular que crecen en el sustrato en cuestión.

Para cada etapa del cultivo, las células se fueron fijando con solución de paraformaldehído (PFA) al 4% durante 15min. Las muestras de titanio, posteriormente, se enjuagaron cuidadosamente con PBSy se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% (v / v). Posteriormente, se lavaron las muestras con PBS y se tiñó el citoesqueleto de actina con Rojo Texas.®-X phalloidin (Molecular Probes), durante 20 min a temperatura ambiente (TA) y en la oscuridad. Como marcador de contraste, los núcleos celulares se tiñeron usando Hoechst (Invitrogen, Molecular Probes). Las muestras se observaron usando el microscopio mencionado anteriormente, Olympus IX51, con un filtro

TRICT ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 550/600$  nm ) para actina, y filtro DAPI para Hoechst ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 380/455$  nm).

- **Diferenciación celular: medidas de ALP**

La detección de la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) se utilizó como un indicador de pre-osteoblastos MC3T3.

Después de 7 días de cultivo, las muestras fueron lavadas con PBS (500 $\mu$ L) y 100  $\mu$ L / pocillo de lisis (50 mM Tris pH 6,8, 0,1%. Se le añadió Triton X-100, 2mM *MgCl*<sub>2</sub>). Las líneas celulares se sembraron en una placa de 96 pocillos y se midió la presencia de ALP utilizando fosfato 2-amino-2-methyl-1-propanol (100  $\mu$ L/pozo). El proceso de incubación duró 30 minutos a una temperatura de 37 ° C a oscuras. Se detuvo la reacción con NaOH 0,5 M (100 $\mu$ L / pocillo), y se leyó la absorbencia a 450 nm usando un lector de microplacas (Synergy HT, Biotek).

- **Ensayo inmunocitoquímico para el análisis de la respuesta inmune**

El ensayo inmunocitoquímico se basa en el estudio del marcador celular CCR7 mediante el uso de inmunocitoquímica para evaluar la polarización del fenotipo RAW 264.7 M1. En el cultivo de macrófagos, se realizó una fijación con PFA al 4% durante un período de tiempo de 20 min a temperatura ambiente y, después, se incubó durante la noche en una solución de bloqueo a una temperatura de 4°C. Posteriormente, se añadieron anticuerpos primarios de rata para la especificación de M1. Para lograr la visualización de las células marcadas con fluorescencia se empleó un microscopio de fluorescencia (Olympus IX51) con un filtro TRICT (parámetros  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 547/572$  nm) empleando el software de análisis CellD.

- **Mineralización celular: ensayo de rojo de alzarina**

Tras 14 de cultivo, a las muestras con células se les aplica PFA al 4% y enjuagándolas posteriormente con agua destilada. Después, las muestras se tiñeron con rojo Sirius. Se realizó un lavado de las muestras con PBS, se tiñeron con una solución de tinción de rojo S de alizarina 40 mM y se incubaron a temperatura ambiente un período de 20 min. Después, se elimina la solución de tinción y se enjuaga de nuevo la muestra. Por último, se identifican en el microscopio (Olympus, BX51,).

- **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó utilizando el software Origin Pro expresando los resultados como media  $\pm$  desviación estándar. Los experimentos de macrófagos y osteoblastos se realizaron por triplicado. Los resultados significativos se expresan como \*  $p < 0,05$ .



## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se expondrán a continuación los resultados obtenidos en este proyecto. Se llevarán a cabo una serie de estudios microestructurales y mecánicos de los sustratos fabricados para su correcta caracterización.

De igual modo, se caracterizarán los sustratos tratados modificados superficialmente mediante distintas técnicas reflejadas en la tabla resumen 7.

### 5.1 Caracterización sustratos de los sustratos porosos fabricados

La siguiente tabla recoge los distintos sustratos fabricados en función del porcentaje de porosidad y tamaño del espaciador.

Tabla 6 Clasificación de los sustratos fabricados en función de la porosidad

% POROSIDAD	Tamaño espaciador		
20	100-200	200-355	355-500
30	100-200	200-355	355-500
40	100-200	200-355	355-500
60	100-200	200-355	355-500

#### 5.1.1 Macrofotografías

A continuación, se presentan una serie de fotografías de los sustratos porosos fabricados junto con una muestra de titanio macizo.



Figura 39 Sustratos fabricados con tamaño de espaciador 100-200  $\mu\text{m}$  a distintos porcentajes de porosidad



Figura 40 Sustratos fabricados con tamaño de espaciador 200-355  $\mu\text{m}$  a distintos porcentajes de porosidad



Figura 41 Sustratos fabricados con tamaño de espaciador 355-500  $\mu\text{m}$  a distintos porcentajes de porosidad

### 5.1.2 Análisis de imagen

Se llevó a cabo un análisis de imagen a los sustratos, estudiándose así la morfología y la porosidad de los mismos. En las siguientes imágenes es posible apreciar las superficies de algunos de los sustratos trabajados:

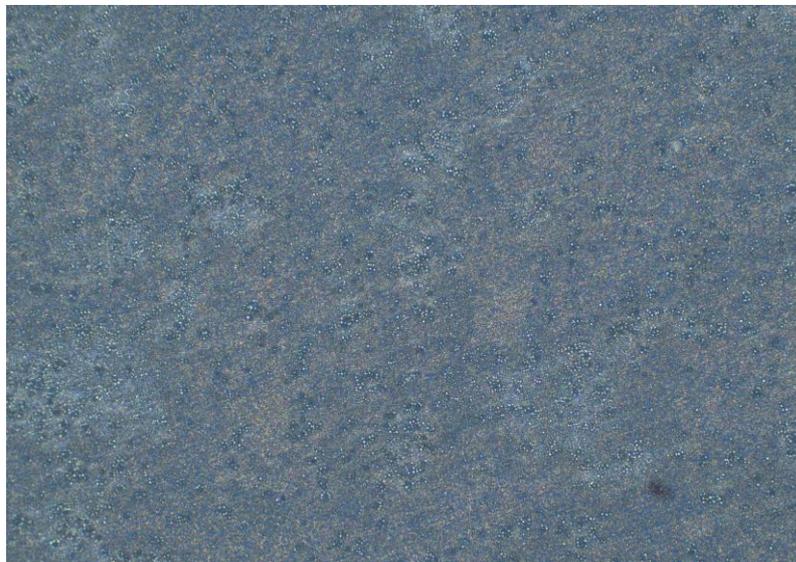


Figura 42 Micrografía titanio macizo

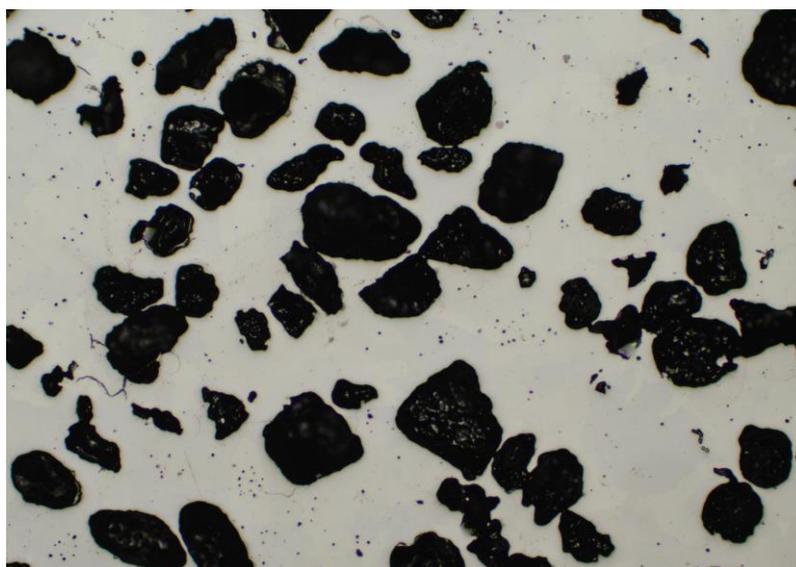


Figura 43 Micrografía sustrato tamaño de poro 100-200  $\mu\text{m}$  30% de porosidad

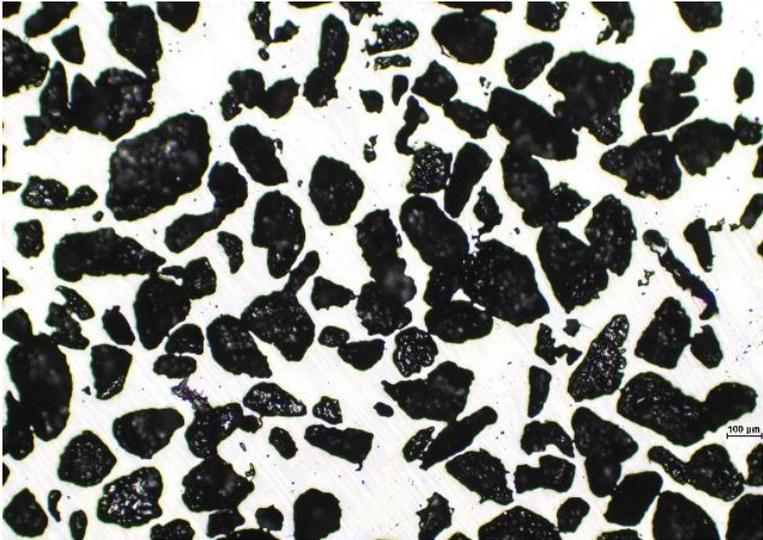


Figura 44 Micrografía sustrato tamaño de poro 100-200  $\mu\text{m}$  60% de porosidad



Figura 45 Micrografía sustrato tamaño de poro 100-200  $\mu\text{m}$  40% de porosidad [70]



Figura 46 Micrografía sustrato tamaño de poro 355-500  $\mu\text{m}$  30% de porosidad

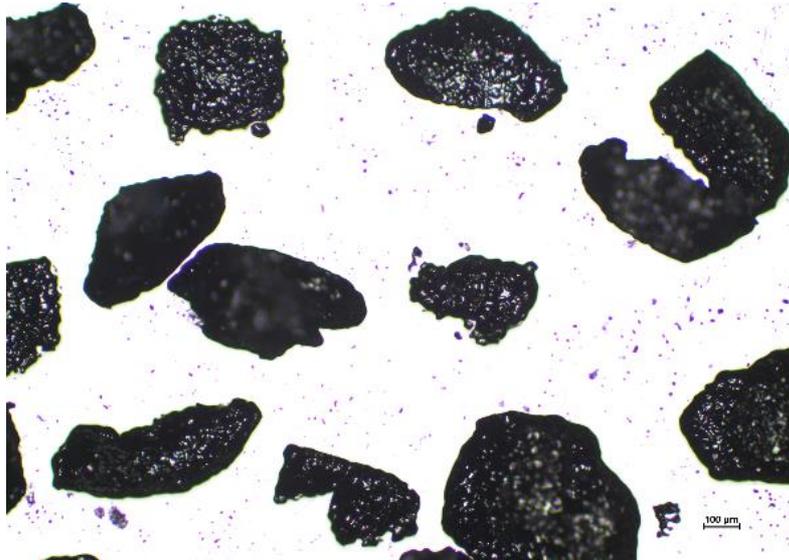


Figura 47 Micrografía sustrato tamaño de poro 355-500  $\mu\text{m}$  40% de porosidad

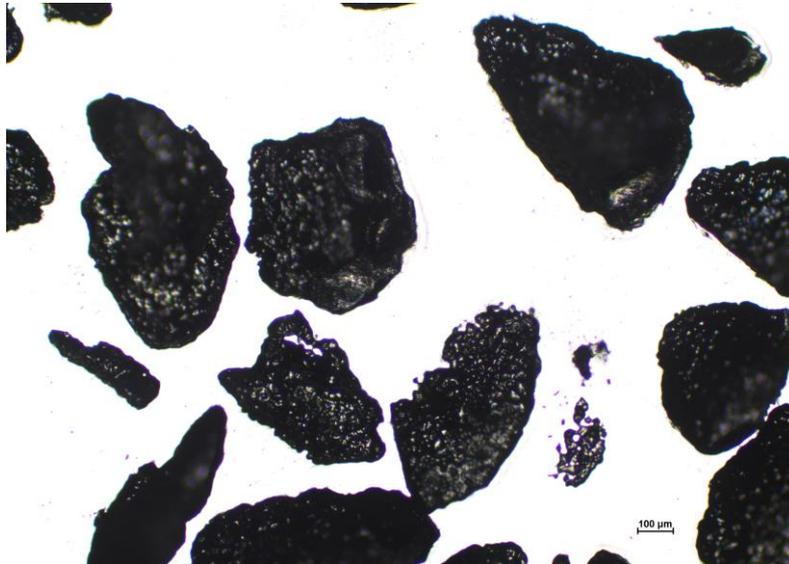


Figura 48 Micrografía sustrato tamaño de poro 355-500  $\mu\text{m}$  50% de porosidad

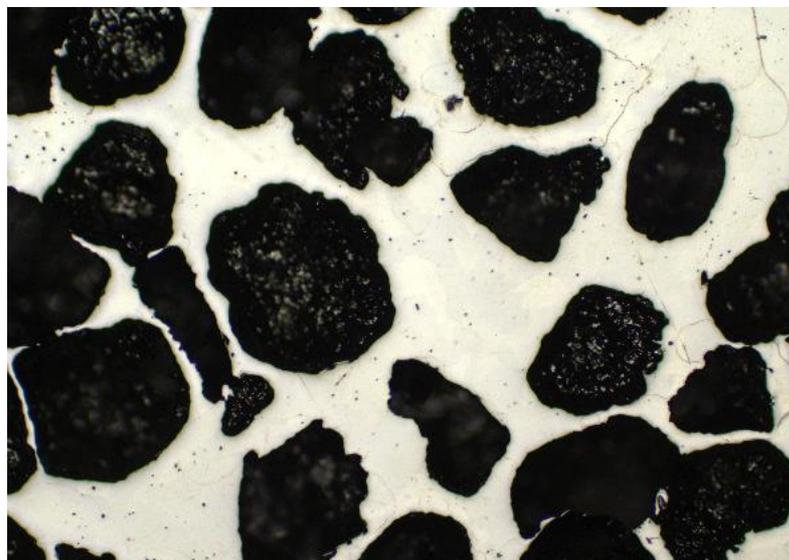


Figura 49 Micrografía sustrato tamaño de poro 355-500  $\mu\text{m}$  60% de porosidad

Tabla 7 Tabla resumen de las técnicas aplicadas a cada sustrato particular

	Ataque químico	Bioglass	Grafeno	Nanopartículas de plata
Microindentación Vickers	100-200 $\mu\text{m}$ 250-355 $\mu\text{m}$ 355-500 $\mu\text{m}$ , 50%	100-200 y 355-500 $\mu\text{m}$ 30 y 60%		
Cultivo celular	100-200 $\mu\text{m}$ 250-355 $\mu\text{m}$ 355-500 $\mu\text{m}$ , 50%	100-200 y 355-500 $\mu\text{m}$ 30 y 60%	Espumas de aleación Ti-Nb-Ta-xMn	
Ensayos de adhesión y proliferación celular	100-200 $\mu\text{m}$ 250-355 $\mu\text{m}$ 355-500 $\mu\text{m}$ , 50%	100-200 y 355-500 $\mu\text{m}$ 30 y 60%		100-200 y 355-500 $\mu\text{m}$ 40%
Evaluación de la morfología celular	100-200 $\mu\text{m}$ 250-355 $\mu\text{m}$ 355-500 $\mu\text{m}$ , 50%	100-200 y 355-500 $\mu\text{m}$ 30 y 60%	Espumas de aleación Ti-Nb-Ta-xMn	
Diferenciación celular: medidas de ALP	100-200 $\mu\text{m}$ 250-355 $\mu\text{m}$ 355-500 $\mu\text{m}$ , 50%			
Ensayo inmunocitoquímico para análisis de respuesta inmune		100-200 y 355-500 $\mu\text{m}$ 30 y 60%	Espumas de aleación Ti-Nb-Ta-xMn	
Mineralización celular: ensayo de rojo de alizarina		100-200 y 355-500 $\mu\text{m}$ 30 y 60%		
Análisis estadístico	100-200 $\mu\text{m}$ 250-355 $\mu\text{m}$ 355-500 $\mu\text{m}$ , 50%		Espumas de aleación Ti-Nb-Ta-xMn	
Análisis de la bioactividad con: 29Si MAS NMR		100-200 y 355-500 $\mu\text{m}$ 30 y 60%		

## 5.2 Caracterización de probetas sometidas a ataque químico

Una vez se ha realizado el proceso de grabado químico sobre los sustratos iniciales, las propiedades tanto mecánicas como microestructurales se ven afectadas.

### 5.2.1 Análisis de imagen

En la figura 49 podemos observar tanto la imagen macroscópica de los sustratos como imágenes SEM de la superficie de los mismos.

Macroscópicamente, se observa un descenso del brillo superficial de las probetas con el aumento de la porosidad, así como con el de la rugosidad.

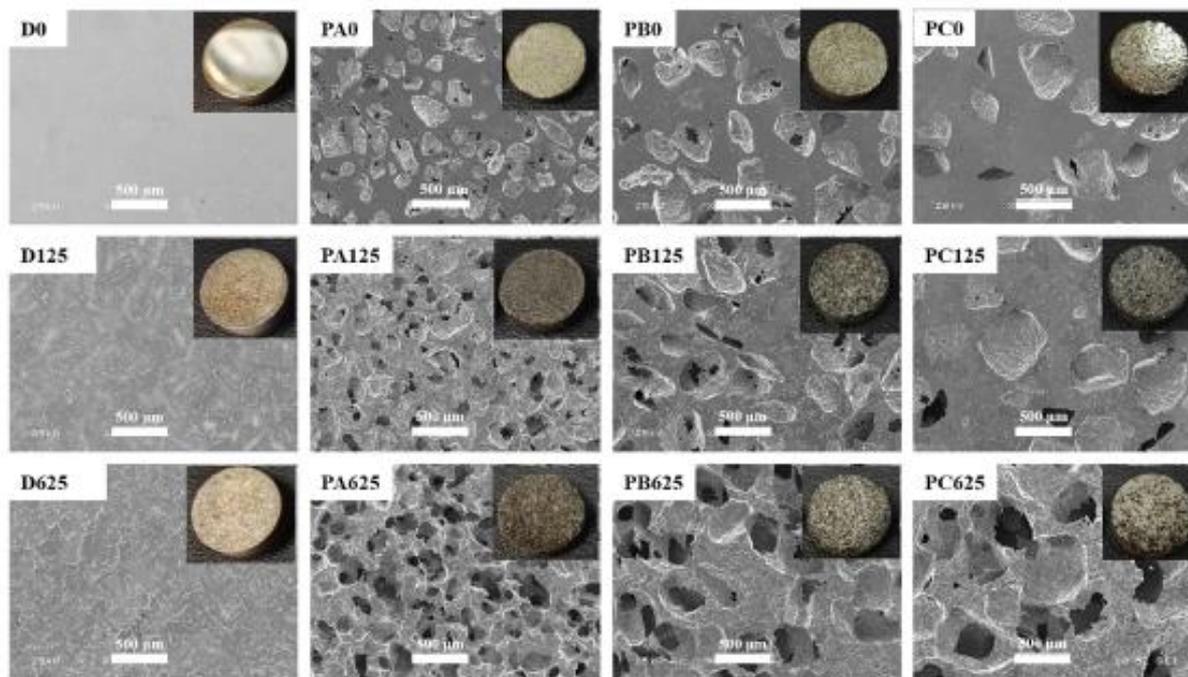


Figura 50 Micrografía SEM de todas las superficies de titanio junto con una imagen macroscópica del sustrato [77]

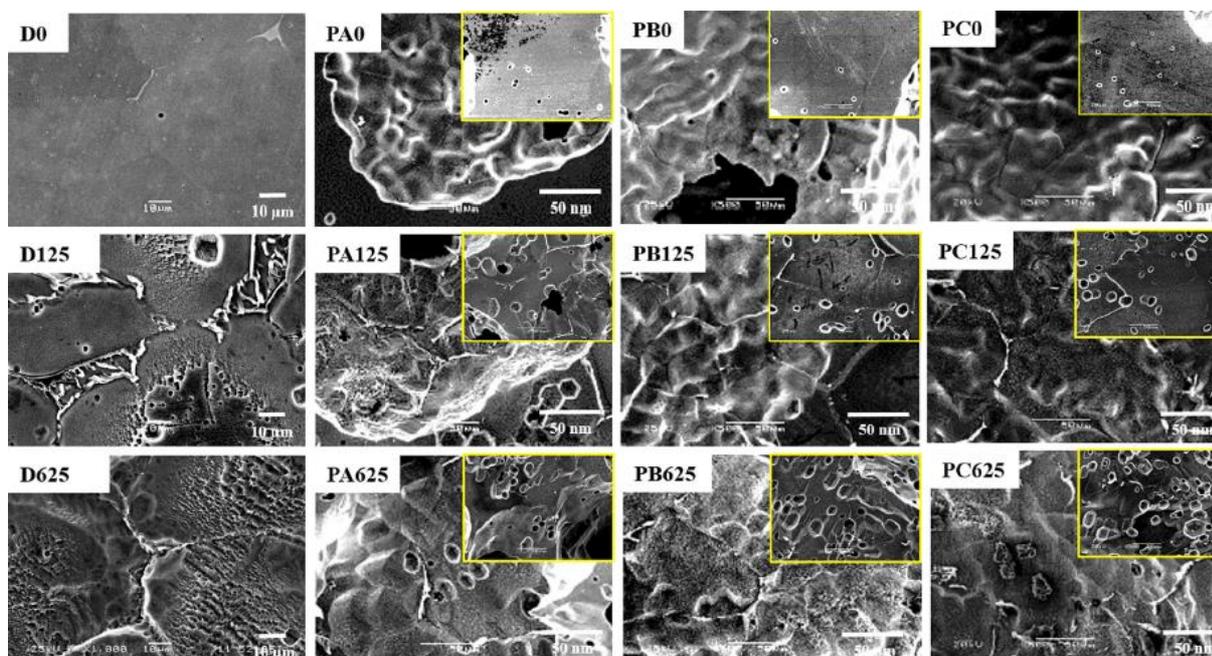


Figura 51 Imagen SEM detallada de la estructura de la porosidad superficial [77]

## 5.2.2 Ensayo de compresión uniaxial

Los resultados obtenidos de este ensayo realizado a los sustratos porosos mostraron unos valores de módulo de Young y de  $\sigma_y$  similares a los del hueso cortical ( $E=20-25$  GPa;  $\sigma_y=150-180$ MPa) (ver tabla).

Tabla 8 Resultados de la caracterización mecánica de los sustratos [77]

Muestras	Tiempo de grabado (s)	Prueba de compresión uniaxial	
		$\sigma_y$ (MPa)	E (GPa)
D (completamente dentro)	0	95	628
	125		
	626		
PA (100-200 $\mu$ metro)	0	120	59,5
	125	60	30,4
	626	62	26,9
PB (250-355 $\mu$ metro)	0	109	32,6
	125	23	28,7
	626	22	47,0
PA (355-500 $\mu$ metro)	0	95	27,7
	125	11	14,1
	626	19	22,8

## 5.2.3 Ensayo micromecánico

Se realizó el ensayo de indentación de Vickers a sustratos con un 50% de porosidad y distintos tamaños de poros comprendidos en los rangos 100-200  $\mu$ m 250-355  $\mu$ m 355-500  $\mu$ m. El ensayo se realizó para dos cargas diferentes (HV0.3 y HV1).

Los resultados obtenidos mostraron unos valores de microdureza mayores para el ensayo realizado a HV0.3 que para HV1 independientemente del tamaño de poro del sustrato ensayado.

En el caso de los ensayos realizados a carga HV0.3 se observa que los valores de microdureza obtenidos para los distintos sustratos porosos son similares al valor obtenido para el sustrato macizo (ver tabla 9). Esto se debe a que la superficie de la matriz existente entre los poros es lo suficientemente grande como para que llegue a asemejarse al sustrato denso. No ocurre lo mismo en el ensayo realizado a mayor carga (HV1) para el cual los resultados muestran una disminución en la microdureza con el aumento de tamaño de poro.

Tabla 9 Resultados de la caracterización micromecánica [77]

Muestras	Tiempo de grabado (s)	Microdureza Vickers	
		HV0.3	HV1
D (completamente dentro)	0	377	342
	125		
	626		
PA (100-200 $\mu$ metro)	0	401	167
	125		
	626		
PB (250-355 $\mu$ metro)	0	356	152
	125		
	626		
PA (355-500 $\mu$ metro)	0	350	138
	125		
	626		

## 5.2.4 Ensayo de adhesión y proliferación celular

Para evaluar estos factores en un tiempo de ensayo de un día, se empleó la línea celular C2C12-GFP.

Se llevó a cabo tanto en sustratos de titanio macizo como porosos de tamaño de poro 100-200, 200-300 y 300-500 al 50% se les sometió a un análisis estadístico con el software Origin Pro para estudiar la viabilidad de las células cultivadas en ellos.

Se analizaron todos los sustratos mencionados, porosos y no porosos, sin tratamiento superficial y con grabado químico 125s y 625s. Los resultados obtenidos tras este análisis (ver figura 51) no presentaron diferencias estadísticas significativas.

La figura muestra los porcentajes de viabilidad celular para todos los sustratos ensayados transcurrido un día desde el inicio del ensayo. En ella se aprecia que, en todos los casos se dan valores superiores al 80% de viabilidad celular comparándolos con el sustrato no poroso sin tratamiento de ataque químico (D0).

Estos resultados reflejan que, para un período de tiempo corto, los parámetros que distinguen los sustratos no afectan a la viabilidad celular de forma reseñable.

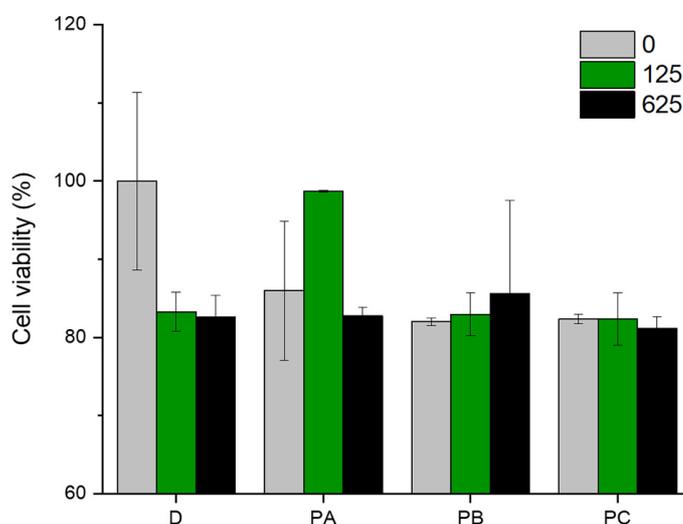


Figura 52 Resultados del análisis estadístico sobre la viabilidad celular de la línea C2C12-GFP transcurrido un día de ensayo [77]

Mediante fluorescencia microscópica, empleando GFP (Green Fluorescent Protein) fue posible observar la proliferación y adhesión celular durante 1-4 días de cultivo (ver imagen 52).

En esta imagen puede observarse cómo, en el primer día de cultivo, la densidad celular es ligeramente mayor en el caso de titanio macizo no tratado (D0) así como el notable aumento de la misma al cuarto día de cultivo. Esto denota citocompatibilidad.

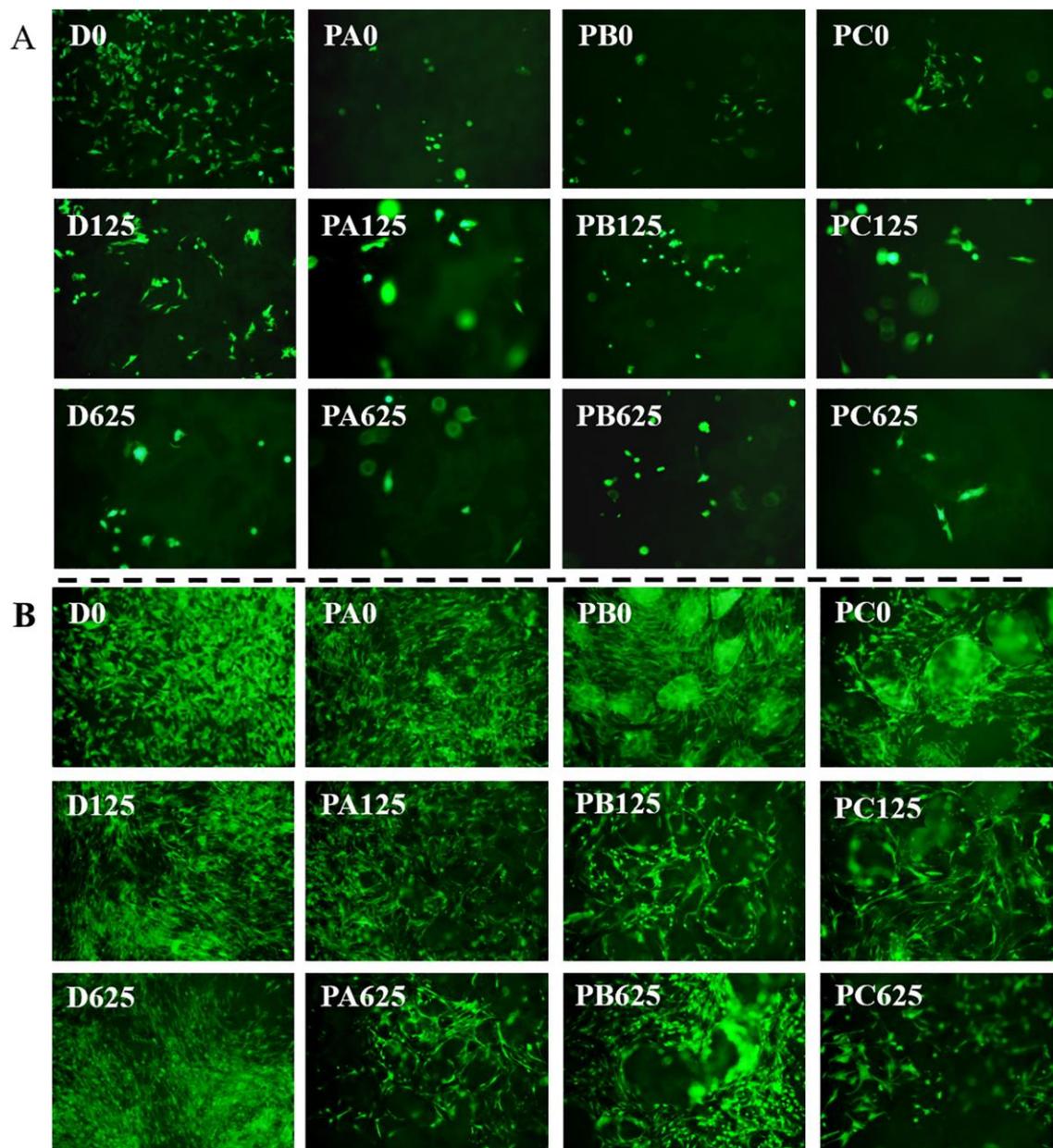


Figura 53 Microfotografías fluorescentes de: (A) adhesión celular y (B) proliferación de la línea celular [77]

Cabe señalar que, en vista de los resultados, la porosidad y rugosidad no son factores que disminuyan la afinidad de la línea celular ya que se aprecia una densidad celular similar entre las superficies grabadas y las no grabadas.

Posteriormente, se llevó a cabo un estudio con la línea celular preostoblástica MC3T3-1 a fin de especificar el ensayo a células óseas.

Los resultados reflejaron un comportamiento similar en los sustratos, aunque observándose una actividad celular mayor en las superficies sometidas a grabado químico (ver figura 53). En las probetas sometidas a grabado químico 625 s la actividad celular resultó también mayor.

Alcanzado el día 7 se aprecian diferencias significativas entre los sustratos D0 y el resto de sustratos porosos y porosos grabados.

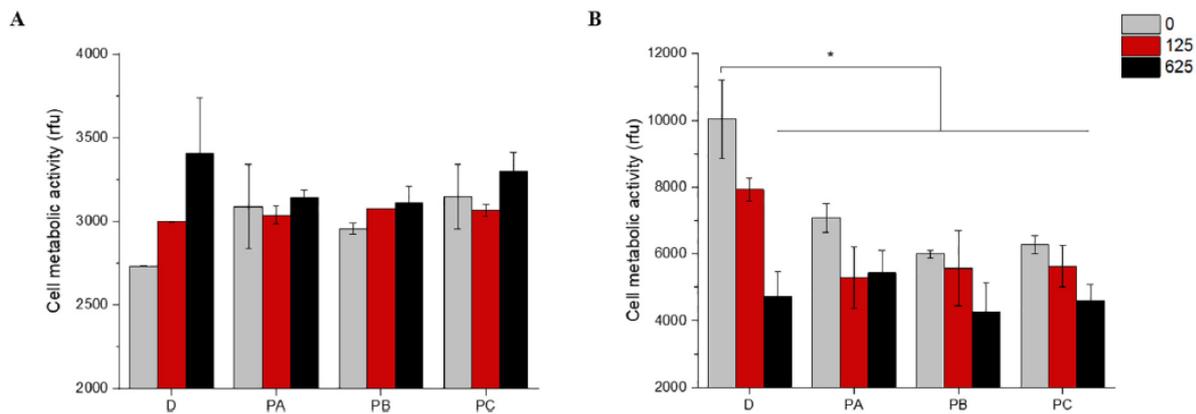


Figura 54 Resultado del análisis estadístico de la viabilidad celular del cultivo de MC3T3E1 a A) 4 y B) 7 días [77]

Un estudio de la fluorescencia realizado con el reactivo AlamarBlue, mostró que la porosidad de los sustratos no representaba un parámetro significativo a la hora de evaluar la actividad metabólica de las células. Sin embargo, las superficies grabadas con ácido sí que presentaron unos niveles de proliferación osteoblástica menores a las lisas. Los niveles fueron incluso menores para los sustratos tratados a 625s que a 125s. A pesar de esto, la densidad celular presente en las superficies de los sustratos sí resultó similar en todas las probetas ensayadas (ver figura 54)

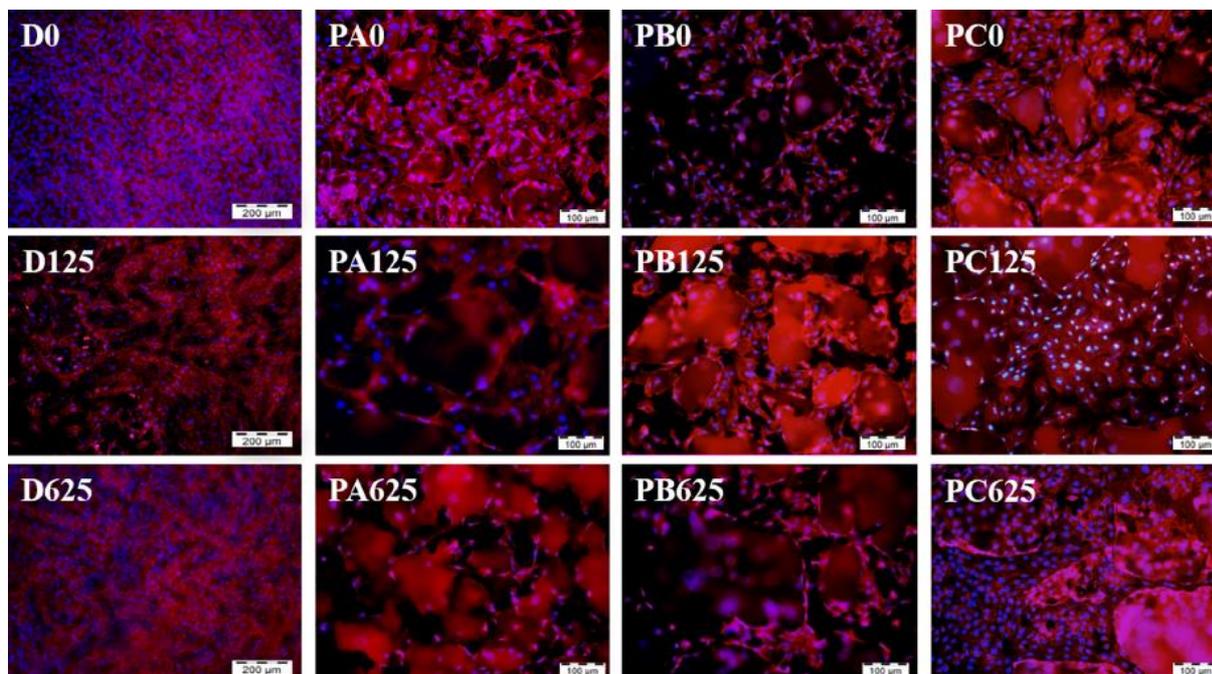


Figura 55 Microfotografías obtenidas del cultivo celular de MC3T3E1 tras el estudio de fluorescencia [77]

### 5.2.5 Medición de actividad de ALP

Tras la aplicación de la técnica de diferenciación celular mediante la medición de la actividad de ALP a la línea celular MC3T3, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Se encontraron niveles más elevados de fosfatasa alcalina en los sustratos de porosidad 100-200 (PA) 250-355 (PB) 355-500 (PC) con respectivos tiempos de grabado de 125s y 625s que, en las muestras de titanio completamente denso, no poroso (D) (ver figura 55).

De igual modo, mediante el mismo método, fue posible detectar que, en el caso de sustratos densos, también era menor la presencia de ALP en aquellos que no presentaban rugosidad, quedando así reflejada la importancia de la porosidad y de la rugosidad del sustrato.

Respecto a la morfología y tamaño de poro, la presencia del marcador óseo es más elevada en los poros de mayor tamaño (PC).

El parámetro de rugosidad influye positivamente en el proceso de diferenciación celular de acuerdo con estudios realizados con anterioridad en los cuales se destaca la importancia de la microrugosidad como activador de dicho proceso.

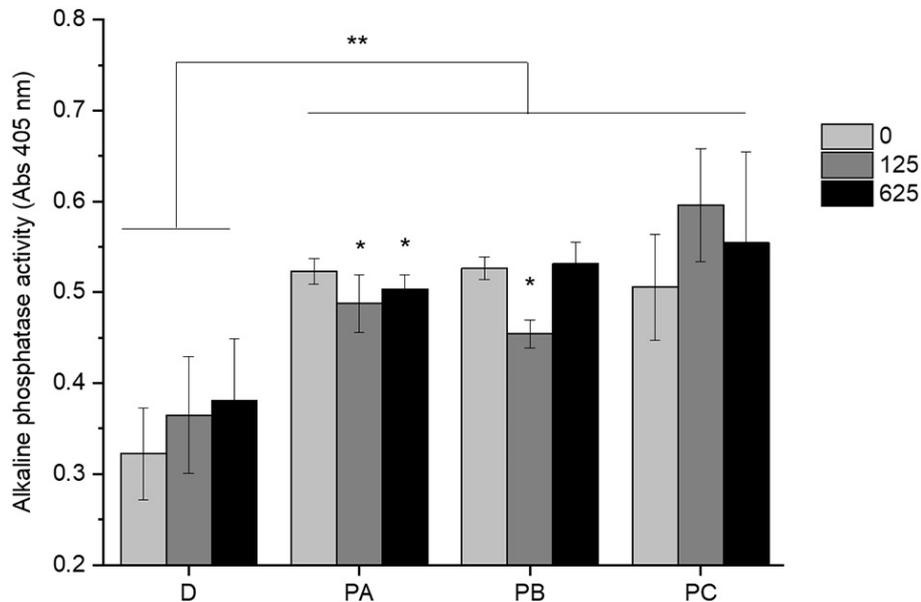


Figura 56 Resultados de la evaluación de diferenciación celular con ALP [77]

### 5.2.6 Rojo alizarina grabado químico

Tras aplicar a los sustratos la técnica de mineralización celular de rojo de alizarina, resultó que los sustratos de superficie porosa mostraban por colorimetría una presencia mayor de depósitos de calcio comparado con los sustratos de superficie lisa.

La mayor aparición de este marcador en los sustratos rugosos, indica que este tipo de elementos tendrá un mejor comportamiento osteoblástico, quedando clara la importancia de la rugosidad en el proceso de mineralización.

En la figura 56 se pueden observar distintos sustratos entre los cuales cabe destacar el caso de sustrato denso sin grabado químico (D0). Se puede apreciar con facilidad la poca presencia del marcador en la superficie de los sustratos D0 y D125 (denso grabado). Su presencia sí que es reseñable en el caso de sustratos porosos (PXX) tanto con grabado químico como sin él.

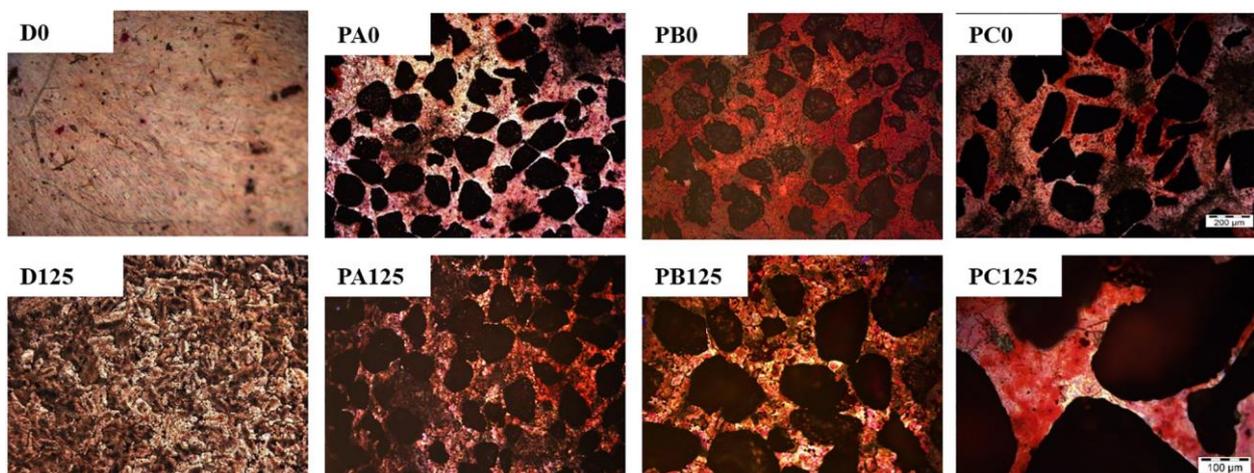


Figura 57 Micrografías para evaluación de la mineralización celular a los 14 días aplicada la prueba de alizarina.[77]

## 5.3 Caracterización de probetas recubiertas con grafeno

A fin de obtener un material con propiedades más adecuadas para implantes óseos, se fabricaron mediante PV una serie de sustratos porosos de una aleación de titanio- $\beta$ .

Se fabricaron con un porcentaje de espaciador del 50%. El proceso de sinterizado se realizó a dos temperaturas diferentes ( $T_1=1200^\circ\text{C}$  y  $T_2=1300^\circ\text{C}$ ) para evaluar los posibles efectos.

Dichos sustratos de aleación (Ti-Nb-Ta-xMn con x:2.4 y 6% en peso) fueron recubiertos con una capa de grafeno depositada mediante el método CVD y sometidos a una serie de ensayos para medir sus propiedades y caracterizarlos [78].

### 5.3.1 Análisis de imagen

Los resultados del análisis de imagen realizado a los sustratos antes de aplicarle el recubrimiento, mostraron tanto macroporos como microporos. En la figura 57 se puede observar como en el caso de un sustrato de titanio puro (caso (a)) la presencia de microporos es menor que en el caso de los sustratos fabricados de aleación.

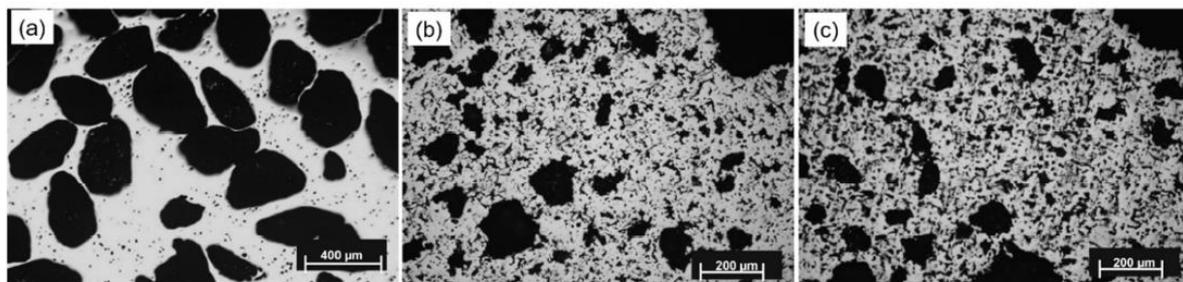


Figura 58 Micrografías de los sustratos: a) cp Ti Tsint  $1250^\circ\text{C}$ , b) 4% en peso Mn- Tsint:  $1200^\circ\text{C}$  c) 4% en peso de Mn- Tsint:  $1300^\circ\text{C}$  [78]

Las imágenes SEM obtenidas mostraron que la temperatura de sinterización no fue un factor relevante para la porosidad obtenida en los sustratos ni para el tamaño de los poros.

Datos relativos al análisis de imagen de los sustratos no recubiertos aparecen recogidos en la tabla 10.

Tabla 10 Parámetros morfológicos de los poros [78]

Muestra [% en peso]	Temperatura de sinterización [ $^\circ\text{C}$ ]	Porosidad total (Tostar) [%]	Pinta de porosidad interconectada [%]	Porosidad por análisis de imagen (IA) [%]	Diámetro equivalente Deq (*) [ $\mu\text{m}$ ]	Factor de forma Ff	Distancia de los poros $\lambda$ [ $\mu\text{m}$ ]
2	1200	$70,2 \pm 0,2$	$54,2 \pm 0,2$	$63,0 \pm 0,0$	$181,3 \pm 13,7$	$0,68 \pm 0,29$	7,3
	1300	$69,2 \pm 0,4$	$50,8 \pm 0,4$	$62,4 \pm 0,0$	$201,7 \pm 15,7$	$0,80 \pm 0,24$	9,6
4	1200	$68,5 \pm 0,2$	$59,5 \pm 0,2$	$52,1 \pm 0,0$	$161,5 \pm 7,4$	$0,76 \pm 0,27$	12,3
	1300	$68,7 \pm 0,0$	$59,4 \pm 0,1$	$57,6 \pm 0,0$	$194,9 \pm 13,1$	$0,77 \pm 0,25$	10,9
6	1200	$71,2 \pm 0,2$	$57,3 \pm 0,0$	$66,2 \pm 0,0$	$183,3 \pm 11,4$	$0,81 \pm 0,24$	6,4
	1300	$70,8 \pm 0,3$	$62,0 \pm 0,4$	$67,2 \pm 0,0$	$192,3 \pm 20,2$	$0,76 \pm 0,26$	7,3

### 5.3.2 Ensayo micromecánico sustratos no recubiertos

Para analizar el comportamiento mecánico de los sustratos se llevaron a cabo una serie de ensayos como es el caso del ensayo de compresión uniaxial. Se realizó en sustratos de distinto contenido en manganeso y sinterizados a distinta temperatura.

Tabla 11 Propiedades mecánicas de las aleaciones porosas de Ti c.p. y Ti-Nb-Ta-Mn [78]

	Temperatura de sinterización [°C]	Porosidad total [%]	El módulo de Young [GPa]		$\sigma_y$ estimado [MPa]	Máximo Compresión Cepa [mm/mm]	
			mic	$M_{Nielsen}$			
cpTi*	1250	66	2,6	10,6	29,0	0,04	
Mn [% en peso]	2	1200	9,8	10,5	41,6	16,9	
		1300	10,1	12,6	52,7	24,9	
	4	1200	9,2	12,9	67,5	21,3	
		1300	9,3	12,7	42,3	12,4	
	6	1200	71,2	11,8	11,1	30,4	14,6
		1300	70,8	9,8	11,0	43,3	16,2

Es preciso señalar los valores obtenidos de E para las aleaciones de Ti  $\beta$ , que se asemejan a los del tejido óseo.

El sustrato sinterizado a 1200°C con un %en peso de Mn de valor 4, presentó el valor de  $\sigma_y$  más elevado (ver figura 58) lo que supone una mejor respuesta a compresión. De manera general, la aleación resultó tener una mejor respuesta mecánica, evaluando resistencia y ductilidad, que el titanio c.p. (ver tabla 11).

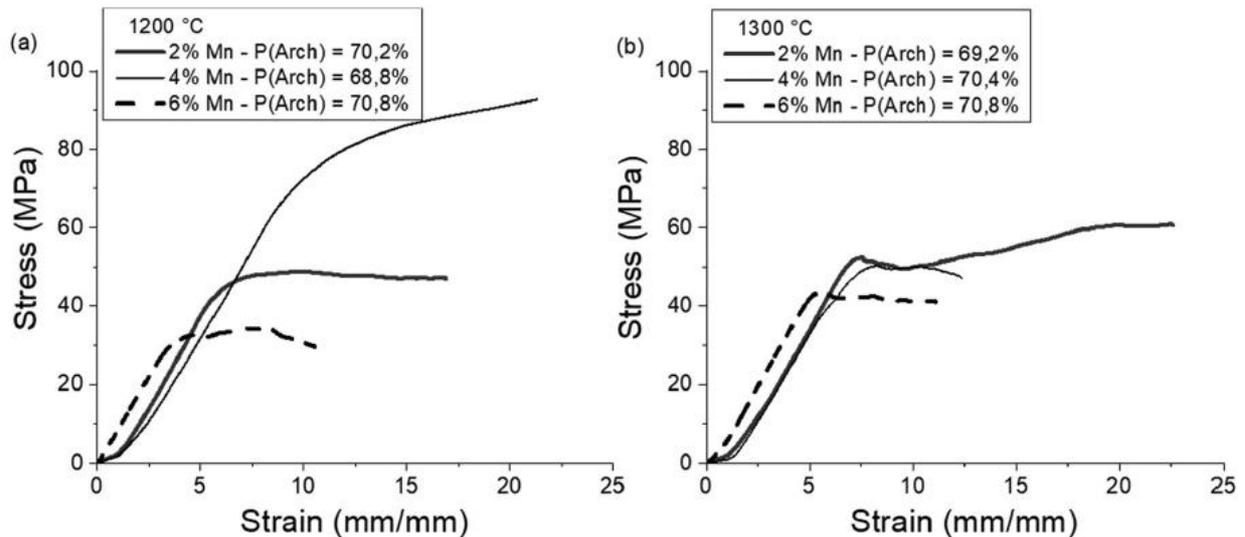


Figura 59 Gráficas tensión deformación a las diferentes temperaturas de sinterizado [78]

### 5.3.3 Caracterización del recubrimiento de grafeno

Del análisis de imagen realizado a los sustratos recubiertos se obtuvieron las imágenes.

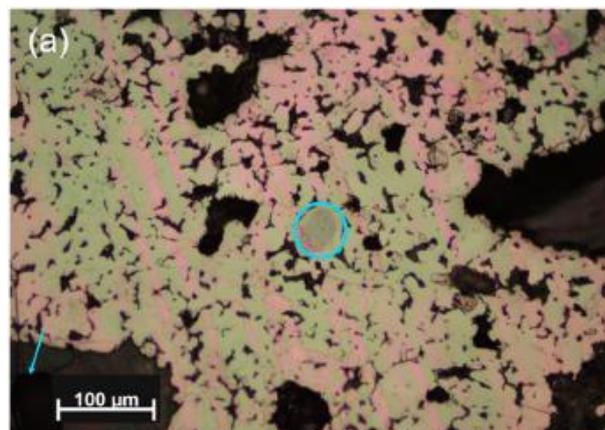


Figura 60 Micrografía de la aleación con 4% en peso de Mn recubiertos con una SLG [78]

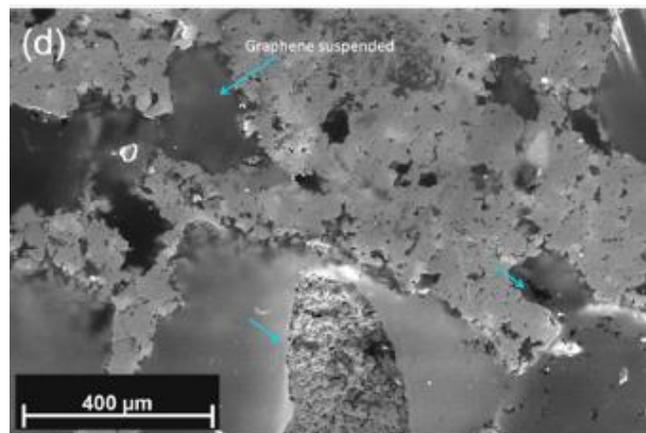


Figura 61 Imagen de la aleación con 4% en peso de Mn recubiertos con una SLG. Detalle de grafeno suspendido en los poros [78]

Se hizo uso de la espectroscopía Raman para analizar el recubrimiento monocapa en las aleaciones *TiNbTaMn*. Los resultados (figura 60) muestran tanto el espectro obtenido para el caso de grafeno sobre un poco como el espectro para el caso de grafeno sobre una superficie plana entre poros.

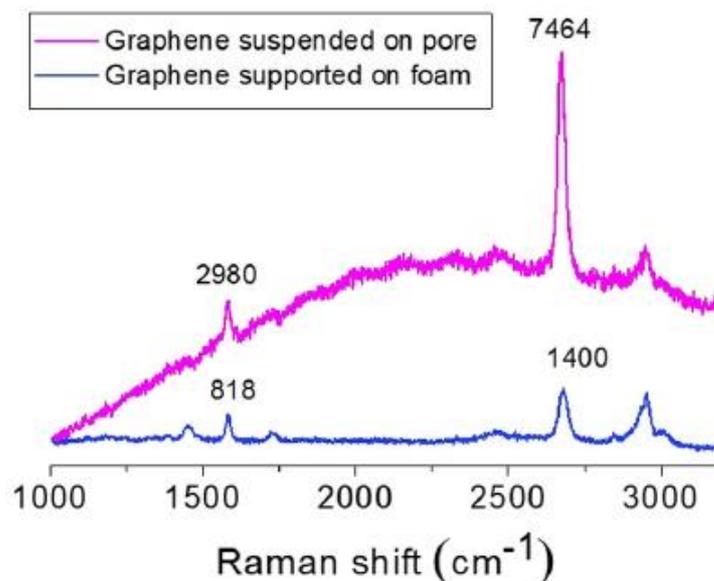


Figura 62 Espectros Raman de grafeno monocapa sobre sustratos: sobre una superficie sólida de la espuma (azul) y suspendida sobre un poro (rojo) [78]

### 5.3.4 Ensayos de biocompatibilidad

La morfología celular presentada por las células cultivadas en el caso de sustratos recubiertos de grafeno (porosidad 50% y tamaño de poro 100-200 en medio fresco ( $\mu=0,79 \pm 0,04$ ) fue analizada a las 24, 24 y 72h del comienzo del estudio. En las primeras 24 h, la mayoría de las células presentaban forma esférica y solo una pequeña cantidad empezaron a mostrar una morfología alargada común de células fibroblásticas. Transcurridas 72 horas, esta morfología estará ya extendida entre todas las células. La etapa de mitosis habrá comenzado llegado este momento y será visible, significando una clara situación de actividad celular.

Los cambios en la morfología celular de aquellas células cultivadas con extracto líquido serán más lentos de forma que, una vez transcurridas 72 horas, la morfología típica de células fibroblásticas sigue sin ser visible. Las células entonces presentan una forma redondeada.

Respecto al crecimiento celular, los resultados aparecen reflejados en la figura 61. Se aprecia cómo el crecimiento celular es exponencial en las muestras con recubrimiento de grafeno y cómo esto no ocurre en el caso de sustrato sin recubrimiento. A pesar de no ser el titanio un material citotóxico, bien es cierto que no parece

activar el crecimiento celular.

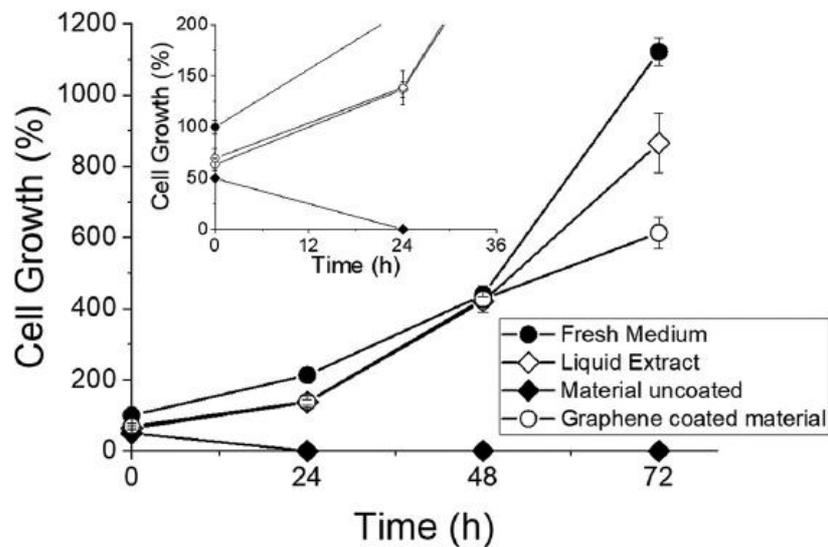


Figura 63 Crecimiento de células con extracto líquido y con contacto directo sobre material recubierto de grafeno [78]

### 5.3.5 Análisis bioestadístico

Los resultados del análisis bioestadístico mostraron que el recubrimiento de grafeno ayuda a mejorar la adhesión celular y el crecimiento celular en las superficies de los sustratos porosos de aleación Ti-35Nb-29Ta4Mn. Se observó que, en caso de sustratos recubiertos, el crecimiento celular fue más rápido ( $\mu = 0,66 \pm 0,11$ ) que en los sustratos de titanio no recubiertos ( $\mu = 0$ ).

También se obtuvo como resultado un crecimiento ligeramente menor para las células cultivadas con extracto líquido ( $\mu = 0,76 \pm 0,11$ ) que para aquellas cultivadas en medio fresco ( $\mu = 0,79 \pm 0,04$ ).

## 5.4 Caracterización de probetas depositadas con AgNPs

Una serie de sustratos de titanio poroso con porcentaje de porosidad 40% y tamaño de poro comprendido en dos rangos distintos (100-200 y 355-500) fueron depositados con nanopartículas de plata (AgNpS) [79].

### 5.4.1 Análisis de imagen

En la figura 63 se muestran imágenes SEM de las superficies de los sustratos porosos de titanio ensayados una vez realizado el recubrimiento. Por lo general, el recubrimiento es homogéneo.

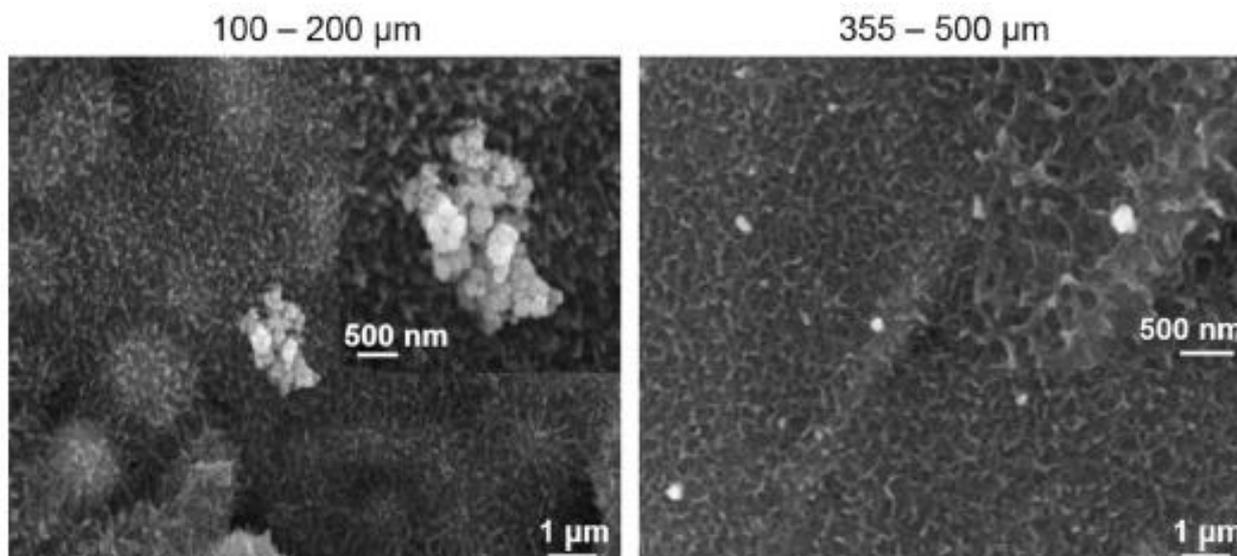


Figura 64 Imágenes SEM de recubrimiento de nanopartículas de plata [79]

### 5.4.2 Ensayos de comportamiento antibacteriano

A fin de evaluar el comportamiento antibacteriano del sustrato recubierto (proliferación, adhesión, etc.) se hizo uso de la bacteria anaerobia *Staphylococcus aureus*.

Se llevaron a cabo una serie de experimentos que acabaron mostrando la presencia de halos inhibidores bacterianos (ver imagen 64).

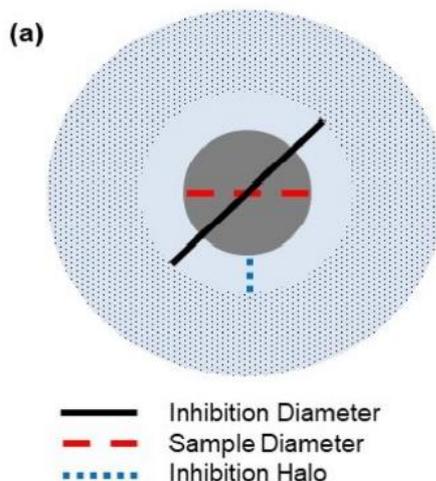


Figura 65 Halos inhibidores bacterianos señalando diámetros [79]

Estos halos se presentaban ligeramente en mayor nivel en aquellos sustratos con tamaño de poro mayor (ver figura 65). Se puede justificar con la mayor facilidad que los poros grandes presentan para ser depositados con las nanopartículas de recubrimiento.

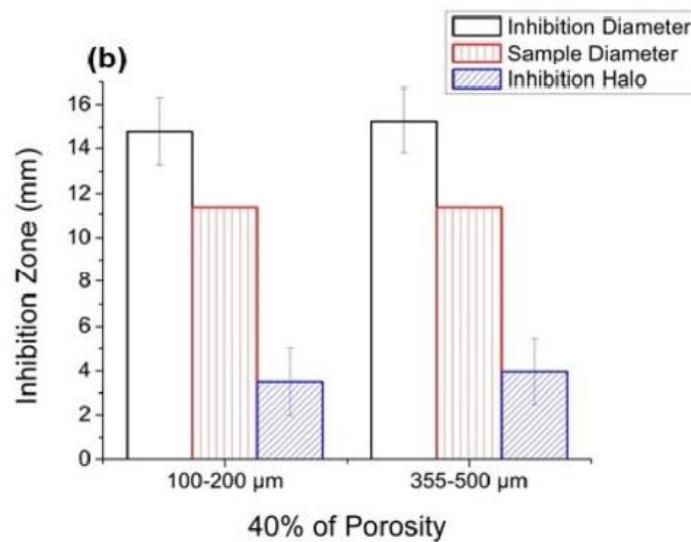


Figura 66 Resultados zona de inhibición para distinto tamaño de poro [79]

## 5.5 Caracterización de probetas recubiertas con vidrios bioactivos

A la hora de estudiar el comportamiento y las propiedades de los recubrimientos de vidrios activos sobre los sustratos de titanio poroso se dieron dos enfoques diferentes: el estudio de las propiedades, adherencia y bioactividad de los biovidrios 45S5 y 1393 como recubrimientos el estudio de un recubrimiento formado por una bicapa que incluyese una capa de cada uno de ellos.

### 5.5.1 Caracterización macroscópica de recubrimientos monocapa

Para el estudio de recubrimiento monocapa se emplearon discos de titanio poroso con porcentajes de porosidad 30% y 60% y tamaños de poro comprendidos en dos rangos, 100-200 μm y 355-500 μm.

La figura 66 muestra las macrografías realizadas a los discos recubiertos antes y después de ser sometidos al tratamiento térmico de vitrificación.

El recubrimiento se repartió de manera homogénea por la superficie del sustrato, penetrando en los poros superficiales

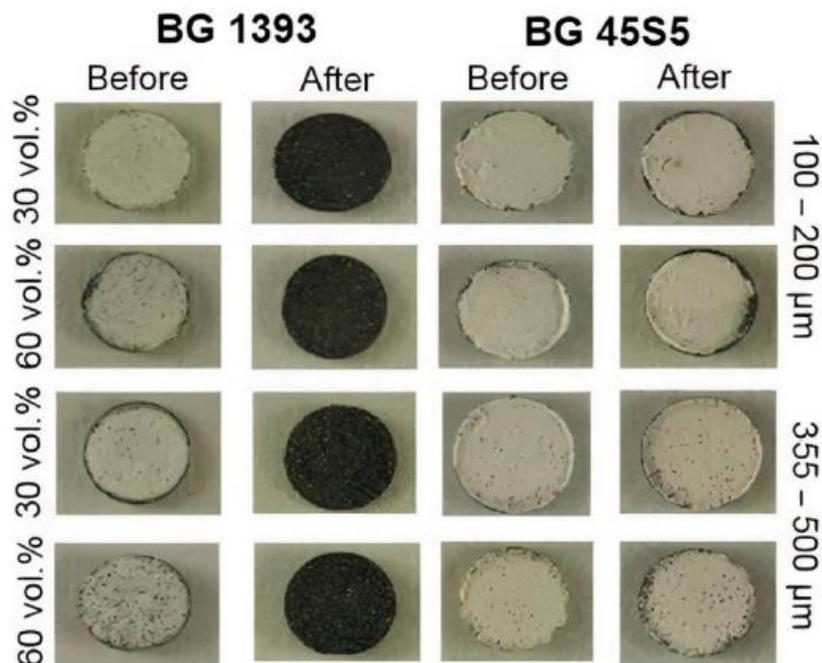


Figura 67 Macrografía de los sustratos de titanio con el recubrimiento dispuesto antes y después de ser sometidos a tratamiento térmico [80]

### 5.5.2 Análisis de imagen de los recubrimientos monocapa

Pasando a analizar la microestructura de los sustratos, se obtuvieron las siguientes imágenes SEM de los mismos (ver figura 67). En dicha imagen se aprecia como en el caso de los recubrimientos realizados con BG 1393, el cuál presenta un menor coeficiente de expansión térmica ( $8.9 \cdot 10^{-6} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ ) en comparación con el del BG 45S5 ( $15 \cdot 10^{-6} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ ), aparecen unas microgrietas producidas por contracción durante el proceso de vitrificación. En el caso de recubrimientos de BG45S5, se observa una superficie rugosa y porosa de aspecto coralino.

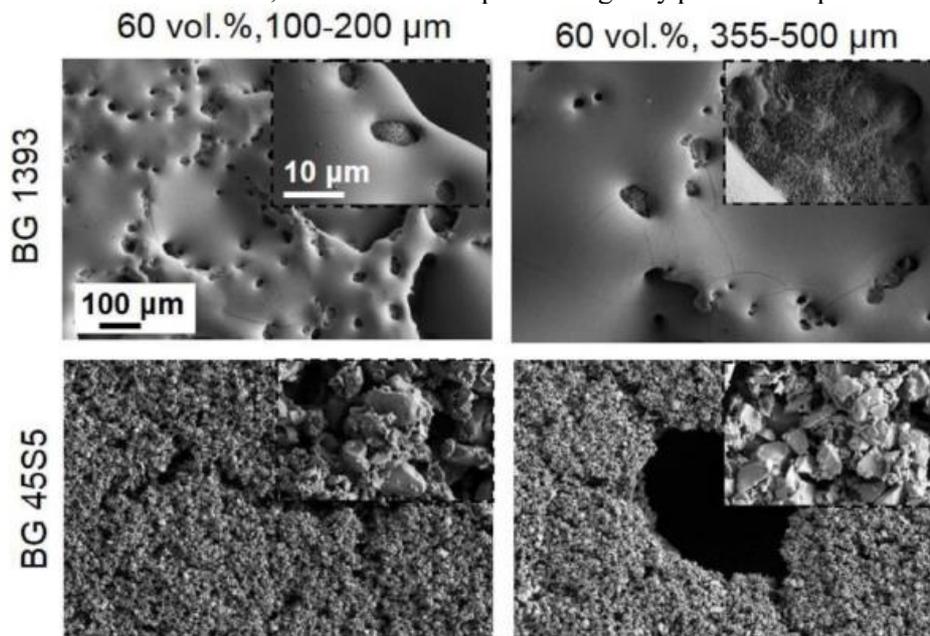


Figura 68 Imagen SEM de los recubrimientos monocapa [80]

Se obtuvieron imágenes SEM de la sección transversal de los sustratos recubiertos para valorar la penetración del vidrio bioactivo en el disco de titanio (figura 68), mostrándose que el espesor en caso del recubrimiento de BG 1393 era menor al del de BG 45S5 debido a que el primero había penetrado con mayor facilidad en el sustrato poroso. Esta facilidad fue prácticamente similar en todos los sustratos independientemente del tamaño de poro. No ocurrió lo mismo para los recubrimientos de BG 45S5, que presentaban una mejor integración en

poros de mayor tamaño.

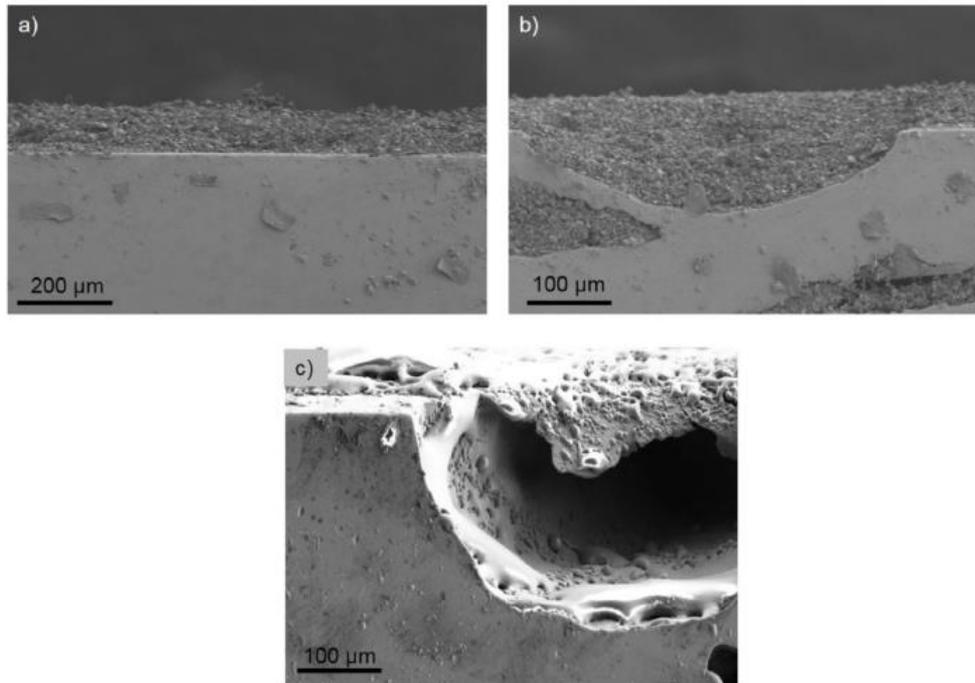


Figura 69 Secciones transversales de los recubrimientos (a y b BG 45S5; c de BG 1393)[80]

Estudio de las propiedades micromecánicas de los recubrimientos monocapa

De la realización de un ensayo Vickers a las distintas probetas recubiertas, se obtuvieron las curvas de carga y descarga mostradas en la figura 69 (a) en el caso de BG 1393 y b) en el caso de BG45S5) con una precarga de 0.1 N y carga máxima de 1N.

Se empleó el método de Oliver y Pharr para la medición del módulo de Young (E) y la microdureza (H).

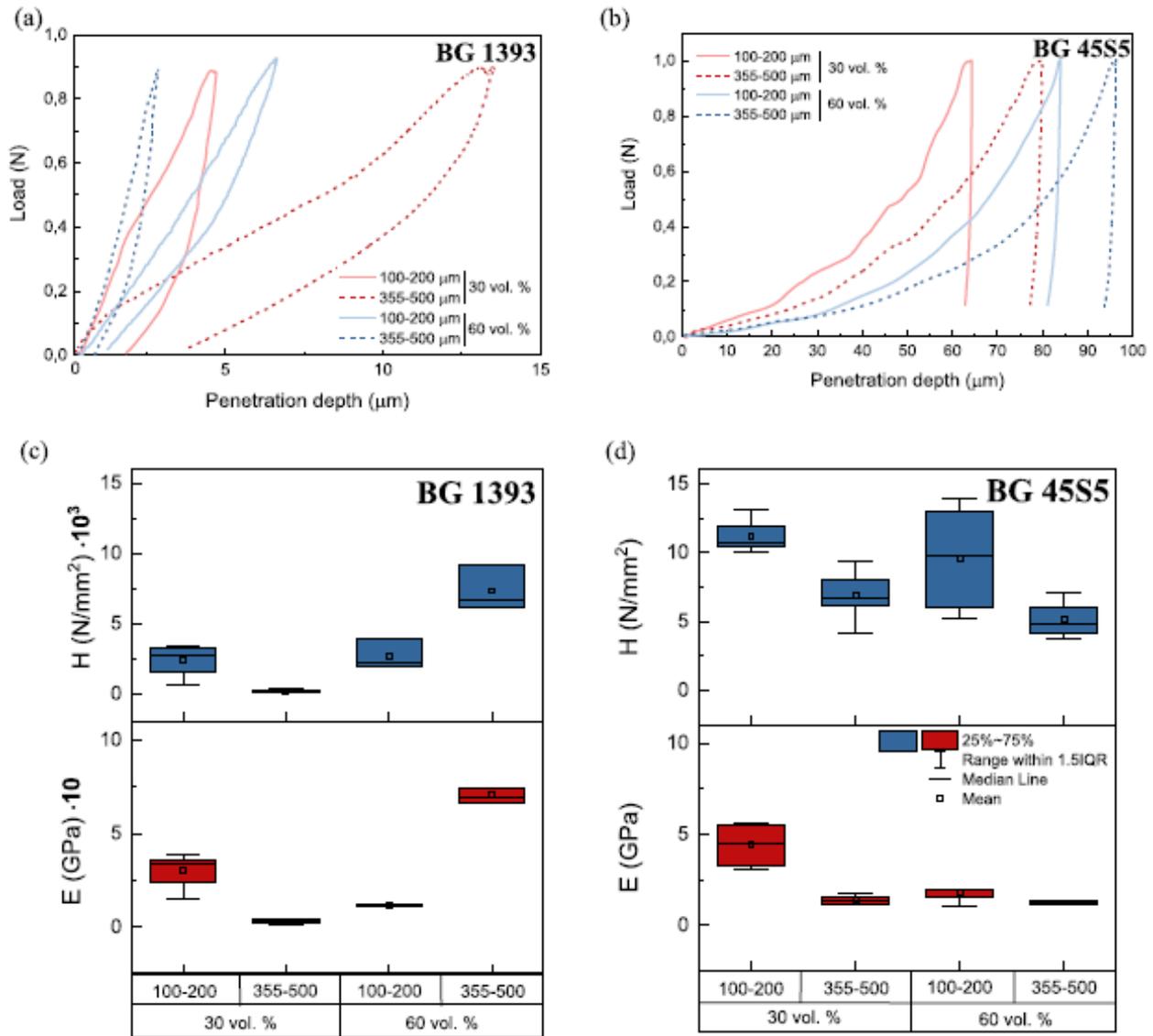


Figura 70 Propiedades micromecánicas de los sustratos con recubrimiento de bioglass: (a,b) curvas P-h; (c,d) microdureza y E [80]

La profundidad de penetración es mayor en los sustratos recubiertos con BG45S5 (más blando) y menor en aquellos recubiertos con BG1393 (más duro), independientemente del porcentaje de porosidad y tamaño de poro, si bien es verdad que la mayor penetración se consigue para sustratos con porosidad al 60% y tamaño de poro 355-500  $\mu\text{m}$  recubiertos de BG45S5

A modo comparativo, la imagen 70 muestra los resultados obtenidos tras la realización de dichos ensayos a sustratos de titanio no recubiertos.

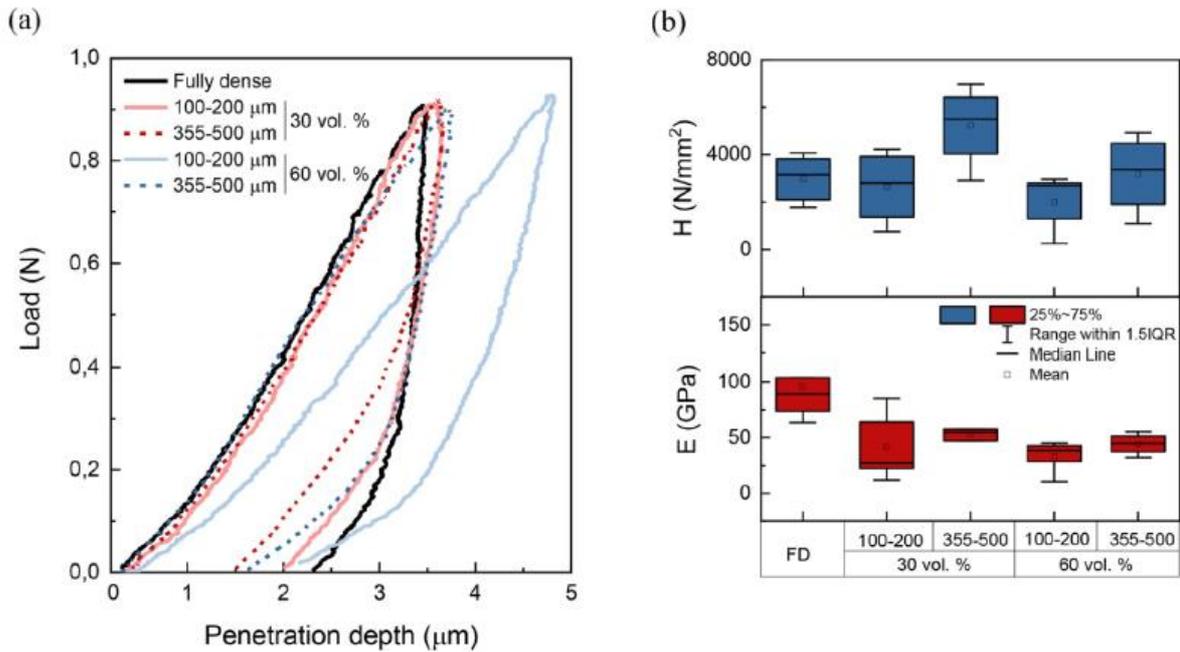


Figura 71 Propiedades micromecánicas de los sustratos vírgenes: (a) curva P-h; (b) microdureza y E [80]

### 5.5.3 Análisis de imagen de los recubrimientos bicapa

Se analizó el recubrimiento bicapa de BG 45S5 y BG 1393 mediante técnicas de microscopía electrónica captando imágenes de la sección transversal del sustrato recubierto. La figura 71.a muestra la sección transversal de un sustrato con porcentaje de porosidad 30% (tamaño de poro 100-200 μ) en la que pueden apreciarse ambas capas de los distintos vidrios bioactivos una sobre otra. La imagen 71.b muestra la sección con microscopía láser confocal (CLM) [81].

En la figura 71.c se hace hincapié en la interfase entre ambos vidrios.

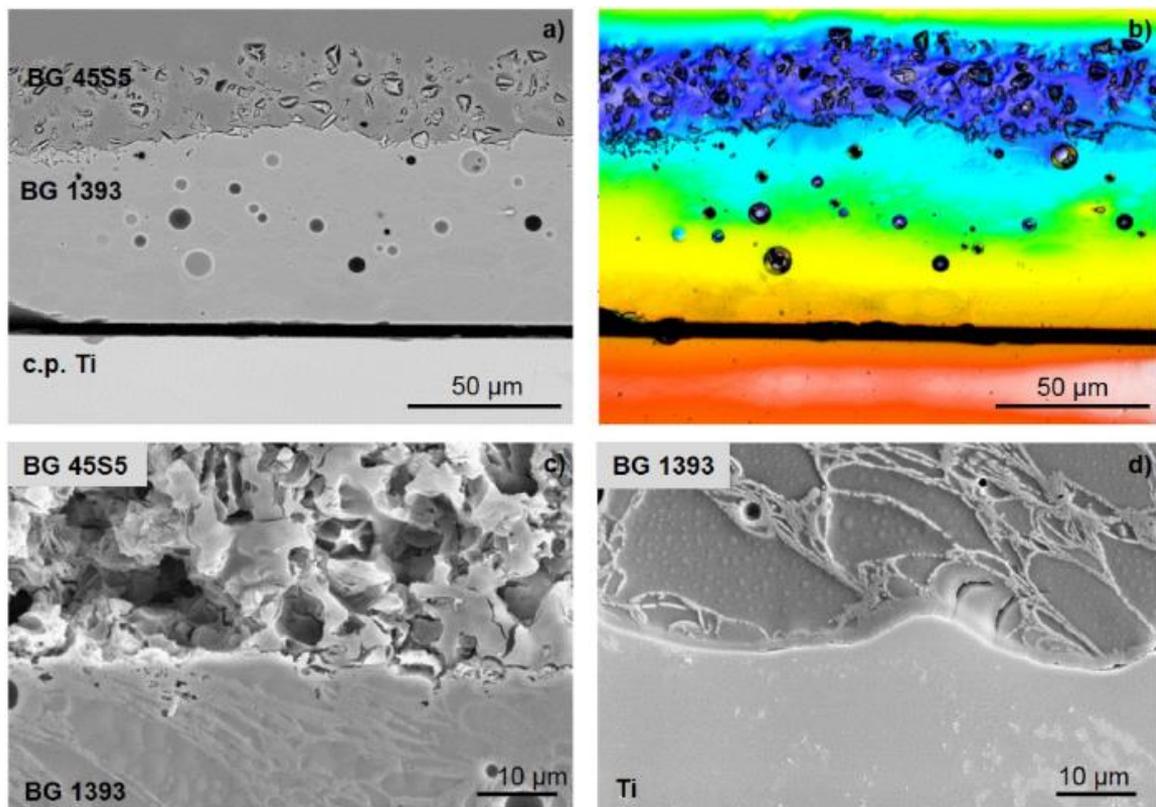


Figura 72 Imágenes SEM de la sección transversal del recubrimiento bicapa [81]

Empleando láser confocal, se consiguió obtener datos sobre los espesores de las capas de recubrimiento y algunos parámetros sobre la rugosidad de las mismas que aparecen reflejados en la tabla X

Tabla 12 Espesor de la capa y parámetros obtenidos con láser confocal [81]

	Recubrimiento de espesor ( $\mu$ metro)		Rugosidad ( $\mu$ metro)	
	30% /100 – 200 $\mu$ metro)	30% /100 – 200 $\mu$ metro)	<b>S<sub>a</sub></b>	<b>S<sub>q</sub></b>
BG 45S5	27,4 $\pm$ 8,2	28,4 $\pm$ 7,7	0,15	0,24
BG 1393	62,3 $\pm$ 3,6	33,2 $\pm$ 9,3	0,09	0,23
Sustrato de Ti	-	-	0,04	0,05

#### 5.5.4 Ensayo micromecánico

Se realizaron pruebas de micro-indentación tanto a los sustratos con recubrimiento de vidrio bioactivo como a los que presentaban rugosidad superficial por ataque químico.

En el caso de sustratos con recubrimiento de vidrio bioactivo, se ensayaron sustratos porosos con distinto porcentaje de porosidad (30% y 60%) para distintos rangos de tamaño de poro (100-200 y 355-500) recubiertos con BG tanto con una capa de vidrio bioactivo 1393, como con una capa de recubrimiento de vidrio bioactivo 45S5 así como bicapa (bilayer).

El ensayo de las distintas probetas fue realizado con los siguientes parámetros: tasa de carga aplicada de 1 N•min<sup>-1</sup>, carga máxima de 1 N y tiempo de retención de 10 s.

Los resultados obtenidos en las curvas p-h o curvas de carga y descarga muestran un comportamiento similar en los distintos sustratos.

Los valores de microdureza (inversa de la penetración) se encuentran en todo caso comprendidos entre los de los dos diferentes recubrimientos monocapa de bioglass.

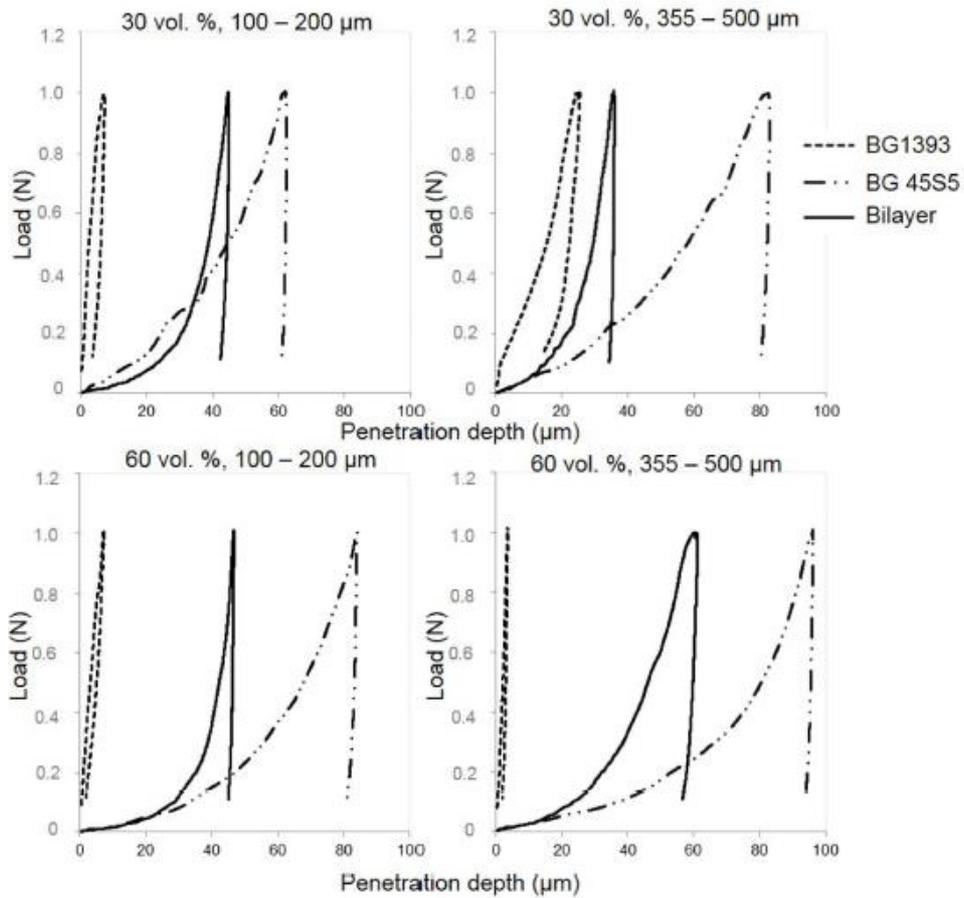


Figura 73 Curvas P-h obtenidas para distinto porcentaje de porosidad y de tamaño de poro en caso de recubrimiento monocapa o bicapa [81]

A modo de resumen, en la figura 73 podemos ver enfrentados los valores de penetración obtenidos en función del porcentaje de porosidad y tamaño de poro para los distintos recubrimientos.

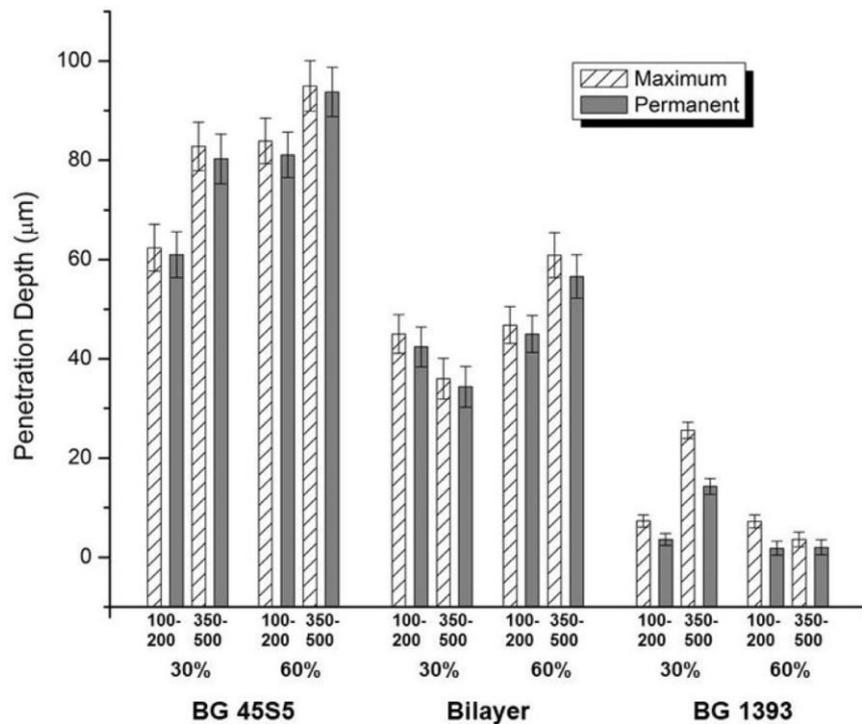


Figura 74 Gráfica comparativa de los valores de penetración [81]

Se observa también que, independientemente del porcentaje de porosidad del sustrato, en el caso de los recubrimientos bicapa, existe una relación inversa entre el tamaño de poro y la penetración en el recubrimiento.

### 5.5.5 Ensayos de bioactividad sobre la capa de BG 45S5

Para analizar la bioactividad del biovidrio 45S5 que sería la capa externa del recubrimiento bicapa, se ha realizado un estudio RMN  $^{29}\text{Si}$  MAS que concluyó mostrando la elevada bioactividad del mismo.

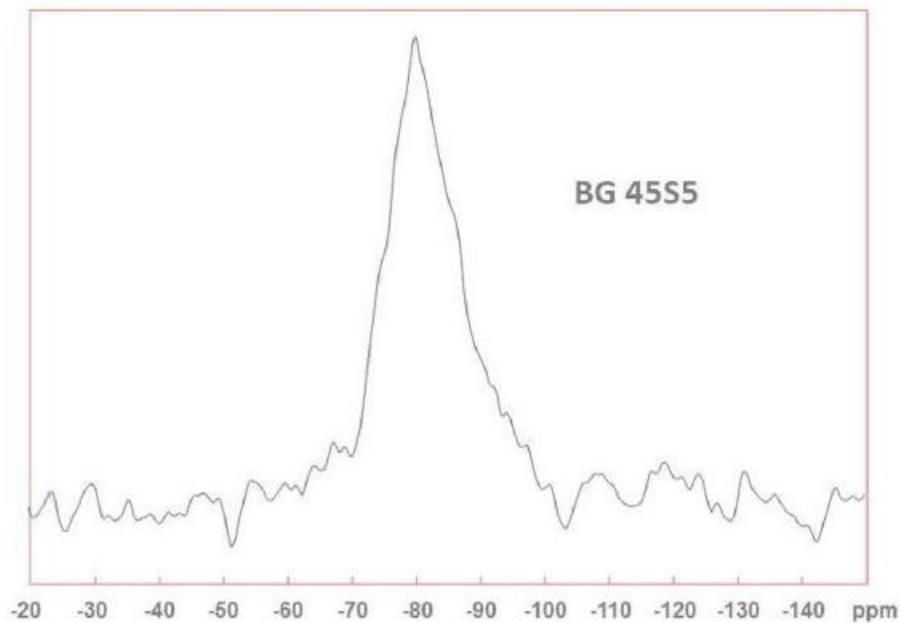


Figura 75 Espectro  $^{29}\text{Si}$  MAS NMR para el BG 45S5 [81]

# 6 CONCLUSIONES

---

De los resultados obtenidos durante la realización de este trabajo de Fin de Grado se han obtenido las siguientes conclusiones distinguiendo entre sustratos porosos y sustratos sometidos a diferentes técnicas de modificación superficial:

## 6.1 Sustratos no tratados:

- Mediante la técnica de espaciadores, es posible fabricar con éxito un sustrato poroso de Ti escogiendo el porcentaje de porosidad, así como el tamaño de poro (mediante el tamaño de espaciador empleado) deseado.
- Los sustratos porosos de menor tamaño de poro presentaron una mejor combinación de propiedades mecánicas.
- El crecimiento de las células óseas parece presentar un mejor comportamiento ante porosidad de mayor tamaño.

## 6.2 Sustratos modificados con ataque químico:

- El tratamiento de modificación superficial por ataque químico provocó un descenso en las propiedades mecánicas de los sustratos, asemejándolas a los valores que presenta el hueso cortical.
- La biocompatibilidad celular se vio más favorecida en el caso de sustratos tratados a 125s.
- Se mostró una mejora en el proceso de diferenciación celular, en especial en aquellos sustratos sometidos a ataque químico de 625 s (diferenciación de osteoblastos).
- No se pudo analizar de forma suficiente la osteointegración en las muestras al estar los ensayos “in vitro” limitados.

## 6.3 Sustratos recubiertos con vidrios bioactivos:

- Los estudios realizados a los recubrimientos monocapa de BG 1393 y BG 45S5, indican que la bioactividad es mayor en el caso de recubrimientos de BG 45S5.
- Los recubrimientos de BG 1393 presentan mayor valor de microdureza.
- El mayor tamaño de poro y la porosidad interconectada favorece la infiltración del recubrimiento en el sustrato.
- El recubrimiento de BG 1393 presenta una morfología plana y homogénea frente a la morfología coralina del recubrimiento de BG 45S5
- En el caso de recubrimiento bicapa, los parámetros de porosidad y rugosidad influyen notablemente en la adhesión y homogeneidad del recubrimiento.
- Los valores de microdureza y de recuperación elástica obtenidos para el caso de la bicapa de vidrios activos, están contenidos entre los obtenidos para el caso de monocapa de BG 1393 y el de monocapa de BG 45S5.
- Los sustratos con porosidad al 30% y rango del tamaño de poros 355-500  $\mu\text{m}$  recubiertos con bicapa de vidrios bioactivos, presentaron la mejor combinación de propiedades de biofuncionalidad y de propiedades mecánicas.

## 6.4 Substratos recubiertos con grafeno:

- Sustratos de aleación  $Ti_{35}Nb_{29}Ta_xMn$  pre-recubrimiento:
  - De entre las probetas porosas fabricadas con la aleación de titanio  $Ti_{35}Nb_{29}Ta_xMn$  ( $x:2, 4, 6wt\%$ ) con distintos tamaños de poro, las que presentaban Mn al 4% en peso ayudaban a favorecer la presencia de la fase de titanio  $\beta$ . Así pues, presentan, dependiendo del tamaño de poros, un módulo de Young de valor similar al del hueso trabecular.
  - Los resultados de los ensayos de citotoxicidad no mostraron dicha propiedad en los recubrimientos.
- Sustratos de aleación  $Ti_{35}Nb_{29}Ta_xMn$  recubiertos:
  - El recubrimiento de grafeno por CVD mostró una mejora en la biocompatibilidad del sustrato.
  - También se vieron favorecidos el crecimiento celular y la adhesión celular a los poros del sustrato.

## 6.5 Substratos recubiertos con nanopartículas de plata:

- La deposición del recubrimiento tiene mejores resultados en sustratos con tamaño de poro grande
- Con respecto a las dos rutas de obtención de nanopartículas de plata, las obtenidas de  $NaBH_4$  se comportan mejor en términos biológicos debido al tamaño de las partículas.
- El proceso de silinización se mostró favorable ya que reduce la toxicidad de las nanopartículas de plata en comparación con otras rutas alternativas.
- Los estudios de cultivo de *Staphylococcus aureus* mostraron que el recubrimiento realizado aportaba propiedades antibacterianas al sustrato. Este comportamiento antibacteriano es más notable en sustratos de mayor tamaño de poro.

# 7 TRABAJOS FUTUROS

---

A fin de continuar con la línea de investigación que sigue el presente trabajo de Fin de Grado se proponen los siguientes puntos para investigaciones en trabajos futuros:

- Evaluación in vivo con modelos animales de los efectos de la técnica de modificación superficial por ataque químico a fin de evaluar la osteointegración.
- Estudio en estructural de alta resolución de los recubrimientos de grafeno con la finalidad de analizar en profundidad la influencia de la morfología superficial a nivel nanométrico en el crecimiento de la población celular.
- Evaluación de la influencia de la energía superficial en las actividades celulares (proliferación, adhesión, crecimiento, diferenciación) en el caso de sustratos recubiertos con grafeno.
- Evaluación de la influencia de los fenómenos electrostáticos en las actividades celulares (proliferación, adhesión, crecimiento, diferenciación) en el caso de sustratos recubiertos con grafeno.



## 8 REFERENCIAS

- [1] Organización Mundial de la Salud, *Informe mundial sobre el envejecimiento y la salud*. Organización Mundial de la Salud, 2015.
- [2] Instituto Geográfico Nacional de España and Freepik, “Cifras de Población. Proyecciones de población INE-España.” [Online]. Available: [https://www.ine.es/infografias/infografia\\_dia\\_poblacion.pdf](https://www.ine.es/infografias/infografia_dia_poblacion.pdf)
- [3] Instituto Nacional de Estadística, “Cifras de Población (CP) a 1 de enero de 2021 Estadística de Migraciones (EM). Año 2020 Datos provisionales.” 2021.
- [4] J. I. Conde-Ruiz and C. I. González, “El proceso de envejecimiento en España.”
- [5] L. Bordons Carriazo, “Implementación de Modelos de Remodelación Ósea Basados en Poblaciones Celulares en un Código de Elementos Finitos”.
- [6] E. Quesada Ortega, “Simulación por Elementos Finitos de la remodelación ósea en el fémur humano. Influencia de la discretización temporal del ciclo de marcha.”
- [7] P. Manchado Morales, “Implementación en elementos finitos de modelos de remodelación ósea locales y no locales con activación discreta de BMUs.”
- [8] “Los huesos: Configuración interna.”
- [9] C. Rodríguez Sol, “Implementación, fabricación y caracterización de cilindros con porosidad alargada de Ti c.p, mediante técnicas de Freeze-Casting.”
- [10] M. I. Luque Sendra, “Estudio de la morfología del cuerpo vertebral en una L4 humana con modelos de remodelación ósea interna y externa.”
- [11] “Esquema de una sección de un hueso largo, en concreto la diáfisis, donde se muestra la organización y localización del hueso compacto y del esponjoso.” [Online]. Available: [https://mmegias.webs.uvigo.es/guiada\\_a\\_oseo.php](https://mmegias.webs.uvigo.es/guiada_a_oseo.php)
- [12] P. Pérez Bazán, “El problema del Checkerboard en simulaciones de remodelación ósea mediante Elementos Finitos.”
- [13] A. Iborra, M. Montañés, and L. Lacalle, “Células de la matriz ósea.” [Online]. Available: <http://atlas.gechem.org/es/component/k2/item/9-osteoclasto>
- [14] “Osteoblastos.” [Online]. Available: <https://definicionyque.es/osteoblastos/>
- [15] C. Bozal, “Maestría en Osteología y Metabolismo mineral.”
- [16] J. M. Delaissé, W. Korper, D. C. Jansen, W. Tigchelaar-Gutter, P. Saftig, and W. Beertsen, “The bone lining cell: Its role in cleaning howship’s lacunae and initiating bone formation”. [Online]. Available: <https://asbmr.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1359/jbmr.2002.17.1.77>
- [17] “Código-Hammurabi”.
- [18] E. Marin, F. Boschetto, and G. Pezzotti, “Biomaterials and biocompatibility: An historical overview,” *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, vol. 108, no. 8. John Wiley and Sons Inc., pp. 1617–1633, Aug. 01, 2020. doi: 10.1002/jbm.a.36930.
- [19] Museo Arqueológico Nacional de Nápoles, “Arte romano: conjunto de instrumentos quirúrgicos de la Casa del Cirujano de Pompeya. Siglo I a.C.” [Online]. Available: <https://www.meisterdrucke.es/>
- [20] H. F. Hildebrand, “Biomaterials - a history of 7000 years,” *BioNanoMaterials*, vol. 14, no. 3–4, pp. 119–133, 2013, doi: 10.1515/bnm-2013-0014.
- [21] J. Park and R. S. Lakes, “Biomaterials: An introduction: Third edition. 2007.”
- [22] A. R. de Revisión Rodas-Rivera, R. Rodas Rivera, R. N. Danny Rodas Rivera Jr José Urdanivia, U. Javier Prado, and S. Borja Lima, “Ene-Mar,” 2013.
- [23] B. D. Ratner and G. Zhang, “A History of Biomaterials.”

- [24] C. Cber, "Use of International Standard ISO 10993-1, 'Biological evaluation of medical devices-Part 1: Evaluation and testing within a risk management process' Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff Preface Public Comment." [Online]. Available: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/guidance-compliance-regulatory-information->
- [25] J. Pino Mínguez and M. Gelabert Gonzalez, "Biomateriales en cirugía ortopédica y traumatología."
- [26] P. Trueba Muñoz, "Diseño, fabricación y caracterización de compactos de titanio con porosidad gradiente para aplicaciones biomédicas."
- [27] H. Reyes-Blas, I. Olivas-Armendáriz, S. A. Martel-Estrada, and L. E. Valencia-Gómez, "Use of functionalized biomaterials with bioactive molecules in biomedical engineering," *Revista Mexicana de Ingeniería Biomedica*, vol. 40, no. 3, Sep. 2019, doi: 10.17488/RMIB.40.3.9.
- [28] B. Pérez Rojo, "Biomateriales: aplicación a cirugía ortopédica y traumatología."
- [29] F. Gil, M. Ginebra, and J. Planell, "Metales y aleaciones para la sustitución de tejidos duros."
- [30] T. Narushima, K. Ueda, and Alfirano, "Co-Cr Alloys as Effective Metallic Biomaterials," 2015, pp. 157–178. doi: 10.1007/978-3-662-46836-4\_7.
- [31] P. Trueba Muñoz, "Desarrollo de titanio con porosidad gradiente radial y longitudinal para aplicaciones biomédicas".
- [32] F. López Martín de Blas, "Estudio de la osteointegración y posibles alteraciones provocadas por el empleo de implantes dentales en hueso inmaduro. Estudio experimental en mini pigs."
- [33] E. Lalana Herraiz, "Estudio de aleaciones de titanio pluvimetálicas con adición de Fe y Cr."
- [34] M. Carboneras Chamorro *et al.*, "Materiales metálicos biodegradables en el campo biomédico," 2011.
- [35] C. Romero Villarreal, "Efecto del tamaño de poro en el comportamiento biomecánico y biofuncional de implantes de titanio."
- [36] D. M. Robertson, L. S. Pierre, and R. Chahal, "Preliminary Observations of Bone Ingrowth into Porous Materials," 1976.
- [37] H. K. Uthhoff and M. Finnegan, "The effects of metal plates on post-traumatic remodelling and bone mass," 1983.
- [38] M. Giner *et al.*, "Biocompatibility and osseointegration study of new prosthetic materials," *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, vol. 12, no. 3, pp. 92–97, Jul. 2020, doi: 10.4321/S1889-836X2020000300004.
- [39] A. Sas, P. Pellikaan, S. Kolk, P. Marty, T. Scheerlinck, and G. Harry Van Lenthe, "Effect of Anatomical Variability on Stress-Shielding Induced by Short Calcar-Guided Stems: Automated Finite Element Analysis of 90 Femora," *J Orthop Res*, vol. 37, pp. 681–688, 2019, doi: 10.1002/jor.24240.
- [40] M. L. Raffa, V.-H. Nguyen, P. Hernigou, C.-H. Flouzat-Lachaniette, and G. Haiat, "Stress shielding at the bone-implant interface: influence of surface roughness and of the bone-implant contact ratio."
- [41] W. Bonfield, A. Tully, J. Bowman, and J. Abram, "Hydroxyapatite reinforced polyethylene-a mechanically compatible implant material for bone replacement."
- [42] J. Xiong, Y. Li, X. Wang, P. Hodgson, and C. Wen, "Mechanical properties and bioactive surface modification via alkali-heat treatment of a porous Ti-18Nb-4Sn alloy for biomedical applications," *Acta Biomaterialia*, vol. 4, no. 6, pp. 1963–1968, Nov. 2008, doi: 10.1016/j.actbio.2008.04.022.
- [43] Y. Torres, S. Lascano, J. Bris, J. Pavón, and J. A. Rodríguez, "Development of porous titanium for biomedical applications: A comparison between loose sintering and space-holder techniques," *Materials Science and Engineering C*, vol. 37, no. 1, pp. 148–155, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.msec.2013.11.036.
- [44] Y. Torres, J. J. Pavón, I. Nieto, and J. A. Rodríguez, "Conventional powder metallurgy process and characterization of porous titanium for biomedical applications," *Metallurgical and Materials Transactions B: Process Metallurgy and Materials Processing Science*, vol. 42, no. 4, pp. 891–900, Aug. 2011, doi: 10.1007/s11663-011-9521-6.
- [45] W. Niu, C. Bai, G. B. Qiu, and Q. Wang, "Processing and properties of porous titanium using space holder technique," *Materials Science and Engineering A*, vol. 506, no. 1–2, pp. 148–151, Apr. 2009, doi:

- 10.1016/j.msea.2008.11.022.
- [46] J. M. Ayllón, C. Navarro, J. Vázquez, and J. Domínguez, “Fatiga en implantes dentales”.
- [47] C. Figueroa-Hernández, E. Pantaleón-Matamoros, S. Méndez-González, C. García-Fernández, R. Gómez-González, and J. Carvajal-de la Osa, “Analysis of the fatigue phenomenon on mono-component dentals implants”, [Online]. Available: <http://www.ingenieriamecanica.cujae.edu.cu>
- [48] Matos N *et al.*, “Influencia de la fatiga cíclica en las conexiones internas implante-pilar.”
- [49] C. Ivorra Server, “Estudio de predicción de vida a fatiga de implantes dentales de titanio y de sus principales tipos de conexiones implantoprotésicas,” 2017.
- [50] C. Aparicio Magallón, “El implante dental y la Osteointegración.”
- [51] Y. González Beriau, E. Enrique Castillo Betancourt, and B. Mesa Reinaldo, “Osseointegration of Immediate Transalveolar Implants.”
- [52] E. Núñez Márquez, “Influencia de la rugosidad y el estrés residual sobre la fatiga de los implantes dentales con superficie arenada,” 2017.
- [53] I. García Ortiz, “La influencia de la superficie de los implantes en la oseointegración. Un estudio histomorfométrico en animales.,” 2011.
- [54] Katleen Bragança, Monsalve Guil, Jiménez Guerra, España López, Ortiz García, and Velasco Ortega, “The biology of osseointegration in postextraction implants.”
- [55] P. Blanco López, L. Monsalve Guil, N. Matos Garrido, J. Moreno Muñoz, E. Nuñez Márquez, and E. Velasco Ortega, “Osseointegration of titanium implant with several rough surfaces.”
- [56] E. Sarabia Lugo, “Estudio de la influencia de los parámetros del proceso de sandblast sobre acabado superficial de placas metálicas de acero AISI 1018. Caso de estudio: construcciones industriales tapia.”
- [57] A. Piattelli, C. Misch, E. Pontes, G. Iezzi, A. Scarano, and M. Degidi, *Contemporary Implant Dentistry*.
- [58] A. Piattelli, L. Manzon, A. Scarano, M. Paolantonio, and M. Piattelli, “Histologic and Histomorphometric Analysis of the Bone Response to Machined and Sandblasted Titanium Implants: An Experimental Study in Rabbits,” 2000.
- [59] A. Wennerberg, C. Hallgren, C. Johansson, and S. Darelli, “A histomorphometric evaluation of screwshaped implants each prepared with two surface roughnesses”.
- [60] E. Velasco *et al.*, “La investigación experimental y la experiencia clínica de las superficies de los implantes dentales (I),” 2009.
- [61] J. Zhou *et al.*, “Roughening the white OLED substrate’s surface through sandblasting to improve the external quantum efficiency,” *Organic Electronics*, vol. 12, no. 4, pp. 648–653, 2011, doi: 10.1016/j.orgel.2011.01.018.
- [62] E. Espinar Escalona, “Mejora de la fijación del bracket al diente mediante la optimización de la rugosidad de la superficie de contacto del metal al diente,” 2005.
- [63] D. Rodríguez, P. Sevilla, and F. J. Gil, “Anodización del titanio para la mejora ante la degradación química de material quirúrgico,” Sep. 01, 2010. <https://gacetadental.com/2010/09/anodizacion-del-titanio-para-la-mejora-ante-la-degradacion-quimica-de-material-quirurgico-28092/> (accessed Aug. 21, 2021).
- [64] J. Lario-Femenía, A. Amigó-Mata, Á. Vicente-Escuder, F. Segovia-López, and V. Amigó-Borrás, “Desarrollo de las aleaciones de titanio y tratamientos superficiales para incrementar la vida útil de los implantes,” *Revista de Metalurgia*, vol. 52, no. 4, p. 084, Dec. 2016, doi: 10.3989/revmetalm.084.
- [65] A. K. Sharma, “Anodizing titanium for space applications,” *Thin Solid Films*, vol. 208, no. 1, pp. 48–54, Feb. 1992, doi: 10.1016/0040-6090(92)90946-9.
- [66] K. Lizano-Borrero, “Evaluación de titanio anodizado para su uso en sistemas de protección catódica por corriente impresa.”
- [67] J. Ignacio and A. Torres, “Texturización Superficial de Aleaciones Metálicas mediante Láser Tesis

- doctoral.”
- [68] N. Umbón Espiñeira, “Texturizado de biomateriales con láser de femtosegundo de alta frecuencia para mejorar la adhesión celular,” 2017.
- [69] J. R. Rosell and I. R. Cantalapiedra, “Método simple para determinar el módulo de Young dinámico a partir de una excitación por impacto aplicado a morteros de cal y cemento,” *Materiales de Construcción*, vol. 61, no. 301, pp. 39–48, 2011, doi: 10.3989/mc.2010.53509.
- [70] J. J. Guzmán Pérez, “Evaluación de la mejora de la oseointegración y la adherencia de recubrimientos de hidroxiapatita sobre implantes de titanio poroso,” 2018.
- [71] A. Infante Petidier, “Implementación de la técnica sol-gel para recubrir con hidroxiapatita discos de titanio poroso para aplicaciones biomédicas.”
- [72] S. P. Álvarez Escobar, “Recubrimientos vítreos silíceos con partículas bioactivas de wollastonita y nanotubos de carbono obtenidos por la técnica sol-gel y depositados sobre acero inoxidable 316L,” 2017.
- [73] E. E. Camacho Guillen, “Simulación computacional 3D mediante el método de elementos finitos para recubrimiento superficial con grafeno a implantes dentales de Titanio.”
- [74] L. Grinschpun, C. Oldani, M. Schneiter, M. Valdemarin, and J. Pereyra, “Obtención de compuesto de titanio con gradiente de porosidad mediante técnica pulvimetalúrgica,” *Revista Materia*, vol. 23, no. 2, 2018, doi: 10.1590/s1517-707620180002.0421.
- [75] S. M. Castillo Rivero, “Evaluación de la influencia de la presión de compactación y la temperatura de sinterización en las propiedades mecánicas del Titanio poroso para aplicaciones biomédicas.”
- [76] A. Formoso *et al.*, “Estudio de la granulación de la mezcla de minerales de hierro en el proceso de sinterización. I parte.” [Online]. Available: <http://revistademetalurgia.revistas.csic.es>
- [77] A. Civantos *et al.*, “Designing bioactive porous titanium interfaces to balance mechanical properties and in vitro cells behavior towards increased osseointegration,” *Surface and Coatings Technology*, vol. 368, pp. 162–174, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.surfcoat.2019.03.001.
- [78] S. Lascano *et al.*, “Graphene-coated Ti-Nb-Ta-Mn foams: A promising approach towards a suitable biomaterial for bone replacement,” *Surface and Coatings Technology*, vol. 401, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.surfcoat.2020.126250.
- [79] J. Gaviria *et al.*, “Synthesis and deposition of silver nanoparticles on porous titanium substrates for biomedical applications,” *Surface and Coatings Technology*, vol. 406, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.surfcoat.2020.126667.
- [80] R. Moriche, A. M. Beltrán, B. Begines, J. A. Rodríguez-Ortiz, A. Alcudia, and Y. Torres, “Influence of the porosity and type of bioglass on the micro-mechanical and bioactive behavior of coated porous titanium substrates,” *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 551, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.jnoncrysol.2020.120436.
- [81] A. M. Beltrán, A. Alcudia, B. Begines, J. A. Rodríguez-Ortiz, and Y. Torres, “Porous titanium substrates coated with a bilayer of bioactive glasses,” *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 544, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.jnoncrysol.2020.120206.



