



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIEROS
INDUSTRIALES VALENCIA

TRABAJO FINAL DE GRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

**EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE
BACTERIAS SOBRE SUPERFICIES DE
TITANIO CON DIFERENTES TRATAMIENTOS
SUPERFICIALES**

Autora: Isabel Baviera Casañ

Tutor: Vicente Amigó Borrás

Tutora externa: María Ángeles Tormo Mas

Curso académico: 2019 – 2020

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres todo el esfuerzo económico que han realizado durante toda mi vida para que pudiese llegar a donde estoy ahora. Gracias, mamá, papá y tete por haberme apoyado, soportado y animado durante estos cinco años a seguir adelante y por darme fuerzas cuando más lo necesitaba.

También quería dar las gracias a Jessi, María, Lucía y Paula por toda la ayuda, risas, cariño y amistad durante esta etapa. Espero que lo que ha unido la UPV no acabe nunca.

Por último, muchísimas gracias a mi tutor de TFG, Vicente, por haber estado siempre disponible a pesar de los cambios e incertidumbre debido al momento en el que hemos tenido que realizar este trabajo, por la paciencia, por el tiempo invertido y por todos los conocimientos que me ha enseñado.

RESUMEN

Palabras clave: Tratamiento superficial, aleación, ataque ácido, anodizado, nanotubos, bacterias, biofilm, microscopía electrónica, rugosidad y perfilometría.

Existe un gran interés en el estudio del crecimiento celular y patológico sobre implantes protésicos, debido a que un porcentaje de los usuarios intervenidos deben volver a pasar por quirófano por una infección, teniendo en muchas ocasiones que reemplazar la prótesis, y suponiendo así un sobre coste económico.

Este estudio sobre el desarrollo del biofilm en superficies protésicas no ha podido llevarse a cabo en el ámbito experimental, debido a la crisis del COVID-19 que provocó el Estado de Alarma desde marzo hasta junio de 2020. Este hecho provocó el cierre de los laboratorios y aulas en el que los alumnos deberíamos haber realizado la experimentación de este trabajo. Así pues, el proyecto queda planteado únicamente desde el ámbito bibliográfico, donde se detallarán punto por punto las pautas para abordar la problemática y la caracterización de los biofilms de manera experimental.

La modificación de las probetas de Ti6Al4V mediante tratamientos superficiales resulta de especial interés, pues modificando la topografía se puede facilitar la adhesión y crecimiento celular, aspecto importante para evitar el rechazo protésico. Así pues, en el proyecto se explica punto a punto cómo se aplicarán los tratamientos de ataque ácido, anodizado, ataque ácido con anodizado y nanotubos, para evaluar cuál es el tratamiento que favorece el desarrollo de microorganismos. Una vez aplicados estos tratamientos sobre las probetas, se estudiará su topografía por medio de microscopía electrónica (FESEM, HRFESEM y AFM) y perfilometría óptica. A continuación, se procederá a la extracción y cultivo de dos bacterias *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, para estudiar la formación de biofilm sobre las muestras, ya que son las bacterias habituales en provocar la infección al ponerse en contacto con estas superficies. Una vez cultivadas, se sembrarán sobre cada una de las muestras tratadas se analizará el crecimiento y desarrollo del biofilm sobre las diferentes superficies por medio de microscopía confocal y CryoFESEM.

Finalmente, el planteamiento del presupuesto cumple con los requisitos para poder llevarse a cabo en el trabajo experimental y posterior análisis en un futuro próximo, y así obtener así los resultados previsibles.

RESUM

Paraules clau: Tractament superficial, aleació, atac àcid, anoditzat, nanotubs, bacteris, biofilm, microscòpia electrònica, rugositat i perfilometria.

Hi ha un gran interès en l'estudi del creixement cel·lular i patològic sobre implantacions protètiques, pel fet que un percentatge dels usuaris intervinguts han de tornar a passar per quiròfan per una infecció, tenint moltes vegades que reemplaçar la pròtesi, i suposant així un sobrecost econòmic.

Este estudi sobre el desenrotllament del biofilm en superfícies protètiques no ha pogut dur-se a terme en l'àmbit experimental, a causa de la crisi del COVID-19 que va provocar l'Estat d'Alarma des de març fins a juny de 2020. Este fet va provocar el tancament dels laboratoris i aules en què els alumnes hauríem d'haver realitzat l'experimentació d'este treball. Així, doncs, el projecte queda plantejat únicament des de l'àmbit bibliogràfic, on es detallaran fil per randa les pautes per a abordar la problemàtica i la caracterització dels biofilms de manera experimental.

La modificació de les provetes de Ti6Al4V per mitjà de tractaments superficials resulta d'especial interès, perquè modificant la topografia es pot facilitar l'adhesió i creixement cel·lular, aspecte important per a evitar el rebuig protètic. Així, doncs, en el projecte s'explica punt a punt com s'aplicaran els tractaments d'atac àcid, anoditzat, atac àcid amb anoditzat i nanotubs, per a avaluar quin és el tractament que afavorix el desenrotllament de microorganismes. Una vegada aplicats estos tractaments sobre les provetes, s'estudiarà la seua topografia per mitjà de microscòpia electrònica (FESEM, HRFEM i AFM) i perfilometria òptica. A continuació, es procedirà a l'extracció i cultiu de dos bacteris, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*, per a estudiar la formació de biofilm en les mostres, ja que són els bacteris habituals a provocar la infecció al posar-se en contacte amb estes superfícies. Una vegada cultivades, se sembraran sobre cada una de les mostres tractades s'analitzarà el creixement i desenrotllament del biofilm sobre les diferents superfícies per mitjà de microscòpia confocal i CryoFESEM.

Finalment, el plantejament del pressupost complix amb els requisits per a poder dur-se a terme en el treball experimental i posterior anàlisi en un futur pròxim, i obtindre així els resultats previsibles.

ABSTRACT

Key words: Surface treatment, alloying, acid attack, anodizing, nanotubes, bacteria, biofilm, electron microscopy, roughness and profiling.

There is a great interest in the study of cellular and pathological growth on prosthetic implants, because a percentage of the operated users have to go through surgery again due to an infection, having to replace the prosthesis in many occasions, and this is an economic over cost.

This study on the development of biofilm on prosthetic surfaces could not be carried out in the experimental field, due to the COVID-19 crisis that caused the State of Alert from March to June 2020. This fact caused the closure of the laboratories and classrooms where the students should have carried out the experimentation of this work. Therefore, the project is proposed only from the bibliographic area, where the guidelines to address the problem and the characterization of biofilms in an experimental way will be detailed point by point.

The modification of the specimens by means of surface treatments is of special interest, since modifying the topography can facilitate the adhesion and cell growth, an important aspect to avoid prosthetic rejection. Therefore, the project explains point by point how the treatments of acid attack, anodizing, acid attack with anodizing and nanotubes will be applied, in order to evaluate which is the treatment that favors the development of microorganisms. Once these treatments have been applied to the test tubes, their topography will be studied by means of electronic microscopy (FESEM, HRFEM and AFM) and optical profiling. Then, two bacteria will be extracted and cultured, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, since they are the usual bacteria that cause infection when they come into contact with these surfaces. Once cultivated, they will be sown on each of the treated samples. The growth and development of the biofilm on the different surfaces will be analyzed by confocal microscopy and CryoFESEM.

Finally, the budget approach meets the requirements to be able to carry out the experimental work and subsequent analysis in the near future, and thus obtain the expected results.

I. MEMORIA

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	1
RESUMEN.....	3
RESUM.....	5
ABSTRACT.....	7
ÍNDICE.....	11
ÍNDICE DE TABLAS.....	13
ÍNDICE DE FIGURAS.....	15
1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1. MOTIVACIÓN.....	17
1.2. OBJETIVOS.....	18
2. ESTADO DEL ARTE.....	19
2.1. INTRODUCCIÓN DE LOS BIOMATERIALES EN MEDICINA.....	19
2.2. TITANIO: CARACTERÍSTICAS Y ALEACIONES.....	20
2.2.1. CARACTERÍSTICAS DEL TITANIO Y LA ALEACIÓN Ti6Al4V.....	20
2.2.2. PROPIEDADES DE LA ALEACIÓN Ti6Al4V.....	22
2.3. TRATAMIENTOS SUPERFICIALES DE LOS MATERIALES.....	27
2.3.1. MECANIZADO.....	29
2.3.2. PROYECCIÓN TÉRMICA.....	30
2.3.3. OXIDACIÓN ELECTROQUÍMICA.....	32
2.3.4. ARENADO.....	33
2.3.5. ATAQUE ÁCIDO.....	34
2.3.6. ANODIZADO.....	34
2.3.7. NANOTUBOS.....	35
2.4. TÉCNICAS Y MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL.....	36
2.5. BIOFILM.....	43
2.5.1. INTRODUCCIÓN.....	43
2.5.2. INFECCIÓN PROTÉSICA.....	43
2.5.3. COMPOSICIÓN Y ORGANIZACIÓN DEL BIOFILM.....	44
2.5.4. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO.....	47
2.5.5. TIPOS DE BACTERIAS.....	48
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
3.1. PLANIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	50
3.2. ELABORACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	51
3.3. TRATAMIENTOS SUPERFICIALES QUE APLICAR.....	53
3.3.1. ATAQUE ÁCIDO.....	53
3.3.2. ANODIZADO.....	54
3.3.3. ATAQUE ÁCIDO Y ANODIZADO.....	55
3.3.4. NANOTUBOS.....	56
3.4. CARACTERIZACIÓN METALOGRÁFICA DE LA SUPERFICIE.....	57
3.4.1. PERFILOMETRÍA.....	57
3.4.2. FESEM.....	58
3.4.3. HRFSEM.....	59
3.4.4. AFM.....	60
3.5. CULTIVO BACTERIANO.....	61
3.5.1. PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....	61
3.5.1. STAPHYLOCOCCUS AUREUS.....	61
3.5.2. DESARROLLO DEL BIOFILM.....	62
3.5.3. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LA SUPERFICIE.....	63
REFERENCIAS.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

	<i>Página</i>
Tabla 1. Composición en % de la aleación Ti6Al4V. Fuente: Tojal et. al. (2012). “ <i>Fabricación y caracterización de aleaciones porosas de Ti y Ti6Al4V producidas mediante sinterización con espaciador</i> ”.	22
Tabla 2. Características y composición de los biofilms. Fuente: Domenech, (2012). “ <i>Biofilmes de ‘Streptococcus pneumoniae’: genética, composición y terapia</i> ”.	44
Tabla 3. Composición de la aleación siguiendo la norma ASTM F-136. Fuente: Perlines, (2019). “ <i>Optimización mediante recubrimientos del comportamiento corrosivo y tribocorrosivo de la aleación Ti6Al4V para el uso de implantes dentales</i> ”.	51

ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Página/s</i>
Figura 1. Microestructura $\alpha + \beta$ de Ti6Al4V. Fuente: Rodney y Collings, (1993). “ <i>Material Properties Handbook: Titanium Alloys</i> ”.	23
Figura 2. Microestructura martensítica de Ti6Al4V. Fuente: Rodney y Collings, (1993). “ <i>Material Properties Handbook: Titanium Alloys</i> ”.	24
Figura 3. Microestructura laminar de Ti6Al4V. Fuente: Rodney y Collings, (1993). “ <i>Material Properties Handbook: Titanium Alloys</i> ”.	24
Figura 4. Microestructura bimodal de Ti6Al4V. Fuente: Rodney y Collings, (1993). “ <i>Material Properties Handbook: Titanium Alloys</i> ”.	25
Figura 5. Superficie de la aleación Ti6Al4V tras sufrir el tratamiento de mecanizado (x10). Fuente: Rodney y Collings, (1993). “ <i>Material Properties Handbook: Titanium Alloys</i> ”.	29
Figura 6. Métodos de proyección térmica. Fuente: Davis, (2004). “ <i>Handbook of Thermal Spray Technology</i> ”.	31
Figura 7. Superficie de la aleación Ti6Al4V tras sufrir el tratamiento de proyección térmica (x20). Fuente: Biomet, 2020.	31
Figura 8. Superficie de la aleación Ti6Al4V tras sufrir el tratamiento de arenado (x2000). Fuente: Rodney y Collings, (1993). “ <i>Material Properties Handbook: Titanium Alloys</i> ”.	33
Figura 9. Superficie de la aleación Ti6Al4V tras sufrir el tratamiento de ataque ácido (x2000). Fuente: Servicio de Microscopía Electrónica (UPV), (2020).	34
Figura 10. Colores característicos obtenidos después del anodizado del Ti. Fuente: Pérez, (2012). “ <i>Influencia de los tratamientos superficiales de ataque ácido y anodizado en el comportamiento a fatiga del Ti c.p. y el Ti6Al4V para implantes dentales</i> ”.	35
Figura 11. Superficie de la aleación Ti6Al4V tras sufrir el tratamiento de nanotubos. Fuente: Lario, J., Haro, M., Viera, M., Amigó, A., & Amigó, V. (2017). “ <i>Influencia de las condiciones de procesado pulvimetalúrgico en las propiedades mecánicas de las aleaciones Ti-35Nb-10Ta</i> ”.	35
Figura 12. Funcionamiento del SEM. Fuente: Almagro, J. F. (1999). “ <i>Nuevo microanálisis cuantitativo de metales empleando microscopía electrónica de barrido con dispersión de energías de rayos X</i> ”.	38
Figura 13. Emisiones tras la incidencia del haz primario en la muestra. Fuente: Pardell, X. (2020, 7 julio). “ <i>El microscopio electrónico de barrido SEM</i> ”.	39
Figura 14. Funcionamiento del AFM. Fuente: Reséndiz, M. C., & Castrellón, J. (2005). “ <i>Microscopio de Fuerza Atómica</i> ”.	41
Figura 15. Resumen para el desarrollo del biofilm. Fuente: Domenech, M. (2012). “ <i>Biofilmes de Streptococcus Pneumoniae: Genética, composición y terapia</i> ”.	46
Figura 16. Esquema para la planificación del proyecto. Fuente: Elaboración propia.	50
Figura 17. Representación perfilométrica bidimensional de una superficie recubierta por plasma spray. Fuente: Filmmetrics, (2020).	57
Figura 18. Representación perfilométrica tridimensional de una superficie recubierta por plasma spray. Fuente: Filmmetrics, (2020).	58
Figura 19. Representación de una superficie nanotubular por FESEM. Fuente: Lario, J., Haro, M., Viera, M., Amigó, A., & Amigó, V. (2017). “ <i>Influencia de las condiciones de procesado pulvimetalúrgico en las propiedades mecánicas de las aleaciones Ti-35Nb-10Ta</i> ”.	58
Figura 20. Representación de una superficie nanotubular por HRFESEM. Fuente: Amigó, A. (2017). “ <i>Influencia de las adiciones de Fe en las aleaciones de Ti-Nb-Ta obtenidas mediante tecnología de polvos, para aplicaciones biomédicas</i> ”.	59
Figura 21. Detalle de la inclinación de los nanotubos por HRFESEM. Fuente: Amigó, A. (2017). “ <i>Influencia de las adiciones de Fe en las aleaciones de Ti-Nb-Ta obtenidas mediante tecnología de polvos, para aplicaciones biomédicas</i> ”.	59
Figura 22. Imagen bidimensional de una superficie oxidada de titanio a 900 °C durante 20 minutos. Fuente: Amigó, A. (2017). “ <i>Influencia de las adiciones de Fe en las aleaciones de Ti-Nb-Ta obtenidas mediante tecnología de polvos, para aplicaciones biomédicas</i> ”.	60

- Figura 23. Representación tridimensional de una superficie oxidada de titanio. Fuente: Amigó, A. (2017). *“Influencia de las adiciones de Fe en las aleaciones de Ti-Nb-Ta obtenidas mediante tecnología de polvos, para aplicaciones biomédicas”*. 60
- Figura 24. Representación del desarrollo del biofilm de S. Aureus a las 6, 12, 24 y 48 h en una superficie por microscopía confocal. Fuente: Ibarra, C., Villar, M., Gaitán, L. A., Pozos, A., Mendoza, R., & Sánchez, L. O. (2012). *“Ensayo de formación y cuantificación de biopelículas mixtas de Candida albicans y Staphylococcus aureus”*. 65
- Figura 25. Representación en Crio-FESEM del desarrollo en cuatro días de la P. Aeruginosa por sobre una superficie metálica. Fuente: Alhede, M., Qvortrup, K., & Liebrechts, R. (2012). *“Combination of microscopic techniques reveals a comprehensive visual impression of biofilm structure and composition”*. 66

1. INTRODUCCIÓN

1.1. MOTIVACIÓN

Tanto el titanio como sus aleaciones se emplean para sustituir y reparar el tejido óseo, ya que posee unas características mecánicas específicas excelentes y una gran resistencia a la corrosión, debido a que en su superficie presenta una capa de óxido formada por rutilo (TiO_2). Gracias a estas características, se ha popularizado su uso en aplicaciones de ortopedia y traumatología con tal de sustituir uniones que hayan sufrido daños, como puede ser implantes de rodilla, cadera, hombro o codo entre otros.

Con tal de mejorar sus propiedades, se aplica a la superficie de los implantes tratamientos superficiales para mejorar la adhesión celular. Las casas comerciales apuntan al mecanizado, arenado y ataque ácido diverso (*Lario et. al., 2016*). También se tiene en cuenta el desarrollo de tratamientos de oxidación superficial basados en nanotubos (*Lario, 2019*) o mediante el proceso PEO (Plasma Electrolytic Oxidation) (*Dorado et. al., 2018*), con éstos es posible conseguir una capa de óxido estable en la superficie, mezclar las fases de TiO_2 , anatasa y rutilo. Ciertos autores, han analizado las consecuencias que tiene el uso de estos procedimientos sobre las superficies y el tejido biológico que se encuentre en contacto (*Pérez, 2012*). Estos análisis se realizan mediante ensayos in vitro sobre el crecimiento y la diferenciación celular, o bien, in vivo tras realizarse ensayos previos.

Así pues, la motivación del presente trabajo es estudiar cómo la modificación con diferentes técnicas de la superficie del metal puede afectar positiva o negativamente a la adhesión, diferenciación y desarrollo bacteriológico. Teniendo estos aspectos en cuenta, se tratará de determinar que procedimiento garantiza el éxito del implante.

1.2. OBJETIVOS

Una vez aplicado el tratamiento correspondiente sobre la superficie, el objetivo consiste en analizar el efecto que éste provoca sobre la aleación de Titanio, Ti6Al4V, en el desarrollo bacteriológico y en la fijación en las superficies. Así, para cumplir el objetivo principal, es necesario cumplir a su vez con los siguientes aspectos:

- Se estudiarán los tratamientos superficiales (ataque ácido, anodizado, ataque ácido con anodizado y nanotubos) con tal de seleccionar el más adecuado de acuerdo con las posibilidades existentes.
- Se estudiarán las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, que podrían desarrollarse sobre la superficie dando lugar a una infección en la zona de unión.
- Se analizará el efecto provocado por las bacterias en las superficies con diferentes tratamientos y el efecto que éstas producen sobre las bacterias.

Los siguientes objetivos han tenido que ser estudiados bibliográficamente debido a la crisis del Covid-19.

- Se tomarán modelos de bacterias para poder realizar los ensayos correspondientes según la disponibilidad de la Fundación La Fe.
- Plantear los métodos que se emplearán al analizar el efecto de las colonias de bacterias en las superficies tratadas.
- Se analizarán las consecuencias del desarrollo bacteriológico sobre las superficies de las aleaciones, como pueden ser picaduras, oxidación o corrosión entre otros efectos, valorando si así pudiese comprometer el éxito del implante.

2. ESTADO DEL ARTE

2.1. INTRODUCCIÓN DE LOS BIOMATERIALES EN MEDICINA

Se define un biomaterial como aquel material que se emplea para la fabricación de elementos que formarán parte de sistemas biológicos y del ámbito de la medicina. Tratará de reemplazar aquella parte del organismo que no sea capaz de realizar su función por sí mismo debido a patologías o malformaciones, ya sea de forma temporal o permanente.

Durante la historia, el ser humano ha ampliado sus conocimientos en el campo de la medicina, tratando de utilizar los recursos disponibles en beneficio de la salud (*Soria et. al. 2009*). Es por ello, que progresivamente ha tratado de reemplazar o restaurar aquellos tejidos que hubieran sufrido daños, con tal de mejorar el estado de salud del individuo (*Milena, 2017*). Así pues, inicialmente los biomateriales más utilizados con fines terapéuticos eran aquellos de origen natural, como la madera, el marfil o el vidrio. A medida que se conoce la respuesta del organismo a estos materiales se fueron introduciendo nuevos, como los metales, cerámicas y polímeros. El uso de nuevos materiales obligó a ampliar el conocimiento en las reacciones que el cuerpo generaba contra estos dispositivos (*Soria et. al., 2009*), ya que, al introducirlos en el organismo, éstos actúan como vectores para bacterias y virus (*Milena, 2017*).

Como se ha comentado anteriormente, los biomateriales pueden ser tanto de origen natural como sintético, pero, además, deben cumplir con ciertas características. Éstas deben no comprometer la salud del paciente y cumplir con la función del tejido sustituido, por lo que deben ser biocompatibles, cumplir con las propiedades mecánicas propias del tejido, no ser tóxico para las células del entorno, ser químicamente estables y cumplir con las características de diseño, tamaño y forma (*Soria et. al., 2009*).

Centrándonos en los materiales metálicos y sus aleaciones, éstos deben cumplir los requisitos citados anteriormente y tener en cuenta ciertas consideraciones debido a su naturaleza. Los metales poseen buenas propiedades mecánicas como son la alta resistencia al desgaste e impacto. Sin embargo, el punto débil de éstos reside en la biocompatibilidad y la corrosión, pues pueden liberar partículas al medio y provocar alteraciones en las células circundantes. Es por ello por lo que los metales han ido evolucionando, para dar paso a los aceros, posteriormente los inoxidables y, finalmente, aparecieron las aleaciones de cobalto y titanio, las cuales cuentan con multitud de ventajas frente a otros materiales (*Gil et. al., 1993*). Así pues, en el presente trabajo nos centraremos en el uso del titanio y la aleación de Ti6Al4V en el campo biomédico. Esta aleación es el material preferente dadas sus excelentes propiedades mecánicas y elevada estabilidad química en los medios fisiológicos, además de que provoca reacciones favorables en el tejido (*Milena, 2017*).

2.2. TITANIO: CARACTERÍSTICAS Y ALEACIONES

2.2.1. CARACTERÍSTICAS DEL TITANIO Y LA ALEACIÓN Ti6Al4V

El titanio se descubrió a finales del siglo XVIII. Pese a tratarse de uno de los elementos más abundantes de la Tierra, posee una concentración del 0'8% en peso, y su extracción es complicada salvo que se encuentre como rutilo (TiO_2) e ilmenita ($\text{FeO}\cdot\text{TiO}_2$). Sin embargo, aunque se extraía de éstos, no se logró una muestra pura hasta la primera década del siglo XX.

En 1937, Kroll dictó un proceso para conseguir titanio tras reducir el tetracloruro de titanio con magnesio, bajo una atmósfera de argón, pues si no podría oxidarse. Actualmente es el método más empleado, pues permite obtener unas cantidades de titanio puro aceptables (*Polmear, 1995*).

A consecuencia de las excelentes propiedades del titanio, los EE. UU. potenciaron durante la década de los 50, estudios sobre este elemento y sus aleaciones. Durante la siguiente década, su uso se encontraba principalmente en las industrias aeroespacial, militar y química. Finalmente, debido al estudio de la capa de pasivación que cubría la superficie, y por tanto, su excelente resistencia a la corrosión (*Polmear, 1995*) junto con su biocompatibilidad, se introdujo en el ámbito biomédico (*Kubli, 1983*).

Hoy en día, el titanio sirve principalmente para la industria aeroespacial, química y médica. Cabe destacar que, del titanio extraído por diversos métodos, el 50% es empleado para la fabricación de la aleación Ti6Al4V (*Donachie, 1989*).

El uso generalizado de este elemento radica en sus características, pues se trata de un metal excepcional para aplicarse al campo de la medicina. Es un elemento ligero pese a ser metálico, pues su densidad es de 4'506 g/cm³, posee excelentes propiedades mecánicas y resistencia a la corrosión, factor que era el punto débil de otros metales en el medio biológico. Además, se caracteriza por ser biocompatible, bioinerte, resistente a la corrosión, aunque reactivo y una vez superados los 883°C sufre una transformación alotrópica (*Gil et. al., 1993*).

El titanio es un metal biocompatible, pues provoca reacciones favorables al establecer relaciones entre el tejido y la superficie del material, pese a provocar inicialmente una respuesta inflamatoria por parte del organismo. En función de la aleación habrá que tener en cuenta su toxicidad, reacciones químicas, corrosión, rugosidad y porosidad (*Rodil, 2009*). Al emplearse la aleación Ti6Al4V para la regeneración ósea, además de ser biocompatible debe ser osteointegrable, lo que significa que el implante debe ser capaz de favorecer el crecimiento óseo en su superficie, sin desarrollar una cápsula fibrosa demasiado espesa (*Lario et. al., 2016*).

El punto débil de los metales suele ser la escasa resistencia a corrosión. Sin embargo, el titanio y sus aleaciones son una excepción. La resistencia a la corrosión es consecuencia del desarrollo de una capa de óxido en su superficie al colocarla en contacto con un medio con presencia de oxígeno. Esta capa se encarga de proteger la superficie y evita que se siga oxidando más allá de la capa superficial (*Cremasco et. al, 2011*).

En relación con la resistencia a la corrosión, se encuentra la reactividad. Esta propiedad encarece el coste de este tipo de material, pues es altamente reactivo en contacto con oxígeno, de modo que es necesario trabajar con él en vacío o a atmósfera inerte. La reactividad de este elemento desarrolla una capa protectora de óxido sobre la superficie (*Escuder, 2014*). La barrera de protección actúa evitando cualquier liberación de iones al medio fisiológico, es decir, trata de evitar que se provoque un desequilibrio en el medio, y, por tanto, que afecte negativamente a las células adyacentes (*Cremasco et. al., 2011*). La temperatura es uno de los factores que más afecta a la reactividad del titanio, pues ésta se reduce al alcanzar temperaturas superiores a 600°C, ya que a estas temperaturas se produciría la difusión del oxígeno sobre la capa de pasivación, aumentando, en consecuencia, el espesor y fragilidad de esta capa (*Escuder, 2014*).

Así pues, tras estas propiedades, los biomateriales se clasifican en función de los resultados que provoquen en el lugar de implantación, teniendo en cuenta únicamente al titanio y, en concreto, a la aleación Ti6Al4V, este material dará lugar a un implante casi inerte. Esto es, que el elemento se colocará en el organismo, y a consecuencia, se desarrollará una cápsula fibrosa a su alrededor. Esta cápsula, cuya composición se basa en tejido fibroso, es la encargada de proteger el implante, aislándolo del tejido que lo envuelve. Como se describe anteriormente, al ser casi inerte ya que los metales son más reactivos, para establecer el equilibrio químico entre la superficie expuesta y el entorno llevará más tiempo, así que la cápsula posee un espesor menor en comparación con otros materiales. También hay que tener en cuenta que la capsula será de menor espesor debido a que el implante considerado se aloja en las zonas de unión, así que estarán expuestos a posibles movimientos (*Rodil, 2009*).

2.2.2. PROPIEDADES DE LA ALEACIÓN Ti6Al4V

Las propiedades de la aleación vendrán determinadas tanto por la composición química como por la microestructura (Dalmau, 2012).

2.2.2.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA

En primer lugar, la aleación Ti6Al4V se trata de un elemento ligero que presenta estructura bifásica, esto es que está compuesto por las fases α y β (Quirama, 2017), en el que la matriz β está contenida en α (Pinilla et. al., 2018), donde la primera se trata de una estructura hexagonal compacta (HCP) y la fase β es la cúbica centrada en el cuerpo (BCC). Al analizar la aleación Ti6Al4V cabe destacar que el aluminio sirve de estabilizador de la fase α , pues incrementa la temperatura de transformación entre la fase α - β . El otro componente, el vanadio, también es un estabilizador, pero de la fase β , encargado de disminuir la temperatura de transformación entre ambas fases (Quirama, 2017). Los elementos estabilizadores de la fase α serán Al, O, N y C entre otros. Y los estabilizadores isomorfos de la fase β son el Mo, W, V y Nb, entre otros (Dalmau, 2012).

Al variar la composición química del titanio, como se puede observar en la *Tabla 1* a continuación, para conseguir la aleación Ti6Al4V, se consiguen propiedades mecánicas diferentes y orientadas a las necesidades de la zona del organismo que requiera el implante.

Composición (% en peso)								
Elemento	Al	V	Fe	Zr	O	N	H	Ti
%	6'62	4'55	0'02	0'03	0'55	0'5	0'3	88

Tabla 1. Composición en % de la aleación Ti6Al4V.

Adaptado de Tojal et. al., 2012.

Esta composición caracteriza al material con una rigidez parecida a la del hueso original, con tal de evitar el apantallamiento de tensiones, y, por tanto, la pérdida de tejido óseo en la zona circundante donde se ha implantado la pieza (Tojal et. al., 2012). Además, la aleación será de mayor densidad, escasa resistencia a rotura frente a temperaturas elevadas y baja ductilidad si se encuentra en condiciones de envejecimiento (Dalmau, 2012).

2.2.2.2. MICROESTRUCTURA

En lo relativo a la microestructura de la aleación, los estudios han asegurado que la modificación de ésta, afecta directamente sobre las propiedades mecánicas del biomaterial en función del tratamiento elegido. (Sieniawsky *et. al.*, 1997).

Como se ha comentado anteriormente, esta composición permite que la aleación sea la preferente para la fabricación de prótesis que se verán sometidas a altas presiones. Si la aleación tuviese en su composición impurezas o demasiada concentración de oxígeno, se produciría un aumento de la dureza y resistencia del material. Sin embargo, al alcanzar los 400 °C se puede producir un agrietamiento intercrystalino, provocado por la presencia de elementos tales como el hidrógeno, nitrógeno o carbono en la estructura cristalina. Cabe destacar que esta aleación Ti6Al4V presenta desventajas frente a las aleaciones de tipo β , ya que éstas no contienen elementos tóxicos y ni inducen reacciones inflamatorias en el medio en el que se alojan debido a que a penas liberan iones (Milena, 2017).

En primer lugar, la microestructura equiaxial (Figura 1) se consigue una vez se ha trabajado de forma mecánica el material en las temperaturas de $\alpha + \beta$. Si se somete a recocido la muestra tras alcanzar temperaturas inferiores a las de inicio de martensita, se formará una microestructura compuesta por granos finos de ambas fases, ésta recibe el nombre mil-annealed, cuya estructura dependerá del trabajo mecánico aplicado previamente. Durante el recocido la muestra está compuesta por fase α primaria y β . Cuando se enfría el material, se mantiene la fase α pero la fase β se modificará en función de la velocidad de enfriamiento. En cambio, si la temperatura del recocido fuese superior, la fase β se transforma a estructura laminar de fase α secundaria, por lo que la nueva estructura sería de granos de α y láminas finas de no transformada. En lo relativo a las propiedades mecánicas de esta microestructura destaca el descenso en la resistencia a fatiga y tenacidad. Además, hay que destacar que si se tratase esta microestructura con tratamientos térmicos también disminuiría la velocidad de propagación de las grietas (Correa *et. al.*, 2014).

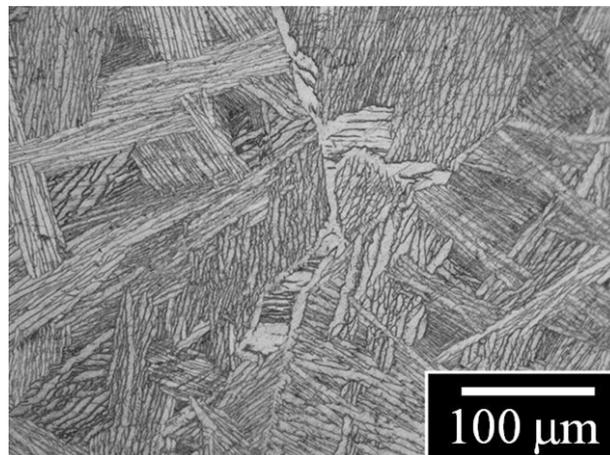
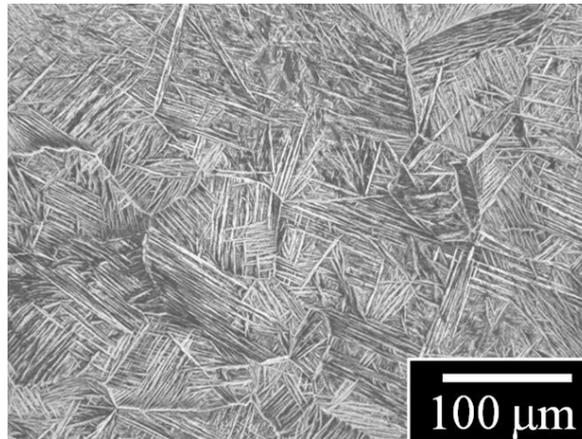


Figura 1. Microestructura $\alpha + \beta$ de Ti6Al4V.

Fuente: (Rodney y Collings, 1993).

En segundo lugar, la martensítica (*Figura 2*) se logra tras un enfriamiento rápido o temple desde una temperatura superior a la de β – transus, de esta forma se generará una transformación masiva a martensita o fase α' . Su microestructura será acicular o laminar fino y con parámetros de red muy similares a los dados en la fase α . Respecto a sus propiedades mecánicas, la microestructura martensítica se caracteriza por tener unos niveles de fragilidad y dureza menores respecto a las aleaciones bifásicas con más estabilizadores de la fase β (*García et. al., 2016*).



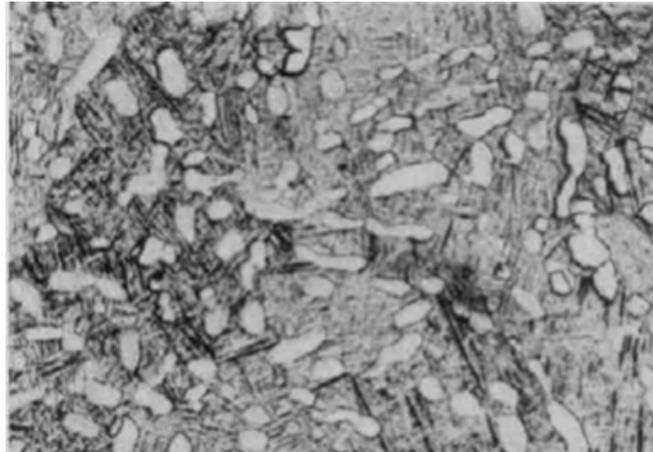
*Figura 2. Microestructura martensítica de Ti6Al4V.
Fuente: (Rodney y Collings, 1993).*

En tercer lugar, la microestructura laminar (*Figura 3*) se consigue tras un enfriamiento lento desde temperaturas superiores al β – transus hasta llegar a la región bifásica. Si se ralentiza el proceso de enfriamiento se produce una difusión controlada entre las dos fases, de forma que al estar por debajo del β – transus, la fase α comienza a formar núcleos junto a los bordes de grano de β , por lo que la fase α crece en láminas. Se consigue una estructura laminar que cuenta con placas de mayor grosor de fase α y finas de β . La microestructura laminar posee mayor tenacidad a fractura y resistencia a corrosión producida por tensión y fluencia, además de menor velocidad de propagación de grieta, como propiedades mecánicas principales (*Delgado, 2012*).



*Figura 3. Microestructura laminar de Ti6Al4V.
Fuente: (Rodney y Collings, 1993).*

Por último, la bimodal (*Figura 4*) consiste en una estructura que posee granos de fase α aislados en una matriz β transformada. Ésta se consigue tras un recocido a 950 °C, un temple en agua y envejecimiento a 600 °C. Si en lugar de envejecer la muestra a 600 °C, se hiciera a 650 °C, precipitaría la fase β en granos de fase α . Sus propiedades mecánicas principales son tensión de fluencia, ductilidad, resistencia a nucleación de fisuras y con una resistencia a fatiga de bajos números de ciclos más alta pero una velocidad de propagación de fisuras más lenta (*Bonvicini, 2017*).



*Figura 4. Microestructura bimodal de Ti6Al4V.
Fuente: (Rodney y Collings, 1993).*

Las propiedades y características de la aleación de titanio dependerán de su composición y posterior tratamiento. Las propiedades de la aleación variarán en función de la adición de dos componentes. Si se añade aluminio, que será el encargado de estabilizar la fase α , se incrementará la temperatura de transformación entre la fase $\alpha - \beta$. En cambio, si se le añade vanadio, la fase estabilizada será β , por lo que la temperatura de transformación anterior disminuirá.

La aleación posee una microestructura que favorece la soldabilidad del material. Debido a su alto contenido en aluminio favorece la resistencia y la resistencia a oxidación a alta temperatura (300 – 600 °C). Si se induce una estructura α el material será capaz de absorber una mayor cantidad de energía de deformación, por lo que las grietas se detendrán o desaparecerán en las partículas α , incrementando así la dureza de la aleación.

La aleación dada se emplea en el ámbito biomédico por sus propiedades, las cuales dependen de su microestructura. Ésta es un factor que determinará la resistencia a fatiga del material, por lo que cuanto más pequeño sea el tamaño de grano y más elementos intersticiales haya, mayor será el valor de este ésta. Es por ello, que para mejorar la resistencia a fatiga se aplicarán tratamientos para mejorarla, ya que es un factor que determinará la biocompatibilidad de la muestra y, por tanto, es necesario incrementar.

Originalmente la muestra de Ti6Al4V, sin aplicar ningún tratamiento superficial, es una matriz β contenida en una α . Los granos serán equiaxiales y uniformes, aunque pueden presentar deformaciones debido al proceso de fabricación.

Así pues, una forma de mejorar las propiedades de la aleación Ti6Al4V será aplicar sobre ella tratamientos superficiales, con tal de compensar sus puntos débiles. De este modo, mediante diferentes tratamientos, como el ataque ácido, anodizado o nanotubos, se desarrollará sobre la superficie una capa de óxido de titanio. El óxido superficial en cuestión será el rutilio, ya que es estable, aunque la muestra se exponga a diferentes temperaturas, pues presenta menos energía libre que otras formas del óxido, como la anatasa. Como inconveniente, este hecho puede provocar que la red cristalina no sea perfecta, por lo que puede haber enlaces débiles o impurezas.

La capa de óxido desarrollada tras aplicar los tratamientos superficiales será una capa protectora que garantizará que la muestra sea más resistente y presente una mayor durabilidad, aunque también dependerá del espesor de ésta. Esta capa modificará la microestructura, puesto que presenta estructura y propiedades distintas a las de la aleación. La nueva microestructura protegerá a la aleación de agentes externos y de la abrasión y variará su color.

De este modo, al aplicar dichos tratamientos superficiales, se observa como en la superficie de la muestra, su microestructura variará, ya que formará cristales de óxido perpendiculares a la superficie que se irán acumulando y cubriendo uniformemente la superficie de la probeta. El espesor de esta capa oscilará entre 0,5 y 10 nm, que dependerán directamente del tratamiento y del tiempo de aplicación (*Pinilla y Siado, 2014*).

2.3. TRATAMIENTOS SUPERFICIALES DE LOS MATERIALES

El desarrollo y popularidad de los tratamientos superficiales en los últimos años se debe a la mejora que supone para conseguir una integración ósea duradera y en menos tiempo. Estos tratamientos pretenden modificar la rugosidad superficial para facilitar la adhesión celular, su interés radica en que el hueso receptor de la prótesis se puede encontrar deteriorado por diversas razones, de modo que podría afectar a la osteointegración. Así pues, emplear biomateriales y nuevos tratamientos superficiales permitirán un mayor éxito de la prótesis.

Es necesario que, tras la modificación superficial, la prótesis mantenga sus excelentes propiedades fisicoquímicas. Ya que permitirán que se reemplace o restaure la función del tejido dañado intentando no provocar una reacción adversa, debido a su contacto constante con el medio interno del huésped. El fallo de los implantes ocurre cuando se pierde el interfaz que pone en contacto la prótesis con el hueso, mostrando una deficiente osteointegración. Para evitar la sustitución protésica, se aplicarán tratamientos superficiales con tal de mejorar la conexión directa entre el tejido y el implante, para ello habrá que tener en cuenta la geometría, topografía, rugosidad y área superficial, ya que la adsorción de proteínas y proliferación celular dependerán de los factores anteriores permitiendo, en consecuencia, la osteointegración.

Las aleaciones de titanio han ido evolucionando con el paso del tiempo, tratando de mejorar su osteointegración con el tejido vivo. Por este motivo, se pueden diferenciar en las generaciones de tratamientos superficiales que se han ido aplicando en función de los avances tecnológicos. Para empezar, como primera generación se refiere a aquellos implantes mecanizados para conseguir las propiedades fisicoquímicas necesarias para ser implantado en un medio biológico. Cabe destacar, que los implantes de esta generación deben ser capaces de distribuir homogéneamente las fuerzas, tener alta resistencia mecánica, tenacidad a fractura, baja toxicidad y ser bioinertes.

En cuanto a la segunda generación, los implantes ya cuentan con bioactividad debido a que se aplican en ellos tratamientos superficiales con tal de mejorar la osteointegración. Esta generación se caracteriza por haber sufrido cambios en la rugosidad y área superficial, en función del medio en el que se vaya a implantar y las células que vayan a proliferar sobre su superficie.

Finalmente, la tercera generación pretende facilitar la respuesta celular a nivel molecular y mejorar el rendimiento de la prótesis. Los tratamientos que sufren estos implantes se basan en la modificación de la morfología a nivel nanométrico. Se favorece el desarrollo celular como consecuencia de disponer de superficies con capas de óxido de titanio o geometría de nanotubos, entre otras nuevas técnicas. Por este motivo, son los implantes que presentan un mayor grado de osteointegración. Además, esta generación puede incorporar en su estructura agentes bioactivos con tal de erradicar el foco de una posible infección.

Así pues, se afirma que la razón del desarrollo de nuevas técnicas superficiales es la mejora significativa de la osteointegración. Este concepto hace referencia a la conexión, tanto estructural como funcional, que se establece entre el tejido en cuestión y la superficie del material. Para ello, se desarrolla un interfaz entre dichos elementos, que, si en algún momento se perdiese, disminuiría considerablemente la capacidad de osteointegración, provocando incluso el fallo del tratamiento. Por este motivo es tan importante considerar ciertos factores anteriormente citados para la fabricación de los implantes. En consecuencia, las superficies tratadas adecuadamente facilitarán la adsorción de proteínas, crecimiento celular, desarrollo y diferenciación de los osteoblastos, y permitirán que el proceso regenerativo tenga una menor duración y sea de mayor calidad (*Lario et. al., 2016*).

2.3.1. MECANIZADO

El objetivo del tratamiento de mecanizado consiste en lograr un implante con la geometría que posee el tejido a sustituir. Dicho elemento tendrá que distribuir las fuerzas homogéneamente, además de no resultar tóxico para el medio en el que se coloca. La superficie tratada con este método se caracteriza por su elevada resistencia mecánica y a fractura, junto con su biocompatibilidad.

El mecanizado provoca diminutas irregularidades en la superficie debido al proceso de fresado y pulido. Este proceso permite que la superficie goce de cierta rugosidad, lo cual facilitaría la interacción del tejido con el material (*Blanco et. al., 2018*).

Para mecanizar una pieza, se parte de una estructura original, la cual se modificará hasta llegar al producto final o el semielaborado. Como se ha comentado, la eliminación de material se consigue por arranque de viruta, el cual lo realiza el filo de una herramienta. Según el tipo de filo elegido es posible distinguir dos tipos:

- Cepillado o arranque con filo geoméricamente determinado: El objetivo es conseguir una geometría particular, por lo que será un tipo más específico y preciso, sin embargo, esto dificulta y encarece el proceso. Este será el proceso empleado para conseguir las piezas de dimensiones deseadas.
- Rectificado o arranque con filo indeterminado: Se emplea un elemento abrasivo, por lo que se eliminará material, pero sin una estructura clara.

Existen multitud de procesos de mecanizado, pero debido a las necesidades del proyecto en cuestión, para este caso, se empleará únicamente el fresado, cuyo resultado sería semejante al representado en la *Figura 5*. Este proceso consiste en arrancar material a partir de una herramienta llamada fresa. Los filos de corte provocan un corte discontinuo, ya que no toda la herramienta participa en el corte en el mismo instante, esta parte de la fresa que no interviene en el arranque de viruta se encontrará en refrigeración (*Jiménez, 2017*).

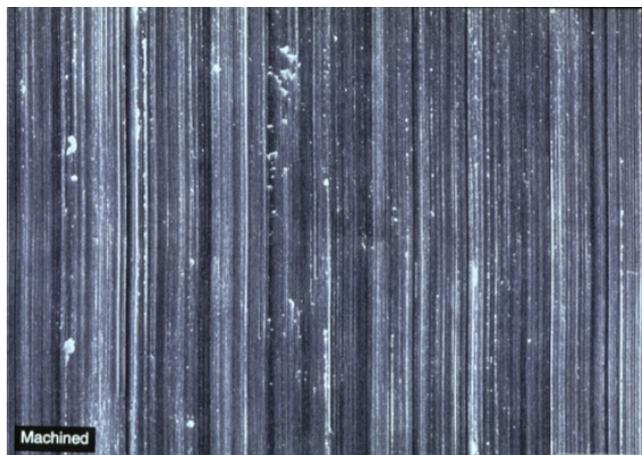


Figura 5. Superficie de la aleación Ti6Al4V tras sufrir el tratamiento de mecanizado (x10).

Fuente: (Rodney y Collings, 1993).

2.3.2. PROYECCIÓN TÉRMICA

La proyección térmica es el procedimiento por el cual se recubren superficies con materiales tanto metálicos como no metálicos. Se pueden diferenciar multitud de categorías, como se observa en la *Figura 6*, donde destacan los siguientes: proyección por flama, proyección por arco eléctrico y proyección por arco de plasma (Roviroza *et. al.*, 2017). El procedimiento trata de proyectar finas partículas sobre una superficie preparada. El espesor de esta nueva capa generada, para considerarse uniforme, debe rondar entre las 30 y 50 μm . Una vez se consigue este espesor, la superficie tendrá una rugosidad aproximada 7 μm , y, en consecuencia, se obtendrá una mayor área superficial en el implante (Lario *et. al.*, 2016).

El proceso de la proyección térmica es el siguiente. En primer lugar, las fuentes de energía calientan el material que va a recubrir la superficie hasta que alcanza un estado de semifundido, es decir, son capaces de deformarse plásticamente. A continuación, dichas partículas son calentadas, aceleradas y propulsadas hasta la superficie de interés, la cual habrá sido preparada previamente. Cuando las partículas impactan con la superficie formarán un enlace con éstas.

Este procedimiento se puede aplicar a multitud de materiales, pues se emplean aquellos que llegan al punto de fusión sin descomposición. Además, en caso de que el recubrimiento sufriese desgaste o daños, en la mayoría de los casos, es posible volver a reponerlo sin necesidad de cambiar la pieza. Sin embargo, este tratamiento también tiene inconvenientes, como es la línea de visión del proceso de deposición, ya que recubre aquello que la pistola es capaz de alcanzar. Tampoco es capaz de recubrir partes pequeñas o profundas. Cada uno de los procesos diferentes de proyección térmica citados anteriormente poseen un rango de temperatura, entalpía y velocidad diferentes, por lo que se elegirá el que mejor se adapte al material y pieza en cuestión.

El objetivo de la proyección térmica reside en mejorar la adherencia, porosidad, inclusión y dureza de los implantes, con tal obtener una superficie como la mostrada en la *Figura 7*. Cabe destacar que el proceso de calentamiento y aceleración de las partículas puede realizarse por diferentes procesos, entre los que destaca la corriente de gas y haz láser. En el diagrama siguiente se presentan multitud de métodos de proyección térmica (Roviroza *et. al.*, 2017).

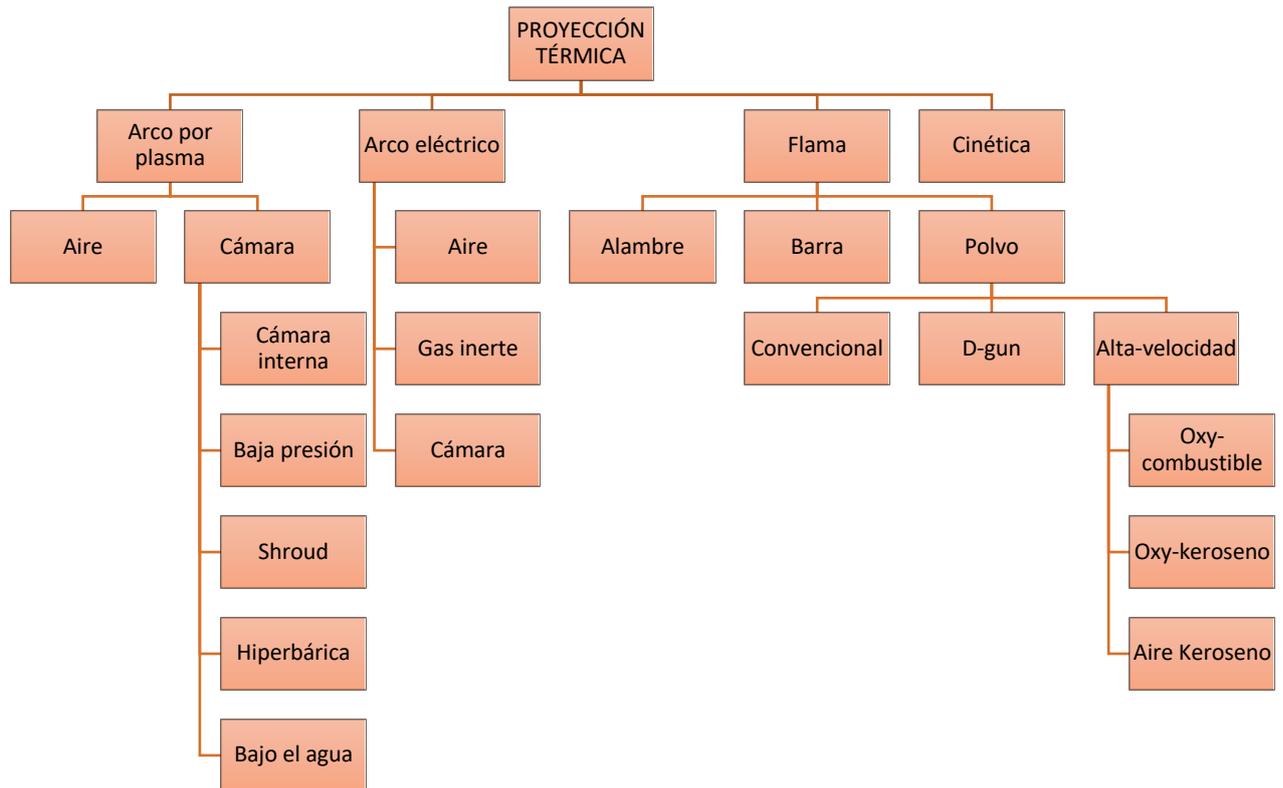


Figura 6. Métodos de proyección térmica.
Adaptado de Handbook of Thermal Spray Technology, 2004.

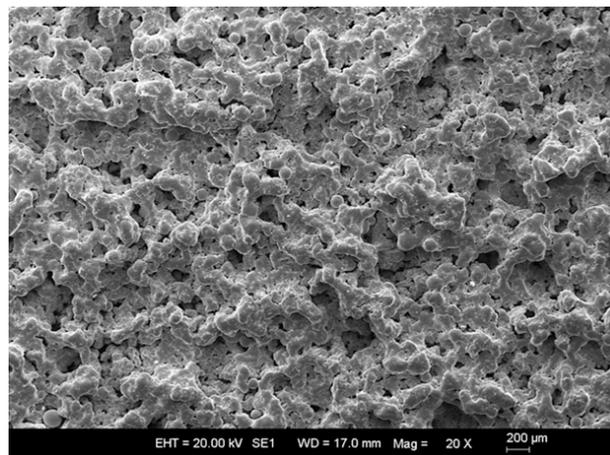


Figura 7. Superficie de la aleación Ti6Al4V tras sufrir el tratamiento de proyección térmica (x20).
Fuente: Biomet, 2020.

2.3.3. OXIDACIÓN ELECTROQUÍMICA

Es posible desarrollar una capa de óxido en la superficie de la aleación a partir de la oxidación electroquímica como tratamiento superficial. La base de este tratamiento radica en la reacción de oxidación-reducción, generando una diferencia de potencial entre el ánodo y el cátodo. Como resultado, se obtiene un mayor crecimiento celular y más adhesión, en comparación con otros tratamientos superficiales.

La capa de óxido o de pasivación es la característica fundamental que permite que el titanio sea considerado como biomaterial, pues proporciona gran estabilidad electroquímica. Esta capa es la que evita que se sufra el ataque electroquímico por parte del medio biológico. Se compone de óxido de titanio (Ti_2O) y su espesor oscila entre los 0,5 y 10 nm. Su formación requiere poco tiempo, al ponerse en contacto la superficie del titanio con un medio con presencia de oxígeno, ésta tardará apenas milisegundos en desarrollarse.

A partir de las curvas de potencial, se observa lo estable que es el potencial electroquímico en las aleaciones de titanio, por lo que será una ventaja para su biocompatibilidad. Sin embargo, la capa desarrollada posee propiedades mecánicas bajas, por lo que podría dar lugar a fallo por fractura. Para evitar que se dé esta situación, se emplean tratamientos que sean estabilizadores para la capa de óxido (*Rodríguez, 1999*).

Cabe destacar una técnica de oxidación llamada Oxidación Electrolítica por Plasma (PEO), la cual modifica la superficie mejorando la resistencia a la corrosión de las aleaciones en las que se aplica. Consiste en mantener un campo eléctrico sobre una creciente película anódica, llegando a superar el voltaje crítico o tensión de ruptura dieléctrica. Las fases cristalinas y amorfas de la cerámica sobre la superficie metálica dependerán tanto de la naturaleza del electrolito como del sustrato. La composición y concentración del electrolito determinará qué recubrimiento bioactivo se consigue para poder controlar los procesos de degradación superficiales. Los compuestos más utilizados para esta técnica son el hidróxido de potasio y sodio (NaOH, KOH), el silicato de sodio (Na_2SiO_3), el fosfato de sodio (Na_3PO_4) y aluminato de sodio ($Na_2Al_2O_4$) (*Dorado et. al., 2018*).

2.3.4. ARENADO

Otra de las técnicas empleadas para alterar la superficie de los metales, aumentando así su rugosidad, es el arenado o granallado, representado en la *Figura 8*. Este tratamiento modifica la composición de la superficie, ya que proyecta partículas abrasivas a alta presión sobre la superficie de interés, incrementando su rugosidad en, aproximadamente, 10 μm . Las partículas más empleadas suelen ser alúmina (Al_2O_3), titania (TiO_2) o hidroxiapatita, entre otras. La razón para incrementar la rugosidad radica en el éxito que supone para la adhesión entre el implante y la superficie ósea. Este tipo de tratamiento también tiene una serie de desventajas, donde destaca la presencia de residuos, que permanecen en la superficie a pesar de haber realizado una limpieza por ultrasonidos, pasivación ácida o esterilización (*Duraccio et al., 2015*). A pesar de esto, se ha demostrado que la presencia de residuos no afecta negativamente a la osteointegración. Otro inconveniente que debe abordarse es que la superficie, tras el tratamiento, posee una peor resistencia a corrosión y a fatiga (*Multigner et al., 2009*).

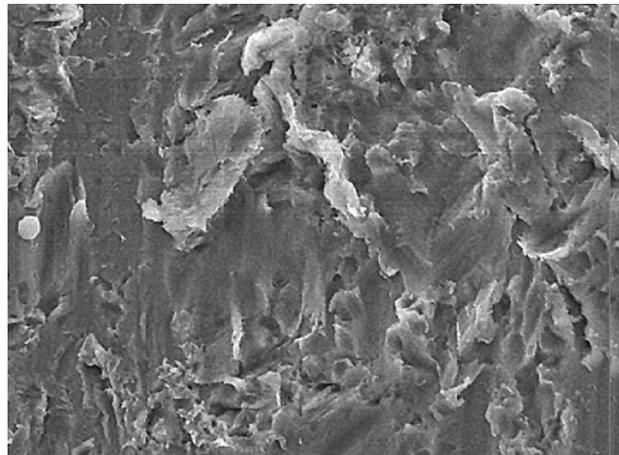


Figura 8. Superficie de la aleación Ti6Al4V tras sufrir el tratamiento de arenado (x2000).

Fuente: (Rodney y Collings, 1993).

2.3.5. ATAQUE ÁCIDO

En lo relativo al ataque o grabado ácido, éste provoca superficies con mayor rugosidad que las que se pueden conseguir con mecanizado, sobre todo la microrrugosidad, como se puede apreciar en la *Figura 9*. El uso de este tratamiento radica en la mejora significativa de la adhesión del tejido a la superficie del implante, y, por tanto, en la mejora de la osteointegración. Se modifica la composición química superficial tras el tratamiento, eliminando impurezas, y con una capa de óxido de titanio bastante más espesa y cristalina (Pérez, 2012). Los factores que afectan a la superficie resultante son el tiempo de aplicación, temperatura, el tipo de ácido empleado y la concentración de la solución (Pérez, 2016).

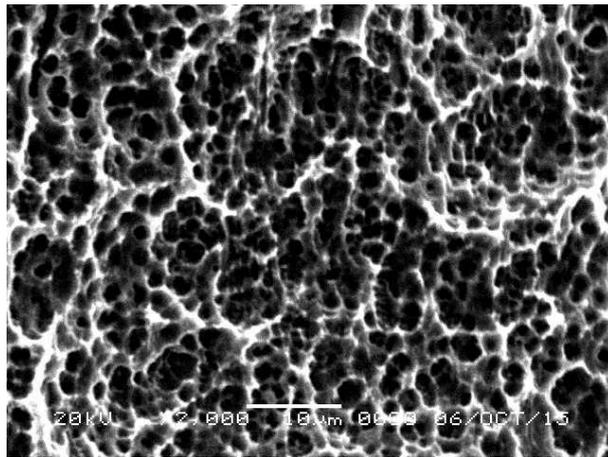


Figura 9. Superficie de la aleación Ti6Al4V tras sufrir el tratamiento de ataque ácido (x2000).

Fuente: Servicio de Microscopía Electrónica (UPV), 2020.

2.3.6. ANODIZADO

El proceso de anodizado genera películas de óxido artificiales sobre las superficies del titanio o aleación con un espesor mayor y mejores características de protección. Esta película se consigue a partir de una serie de procesos químicos y electrolíticos, en los cuales el oxígeno resultante de la disociación electrolítica del agua oxida el ánodo.

El procedimiento consiste en sumergir las muestras en una disolución dentro de una celda electrolítica, en la cual habrá reacciones en función del electrodo junto con un campo magnético, éste último será el encargado del movimiento de difusión de los iones para generar la película de óxido sobre la muestra. En este procedimiento intervienen diversos factores, a partir de los cuales se generará una capa de óxido de mayor o menor espesor, como el electrolito elegido, la corriente, concentración, temperatura o velocidad, entre otros.

Al generarse la capa de óxido, se modificará la superficie de la muestra generando microporos, aspecto que aportará propiedades beneficiosas para su implantación, como la resistencia a la corrosión, dureza y menor liberación de iones al medio. El espesor de la película generada depende del voltaje que se le aplica a la muestra, y, cuanto más voltaje del recomendado se aplique, más posibilidades habrá de que se rompa la capa superficial. Por último, tras aplicar este tratamiento superficial, en función del material de la muestra se podrán observar diferentes colores correspondientes a los diferentes voltajes aplicados

(Figura 10), pues cuando interfiere la luz sobre la superficie de la muestra, las longitudes de onda atravesarán la capa de óxido permitiendo distinguir así los colores. Los colores claros corresponden a interferencias constructivas y los oscuros, a interferencias destructivas (Espinosa *et. al.*, 2006).

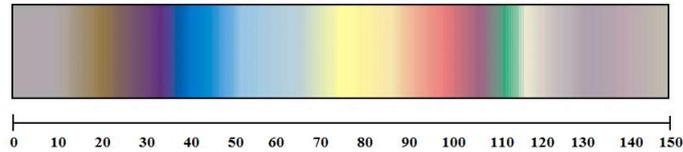


Figura 10. Colores característicos obtenidos después del anodizado del Ti.
Fuente: (Pérez, 2012).

2.3.7. NANOTUBOS

Actualmente, una de las técnicas que están en vías de desarrollo son los recubrimientos que siguen una morfología en nanotubos (Figura 11). Esta geometría es a razón de que se reduce la concentración de tensiones y mejora la adhesión. La principal técnica empleada para conseguir nanotubos en la superficie del titanio y sus aleaciones es la oxidación electroquímica. La principal ventaja que presenta este tratamiento superficial es que es posible aplicarlo a baja temperatura (Lario, 2019).

El procedimiento de esta técnica consiste en desarrollar una capa inicial de óxido en la superficie de la aleación en cuestión. Esta capa se genera como consecuencia de una diferencia de voltaje entre los electrodos, y, posteriormente, sufre un ataque químico, el cual provocará picaduras en la superficie de la aleación. Estas picaduras evolucionarán a poros. La morfología y las dimensiones de los nanotubos dependerán de los factores que determinen el electrolito y la propia aleación, como su composición, concentración o pH. Así pues, tras desarrollar los nanotubos se podrán aplicar tratamientos superficiales sobre ellos para tratar de mejorar la biocompatibilidad (Lario *et. al.*, 2017).

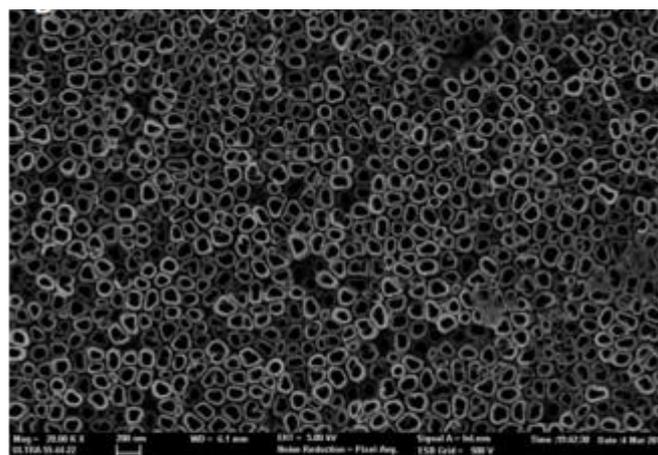


Figura 11. Superficie de la aleación Ti6Al4V tras sufrir el tratamiento de nanotubos.
Fuente: (Lario *et. al.*, 2017).

2.4. TÉCNICAS Y MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL

La caracterización de superficies se basa en el estudio de las propiedades físicas, químicas y morfológicas determinadas por unas condiciones concretas. Para obtener dicha información, el estudio se basa en perturbar el material con una señal para que la manifestación de esta perturbación permita conocer las propiedades del material estudiado.

El material original se transformará superficialmente con el objetivo de conseguir unas propiedades determinadas. Por esta razón, las propiedades superficiales variarán mucho en comparación con el interior del material. Conociendo las propiedades superficiales será posible determinar su aplicación, durabilidad, resistencia o tenacidad.

El presente proyecto pretende determinar qué tratamiento superficial facilita la adhesión bacteriana y el efecto que ésta pudiese haber causado a la superficie una vez adheridas. Es por ello por lo que las propiedades a estudiar serán la estructura, el tamaño de poro y la rugosidad (*Dalmau et. al., 2019*).

La superficie de la muestra es el interfaz con el que interactuarán tanto las células como los microorganismos. Cuando se implanta la prótesis, las primeras moléculas que interactuarán con la superficie serán las de agua, desarrollando una monocapa o bicapa. La interacción de esta molécula dependerá del grado de mojabilidad del biomaterial. A continuación, se adherirán los iones de sodio y cloro, luego se formará una capa de proteínas sobre la superficie. En ese momento, en función de la capa proteica, se adherirán las células y microorganismos presentes. La capa de proteínas puede alterar las propiedades superficiales e incluso degradar el metal. Finalmente, se podrá desarrollar una cápsula fibrosa o se llevará a cabo el proceso de osteointegración, que dependerá de la topografía y rugosidad y composición química, entre otros factores que no se estudiarán en el presente proyecto.

En primer lugar, la composición química superficial determinará qué biomoléculas son capaces de interactuar con el material. Los cuatro tratamientos seleccionados (ataque ácido, anodizado, ataque ácido y anodizado y nanotubos) desarrollan una capa superficial de óxido estable en la superficie, este hecho facilita la adsorción de proteínas, diferenciación celular, resistencia a la corrosión y al desgaste. Cuanto más gruesa sea esta capa de óxido mejor será la respuesta ósea.

En cuanto a la topografía y rugosidad, éstas afectan directamente a la osteointegración. Cuanto más rugosa sea una superficie, mayor será su capacidad de retención de microorganismos, ya que aumentará el área de contacto, por lo que mejorará la energía superficial y, por tanto, la adhesión de proteínas, que afectará en consecuencia a la osteointegración (*Won, 2017*). Este es el interés de los tratamientos superficiales, pues modificará la topografía formando grietas, poros y rayas en la parte superior de la muestra. Estas estructuras, en función de sus dimensiones, permitirán alojar microorganismos, los

cuales se beneficiarán de ellas para adherirse, crecer, diferenciarse y desarrollar una estructura biológica, modificando así la topografía. Esta será la razón del interés para estudiar el efecto que el biofilm provoca a la superficie y viceversa (*Bethencourt et. al., 2010*).

Para analizar los cambios superficiales existen multitud de técnicas para conseguir las imágenes bidimensionales o tridimensionales de la superficie analizada. Estos rugosímetros pueden ser de contacto, como los perfilómetros, u ópticos, como los perfilómetros ópticos, interferómetros ópticos, microscopía confocal o la microscopía electrónica (FESEM, HRFEM, CryoFESEM y AFM). Ya sea por una técnica o por otra, es posible conseguir una representación micrométrica de la rugosidad de la superficie, por lo que se podrá estudiar ésta sin emplear procesos destructivos. En lo relativo a la resolución, la microscopía electrónica y la microscopía de fuerza atómica, son capaces de aportar información a escala nanométrica, por lo que su resolución es mucho mayor que la que podrían ofrecer otras técnicas (*Fort et. al., 2013*).

Para cuantificar la rugosidad superficial se emplea el perfilómetro, este instrumento puede ser de contacto u óptico.

El primer tipo, barre la muestra con una punta fina que está en contacto con la superficie a analizar. El barrido debe realizarse en línea recta para poder detectar las variaciones verticales que haya en la muestra. Las variaciones se transformarán en señales eléctricas que quedarán registradas en una gráfica. Hay que tener en cuenta las dimensiones de la punta, pues cuanto más pequeña sea ésta, mejor resolución reflejará la gráfica resultante. Una vez conseguida la primera representación superficial, ésta se filtrará para eliminar los defectos que no sean propios de la superficie. Además, hay que tener en cuenta que la presión ejercida sobre la superficie no debe alterar la muestra, por lo que se debe controlar la carga (*Hinojosa y Reyes, 2001*).

El interferómetro óptico es un instrumento empleado para el análisis topográfico y visualización de estructuras tridimensionales, posee 1 nm de resolución vertical y hasta 400 nm de resolución lateral. El funcionamiento de este dispositivo consiste en un haz de luz blanca que atraviesa un divisor de luz con tal de dirigirla por dos vías, la superficie de la muestra y un espejo. Al recombinarse la luz de estas dos vías se formará un patrón de referencia, el cual está formado por franjas y ondulaciones. El objetivo está en lograr el mayor contraste posible, pues es directamente proporcional a la resolución resultante. Posteriormente se capturaré la imagen y se procesará con el software correspondiente (*Avilés, 2013*).

En cuanto a la espectrometría, la técnica más empleada para analizar superficies metálicas es la Espectroscopía Electrónica Auger (AES). Esta técnica consiste en bombardear con un haz de electrones la muestra a analizar. Este haz ionizará los átomos debido a la pérdida de electrones, la superficie quedará en un estado inestable y ese exceso de energía provocará que se emita un fotón. Estos electrones liberados poseen una energía

determinada en función del elemento en cuestión. Para realizar este procedimiento se requiere de una cámara de ultra-alto vacío, un cañón de electrones y un dispositivo capaz de medir la energía de los electrones liberados, además de un software junto con un monitor para visualizar el resultado. Esta técnica presenta una excelente resolución espacial, aunque dependerá del diámetro del haz de electrones, se emplea para conseguir mapas de composición, que posteriormente se analizarán y cuantificarán (Feliu, 2016).

En primer lugar, la microscopía electrónica se basa en la difracción, reflexión y refracción de la radiación sobre la muestra, cuyo esquema se puede observar en la *Figura 12*. La microscopía electrónica aumenta 1000 veces más que la óptica y con una mejor resolución. Existen dos tipos de microscopía electrónica, pues se puede diferenciar en transmisión y barrido. El microscopio electrónico de transmisión proyecta electrones sobre la muestra y genera una imagen bidimensional, mientras que el microscopio electrónico de barrido captará los electrones secundarios por medio de diferentes sensores, generando así una imagen tridimensional de alta resolución, por lo que se podrá realizar análisis topográfico, estructural y composicional.

De este modo, la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM) se basa en emitir un haz de electrones primarios hacia la muestra a analizar. En función del material de la muestra, cuando impacten los electrones de alta energía, la muestra emitirá señales que llegarán a los diferentes sensores que analizarán esta variación para aportar información sobre la topografía y composición de la muestra. Para conseguir formar una imagen, será necesario mover el haz sobre el plano de la muestra. Este tipo de microscopía es capaz de aportar información topográfica, morfológica, cristalográfica y sobre la composición química y conductividad eléctrica (Cori, 2018).

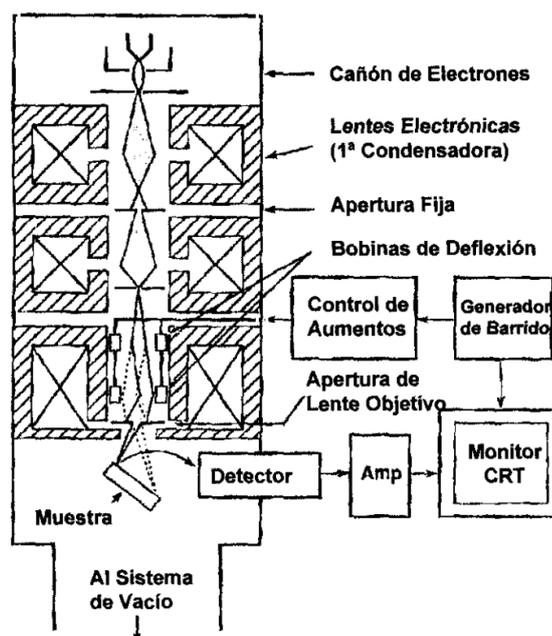


Figura 12. Funcionamiento del SEM.

Fuente: (Almagro, 1999).

Al interactuar el haz primario con la superficie, se generan emisiones de diferentes electrones como los electrones secundarios, retrodispersados, absorbidos y los rayos X, como aparece en la *Figura 13*. Estas emisiones dependerán de la topografía, composición y estado de la superficie analizada.

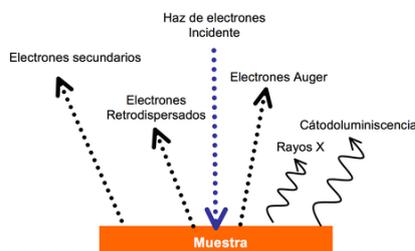


Figura 13. Emisiones tras la incidencia del haz primario en la muestra. Fuente: (Pardell, 2020).

En cuanto a los electrones secundarios, éstos conservan prácticamente la misma trayectoria, aunque pierden algo de su energía original. Por tanto, se transferirá energía a la muestra y devolverá el electrón al medio con una energía menor de 50 eV. Se absorben fácilmente por el material, por lo que los captados por los sensores serán los que se generen más cerca de la superficie. En caso de que el electrón emitido fuese de un orbital mayor, se generaría un rayo X procedente de esa transición de energía. Estos electrones se emplearán para obtener una imagen, ya que ayudarán a analizar la topografía de la superficie

Respecto a los electrones retrodispersados, modificarán su trayectoria respecto al haz incidente y, además, cuentan con una energía entre 50 eV y la del haz primario, razón por la cual penetrarán más fácilmente en la muestra. Esta energía variará en función de la composición de la superficie y la topografía. Estos electrones se analizan para aportar información sobre la composición superficial.

En lo relativo a los rayos X, estos aparecen tras expulsar al electrón que se encuentre en orbitales más internos del átomo, este hueco será ocupado por un electrón de una órbita superior, de modo que se generará un fotón, que es la diferencia energética entre dos orbitales. Este es el motivo por el cual los rayos X poseen prácticamente la misma energía que el haz incidente. El análisis de este elemento se emplea para generar mapas sobre la distribución elemental de la muestra.

La energía con la que se analiza la muestra determinará la calidad del análisis, pues si disminuye la diferencia de potencial, se acelerarán menos los electrones, por lo que el haz incidirá superficialmente.

El diámetro de la sonda o haz puede variarse alterando la corriente de la lente condensadora, permitiendo una mayor resolución, una cierta disminución de la aberración de las lentes y una menor corriente de sonda (Pardell, 2020).

Gracias a la Microscopía Electrónica de Barrido es posible visualizar la topografía y el relieve de la muestra analizada. Al emplear muestras de Ti6Al4V no será necesario metalizar la cara externa de la muestra para que sea posible la conducción de la radiación de electrones sobre la superficie, de modo que no será una técnica destructiva con nuestra muestra debido a que son piezas pequeñas. En cuanto a los sensores, lo ideal sería mezclar tanto sensores de electrones secundarios, como de electrones retrodispersados, ya que permite el estudio de fracturas o poros superficiales. La ventaja de este tipo de microscopía es que es capaz de llegar a observar tanto a escala micrométrica como nanométrica. En el proyecto se emplearán diferentes tipos de microscopios electrónicos de emisión de campo (FESEM), pues es capaz de captar detalles superficiales topográficos y morfológicos (*Fort et. al., 2013*).

En primer lugar, el Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo (FESEM), aporta información sobre la superficie de la muestra con más resolución y energía que un microscopio SEM. Su funcionamiento consiste en emitir un haz de electrones sobre la muestra a analizar a la vez que en una pantalla se observará la información captada por los sensores disponibles en la propia lente. Este tipo de microscopios emplean un cañón de emisión de campo para generar un haz de electrones de alta y baja energía que están muy focalizados, aspecto que afecta a la resolución espacial, además de que permite emplear potenciales menores (0,02 – 5 kV).

El Microscopio Electrónico de Barrido de Alta Resolución (HRFESEM) permite caracterizar la topografía, composición, textura, cristalografía y conductividad de la superficie de una muestra. Trabaja de igual modo que el SEM, pero maximiza la resolución espacial debido a la diferencia de potencial, ya que se sitúa en un rango de voltaje entre 1 y 30 kV. Además, habitualmente las superficies metálicas necesitan un haz de electrones entre 7 y 9 kV, sin embargo, la muestra de Ti6Al4V, necesitará al menos 10 kV para obtener una imagen con la resolución adecuada.

Por otra parte, el Microscopio de Fuerza Atómica (AFM), cuyo esquema aparece en la *Figura 14*, es capaz de aportar imágenes tridimensionales en tiempo real de la muestra que se esté analizando. Este instrumento se basa en una punta, un escáner un detector, sistema de control electrónico y de aislamiento contra la vibración. Este microscopio es capaz de abarcar 100 micras en movimiento lateral y un desnivel de 10 micras. El AFM monitorea la superficie de la muestra a analizar con una punta al final de una viga en voladizo. En función de la fuerza ejercida entre la punta y la muestra, se reflejará en la viga (cantilever), por lo que un sensor captará esta deflexión y generará una micrografía de la superficie de la muestra (*Reséndiz y Castellón, 2005*).

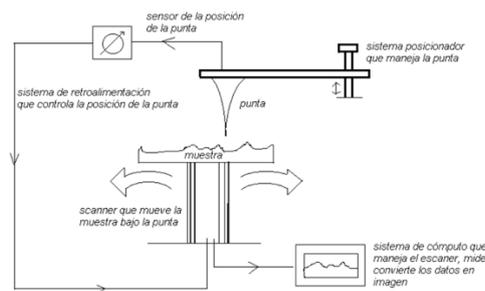


Figura 14. Funcionamiento del AFM. Fuente: (Reséndiz y Castellón, 2005).

Ahora bien, pese a la multitud de ventajas que presenta estas técnicas, también cuentan con una serie de limitaciones, las cuales determinarán si es necesario emplear otras técnicas para obtener más información. En primer lugar, la microscopía electrónica impide analizar muestras *in vivo*, pues es necesario estudiarlas en vacío. Además, sólo se obtendrán imágenes en escala de grises. En muchas ocasiones, puede haber artefactos en la muestra que se verán reflejados en el resultado final. También, cabe destacar que es necesario que la información de la muestra sea tratada por un experto en microscopía electrónica, pues es un proceso complicado (Davey, 2019).

En lo relativo a técnicas para visualizar superficies con organismos *in vivo*, se emplean habitualmente dos técnicas, la microscopía confocal y el CrioFESEM.

Respecto a la microscopía confocal, ésta emplea el láser como fuente luminosa. El mecanismo se basa en que la luz del laser atraviesa un diafragma o *pinhole* en el filtro detector de la luz, el cual impide que incida cualquier otro tipo de luz que no sea la procedente del foco. Este detector multiplica la corriente de la luz emitida, por lo que es más fácil detectar los fotones individuales y las moléculas fluorescentes de interés de la muestra. Este tipo de microorganismos se controlan a través de un software, de modo que mostrarán la imagen en un monitor, por lo que ofrece multitud de posibilidades en cuanto al tratamiento de la imagen. En cuanto a la ventaja que presenta este tipo de microscopía, se encuentra el número de cortes que es posible analizar de una misma muestra y la posibilidad de construir la imagen a partir de toda la información recogida de diferentes planos. Además de garantizar una gran resolución espacial. La microscopía confocal permite estudiar la expresión de biomoléculas en una muestra, así es posible captar actividades enzimáticas, reacciones de oxidación o unión entre células, entre otras funciones. Para poder observar la muestra biológica, ésta no debe ser muy gruesa y tiene que estar marcada con moléculas fluorescentes (López *et. al.*, 2016).

La otra técnica para estudiar la superficie de una muestra *in vivo* es la microscopía CrioFESEM. Este instrumento crioinmoviliza las muestras, a temperaturas de nitrógeno líquido (-130 °C). Una vez sumergidas en éste, se analizará la superficie con un Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo de Alta Resolución (FESEM). Este tipo de microscopía permite detectar estructuras concretas en el glucocálix de las células o microorganismos adheridos a la superficie de la muestra (Erlandsen *et. al.*, 2001).

Como resultado del desarrollo de un biofilm, la actividad microbiana en superficies metálicas suele provocar el deterioro metálico, el cual es conocido como biocorrosión. Este fenómeno ocurre debido a la acción de un grupo de microorganismos, o bacterias en este caso, que se han adherido a la superficie metálica. La actividad de este tipo de microorganismos junto con la difusión molecular necesario, genera gradientes de metabolitos entre las bacterias y la superficie, por lo que se desarrollan relaciones y consorcios metabólicos que, al acentuarse conforme crece el biofilm, provocarán el deterioro del material con el tiempo. Entre las sustancias y metabolitos que segregan, la formación de ácidos volátiles incrementa la tasa de corrosión y la heterogeneidad del recubrimiento en ambientes oxigenados pueden acentuar el ataque local del metal al generarse celdas de aireación. El resultado de estos ataques a la superficie puede generar como resultado picaduras, cambios en el grosor del óxido y manchas superficiales. Como se ha explicado previamente, la adhesión dependerá de la facilidad que tengan las bacterias para sobrevivir en la superficie, la cual variará en función del tratamiento superficial aplicado, en consecuencia, cada tratamiento se verá en mayor o menor medida afectado por la acción bacteriana (*Bethencourt et. al., 2010*).

2.5. BIOFILM

2.5.1. INTRODUCCIÓN

Los biofilms o biopelículas son congregaciones heterogéneas de diferentes microorganismos sobre una superficie, donde desarrollan una matriz extracelular de polisacáridos, proteínas y ADN. Los biofilms son un mecanismo de supervivencia que desarrollan ciertos microorganismos con tal de garantizar su supervivencia y crecimiento. La matriz extracelular será una barrera física contra aquellos agentes que pudiesen afectar a los microorganismos que la constituyen.

Los microorganismos capaces de crecer en forma de biofilm son bacterias, hongos y levaduras, en el presente trabajo nos centraremos en las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, pues son las bacterias más comunes en infecciones hospitalarias. Al asociarse las bacterias y desarrollar el biofilm sobre la superficie protésica, estos organismos consiguen 1.000 veces más resistencia y tolerancia contra el sistema inmunitario del huésped y los antibióticos (*Kumar et. al., 2017*).

Los biofilms son elementos que podrían alterar la evolución de la integración, pudiendo incluso provocar el rechazo del implante en el organismo y, por tanto, obligando a una nueva intervención con el fin de extraerla. Debido a su tolerancia y resistencia a los tratamientos antimicrobianos, es necesario aplicar una combinación de diferentes terapias para tratar de acabar con la infección definitivamente (*Koo et. al, 2017*). Los microorganismos culpables de provocar la infección pueden adherirse en la superficie debido a que entran en contacto directo con ésta o porque son transportados desde un foco infeccioso. Hay que tener en cuenta que las bacterias no son capaces de colonizar por sí mismas las superficies, por lo que será necesario contar con colonizadores primarios, que son los encargados de preparar la superficie generando una película para ser capaces de colonizarla posteriormente. Las células que forman parte de la biopelícula cuentan con un fenotipo alterado, en comparación con las de su misma especie que tienen vida libre, este fenotipo afecta a la tasa de crecimiento y a su expresión génica (*Lario, 2019*), lo que afecta a la eficacia del tratamiento antibiótico.

2.5.2. INFECCIÓN PROTÉSICA

Según los datos del Instituto Nacional de Salud, el 60% de las infecciones microbianas se producen por el desarrollo del biofilm. Este dato provoca que se incremente el gasto sanitario para paliar la enfermedad (*Zambrano y Suárez, 2006*).

Los biofilms en implantes médicos pueden desarrollarse al haberse puesto en contacto los materiales con focos donde habiten microorganismos, como puede ser el propio paciente, personal sanitario o del propio ambiente, aunque también puede producirse por una infección de la herida. Una vez los microorganismos se han adherido a la superficie del implante y, por tanto, se comienza a desarrollar el biofilm y se convierte en una fuente de infección. Este proceso se debe a que la biopelícula libera endotoxinas, grupos de bacterias

para seguir colonizando nuevas superficies e incluso desarrollan bacterias más resistentes a los antibióticos (Lasa, 2005).

2.5.3. COMPOSICIÓN Y ORGANIZACIÓN DEL BIOFILM

De la estructura del biofilm, a lo sumo, el 20% del volumen de ésta serán las bacterias. El 80% del volumen restante lo ocupa la matriz extracelular, la cual está formada mayoritariamente por agua. Además, su composición se basa en polisacáridos, que se producen por los propios microorganismos. Junto a los polisacáridos, también se encuentran proteínas y ácidos nucleicos, entre otros componentes que provienen de la lisis de las bacterias. Estos componentes son las sustancias poliméricas extracelulares. A parte de éstas, es posible encontrar iones, sales minerales, partículas de corrosión o sedimento, estas partículas pueden dotar a la matriz de capacidad para interactuar con antimicrobianos, por lo que protegería a las bacterias de su efecto. La producción de sustancias poliméricas extracelulares dependerá del ambiente en el que se encuentren.

En lo relativo a la estructura, la matriz no forma un complejo sólido. Las bacterias que forman el biofilm se apilan unas sobre otras, de modo que formarán torres sobre las bacterias que están adheridas a la superficie del implante. Al estar unas sobre otras, se formarán canales entre bacterias para garantizar que todas reciben oxígeno, nutrientes y agua necesarios para su supervivencia, estos canales garantizan el correcto funcionamiento del metabolismo de todas las bacterias.

La estructura del biofilm no es homogénea, pues en función de la profundidad o ambiente, éste tendrá una composición diferente, razón por la cual el metabolismo será más activo en la superficie de la estructura que en las capas más profundas.

COMPOSICIÓN 70 – 97 % de agua, 2 – 5 % microorganismos y 1 – 2 % exopolisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos.

PROPIEDADES	Adherencia, resistencia a los antimicrobianos, protección frente a los anticuerpos y la fagocitosis, mayor capacidad para captar nutrientes, crecimiento ralentizado, comunicación interbacteriana y heterogeneidad.	
ARQUITECTURA	Compleja, moldeable, sistemas de canales y microambientes.	
IMPACTO	Industria	Contaminación o biofouling
	Medio Ambiente	Biorremediación
		Biocontrol
	Salud humana	Papel protector
		Infeción

Tabla 2. Características y composición de los biofilms. Adaptado de (Domenech, 2012).

Los microorganismos responsables de provocar la infección pueden adherirse a la superficie debido a que entran en contacto directo con ésta o porque son transportados desde un foco infeccioso, previamente será necesario contar con colonizadores primarios para preparar la superficie que las bacterias colonizarán posteriormente.

Así pues, una vez puesto el implante en contacto con el entorno, se llevará a cabo la carrera por la superficie, esto es una competición entre las células encargadas de la regeneración tisular y las bacterias por conseguir adherirse a la superficie de la aleación. Si las células ganan terreno a las bacterias, el implante será un éxito, sino podría haber una infección que forzase a retirar la prótesis. Durante este proceso se desarrollan dos fases.

La primera fase es reversible y espontánea, en ella participan las interacciones fisicoquímicas entre la bacteria y la superficie de la muestra. En la fase uno, se atraerán las bacterias y, posteriormente, sufrirán la adsorción y adherencia a la superficie. Las fuerzas que participan son las fuerzas de Van der Waals, los movimientos Brownianos, fuerzas gravitacionales, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. A su vez, el movimiento de las bacterias se puede dirigir en función del gradiente de concentración o por la motilidad direccional. Además, cabe destacar que las bacterias encuentran el medio acuoso mucho más afable para su crecimiento, pues acumulan los nutrientes que necesitan en las superficies, aspecto que facilita su supervivencia y desarrollo.

Por otro lado, la segunda fase posee un tiempo dependiente e irreversible, pues ya intervienen las interacciones celulares y moleculares (cápsula, fimbrias, pili y slime, entre otros) desarrollado entre el tejido y el material. El tipo de unión de la bacteria a la superficie dependerá de la hidrofobicidad y de la cantidad de adhesinas en las fimbrias. A más adhesinas, mayor virulencia, por lo tanto, las bacterias permanecerán y se desarrollarán más en el huésped (*Pérez, 2014*).

Una vez las bacterias han conseguido llegar a la superficie del implante, éstas comienzan a diferenciarse incrementando así su tasa de crecimiento. Llega un punto en el que el sistema inmunitario del huésped no es capaz de eliminar las bacterias, por lo que finalmente genera un biofilm o biopelícula que los antibióticos son incapaces de eliminar. Los biofilms son los responsables de las infecciones crónicas y los fallos del implante, ya que está íntimamente relacionados con la osteointegración. Además, cabe destacar, que las cepas capaces de resistir a los antibióticos no se pueden tratar una vez estén adheridas a la superficie del implante (*Lario, 2019*).

Los factores que afectan al ritmo de crecimiento de las bacterias son: la naturaleza de la cepa, el tipo de unión, la hidrofobicidad, el medio de cultivo, fase de crecimiento, el tiempo de exposición, la temperatura, la concentración bacteriana y la superficie a colonizar. Respecto al último factor, cabe destacar que la rugosidad es una característica muy importante para este proceso, pues a mayor rugosidad, las células dispondrán de mayor área superficial, por lo que tendrán más espacio para colonizar.

La formación de la biopelícula está basada en tres fases, como muestra la *Figura 15*: fijación, maduración y dispersión.

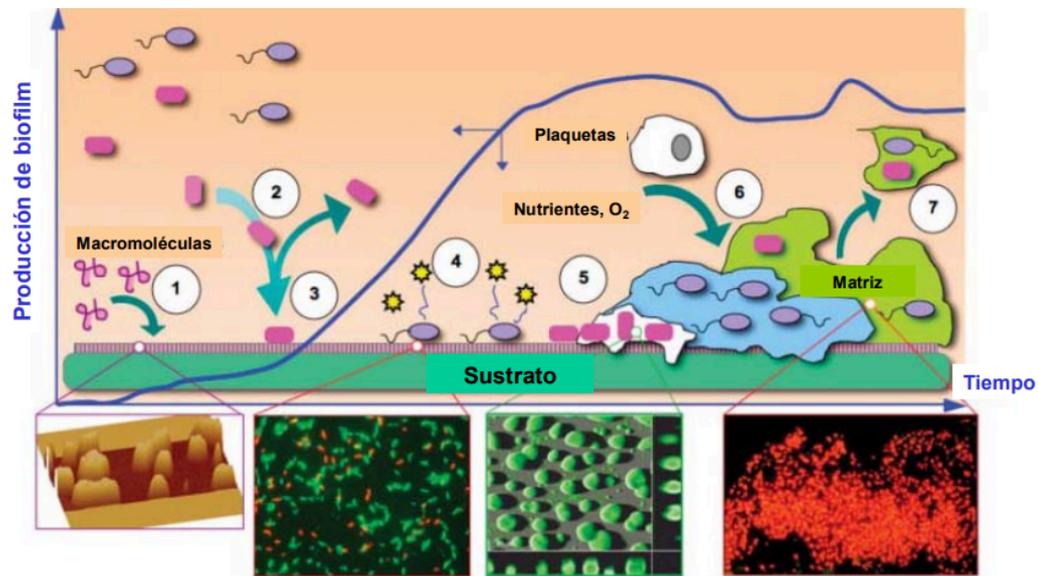


Figura 15. Resumen para el desarrollo del biofilm. Fuente: (Domenech, 2012).

La fijación es la primera etapa y ésta es una carrera por la superficie mediante las fuerzas hidrodinámicas y el movimiento Browniano, en la que si la bacteria se adhiere a la superficie de la prótesis o muestra.

Durante la segunda fase, la maduración, al estar con el medio adecuado para su desarrollo, las bacterias comenzarán a dividirse y acumularse en la superficie formando microcolonias. A la vez que se forman estos agrupamientos, se irá desarrollando una matriz extracelular (ECM) que será la estructura a partir de la cual se desarrollará una arquitectura tridimensional. Mientras se está formando esta ECM, las bacterias hijas pueden desprenderse de la estructura, por lo que se segregarán proteínas extracelulares para asegurar la estabilidad de la biopelícula. Esta ECM es un complejo a gran escala de quorum sensing, ya que protege a las bacterias inferiores, pero a su vez es capaz de establecer canales de comunicación entre la superficie y el medio.

Finalmente, en la fase de dispersión, una vez se alcanza una densidad celular específica, se comenzará a degradar la ECM para poder liberar bacterias de la biopelícula al medio y que así se pueda desarrollar otra microcolonia en otro sustrato. Se activa un mecanismo para iniciar la degradación de ECM que libera células incrustadas dentro de la biopelícula para dispersarse y reiniciar el desarrollo de la biopelícula en los sitios distales (Roy *et. al.*, 2018).

2.5.4. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO

Para prevenir la posible infección protésica es necesario la quimioprofilaxis quirúrgica y del personal, además de intervenir al paciente en un quirófano con flujo laminar. Para evitar una infección una vez realizada la intervención se tratará de encontrar un diagnóstico precoz mediante extracciones o sondajes, entre otros.

En cuanto al tratamiento, inicialmente se suministra tratamiento antibiótico sistémico para evitar que haya propagación de bacterias por el torrente circulatorio, éste será de amplio espectro, que se irá especificando en el momento en el que se identifique la naturaleza del microorganismo que ha provocado la infección (*Lasa, 2005*).

Sin embargo, para eliminar las biopelículas al final lo más eficaz es el reemplazo de los implantes contaminados y la inhibición del quorum sensing, el cual se trata de un mecanismo de comunicación entre los individuos para desarrollar acciones en conjunto y así favorecer a toda la colonia bacteriana (*Roy et. al., 2018*). Así que se someterá al paciente a una terapia antimicrobiana agresiva y una intervención quirúrgica en la que se retirarán los implantes y tejidos infectados (*Lasa, 2005*).

El hecho de volver a intervenir a un paciente debido al fallo de la prótesis se encuentra principalmente debido a apantallamiento de tensiones, desgaste, corrosión, baja tasa de osteointegración o infección, siendo la última razón la más frecuente. La principal razón de una nueva intervención quirúrgica es el fallo de la prótesis. A su vez, si la tasa de osteointegración es demasiado baja puede ocurrir una colonización bacteriana, afectando tanto a la superficie protésica como a los tejidos adyacentes. Esto podría dificultar la acción de los antibióticos y acabar ocasionando osteomielitis, la cual es una infección súbita (*Pérez, 2014*).

Actualmente se están tratando de desarrollar recubrimientos de nanotubos de óxido de titanio que contengan antibióticos o bactericidas para evitar la posible adhesión y proliferación bacteriana durante el proceso de implantación de la prótesis. La capacidad de los nanotubos dependerá principalmente de su morfología, la cual es modificable con el tratamiento de anodizado electroquímico (*Lario, 2019*). También se trabaja para conseguir implantes inteligentes que sean capaces de detectar patógenos e impedir la infección (*Lasa, 2005*).

2.5.5. TIPOS DE BACTERIAS

Muchas especies de microorganismos son capaces de desarrollar sobre las superficies biofilms infecciosos. Las especies de bacterias más comunes que suelen desarrollar biopelículas son las especies *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Enterococcus* spp, *Escherichia Coli* y *Pseudomonas* spp. En lo relativo a las especies fúngicas, éstos también son capaces de desarrollar biopelículas, la infección suele ocurrir debido a que este tipo de microorganismos se encuentran presentes en el medio hospitalario. Así pues, las especies más comunes son las *Candida* spp, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus laurentii* y *Aspergillus* spp, *Pneumocystis*, *Coccidioides*, *Zygomycetes*, *Blastoschizomyces*, *Saccharomyces*, *Malassezia* y *Trichosporon* (Castrillón et. al. 2013).

2.5.5.1. BACTERIAS ANAEROBIAS GRAM NEGATIVAS

2.5.5.1.1. PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Las *P. aeruginosa* se trata de una bacteria móvil aerobia con forma de bacilo y gram negativo. Morfológicamente poseen una longitud entre 1 y 3 μm con una anchura entre 0'5 y 1 μm . Estas bacterias suelen presentarse en colonias aplanadas, lisas y con bordes en sierra. Se trata de bacterias con movimiento, debido a que poseen un flagelo, el cual les ayuda tanto a desplazarse como a adherirse a la membrana celular. Esta bacteria es posible localizarla en el agua, suelo y en los recintos hospitalarios, razón por la cual puede contaminar a ciertos pacientes que entren en contacto con ella, se trata de uno de los patógenos oportunistas más comunes en los seres humanos.

Sufren alteraciones genéticas y fenotípicas, por lo que existen multitud de morfologías, las cuales variarán en función de dónde se localicen dentro del individuo. Además, es capaz de sobrevivir en ambientes hasta 42 °C y ricos en sales.

Se reproducen por bipartición, como la mayoría de las bacterias. *P. aeruginosa* se puede encontrar en hospitales, profesionales y material quirúrgico, por lo que este hecho explica su facilidad para infectar pacientes. Para ello, es necesario que exista contacto directo alguna herida o debilitamiento de la piel. También es posible contraer esta infección a partir del sistema respiratorio y digestivo, por aspiración o ingestión de fluidos contaminados (Vilar et. al., 2018).

2.5.5.2. BACTERIAS ANAEROBIAS GRAM POSITIVAS

2.5.5.2.1. STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Las bacterias del género *Staphylococcus* son cocos gram positivos y anerobias facultativas. Morfológicamente poseen un diámetro de 0'5 a 1'5 μm . Este tipo de bacterias pueden presentarse aisladas o en grupos, formando cadenas. Se trata de bacterias que carecen de movimiento, sin cápsula y no esporuladas. Dentro de este género, es posible encontrar hasta 32 especies, en las cuales hay 16 de ellas que están presentes en la microbiota de la piel o en las mucosas de los seres humanos. Pueden ser especies patógenas si el huésped padece inmunosupresión.

Es una bacteria oportunista que se encuentra en la microflora humana. Habitualmente, esta bacteria coloniza la mucosa nasal. *S. aureus* es de las especies menos infecciosas, pero puede producir multirresistencia a los antibióticos, cabe destacar, que debido a este hecho actualmente han remergido las infecciones de esta bacteria.

Para identificar este microorganismo se realizan pruebas sanguíneas, de tejidos, líquidos o abscesos. Posteriormente se emplea la tinción de Gram para identificar el tipo celular (*Cervantes et. al., 2014*).

La colonización por parte de esta especie comienza, habitualmente, en las fosas nasales. La bacteria consta de adhesinas superficiales y factores de virulencia que permiten la colonización nasal. Las adhesinas, junto a los ácidos teicoicos, permiten que la *S. aureus* se una a proteínas de la matriz del huésped (*Rodríguez et. al., 2015*).

Estas son las razones de interés de los objetivos planteados previamente.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

A pesar de que no se ha podido realizar la parte práctica debido a la crisis del Covid-19, en el siguiente apartado se especificarán tanto los materiales como los métodos necesarios para desarrollar el proyecto que se plantea.

3.1. PLANIFICACIÓN DEL PROYECTO

Para una mejor comprensión, en la siguiente figura se esquematizan las fases y etapas de que se seguirán para desarrollar correctamente el proyecto que se plantea.

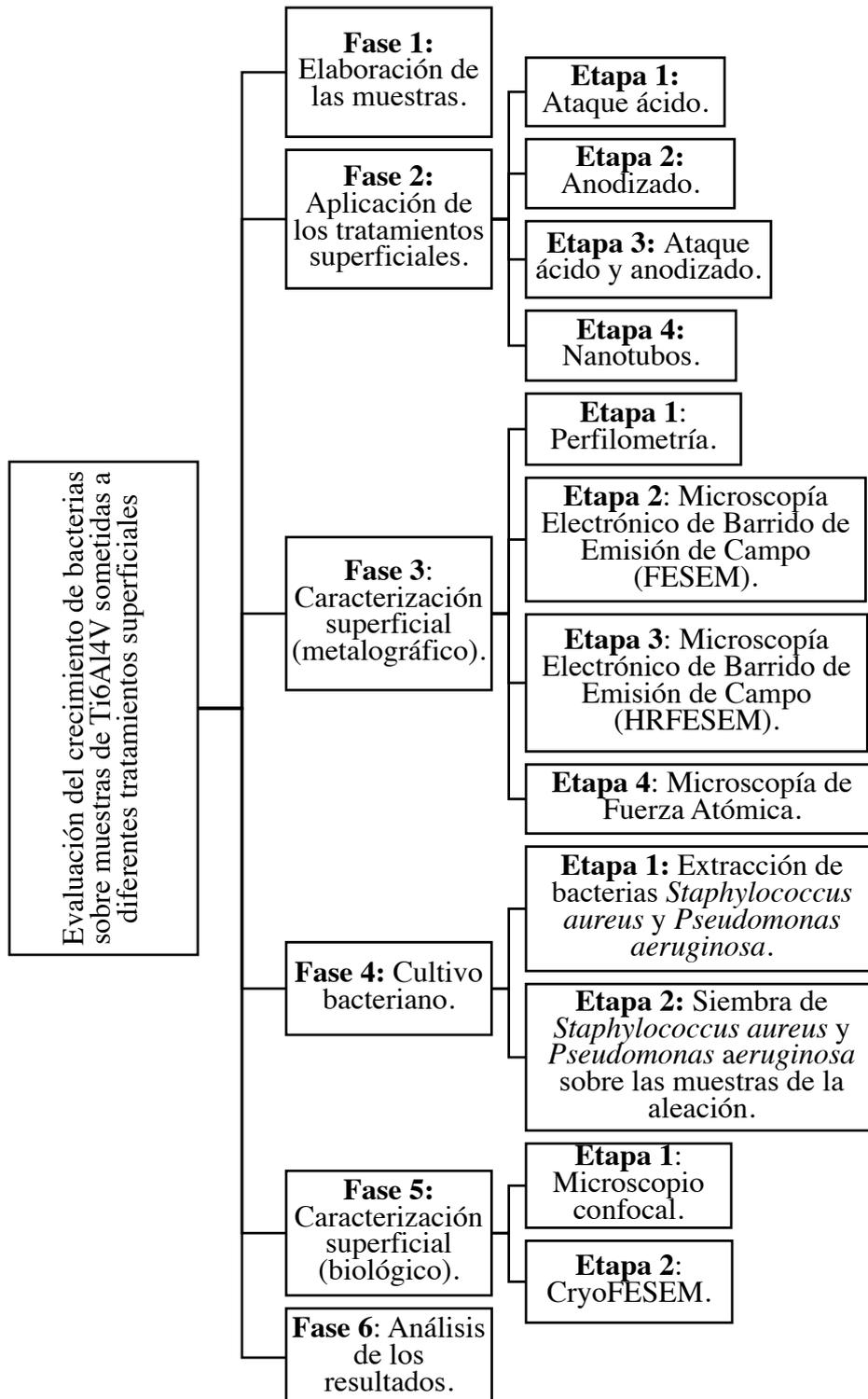


Figura 16. Esquema para la planificación del proyecto.

3.2. ELABORACIÓN DE LAS MUESTRAS

El objetivo es conseguir un total de 96 muestras de aleación Ti6Al4V cuyas dimensiones son 20 x 2 mm. Estas 96 muestras se dividirán posteriormente en cuatro grupos, pues a cada uno se le aplicará un tratamiento superficial diferente.

Las muestras fueron suministradas por Zimmer Biomet. Éstos produjeron los 96 discos de Ti6Al4V a partir de una barra de aleación, la cual se modificará por medio del torneado, proceso que consiste en arrancar viruta hasta lograr las dimensiones deseadas.

La maquinaria necesaria será:

- Torno CNC.
- Máquina de corte Struers Accutom-5.
- Máquina de desbaste Knuth-Rotor 3.
- Pulidora semiautomática Labopol-5 de Struers.
- Microscopio óptico.
- Maquinaria de secado.

Los materiales empleados serán:

- Barra de titanio Ti6Al4V, cuya composición se especifica en la norma ASTM F-136.
- Agua oxigenada.
- Alcohol etílico (96 °).
- Agua destilada.
- Papel de lija de tamaño de grano 220, 500 y 1000.
- Paño para abrasivo fino.
- Paño para abrasivo grueso.
- Suspensión de diamante de 9 μm .
- Suspensión de sílice coloidal de 0'05 μm .

Para elaborar 96 discos de Ti6Al4V, se parte de una primera barra de dicha aleación, cuya composición se especifica a continuación.

Composición de la aleación Ti6Al4V								
Elemento	Al	V	Fe	C	O	N	H	Ti
% en peso	5'5 – 6'5	3'5 – 4'5	0'25	0'08	0'13	0'05	0'012	El resto

Tabla 3. Composición de la aleación siguiendo la norma ASTM F-136.

Adaptación de (Perlines, 2019).

La barra sufrirá un proceso de cilindrado por medio de un torno. Para ello, se debe fijar la barra en la mordaza, de forma que se encuentre perpendicular a la herramienta de corte. Una vez fijada la barra, se mueven los carros para colocar la herramienta de corte sobre la superficie de la barra. Se introducen los parámetros (velocidad de giro, velocidad de avance y ángulo de la herramienta de corte) en el software del torno. La barra comenzará a girar sobre su propio eje de rotación, de modo que la herramienta de corte arrancará viruta

logrando así las dimensiones que se desean (20 mm). Durante este proceso, se generará calor, ya que la aleación de titanio es un mal conductor de éste, por lo que mientras se corta será necesario suministrar grandes cantidades de refrigerante.

Una vez conseguida la barra con el diámetro deseado, se para la máquina y se suelta la mordaza del torno al que está sujeto la barra. El siguiente paso para conseguir los discos es cortar el cilindro. Para ello dispondremos de una cortadora, en la que nuevamente se fijará la barra a su mordaza, quedando perpendicular al eje de corte, donde se encuentra a la sierra. Se mueve la hoja hasta el principio de la barra y se realiza un primer corte, esta pieza será la que se deseche. A partir de este corte, ya se realizarán cortes cada 2mm durante toda la longitud de la barra, hasta conseguir 96 discos de aleación cuyas dimensiones serán de 20 x 2 mm.

En tercer lugar, las muestras obtenidas deberán pasar por un proceso de desbaste. Éste trata de eliminar cualquier distorsión que se haya producido durante el proceso de corte. Para realizarlo, será necesario pasar la muestra por sucesivas lijas, cada vez de mayor granulometría. Así pues, se empleará la máquina de desbaste Knuth-Rotor 3, por lo que se abrirá la llave de paso de agua y se empezará con un disco de papel de esmeril 220. Se enciende la máquina y una vez comience el disco a girar se colocará la muestra de Ti6Al4V perpendicular a la superficie del papel esmeril, aplicando siempre la misma presión para que la superficie sea lo más homogénea posible. Una vez conseguida dicha superficie, se observará a microscopio óptico la muestra, una vez se verifique que las líneas de la lija sobre la muestra son homogéneas, se repetirá el proceso anterior pasando a una lija de mayor granulometría, primero 500 y posteriormente 1000. Cada vez que se vaya a pasar a una lija de grano superior, será necesario lavar la muestra con agua destilada, sumergirla en alcohol y secarla con ayuda de un secador.

Finalmente, una vez desbastadas todas las muestras, el siguiente paso será el pulido. Para ello se empleará una pulidora semiautomática Labopol-5 de Struers. En primer lugar, la muestra sufrirá un pulido grueso y, a continuación, uno fino. Para el grueso, se colocarán las muestras de titanio en el portamuestras, en este caso se empleará un paño grueso al que se le verterá suspensión de diamante de $9\ \mu\text{m}$. Para pulirlas, se enciende la máquina y se mueven las muestras en sentido contrario al que gira el disco. Se apaga la máquina, se lavan con agua y jabón, luego con agua destilada, se sumergen en alcohol y se secan con ayuda de un secador. Para el pulido fino, se verterá una suspensión de sílice coloidal de $0,05\ \mu\text{m}$ con agua oxigenada sobre un paño fino y se repetirá el proceso anterior. Finalmente se volverá a lavar con agua jabonosa, agua destilada, alcohol y se secará con secador.

El objetivo de esta etapa es conseguir 96 muestras de 20 x 2 mm que tengan una superficie especular (*Perlins*, 2019).

3.3. TRATAMIENTOS SUPERFICIALES QUE APLICAR

De todos los tratamientos superficiales explicados en el estado del arte, en el presente proyecto sólo se aplicarían cuatro, los cuales serían: ataque ácido, anodizado, ataque ácido con anodizado y nanotubos.

3.3.1. ATAQUE ÁCIDO

El primer lote de muestras se someterá a ataque ácido.

La maquinaria y fungible necesarios será:

- Limpiadora por ultrasonidos.
- Recipiente.

Los materiales empleados serán:

- Acetona.
- Alcohol etílico (96 °).
- Agua destilada.
- 100 ml de solución de ácido clorhídrico (HCl).
- 100 ml de solución de ácido sulfúrico (H₂SO₄).
- Probetas de Ti6Al4V.

El primer paso de este tratamiento superficial consiste en limpiar las muestras mecanizadas durante 15 minutos por ultrasonidos con acetona. A continuación, se limpiarán con alcohol durante 20 minutos y agua destilada durante otros 20 minutos para eliminar cualquier impureza que pudiese haber en la superficie de la probeta de Ti6Al4V.

Una vez limpiadas, se prepara una mezcla con 100 ml de ácido clorhídrico y 100 ml de ácido sulfúrico, y se sumergen las muestras en dicha mezcla durante 2 h a temperatura ambiente.

El objetivo es acabar con una muestra cuya superficie presente irregularidades, como poros y crestas, aumentando la rugosidad y área de adhesión (Pérez, 2016).

3.3.2. ANODIZADO

El anodizado se aplicará sobre el segundo lote de muestras.

La maquinaria necesaria será:

- Limpiadora por ultrasonidos.
- Celda electroquímica.
- Fuente DC Power Supply SM 400 - AR – 8.
- Maquinaria de secado.

Los materiales empleados serán:

- Solución de bórax con trifosfato de sodio.
- Agua destilada.
- 150 ml de ácido nítrico (HNO_3) al 70%.
- 10 ml de ácido fluorhídrico (HF) al 40%.
- Solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1M.
- Alcohol etílico (96 °).
- Probetas de Ti6Al4V.
- Placas de acero inoxidable.

Partimos de muestras que tienen una superficie cuya apariencia es especular. El anodizado es el proceso por el cual se modificará la superficie de la muestra generando una capa de óxido sobre ella. El primer paso consiste en limpiar la superficie de las probetas de aleación, tanto de grasa como de óxido. Para ello se colocan en la limpiadora por ultrasonidos con una solución de bórax con trifosfato de sodio.

Una vez que las piezas se han limpiado, sufrirán un proceso de decapado sumergiéndolas en una solución con 150 ml de ácido nítrico y 10 ml de ácido fluorhídrico durante 2 minutos, luego se enjuagarán con agua destilada y se colocarán en la celda electroquímica con una solución de ácido sulfúrico 1M. Para montar la celda, el ánodo serán las muestras de Ti6Al4V y el cátodo será una placa de acero inoxidable, dejando una distancia de 20 cm entre ambos electrodos. Se conectará la fuente de tensión con un voltaje de 18V durante un periodo de 15 minutos. Finalmente, se apagará la fuente de tensión y las muestras se lavarán con agua destilada, alcohol etílico y se secarán en el equipo de secado.

El objetivo de esta etapa es conseguir que las muestras hayan cambiado de color, en función del voltaje y tiempo de aplicación, con una capa de óxido continua cuyo espesor oscile entre 5 nm y 1 μm , porosa y adherida a la muestra (*Espinosa y Jaimes, 2006*).

3.3.3. ATAQUE ÁCIDO Y ANODIZADO

El tratamiento superficial de ataque ácido y posterior anodizado se aplicará sobre el tercer lote de muestras.

La maquinaria necesaria será:

- Celda electroquímica.
- Limpiadora por ultrasonidos.
- Recipiente.
- Fuente DC Power Supply SM 400 - AR – 8.

Los materiales necesarios serán:

- Acetona.
- Alcohol etílico (96 °).
- Agua destilada.
- 100 ml de solución de ácido clorhídrico (HCl).
- 100 ml de solución de ácido sulfúrico (H₂SO₄).
- Solución de bórax con trifosfato de sodio.
- 150 ml de ácido nítrico (HNO₃) al 70%.
- 10 ml de ácido fluorhídrico (HF) al 40%.
- Solución de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1M.
- Probetas de Ti6Al4V.
- Placas de acero inoxidable.

El primer método que se aplicará sobre las muestras será el ataque ácido, luego el anodizado. Así pues, el primer paso será limpiar las muestras, las cuales se introducirán en una limpiadora por ultrasonidos de acetona durante 15 minutos, se sumergirán en alcohol etílico durante 20 minutos y, finalmente, se volverán a sumergir en agua destilada durante otros 20 minutos. Una vez limpiadas, se preparará la solución ácida con 100 ml de ácido clorhídrico y otros 100 ml de ácido sulfúrico. Las muestras se sumergirán en dicha solución durante 2 horas (Pérez, 2016).

Una vez pasadas las dos horas, las muestras se sacarán de la solución y pasarán de nuevo a la limpiadora por ultrasonidos junto con una solución bórax con trifosfato de sodio. Las probetas se sumergirán en 150 ml de ácido nítrico con 10 ml de ácido fluorhídrico durante 2 minutos, se enjuagan con agua destilada y se introducirán en la celda electroquímica con una solución de ácido sulfúrico 1M. El ánodo es la muestra en cuestión y el cátodo es una placa de acero inoxidable, ambos electrodos están separados 20 cm. Se conectará la fuente de tensión a 18V durante 15 minutos. Por último, pasado este tiempo, se apaga la fuente, se lavan las muestras de nuevo con agua destilada y alcohol etílico, y se secan en el equipo de secado. El objetivo de esta etapa es conseguir muestras porosas debido a la capa de óxido que se genera en su superficie y con otro color debido a la aplicación de voltaje. (Espinosa y Jaimes, 2006).

3.3.4. NANOTUBOS

La formación de nanotubos se aplicará en el cuarto lote de muestras.

La maquinaria necesaria será:

- Agitador.
- Pulidora semiautomática Labopol-5 de Struers.
- Celda electroquímica.
- Maquinaria de secado.
- Limpiadora por ultrasonidos.

Los materiales necesarios serán:

- Probetas de Ti6Al4V.
- Papel de lija de tamaño de grano 220, 500 y 1000.
- Detergente.
- Agua.
- Agua desionizada.
- Solución de ácido fluorhídrico (HF) (48% en peso).
- Solución de ácido nítrico (HNO₃).
- Agua destilada.
- Malla de platino.
- Solución ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1M.

Partimos de una superficie mecanizada, así que en primer lugar se pulirán las superficies con lijas de SiC de tamaño de grano 220, 500 y 1000. A continuación, se lavarán las muestras con detergente, agua y agua desionizada. El siguiente proceso es el pulido químico, para el cual se empleará una mezcla de HF, HNO₃ y agua, manteniendo la relación de volumen 1:4:5. Se sumergirán las muestras en esta mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente y con una agitación continua de 400 rpm. Una vez pasados los 5 minutos, se enjuagarán con agua destilada y se secarán en el equipo de secado.

Se obtiene así una superficie cuya rugosidad es inferior a los 100 nm. Así pues, para formar los nanotubos superficiales, se colocarán las muestras en la celda electroquímica, cuyo electrolito es H₂SO₄ 1M y 0'15% de HF siendo la muestra el ánodo y la malla de platino el cátodo. Se aplicará una tensión de 20 V durante una hora (*Ortiz, 2018*).

Finalmente, se apagará la fuente de tensión y se dejarán las muestras durante 15 minutos. Se neutralizará el electrolito que pudiese quedar en el interior de los nanotubos por medio de una solución de carbonato de sodio monohidratado 0'25 M, sumergiendo las muestras en ella. A continuación, se decapará la superficie mediante una mezcla de H₃PO₄ 0'1 M y un 0'08% de NaF, con tal de eliminar el óxido que se pudiese haber originado. Por último, para eliminar la disolución decapante y obtener muestras limpias, se volverá a neutralizar las muestras y limpiarán con ultrasonidos con agua destilada durante 10 minutos. El objetivo es obtener una superficie nanotubular lo más homogénea posible (*Lario, 2019*).

3.4. CARACTERIZACIÓN METALGRÁFICA DE LA SUPERFICIE

3.4.1. PERFILOMETRÍA

Se tomarán 4 muestras de cada tratamiento superficial para realizar el análisis perfilométrico, es decir, se analizarán un total de 16 muestras.

La maquinaria necesaria será:

- Perfilómetro Alpha-Step D-500.

Los materiales necesarios serán:

- Probetas con ataque ácido.
- Probetas con anodizado.
- Probetas con ataque ácido y anodizado.
- Probetas con nanotubos.

Las muestras de Ti6Al4V se colocan en el porta muestras y mediante el brazo del interferómetro se colocan debajo de la fuente de iluminación donde comenzará a medirse la topografía de ésta. Una vez el haz la haya recorrido, mediante el software y el monitor se podrá decodificar y tratar la información recogida, por lo que se formará una imagen. Este proceso se repetirá con las muestras seleccionadas de cada lote.

El objetivo es conseguir una imagen en la que se observen los cambios topográficos de las muestras, como aparece en la *Figura 17* y la *Figura 18* (Sainz *et. al.*, 1993).

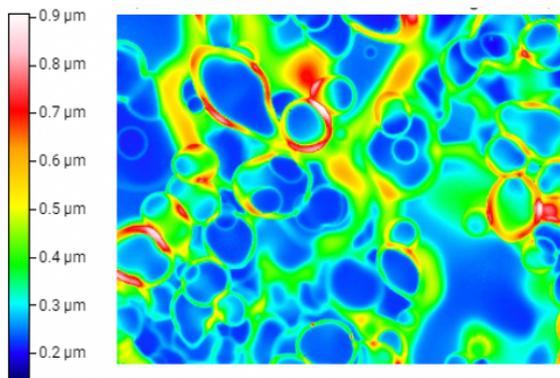


Figura 17. Representación perfilométrica bidimensional de una superficie recubierta por plasma spray. Fuente: (Filmmetrics, 2020).

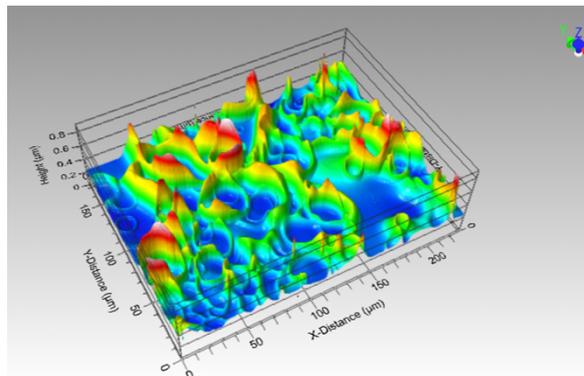


Figura 18. Representación perfilométrica tridimensional de una superficie recubierta por plasma spray. Fuente: (Filmmetrics, 2020).

3.4.2. FESEM

Para analizar la superficie de las probetas por Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo (FESEM), se tomarán 4 muestras de cada lote, realizando en total 16 mediciones.

La maquinaria necesaria será:

- Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo (FESEM) Ultra 55 Zeiss.

Los materiales necesarios serán:

- Probetas con ataque ácido.
- Probetas con anodizado.
- Probetas con ataque ácido y anodizado.
- Probetas con nanotubos.

Se colocan las probetas a analizar en el portamuestras. Este portamuestras se colocará en el interior del microscopio electrónico. Mediante el software se colocará la muestra debajo de la trayectoria del haz de electrones. Mediante el software será posible introducir los valores deseados para inspeccionar la superficie, para ello se elegirá un haz de un 5 kV para analizar la superficie. Finalmente, en el haz de electrones se podrá mover por la muestra, así que la imagen se visualizará en la pantalla. Este proceso se repetirá con las probetas seleccionadas de cada tratamiento superficial (Fort et. al., 2013).

El objetivo es conseguir una imagen a escala de grises que aporte información sobre la topografía de la superficie con gran resolución, la imagen sería similar a la mostrada en la *Figura 19*.

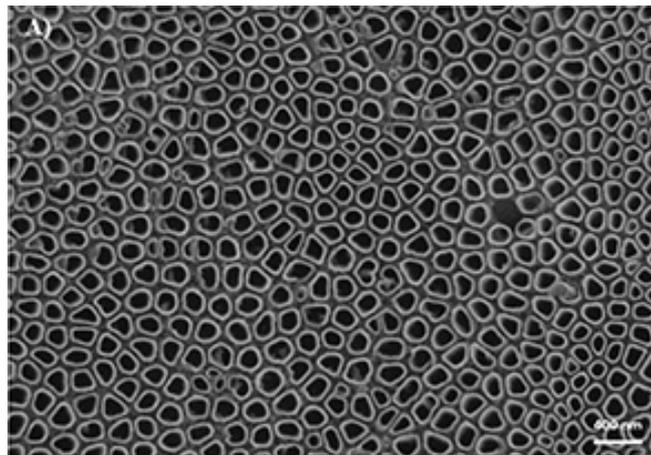


Figura 19. Representación de una superficie nanotubular por FESEM.

Fuente: (Lario et. al., 2018).

3.4.3. HRFESEM

Se tomarán 4 muestras de cada tratamiento superficial para realizar el análisis perfilométrico, es decir, se analizarán un total de 16 muestras.

La maquinaria necesaria será:

- Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo de Alta Resolución (FESEM) GeminiSEM Zeiss.

Los materiales necesarios serán:

- Probetas con ataque ácido.
- Probetas con anodizado.
- Probetas con ataque ácido y anodizado.
- Probetas con nanotubos.

El procedimiento para obtener imágenes por Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo de Alta Resolución es el mismo que el descrito en el FESEM. La única modificación será la diferencia de potencial empleado, pues para visualizar superficies de titanio o aleaciones se empleará un potencial mayor del habitual, superior a 10 kV (*Fort et. al., 2013*).

El objetivo es conseguir una imagen a escala de grises y con alta resolución de las superficies analizadas como en la *Figura 20* y *Figura 21*.

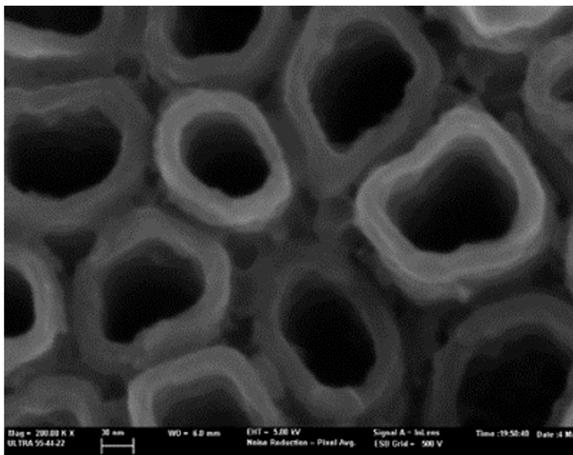


Figura 20. Representación de una superficie nanotubular por HRFESEM. Fuente: (Amigó, 2016).

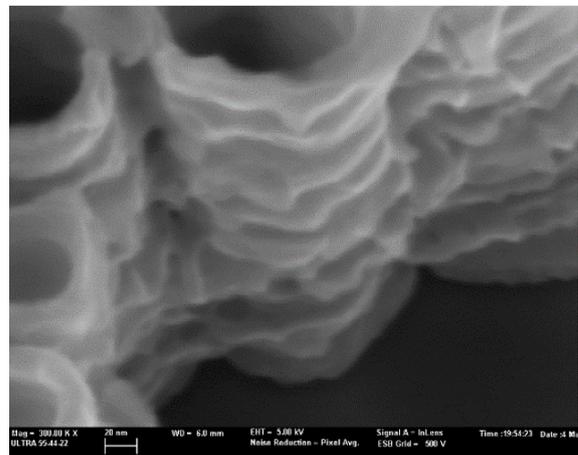


Figura 21. Detalle de la inclinación de los nanotubos por HRFESEM. Fuente: (Amigó, 2016).

3.4.4. AFM

Para analizar la superficie de las probetas por microscopía de Fuerza Atómica, se tomarán 4 muestras de cada lote, realizando un total 16 mediciones.

La maquinaria necesaria será:

- Microscopio de Fuerza Atómica Multimode 8 de Bruker.

Los materiales necesarios serán:

- Probetas con ataque ácido.
- Probetas con anodizado.
- Probetas con ataque ácido y anodizado.
- Probetas con nanotubos.

Se colocará la probeta a analizar en el portamuestras. Una vez asegurado el portamuestras, se encenderá el microscopio y se equilibrará para evitar cualquier movimiento u oscilación, pues este instrumento es muy sensible. Cuando se haya asegurado contra vibraciones, se encenderá el software y monitor. Se centrará la muestra para captar correctamente el haz láser en el sensor. El cantilever recorre la muestra. Una vez finalizado el recorrido, se mostrará en el monitor la imagen de la superficie de la muestra. Este proceso se repetirá con las probetas seleccionadas de cada tratamiento superficial (Reséndiz y Castellón, 2005).

El objetivo es conseguir información de la superficie del mismo tipo que la mostrada en la *Figura 22* y *Figura 23*.

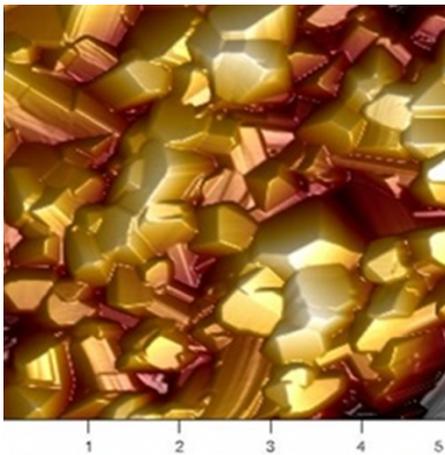


Figura 22. Imagen bidimensional de una superficie oxidada de titanio a 900 °C durante 20 minutos.

Fuente: (Amigó, 2016).

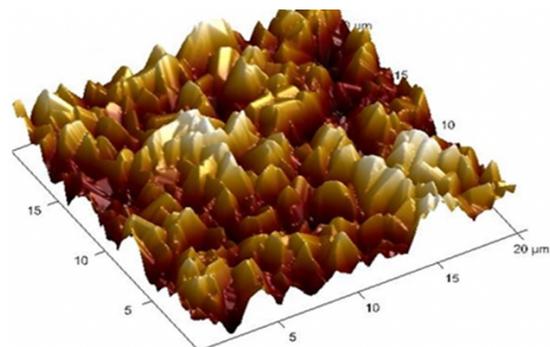


Figura 23. Representación tridimensional de una superficie oxidada de titanio.

Fuente: (Amigó, 2016).

3.5. CULTIVO BACTERIANO

La siguiente fase del proyecto consiste en cultivar las bacterias sobre las que se basa el estudio para comprobar si pueden provocar el rechazo de la prótesis al desarrollar un biofilm sobre su superficie.

3.5.1. PSEUDOMONAS AERUGINOSA

En la siguiente fase del proyecto se procede a la extracción y cultivo de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

La maquinaria necesaria será:

- Incubadora.

Los materiales necesarios serán:

- Frasco estéril.
- Hisopos.
- Agua estéril.
- Medio sólido TSA (Scharlab).
- Placas Petri.

En primer lugar, hay que acudir a un ambiente en el que la bacteria esté presente, como un hospital. Una vez ahí, se tomarán con varios hisopos mojados con agua estéril muestras de herramientas quirúrgicas, superficies e incluso las manos del personal médico. Estos hisopos se introducirán en frascos estériles para, posteriormente, realizar un cultivo bacteriano. Se toman placas Petri con medio sólido TSA y rasparán cuidadosamente los hisopos. Se cierran las placas y se incuban a 37 °C durante 24 h (Vilar et. al., 2003).

3.5.1. STAPHYLOCOCCUS AUREUS

En esta misma fase del proyecto se extraerá y cultivará la bacteria *Staphylococcus aureus*.

La maquinaria necesaria será:

- Incubadora.
- Frigorífico.

Los materiales necesarios serán:

- Torunda.
- Placa Petri.
- Medio sólido TSA (Scharlab).

Se toma un paciente y mediante una torunda se le extrae exudado nasal. La muestra puede conservarse durante 24 h como máximo, tanto a temperatura ambiente como en el frigorífico (2 – 8 °C). No es necesario prepararlas para inocularlos en los medios de cultivo. Se descarga la muestra de la torunda frotándola sobre la placa. Luego se utilizan medios de cultivo como el medio sólido TSA. Se almacenan entre 2 y 8 °C, una vez pasadas las 24 horas ya se podrá emplear el cultivo (*Baños et. al., 2011*).

3.5.2. DESARROLLO DEL BIOFILM

En este proyecto se emplearán cepas de la colección del gripe de infección grave obtenidas en pacientes con infecciones relacionadas con la prótesis articulares de las especies *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Se emplearán aquellas cepas cuya capacidad de formación de biofilm sea elevada.

La maquinaria necesaria será:

- Autoclave.
- Incubador.
- Frigorífico.
- Cabina de flujo laminar H-100.
- Sonicador.
- Agitador.

Los materiales necesarios serán:

- Asa bacteriológica.
- Placas Petri.
- Tubos estériles.
- Solución TBS (Scharlab).
- Medio sólido TSA (Scharlab).
- Solución Tampón Fosfato Salino (PBS).
- Erlenmeyer.
- Algodón.
- Frasco estéril.

Todos los medios y soluciones serán autoclavados a 121 °C a una presión de 1'2 atm durante 20 minutos.

En primer lugar, se debe preparar el inóculo, para ello se trabajará en la cabina. Se preparará un Erlenmeyer esterilizado, se abrirá el frasco donde se encuentra el caldo de cultivo y se verterán 50 ml sobre el Erlenmeyer. A continuación, con un asa estéril se recogerá la colonia de la cepa correspondiente crecida previamente en la placa de TSA y se disolverá en el medio de cultivo. El Erlenmeyer se tapaná con algodón graso y se incubará 18 h a 37 °C en agitación en el incubador.

Por otro lado, los discos de aleación se esterilizarán en autoclave durante 20 minutos a una temperatura de 121 °C. A continuación, se colocarán las muestras en pocillos, donde se añadirá por cada uno 1 ml de la solución TBS y 20 µl del inóculo de bacterias. Una vez cultivados, se incubará durante 48 h a una temperatura de 37 °C. Una vez finalizadas las 48 h de incubación, se lavan los discos con PBS para eliminar las bacterias que no hayan conseguido adherirse. Posteriormente se extraen los discos y en sumergirán en 2 ml de TBS para su sonicación. Por último, para separar el biofilm de las muestras, se someterá a cada

una a una agitación durante 1 minuto a 2500 rpm, se someterá de nuevo a sonicación durante 5 minutos y de nuevo se agitará durante otro minuto (Vilar *et. al.*, 2003).

El objetivo es ser capaces de contar el número de colonias de los diferentes biofilms de *P. aeruginosa* y *S. aureus* de cada tratamiento superficial para, posteriormente, poder determinar en cuál ha crecido más.

3.5.3. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LA SUPERFICIE

3.5.3.1. MICROSCOPIA CONFOCAL

De las muestras sembradas con bacterias, se elegirán al azar dos muestras de cada lote de tratamientos para cada una de las bacterias sembradas. Realizándose un total de 16 observaciones.

La maquinaria necesaria será:

- Microscopio confocal.

Los materiales necesarios serán:

- Solución PBS.
- Tinte SYTO 9.

Se tomarán las muestras a analizar una vez cultivadas las bacterias y se lavarán con PBS. A continuación, se teñirá la biopelícula con SYTO 9. Después, se colocará en microscopio e incidirá sobre la muestra un haz láser de argón con una longitud de onda de 488 nm. El campo de superficie analizado se reconstruirá tridimensionalmente mediante un software y se visualizará en el monitor. Para evaluar el crecimiento del biofilm se analizarán las muestras a las 8 h y 24 h tras la siembra.

El objetivo de esta práctica es evaluar la morfología y cinética del biofilm en función de la topografía superficial resultante con cada tratamiento aplicado. Las imágenes conseguidas permitirán observar las bacterias metabólicamente activas, en las que, gracias al colorante SYTO 9, se mostrarán las bacterias intactas en verde fluorescente y las que presenten la membrana dañada en rojo fluorescente, como en la *Figura 24* (López *et. al.*, 2016).

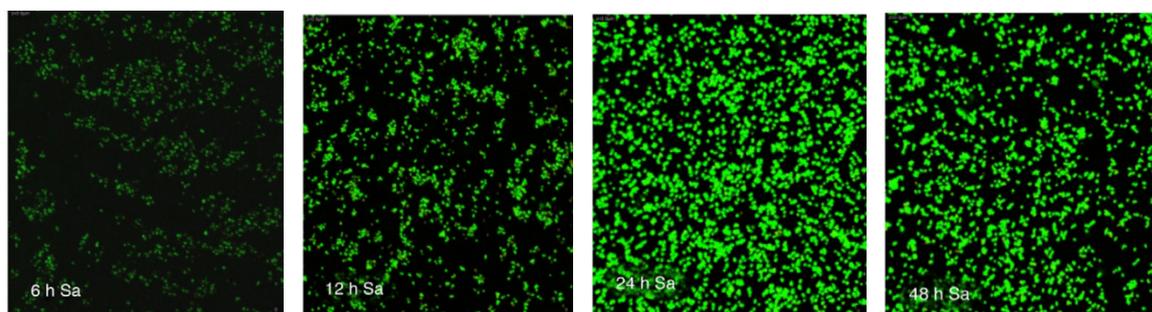


Figura 24. Representación del desarrollo del biofilm de S. Aureus a las 6, 12, 24 y 48 h en una superficie por microscopía confocal. Fuente: (Ibarra et. al., 2012).

3.5.3.2. MICROSCOPIA CRIO-FESEM

De las muestras sembradas con bacterias, se elegirán al azar dos muestras de cada lote de tratamientos para cada una de las bacterias sembradas. Realizándose un total de 16 observaciones.

La maquinaria necesaria será:

- Microscopio CrioFESEM PP3010T de Quorum Technologies.

Los materiales necesarios serán:

- Probetas con ataque ácido.
- Probetas con anodizado.
- Probetas con ataque ácido y anodizado.
- Probetas con nanotubos.
- Nitrógeno líquido.

El primer paso es tomar la muestra a analizar y criogenizarla en nitrógeno líquido. Esta muestra de Ti6Al4V criogenizada se transferirá al portamuestras del microscopio CryoFESEM PP3010T. Al igual que en el resto de equipos, mediante el software se colocará la probeta debajo del haz y se visualizará la imagen en el monitor, el cual se configurará con una energía de 1 a 5 kV. Este proceso se repetirá con las probetas seleccionadas de cada tratamiento superficial (Erlandsen *et. al*, 2001).

El objetivo es conseguir información de la superficie del mismo tipo que la mostrada en la *Figura 25*.

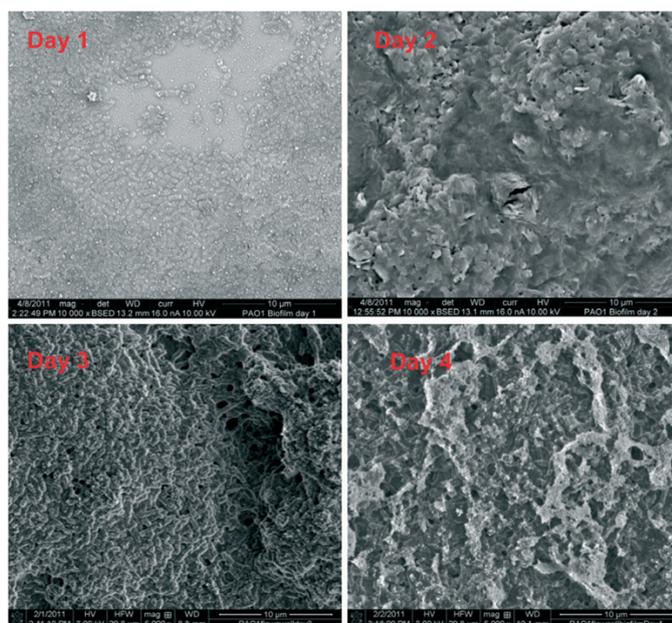


Figura 25. Representación en Crio-FESEM del desarrollo en cuatro días de la P. Aeruginosa por sobre una superficie metálica. Fuente: (Alhede et. al., 2012).

REFERENCIAS

Alhede, M., Qvortrup, K., & Liebrechts, R. (2012). Combination of microscopic techniques reveals a comprehensive visual impression of biofilm structure and composition. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 335-342. [Almagro, J. F. \(1999\). *Nuevo microanálisis cuantitativo de metales empleando microscopía electrónica de barrido con dispersión de energías de rayos X* \(Doctorado\). Universidad Complutense de Madrid. <https://eprints.ucm.es/3557/1/T23675.pdf>](https://watermark.silverchair.com/65-2-335.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kKhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAq8wggKrBgkqhkiG9w0BBwagggKcMIICmAlBADCCApEGCSqGSIb3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMLL1a_iS55IZK11fgAgEQgIICYpMW4M5IOh34vcMUGL-8GK7wvh-LOB1vH1a5di3iMn9EJMFqwYV9LW1SaA-ODAWO51NKhfYHURwnNtq5VsnUiY3OZQIsR5IA2SJ1h2mMC5tJ6CNofUpkS8ZboHJbIKbOacN3tc73kz0ALuvGcRDRqR9D8L11V1QpNrkDM-dzB36EWAmoIRMJR4FHWQsqXC67L5HM1Um9QZ5nyiXhfd9S5tdAu7Li01o9hKJjM1Pwd045OZayzEVCc0-aNX5vRJJiIOGkB_16hn23isdwqZKkfGZaRWiJU0vr0CBPamS5hjFXbmH4W1mNgNgcC6HyQ3y3r9U48jnWn6l8sNyjx0B1oZpt3D9OH10YO6pl6DCUEph1ZGwOhnusYq5q-PVslUGkDgR9prOKV5eMiRywlLx3P3iZXynzxFtXMrxIxvfv4TgdpTyWo5JMdUfGr2WxQEngVa8TWia8TzceGGsOAl6MiiGev59faSfi1L8jlxo9uLd7fTEAl7qFRJXLYPgWl6_inS6JVod3L_qX7TNxPTaqcqw5alQmGNo9mcxqOveSrWk5s1T4v9jLHw4EphTKmqgu5Pp4A6IfNmgJBuwr1QPoXxYZ9QDRRejJkS60fd8ytOam7kxIDyJBWQD-4rf0AeT0DnQyPobEE5f_kd0kIpelTzRsPS6Fna_F2Q9H6XZEvjihXWeGilpR4zsyYygdFUi8nOekmBSWKQyIUORu_IhAUbiSvQ8F3wCIWd6I8tU1H0L4VyBcNrQelfMvZV0XO5B6kdFkDv3TG8hR6pkfkGuwWWhkGvFAqwGBA3N_5h02k</p></div><div data-bbox=)

Amigó, A. (2017). *Influencia de las adiciones de Fe en las aleaciones de Ti-Nb-Ta obtenidas mediante tecnología de polvos, para aplicaciones biomédicas* (Doctorado). Universidad Politécnica de Valencia. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/80618/Amig%F3%20-%20Influencia%20de%20las%20adiciones%20de%20Fe%20en%20las%20aleaciones%20de%20Ti-Nb-Ta%20obtenidas%20mediante%20tecnol....pdf?sequence=1>

Araceli, F., García, F. J., Reyes, F. A., Zambrano, P. C., Hernández, G. M., & Rodríguez, E. R. (2016). Evolución Microestructural en Uniones de la Aleación Ti-6Al-4V Mediante el Proceso de Soldadura de Punto por Fricción-agitación. *Soldagem & Inspeção*, 185-194. <https://www.scielo.br/pdf/si/v21n2/0104-9224-si-21-2-185.pdf>

Avilés, M. (2013). *Desarrollo y caracterización de una capa de biopolímero sobre titanio con efectos antibacterianos* (TFG). Universidad Politécnica de Cataluña. https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/18814/TFG_Marc_Aviles_Palou.pdf

Baños, E. (2011). Identificación rápida de Staphylococcus aureus meticilina resistente (Cribado de portadores). *Informes de evaluación de tecnologías sanitarias*, 5-59. https://www.aetsa.org/download/publicaciones/antiguas/AETSA_2011_2_5_MRSA.pdf

Bethencourt, M., García de Lomas, J., Corzo, A., Villahermosa, D., & Matres, V. (2010). Efecto de la biopelícula en la corrosión de aceros inoxidables austeníticos en estaciones depuradoras de aguas residuales. *Revista de metalurgia*, 1-14. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3186460>

Blanco, P., Monsalve, L., Matos, N., Moreno, J., Núñez, E., & Velasco, E. (2018). La oseointegración de implantes de titanio con diferentes superficies rugosas. *SciELO*, 141-147. http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0213-12852018000300005&script=sci_arttext&tlng=pt

Castrillón, L. E., Palma, A., & Padilla, M. C. (2013). Biopelículas fúngicas. *Dermatol Rev Mex*, 350-361. <https://www.medigraphic.com/pdfs/derrevmex/rmd-2013/rmd135g.pdf>

Cervantes, E., García, R., & Salazar, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 28-40. <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>

Cori, J. W. (2018). *Estudio de la microscopía electrónica de barrido para el mantenimiento predictivo de superficies metálicas en sistemas de esterilización* (TFM). Universidad Mayor de San Andrés. <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/19199/TM-2163.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Correa, R. E., Fernández, T., Rodríguez, I., & Alcántara, D. (2014). Comportamiento microestructural de una aleación Ti6Al4V empleada en pulpa lixiviada. *SciELO*, 23-30. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1815-59442014000100003

Dalmau, A. (2012). *Caracterización y estudio del comportamiento electroquímico de aleaciones de titanio para uso biomédico* (TFM). Universidad Politécnica de Valencia. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/27283/TFM%20-%20ALBA%20DALMAU%20BORR%3%81S%20-%20JULIO%202012.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Dalmau, A., Vega, J. M., Vara, G., & Díez, J. A. (2019, 30 abril). *Caracterización de materiales y recubrimientos*. Canales Sectoriales Interempresas. <https://www.interempresas.net/Pintura/Articulos/244722-Caracterizacion-de-materiales-y-recubrimientos.html>

Davey, R. (2019, 22 octubre). *Ventajas y desventajas de la microscopía electrónica*. News Medical Life Sciences. [https://www.news-medical.net/life-sciences/Advantages-and-Disadvantages-of-Electron-Microscopy-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/Advantages-and-Disadvantages-of-Electron-Microscopy-(Spanish).aspx)

Delgado, J. (2012). *Estudio de la influencia sobre la microestructura y las propiedades mecánicas de la altura de fabricación para la aleación Ti6Al4V Eli procesada mediante la tecnología aditiva Electron Beam Meltin* (TFG). Universidad Politécnica de Valencia. <https://pdfs.semanticscholar.org/e764/5443238bc97c19f0a44da1e1f78e1f2f868e.pdf>

Domenech, M. (2012). *Biofilmes de Streptococcus Pneumoniae: Genética, composición y terapia* (Doctorado). Universidad Complutense de Madrid. <https://eprints.ucm.es/16601/1/T33980.pdf>

Donachie, M. (1989). *Titanium: a Technical Guide*. ASM.

Dorado, K., Zuluaga, B., & Estupiñán, H. (2017). Análisis de la bioactividad de Mg AZ31 recubierta por PEO (Plasma Electrolytic Oxidation). *Universidad Nacional de Colombia*, 328-337. https://www.researchgate.net/publication/326565550_Analisis_de_la_bioactividad_de_Mg_AZ31_recubierta_por_PEO_Plasma_Electrolytic_Oxidation/fulltext/5b568837aca27217ffb6d442/Analisis-de-la-bioactividad-de-Mg-AZ31-recubierta-por-PEO-Plasma-Electrolytic-Oxidation.pdf

Duraccio, D., Mussano, F., & Faga, M. G. (2015). Biomaterials for dental implants: current and future trends. *J. Mater. Sci.*, 4779-4812. <http://dx.doi.org/10.1007/s10853-015-9050-3>

Erlandsen, S. L., Ottenwaelter, C., Frethem, C., & Chen, Y. (2001). Cryo field emission scanning electron microscopy. *Bioimaging*, 1-5. <https://www.future-science.com/doi/pdf/10.2144/01312bi01>

Escuder, A. (2014). *Análisis del efecto de los aleantes en titanio pulvimetalúrgico* (TFM). Universidad Politécnica de Valencia. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/50025/Tesis.pdf?sequence=1>

Espinosa, D. M., & James, M. L. (2006). *Anodizado de aleaciones de titanio (Ti6Al4V), ELI, utilizados en la fabricación de implantes* (TFG). Universidad Industrial de Santander. <https://studylib.es/doc/6768504/anodizado-de-aleaciones-de-titanio--ti6al4v---eli>

Feliu, S. (2016). Caracterización química de nanosuperficies. Introducción a la espectroscopia fotoelectrónica de rayos X. *CSIC*, 2-19. https://www.academia.edu/28387320/CARACTERIZACION_QU%C3%8DMICA_DE_NANOSUPERFICIES_INTRODUCCION_A_LA_ESPECTROSCPIA_FOTOELECTRONICA_DE_RAYOS_X_XPS

Fort, R., Álvarez, M., Vázquez, C., & Gómez, L. S. (2013). Análisis de la microrrugosidad mediante técnicas portátiles: aplicaciones y casos de estudio en patrimonio. *Ciencias experimentales y conservación del patrimonio*, 198-214. https://digital.csic.es/bitstream/10261/115409/1/CA_2012_4_198.pdf

Gil, F. J., & Planell, J. A. (1993). *Aplicaciones biomédicas del titanio y sus aleaciones*. Universidad Politécnica de Cataluña. <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/6814/Article04.pdf>

Hinojosa, M., & Reyes, M. E. (2001). La rugosidad de la superficie: Topometría. *Ingenierías*, 27-33. http://eprints.uanl.mx/10044/1/11_Moisés_Hinojosa_et_al_Rugosidad.pdf

Ibarra, C., Villar, M., Gaitán, L. A., Pozos, A., Mendoza, R., & Sánchez, L. O. (2012). Ensayo de formación y cuantificación de biopelículas mixtas de *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 214-222. <http://www.reviberoammicol.com/2012-29/214222.pdf>

Jiménez, R. (2017). *Estudio numérico de un proceso de mecanizado aplicado al Ti-6Al-4V* (TFG). Universidad Carlos III de Madrid. https://e-archivo.uc3m.es/bitstream/handle/10016/27766/TFG_Rodrigo_JimenezDeLosGalanes_RomeroDelHombrebueno.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Koo, H., Allan, R. N., Howlind, R. P., Hall-Stoodley, L., & Stoodley, P. (2017). Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat Rev Microbiol.*, 1-18. <https://www.nature.com/articles/nrmicro.2017.99>

Kubli, L. (1983). *Titanium Alloys in Surgical Implants*. ASTM STP.

Kumar, D., Banerjee, T., Chakravarty, J., Singh, S. K., Dwivedi, A., & Tilak, R. (2016). Identification, antifungal resistance profile, in vitro biofilm formation and ultrastructural characteristics of *Candida* species isolated from diabetic foot patients in Northern India. *Indian J Med Microbiol*, 308-314. <http://www.ijmm.org/article.asp?issn=0255-0857;year=2016;volume=34;issue=3;page=308;epage=314;aulast=Kumar>

Lario, J. (2019). *Efecto del anodizado electroquímico en la obtención de nanotubos en la superficie de aleaciones beta de titanio* (Doctorado). Universidad Politécnica de Valencia.

Lario, J., Amigó, A., Vicente, A., Segovia, F., & Amigó, V. (2016). Desarrollo de las aleaciones de titanio y tratamientos superficiales para incrementar la vida útil de los implantes. *Revista de metalurgia*, 6-11. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/93302/1397-3179-1-PB.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Lario, J., Haro, M., Viera, M., Amigó, A., & Amigó, V. (2017). Influencia de las condiciones de procesado pulvimetalúrgico en las propiedades mecánicas de las aleaciones Ti-35Nb-10Ta. *I Congreso Nacional de Pulvimetalurgia y I Congreso Iberoamericano de Pulvimetalurgia*, 1-6. https://www.researchgate.net/publication/317645354_INFLUENCIA_DE_LAS_CONDICIONES_DE_PROCESADO_PULVIMETALURGICO_EN_LAS_PROPIEDADES_MECANICAS_DE_LAS_ALEACIONES_Ti-35Nb-10Ta#read

Lasa, I., Pozo, J. L., Penadés, J. R., & Leiva, J. (2005). Biofilms bacterianos e infección. *Anales Sis San Navarra*, 163-175. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1137-66272005000300002

López, A., Fernández, J., & Zepeda, A. (2016). Principios y aplicaciones de la microscopia láser confocal en la investigación biomédica. *Instituto Nacional de Rehabilitación*, 156-162. <https://biblat.unam.mx/es/revista/investigacion-en-discapacidad/articulo/principios-y-aplicaciones-de-la-microscopia-laser-confocal-en-la-investigacion-biomedica>

Milena, A. (2012). *Desarrollo de recubrimientos biocompatibles y bactericidas de TaNx(Ag)y, TixAlyV(Ag) y TaNx(Ag,Cu) y obtenidos por pulverización y catódica para su posible aplicación en implantes dentales e instrumentación odontológica, respectivamente* (Doctorado). Universidad de Antioquia.

Multigner, M., Fernández, P., Ferreira, S., González, G., & González, J. L. (2009). Influencia del arenado de la aleación Ti6Al4V en la dureza superficial y estado de tensiones residuales. *Revista de metalurgia*, 52-56. <https://digital.csic.es/bitstream/10261/14474/3/147.pdf>

Nieto, D. J. (2012). *Influencia de los tratamientos superficiales de ataque ácido y anodizado en el comportamiento a fatiga del Ti c.p. y el Ti6Al4V para implantes dentales* (TFG). Universidad del Norte División de Ciencias Básicas.

Ortiz, L. C. (2018). *Estudio de procesos de autoensamble para la modificación química de metales, óxidos metálicos y nanoestructuras* (Doctorado). https://www.researchgate.net/publication/323525377_Estudio_de_procesos_de_autoensamble_para_la_modificacion_quimica_de_metales_oxidos_metalicos_y_nanoestructuras#read. https://www.researchgate.net/publication/323525377_Estudio_de_procesos_de_autoensamble_para_la_modificacion_quimica_de_metales_oxidos_metalicos_y_nanoestructuras#read

Pardell, X. (2020, 7 julio). *El microscopio electrónico de barrido SEM*. Apuntes de Electromedicina. <https://www.pardell.es/el-microscopio-electronico-de-barrido-sem.html>

Pérez, M. (2014). *Análisis de las vías de carcinogénesis del cáncer colorrectal de aparición precoz* (Doctorado). Universidad Complutense de Madrid Facultad de Medicina. <https://eprints.ucm.es/24576/1/T35099.pdf>

Pérez, R. (2016). *Caracterización microestructural y tribo-mecánica de muestras de Ti6Al4V fabricadas combinando la fusión selectiva por láser y tratamientos termo-químicos de modificación superficial* (TFG). Escuela Técnica Superior de Ingeniería Universidad de Sevilla. <https://core.ac.uk/download/pdf/51410431.pdf>

Perlines, M. (2019). *Optimización mediante recubrimientos del comportamiento corrosivo y tribocorrosivo de la aleación Ti6Al4V para el uso de implantes dentales* (TFG). <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/36244>

Pinilla, O., & Siado, A. (2014). *Caracterización microestructural de la aleación de titanio Ti6Al4V oxidada térmicamente* (TFG). Universidad Autónoma del Caribe.

<http://repositorio.uac.edu.co/bitstream/handle/123456789/797/TMEC%201130.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Pinilla, O., Siado, A., Cely, M. M., Romero, I., & Jaramillo, J. (2018). Caracterización microestructural de la aleación de titanio Ti6Al4V oxidada térmicamente. *Universidad Autónoma del Caribe*, 68-74. <http://www.scielo.org.co/pdf/prosp/v16n2/1692-8261-prosp-16-02-00068.pdf>

Polmear, I. J. (1995). *Light Alloys: Metallurgy of the Light Metals* (3.ª ed.). Elsevier.

Quirama, A. C. (2017). *Desarrollo de un recubrimiento de TiN/TiO₂/HA depositado mediante pulverización catódica de radiofrecuencia para su posible aplicación en implantes óseos* (TFM). Universidad de Antioquia.

Reséndiz, M. C., & Castrellón, J. (2005). Microscopio de Fuerza Atómica. *Universidad Autónoma del Estado de Morelos*, 8-13. https://www.usfx.bo/nueva/vicerrectorado/citas/TECNOLOGICAS_20/Ingenieria%20Electrica/8.pdf

Rodil, S. E. (2009). Modificación superficial de biomateriales metálicos. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 1-12. http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0255-69522009000200002&script=sci_abstract

Rodney, F. B., & Collings, E. W. (1993). *Materials Properties Handbook: Titanium Alloys* (Vol. 1). ASM International. <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=x3rToHWOCd8C&oi=fnd&pg=PR3&dq=Material+Properties+Handbook:+Titanium+Alloys+rodney&ots=x6C6RCfrc4&sig=YYjDvkFk08Z-Eu4tIYQWYVILJyg#v=onepage&q=Material%20Properties%20Handbook%3A%20Titanium%20Alloys%20rodney&f=false>

Rodríguez, E. A., & Jiménez, J. N. (2015). Factores relacionados con la colonización por *Staphylococcus aureus*. *Universidad de Antioquia*, 66-77. <https://www.redalyc.org/pdf/1805/180533008008.pdf>

Rodríguez, J., Cañizares, P., Domínguez, J. A., Rodrigo, M. A., & Villaseñor, J. (1999). Industrial & Engineering Chemistry Research. *American Chemical Society*, 3779-3785. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie9901574>

Roviroza, J., Bautista, J. C., & Cruz, V. A. (2017). Proyección Térmica por flama de hidroxiapatita en acero 316l y aleación Ti6Al4V. *Memorias del XXIII Congreso Internacional Anual de la SOMIM*, 129-141. http://somim.org.mx/memorias/memorias2017/articulos/A2_3.pd

Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G., & Tiwari, V. (2018). Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Taylor & Francis*, 522-527. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21505594.2017.1313372>

Sainz, C., Guerrero, A., Sandoz, P., Perrin, H., Tribillon, G., & Calatroni, J. (1993). Perfilometría de superficies por medio de doble modulación espectral: Aplicación al estudio de superficies bajo líquido. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 78-83. <https://docplayer.es/21296780-Perfilometria-de-superficies-por-medio-de-doble-modulacion-espectra-aplicacion-al-estudio-de-superficies-bajo-liquido.html>

Sienawski, J., Filip, R., & Ziaja, W. (1997). The effect of microstructure on the mechanical properties of two-phase titanium alloys. *Materials & Design*, 361-363. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0261306997000873?via%3Dihub>

Soria, J. M., Barcia, J., Andrades, J. A., Romero, J., Monleón, M., & García, J. M. (2009). Uso de biomateriales en medicina regenerativa, aspectos básicos y aplicaciones en el Sistema Nervioso. *Trauma*, 15-20. https://app.mapfre.com/fundacion/html/revistas/trauma/v20n1/pdf/02_02.pdf

Tojal, C., Amigó, V., & Calero, J. A. (2013). Fabricación y caracterización de aleaciones porosas de Ti y Ti6Al4V producidas mediante sinterización con espaciador. *Revista de metalurgia*, 20-22. <http://revistademetalurgia.revistas.csic.es/index.php/revistademetalurgia/article/view/1265>

Vilar, D., Jacquemin, B., Díaz, A., Velásquez, C., & Volkow, P. (2003). Brote por *Pseudomonas aeruginosa*, en el área de atención ambulatoria de heridas quirúrgicas, en pacientes posmastectomizadas. *Salud Publica Mex*, 371-378. <http://www.scielo.org.mx/pdf/spm/v45n5/17741.pdf>

Won, K. (2017). *Caracterización superficial de aleaciones para implantes mediante técnicas espectroscópicas y microscopía electrónica de barrido* (Doctorado). Universidad Nacional de La Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/63513>

Zambrano, M. A., & Suárez, L. (2006). Biofilms bacterianos: sus implicaciones en salud y enfermedad. *Pontífica Universidad Javeriana*, 1-7. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5213860>

II. PRESUPUESTO

ÍNDICE

	<i>Página/s</i>
1. CUADRO DE PRECIOS UNITARIOS.....	75
1.1. MANO DE OBRA.....	75
1.2. MATERIALES.....	75
1.3. MAQUINARIA.....	77
2. CUADRO DE PRECIOS DESCOMPUESTOS.....	79
3. MEDICIONES.....	88
4. PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN POR CONTRATA.....	89
REFERENCIAS.....	90

A continuación, pese a las dificultades encontradas durante el desarrollo de este trabajo debido a la crisis del Covid-19, se ha elaborado el presupuesto necesario estimado para llevar a cabo el proyecto previamente explicado. Con la ayuda de tablas se exponen los precios unitarios, tanto de mano de obra como de materiales y amortización de maquinaria. Estos precios unitarios luego se emplearán para calcular los precios descompuestos de las unidades de obra. A su vez, estas unidades de obra las hemos separado en capítulos para entender el coste que supondría cada uno de los pasos de este proyecto (*Labcomercial, Labotienda y Suministros de laboratorio, 2020*).

- Capítulo 1: Obtención de las muestras y bacterias.
- Capítulo 2: Tratamientos superficiales sobre las muestras.
- Capítulo 3: Cultivo de bacterias sobre superficies con diferentes tratamientos.
- Capítulo 4: Caracterización y análisis de los resultados.

1. CUADRO DE PRECIOS UNITARIOS

1.1. MANO DE OBRA

Código	Descripción	Unidades	Precio (€)
MO1	Ingeniero Biomédico	Hora (h)	17
MO2	Ingeniero Jefe	Hora (h)	26
MO3	Técnico de laboratorio	Hora (h)	16

1.2. MATERIALES

Código	Descripción	Unidades	Precio (€)
MAT1	Acetona	Litros (l)	5,99
MAT2	Agua	Litros (l)	0,0016
MAT3	Agua desionizada	Litros (l)	0,78
MAT4	Agua destilada	Litros (l)	0,80
MAT5	Agua estéril	Litros (l)	3,95
MAT6	Agua oxigenada	Litros (l)	0,95
MAT7	Alcohol etílico (96 °C)	Litros (l)	22
MAT8	Algodón	Kilogramos (kg)	6,38
MAT9	Asa bacteriológica	Unidad (u)	0,07
MAT10	Barra Ti6Al4V 30 x 6000 mm	Kilogramos (kg)	45
MAT11	Detergente	Litros (l)	8,11
MAT12	Erlenmeyer 1 l	Unidad (u)	7,31
MAT13	Frasco estéril	Unidad (u)	0,10
MAT14	Guantes de nitrilo	Unidad (u)	0,05
MAT15	Hisopos	Unidad (u)	0,11
MAT16	Malla de platino	Unidad (u)	20,70
MAT17	Medio sólido TSA (Scharlab)	Unidad (u)	0,73
MAT18	Nitrógeno líquido	Litros (l)	10,29
MAT19	Oxalicina	Litros (l)	9,99
MAT20	Papel de aluminio	Metro (m)	0,05

MAT21	Papel de lija de 220, 500 y 1000	Unidad (u)	0,35
MAT22	Placas de acero inoxidable	Unidad (u)	0,29
MAT23	Placas Petri	Unidad (u)	0,79
MAT24	Polvos Baird Parker Agar (base) para caldo de cultivo de Laboratorio Britania	Gramos (g)	0,318
MAT25	Recipiente	Unidad (u)	6,40
MAT26	Resina epoxi	Gramos (g)	0,018
MAT27	Solución de carbonato de sodio monohidratado 0,25 M (Na_2CO_3)	Litros (l)	2,9
MAT28	Solución de ácido clorhídrico (HCl)	Litros (l)	8,17
MAT29	Solución de ácido fosfórico (H_3PO_4)	Litros (l)	33,34
MAT30	Solución de ácido fluorhídrico (HF) al 40%	Litros (l)	23,93
MAT31	Solución de ácido fluorhídrico (HF) (48% en peso)	Litros (l)	30,19
MAT32	Solución de fluoruro de sodio (NaF)	Litros (l)	303
MAT33	Solución de ácido nítrico (HNO_3)	Litros (l)	16,71
MAT34	Solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1M	Litros (l)	9,53
MAT35	Solución de bórax con trifosfato de sodio	Litro (l)	1'72
MAT36	Solución de PBS	Litros (l)	73,54
MAT37	Solución TBS (Scharlab)	Litros (l)	33'09
MAT38	Suspensión de diamante de $9 \mu\text{m}$	Litros (l)	204,2
MAT39	Suspensión de sílice coloidal de $0'05 \mu\text{m}$	Litros (l)	49,97
MAT40	Tinte SYTO 9	Microlitros (μl)	4,25
MAT41	Torunda	Unidad (u)	0,12
MAT42	Vaso de precipitados	Unidad (u)	3

1.3. MAQUINARIA

Código	Descripción	Coste de la inversión (€)	Vida útil (años)	Horas/año	Precio/hora
MAQ1	Agitador MaxQ4450 ThermoSCIENTIFIC	1.865	10	1.680	0,111
MAQ2	Agitadora	338	10	1.680	0,020
MAQ3	Autoclave	5.347	10	1.680	0,318
MAQ4	Cabina de flujo laminar H-100	3.565	10	1.680	0,212
MAQ5	Celda electroquímica	96,32	5	1.680	0,012
MAQ6	Frigorífico	790	5	1.680	0,094
MAQ7	Fuente DC Power Supply SM 400 – AR – 8	265	5	1.680	0,0314
MAQ8	Incubadora	1.328	10	1.680	0,079
MAQ9	Limpiadora por ultrasonidos	1.100	10	1.680	0,065
MAQ10	Máquina de corte Struers Accutom-5	19.580	10	1.680	0,987
MAQ11	Máquina de desbaste Knuth-Rotor 3	17.340	10	1.680	1,032
MAQ12	Maquinaria de secado	10	10	1.680	0,001
MAQ13	Mechero Bunsen	82,17	5	1.680	0,01
MAQ14	Microscopio confocal LSM 900 de Zeiss	105.000	10	1.400	7,50
MAQ15	Microscopio CryoFESEM PP3010T de Quorum Technologies	140.000	10	1.400	10
MAQ16	Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo (HRFESEM) GeminiSEM Zeiss	380.000	10	1.400	27,14
MAQ17	Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo (FESEM) Ultra 55 Zeiss	260.000	10	1.400	18,57

MAQ18	Microscopio de Fuerza Atómica Multimode 8 de Bruker	125.000	10	1.400	8,93
MAQ19	Microscopio óptico	1.675	5	1.680	0,2
MAQ20	Perfilómetro Alpha-Step D-500	23.000	10	1.400	1,64
MAQ21	Pulidora semiautomática Labopol-5 de Struers	25.000	10	1.680	1,488
MAQ22	Sonicador	329	10	1.680	0,02
MAQ23	Torno CNC	1.400	10	1.680	0,083

2. CUADRO DE PRECIOS DESCOMPUESTOS

Dividiremos cada uno de los procesos presentes en el proyecto en unidades de obra.

Código	Descripción	Rendimiento	Precio (€)	Importe (€)
UO1	Fase 1: Elaboración de las muestras			
MAT4	Agua destilada	4	0,80	3,20
MAT6	Agua oxigenada	0,5	0,95	0,475
MAT7	Alcohol etílico (96°)	0,75	22	16,50
MAT10	Barra Ti6Al4V 30 x 6000 mm	0,032	45	1,44
MAQ10	Máquina de corte Struers Accutom-5	1	0,987	0,987
MAQ11	Máquina de desbaste Knuth-Rotor 3	1	1,032	1,032
MAQ12	Maquinaria de secado	0,25	0,001	0,00025
MAQ19	Microscopio óptico	1	0,2	0,20
MAT21	Papel de lija de tamaño de grano 200, 550 y 1000	3	0,35	1,05
MAQ21	Pulidora semiautomática Labopol-5 de Struers	1	1,488	1,488
MAT38	Suspensión de diamante de 9 μm	0,2	204,2	40,84
MAT39	Suspensión de sílice coloidal de 0'05 μm	0,2	49,97	9,99
MAQ23	Torno CNC	1	0,083	0,083
MO3	Técnico de laboratorio	8	16	128

Clase: Material	73,50
Clase: Maquinaria	3,80
Clase: Mano de Obra	128
Coste total	205,3

Código	Descripción	Rendimiento	Precio (€)	Importe (€)
UO2	Fase 2, etapa 1: Ataque ácido			
MAT1	Acetona	10	5'99	59,90
MAT4	Agua destilada	10	0'80	8
MAT7	Alcohol etílico (96°)	10	22	220
MAQ9	Limpiadora por ultrasonidos	0'91	0,065	0,059
MAT25	Recipiente	1	6,40	6,40
MAT28	Solución de ácido clorhídrico (HCl)	0,1	8,17	0,817
MAT34	Solución de ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄)	0,1	9,53	0,953
MO1	Ingeniero Biomédico	6	17	102
MO2	Ingeniero Jefe	2	26	52
MO3	Técnico de laboratorio	6	16	96

Clase: Material	296,07
Clase: Maquinaria	0,059
Clase: Mano de Obra	250
Coste total	546,13

Código	Descripción	Rendimiento	Precio (€)	Importe (€)
UO3	Fase 2, etapa 2: Anodizado			
MAT4	Agua destilada	1	0,8	0,80
MAT7	Alcohol etílico (96°)	0,3	22	6,60
MAQ5	Celda electroquímica	0,5	0,012	0,006
MAQ7	Fuente DC Power Supply SM 400 - AR - 8	0,25	0,0314	0,00785
MAQ9	Limpiadora por ultrasonidos	0,25	0,065	0,016
MAQ12	Maquinaria de secado	0,25	0,001	0,00025
MAT22	Placas de acero inoxidable	1	0,29	0,29
MAT25	Recipiente	1	6,4	6,40
MAT30	Solución de ácido fluorhídrico (HF) al 40%	0,01	23,93	0,24
MAT33	Solución de ácido nítrico (HNO ₃) al 70%	0,15	16,71	2,50
MAT34	Solución de ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄) 1M	0,4	9,53	3,81
MAT35	Solución de bórax con trifosfato de sodio	10	1'72	17,20
MO1	Ingeniero Biomédico	4	17	68
MO2	Ingeniero Jefe	2	26	52
MO3	Técnico de laboratorio	4	16	64

Clase: Material	37,84
Clase: Maquinaria	0,03
Clase: Mano de Obra	184
Coste total	221,87

Código	Descripción	Rendimiento	Precio (€)	Importe (€)
UO4	Fase 2, etapa 3: Ataque ácido y anodizado			
MAT1	Acetona	10	5,99	59,90
MAT4	Agua destilada	10,5	0,8	8,40
MAT7	Alcohol etílico (96 °)	10,5	22	231
MAQ5	Celda electroquímica	0,5	0,012	0,03
MAQ7	Fuente DC Power Supply SM 400 - AR - 8	0,25	0,0314	0,04
MAQ9	Limpiadora por ultrasonidos	1,16	0,065	0,754
MAQ12	Maquinaria de secado	0,25	0,01	0,00025
MAT22	Placas de acero inoxidable	1	0,29	0,29
MAT25	Recipiente	1	6,4	6,40
MAT28	Solución de ácido clorhídrico (HCl)	0,1	8,17	0,817
MAT30	Solución de ácido fluorhídrico (HF) al 40%	0,01	23,93	0,2393
MAT33	Solución de ácido nítrico (HNO ₃) al 70%	0,15	16,71	2,50
MAT34	Solución de ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄) 1M	0,5	9,53	4,765
MAT35	Solución de bórax con trifosfato de sodio	10	1,72	17,20
MO1	Ingeniero Biomédico	10	17	170
MO2	Ingeniero Jefe	4	26	104
MO3	Técnico de laboratorio	10	16	160

Clase: Material	331,51
Clase: Maquinaria	0,82
Clase: Mano de Obra	434
Coste total	766,33

Código	Descripción	Rendimiento	Precio (€)	Importe (€)
UO5	Fase 2, etapa 4: Nanotubos			
MAQ1	Agitador MaxQ4450 ThermoSCIENTIFIC	0,1	0,11	0,032
MAT2	Agua	5,5	0,0016	0,0088
MAT3	Agua desionizada	0,5	0,78	0,39
MAT4	Agua destilada	10	0,80	8
MAQ5	Celda electroquímica	0,5	0,012	0,06
MAT11	Detergente	0,1	8,11	0,811
MAQ7	Fuente DC Power Supply SM 400 - AR - 8	1	0,157	0,157
MAQ9	Limpiadora por ultrasonidos	0,16	0,065	0,0104
MAT16	Malla de platino	1	20,70	20,70
MAQ12	Maquinaria de secado	0,25	0,001	0,00025
MAT21	Papel de lija de tamaño de grano 200, 550 y 1000	3	0,35	1,05
MAT31	Solución de ácido fluorhídrico (HF) (48% en peso)	1,03	30,19	31,10
MAT33	Solución de ácido nítrico (HNO ₃)	4	16,71	66,84
MAT34	Solución ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄) 1M	0,2	9,53	1,906
MAQ21	Pulidora semiautomática Labopol-5 de Struers	1	0,0314	0,0314
MO1	Ingeniero biomédico	4	17	68
MO2	Ingeniero Jefe	2	26	52
MO3	Técnico de laboratorio	4	16	64

Clase: Material	130,80
Clase: Maquinaria	0,30
Clase: Mano de Obra	184
Coste total	315,10

Código	Descripción	Rendimiento	Precio (€)	Importe (€)
UO6	Fase 3: Caracterización superficial (metalográfico)			
MAQ16	Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo (HRFESEM) GeminiSEM Zeiss	24	27,14	651,36
MAQ17	Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo (FESEM) Ultra 55 Zeiss	24	18,57	445,68
MAQ18	Microscopio de Fuerza Atómica Multimode 8 de Bruker	24	8,93	214,32
MAQ20	Perfilómetro Alpha-Step D-500	24	1,64	39,36
MO3	Técnico de laboratorio	24	16	384

Clase: Material -
Clase: Maquinaria 1.350,72
Clase: Mano de Obra 364
Coste total 1.714,72

Código	Descripción	Rendimiento	Precio (€)	Importe (€)
UO7	Fase 4, etapa 1: Cultivo <i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
MAT5	Agua estéril	0,1	3,95	0,395
MAT13	Frasco estéril	3	0,10	0,3
MAT15	Hisopos	3	0,11	0,33
MAQ8	Incubadora	1	0,079	0,079
MAT17	Medio sólido TSA (Scharlab)	1	0,73	0,73
MAT23	Placas Petri	1	0,79	0,79
MO1	Ingeniero Biomédico	2	17	34
MO3	Técnico de laboratorio	2	16	32

Clase: Material 2,545
Clase: Maquinaria 0,079
Clase: Mano de Obra 66
Coste total 68,62

Código	Descripción	Rendimiento	Precio (€)	Importe (€)
U08	Fase 4, etapa 1: Cultivo <i>Staphylococcus aureus</i>			
MAQ6	Frigorífico	24	0,094	2,26
MAQ8	Incubadora	1	0,079	0,079
MAT17	Medio sólido TSA (Scharlab)	1	0,73	0,73
MAT23	Placa Petri	1	0,79	0,79
MAT41	Torunda	1	0,12	0,12
MO1	Ingeniero Biomédico	2	17	34
MO3	Técnico de laboratorio	2	16	32

Clase: Material 1,64

Clase: Maquinaria 2,34

Clase: Mano de Obra 66

Coste total 69,98

Código	Descripción	Rendimiento	Precio (€)	Importe (€)
UO9	Fase 4, etapa 2: Siembra de las colonias en las muestras tratadas superficialmente			
MAT10	Algodón	0,1	6,38	0,64
MAT11	Asa bacteriológica	2	0,07	0,14
MAQ3	Autoclave	1	0,318	0,32
MAQ4	Cabina de flujo laminar H-100	1	0,212	0,21
MAT14	Erlenmeyer	1	7,31	7,31
MAQ8	Incubadora	42	0,079	3,31
MAT38	Solución Tampón Fosfato Salino (PBS)	0,5	73,54	36,77
MAT39	Solución TBS (Scharlab)	0,01	33'09	0,33
MAQ22	Sonicador	0,33	0,02	0,01
MO1	Ingeniero Biomédico	4	17	68
MO3	Técnico de laboratorio	4	16	64

Clase: Material	45,20
Clase: Maquinaria	3,85
Clase: Mano de Obra	132
Coste total	181,05

Código	Descripción	Rendimiento	Precio (€)	Importe (€)
UO10	Fase 5: Caracterización superficial (biológica)			
MAQ14	Microscopio confocal LSM 900 de Zeiss	24	7,50	180
MAQ15	Microscopio CryoFESEM PP3010T de Quorum Technologies	24	10	240
MAT20	Nitrógeno líquido	0,2	10,29	2,06
MAT38	Solución de PBS	0,5	73,54	36,77
MAT42	Tinte SYTO 9	24	4,25	102
MO3	Técnico de laboratorio	48	16	768

Clase: Material	140,83
Clase: Maquinaria	420
Clase: Mano de Obra	768
Coste total	1.328,83

Código	Descripción	Rendimiento	Precio (€)	Importe (€)
UO11	Fase 6: Análisis de los resultados			
MO1	Ingeniero Biomédico	288	17	4.896
MO2	Ingeniero Jefe	288	26	7.488

Clase: Material	-
Clase: Maquinaria	-
Clase: Mano de Obra	12.384
Coste total	12.384

3. MEDICIONES

CAPÍTULO 1 (C1): Obtención de las muestras y bacterias

Código	Descripción	Medición	Precio (€)	Importe (€)
UO1	Fase 1: Elaboración de las muestras	1	205,3	205,3
UO7	Fase 4, etapa 1: Cultivo <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	68,62	266,62
UO8	Fase 4, etapa 1: Cultivo <i>Staphylococcus aureus</i>	4	69,98	279,92

CAPÍTULO 2 (C2): Tratamientos superficiales sobre las muestras

Código	Descripción	Medición	Precio (€)	Importe (€)
UO2	Fase 2, etapa 1: Ataque ácido	1	546,13	546,13
UO3	Fase 2, etapa 2: Anodizado	1	221,87	221,87
UO4	Fase 2, etapa 3: Ataque ácido y anodizado	1	766,33	766,33
UO5	Fase 2, etapa 4: Nanotubos	1	315,10	315,10

CAPÍTULO 3 (C3): Cultivo de bacterias sobre superficies con diferentes tratamientos

Código	Descripción	Medición	Precio (€)	Importe (€)
UO9	Fase 4, etapa 2: Siembra de las colonias en las muestras tratadas superficialmente	8	181,05	1.448,40

CAPÍTULO 4 (C4): Caracterización y análisis de los resultados

Código	Descripción	Medición	Precio (€)	Importe (€)
UO6	Fase 3: Caracterización superficial (metalográfico)	1	1.714,72	1.714,72
UO10	Fase 5: Caracterización superficial (biológica)	1	1.328,83	1.328,83
UO11	Fase 6: Análisis de las muestras	1	12.384	12.384

4. PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN POR CONTRATA

Código	Descripción	Importe (€)
C1	CAPÍTULO 1: Obtención de las muestras y bacterias	751,84
C2	CAPÍTULO 2: Tratamientos superficiales sobre las muestras	1.849,43
C3	CAPÍTULO 3: Cultivo de bacterias sobre superficies con diferentes tratamientos	1.448,40
C4	CAPÍTULO 4: Caracterización y análisis de los resultados	15.427,55
TOTAL DEL PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN MATERIAL		19.477,22
15%	Gastos generales	2.921,58
6%	Beneficio industrial	1.168,63
SUMA PARCIAL		23.567,43
21%	Impuesto de Valor Añadido (IVA)	4.949,16
PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN POR CONTRATA		28.516,60

El presupuesto de ejecución por contrata del proyecto ‘Evaluación del crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* sobre muestras de aleación Ti6Al4V sometidas a diferentes tratamientos superficiales’ asciende a la cantidad de 28.516,60 € (VEINTIOCHO MIL QUINIENTOS DIECISÉIS CON SESENTA).

REFERENCIAS

Labcomercial. (2020). LabComercial. <https://www.labcomercial.com/es/>

Labotienda - tienda online de material de laboratorio. (2020). Labotienda. <https://www.labotienda.com/>

Suministros de laboratorio (material de laboratorio). Equipo de Laboratorio - Tecnylab. (2020). TecnyLab. <https://www.tecnylab.es/>