



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIERÍA
INDUSTRIAL VALENCIA

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

ESTUDIO DE LA BIOCOMPATIBILIDAD DE LAS ALEACIONES Ti-Nb Y Ti-Mo CON ADICIÓN DE INDIO

AUTOR: CARMEN SEGUÍ ESQUEMBRE

TUTOR: VICENTE AMIGÓ BORRÁS

COTUTOR: LARA MILIÁN MEDINA

CURSO ACADÉMICO: 2020-2021

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Vicente Amigó, por confiar en mí dándome la oportunidad de poder realizar este trabajo junto a él. Gracias por guiarme y enseñarme durante este proyecto. Gracias también a mi cotutora Lara por brindarme esta oportunidad en la que he aprendido tanto.

Además, quería agradecer a todos los que han estado día tras día junto a mí, sobre todo a Montse, Zaka y Marieta, habéis sido los mejores compañeros que podría imaginar.

A mis maravillosos amigos, con los que he compartido los mejores años de mi vida. Gracias por haber hecho de cada lugar desconocido un hogar, ya sabéis que os quiero para siempre.

Resaltar a mi familia, a mis padres y a mi hermano, sin duda alguna vosotros tenéis el broche de oro. Gracias por enseñarme como lo habéis hecho, apoyarme, cuidarme y quererme siempre. De mayor quiero ser como vosotros.

Y a ti, por formar el mejor equipo del mundo, ya sabes... “no sé si lo hubiera logrado sin ti”.

RESUMEN

El titanio y sus aleaciones son los materiales más utilizados en el campo de la biomedicina y odontología para fabricar prótesis, componentes de las prótesis e implantes dentales ya que estos tienen una combinación favorable de propiedades mecánicas, físicas y químicas. En los últimos años la investigación en las aleaciones de base titanio ha estado en crecimiento constante, convirtiéndose en un sector muy competitivo, para buscar soluciones a los problemas que pueden dar los implantes utilizados actualmente, así como es la enfermedad periimplantaria.

Mediante este trabajo se lleva a cabo la caracterización completa de la aleación Ti-15Mo-5In PM y Ti-35Nb-5In PM. Ambos presentan una estructura hexagonal compacta que permite la reducción de su módulo elástico y el acercamiento de este al del hueso, a diferencia de lo que ocurre con la aleación tan empleada Ti-6Al-4V, con un valor de módulo elástico que dista mucho del del hueso. Además, se realiza también la caracterización microestructural y mecánica de ambas aleaciones para conocer con exactitud sus propiedades. Por otro lado, se realiza en análisis de liberación de iones y el estudio de la resistencia a corrosión de las dos aleaciones en cuestión utilizando saliva artificial como electrolito. Ambas presentaron que se tratan de aleaciones biocompatibles y ninguna presentó ningún efecto tóxico. Además, se utilizaron las salivas con los restos de iones liberados como medio de contacto con las dos líneas celulares: las células madre de pulpa dental humana (hDPSC) y la línea de osteosarcoma humano MG-63. Esto hace posible el análisis de la posible citotoxicidad de estas y se mida el grado de viabilidad celular. Además, se realizan ensayos de diferenciación osteogénica de las células hDPSC y MG-63 para ver si se produce o no la diferenciación de estas en contacto con los discos de las aleaciones Ti-15Mo-5In PM y Ti-35Nb-5In PM.

De este modo se consigue obtener un análisis tanto mecánico como biológico completo de las aleaciones ternarias. Como resultado, se concluye que tanto la aleación aleaciones Ti-15Mo-5In PM y Ti-35Nb-5In PM presentan resultados interesantes en todos los ensayos y también en los ensayos donde se ha utilizado el contacto con las células. Así pues, mediante este trabajo se anima a seguir investigando acerca de estas aleaciones que se consideran muy prometedoras en el campo biomédico.

Palabras clave: Ti-15Mo-5In, Ti-35Nb-5In, implante dental, periimplantitis, módulo elástico, hueso, biocompatible, citotoxicidad, saliva artificial, hDPSC, MG-63, diferenciación osteogénica, osteointegración, análisis biológico.

RESUM

El titani i els seus aliatges són els materials més utilitzats en el camp de la biomedicina i odontologia per a fabricar pròtesis, components de les pròtesis i implants dentals ja que aquests tenen una combinació favorable de propietats mecàniques, físiques i químiques. En els últims anys la investigació en els aliatges de base titani ha estat en creixement constant, convertint-se en un sector molt competitiu, per a buscar solucions als problemes que poden donar els implants utilitzats actualment, així com és la malaltia periimplantària.

Mitjançant aquest treball es porta a terme la caracterització completa de l'aliatge Ti-15Mo-5In PM i Ti-35Nb-5In PM. Ambdós presenten una estructura hexagonal compacta que permet la reducció del seu mòdul elàstic i l'acostament d'aquest al de l'os, a diferència del que ocorre amb l'aliatge tan emprat Ti-6Al-4V, amb un valor de mòdul elàstic que dista molt del de l'os. A més, es realitza també la caracterització microestructural i mecànica de tots dos aliatges per a conèixer amb exactitud les seues propietats. D'altra banda, es realitza un anàlisi d'alliberament d'ions i l'estudi de la resistència a corrosió dels dos aliatges en qüestió utilitzant saliva artificial com a electròlit. Ambdós van presentar que es tracten d'aliatges biocompatibles i cap va presentar cap efecte tòxic. A més, es van utilitzar les salives amb les restes d'ions alliberats com a mitjà de contacte amb les dues línies cel·lulars: les cèl·lules mare de polpa dental humana (hDPSC) i la línia d'osteosarcoma humà MG-63. Això fa possible l'anàlisi de la possible citotoxicitat d'aquestes i es mesura el grau de viabilitat cel·lular. A més, es realitzen assajos de diferenciació osteogènica de les cèl·lules hDPSC i MG-63 per a veure si es produeix o no la diferenciació d'aquestes en contacte amb els discos dels aliatges Ti-15Mo-5In PM i Ti-35Nb-5In PM.

D'aquesta manera s'aconsegueix obtenir una anàlisi tant mecànica com biològica completa dels aliatges ternaris. Com a resultat, es conclou que tant l'aliatge Ti-15Mo-5In PM com Ti-35Nb-5In PM presenten resultats interessants en tots els assajos i també en els assajos on s'ha utilitzat el contacte amb les cèl·lules. Així doncs, mitjançant aquest treball s'anima a continuar investigant sobre aquests aliatges que es consideren molt prometedores en el camp biomèdic.

Paraules clau: Ti-15Mo-5In, Ti-35Nb-5In, implant dental, periimplantitis, mòdul elàstic, os, biocompatible, citotoxicitat, saliva artificial, hDPSC, MG-63, diferenciació osteogènica, osteointegració, anàlisi biològica.

ABSTRACT

Titanium and its alloys are the most widely used materials in the field of biomedicine and dentistry to manufacture prostheses, components of prostheses and dental implants since they have a favorable combination of mechanical, physical and chemical properties. In recent years, research on titanium-based alloys has been in constant growth, becoming a very competitive sector, to seek solutions to the problems that currently used implants can cause, such as peri-implant disease.

Through this work, the complete characterization of the Ti-15Mo-5In PM and Ti-35Nb-5In PM alloy is carried out. Both present a compact hexagonal structure that allows the reduction of their elastic modulus and its approach to that of bone, unlike what happens with the widely used Ti-6Al-4V alloy, with an elastic modulus value that is far from that of the bone. In addition, the microstructural and mechanical characterization of both alloys is also carried out to know exactly their properties. On the other hand, an ion release analysis and a study of the corrosion resistance of the two alloys in question was performed using artificial saliva as electrolyte. Both presented that they are biocompatible alloys and neither presented any toxic effect. In addition, saliva with the released ion remains were used as a means of contact with the two cell lines: human dental pulp stem cells (hDPSC) and the human osteosarcoma line MG-63. This makes possible the analysis of the possible cytotoxicity of these and the degree of cell viability is measured. In addition, osteogenic differentiation assays of hDPSC and MG-63 cells are carried out to see whether or not their differentiation occurs in contact with the discs of the Ti-15Mo-5In PM and Ti-35Nb-5In PM alloys.

In this way it is possible to obtain a complete mechanical and biological analysis of the ternary alloys. As a result, it is concluded that both the alloys Ti-15Mo-5In PM and Ti-35Nb-5In PM present interesting results in all the tests and also in the tests where contact with cells has been used. Thus, this work encourages further research on these alloys that are considered very promising in the biomedical field.

Keywords: Ti-15Mo-5In, Ti-35Nb-5In, dental implant, peri-implantitis, elastic modulus, bone, biocompatible, cytotoxicity, artificial saliva, hDPSC, MG-63, osteogenic differentiation, osseointegration, biological analysis.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.1.1. Tejido óseo	1
1.1.2. Interfase hueso-implante	2
1.1.3. Aleaciones base titanio.....	4
1.1.4. Periimplantitis	7
1.2. Motivación	9
1.3. Objetivos	10
2. PLANIFICACIÓN	11
2.1. FASE 1: OBTENCIÓN DE LAS ALEACIONES	11
2.1.1. OBTENCIÓN DE LAS ALEACIONES MEDIANTE TÉCNICAS DE PULVIMETALÚRGIA CONVENCIONAL	11
2.1.2. OBTENCIÓN DE LAS ALEACIONES MEDIANTE COLADA	12
2.3. FASE 3: CARACTERIZACIÓN MECÁNICA DE LAS ALEACIONES	12
2.4. FASE 4: CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LAS ALEACIONES	12
2.5. FASE 5: ANÁLISIS BIOLÓGICO.....	12
3. MATERIALES Y METODOLOGÍA	14
3.1. FASE 1: OBTENCIÓN DE LAS ALEACIONES	14
3.1.1. OBTENCIÓN DE LAS ALEACIONES MEDIANTE TÉCNICAS DE PULVIMETALÚRGIA CONVENCIONAL	14
3.1.2. OBTENCIÓN DE LAS ALEACIONES MEDIANTE COLADA	20
3.2. FASE 2: CARACTERIZACIÓN MICROESTRUCTURAL DE LAS ALEACIONES	21
3.2.1. Preparación metalográfica.....	21
3.2.2. Análisis superficial mediante microscopía óptica (antes y después de liberación de iones). 23	
3.2.3. Estudio microestructural mediante microscopía electrónica de barrido.....	24
3.2.4. Estudio de las fases mediante difracción de rayos X	25
3.3. FASE 3: CARACTERIZACIÓN MECÁNICA DE LAS ALEACIONES	27
3.3.1. Obtención del módulo elástico.....	27
3.3.2. Ensayo de flexión a 4 puntos.....	28
3.3.3. Ensayo de dureza.....	30

3.3.4.	Ensayo de microdureza	30
3.4.	FASE 4: CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LAS ALEACIONES	32
3.4.1.	Estudio de la liberación de iones	32
3.4.2.	Estudio de la resistencia a la corrosión	33
3.5.	FASE 5: ANÁLISIS BIOLÓGICO	36
3.5.1.	Líneas celulares	36
3.5.2.	Ensayo de citotoxicidad	37
3.5.3.	Ensayo de inmunofluorescencia	39
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
4.1.	OBTENCIÓN DE LAS ALEACIONES MEDIANTE TÉCNICAS DE PULVIMETALÚRGIA CONVENCIONAL	43
4.2.	CARACTERIZACIÓN MICROESTRUCTURAL DE LAS ALEACIONES	45
4.2.1.	Análisis mediante microscopía óptica	45
4.2.2.	Estudio microestructural mediante microscopía electrónica de barrido	46
4.2.3.	Estudio de las fases mediante difracción de rayos X	55
4.3.	CARACTERIZACIÓN MECÁNICA DE LAS ALEACIONES	56
4.3.1.	Obtención del módulo elástico	56
4.3.3.	Ensayo de dureza	58
4.3.4.	Ensayo de microdureza	59
4.4.	CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LAS ALEACIONES	60
4.4.1.	Estudio de la liberación de iones	60
4.4.2.	Estudio de la resistencia a la corrosión	63
4.5.	ANÁLISIS BIOLÓGICO	67
4.5.1.	Ensayo de citotoxicidad	67
4.5.2.	Ensayo de inmunofluorescencia	68
5.	CONCLUSIONES	77
6.	FUTUROS TRABAJOS	78
7.	BIBLIOGRAFÍA	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Las dos estructuras del titanio posibles: A la izquierda aparece la estructura hexagonal compacta (fase α), y a la derecha se observa la estructura cúbica centrada en el cuerpo (fase β) (Leyens & Peters, 2003).....	4
Figura 2. Diagrama de equilibrio de fases de los elementos más comunes en las aleaciones base titanio (Leyens & Peters, 2003).....	5
Figura 3. Esquema de la planificación del proyecto.	11
Figura 4. Cámara de guantes de laboratorio modelo GP Campus del fabricante Jacomex.	15
Figura 5. Recipientes correspondientes a la aleación Ti-15Mo-5In y Ti-35Nb-5In respectivamente.	16
Figura 6. Túbala inversiva de BioEngineering.	17
Figura 7. Pie de rey de RS Components /Balanza KERN ABJ-NM/ABS-N.	18
Figura 8. Horno tubular de alto vacío Carbolite HVT 15-75- 450.	19
Figura 9. horno de arco eléctrico, modelo Edmund-Bühler MAM-1.....	20
Figura 10. Máquina para embutir modelo LaboPress-3 de Struers.	21
Figura 11. Lijadora del fabricante Struers modelo LaboPol-21.	22
Figura 12. Máquina para pulir modelo LaboPol-5 del fabricante Struers.	22
Figura 13. Máquina para pulir modelo Vibromet del fabricante Buehler.	23
Figura 14. Microscopio óptico empleado para el análisis de las muestras.....	24
Figura 15. Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo modelo AURIGA de Zeiss.	24
Figura 16. Representación del funcionamiento de la técnica EBSD.....	25
Figura 17. Difractómetro de Rayos X D2 Phaser de Bruker.....	26
Figura 18. Equipo Sonelastic para muestras pequeñas (Sonelastic, 2019).....	27
Figura 19. Soporte del ensayo de flexión a 4 puntos.....	28
Figura 20. Máquina universal Shimadzu que se utiliza en ensayo de flexión a 4 puntos.	29
Figura 21. Durómetro universal HD9-45 de Centaur.....	30
Figura 22. Esquema de la ubicación de las muescas realizadas durante el ensayo.	31
Figura 23. Muestras resultantes de la liberación de iones.	33
Figura 24. Montaje experimental del ensayo a corrosión.	34
Figura 25. Circuitos eléctricos equivalentes al comportamiento de las aleaciones de titanio.....	34
Figura 26. Diseño de la placa utilizada durante el ensayo de citotoxicidad.....	38
Figura 27. Cortadora metalográfica de precisión Accutom 10 de Struers.	39
Figura 28. a) Placa de 24 pocillos, cultivo de células MG-63 pase 11 sobre discos, 1000 células/pocillo, medio Proli; b) Placa de 24 pocillos, cultivo de células MG-63 pase 13 sobre discos, 500 células/pocillo, medio Difer.	40
Figura 29. a) Placa de 48 pocillos, cultivo de células hDPSC pase 7 sobre discos, 1000 células/pocillo, medio Proli; b) Placa de 48 pocillos, cultivo de células hDPSC pase 7 sobre discos, 1000 células/pocillo, medio Difer.	40
Figura 30. a) Millisell, cultivo de células MG-63 pase 11 como control, 300 células/pocillo, medio Proli; b) Millisell, cultivo de células MG-63 pase 11 como control, 300 células/pocillo, medio Difer; c) Millisell, cultivo de células hDPSC pase 7 como control, 750.....	40
Figura 31. Disposición de los marcadores en el ensayo de diferenciación y proliferación de células hDPSC y MG-63 con discos de Ti-15Mo-5In, Ti-35Nb-5In y pocillos control.	41
Figura 32. Imágenes obtenidas en diferentes zonas por microscopía óptica de la superficie de la aleación Ti-15Mo-5In PM.....	45
Figura 33. Imágenes obtenidas por microscopía óptica de la aleación Ti-35Nb-5In PM.	46
Figura 34. Imagen FSD de la aleación Ti-15Mo-5In PM a 250X.....	47

Figura 35. Mapa de distribución a 250X de los elementos que componen a la aleación Ti-15Mo-5In PM siendo: a) Distribución del titanio, b) Distribución del indio, c) Distribución del molibdeno y d) Distribución del titanio, indio y molibdeno.	48
Figura 36. Imagen FSD de la aleación Ti-35Nb-5In PM.	48
Figura 37. Mapa de Distribución de los elementos que componen a la aleación Ti-35Nb-5In PM siendo: a) Distribución del titanio, b) Distribución del indio, c) Distribución del niobio.	49
Figura 38. Imagen FSD de la aleación Ti-35Nb-5In colada.	49
Figura 39. Mapa de distribución de los elementos que componen a la aleación Ti-35Nb-5In colada siendo: a) Distribución del titanio, b) Distribución del indio, c) Distribución del niobio.	50
Figura 40. a) Contraste de bandas de la aleación Ti-15Mo-5In PM, b) Contraste de bandas de la aleación Ti-15Mo-5In colada.	50
Figura 41. Contraste de bandas de la aleación Ti-35Nb-5In PM, b) Contraste de bandas de la aleación Ti-35Nb-5In colada.	51
Figura 42. a) Euler de la aleación Ti-15Mo-5In PM.	51
Figura 43. a) Euler de la aleación Ti-35Nb-5In PM, b) Euler de la aleación Ti-35Nb-5In colada.	52
Figura 44. Figura de polos inversos de la aleación Ti-15Mo-5In PM.	52
Figura 45. IPF de la aleación Ti-15Mo-5In PM.	53
Figura 46. a) Figura de polos inversos de la aleación Ti-35Nb-5In PM, b) Figura de polos inversos de la aleación Ti-35Nb-5In colada.	53
Figura 47. Fases presentes en la aleación Ti-15Mo-5In PM.	54
Figura 48. Fases presentes en la aleación Ti-35Nb-5In PM.	54
Figura 49. Fases presentes en la aleación Ti-35Nb-5In colada.	55
Figura 50. Difractograma de la muestra Ti-15Mo-5In PM y colada.	55
Figura 51. Difractograma de la muestra Ti-35Nb-5In PM y colada.	56
Figura 52. Curvas tensión-deformación de cada una de las aleaciones (PM) obtenidas mediante el ensayo de flexión a cuatro puntos.	57
Figura 53. Comparación del módulo elástico del hueso trabecular (5 GPa), hueso cortical (20 GPa), Ti-15Mo-5In (80 GPa), Ti-35Nb-5In (63 GPa), Ti CP (103 GPa) y Ti-6Al-4V (110 GPa).	58
Figura 54. Valores de dureza para cada aleación.	59
Figura 55. Valores de microdureza para cada aleación estudiada y para la aleación comercial Ti-6Al-4V.	59
Figura 56. Imágenes obtenidas por MO a diferentes aumentos de la microestructura de las muestras de Ti-15Mo-5In PM después del ensayo de liberación de iones. Cada imagen representa una zona diferente de la muestra.	60
Figura 57. Imágenes obtenidas por MO a 200 aumentos de la microestructura de las muestras de Ti-35Nb-5In PM después del ensayo de liberación de iones. Cada imagen a) y b) representa una zona diferente de la probeta.	61
Figura 58. Resultados de la velocidad de corrosión obtenidos en el ensayo de liberación de iones de los elementos disueltos en la saliva artificial por cada aleación comparados con otras aleaciones comercialmente utilizadas.	62
Figura 59. Curva OCP para cada una de las aleaciones por PM.	63
Figura 60. Curvas potenciodinámicas para cada aleación por PM.	64
Figura 61. Diagrama de Nyquist para las aleaciones estudiadas por PM.	65
Figura 62. Diagramas de bode de las aleaciones por PM.	66
Figura 63. Resultados del ensayo de citotoxicidad para la aleación M1 = Ti-15Mo-5In PM y M2 = Ti-35Nb-5In PM de laboratorio con células hDPSC.	67
Figura 64. Resultados del ensayo de citotoxicidad para la aleación M1 = Ti-15Mo-5In PM y M2 = Ti-35Nb-5In PM de laboratorio con células hDPSC.	68

Figura 65. Línea celular hDPSC sembrada los pocillos control (sin discos) con diferente medio (proliferación en las imágenes de la derecha y diferenciación en las imágenes de la izquierda). Tinción con rodamina-faloidina e inmunofluorescencia de fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OC) en hADSC cultivadas en 2D durante 3 semanas con medio de proliferación y de diferenciación osteogénica complementada. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI y se observaron en azul, la distribución de los filamentos de actina en rojo y la presencia de ALP u OC en verde. Barra de escala = 31.8 μm	69
Figura 66. Línea celular MG-63 sembrada los pocillos control (sin discos) con diferente medio (proliferación en las imágenes de la derecha y diferenciación en las imágenes de la izquierda). Tinción con rodamina-faloidina e inmunofluorescencia de fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OC) en hADSC cultivadas en 2D durante 3 semanas con medio de proliferación y de diferenciación osteogénica complementada. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI y se observaron en azul, la distribución de los filamentos de actina en rojo y la presencia de ALP u OC en verde. Barra de escala = 31.8 μm	70
Figura 67. Línea celular hDPSC sembrada en discos de la aleación Ti-15Mo-5In con diferente medio (proliferación en las imágenes de la derecha y diferenciación en las imágenes de la izquierda). Tinción con rodamina-faloidina e inmunofluorescencia de fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OC) en hADSC cultivadas en 2D durante 3 semanas con medio de proliferación y de diferenciación osteogénica complementada. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI y se observaron en azul, la distribución de los filamentos de actina en rojo y la presencia de ALP u OC en verde. Barra de escala = 31.8 μm	72
Figura 68. Línea celular MG-63 sembrada en discos de la aleación Ti-15Mo-5In con diferente medio (proliferación en las imágenes de la derecha y diferenciación en las imágenes de la izquierda).Tinción con rodamina-faloidina e inmunofluorescencia de fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OC) en hADSC cultivadas en 2D durante 3 semanas con medio de proliferación y de diferenciación osteogénica complementada. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI y se observaron en azul, la distribución de los filamentos de actina en rojo y la presencia de ALP u OC en verde. Barra de escala = 31.8 μm	73
Figura 69. Línea celular hDPSC sembrada en discos de la aleación Ti-35Nb-5In con diferente medio (proliferación en las imágenes de la derecha y diferenciación en las imágenes de la izquierda).Tinción con rodamina-faloidina e inmunofluorescencia de fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OC) en hADSC cultivadas en 2D durante 3 semanas con medio de proliferación y de diferenciación osteogénica complementada. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI y se observaron en azul, la distribución de los filamentos de actina en rojo y la presencia de ALP u OC en verde. Barra de escala = 31.8 μm	74
Figura 70. Línea celular MG-63 sembrada en discos de la aleación Ti-35Nb-5In con diferente medio (proliferación en las imágenes de la derecha y diferenciación en las imágenes de la izquierda).Tinción con rodamina-faloidina e inmunofluorescencia de fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OC) en hADSC cultivadas en 2D durante 3 semanas con medio de proliferación y de diferenciación osteogénica complementada. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI y se observaron en azul, la distribución de los filamentos de actina en rojo y la presencia de ALP u OC en verde. Barra de escala = 31.8 μm	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades mecánicas de algunas de las aleaciones de Ti utilizadas (Montes, Martínez, & Romero, 2006).	5
Tabla 2. Valores del proceso que se ha seguido para obtener la masa de cada elemento para fabricar 10 probetas de cada aleación.	15
Tabla 3. Masas reales de los elementos de las aleaciones.	16
Tabla 4. Composición de la solución Ringer-Hartmann modificada a emplear como electrolito.	32
Tabla 5. Dimensiones y masas de las muestras de la aleación Ti-15Mo-5In en verde obtenidas por compactación.	43
Tabla 6. Dimensiones y masas de las muestras de la aleación Ti-35Nb-5In en verde obtenidas por compactación.	43
Tabla 7. Valores de porosidad y densidad de las probetas en verde.	44
Tabla 8. Contracción de las probetas.	44
Tabla 9. Datos obtenidos tras el ensayo de Arquímedes.	44
Tabla 10. Valores de poro abierto, poro cerrado y densidad relativa.	45
Tabla 11. Porcentajes en peso reales obtenidos mediante análisis EBSD para cada aleación. ...	47
Tabla 12. Módulo elástico de cada aleación resultado del ensayo de Sonelastic.	56
Tabla 13. Resultados del ensayo de flexión a 4 puntos: Tensión máxima, desplazamiento máximo y módulo elástico.	57
Tabla 14. Valores del ensayo de liberación de iones de los elementos disueltos en la saliva artificial por cada aleación.	62
Tabla 15. Valores de potencial de circuito abierto (OCP) y desviación para cada una de las aleaciones.	63
Tabla 16. Valores del ajuste del montaje mediante circuito equivalente.	66

DOCUMENTO 1
MEMORIA

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Basado en altas demandas de prótesis dentales, la investigación en aleaciones nuevas o mejoradas para obtener procesos de biomateriales es cada vez más importante. Estadísticamente hablando, “El 69% de los adultos de 35 a 44 años han perdido al menos un diente permanente” por accidentes o enfermedades bucales (Gaviria et al., 2014). También se estima que “3 millones de personas en EEUU tienen implantes dentales”, lo que implica un aumento continuo de demanda (Alrabeah et al., 2017). Por las razones anteriores, el desarrollo de nuevos biomateriales y la metodología de procesamiento son esencialmente relevantes para avanzar en aplicaciones de odontología.

Los materiales dentales deben poder interactuar no solo con las tensiones generadas por masticar, sino también con las diferentes sustancias químicas que hay presentes en la boca y las que provienen de los alimentos, y todo esto deben hacerlo sin generar ninguna respuesta biológica enemiga.

1.1.1. Tejido óseo

Un hueso tiene la capacidad de regenerarse por sí mismo, de hecho, es el único tejido capaz de enmendar nuevas células tras un traumatismo ya que es un tejido dinámico en constante formación y reabsorción. La regeneración ósea es dada por un proceso de remodelación que genera entre un 5 y un 15% del tejido óseo al rededor del año en condiciones óptimas. En este proceso, se produce una absorción de células óseas producidas por los osteoclastos, como la formación de la matriz osteoide por los osteoblastos y su posterior mineralización (Hernández-Gil et al., 2006).

Los huesos están formados por distintos tejidos, entre ellos destaca el periostio, tejido cartilaginoso, hematopoyético y el tejido óseo. La función principal del tejido óseo es dar soporte y protección a los diferentes tejidos y órganos que forman parte del cuerpo humano. Está formado por células en un porcentaje del 2% y por matriz extracelular (el 98% restante)

Se pueden diferenciar las células que conforman el tejido óseo como (Albright & Skinner, 1987):

- Osteoclastos: Los osteoclastos son células que se originan a partir de los monocitos. Se trata de células multinucleadas que llevan a cabo la resorción ósea. Se ha estudiado que un osteoclasto puede reabsorber hasta $200.000 \mu\text{m}^3$ /día. Estos tienen una vida media alrededor de 15 a 20 días.
- Osteoblastos: Los osteoblastos proceden de las células madre mesenquimales pluripotentes, estos representan entre el 4 y el 6% de las células del hueso. El osteoblasto es responsable de la producción de los componentes de la matriz ósea. Los osteoblastos no funcionan individualmente, sino que se encuentran en grupos a lo largo de la superficie del hueso, que recubre la capa de matriz ósea que están produciendo gracias a la expresión de fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OSC) (Hadjidakis et al., 2006). Su vida media es alrededor de 3 semanas en el cuerpo humano. Además, algunos osteoblastos son capaces de modificar su fenotipo y convertirse en osteocitos. Una de las líneas celulares

más utilizadas en este campo es la línea de osteosarcoma humano (MG-63). Esta ha participado en numerosos estudios para analizar la biocompatibilidad y biofuncionalidad de los materiales de los implantes ya que anteriormente se ha demostrado que estas células siguen manteniendo sus características tras numerosos pases in vitro (Staehlke et al., 2019).

- Osteocitos: Un osteocito es la célula ósea madura rodeada por la matriz ósea que secretó antes como osteoblasto. Son células relativamente inactivas, aunque son cruciales para mantener el hueso. Por mecanotransducción convierten las cargas mecánicas en procesos celulares bioquímicos que regulan la remodelación del hueso. Forman el 90% del contenido celular óseo y su vida media es alrededor de 25 años (Curtis et al., 1985)-

Además, es interesante el estudio de las células hDPSC (células de pulpa dental humana), estas forman el tejido de la pulpa dentaria. Se trata de células madre que derivan del ectodermo y han sido causadas en la migración de las células de la cresta neural. Desde hace unos años este tipo de células ha sido muy utilizado en el campo de la biomedicina ya que son muy asequibles y además, tienen la disposición de poder diferenciarse en varios fenotipos celulares (Nutti et al., 2016).

Por otra parte, los huesos se pueden clasificar en dos grupos diferentes: (Cano & Campo, 2007)

- Hueso Cortical: El hueso cortical se trata de la parte más dura y resistente que rodea a los huesos de manera individual del esqueleto. Este tiene gran resistencia a la compresión (90-280 MPa) y un módulo elástico de 15-20 GPa. En comparación con el hueso trabecular, se trata de un hueso muy poco poroso (3 a 12%) y presenta una densidad media de 1.80 g/cm³.
- Hueso Trabecular: El hueso trabecular se encuentra en el interior de los huesos y en los extremos de los huesos largos. Este es menos rígido que el cortical (módulo elástico 0.75-10 GPa) y mucho más poroso (50-90%), lo que hace que se trate de un hueso poco denso con un valor de 0.2 g/cm³.

1.1.2. Interfase hueso-implante

Los dientes son los órganos anatómicos que participan en la masticación. Estos están formados por la corona, el cuello y la raíz. Los dientes se encuentran situados en el interior de los alvéolos del hueso de la mandíbula.

El soporte de los dientes se lo da un conjunto de estructuras llamado periodonto. Este lo forman la encía, el cemento, el ligamento periodontal y el hueso alveolar. A su vez, el hueso alveolar está formado por dos estructuras: el proceso alveolar y la cortical alveolar.

Por otro lado, se define implante dental como “dispositivo hecho de un material biológicamente inerte que es insertado mediante cirugía en el hueso alveolar y que sustituye la raíz de un diente ausente” (Vanegas et al., 2009).

La osteointegración ha sido durante mucho tiempo el gran reto de la nueva era de la implantología (Albrektsson & Zarb, 1993). La osteointegración se produce cuando el implante conecta de

manera firme, estable y duradera con el tejido óseo que se forma alrededor de él. El logro de este suceso tiene que ver con si se ha producido o no la osteoinducción y la osteogénesis anteriormente. Es decir, si las células madre presentes se diferencian en las células osteogénicas del tejido óseo y estas a su vez, son capaces de formar lugares de deposición del nuevo hueso. Si además la formación del nuevo hueso se produce en la superficie del implante, es decir, las células colonizan en la superficie de este, significa que se ha producido la osteoconducción. Como fruto de esta colonización se crea una interfase de contacto directa entre el implante y sus tejidos de alrededor.

Que se produzca la osteointegración del hueso significaría que la herida ha sanado completamente tras la cirugía del implante y el organismo del paciente no ha producido ninguna reacción ante el cuerpo extraño. Este fenómeno va a depender principalmente de la biocompatibilidad del implante y sus características superficiales.

Para que un implante consiga osteointegrarse con el hueso huésped del paciente, se han de dar tres factores importantes:

- **Calidad del hueso receptor:**

La viabilidad del proceso de cicatrización y del nuevo hueso van a depender de la calidad del hueso huésped y de cuál sea el procedimiento quirúrgico utilizado. El hueso cortical tiene mayor densidad y menor porosidad que el hueso trabecular, por lo que van a ofrecer mayor estabilidad y mejor anclaje con el material implantado. Sin embargo, el hueso trabecular requiere menor tiempo a la hora de la cicatrización ya que este se encuentra más cerca de la médula ósea y el tejido hematopoyético. Por esta razón, es más conveniente que el lugar de la implantación tenga una calidad de hueso trabecular y no hueso cortical. No obstante, la dualidad estabilidad-tiempo de cicatrización ha impulsado al diseño de implantes osteointegrables destinados a ser usados en regiones donde haya hueso trabecular mayoritariamente (Vanegas et al., 2009).

A parte de tener en cuenta en la formación de hueso en la interfase la anatomía del hueso alveolar del paciente en cuestión, se han de tener en cuenta factores aún más generales como la edad del paciente, el historial médico que indique si este padece o no alguna otra enfermedad ósea, etc. Además, hay que examinar el maxilar del paciente antes de la intervención quirúrgica para saber cómo es su tamaño, con qué espacio cuenta el cirujano para poder colocar en su sitio el implante, y, la posición y la dirección que ha de tener este.

- **Biocompatibilidad:**

Se conoce como material biocompatible aquellas aleaciones que son tanto química como biológicamente inertes. Se dice que un material es biocompatible cuando no presenta indicios de corrosión y, por tanto, no libera sustancias tóxicas que puedan dañar a los tejidos que lo rodean.

En el proceso por el que se delimita la biocompatibilidad de un material se realizan pruebas experimentales in vitro utilizando cultivos celulares que determinan la solubilidad y toxicidad de las aleaciones utilizadas en cuestión. La biocompatibilidad es una de las características más importantes en el éxito de un implante.

- Biofuncionalidad:

Otro factor importante es la superficie del implante ya que esta va a ser la responsable de transferir las fuerzas que se generan durante la masticación en el menor espacio posible del hueso disponible. Un estado óptimo de osteointegración del implante sería la unión perfecta entre el hueso cortical y trabecular al implante (Pérez Pevida, 2017).

1.1.3. Aleaciones base titanio

El titanio y sus aleaciones es muy utilizado en el campo de los biomateriales desde el año 1951. Destaca su uso en la odontología por sus favorables propiedades mecánicas, físicas y propiedades químicas ya que presenta baja densidad, alta fuerza mecánica, buena resistencia a corrosión y excelente biocompatibilidad. (Veiga et al., 2012).

A bajas temperaturas, el titanio puro tiene una estructura hexagonal compacta (fase α). Pero, a altas temperaturas, la estructura estable pasa a ser cúbica centrada en el cuerpo, lo que se conoce como fase β del titanio. La temperatura beta-transus de la que se está hablando del titanio puro es de alrededor de 882°C. (Veiga et al., 2012).

El hecho de que este elemento tenga ambas estructuras es de gran importancia, pues esto le otorga la capacidad de tener una amplia variedad de propiedades en las aleaciones base Ti combinando transformaciones de fase con diferentes microestructuras. (Veiga et al., 2012).

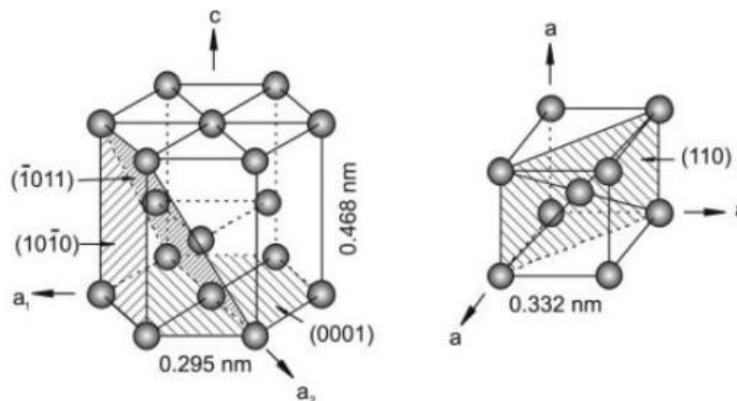


Figura 1. Las dos estructuras del titanio posibles: A la izquierda aparece la estructura hexagonal compacta (fase α), y a la derecha se observa la estructura cúbica centrada en el cuerpo (fase β) (Leyens & Peters, 2003).

La temperatura de transformación alotrópica del titanio va a depender de los distintos elementos que formen las diferentes aleaciones. Estos se pueden dividir en tres grupos: los elementos de aleación α -estabilizantes (favorece la formación de fase α), β -estabilizantes (favorecen la formación de fase β) y elementos neutros. (Veiga et al., 2012).

El Aluminio (Al) se trata de un elemento α -estabilizante muy utilizado en las aplicaciones biomédicas. Este aumenta la temperatura alotrópica en medida que incrementa su cantidad como

soluto en la aleación Ti y presenta solubilidad tanto en la fase alfa como en la fase beta. (Veiga et al., 2012).

Por otra parte, el Molibdeno (Mo), Vanadio (V), Tantalio (Ta) y Niobio (Nb) se clasifican como elementos β -estabilizantes. Estos tienen la característica de ser capaces de estabilizar la fase beta a temperatura ambiente siempre que se utilice la cantidad necesaria de cada elemento. (Leyens & Peters, 2003).

Además, el Zirconio (Zr) y el Estaño (Sn), se clasifican como elementos neutros. Estos elementos tienen la capacidad de aumentar o disminuir la temperatura de transición según las concentraciones empleadas. Además, son elementos que presentan solubilidad total tanto en la fase alfa como beta del titanio. (Veiga et al., 2012).

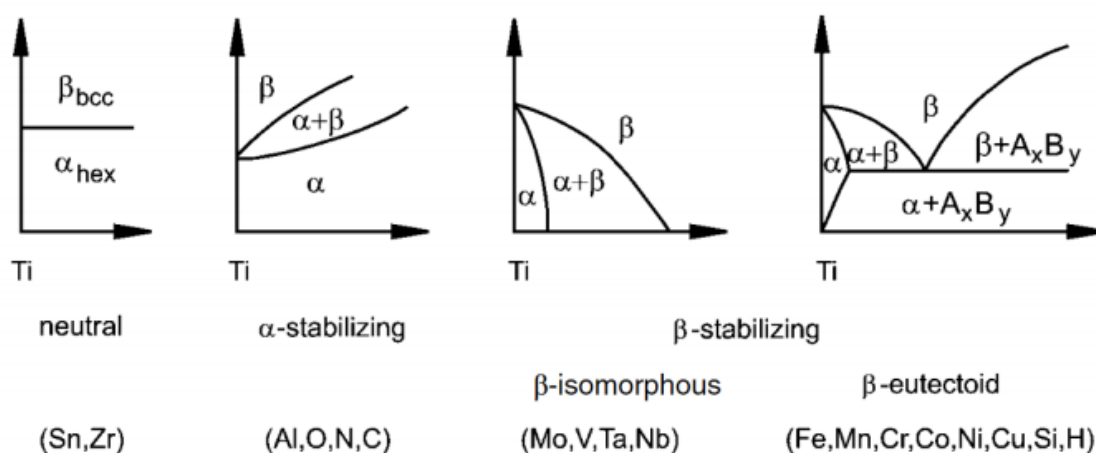


Figura 2. Diagrama de equilibrio de fases de los elementos más comunes en las aleaciones base titanio (Leyens & Peters, 2003).

La tabla 1 indica las propiedades mecánicas de algunas de las aleaciones de titanio utilizadas. En ella se puede observar que las aleaciones β presentan mejores propiedades mecánicas que el resto. Pues poseen menor módulo elástico, mayor dureza, mayor límite elástico y mayor resistencia a tracción que las aleaciones α y $\alpha + \beta$.

Tabla 1. Propiedades mecánicas de algunas de las aleaciones de Ti utilizadas (Montes, Martínez, & Romero, 2006).

Aleación	Estado	Estructura	Dureza (HV)	Módulo elástico (GPa)	Límite elástico (MPa)	Resistencia tracción (MPa)
Ti CP – Grado 2	-	α	155-165	100-105	276-360	345-490
Ti 6Al 4V	Solubilización y envejecimiento	$\alpha - \beta$	380-420	110-117	800-1100	900-1200
Ti 6Al 7Nb	-	$\alpha - \beta$	270-290	100-110	898-905	995-1010
Ti 13Nb 13Zr	Solubilización y envejecimiento	Casi - β	280-300	76-82	800-900	900-1050
Ti 12Mo 6Zr 2Fe	-	β	330-350	63-90	900-1150	980-1140

De las aleaciones expuestas en la tabla 1, las más comúnmente utilizadas son el Titanio puro comercial (Ti CP) y la aleación Ti-6Al-4V.

El Ti-CP, puesto que pertenece a fase α , presenta propiedades excelentes en cuanto a la resistencia a la corrosión con fluidos corporales y biocompatibilidad, mucho mejores que la aleación Ti-6Al-4V. No obstante, la aleación Ti-6Al-4V es mucho más utilizada a día de hoy en aplicaciones de prótesis e implantes dentales. Este hecho tiene que ver con que la aleación Ti-6Al-4V pertenece a fase $\alpha + \beta$. Esto le otorga propiedades mecánicas más óptimas que las del titanio comercial puro, pues tanto su dureza como su resistencia a fatiga son muy superiores a las que ofrece el Ti-CP. (Khorasani et al., 2015).

No obstante, estudios demuestran los efectos tóxicos que puede tener la aleación Ti-6Al-4V cuando es implantada en la cavidad bucal. El hecho de presentar toxicidad con el medio en cuestión puede provocar a el desajuste mecánico del propio implante y dar lugar a fallo en un futuro. Según estudios, este comportamiento tiene que ver con el Aluminio y el Vanadio (Kuroda et al., 1998).

Además, se dan diferencias significativas en el valor del módulo elástico que tiene la aleación Ti-6Al-4V (110-117 GPa) respecto al del hueso cortical (20 GPa). Este valor es importante ya que se trata de otro parámetro que contribuye a la baja durabilidad de las prótesis. Pues cuando el módulo elástico del implante difiere mucho del tejido óseo, hace que el tejido que está alrededor del implante se desanime con el tiempo debido a la absorción casi total de la tensión mecánica por parte de la prótesis. Esta característica se debe a que el módulo de elasticidad de estos materiales es significativamente superior al del hueso (Okazaki Y et al., 1998).

Así, una opción es la producción de materiales con un alto porcentaje de fase β , lo que proporciona una mejor compatibilidad mecánica. Además, las características mecánicas están directamente relacionadas con el tipo de microestructura que se forma después de procesar los materiales. En las aleaciones de titanio, la principal barrera al movimiento de desplazamiento está representada por las interfaces β / α , refiriéndose así a la morfología y distribución de la fase α , que normalmente delimitan la resistencia mecánica de las aleaciones (Banerjee & Williams, 2013).

Por todo esto, se están estudiado constantemente nuevas aleaciones con ausencia de aluminio y vanadio que presenten mejor comportamiento en la toxicidad y que tengan un módulo elástico más parecido al del hueso (Lario-Femenía, 2016).

Los materiales que incluyen elementos no tóxicos, como Nb y Sn en aleaciones de Ti, son excelentes opciones para el desarrollo de nuevos dispositivos biomédicos además de no ser dañinos para el organismo. El Nb actúa como elemento estabilizador de fase β y se ha demostrado que en aleaciones Ti es capaz de disminuir el valor del módulo elástico hasta valores muy cercanos al del hueso (Miura K et al., 2011) (Matsumoto H et al., 2005).

Del mismo modo, varios investigadores estudiaron el comportamiento de la adicción de Mo en aleaciones de Ti. Se comprobó que el Mo actúa como un fuerte estabilizador β que puede aumentar las propiedades mecánicas y biológicas, ya que puede reducir el módulo elástico,

disminuye la porosidad, y es capaz de aumentar densidad, la microdureza y la resistencia. Además, presenta un buen comportamiento biológico pues también aumenta la resistencia a la corrosión en las aleaciones de Ti (Mohan et al., 2021).

El indio es un elemento α -estabilizante químicamente similar al aluminio. Se intentó integrar el indio en el uso de implantes dentales y hay informes que confirman que el su uso como elemento de la aleación Ti en biomateriales puede mejorar las propiedades mecánicas necesarias en este tipo de implantes. Por una parte, el In funciona como elemento no citotóxico en materiales para aplicaciones dentales, comportamiento propio de aleaciones α (B.H. Lee et al., 2003) (Hornez et al., 2002).

La necesidad de desarrollar simulaciones del ambiente bucal se ve aumentada con la creación de estos nuevos compuestos / estas nuevas aleaciones. El correcto funcionamiento a largo plazo de este tipo de estructuras está directamente relacionado con la resistencia a las tensiones creadas con la masticación y a las reacciones electroquímicas que ocurren en el interior de la boca. Un claro ejemplo es la infiltración salivar entre los implantes y las estructuras soportadas por los mismos, lo cual favorece la creación de celdas galvánicas, y con ello la aparición de corrosión por grietas y la posterior liberación de iones. Además, los iones fluoruro pueden llegar a disminuir la resistencia a la corrosión de este tipo de aleaciones debido a su predisposición a atacar las superficies compuestas por titanio. Este hecho resulta de gran interés debido a la gran cantidad de compuestos actuales utilizados para limpieza dental y prevención de caries que contienen fluoruro, provocando la liberación de productos de corrosión que pueden llegar a producir inflamaciones y pérdidas óseas periprotésicas. (Miotto et al., 2016).

1.1.4. Periimplantitis

Por tanto, si la aleación escogida como implante dental no cumple con los requisitos que han sido nombrados hasta ahora (que sea biocompatible, biofuncional, y que su módulo elástico no difiera significativamente al del hueso, entre otros), el paciente puede sufrir la enfermedad conocida como periimplantitis. La periimplantitis es el proceso inflamatorio que afecta a los tejidos que se encuentran alrededor del implante a causa de la presencia de especies bacterianas. Cuando la inflamación afecta solo a los tejidos blandos que rodean al implante dental se llama mucositis. La mucositis se trata de un proceso reversible ya que en este caso el problema inflamatorio no va a crear pérdida ósea tras la remodelación inicial y después de la colocación del implante. No obstante, se puede llegar a originar una perrimplantitis si esta no se trata a tiempo y provocar la pérdida de tejidos duros y soporte óseo de alrededor del implante.

Los expertos consideran como umbral para diagnosticar periimplantitis una pérdida de hueso vertical de 2 mm. Además, para llevar un seguimiento a los pacientes realizan sondajes y radiografías. Si en ellas se observa que el paciente pierde más de 0.44 mm por año del nivel óseo le diagnostican una periimplantitis progresiva.

Como en la interfase entre hueso-implante no hay tejido intermedio, influyen varios factores a la hora de decidir si la colocación de un implante es una buena opción. Es necesario entender que,

las formas en las que el tejido duro y blando interactúan con el implante contribuyen al éxito de la osteointegración, así como un tejido blando favorable y una higiene bucal óptima. Es por ello que, el mantenimiento de estos implantes es imprescindible para su vida útil a lo largo del tiempo.

Actualmente hay un campo abierto en la investigación de tratamientos de las enfermedades periimplantarias.

En primer lugar, se da el estudio de superficies que frenen la creación de la capa bacteriana con el uso de zinc y plata, pues tienen propiedades antibacterianas. Además, hacer uso de antibióticos en la superficie del implante puede actuar como defensa de la capa bacteriana (Segura et al., 2015).

Por otro lado, para reducir los tiempos de carga de los implantes se han desarrollado superficies más rugosas. Un ejemplo sería cubrir las superficies con hidroxiapatita y rociarlas con plasma-spray de titanio para aumentar la rapidez del contacto hueso-implante (Vanegas et al., 2009).

El caso de la superficie rugosa o no del implante es un tema que aún falta por tratar pues, a pesar de que la rugosidad del implante facilita la adhesión hueso-implante al aumentar la superficie de contacto, también se ha estudiado que algunas de las superficies con mayor rugosidad son más propensas a agudizar la periimplantitis ya que en estas es más fácil el acúmulo bacteriano que en las superficies lisas (LavosValereto et al., 2002).

1.2. Motivación

En primer lugar, analizando los resultados obtenidos en 2017, se estimó que un 19.83% de los sujetos que llevan un implante dental son propensos a sufrir periimplantitis, un 46.83% pertenecería a los sujetos que sufren mucositis. (Lee et al., 2017). Por lo que parece que la mitad de los pacientes sufrirán inflamación de la mucosa implantaria y un número menor, pero importante, llegarán a sufrir pérdida ósea (Harry Dym, 2020).

En consecuencia, a este porcentaje de fallo, ha crecido un campo interesado constantemente en el desarrollo de nuevas aleaciones y soluciones que puedan mejorar estas debilidades que presentan las aleaciones empleadas hasta ahora. (Li & Yang, 2014).

Desde hace años, los implantes de titanio han pasado a ser una solución común en este sector ya que se trata de un elemento que presenta gran biocompatibilidad y resistencia a la corrosión. No obstante, también presentan algunos problemas cuando son utilizados como implantes dentales.

En primer lugar, en el caso de la aleación Ti-6Al-4V se ha demostrado que esta presenta un módulo elástico que difiere mucho al valor del módulo elástico del hueso natural. Este hecho puede provocar el fallo del implante. Pues, debido al apantallamiento de tensiones generado por esa diferencia en el valor del módulo elástico puede causar atrofia por desuso del implante (Hanawa, 2011).

En segundo lugar, varios estudios han demostrado los efectos citotóxicos que pueden presentar en el organismo elementos como el aluminio o el vanadio tras resultados obtenidos en el ensayo de liberación de iones (Kuroda et al., 1998).

Por último, también se ha comprobado que los implantes dentales presentan alta tasa de infección, alrededor del 40% (Leyens & Peters, 2003).

El tratamiento de implantes dentales ha aumentado en los últimos diez años, estando presente en una de cada diez personas adultas (Estudio de Salud Bucodental Sanitas, 2019). Debido al gran grupo que está expuesto ante este tratamiento, surge la necesidad de encontrar soluciones que acaben con la problemática expuesta anteriormente.

Es por ello este análisis exhaustivo de las aleaciones prometedoras Ti-15Mo-5In y Ti-35Nb-5In. La caracterización microestructural y mecánica de estas va a permitir asegurar que ambas aleaciones presentan propiedades idóneas además de un módulo de elasticidad que puede beneficiar considerablemente a la transferencia de carga entre el hueso y el implante. Así mismo, la sustitución del aluminio y el vanadio por elementos biocompatibles como el niobio y el molibdeno puede suponer una reducción de la tasa de infecciones de los implantes. Además, el análisis biológico de las aleaciones en cuestión es imprescindible para saber el comportamiento de estas cuando son introducidas en el organismo humano como implante biomédico.

1.3. Objetivos

El objetivo principal de este proyecto es el estudio de la biocompatibilidad de las aleaciones Ti-15Mo-5In y Ti-35Nb-5In en sus aplicaciones como implantes dentales para la posible reducción de incidencia de periimplantitis.

Para poder llegar a este objetivo, se deben ir abordando algunos objetivos más específicos durante este trabajo:

- 1.1. Obtención de ambas aleaciones mediante técnicas de pulvimetalurgia convencional.
- 1.2. Caracterización microestructural de las aleaciones en cuestión mediante técnicas como microscopía óptica, microscopía electrónica o difracción de rayos x.
- 1.3. Caracterización de las propiedades mecánicas de las aleaciones estudiadas mediante ensayos de flexión a cuatro puntos, dureza y microdureza. Además de la obtención del valor del módulo elástico con el equipo Sonelastic.
- 1.4. Análisis de la citotoxicidad de Ti-15Mo-5In y Ti-35Nb-5In.
- 1.5. Análisis biológico de ambas aleaciones que permita conocer la capacidad de diferenciación osteogénica y nivel de viabilidad de las (hDPSC y MG-63), al ser sembradas en contacto con discos de Ti-15Mo-5In PM y Ti-35Nb-5In PM.

2. PLANIFICACIÓN

En este punto se muestra el plan de trabajo que se va a seguir para poder llevar a cabo el proyecto. Para ello, se diferencian 5 fases y se nombran los objetivos que se pretenden conseguir en cada una de ellas.

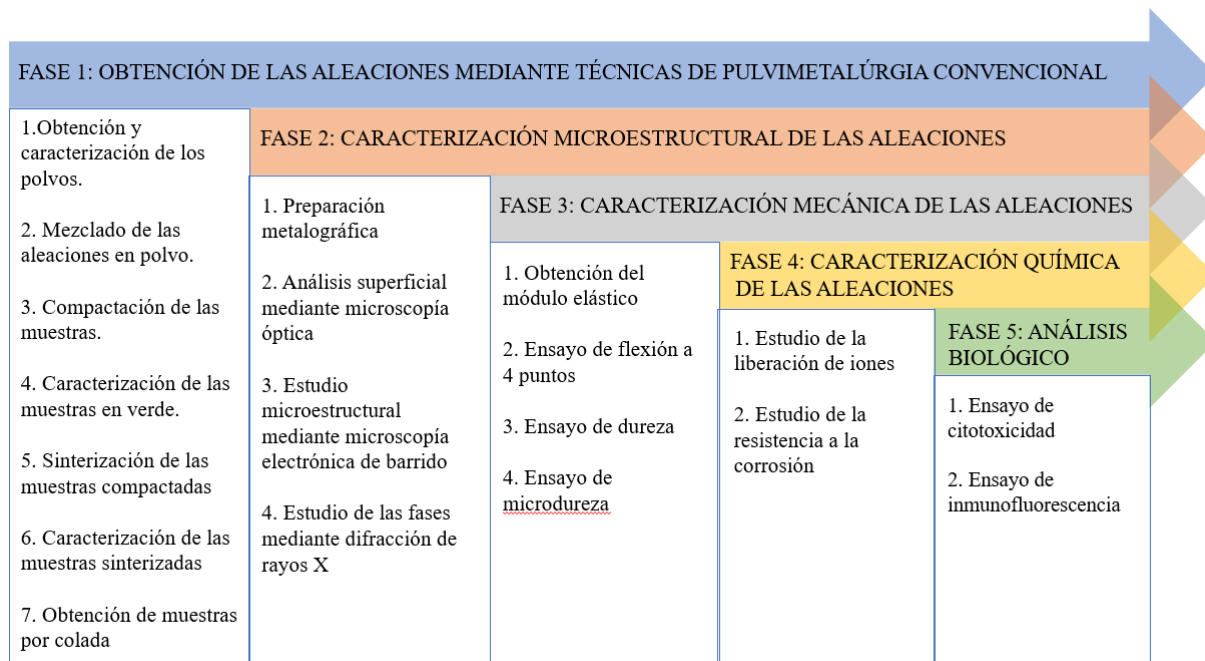


Figura 3. Esquema de la planificación del proyecto.

2.1. FASE 1: OBTENCIÓN DE LAS ALEACIONES

2.1.1. OBTENCIÓN DE LAS ALEACIONES MEDIANTE TÉCNICAS DE PULVIMETALÚRGIA CONVENCIONAL

En esta primera fase se consigue la obtención de los materiales con los que se va a trabajar durante el proyecto. Se trata de dos aleaciones formadas por Ti-15Mo-5In y Ti-35Nb-5In, respectivamente.

En el punto inicial se parte de los polvos de Titanio, Indio, Molibdeno y Niobio. Para conseguir las aleaciones deseadas se procede a mezclar estos polvos según las cantidades y elementos necesarios en cada una de ellas.

En segundo lugar, se procederá a compactar los polvos para así conseguir 10 probetas de tamaño 30x12x5 mm de cada una de las diferentes aleaciones, todas ellas serán sinterizadas.

2.1.2. OBTENCIÓN DE LAS ALEACIONES MEDIANTE COLADA

Además, se partirá de una muestra de Ti-15Mo-5In y otra de Ti-35Nb-5In ambas obtenidas por colada. El procesado de obtención por colada permite que la aleación posea unas características mecánicas excelentes ya que experimenta una etapa de enfriamiento y solidificación en su preparación.

2.2. FASE 2: CARACTERIZACIÓN MICROESTRUCTURAL DE LAS ALEACIONES

Para conocer las distintas fases presentes en la aleación, el aspecto morfológico, la distribución de las mismas y su estructura cristalina se empleará la difracción de rayos X, la microscopía óptica y la microscopía electrónica de barrido. Esta fase permitirá entender la microestructura de la aleación con la que se trabajará y, por lo tanto, anticipar ciertos comportamientos. Se analizarán tanto las probetas obtenidas por pulvimetalurgia convencional como las de colada.

2.3. FASE 3: CARACTERIZACIÓN MECÁNICA DE LAS ALEACIONES

En esta fase se sacan las propiedades mecánicas de las aleaciones y se estudia la influencia que tiene el Molibdeno y el Niobio en ellas.

Para ello se saca el valor del módulo elástico ya que es especialmente interesante saberlo para poder compararlo con el módulo elástico del hueso y saber si este implante va a repartir bien las tensiones o no. Por otra parte, se someten las probetas a un ensayo de flexión de 4 puntos, y por último, se practican los ensayos de dureza y microdureza.

Todo esto ayudará a conocer las propiedades mecánicas de las aleaciones estudiadas y poder dar una primera opinión de si van a aguantar o no ciertas fuerzas que se producen en la cavidad bucal como puede ser la masticación.

2.4. FASE 4: CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LAS ALEACIONES

Es muy importante conocer el comportamiento del implante cuando este está dentro del organismo humano ya que puede reaccionar ante el contacto con los distintos fluidos, como por ejemplo la saliva. Es por ello que, en esta cuarta fase, se estudiará el comportamiento que tienen las aleaciones bajo ambientes corrosivos que imiten la cavidad bucal mediante ensayos de corrosión y ensayo de liberación de iones.

2.5. FASE 5: ANÁLISIS BIOLÓGICO

En esta última fase se estudia el análisis biológico de las aleaciones. Es muy importante que tengan un excelente comportamiento al estar en contacto con otros elementos del cuerpo humano.

La aleación ha de promover la actividad celular. Para comprobar que esto se cumple se realiza el ensayo de citotoxicidad donde se podrá medir la cantidad de células que sobreviven en el ambiente que crea la liberación de iones del implante.

Por otro lado, se realizará el ensayo de inmunofluorescencia para comprobar que la muestra ayuda o no a la diferenciación hacia células características del diente como son los osteoblastos.

3. MATERIALES Y METODOLOGÍA

En este apartado se describen los materiales y la metodología que se han utilizado para poder llevar a cabo cada uno de los ensayos y poder llegar a cumplir los objetivos de este trabajo.

El proceso se ha llevado a cabo en el Instituto de Tecnología de Materiales de la Universidad Politécnica de Valencia y en el Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

3.1. FASE 1: OBTENCIÓN DE LAS ALEACIONES

3.1.1. OBTENCIÓN DE LAS ALEACIONES MEDIANTE TÉCNICAS DE PULVIMETALÚRGIA CONVENCIONAL

3.1.1.1. Obtención y caracterización de los polvos

Para la selección de los polvos se considerarán varios parámetros de los elementos a alear, así como el tamaño de la partícula, su morfología y su pureza. Se trabajará con el distribuidor Atlantic Equipment Engineering y Alpha Aesar para que envíe las materias primas al laboratorio, teniendo en cuenta la facilidad de envío y presupuesto.

Los proveedores suministran al laboratorio los materiales junto con su análisis químico-físico de los componentes. Los materiales utilizados serán: titanio (Ti), indio (In), molibdeno (Mb) y niobio (Nb).

3.1.1.2. Mezclado de las aleaciones en polvo

Una vez está el material disponible, se dispone a mezclar los polvos para obtener 20 probetas, 10 para la aleación Ti-15Mo-5In y las otras 10 para Ti-35Nb-5In.

Para saber la cantidad de polvos que se van a utilizar para formar cada una de las aleaciones se han de seguir los siguientes pasos:

En primer lugar, se calcula la densidad de la mezcla siguiendo la ecuación, donde ρ_i representa la densidad teórica de los elementos utilizados y $\%w_i$ el porcentaje en peso de los mismos.

$$\rho_{rt} = \frac{100}{\frac{\%w_{Ti}}{\rho_{Ti}} + \frac{\%w_{Mo}}{\rho_{Mo}} + \frac{\%w_{In}}{\rho_{In}}}$$
$$\rho_{rt} = \frac{100}{\frac{\%w_{Ti}}{\rho_{Ti}} + \frac{\%w_{Nb}}{\rho_{Nb}} + \frac{\%w_{In}}{\rho_{In}}}$$

Una vez se conoce la densidad la mezcla, sabiendo que las probetas van a tener un volumen de 1800 mm³ (Dimensiones de probetas: 30x12x5mm) y que el número de probetas para cada aleación es 10, se puede obtener la masa total de la mezcla necesaria para realizar las mezclas siguiendo la siguiente ecuación:

$$\text{Masa total de la mezcla} = 10 \cdot \text{Volumen probeta} \cdot \rho_{rt}$$

En último lugar, se multiplicará el porcentaje en peso de cada elemento por la masa total de la mezcla para saber la cantidad de masa de cada uno de los elementos para formar la aleación final:

$$\text{Masa del elemento} = \frac{\text{Masa total de la mezcla} \cdot \%wi}{100}$$

Tabla 2. Valores del proceso que se ha seguido para obtener la masa de cada elemento para fabricar 10 probetas de cada aleación.

Aleación	Elementos	Densidad	% peso	Densidad mezcla (g/cm3)	Masa Flexión (g)	Cantidad de probetas	Masa de mezcla (g)	Masa de elemento (g)
Ti-15Mo-5In	Ti	4.507	80.00	5.03	9.048	10	90.478	72.383
	Mo	10.28	15.00					13.572
	In	7.300	5.00					4.524
Aleación	Elementos	Densidad	% peso	Densidad mezcla (g/cm3)	Masa Flexión (g)	Cantidad de probetas	Masa de mezcla (g)	Masa de elemento (g)
Ti-35Nb-5In	Ti	4.507	60.00	5.53	9.955	10	99.549	59.729
	Nb	8.57	35.00					34.842
	In	7.300	5.00					4.977

Para mezclar los polvos se utiliza la cámara de guantes que se encuentra en el laboratorio modelo GP Campus del fabricante Jacomex. Esta se puede observar en la figura 4.



Figura 4. Cámara de guantes de laboratorio modelo GP Campus del fabricante Jacomex.

En esta se puede hacer la mezcla de polvos en un ambiente controlado ya que dispone de un controlador de presión y de atmósfera.

Para conseguir las dos aleaciones deseadas, se utilizan dos recipientes de plástico distintos. Para rellenar ambos pesaremos los polvos hasta conseguir las medidas teóricas que se han calculado anteriormente para cada uno. En su medición se utilizarán distintos pocillos de plástico para que las aleaciones no sean contaminadas.

El resultado de las masas que realmente han sido pesadas en la balanza y, por tanto, van a ser utilizadas en este proyecto se puede observar en la siguiente tabla. Como se observa, teniendo estos datos se puede sacar el porcentaje en peso final y la densidad teórica final.

Tabla 3. Masas reales de los elementos de las aleaciones.

Aleación	Elementos	Masa realmente utilizada (g)	% Peso final	Densidad teórica final (g/cm ³)
Ti-15Mo-5In	Ti	72.378	79.98	5.027
	Mo	13.579	15.00	
	In	4.542	5.02	

Aleación	Elementos	Masa realmente utilizada (g)	% Peso final	Densidad teórica final (g/cm ³)
Ti-35Nb-5In	Ti	59.713	60.00	5.531
	Nb	34.843	35.02	
	In	4.967	4.99	

Una vez tenemos los dos recipientes de las aleaciones completos, metemos en cada uno de ellos 3 bolas de acero inoxidable de 5mm de radio para poder homogeneizar las aleaciones posteriormente en una túbula durante 45 minutos.



Figura 5. Recipientes correspondientes a la aleación Ti-15Mo-5In y Ti-35Nb-5In respectivamente.

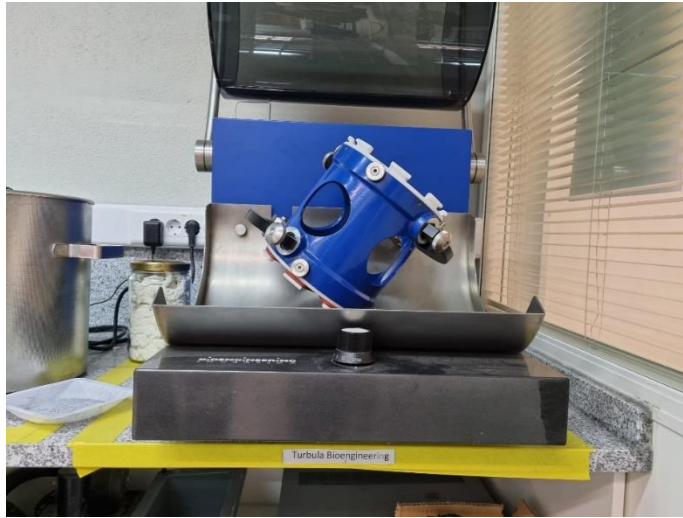


Figura 6. Trbala inversiva de BioEngineering.

3.1.1.3. Compactación de las muestras

Se necesita compactar las muestras para conseguir las probetas con las que poder trabajar en durante todo el proyecto. Para ello se utiliza una prensa hidráulica de 30 toneladas de capacidad de la marca MEGA. Las muestras que se han homogeneizado se introducen en la matriz flotante de 30x12x5 mm. Entonces, se aplica una fuerza constante de 15 segundos sobre las muestras.

Para garantizar el buen uso de la máquina se realiza una limpieza de la matriz cada 4 muestras compactadas. Además, para poder sacar las muestras que van siendo compactadas se va lubricando la matriz con estearato de Zinc. Este proceso dará como resultado las muestras en verde.

3.1.1.4. Caracterización de las muestras en verde

Se miden y pesan las muestras en verde para poder sacar sus datos. Una vez recopilamos estos datos podemos sacar el volumen y la densidad en verde de las muestras siguiendo las ecuaciones siguientes para, posteriormente poder calcular la porosidad en verde y así, la porosidad en verde promedio.

$$Volumen\ en\ verde = \frac{Largo \cdot Ancho \cdot Espesor}{1000}$$

$$Densidad\ en\ verde = \frac{masa\ en\ verde}{volumen\ en\ verde}$$

$$Porosidad\ en\ verde(\%) = \left(1 - \frac{\rho_v}{\rho_t}\right) \cdot 100$$

Para para tomar las medidas se utiliza el pie de rey de RS Components con una sensibilidad de 0.01 mm y, por otro lado, medir los pesos se utiliza la balanza KERN ABJ-NM/ABS-N disponible en el laboratorio que se observa en la figura 7.



Figura 7. Pie de rey de RS Components /Balanza KERN ABJ-NM/ABS-N.

3.1.1.5. Sinterización de las muestras compactadas

En el proceso de sinterizado se generan puentes de unión mediante difusión de átomos entre partículas de polvo. Por tanto, si se aumenta la temperatura, la unión entre partículas acelerará. Es por ello que dos factores muy importantes a tener en cuenta en este proceso son: la temperatura y el tiempo.

Por otra parte, dado que el Titanio es un elemento que produce reacción, se ha de trabajar en condiciones de la atmósfera controladas. Por ello, el proceso de sinterización se va a realizar en un horno de alto vacío donde se consigue una atmósfera inerte. Por ello, la sinterización se realizará en el horno tubular de alto vacío Carbolite HVT 15-75- 450. Se meterán las muestras en el interior de este sobre las bandejas que contiene y una vez cerrado el horno se baja la presión hasta conseguir $3 \cdot 10^{-4}$ mbares.

Cuando se elige la temperatura del ciclo de sinterización se han de tener en cuenta las propiedades del material. En este caso, el Titanio tiene una temperatura de fusión de 882°C , esto quiere decir que a 882°C va a sufrir un cambio de fase. Para garantizar que el cambio de fase se produce de manera homogénea en toda la masa de la muestra y evitar que partes del material se sublimen al fin del sinterizado, la muestra ha de estar a la misma temperatura en cualquiera de sus zonas.

El proceso de sinterizado es el siguiente:

- Sinterización a 780°C durante 60 minutos a velocidad $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$.
- Aumento de la temperatura del horno 1300°C durante 180 minutos a velocidad $7^{\circ}\text{C}/\text{min}$.
- Apagar el horno y dejar las muestras dentro hasta que enfríen.



Figura 8. Horno tubular de alto vacío Carbolite HVT 15-75- 450.

3.1.1.6. Caracterización de las muestras sinterizadas

Una vez obtenidas las probetas sinterizadas se estudian que cambios han sufrido estas a la hora de sinterizado. El método de Arquímedes sacará los valores con los que se va a trabajar. Para ellos, se siguen los siguientes pasos:

Primero se mide el peso en seco de las muestras (M_{se}), luego se mide el peso de las muestras sumergidas en agua (M_{as}), y, por último, se mide el peso de las muestras que han sido sumergidas en agua en aire (M_{aa}). Teniendo estos datos y sabiendo la densidad de las muestras (ρ_{rt}) se puede calcular el volumen teórico (V_t), el volumen de poro abierto (V_{OP}) y de poro cerrado (V_{cl}) y el volumen exterior (V_{ext}) siguiendo las siguientes ecuaciones:

$$V_t = M_{SE} \cdot \rho_{rt}$$

$$V_{OP} = M_{aa} - M_{se}$$

$$V_{cl} = V_{Ext} - V_t - V_{OP}$$

$$V_{Ext} = M_{aa} - M_{as}$$

Con estos valores se podrán calcular los valores de la densidad experimental y el porcentaje de porosidad abierta y cerrada:

$$\rho_e = \frac{M_{se}}{V_{Ext}}$$

$$\% \text{ porosidad abierta} = \frac{V_{OP}}{V_{Ext}}$$

$$\% \text{ porosidad cerrada} = \frac{V_{cl}}{V_{Ext}}$$

Para ello, se utiliza la balanza de precisión KERN 770 con un peso máximo de 210 g y una sensibilidad de 0,0001 g. Teniendo el montaje del ensayo listo se podrán realizar todas las medidas.

Por otra parte, para la dimensionalidad de estas se utilizará el pie de rey mencionado anteriormente en la medición de las probetas después de la compactación.

3.1.2. OBTENCIÓN DE LAS ALEACIONES MEDIANTE COLADA

Para obtener las aleaciones por colada se hace uso del horno de arco eléctrico, en particular el modelo Compact Arc Melter MAM-1 de la marca Edmund-Bühler MAM-1.

Es interesante obtener probetas por colada ya que esta técnica permite obtener superficies más uniformes y así, poder comparar estos resultados con los obtenidos por pulvimetalurgia. Las probetas que han pasado por este proceso provienen de probetas que fueron sinterizadas anteriormente. Estas se han fundido con el horno que se observa en la figura 9.



Figura 9. horno de arco eléctrico, modelo Edmund-Bühler MAM-1.

Estas aleaciones se han sometido a diferentes ensayos durante todo el proyecto para poder cumplir con el objetivo de este. Estos se irán comentando en los siguientes apartados.

3.2. FASE 2: CARACTERIZACIÓN MICROESTRUCTURAL DE LAS ALEACIONES

3.2.1. Preparación metalográfica

Lo primero que se realizará es embutir las muestras. Para ello se trabajará con el modelo LaboPress-3 de Struers. Al prepararlas para microscopía óptica y difracción se embutirán en resina transparente no conductora, mientras que las que sean destinadas para microscopía electrónica se embutirán en resina negra conductora. En este caso prepararemos 3 en resina transparente y 1 en resina negra para cada aleación obtenida por pulvimetalurgia convencional. En el caso de las muestras obtenidas por colada, realizaremos dos cortes en cada muestra y de esta manera se embutirá 1 trozo de cada aleación en resina blanca y los dos trozos restantes en resina negra.



Figura 10. Máquina para embutir modelo LaboPress-3 de Struers.

Cuando las muestras están embutidas se realiza el desbaste de éstas. Para ello se utiliza una lijadora del fabricante Struers modelo LaboPol-21. El procedimiento es el siguiente:

El desbaste se realiza con lijas de 3 granulometrías distintas; es decir, primero se lija la muestra con una lija de 200 y cuando se vea que la superficie tiene un pulido uniforme se cambia de lija a 500, cambiando también la orientación unos 90°. Se realiza el mismo paso posteriormente con una lija de 1000. Durante todo este procedimiento se utilizará agua como lubricante.



Figura 11. Lijadora del fabricante Struers modelo LaboPol-21.

Antes de comenzar con el pulido de las muestras se limpian con acetona y se secan con el secador. Esta preparación tiene dos etapas pues, primero se realiza un pulido de la muestra durante 6 minutos usando un paño MD-largo y suspensión de diamante de de $9\ \mu\text{m}$ con Diaduo-2 como lubricante, la velocidad de rotación del paño es de 150 rpm y la fuerza aplicada es de 15 N. Después, limpiamos las muestras con agua y jabón y se procede a la segunda etapa donde esta vez el pulido se realizará con un paño MD Chem y suspensión OP-S de $1\ \mu\text{m}$ con un 10% en volumen de H_2O_2 (agua oxigenada), la velocidad de rotación es 150 rpm y la fuerza ejercida es 20 N.



Figura 12. Máquina para pulir modelo LaboPol-5 del fabricante Struers.

Tras la segunda etapa se limpian las muestras con agua, jabón y finalmente con etanol y se secan con el aire del secador. De esta manera ya tendremos las probetas preparadas para el análisis de microscopía óptica y difracción de rayos X que se explicarán a continuación.

No obstante, las probetas que se vayan a someter al estudio microestructural mediante microscopía electrónica de barrido van a necesitar un segundo pulido más exhaustivo. Estas además se pondrán en la pulidora Vibromet del fabricante Buehler con suspensión OP-S de 1 μm durante 12 horas. Después, se limpian las muestras con agua y jabón y se sumergen en un baño de ultrasonidos ELMA. Las muestras se pondrán boca abajo en un vaso de vidrio con etanol durante 15 minutos.



Figura 13. Máquina para pulir modelo Vibromet del fabricante Buehler.

3.2.2. Análisis superficial mediante microscopía óptica (antes y después de liberación de iones).

Se realiza esta fase para analizar la porosidad que tienen las superficies de las aleaciones. Para ello se hace uso del microscopio óptico modelo Nikon Eclipse LV100DA y se sacan diferentes imágenes a diferentes aumentos para que la porosidad pueda ser analizada mejor. Se van a obtener imágenes de las 6 muestras.

Posteriormente también se analizarán con microscopio óptico las muestras que resulten del ensayo de liberación de iones con el fin de observar sus posibles modificaciones microestructurales.



Figura 14. Microscopio óptico empleado para el análisis de las muestras.

3.2.3. Estudio microestructural mediante microscopía electrónica de barrido.

En este estudio se utiliza el microscopio de barrido electrónico de barrido de emisión de campo de ZEISS, modelo AURIGA compact que se observa en la figura 15.



Figura 15. Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo modelo AURIGA de Zeiss.

El microscopio contiene tres detectores diferentes que permitirán sacar la información que interese al operador. Se distingue el detector de electrones secundario (SE) el cual va a permitir captar las imágenes con alta resolución. Por otro lado, está el detector de electrones dispersados (BS) con el que será posible conocer la distribución de los elementos en la superficie de la

muestra. Por último, el detector de energías dispersivas de rayos X (EDS) va a indicar el porcentaje de cada elemento que se encuentre en la superficie de la muestra mediante rayos X.

Además, se hace uso también de este mismo microscopio para realizar para el estudio de las orientaciones cristalina y los bordes de grano.

Como se observa en la figura 16, gracias al el detector de rayos EDS junto con imágenes que representan en tonos grises las fases existentes mediante el detector de electrones retrodispersados se puede obtener el análisis composicional. El estudio de las estructuras cristalinas se realiza a partir de las líneas de Kikuchi que se obtienen y que nos permiten indexar la difracción de los electrones en diferentes planos atómicos.

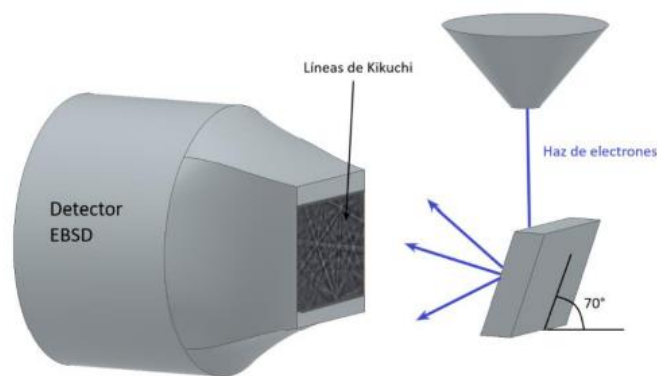


Figura 16. Representación del funcionamiento de la técnica EBSD.

3.2.4. Estudio de las fases mediante difracción de rayos X

Para analizar la estructura cristalina de las aleaciones estas se someten al ensayo de difracción de rayos X. Para poder comparar la aleación Ti-15Mo-5In obtenida por técnicas de pulvimetalurgia convencional y por colada se somete una muestra de cada una de ellas a este ensayo, lo mismo sucederá con la aleación Ti-35Nb-5In. Estas 4 muestras anteriormente habrán sufrido el proceso de mecanizado y preparación metalográfica que se explicarán en el siguiente apartado.

En esta técnica se utiliza un haz incidente de rayos x con una longitud de onda adecuada para el material con el que se va a trabajar. El mecanismo es el siguiente: esta onda incide sobre los planos cristalinos y cuando la onda que se refleja en el plano superior y la que se difracta en el plano inferior a la salida están en fase se produce un reforzamiento de las ondas difractadas que produce una señal de rayos x muy intensa. Esta señal es captada por un detector que se encuentra en el lado opuesto y es la que indica para que ángulo se produce la difracción.

El fenómeno de ondas en fase ocurre cuando se cumple la ley de Bragg. Esta ley sigue la siguiente ecuación que de la ley en la cual se basa el fenómeno de difracción de rayos X.

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin(\theta)$$

Siendo n un número entero, λ la longitud de onda de los rayos X, d la distancia entre los planos de la red cristalina y θ el ángulo que se forma entre los rayos incidentes y los planos de dispersión.



Figura 17. Difractómetro de Rayos X D2 Phaser de Bruker.

Para poder llevar el ensayo a cabo las muestras se introdujeron en el difractómetro que muestra la figura 17 y se establecieron en el software los parámetros adecuados con los que trabajar. Para obtener y procesar los datos se utilizará el software propio integrado en el difractómetro y el software MAUD (Material Analysis Using Diffraction) 2.94, respectivamente. Por último, para poder representar gráficamente los resultados se hará uso de Excel.

3.3. FASE 3: CARACTERIZACIÓN MECÁNICA DE LAS ALEACIONES

3.3.1. Obtención del módulo elástico

Para obtener el módulo elástico se utiliza el equipo de Sonelastic para muestras pequeñas. En este ensayo se someterán todas las probetas que se han obtenido de la sinterización.

Este equipo contiene:

- El percutor.
- El sensor acústico.
- Un ordenador donde se encuentra el Software específico.
- Y el soporte para las muestras.

El ensayo consiste en que primero, pones la muestra en el soporte, entonces le das un pequeño golpe a esta que va a ser recibido por el sensor acústico que se encuentra en el soporte ya que las muestras van a emitir la señal acústica que registra el sensor e interpretará posteriormente el Software.

Estos pequeños golpes se repiten en las 4 esquinas de las probetas por cada una de las caras de ellas. Con esto se conseguirá una gran cantidad de datos que permitirán la obtención de valores más exactos a la hora de realizar la media final.



Figura 18. Equipo Sonelastic para muestras pequeñas (Sonelastic, 2019).

En este ensayo se va a obtener el módulo elástico de manera no destructiva por lo que se podrán utilizar estas mismas muestras posteriormente para realizar otros ensayos.

3.3.2. Ensayo de flexión a 4 puntos

Las muestras que se emplean en el ensayo de flexión a 4 puntos provienen de la obtención de las aleaciones por pulvimetalurgia convencional. Estas tendrán una longitud de 28mm, un ancho de 11mm y su espesor es aproximadamente de 5mm. El objetivo de este ensayo es conocer las propiedades mecánicas de los materiales de Ti-15Mo-5In y Ti-35Nb-5In relacionadas con los esfuerzos y deformaciones que se producen en los puntos máximos de rotura. Por otro lado, este ensayo también dará como resultado el módulo elástico de estas en función de la separación entre los apoyos y el espesor de las probetas.

Para ello, se colocan de manera individual todas las muestras de las diferentes aleaciones, de manera que la probeta apoye sobre dos soportes (como se puede observar en la figura 19), y se le aplica una fuerza a flexión en dos puntos alejados de manera equitativa del centro de la muestra.



Figura 19. Soporte del ensayo de flexión a 4 puntos.

Se utiliza la máquina universal Shimadzu del modelo Autograph 100 kN que se observa en la figura 20. Esta va a dar información acerca la tensión y el desplazamiento siguiendo las ecuaciones mostradas respectivamente.



Figura 20. Máquina universal Shimadzu que se utiliza en ensayo de flexión a 4 puntos.

$$\sigma(\text{resistencia a máxima flex}) = \frac{0,75 \cdot \text{Fuerza aplicada} \cdot \text{Distancia entre los apoyos}}{\text{Ancho de la muestra} \cdot \text{Espesor de la muestra}^2}$$

$$\varepsilon(\text{def a máxima flex}) = \frac{4,76 \cdot \text{Desplazamiento de la muestra} \cdot \text{Espesor de la muestra}}{\text{Distancia entre los apoyos}^2}$$

Una vez obtenidos todos estos valores se puede calcular el valor de la tensión, de la deformación y el módulo elástico:

$$\text{Tensión } (\sigma) = E \cdot \varepsilon$$

$$\text{Deformación } (\varepsilon) = \frac{\sigma}{E}$$

$$\text{Módulo elástico a flexión } (E) = \frac{\sigma}{\varepsilon}$$

Cuando las muestras están colocadas en el soporte se prepara el equipo poniendo a punto el utillaje que se requiere. Lo primero que hay que hacer es calibrar la máquina referenciando la posición de la muestra y estableciendo la fuerza en 0. Una vez esto está preparado comenzará el ensayo y el desplazamiento se registrará cada 0.1 s mediante un extensómetro óptico.

Por último, antes de pulsar el botón “Start” se introducen las medidas de las probetas en el software Trapezium X. Con este se obtendrán las curvas tensión-deformación, los datos de la tensión máxima y la tensión de rotura obtenidos en el estudio.

El resultado de las aleaciones será las probetas rotas partidas por la mitad que posteriormente, se usarán para realizar otro tipo de ensayos.

3.3.3. Ensayo de dureza

Se realiza el ensayo de dureza para determinar la resistencia que tiene el material al ser penetrado por otro material. En este caso, se trabaja con 2 muestras rotas obtenidas en el ensayo de flexión y otras 2 obtenidas por colada (una de cada una de las aleaciones). Además, antes de aplicarle la penetración a las muestras se devastarán de manera sencilla.

El ensayo se realiza con el durómetro universal HD9-45 de Centaur. El equipo está formado por una punta HR15T que ejercerá una fuerza sobre la muestra de 147N. Esta fuerza se aplicará durante 10 segundos hasta que se estabiliza la lectura.

Los datos obtenidos de la dureza se han de pasar a HV (Vickers), para poder así comparar ambas aleaciones.



Figura 21. Durómetro universal HD9-45 de Centaur.

3.3.4. Ensayo de microdureza

Para este ensayo se necesitará que las muestras estén previamente pulidas. En este caso serán seleccionadas 3 muestras rotas obtenidas en el ensayo de flexión de la aleación Ti-15Mo-5In y otras 3 de Ti-35Nb-5In, además, se realizará también este ensayo sobre las 2 muestras obtenidas por colada. Las probetas se colocarán en la máquina de ensayos de microdureza y sobre una de sus caras se realizarán 5 pinchazos cambiando el área de uno a otro unos 0.4mm, primero en dirección vertical y luego horizontal reiteradamente.

El elemento penetrador es de diamante y tiene la base cuadrada, cuyas caras laterales forman un ángulo de 136°. Cuando penetre dejará una impresión cuadrada sobre el material de la superficie de la probeta.

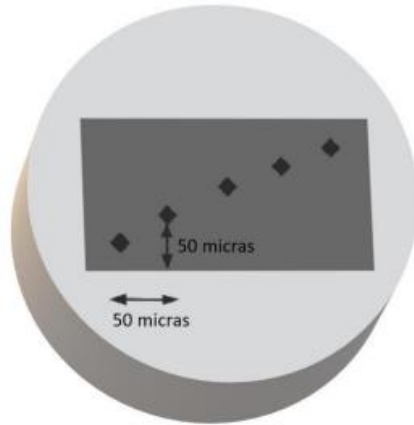


Figura 22. Esquema de la ubicación de las muescas realizadas durante el ensayo.

La carga aplicada utilizada en el ensayo es de 1.961 N (0.2 HV) durante 10 segundos.

Una vez se ha realizado el ensayo se miden las diagonales de la impresión que el diamante ha dejado sobre la probeta mencionada anteriormente y se calcula la medida promedio de las 5 obtenidas.

El ensayo de microdureza se realiza con la máquina Shimadzu que se encuentra en el laboratorio y se trabaja con el Software Easytest.

3.4. FASE 4: CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LAS ALEACIONES

3.4.1. Estudio de la liberación de iones

Para estudiar la cantidad de iones metálicos que liberan las aleaciones en condiciones similares a la cavidad bucal se realiza este estudio. Con esto ofrece una idea de la totalidad de residuos dañinos que va a expulsar el implante durante su funcionamiento y cuánto van a ser afectados los tejidos cercanos.

Es necesario este estudio ya que se corresponde con la primera parte del estudio de citotoxicidad que se realizará posteriormente. Para ello, se preparan 3 muestras de cada aleación de manera metalográfica. En este caso las 6 muestras se embutirán en resina transparente no conductora.

Una vez están preparadas las muestras, se sellan los bordes con esmalte para evitar que la saliva penetre y así poder estudiar con exactitud que solo la superficie deseada va a ser la que libere iones. En este caso, el promedio de las superficies que están expuestas al ensayo es de 1.12cm^2 .

Entonces, se preparan 6 recipientes de plástico con 50 mL de saliva artificial para cada uno de ellos. La saliva artificial con la que se va a trabajar va a ser Ringer-Hartmann modificada. Una vez está todo preparado, se sumergen las muestras boca arriba y para conseguir que las condiciones del ensayo sean semejantes a las de un implante bucal se meten los recipientes cerrados en la estufa Selecta durante 839.38 h a 37°C .

Además, el pH de la saliva artificial Ringer-Hartmann modificado fue de 6.53, siendo un pH ácido (menor que 7) lo cual favoreció también la liberación de iones.

A continuación, se muestra en la tabla 4 la composición de la saliva artificial utilizada en el ensayo:

Tabla 4. Composición de la solución Ringer-Hartmann modificada a emplear como electrolito.

Solución Ringer-Hartmann modificada			
Compuesto	mMoles/L	Mw (g/mol)	C (g/L)
NaCl	102.0	58.5	5.97
KCl	5.0	74.6	0.37
CaCl₂	2.0	111.1	0.22
C₃H₅O₃xNa	29.0	112.1	3.25

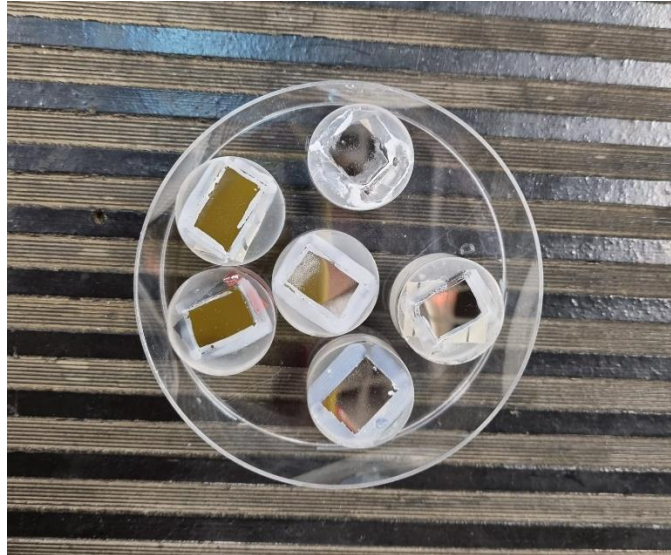


Figura 23. Muestras resultantes de la liberación de iones.

Una vez se ha cumplido con el tiempo del ensayo, se sacan las aleaciones de la saliva artificial. Las muestras son esterilizadas con una solución de acetona y etanol y secadas con un secador para analizar su microestructura y la disolución se analizará mediante la técnica ICP-OES (Plasma de acoplamiento inductivo y espectroscopía de emisión óptica) la cual analiza los iones que se han liberado en este ensayo.

3.4.2. Estudio de la resistencia a la corrosión

Por último, Se realiza el estudio de corrosión para poder analizar cómo se comportan las aleaciones Ti-15Mo-5In y Ti-35Nb-5In en un ambiente corrosivo. Para ello se han escogido de cada aleación 3 muestras obtenidas en el ensayo de flexión a 4 puntos y 2 de las muestras obtenidas por colada. Estas han sido sometidas a una preparación metalográfica hasta conseguir el pulido espejo y una vez preparadas, se van a desembutir en una prensa manual con una sierra para poder llevar a cabo el ensayo.

El ensayo de corrosión tiene el siguiente montaje:

- El potencióstato PGSTAT204 del fabricante Metrohm AUTOLAB.
- Un electrodo de referencia de Ag/AgCl del fabricante Metrohm AUTOLAB.
- Un contraelectrodo de platino (Pt) del fabricante Radiometer Analytical.
- Un electrodo de trabajo donde se coloca la muestra.
- Un electrolito con el que se va a trabajar que son 50 mL de saliva artificial Solución Ringer-Hartmann modificada, comentada su composición anteriormente.

En el ensayo el electrolito se encuentra en contacto con todos electrodos durante las 2 horas que dura aproximadamente y se mantiene a una temperatura de 37°C constante. Para dar ese calor se utilizará una lámpara halógena y un termopar para poder ir controlando la temperatura.



Figura 24. Montaje experimental del ensayo a corrosión.

Una vez está el montaje finalizado se realizarán tres ensayos:

- Potencial a circuito abierto (OCP): Registra el potencial de la muestra (E_{OCP}) respecto al del electrodo de referencia cuando no está circulando ninguna corriente externa.
- Espectroscopía de impedancias electroquímicas (EIS): Se aplica una señal de corriente alterna sobre la muestra y se mide la respuesta que esta da (en intensidad) a diferentes frecuencias. Con esto permite evaluar la respuesta electroquímica que tiene la superficie del material en un rango de frecuencias desde 100 kHz a 5 kHz.

Para poder analizar de manera correcta cómo varía la impedancia con respecto a las frecuencias se tiene que modelar el montaje con un circuito equivalente. En el caso del titanio, las aleaciones van a crear una capa superficial de óxido (TiO_2). Este hecho puede corresponderse con dos circuitos eléctricos equivalentes:

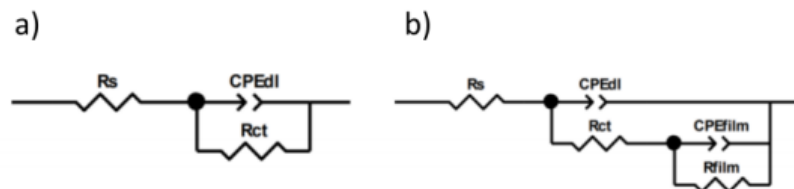


Figura 25. Circuitos eléctricos equivalentes al comportamiento de las aleaciones de titanio.

Donde a) corresponde a un modelo de capa simple de óxido generada sobre la superficie del metal y b) un modelo de doble capa porosa de óxido generada sobre la superficie del metal. Siendo: R_s la resistencia a la solución salina que va a ser la saliva artificial Ringer-Hartmann modificada) [$\Omega \cdot cm^2$], CPE_{dl} (Constant Phase Element of Discontinuous layer) la capacidad de la capa que

permite o dificulta la difusión de iones y cationes en función de su porosidad, R_{ct} (Charge Transference) es la resistencia a la transferencia de carga entre el metal y la saliva artificial a través de la capa aislante de óxido [$\Omega \cdot \text{cm}^2$], C_{dl} la capacitancia de la capa [F/cm^2], R_{film} la resistencia de la capa interna adherida a la superficie de la aleación [$\Omega \cdot \text{cm}^2$], R_p la resistencia conjunta de ambas capas [$\Omega \cdot \text{cm}^2$], CPE_{film} la capacidad del elemento que actúa como elemento dieléctrico [F/cm^2] y por último, C_{film} la capacitancia de la capa interior [F/cm^2].

- Voltametría de barrido lineal (LSV): este ensayo permite saber la velocidad de corrosión de la aleación (V_{cor}) a partir de los parámetros que se obtienen en él.

$$V_{COR} = \frac{k \cdot \text{masa atómica total de la aleación} \cdot \text{área expuesta} \cdot i_{cor}}{\text{valencia de la aleación} \cdot \text{constante de Faraday} \cdot \text{densidad del material}}$$

Donde k es una constante e i_{cor} es la intensidad de corriente.

3.5. FASE 5: ANÁLISIS BIOLÓGICO

3.5.1. Líneas celulares

Las líneas celulares que se van a utilizar en ambos ensayos biológicos van a ser las células madre de pulpa dental humana (hDPSC) obtenidas de pacientes donantes y por otra parte, las células humanas procedentes de osteosarcoma (MG-63) obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC CRL-1427, Barcelona, España). Las células hDPSC representan el comportamiento que tienen las células de la pulpa y las MG-63 van a ser utilizadas como células control en los ensayos.

Las células madre de pulpa dental humana (hDPSC) se cultivan en su medio α -MEM (Thermo Fisher Scientific, Paisley, Reino Unido), junto con:

- 10% de suero fetal bovino (FBS) no inactivado (Thermo Fisher Scientific, Paisley, Reino Unido).
- 1% de antibióticos Penicilina/Estreptomicina (P/S) (Thermo Fisher Scientific, Grand Island, EEUU).
- 1% de L-Glutamina (EuroClone, Pero, Italia).
- 1% de fungizona (Thermo Fisher Scientific, Paisley, Reino Unido)

Por otro lado, las células MG-63 se cultivan en MEM (Thermo Fisher Scientific, Paisley, Reino Unido) junto con:

- 10% de suero fetal bovino (FBS) no inactivado.
- 1% de antibióticos Penicilina/Estreptomicina (P/S).32
- 1% de L-Glutamina.
- 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA) (Thermo Fisher Scientific, Paisley, Reino Unido).
- 1% de piruvato (Thermo Fisher Scientific, Paisley, Reino Unido).

En el ensayo de inmunofluorescencia también se ha utilizado el medio de diferenciación cuya composición es la siguiente:

- Medio de proliferación de hDPSC.
- 10% de glicerol-2-fosfato (Merck KGaA, Buchs, Suiza).
- 4% de ácido ascórbico (Merck KGaA, Buchs, Suiza).
- 2.5% de proteína morfogénica ósea 2 (BMP2) (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá).
- 1% de dexametasona (Merck KGaA, Buchs, Suiza)

Para poder llevar a cabo los ensayos con células se ha trabajado con la campana de flujo laminar Mars Safety Class 2 de Scanaf, la cual mantiene el área de trabajo estéril en todo momento.

Para preparar ambos ensayos y tener las células con las que se va a trabajar disponibles, estas se siembran y crecen en frascos de cultivo o T75 (75 cm²) o T25 (25 cm²) y se incuban en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5% a 37°C. Se utiliza el microscopio óptico de contraste de fases de Lumin para poder analizar el desarrollo de las células conforme pasan los días. Además, es necesario cambiar el medio celular de cada tipo de células cada dos o tres días para que estas se sigan alimentando y evitar la muerte celular. Una vez se intuye con las imágenes que se ha

conseguido una confluencia de las células de al menos el 90%, se procede al recuento celular. Para ello es necesario levantar las células, en primer lugar se retira el medio celular del frasco y se utiliza PBS para limpiar, este se retira y entonces se pone tripsina durante 3 minutos para que haga la función de despegar las células de la superficie del frasco y cuando se observe con el microscopio óptico que las células tienen la forma esférica (es lo que ocurre cuando se despegan) se introduce el medio de la línea celular correspondiente. Una vez preparada la disolución se ponen 10 μ L junto con 10 μ L del colorante Trypan blue y se introduce en el contador de células (Automatic Cell Counter de EVE) (Se utiliza este colorante ya que solo es capaz de introducirse en el citoplasma de células muertas).

Antes de cada ensayo se realizarán los cálculos necesarios para saber la cantidad de células que se ha de sembrar en cada uno de ellos.

3.5.2. Ensayo de citotoxicidad

Para realizar el ensayo de citotoxicidad se va a seguir el protocolo MTS por su facilidad de uso y precisión. Este análisis se va a realizar por triplicado para obtener un valor medio de los resultados adecuado.

En primer lugar, se diseñó la placa de la prueba. Tal y como muestra la figura 26 esta fue una placa de cultivo de 96 pocillos en la que en los pocillos naranjas fueron sembradas hDPS y en los azules células MG63. Por otra parte, la composición que sigue cada triplicado es la siguiente:

- C- (control negativo): células hDPSC o MG-63 con su medio correspondiente, α -MEM o MEM sin rojo fenol, respectivamente.
- C+ (control positivo): células hDPSC o MG-63 con látex.
- B_C- (blanco del control negativo): medio celular correspondiente sin rojo fenol y sin células.
- Sp_{25%} (saliva pura al 25%): células hDPSC o MG-63 con solución Ringer-Hartmann modificada al 25%.
- B_{Sp25%} (blanco de la saliva pura al 25%): solución Ringer-Hartmann modificada al 25% sin células.
- M_{x%} (muestra al x%): células hDPSC o MG-63 con solución Ringer-Hartmann modificada con iones liberados de la aleación en cuestión al x% (1,10 ó 25).
- B_{M25%} (blanco de la muestra al 25%): solución Ringer-Hartmann modificada con iones liberados de la aleación en cuestión al 25% sin células

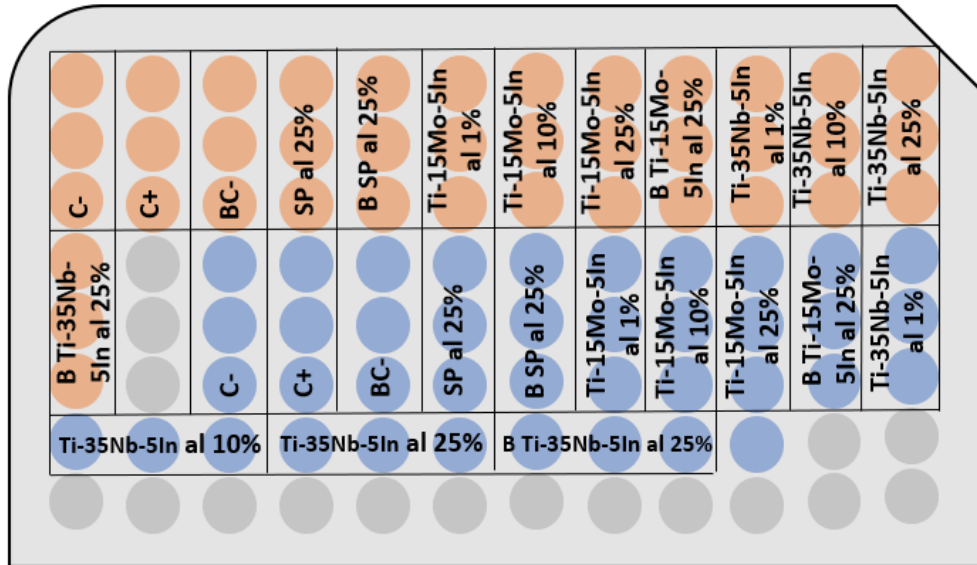


Figura 26. Diseño de la placa utilizada durante el ensayo de citotoxicidad.

El ensayo tuvo una duración de 4 días (96 horas) y los pasos que se siguieron fueron los siguientes: El primer día se sembraron ambas líneas celulares en la placa (10.000 células/pocillo y volumen de 100 μ l/pocillo) junto con sus respectivos medios. Los pocillos que se corresponden con un blanco no se trataron hasta el día siguiente. Una vez sembradas las células se incubó la placa a 37°C y 5% de CO₂.

Al finalizar las 24 horas se retiraron todos los medios de cultivo y se añadieron los compuestos (100 μ l/pocillo) nombrados en la figura anterior realizando las diluciones correspondientes de la saliva pura (Ringer-Hartmann modificada) y de las salivas obtenidas en el ensayo de liberación de iones de ambas muestras. Cuando se ha finalizado este paso la placa se vuelve a incubar a 37°C y 5% de CO₂ durante 48 horas.

El cuarto día fue cuando se inició el protocolo MTS. Este paso es el que permite medir la citotoxicidad de las muestras. Para ello se añadió 20 μ l de MTS a cada pocillo en la campana laminar de flujo y con la luz apagada, ya que MTS es un reactivo fotosensible y puede perder su potencia con la luz del exterior. Entonces se incubó la placa durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo, se hizo la primera lectura de la placa en el espectrofotómetro máquina SpectraMax Plus. Si los niveles del control negativo están en torno a 1-1.2 se da por finalizado el ensayo, si no, será necesaria una segunda lectura. Los resultados obtenidos de absorbancia fueron tratados y normalizados respecto al control negativo.

3.5.3. Ensayo de inmunofluorescencia

Para poder realizar este ensayo se necesitan discos de 5x5x1,5mm de ambas aleaciones con las que se está trabajando. Para poder conseguir este tamaño de las probetas se utilizó la cortadora metalográfica de precisión Accutom 10 de Struers que trabaja con un disco de diamante 357CA.

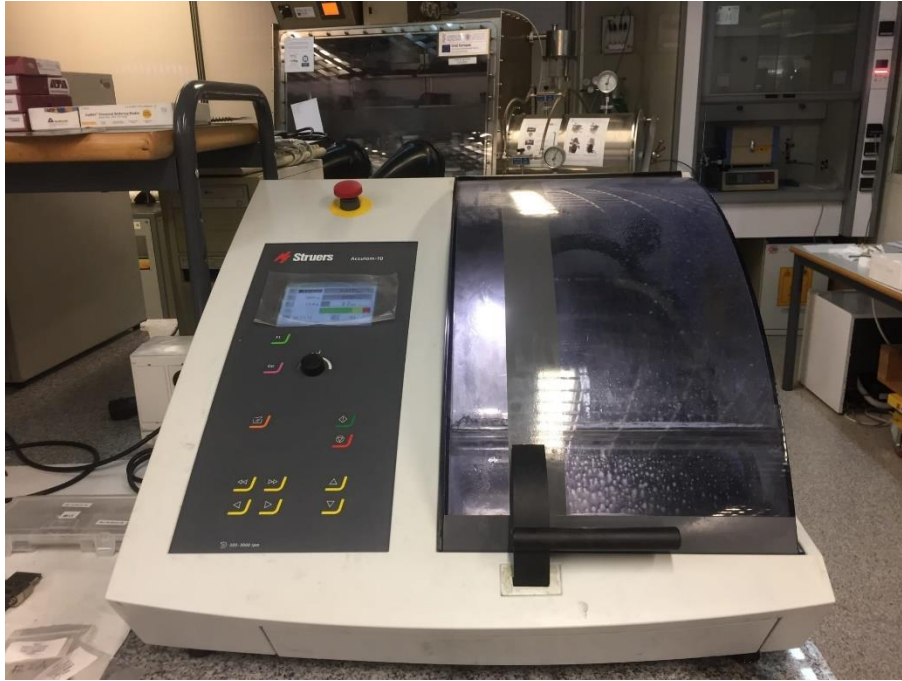


Figura 27. Cortadora metalográfica de precisión Accutom 10 de Struers.

Puesto que estos discos van a estar en contacto directo con las células durante todo el ensayo de inmunofluorescencia, es necesario que la esterilización de estos se haga de manera exhaustiva. Por ello, en primer lugar, se introdujeron en un baño de ultrasonidos con etanol durante 10 minutos para eliminar las posibles partículas externas. En segundo lugar, se utilizó el sistema autoclave de icanCLAVE con el que se consigue eliminar de manera eficiente las posibles bacterias que hallan. Y por último, al llegar a la Facultad de Medicina donde se realizó este ensayo, estos discos fueron esterilizados otra vez. Para ello se pusieron los discos de cada aleación en una placa Petri y se colocaron estas durante 1 hora por cada una de sus caras bajo la luz de ultravioleta de la campana.

Este ensayo fue realizado durante tres semanas, tiempo necesario para poder asegurar que los resultados obtenidos son fiables y efectivamente, la diferenciación esperada de células a osteoblastos se ha realizado completamente. En este tiempo los frascos y las placas de cultivo con las que se trabaja van a estar incubados en una atmósfera humidificada constantemente con 5% de CO₂ a 37°C y en la campana de flujo laminar se realizarán los cambios de medio.

Una vez los discos se esterilizaron por completo se colocaron en placas de cultivo de la siguiente manera:

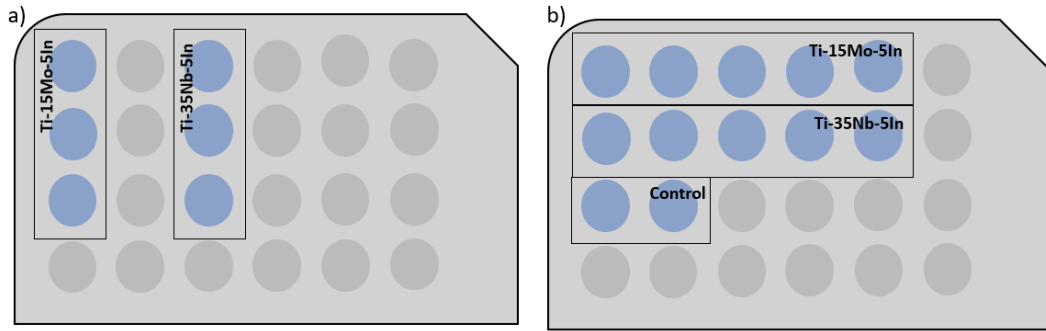


Figura 28. a) Placa de 24 pocillos, cultivo de células MG-63 fase 11 sobre discos, 1000 células/pocillo, medio Proli; b) Placa de 24 pocillos, cultivo de células MG-63 fase 13 sobre discos, 500 células/pocillo, medio Difer.

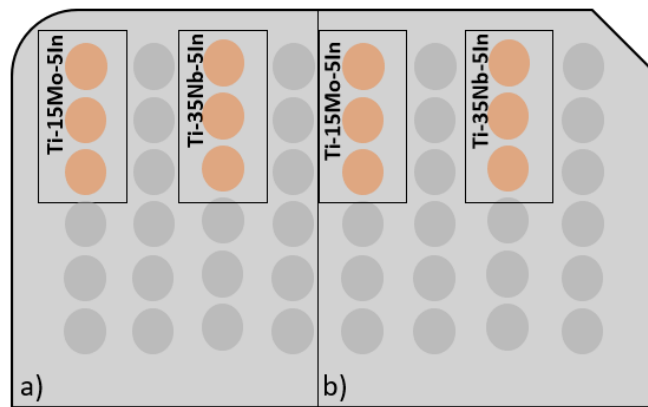


Figura 29. a) Placa de 48 pocillos, cultivo de células hDPSC fase 7 sobre discos, 1000 células/pocillo, medio Proli; b) Placa de 48 pocillos, cultivo de células hDPSC fase 7 sobre discos, 1000 células/pocillo, medio Difer.

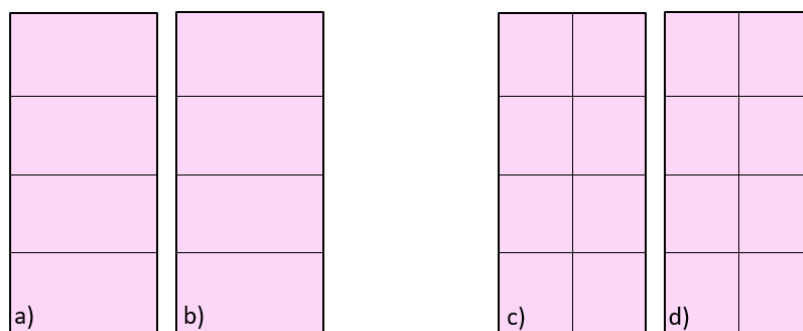


Figura 30. a) Millisell, cultivo de células MG-63 fase 11 como control, 300 células/pocillo, medio Proli; b) Millisell, cultivo de células MG-63 fase 11 como control, 300 células/pocillo, medio Difer; c) Millisell, cultivo de células hDPSC fase 7 como control, 750

En este ensayo se pueden diferenciar dos tipos de placas, por un lado, en las placas de proliferación el mantenimiento celular en los pocillos se llevó a cabo cambiando el medio específico de cada línea celular cada dos o tres días. Por otro lado, en las placas de diferenciación los pocillos se trataron con el medio celular correspondiente hasta que en microscopio óptico se observó que las células tenían una confluencia del 30% aproximadamente, es entonces cuando se substituyó cada medio específico por el medio de diferenciación explicado en el apartado anterior de líneas celulares.

Al cabo de dos semanas los pocillos celulares de proliferación fueron parados, ya que las células presentaban máximo crecimiento en ellos. En cuanto a los pocillos de diferenciación, estos fueron parados una vez transcurrieron tres semanas con el respectivo medio. Es entonces cuando se procede a preparar todos los pocillos para su análisis de inmunofluorescencia. Para ello se sigue el siguiente protocolo: En primer lugar, se retiró el medio de cultivo de cada pocillo y se realizaron 2 lavados con PBS con un pH de 7,4. A continuación, se fijaron las células con formaldehído al 3,7% en PBS, manteniéndolas a 4°C durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo se volvieron a realizar 2 lavados más con PBS y se permeabilizaron las células con el detergente TBS-T al 1x, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras ello, las células se incubaron con el anticuerpo primario anti-OC (osteocalcina) y con el anticuerpo anti-ALP (fosfatasa alcalina) diluidos cada uno de ellos al 1:200 con el disolvente EnVision™ FLEX, durante 3 horas a temperatura ambiente. Se empleó 1 pocillo por cámara como control del anticuerpo secundario, los cuales solo contenían el disolvente. Concluidas las 3 horas, se realizaron 3 lavados con PBS para retirar los anticuerpos no unidos de manera específica. Entonces se incubaron todos los pocillos con el anticuerpo secundario anti-ratón diluido al 1:200 en PBS y con el DAPI diluido al 1:500 en esta solución, durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrida la hora, se realizaron 3 lavados sucesivos de PBS y se procedió al montaje empleando un medio con DAPI. Los discos fueron extraídos de las cámaras de cultivo y la placa y colocados en un portamuestras. Finalmente, las muestras fueron analizadas y fotografiadas usando el microscopio de fluorescencia Leica DM4000B junto con la cámara DFC 340 FX y el programa de imagen Leica Application Suite Advance Fluorescence (Leica).

La disposición de los marcadores en el ensayo de diferenciación y proliferación de células hDPSC y MG-63 con discos de Ti-15Mo-5In, Ti-35Nb-5In y pocillos control fueron los siguientes:

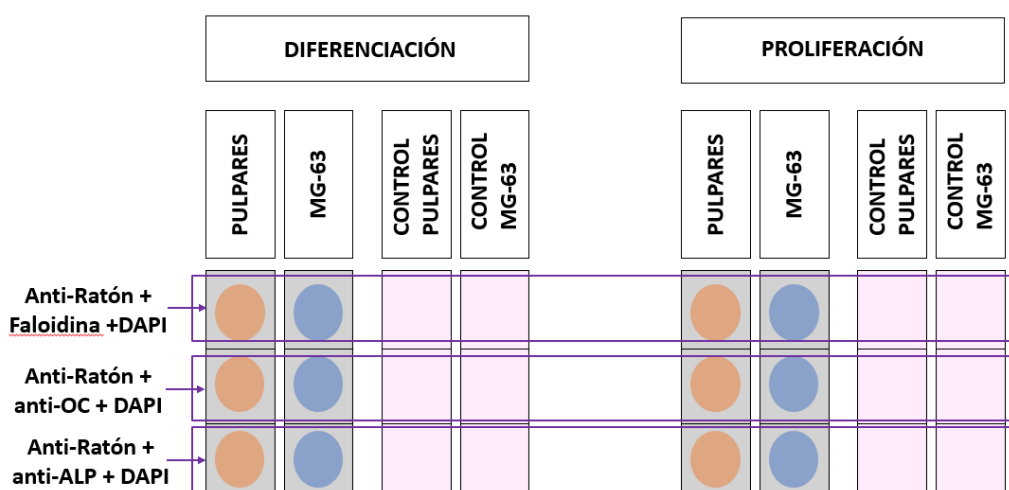


Figura 31. Disposición de los marcadores en el ensayo de diferenciación y proliferación de células hDPSC y MG-63 con discos de Ti-15Mo-5In, Ti-35Nb-5In y pocillos control.

Llegados a este punto se podrá concluir si las células hDPSC se diferencian a osteoblastos ya que se trabaja con el anticuerpo osteocalcina y fosfatasa alcalina, proteínas presentes en éstos. Y, por otra parte, se podrá concluir si las aleaciones ayudan o no a la proliferación de las células en función del número de células o no que se muestren.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. OBTENCIÓN DE LAS ALEACIONES MEDIANTE TÉCNICAS DE PULVIMETALÚRGIA CONVENCIONAL

Para poder obtener las probetas de cada aleación se realiza el cálculo necesario que indique la cantidad de polvo que le pertenece a cada una de ellas como se observa en las Tablas 5 y 6.

Tabla 5. Dimensiones y masas de las muestras de la aleación Ti-15Mo-5In en verde obtenidas por compactación.

	Ident. Muestra	Masa después compactación (g)	Dimensiones después compactación		
			Largo (mm)	Ancho (mm)	Espesor (mm)
Ti-15Mo-5In	1515	8.82	30.04	11.90	6.66
	1516	8.89	29.94	11.90	6.68
	1617	8.98	29.95	11.92	6.52
	1518	8.97	30.18	12.95	6.59
	1519	8.66	29.94	11.92	6.67
	1520	8.99	30.21	11.92	6.63
	1521	8.88	29.95	11.91	6.64
	1522	8.97	29.95	11.90	6.63
	1523	8.90	29.96	11.91	6.61
	1524	8.61	29.96	11.91	6.40

Tabla 6. Dimensiones y masas de las muestras de la aleación Ti-35Nb-5In en verde obtenidas por compactación.

	Ident. Muestra	Masa después compactación (g)	Dimensiones después compactación		
			Largo (mm)	Ancho (mm)	Espesor (mm)
Ti-35Nb-5In	1525	9.96	29.92	11.90	6.52
	1526	9.99	29.95	11.91	6.56
	1527	9.91	29.96	11.92	6.43
	1528	9.95	29.95	11.91	6.80
	1529	10.44	29.93	11.91	6.96
	1530	9.85	29.95	11.91	6.57
	1531	9.94	29.94	11.90	6.54
	1532	9.92	29.93	11.92	6.48
	1533	9.61	29.30	11.92	6.32
	1534	9.42	29.30	11.91	6.14

Con los valores de la Tabla 5 y Tabla 6 respectivamente, se han obtenido los valores de la porosidad en verde promedio y la densidad en verde relativa. Se puede observar en la tabla 7 que

el elemento Molibdeno con respecto al Niobio presenta una menor densidad, y con ello, mayor porosidad que el niobio.

Tabla 7. Valores de porosidad y densidad de las probetas en verde.

Aleación	Porosidad en verde promedio (%)	Densidad en verde promedio (g/cm ³)
Ti-15Mo-5In	24.74 ± 2.05	3.78 ± 0.10
Ti-35Nb-5In	22.88 ± 2.21	4.26 ± 0.12

En el proceso de sinterización se produce la contracción de estas, lo cual cambia su dimensionalidad. Estos cambios se observan en la siguiente tabla:

Tabla 8. Contracción de las probetas.

Aleación	Δlargo (%)	Δancho (%)	Δespesor (%)	Δvolumen (%)
Ti-15Mo-5In	6.98 ± 0.53	8.18 ± 2.36	20.16 ± 4.47	31.82 ± 4.08
Ti-35Nb-5In	6.58 ± 0.29	6.76 ± 0.35	15.63 ± 4.43	26.49 ± 4.18

Por otro lado, para poder conocer la porosidad de las probetas se ha realizado un ensayo que sigue el Principio de Arquímedes y estos han sido los resultados:

Tabla 9. Datos obtenidos tras el ensayo de Arquímedes.

Aleación	Ident. Muestra	Densidad mezcla (g/cm ³)	M _{se} (g)	M _{as} (g)	M _{aa} (g)	V teórico (cm ³)	V Exterior (cm ³)	V _{OP} Poro abierto (cm ³)	V _{cl} Poro cerrado (cm ³)
Ti-15Mo-5In	1515	5.027	7.62	6.11	7.63	1.51	1.51	0.004	0.002
	1516		8.46	6.78	8.47	1.68	1.68	0.005	0.004
	1517		8.31	6.66	8.31	1.65	1.65	0.005	0.008
	1518		8.13	6.52	8.14	1.61	1.61	0.006	0.006
	1519		7.13	5.71	7.13	1.41	1.41	0.003	0.005
	1520		7.65	6.13	7.65	1.52	1.52	0.002	0.001
	1521		7.82	6.27	7.83	1.55	1.55	0.003	0.004
	1522		8.37	6.71	8.37	1.66	1.66	0.003	0.003
	1523		7.87	6.31	7.87	1.56	1.56	0.003	0.004
Ti-35Nb-5In	1525	5.531	8.47	6.88	8.47	1.51	1.59	0.006	0.074
	1526		9.15	7.43	9.15	1.68	1.72	0.008	0.035
	1527		9.19	7.46	9.20	1.65	1.73	0.007	0.075
	1528		8.96	7.27	8.96	1.61	1.69	0.005	0.070
	1529		9.67	7.85	9.68	1.41	1.83	0.009	0.405
	1530		8.99	7.30	9.01	1.52	1.70	0.008	0.171
	1531		9.12	7.40	9.13	1.55	1.72	0.007	0.161
	1532		8.87	7.20	8.88	1.66	1.68	0.008	0.005
	1533		8.32	6.75	8.33	1.56	1.58	0.010	0.004
	1534		8.34	6.7	8.35	1.41	1.58	0.010	0.156

En la tabla 10 se obtienen los porcentajes de la porosidad de poros abiertos y cerrados que hay y la densidad relativa de cada uno de ellos. El porcentaje de poro abierto es semejante en ambos casos, mientras que el de poro cerrado es bastante mayor en el niobio que el molibdeno.

Tabla 10. Valores de poro abierto, poro cerrado y densidad relativa

Aleación	Poro abierto (%)	Poro cerrado (%)	Densidad relativa (%)
Ti-15Mo-5In	0.23 ± 0.07	0.22 ± 0.15	99.55 ± 0.11
Ti-35Nb-5In	0.46 ± 0.09	6.70 ± 6.54	92.83 ± 0.19

4.2. CARACTERIZACIÓN MICROESTRUCTURAL DE LAS ALEACIONES

4.2.1. Análisis mediante microscopía óptica

Mediante microscopía óptica se obtienen imágenes que pertenecen a un corte transversal para ambas aleaciones.

La figura 32 hace referencia a la aleación Ti-15Mo-5In. En ella se observa que aparece una ligera porosidad, además, en otra de las zonas mostrada por la imagen b) se detectan dos partículas de molibdeno que indican esa falta de homogeneidad química. Al realizar un acercamiento mayor a esas partículas (imagen c)), se puede observar que estas quedan completamente porosas. Esto puede venir por la diferente difusión que tienen el titanio y el molibdeno. Los poros son por el comportamiento del molibdeno ya que el molibdeno va hacia el titanio, pero el titanio no va tanto hacia el molibdeno, y, además, los radios atómicos son ligeramente distintos por lo cual se generan unos vacíos en la parte del molibdeno durante la difusión.

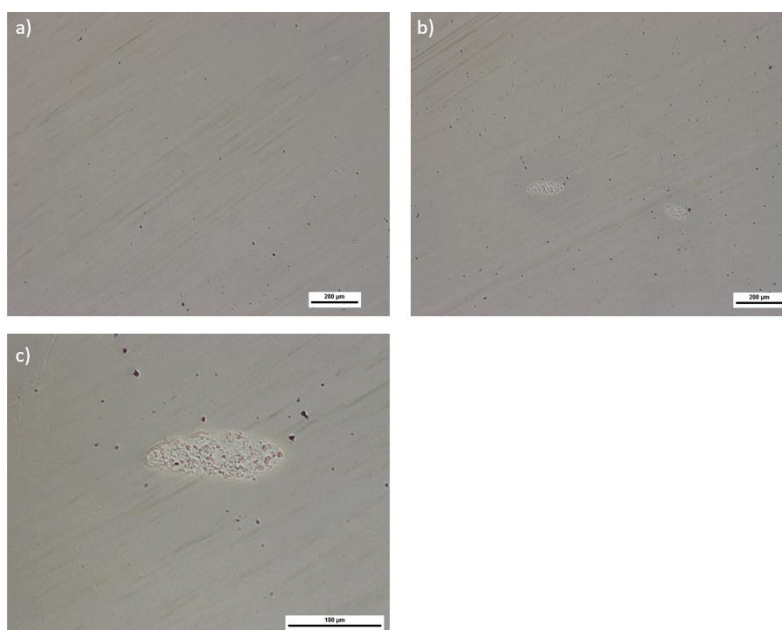


Figura 32. Imágenes obtenidas en diferentes zonas por microscopía óptica de la superficie de la aleación Ti-15Mo-5In PM.

Por otro lado, la figura 33 se trata de la aleación Ti-35Nb-5In. Las imágenes a y b representan diferentes zonas de la probeta a diferentes aumentos. Por un lado, en la imagen a se estaría hablando de una porosidad macro mientras que en la b se aprecian más poros, esto es porque se están observando poros de menor tamaño en la segunda de ellas.

Comparando la figura 33 con la anterior, se puede decir que en esta se aprecia un número mayor de poros respecto a la aleación de molibdeno.

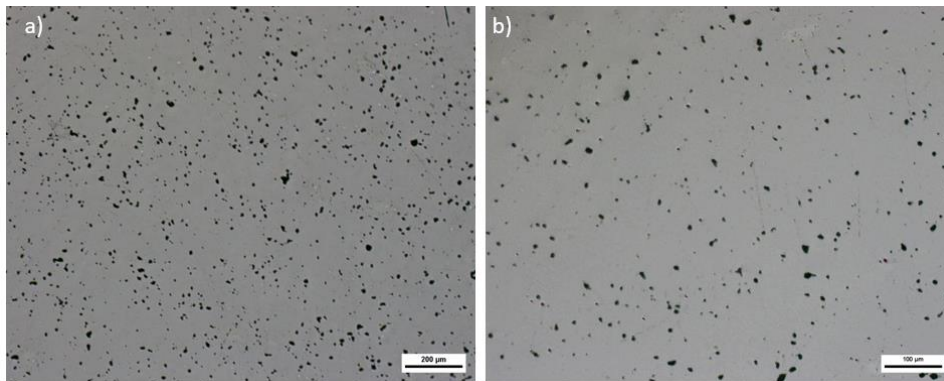


Figura 33. Imágenes obtenidas por microscopía óptica de la aleación Ti-35Nb-5In PM.

4.2.2. Estudio microestructural mediante microscopía electrónica de barrido

En este apartado se muestran las imágenes tomadas con microscopía electrónica de barrido. Esta técnica nos permite conocer la composición que forma cada una de las aleaciones, así como la distribución de cada uno de los elementos que la componen. Se someterán a este estudio las probetas que corresponden con Ti-15Mo-5In PM y Ti-35Nb-5In PM. Además, también se realizará este estudio a una de las muestras Ti-35Nb-5In obtenidas por colada para poder comparar los porcentajes en peso del titanio e indio que se obtienen según se ha utilizado la técnica de pulvimetalurgia convencional o la colada, y, además, poder ver como se distribuyen las fases en estas muestras obtenidas por colada.

Además, el conocimiento de estos datos tiene gran importancia ya que esto permitirá compararlos con los porcentajes en peso teóricos de cada aleación y saber si el proceso de sinterizado seguido ha sido correcto o no.

Con los datos obtenidos en la tabla 11 se concluye que con el ciclo térmico utilizado se está consiguiendo mantener ese 5% de indio en ambas aleaciones, sin embargo, cuando se utiliza la técnica de colada, el porcentaje de este disminuye ligeramente. Esto es debido a que el indio, comparado con otros, no se trata de un elemento muy aleante con el titanio entonces produce su propia volatilización (Romero-Resendiz et al., 2021).

Tabla 11. Porcentajes en peso reales obtenidos mediante análisis EBSD para cada aleación.

Aleación	Elemento	% peso normalizado
Ti15Mo5In	Ti	80.30
	Mo	14.20
	In	5.50
Ti35Nb5In	Ti	62.03
	Nb	32.97
	In	5.00
Ti35Nb5In colada	Ti	61.61
	Nb	35.05
	In	3.34

Las figuras 34, 36, 38 y 40 representan las imágenes FSD de las aleaciones Ti-15Mo-5In PM, Ti-35Nb-5In PM y Ti-35Nb-5In colada, respectivamente. Estas muestran cuál es la superficie de cada una de ellas y se ampliará la información con las imágenes del mapa de distribución de la aleación en cuestión para poder conocer de qué manera está distribuido cada elemento en la superficie de la probeta.

En la figura 35 se puede observar el mapa de distribución de la aleación Ti-15Mo-5In PM. En ella se puede ver que los elementos están distribuidos de manera homogénea ya que en cada imagen predomina un color de manera individual.

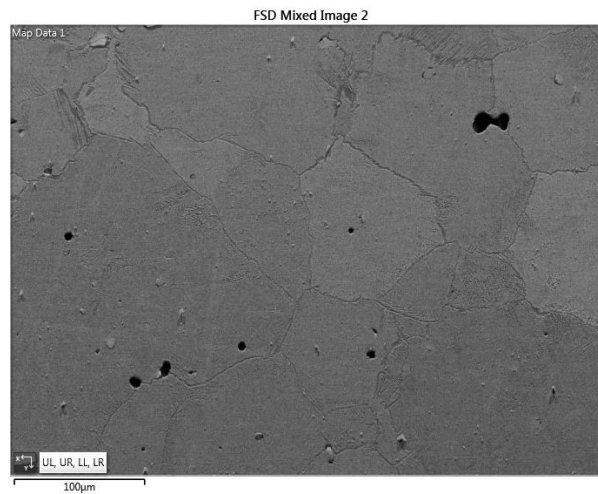


Figura 34. Imagen FSD de la aleación Ti-15Mo-5In PM a 250X.

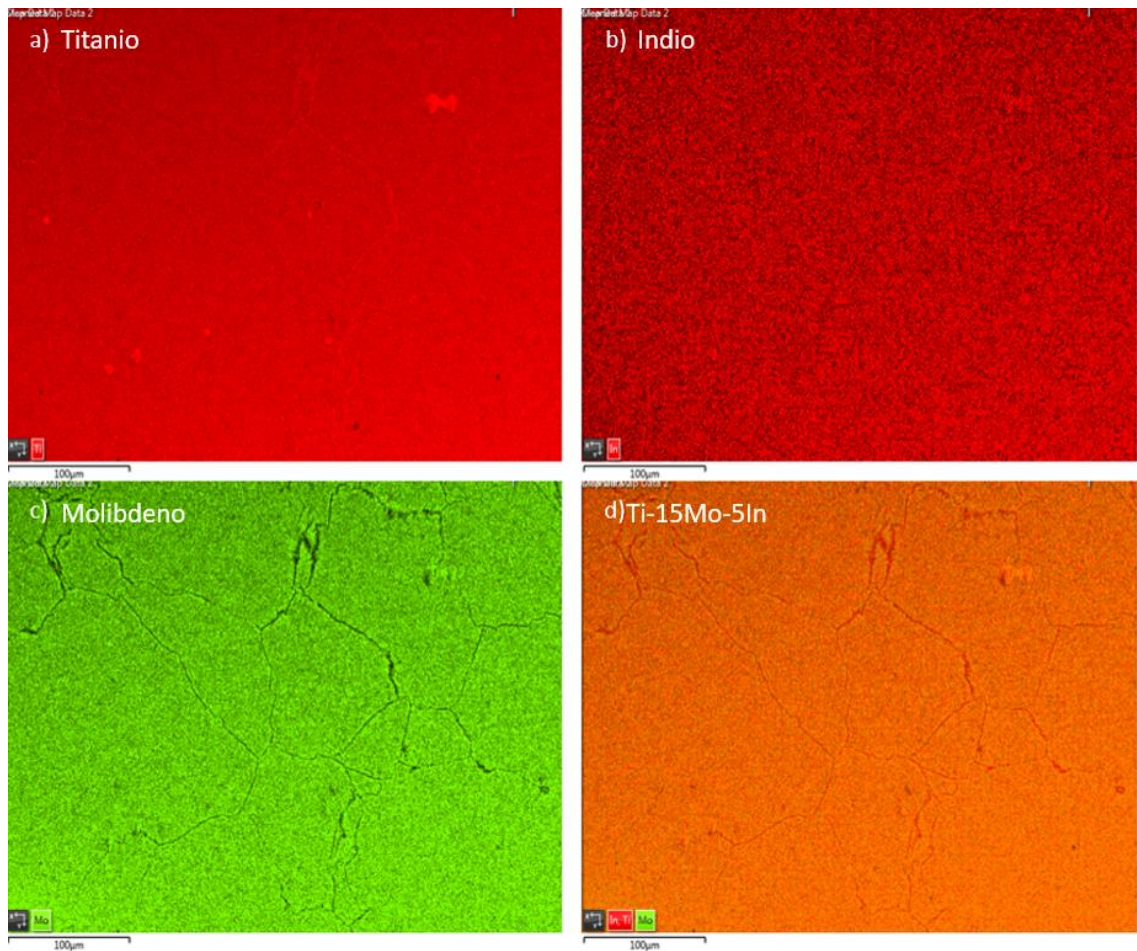


Figura 35. Mapa de distribución a 250X de los elementos que componen a la aleación Ti-15Mo-5In PM siendo: a) Distribución del titanio, b) Distribución del indio, c) Distribución del molibdeno y d) Distribución del titanio, indio y molibdeno.

En la figura 37 se observa el mapa de distribución elemental de la aleación Ti-35Nb-5In PM. Se puede apreciar una diferencia en la composición cosa que no se observaba en la microscopía óptica.

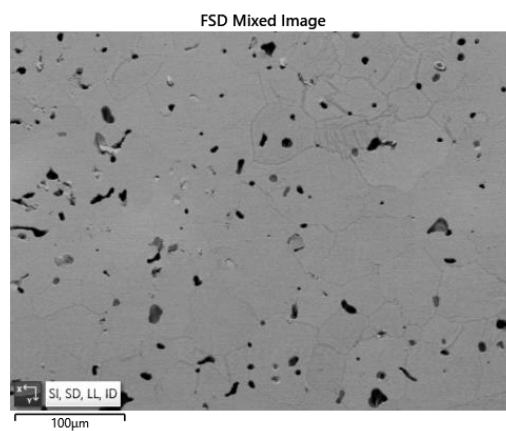


Figura 36. Imagen FSD de la aleación Ti-35Nb-5In PM.

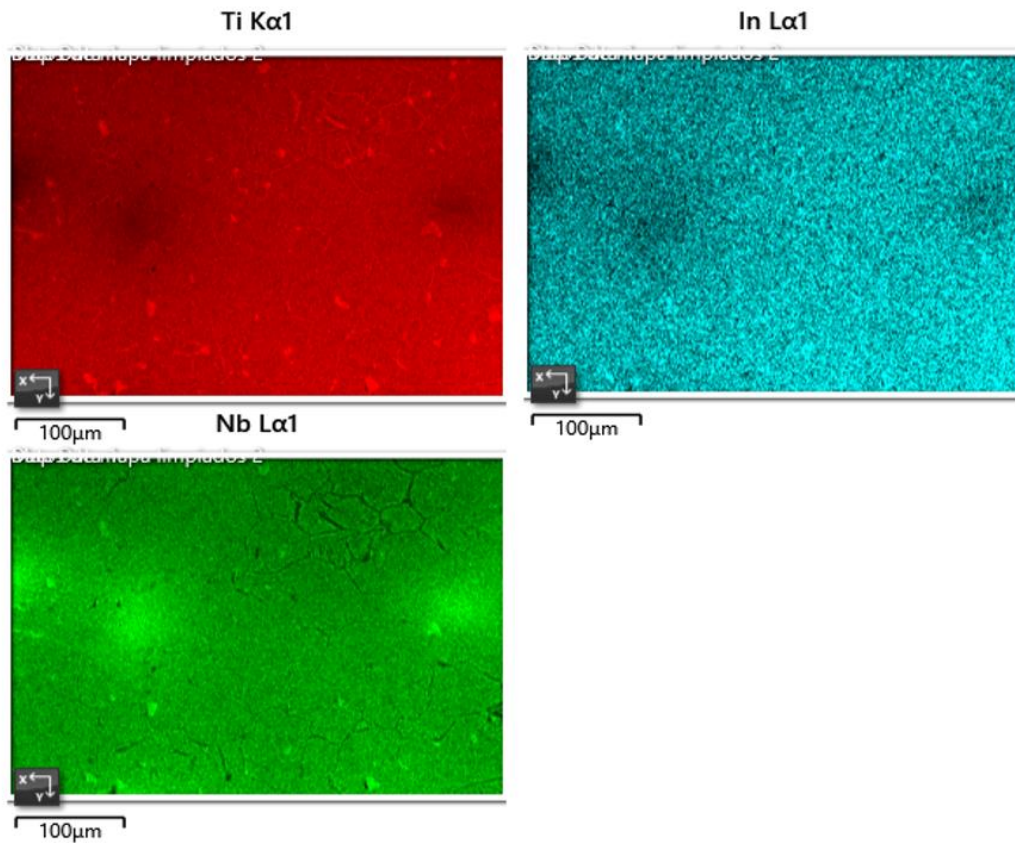


Figura 37. Mapa de Distribución de los elementos que componen a la aleación Ti-35Nb-5In PM siendo: a) Distribución del titanio, b) Distribución del indio, c) Distribución del niobio.

Por último, la figura 39 representa el mapa de distribución elemental de la aleación Ti-35Nb-5In de colada, y tal como se aprecia durante la colada sí que se obtiene una mayor homogeneidad entre los diferentes componentes. Además, a bajos aumentos los detectores pueden generar sombras a la hora de la captura de la energía dispersiva de los rayos x, y, por lo tanto, generan una falta de datos que se manifiesta en la esquina superior izquierda de las imágenes de la figura.

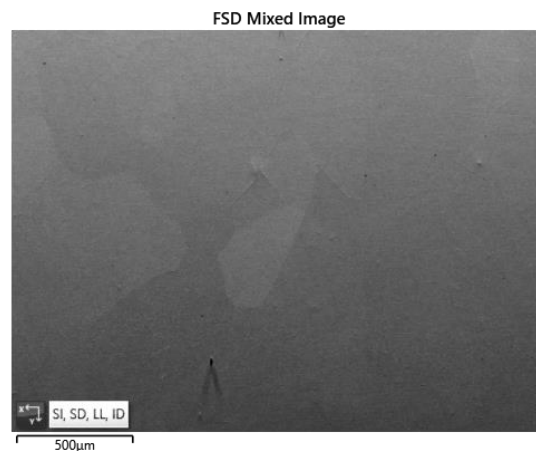


Figura 38. Imagen FSD de la aleación Ti-35Nb-5In colada.

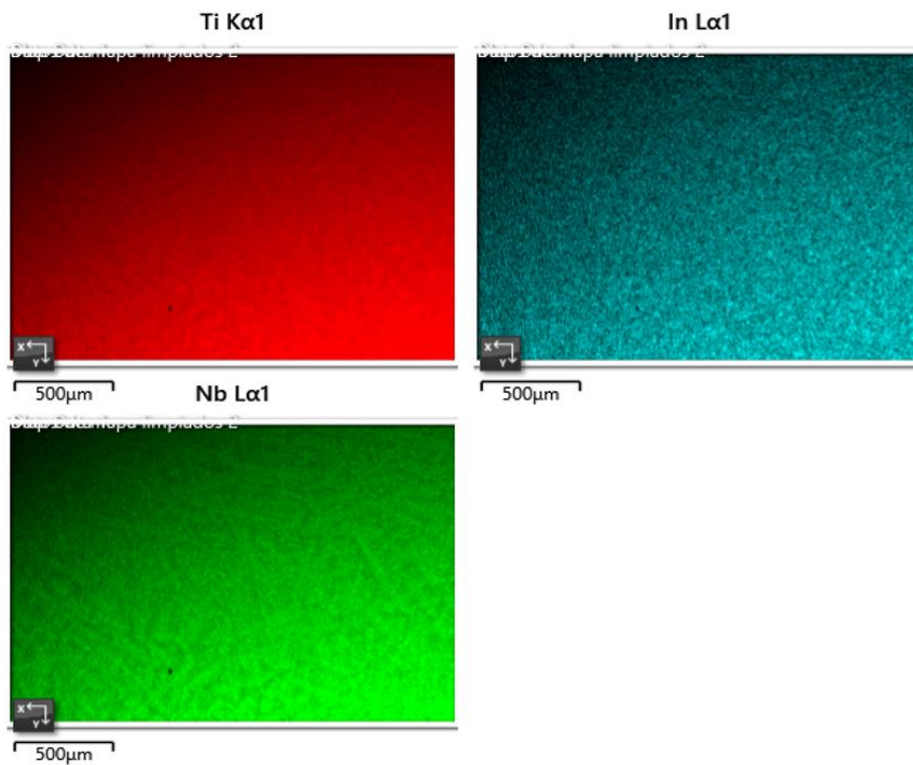


Figura 39. Mapa de distribución de los elementos que componen a la aleación Ti-35Nb-5In colada siendo: a) Distribución del titanio, b) Distribución del indio, c) Distribución del niobio.

Además, el ensayo EBSD permite analizar el estudio de las orientaciones cristalinas así como la distribución de las fases α y β . En primer lugar, el contraste de bandas informa sobre si se ha producido una buena indexación o no, de manera que las zonas más claras indican que hay una buena indexación mientras que las más oscuras no. Se exponen las imágenes de contraste de bandas para las diferentes aleaciones estudiadas a continuación:

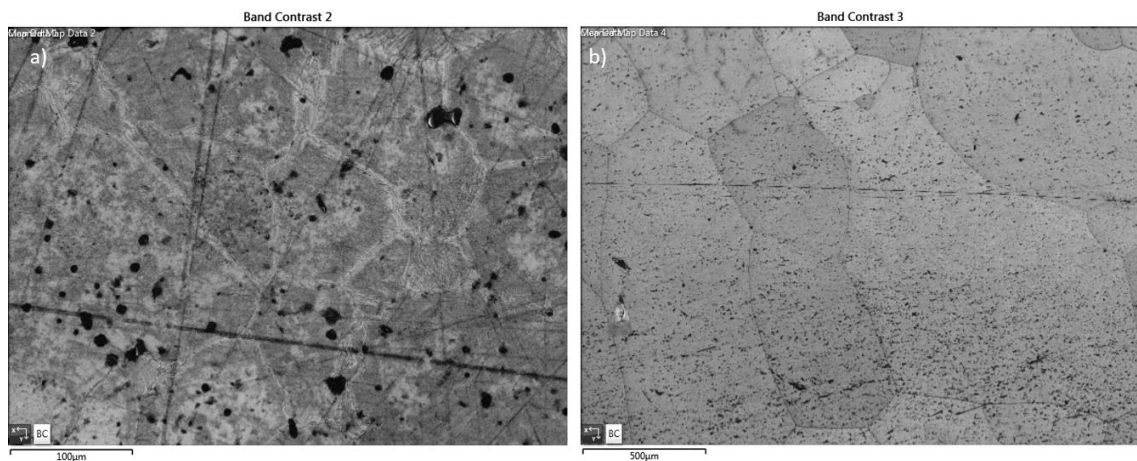


Figura 40. a) Contraste de bandas de la aleación Ti-15Mo-5In PM, b) Contraste de bandas de la aleación Ti-15Mo-5In colada.

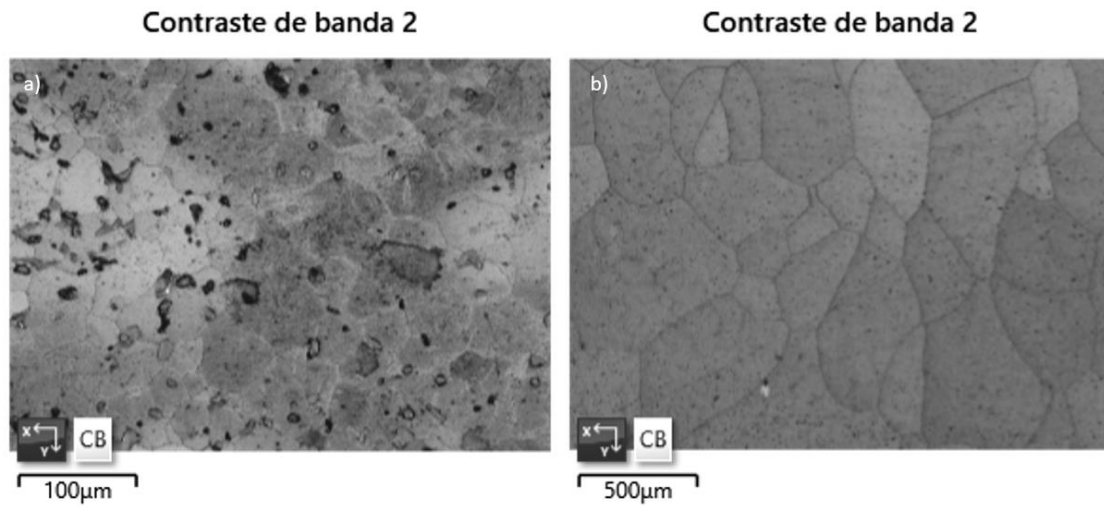


Figura 41. Contraste de bandas de la aleación Ti-35Nb-5In PM, b) Contraste de bandas de la aleación Ti-35Nb-5In colada.

En las siguientes figuras se pueden observar los granos de manera mucho más clara ya que el modo Euler colorea a cada uno de ellos con un color diferente.

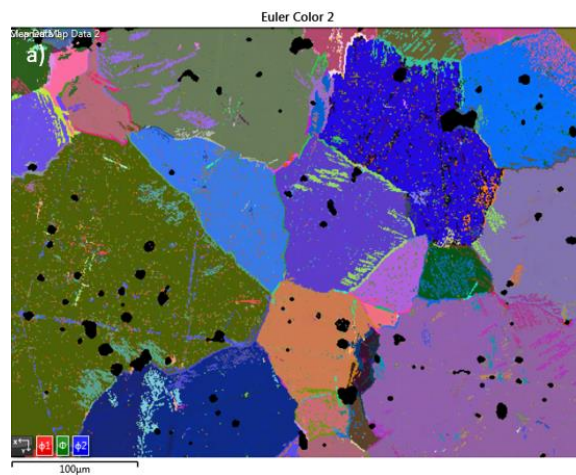


Figura 42. a) Euler de la aleación Ti-15Mo-5In PM.

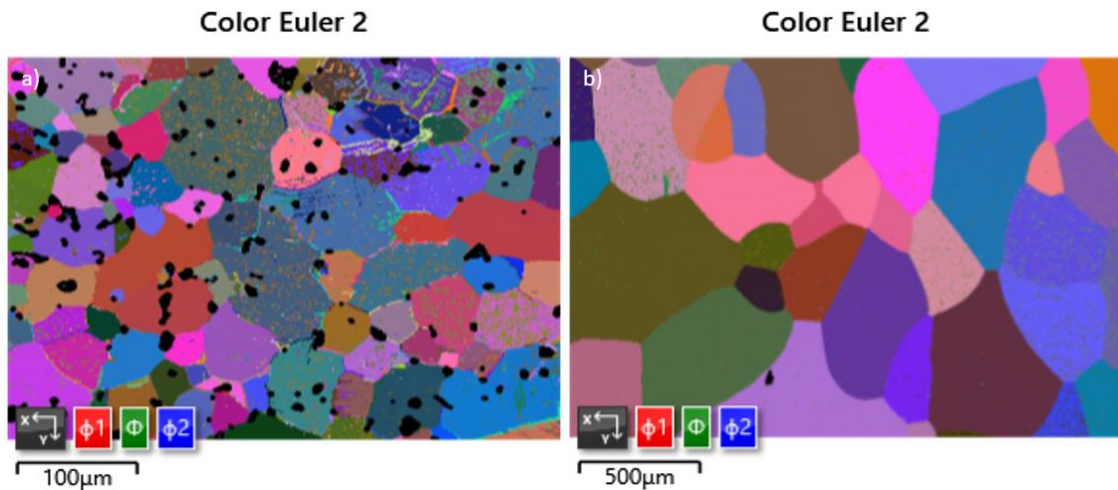


Figura 43. a) Euler de la aleación Ti-35Nb-5In PM, b) Euler de la aleación Ti-35Nb-5In colada.

Para completar esta información las figuras de polos inversos (IPF) nos permiten conocer la orientación de los granos presentes y su orientación. Cada grano irá coloreado según su orientación.

Como se puede observar en la figura 44, los granos de la aleación de molibdeno son de tamaño bastante grande.

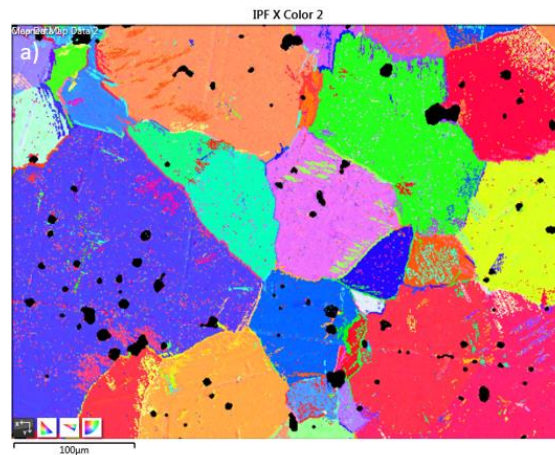


Figura 44. Figura de polos inversos de la aleación Ti-15Mo-5In PM.

Por otro lado, la figura 45 indica el valor del MUD. El MUD corresponde a la cantidad de granos que pertenecen a la misma orientación. Entonces, si los MUDs son pequeños como en este caso, significa que no hay mucha orientación preferente. El motivo de esto puede ser debido a que en las aleaciones obtenidas por pulvimetalurgia convencional, los granos no suelen tener orientaciones preferentes.

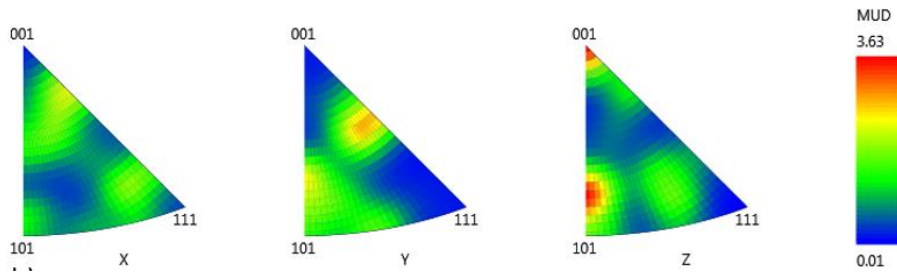


Figura 45. IPF de la aleación Ti-15Mo-5In PM.

En el caso de la IPF de la aleación con niobio representado en la figura 46 se observan resultados semejantes a los de la aleación con molibdeno, y, además, en el caso de PM se ve representada como manchas de color negro la gran porosidad de esta aleación (Ti-35Nb-5In PM) que ya se intuía mediante microscopía óptica.

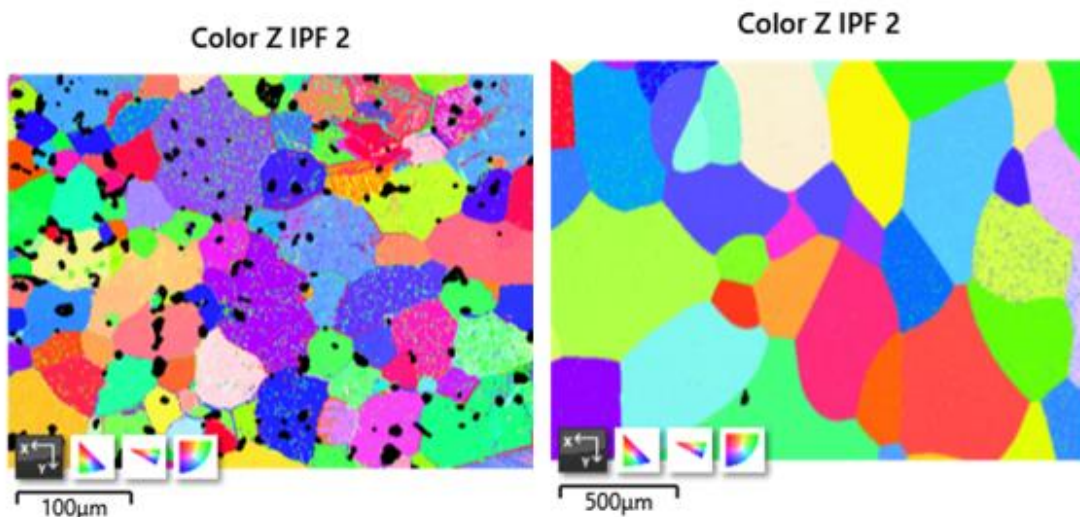


Figura 46. a) Figura de polos inversos de la aleación Ti-35Nb-5In PM, b) Figura de polos inversos de la aleación Ti-35Nb-5In colada.

Además de conocer bien la orientación de los granos, el ensayo EBSD también ha permitido conocer de manera más exacta cuál es la fase presente en cada uno de ellos. Esto se ve representado en la figura 47, figura 48 y figura 49 que aparecen a continuación, donde el color rojo pertenece a una estructura cúbica (fase β), el azul representa la estructura hexagonal (fase α) y, por último, el amarillo a la fase martensítica (α'). En los casos los que aparezcan porcentajes de solución cero significará que en ciertas partes de la imagen no se ha podido obtener ninguna solución.

Con los valores obtenidos en cada tabla para cada aleación se puede verificar que las aleaciones que han sido obtenidas por técnicas de pulvimetalurgia convencional presentan mayoritariamente fase β , sin embargo, también se puede diferenciar, aunque sea en menor cantidad, fase α . Esto se ve representado en la figura 47 y la figura 48 que pertenecen a las fases presentes en la aleación Ti-15Mo-5In PM y Ti-35Nb-5In PM respectivamente.

En la figura 47 (molibdeno PM) se puede ver que la fase alfa se encuentra sobre todo en los extremos del grano. Esto es debido precisamente por la formación de fase alfa incipiente a partir de la fase beta de sinterización durante el enfriamiento. Lo que pasa es que se forma esa fase alfa inicialmente en borde de grano y después va dirigiéndose hacia el interior en unas orientaciones preferentes.

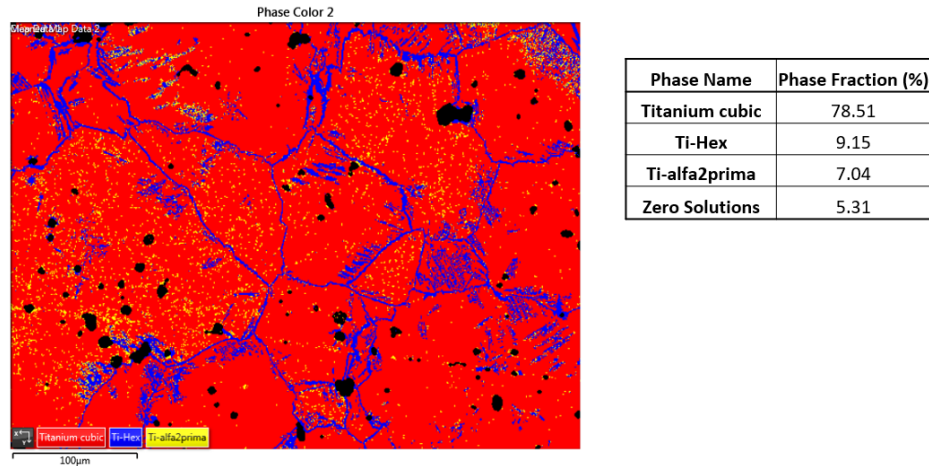


Figura 47. Fases presentes en la aleación Ti-15Mo-5In PM.

En el caso del niobio PM (figura 48), se observan unas zonas claramente beta y unas zonas que son alfa + beta debido a la diferente difusión y a la cantidad de niobio no difundido que se tiene. Esto ya se observaba en la figura 37 que representa el mapa de distribución de los elementos que componen a la aleación Ti-35Nb-5In PM.

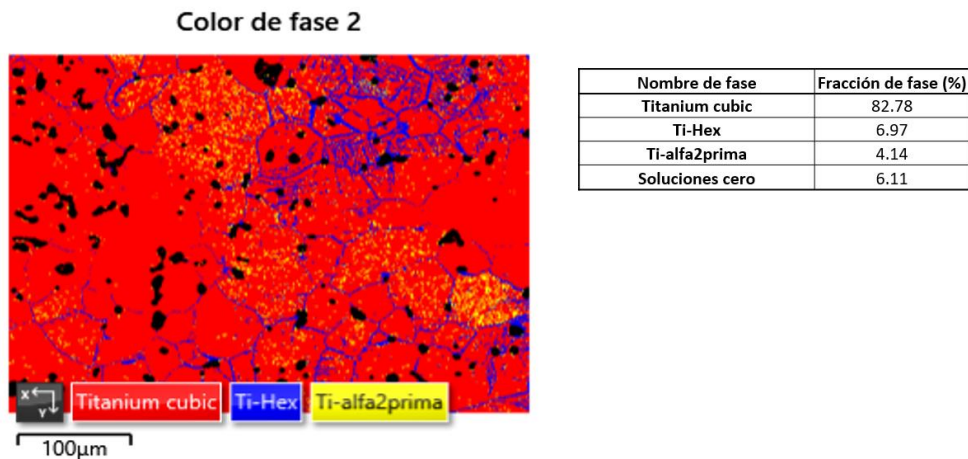


Figura 48. Fases presentes en la aleación Ti-35Nb-5In PM.

En el caso de la aleación obtenida por colada (figura 51) casi la totalidad de fases presentes pertenecen a la fase beta y esto es debido a su lenta velocidad de enfriamiento. El valor de fase alfa y alfa-2-prima no llega a ser completamente nulo, esto puede ser debido a que algunas partes de la probeta puedan haber sufrido un enfriamiento más rápido.

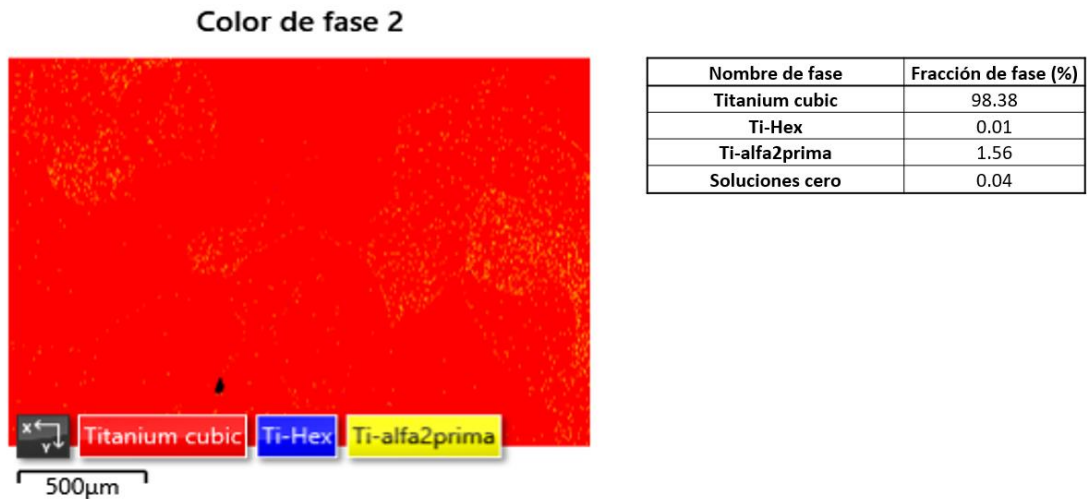


Figura 49. Fases presentes en la aleación Ti-35Nb-5In colada.

4.2.3. Estudio de las fases mediante difracción de rayos X

Con la difracción de rayos X se conocen las fases que componen cada una de las aleaciones. Se enfrentan los difractogramas de las muestras obtenidas por pulvimetalurgia convencional y por colada.

Con los picos registrados representados en la figura 50 y en la figura 51, se concluye que ambas aleaciones obtenidas por colada se corresponden en su totalidad a la fase β (100%) mientras que en las obtenidas por pulvimetalurgia hay una predominancia en la totalidad de picos de fase β para ambas aleaciones (aproximadamente 65%) pero también se pueden diferenciar algunos picos de fase α (aproximadamente 35%) en ambas aleaciones. El resultado de este ensayo cuadra con lo que se comentaba anteriormente en el apartado 4.2.2. Estudio microestructural mediante microscopía electrónica de barrido, ya que en el análisis de fases se obtuvieron resultados respecto a las fases presentes en cada una de las aleaciones muy semejantes a los obtenidos mediante la difracción de rayos x.

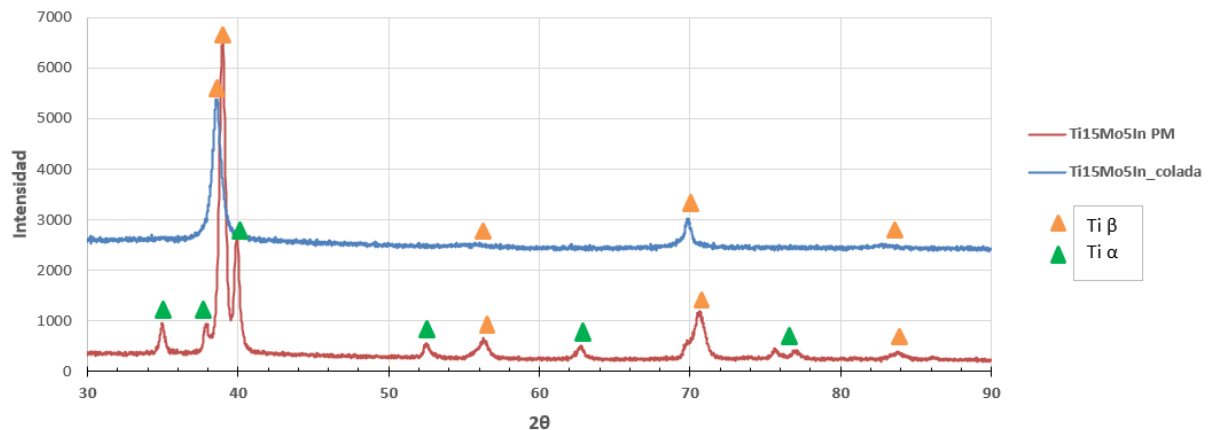


Figura 50. Difractograma de la muestra Ti-15Mo-5In PM y colada.

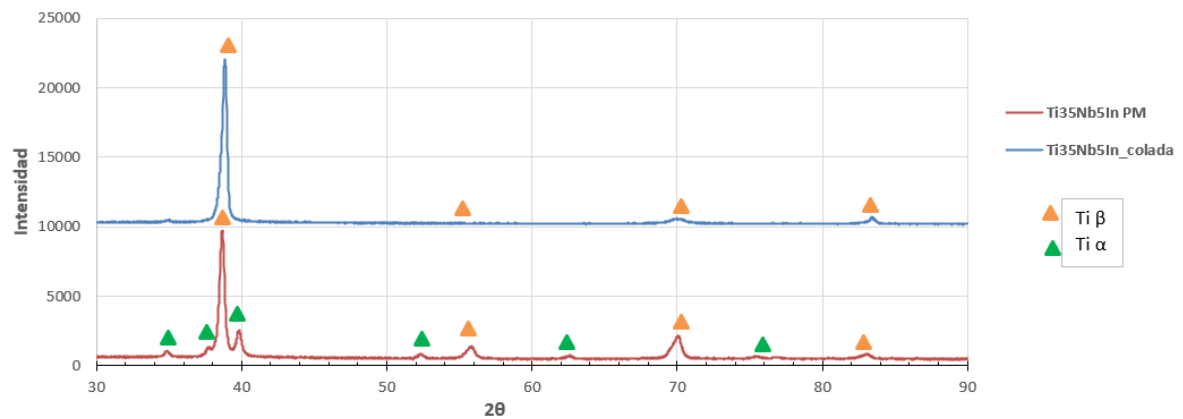


Figura 51. Difractograma de la muestra Ti-35Nb-5In PM y colada.

De este modo, como la estructura que predomina en ambas aleaciones es la cúbica centrada en el cuerpo, se tratan de unas aleaciones más dúctiles en comparación con la aleación Ti-6Al-4V, que posee aluminio, y por tanto un mayor porcentaje de alfa estabilizante con estructura hexagonal compacta. Esta estructura, además, conduce a un módulo elástico cercano al del hueso. Así pues, se puede asegurar que las aleaciones beta de titanio como Ti-15Mo-5In y Ti-35Nb-5In son excelentes para promover una interfase entre el hueso y el implante que no comprometa el apantallamiento de las cargas y, por lo tanto, que se reduzca su porcentaje de fallo (Brizuela et al., 2019).

4.3. CARACTERIZACIÓN MECÁNICA DE LAS ALEACIONES

4.3.1. Obtención del módulo elástico

Para obtener el módulo elástico de ambas aleaciones se trabaja con un ensayo de excitación por impulso y los resultados se muestran en la tabla 12.

Resulta extraño que el valor del módulo elástico de Ti-15Mo-5In PM sea 15 GPa. Evidentemente, este es el resultado que se ha obtenido con el equipo Sonelastic pero, se trata de una cifra muy cuestionable, por lo que no se debería tener en cuenta como definitiva. El porqué de este resultado erróneo se desconoce.

Tabla 12. Módulo elástico de cada aleación resultado del ensayo de Sonelastic.

Aleación	Módulo elástico (GPa)
Ti-15Mo-5In PM	15 ± 21
Ti-35Nb-5In PM	62 ± 17

4.3.2. Ensayo de flexión a 4 puntos

Los resultados del ensayo de flexión a cuatro puntos se exponen en la tabla 13, donde se muestran los valores de tensión máxima, desplazamiento máximo y el módulo elástico de cada una de las aleaciones. Además, se compara el comportamiento de ambas en la figura 52 con un gráfico que representa la curva tensión en función de la deformación.

Tabla 13. Resultados del ensayo de flexión a 4 puntos: Tensión máxima, desplazamiento máximo y módulo elástico.

Aleación	Tensión Máxima (MPa)	Desplazamiento Máximo (mm)	Módulo elástico (GPa)
Ti-15Mo-5In PM	595 ± 99	0.18 ± 0.053	80 ± 24
Ti-35Nb-5In PM	615 ± 86	0.23 ± 0.041	63 ± 25

Comparando el resultado de los valores del módulo elástico obtenidos con Sonelastic respecto al ensayo de flexión a cuatro puntos se observa que en el caso de la aleación Ti-15Mo-5In este valor difiere significativamente, lo que hace concluir que el valor obtenido por Sonelastic es erróneo.

Por otra parte, el valor del módulo elástico de la aleación Ti-35Nb-5In coincide con lo visto en bibliografía. El niobio es capaz de disminuir el valor del módulo elástico respecto a la aleación Ti-6Al-4V y este dato es de especial interés.

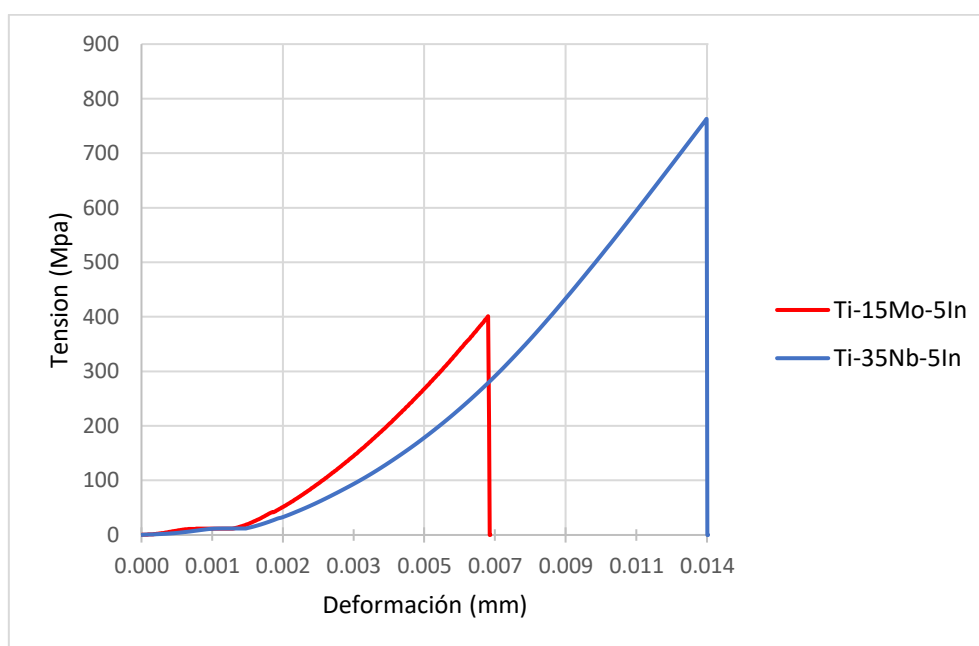


Figura 52. Curvas tensión-deformación de cada una de las aleaciones (PM) obtenidas mediante el ensayo de flexión a cuatro puntos.

Una vez conocido el módulo elástico de las aleaciones estudiadas, estos se comparan con el módulo elástico del hueso cortical, del hueso trabecular, del titanio puro comercial y del Ti-6Al-4V, aleación biomédica muy empleada en la actualidad:

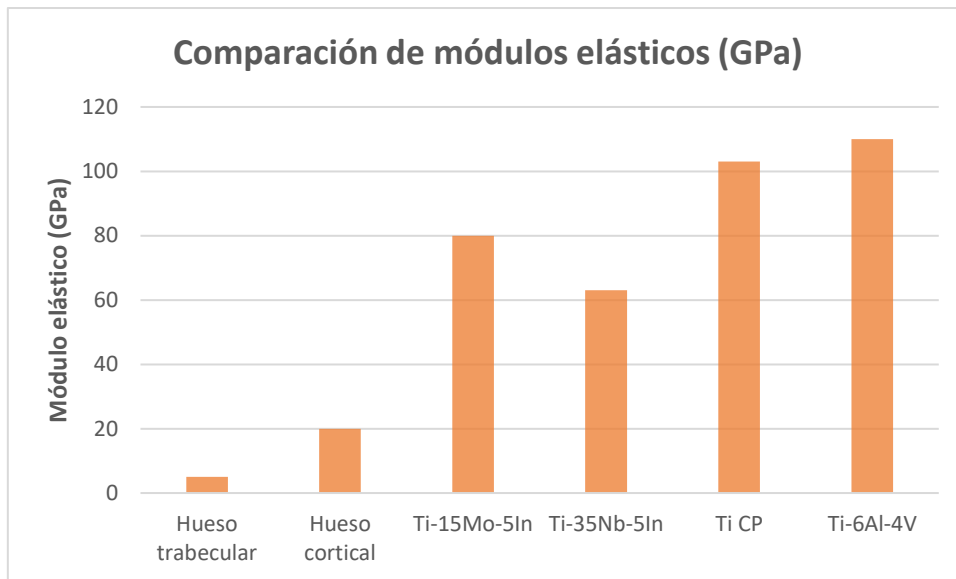


Figura 53. Comparación del módulo elástico del hueso trabecular (5 GPa), hueso cortical (20 GPa), Ti-15Mo-5In (80 GPa), Ti-35Nb-5In (63 GPa), Ti CP (103 GPa) y Ti-6Al-4V (110 GPa).

Así pues, las aleaciones estudiadas (Ti-15Mo-5In y Ti-35Nb-5In) son candidatas prometedoras para su uso como implantes biomédicos por su alta biocompatibilidad y su relativamente bajo módulo elástico. Pues, según los resultados obtenidos (Tabla 14), el caso de Ti-15Mo-5In su módulo elástico es de 80 GPa, y en el caso de Ti-35Nb-5In 63 GPa, ambas están alrededor de un 20-25% menor que el de otras aleaciones disponibles (Maity et al., 2020). Como se ha analizado previamente, esta reducción de módulo elástico supone un gran cambio en cuanto a la transmisión de cargas masticatorias (en el caso del implante dental) entre el hueso y el propio implante. Esto radica nuevamente en la microestructura, pues en ambas aleaciones estudiadas predomina mayoritariamente la fase beta como se ha podido observar en los resultados obtenidos por técnicas de difracción de iones y EBSD, y está comprobado que las aleaciones con elementos β -estabilizantes como son el Mo y Nb, son aleaciones que presentan valores de módulos elásticos más similares al del hueso (Leyens & Peters, 2003).

4.3.3. Ensayo de dureza

Los resultados obtenidos en el ensayo de dureza se ven representados en la figura 54. En esta se puede observar que la dureza del niobio es menor que la del molibdeno como se puede leer en bibliografía. No obstante, cuando la aleación Ti-35Nb-5In se cuele, incrementa el valor de la dureza. Esto es debido a que cuando se trabaja con colada se disminuye la porosidad intrínseca causada por la pulvimetalurgia convencional y con ello, aumenta sus propiedades. Pero sobre todo, debido a la mayor homogeneidad en la composición química que elimina en gran parte las partículas de niobio no difundidas.

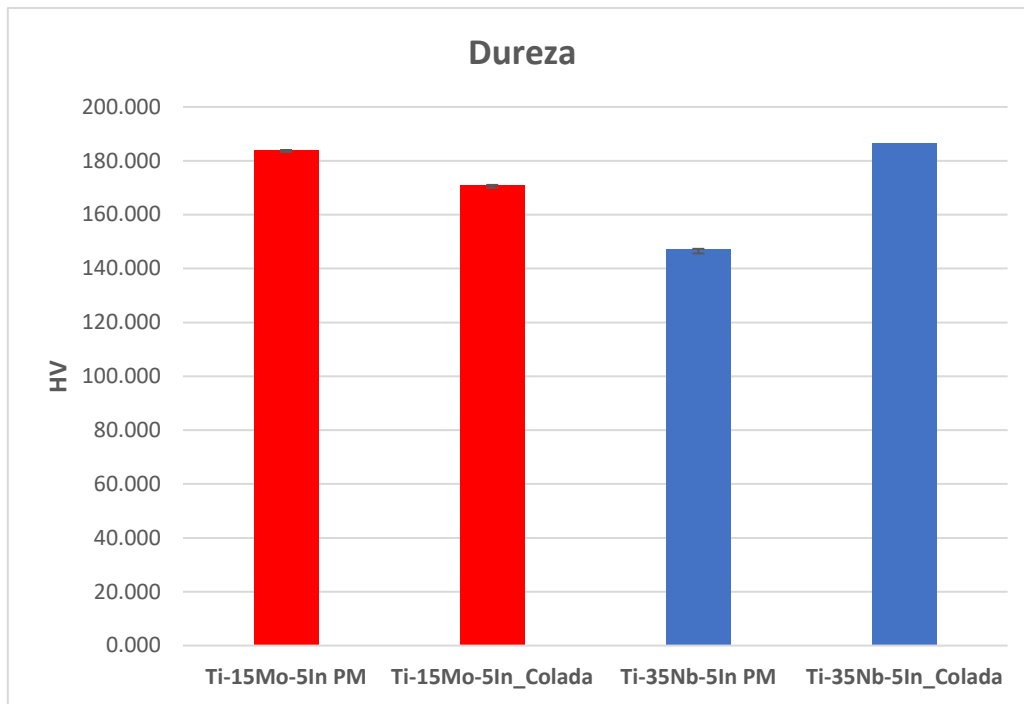


Figura 54. Valores de dureza para cada aleación.

4.3.4. Ensayo de microdureza

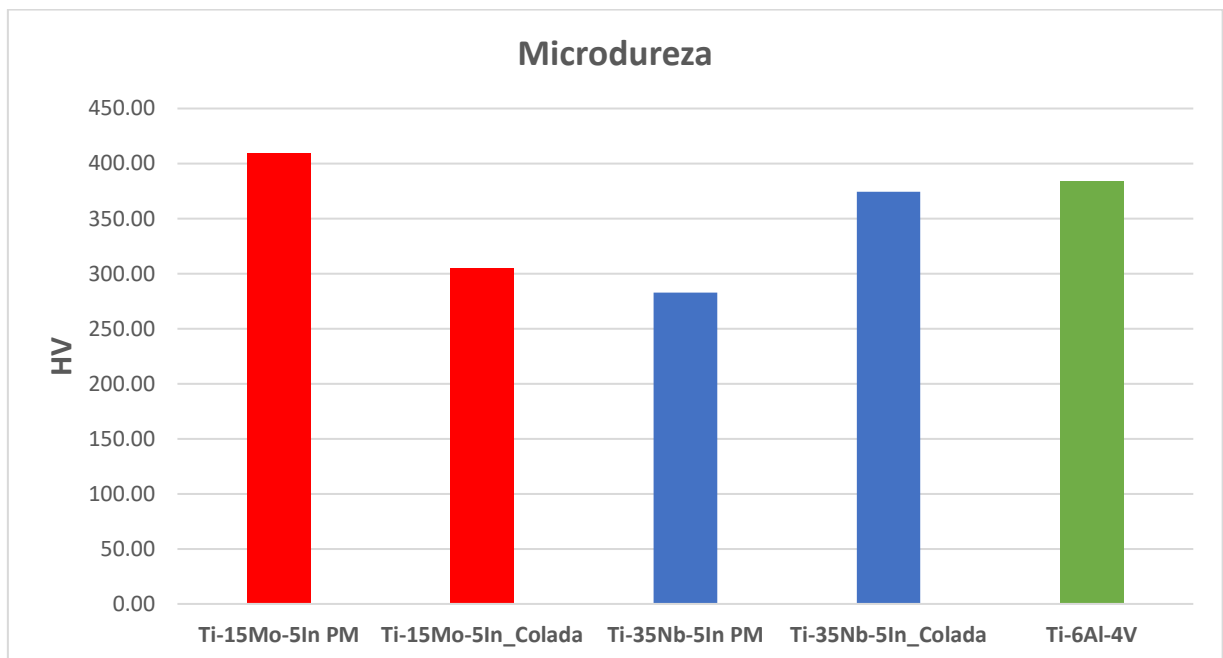


Figura 55. Valores de microdureza para cada aleación estudiada y para la aleación comercial Ti-6Al-4V.

Observando los valores obtenidos en la figura 54 y figura 55 para la dureza y la microdureza respectivamente, se puede decir que estos de forma relativa son muy semejantes, pero, si se comparan en valor absoluto estos difieren. Esto es porque la dureza se ha obtenido como Rockwell superficial en la superficie del material. Esta se trata de una dureza generalizada que implica a varios granos y que tiene en cuenta la porosidad de la aleación. Sin embargo, cuando se mide la microdureza se está pinchando en un grano en cuestión y, en el caso de que haya algún poro que pueda afectar al resultado, se va a desestimar esa medida. Esto significa que en este caso se está considerando la dureza de la aleación sin porosidad.

Los resultados de microdureza obtenidos tras el ensayo quieren decir que la aleación Ti-15Mo-5In presenta mayor dureza que la aleación Ti-6Al-4V. Esto representa a lo que se observa en bibliografía (Mohan et al., 2021), pues el molibdeno como aleaciones base titanio es capaz de aumentar las propiedades mecánicas. Este resultado también interesa en el campo de las aplicaciones biomédicas.

4.4. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LAS ALEACIONES

4.4.1. Estudio de la liberación de iones

Las probetas embutidas en resina una vez finalizó el ensayo fueron extraídas y se limpiaron las superficies de estas para poder ser analizadas con microscopio óptico.

En la figura 56 se observa que apenas hay picaduras producidas por la corrosión. Las esferas más oscuras que se aprecian representan la porosidad de la propia aleación. Además, en el centro de la imagen de la figura 56.b) se pueden diferenciar los bordes de grano. Estos se tratan de granos equiaxiales muy grandes pertenecientes a la fase beta. No se aprecia la formación de fase alfa en borde de grano.

La microestructura no se debería observar en estas superficies ya que se trata de probetas que han sido pulidas anteriormente, no obstante, es el efecto de la liberación de iones el que permite ver esto. Además, el ataque será distinto según sea la orientación de los granos.

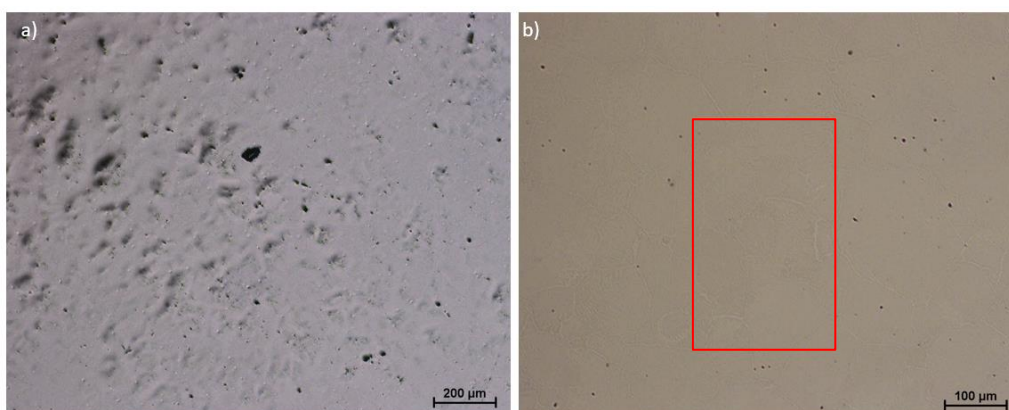


Figura 56. Imágenes obtenidas por MO a diferentes aumentos de la microestructura de las muestras de Ti-15Mo-5In PM después del ensayo de liberación de iones. Cada imagen representa una zona diferente de la muestra.

En la figura 57 se muestran las imágenes que representan a la aleación Ti-35Nb-5In. En ellas se pueden apreciar algunas picaduras que se han formado durante el proceso de liberación de iones (cuadros en rojo) pero vemos como el resto de superficie está manchada por la porosidad de la misma aleación, por lo que se concluye que tampoco se trata de una superficie muy picada.

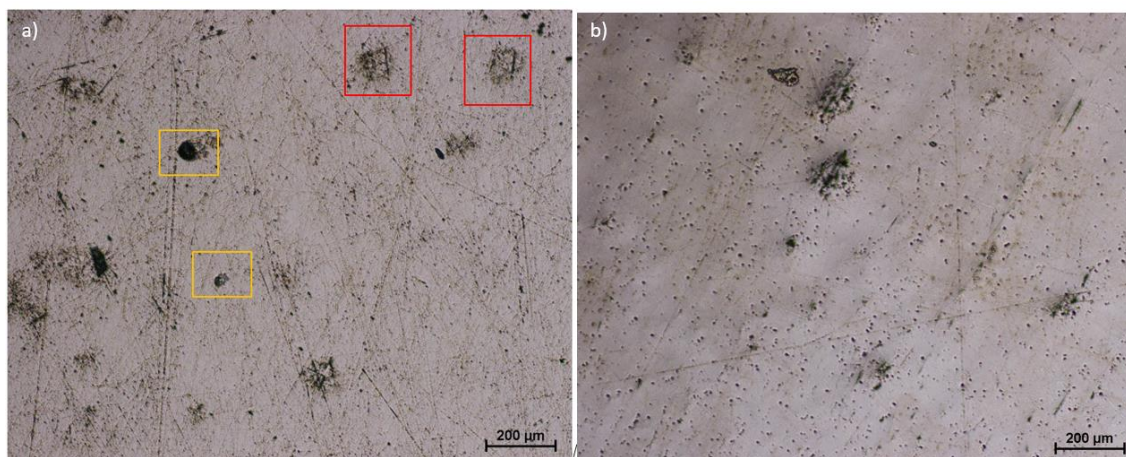


Figura 57. Imágenes obtenidas por MO a 200 aumentos de la microestructura de las muestras de Ti-35Nb-5In PM después del ensayo de liberación de iones. Cada imagen a) y b) representa una zona diferente de la probeta.

En la tabla 14 se encuentran los resultados del ensayo. Estos muestran las concentraciones promedio de iones liberadas por cada aleación en función del tiempo de ensayo y la superficie de muestra expuesta (un promedio de 1cm^2) tras permanecer 840 horas sumergidas en saliva artificial Ringer-Hartmann modificada en una estufa a 37°C .

Se aprecia (tabla 14), que los resultados en los elementos titanio e indio son muy similares y con valores muy bajos en ambas aleaciones, esto puede ser debido a que ambas han estado el mismo tiempo y bajo las mismas condiciones en el ensayo. Sin embargo, se puede observar que el Molibdeno, y con ello la aleación Ti-15Mo-5In, tiene tanto una tasa de liberación de iones como una velocidad de corrosión superior a la del niobio, es decir, de los elementos estudiados este es el que tiene mayor tendencia a la migración y, por tanto, el que más contribuye a la corrosión. Este hecho puede estar relacionado a lo que ya se percibía en las imágenes tomadas mediante microscopía óptica (figura 32), pues indicaba que el molibdeno no ha conseguido solubilizar con el resto de elementos y por ello es posible que tenga más incidencia a escapar cuando están en contacto con el electrolito.

Tabla 14. Valores del ensayo de liberación de iones de los elementos disueltos en la saliva artificial por cada aleación.

Aleación	Tasa de liberación de iones ($\mu\text{g/L}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{h}$) $\times 10^{-3}$		
	Ti	Mo	In
Ti-15Mo-5In PM	0.019 ± 0.009	0.62 ± 0.42	0.0013 ± 0.017
Ti-35Nb-5In PM	Ti	Nb	In
	0.019 ± 0.007	0.022 ± 0.005	0.003 ± 0.004
Aleación	Velocidad de corrosión ($\text{mg}/\text{dm}^2\cdot\text{día}$) $\times 10^{-3}$		Velocidad de corrosión ($\mu\text{m}/\text{año}$)
Ti-15Mo-5In PM	0.08 ± 0.05		0.57 ± 0.38
Ti-35Nb-5In PM	0.005 ± 0.001		0.07 ± 0.02

Pese a todo se observa que tanto la tasa de liberación de iones como la velocidad de corrosión de ambas aleaciones pertenece a valores muy bajos por lo que se concluye que tanto Ti-15Mo-5In como Ti-35Nb-5In se tratan de aleaciones que tienen alta resistencia a la corrosión cuando se encuentran en un medio de saliva artificial Ringer-Hartmann modificada, situación similar a la que podría ser la cavidad bucal.

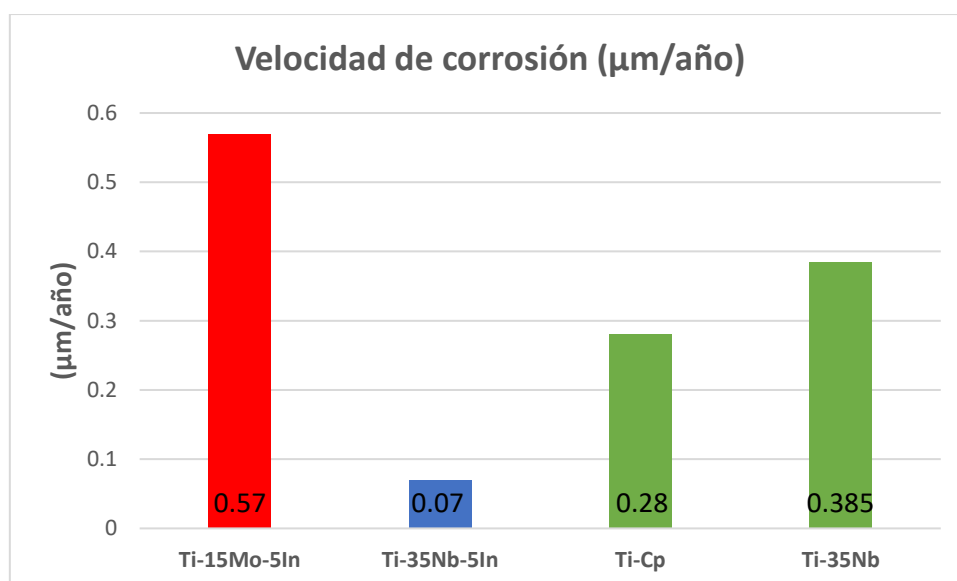


Figura 58. Resultados de la velocidad de corrosión obtenidos en el ensayo de liberación de iones de los elementos disueltos en la saliva artificial por cada aleación comparados con otras aleaciones comercialmente utilizadas.

Comparando las aleaciones estudiadas durante este proyecto con otras aleaciones de las que se conoce la velocidad de corrosión, se observa que la aleación Ti-35Nb-5In presenta el valor más bajo. Esto representa el excelente comportamiento que tiene esta aleación en cuanto a la resistencia a la corrosión y motiva a su seguimiento, ya que se trata de una aleación muy prometedora.

4.4.2. Estudio de la resistencia a la corrosión

Los resultados de este ensayo son de vital importancia en el ámbito de biomateriales ya que un mal comportamiento a corrosión no permitiría el uso de estas aleaciones en aplicaciones biomédicas.

La figura 59 muestra el potencial de circuito abierto (OCP) para cada una de las muestras con las que se está trabajando. Este se ha obtenido como resultado de una media de los últimos 300 segundos tras aplicar un potencial de -1V.

El OCP indica la tendencia que tiene el metal a participar o no en la corrosión electroquímica con el medio que la rodea, en este caso será la saliva artificial Ringer Hartman modificada. En la figura 59 se puede observar que del potencial van aumentando conforme para el tiempo hasta que llega un momento en el que se estabilizan rápidamente. Esto indica que la capa pasiva de óxido se ha formado de manera eficaz.

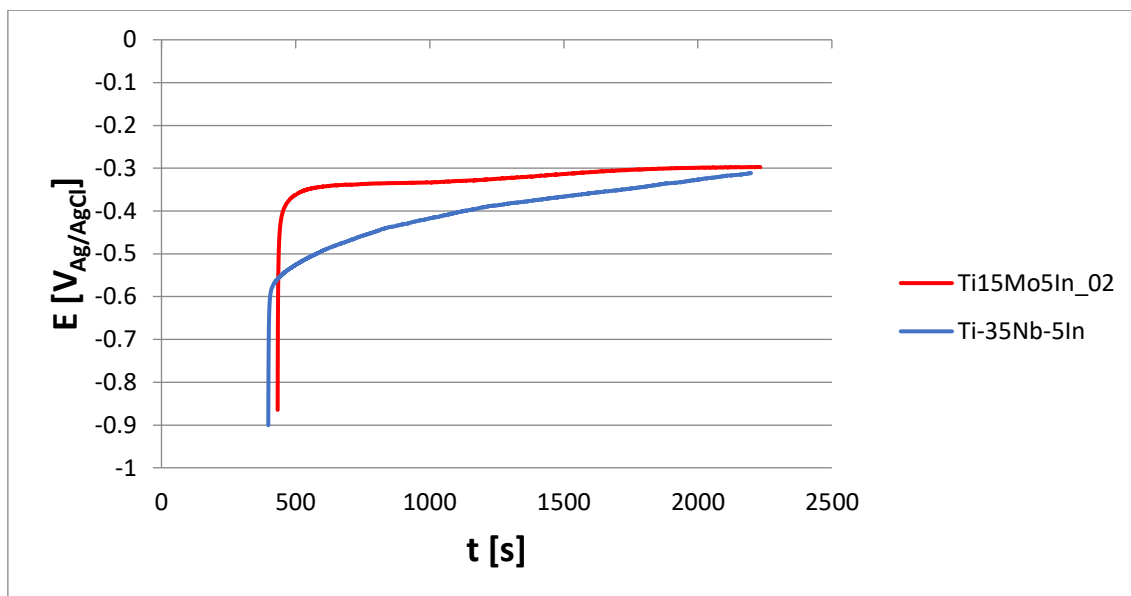


Figura 59. Curva OCP para cada una de las aleaciones por PM.

Tabla 15. Valores de potencial de circuito abierto (OCP) y desviación para cada una de las aleaciones.

Aleación	OCP
Ti-15Mo-5In PM	-0.26 ± 0.04
Ti-35Nb-5InPM	-0.30 ± 0.18

Además, la figura 60 muestra el valor de las curvas potenciodinámicas que se han obtenido para cada aleación durante el ensayo. Con esto se puede concluir cuál es el comportamiento a corrosión de ambas ya que permite visualizar el punto exacto donde se produce la transición catódica-anódica.

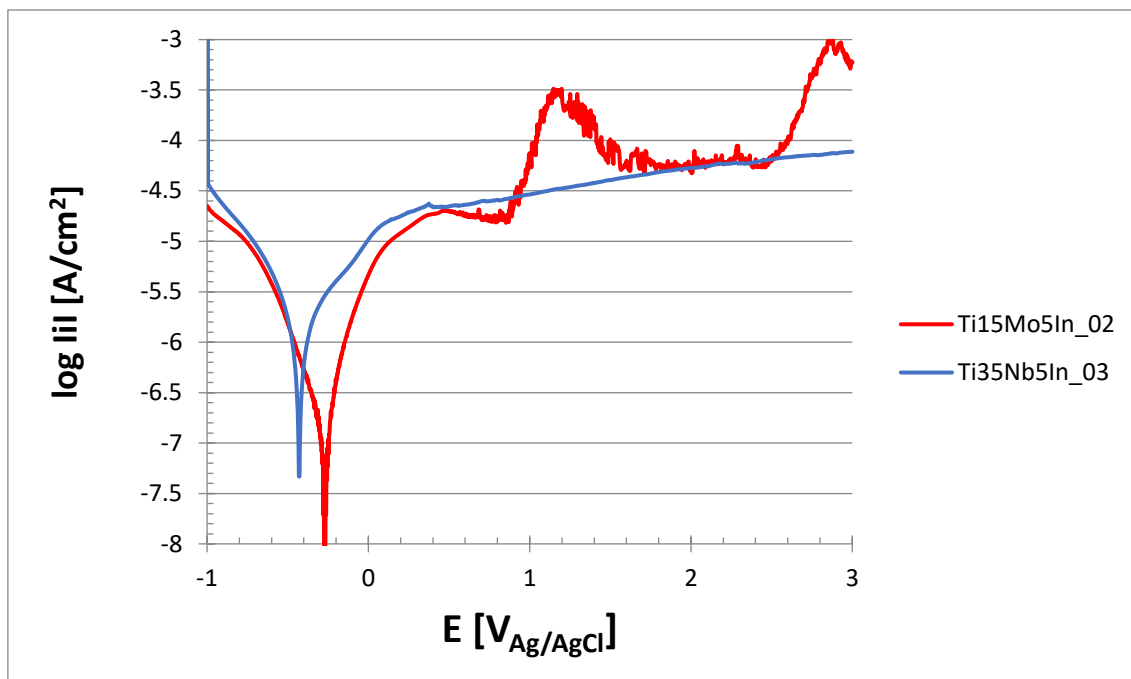


Figura 60. Curvas potenciodinámicas para cada aleación por PM.

Las curvas potenciodinámicas representan el potencial necesario (pico decreciente) para que se produzca un paso de corriente 0. El funcionamiento es el siguiente: el potenciostato va aplicando durante el ensayo diferentes potenciales (de más negativos a más positivos). En la primera región de potenciales negativos también conocida como región catódica (que presenta valores de densidad de corriente negativos y pendiente descendiente), se va creando una capa pasiva de óxido en la superficie del metal que evita el aumento del valor de la corriente. Acto seguido, se produce la transición entre la región catódica y anódica. En ese momento se ha producido el pico que corresponde al potencial de corrosión (E_{cor}). Este punto significa que en la superficie del material ya se ha creado una capa de óxido suficientemente gruesa que impedirá la corrosión del resto del metal, y, por tanto, no va a dejar pasar nada de corriente. A partir de este punto y durante la etapa anódica, la corriente que circula será consecuencia de esa capa de óxido, pero no afectará al resto del material.

El valor del potencial de corrosión que se ha obtenido para ambas aleaciones (tabla 15) indica que tanto Ti-15Mo-5In como Ti-35Nb-5In tienen un buen comportamiento frente a corrosión.

Al comparar ambas aleaciones entre sí se puede observar que tienen un comportamiento similar frente a corrosión. El valor del niobio es apenas más reactivo que el molibdeno, pero se puede decir que no hay diferencia significativa en el resultado de ambas. Sin embargo, cabe destacar que el molibdeno está en una proporción mucho menor que el niobio (15% frente a 35%). Comparando esto con lo ocurrido en el ensayo de liberación de iones, ya se observaba en la tabla 15 que la velocidad de corrosión del molibdeno era mucho mayor que la del niobio, a pesar de la diferencia en la proporcionalidad de ambos.

Por otra parte, se han obtenido los diagramas de Nyquist de las distintas aleaciones mediante EIS (espectroscopía de impedancias electroquímicas) que representan la impedancia real frente a la

compleja en negativo. La pendiente de la figura 61 muestra que la capa pasiva formada no está siendo penetrada por el agua, por tanto, cuanto más vertical sea esta, mejor comportamiento tendrá en la corrosión. Se observa que la aleación Ti-15Mo-5In presenta mayor pendiente. Esto tiene sentido porque ya se sabía que el potencial de corrosión de esta aleación es mayor que el de Ti-35Nb-5In, y, por tanto, cuanto más negativo, más anódico, y peor comportamiento tiene en la corrosión.

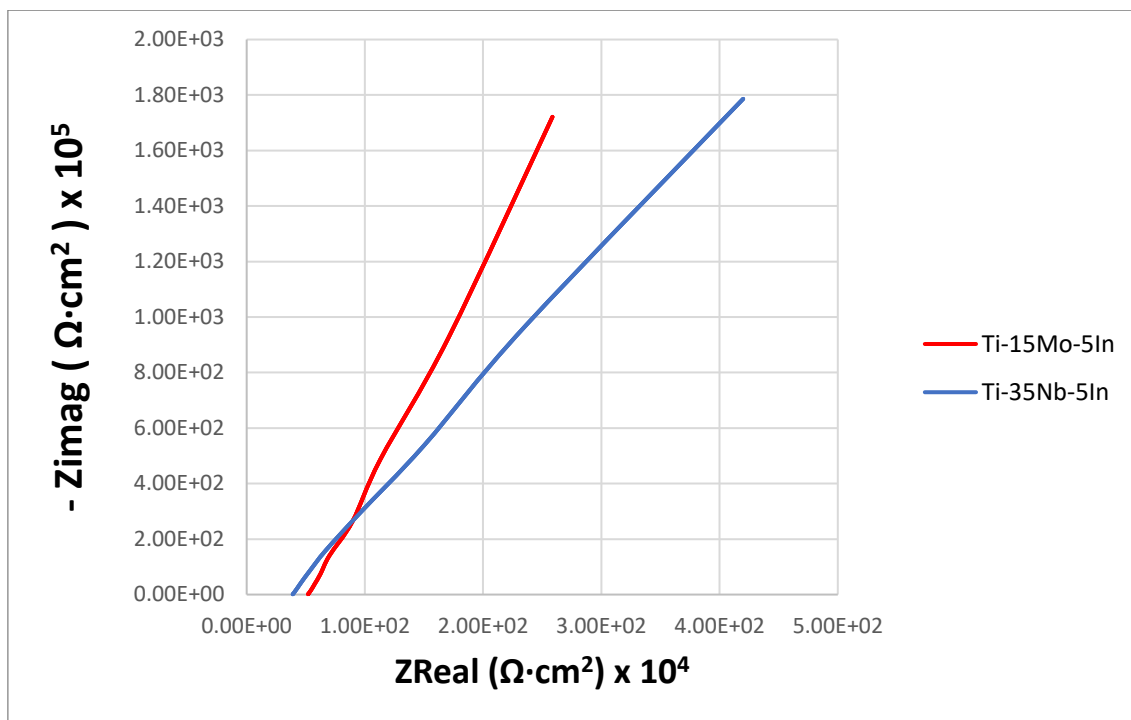


Figura 61. Diagrama de Nyquist para las aleaciones estudiadas por PM.

Además, se han obtenido los diagramas de bode de las distintas aleaciones mediante EIS donde el gráfico representa la fase y el módulo de la impedancia respecto a la frecuencia. Estos diagramas muestran que cuando las aleaciones se encuentran en contacto con la disolución, el comportamiento a corrosión se ajusta a un comportamiento de capa metálica porosa. Se observa en la figura 62 para ambas aleaciones que los valores del módulo de la impedancia son elevados en cuando se habla de frecuencias bajas y estos disminuyen cuando la frecuencia se va incrementando. Además, el ángulo de fase toma valores de hasta 85° cuando está a alta frecuencia y disminuye hasta valores cercanos a 0° a altas frecuencias. Además, la fase de Ti-15Mo-5In es mayor que la de Ti-35Nb-5In, por lo que se concluye que tiene un mejor comportamiento frente a corrosión.

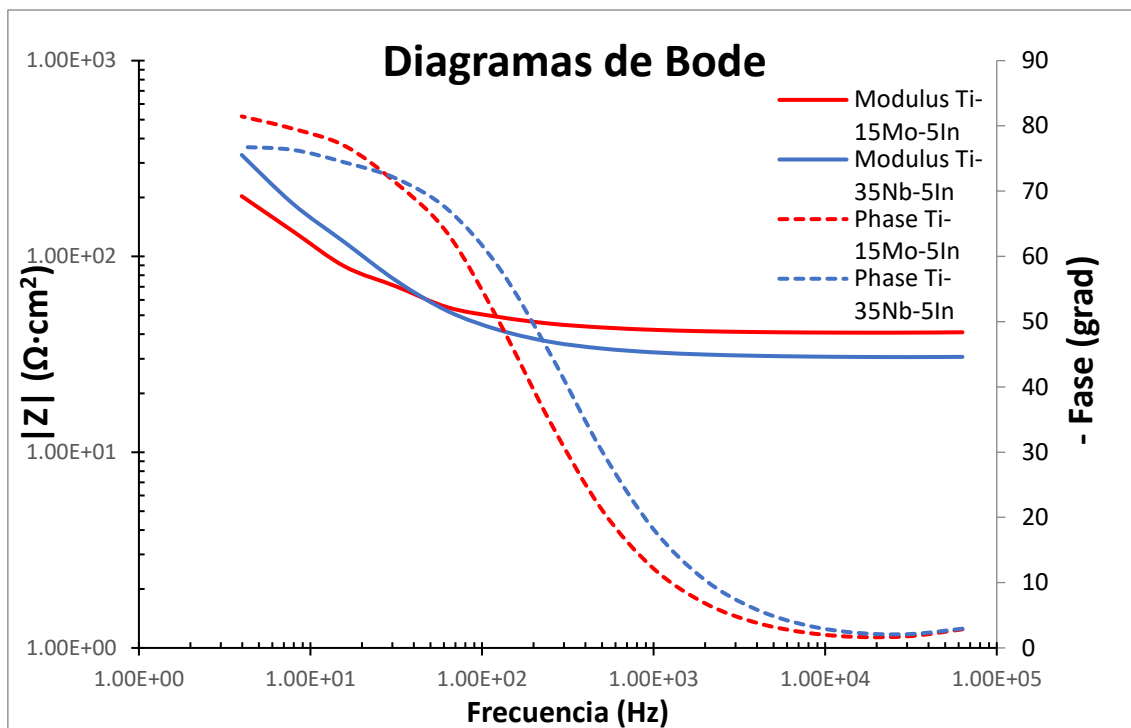


Figura 62. Diagramas de bode de las aleaciones por PM.

Al ajustar el circuito eléctrico como el modelo representado en la figura 25 a), se obtienen los parámetros de χ^2 , R_s y R_{ct} , el valor constante de CPE_{dl} y el valor del exponente exp_{dl} .

Tabla 16. Valores del ajuste del montaje mediante circuito equivalente.

	$\chi^2 \times 10^{-3}$	R_s ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	CPE_{dl} (nF/cm^2)	exp_{dl}	R_{ct} ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) $\times 10^5$
Ti-15Mo-5In PM	0.0005	50.12	3.89E-05	0.90	3.41E+19
Ti-35Nb-5In PM	0.0002	50.46	3.32E-05	0.87	1.00E+20

De la tabla 16 los datos de CPE_{dl} , exp_{dl} y R_{ct} hacen referencia a la capa salina, es decir, como se distribuyen los cationes y aniones en el medio en el que se encuentra la aleación. La concentración de cationes y aniones será mayor en la superficie del metal e irá disminuyendo al distanciarnos de esta en la disolución que se emplea en el ensayo. Esto es un comportamiento característico de un condensador.

Como se puede ver, el valor de chi-cuadrado es superior a 10^{-3} en ambas aleaciones. Esto quiere decir que se ha producido un buen ajuste del modelo elegido al montaje. Por otro lado, los valores de las resistencias son muy elevados y los valores de CPE_{dl} son muy reducidos, lo que indican mayor grosor de la capa. Este contraste interesa ya que significa un buen comportamiento a corrosión ya que se va a formar una capa porosa con un cierto espesor y también se va a tener gran resistencia en las transferencias de carga dadas.

4.5. ANÁLISIS BIOLÓGICO

4.5.1. Ensayo de citotoxicidad

Este ensayo se realizó en los discos obtenidos en el laboratorio de las aleaciones Ti-15Mo-5In y Ti-35Nb-5In. Se empleó el Software GraphPad Prism 7.3 para el análisis de los resultados. Este permite normalizar los datos obtenidos y fijar el 100% de viabilidad celular en el pocillo control. Este pocillo es el control negativo (C-) de las distintas placas, que como se comentó en el apartado correspondiente de materiales y metodología, en él se encuentran las células cultivadas (hDPSC y MG-63) con su propio medio de proliferación. Esto permitirá poder comparar todos los resultados obtenidos en el resto de pocillos respecto a este de control y así saber si existen diferencias significativas entre estos y el control (*) gracias a la función del test de Turkey. Con esto, se podrá concluir un cierto grado de citotoxicidad de los iones liberados por la aleación en cuestión en aquellos casos en los que el resultado sea significativo.

En este caso, bastó con la primera lectura para obtener los resultados ya que todos los pocillos del control negativo alcanzaron niveles dentro del rango 1-1.2. Entonces, se paró el ensayo y se analizaron los resultados.

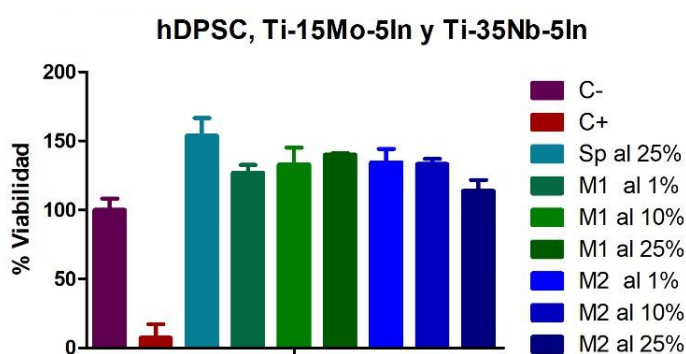


Figura 63. Resultados del ensayo de citotoxicidad para la aleación MI = Ti-15Mo-5In PM y M2 = Ti-35Nb-5In PM de laboratorio con células hDPSC.

Los porcentajes de viabilidad celular obtenidos en ambas aleaciones permiten concluir que no hay evidencias para decir que las aleaciones Ti-15Mo-5In y Ti-35Nb-5In son citotóxicas con células madre de pulpa dental humana y, por tanto, se puede afirmar que la incorporación de molibdeno y niobio en este tipo de aleaciones es positiva en cuanto a la viabilidad celular.

Del mismo modo, se lleva a cabo este análisis trabajando con la línea celular MG-63. Esto ayudará a conocer el comportamiento de las aleaciones en cuestión cuando estas se encuentran en contacto con células osteoblásticas. Este punto es de elevada importancia ya que en este proyecto se busca que cuando el implante esté colocado en la cavidad bucal además de no ser citotóxico, parte de las células madre de pulpa dental humana se diferencien en osteoblastos y promuevan la osteointegración del implante con el hueso circundante.

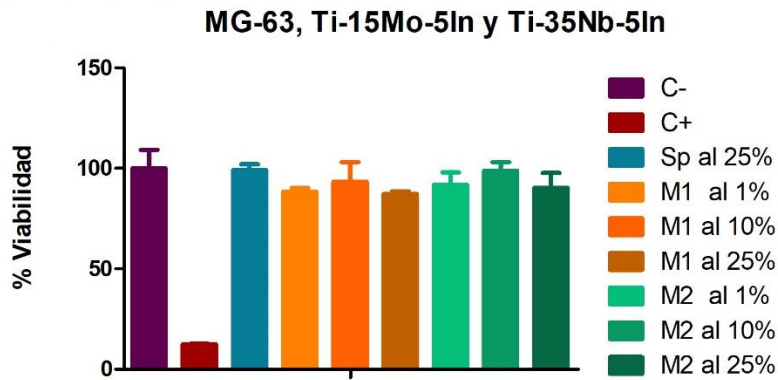


Figura 64. Resultados del ensayo de citotoxicidad para la aleación M1 = Ti-15Mo-5In PM y M2 = Ti-35Nb-5In PM de laboratorio con células hDPSC.

Se puede observar que las barras que representan los tres porcentajes de cada muestra son muy similares entre sí. Además, sus valores son muy parecidos a los del control. Esto indica que las células MG-63 proliferan de manera adecuada en el medio con los iones liberados y, por tanto, que no hay indicios de citotoxicidad en ninguna de las aleaciones tratadas.

4.5.2. Ensayo de inmunofluorescencia

Se evaluó en las células hDPSC y MG-63, tras 3 semanas en cultivo como se describe en Materiales y Métodos, en sus medios correspondientes, la distribución de F-actina por tinción fluorescente con el conjugado faloidina-rodamina para definir la morfología celular y con osteocalcina y fosfatasa alcalina mediante inmunofluorescencia para la confirmación de la posible diferenciación de las células. En las imágenes tomadas, los núcleos se ven representados de color azul por el uso del marcador fluorescente DAPI y los filamentos de F-actina del citoesqueleto de color rojo.

En cuanto a los pocillos control (sin disco): Para las hDPSC, no se detectó OC ni ALP en el medio de proliferación (Figura 65, c) y e) respectivamente), como era de esperar, pero sí que se detectó la expresión de estos marcadores al incubar las células con medio de diferenciación (Figura 65, d) y f) respectivamente). Además, la faloidina, permitió el análisis de la morfología celular, permitiendo observar ligeros cambios en las formas de estas líneas celulares para los distintos medios (Figura 65, a) y b) respectivamente).

hDSPC

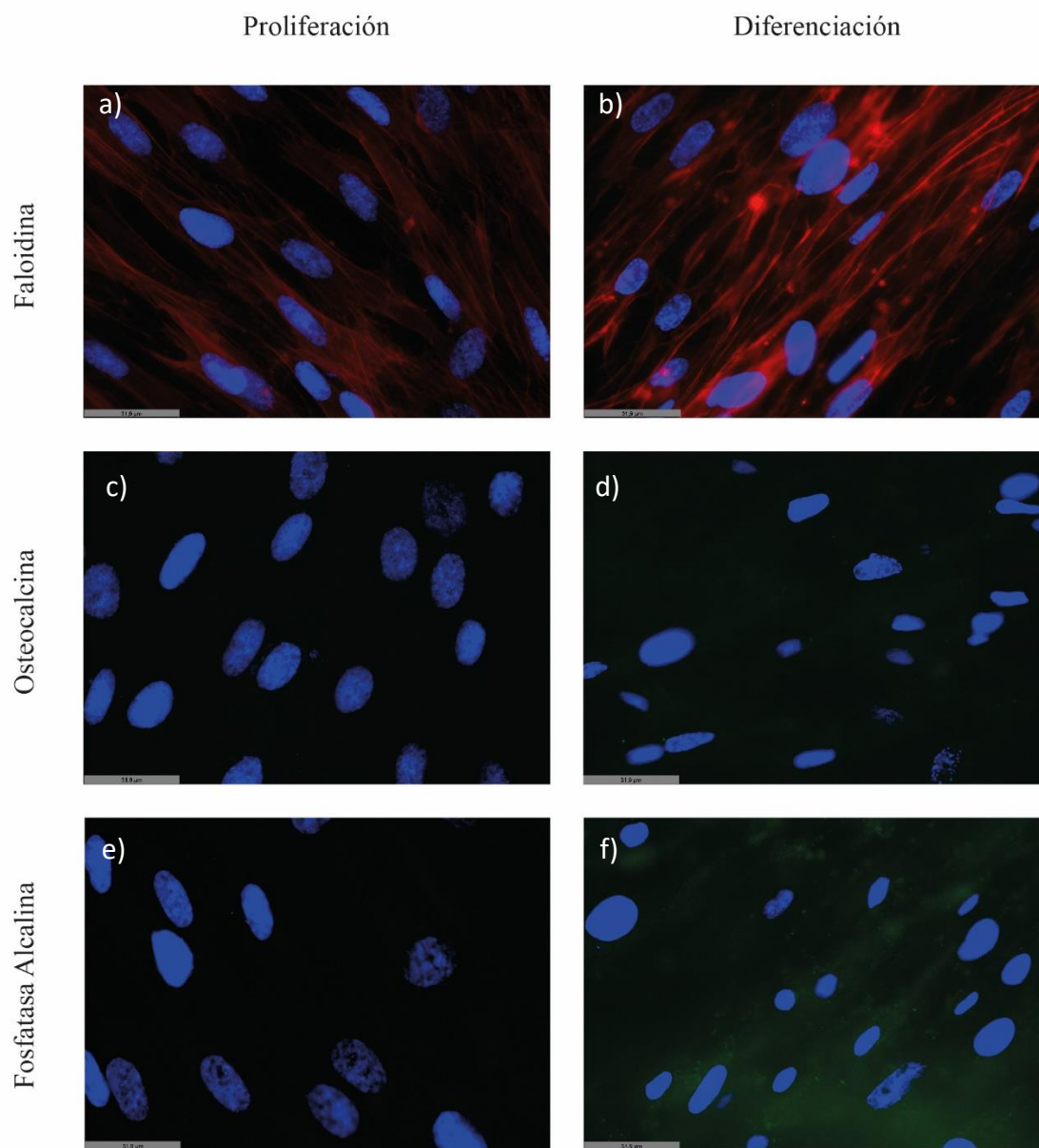


Figura 65. Línea celular hDPSC sembrada los pocillos control (sin discos) con diferente medio (proliferación en las imágenes de la derecha y diferenciación en las imágenes de la izquierda). Tinción con rodamina-faloidina e inmunofluorescencia de fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OC) en hADSC cultivadas en 2D durante 3 semanas con medio de proliferación y de diferenciación osteogénica complementada. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI y se observaron en azul, la distribución de los filamentos de actina en rojo y la presencia de ALP u OC en verde. Barra de escala = 31.8 μ m

En los pocillos control con el cultivo de las células MG-63 se observó expresión de OC tanto en el medio de proliferación (se trata de células de osteosarcoma) como en el medio de diferenciación (Figura 66, c), d), e) y f) respectivamente). En este último medio, la síntesis de osteocalcina y fosfatasa alcalina fue mayor tal y como puede apreciarse en las imágenes por la intensidad de la fluorescencia (Figura 66, d) y f) respectivamente).

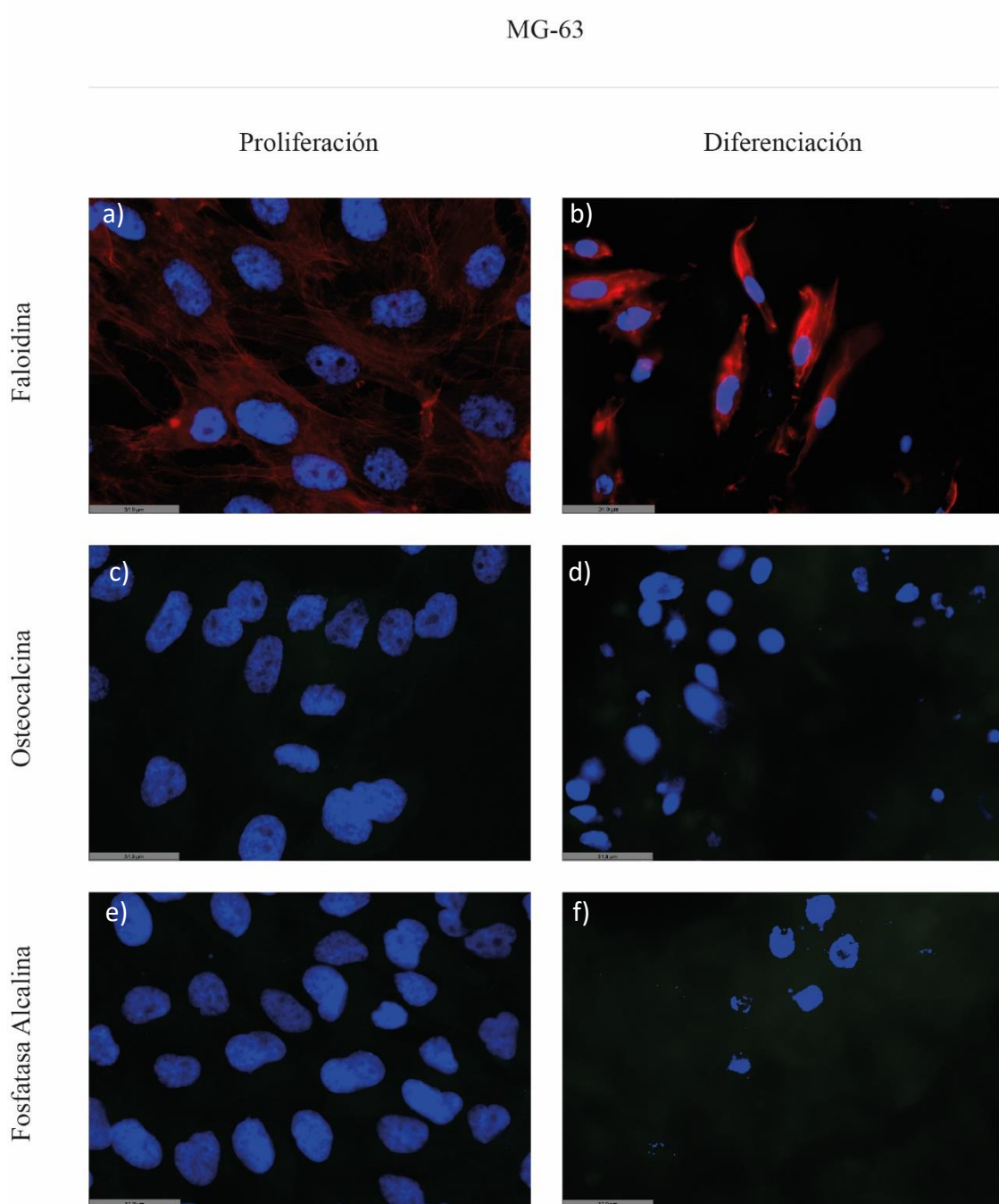


Figura 66. Línea celular MG-63 sembrada los pocillos control (sin discos) con diferente medio (proliferación en las imágenes de la derecha y diferenciación en las imágenes de la izquierda). Tinción con rodamina-faloïdina e inmunofluorescencia de fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OC) en hADSC cultivadas en 2D durante 3 semanas con medio de proliferación y de diferenciación osteogénica complementada. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI y se observaron en azul, la distribución de los filamentos de actina en rojo y la presencia de ALP u OC en verde. Barra de escala = 31.8 μm .

El comportamiento de estas líneas celulares sobre los discos de la aleación Ti-15Mo-5In fue el siguiente: La expresión del marcador de OC en hDPSC apareció en aquellos discos cuyas células habían sido cultivadas con medio de proliferación y de diferenciación (Figura 67, c) y d), respectivamente). De este modo, se confirmó la capacidad de las células hDPSC para diferenciarse en células óseas sobre discos metálicos de la aleación Ti-15Mo-5In. Este hecho resulta imprescindible y es de gran relevancia pues permite predecir el comportamiento de esta aleación en el caso de que fuera empleada como implante dental. Al posibilitar esta diferenciación, se puede intuir que la interacción futura del implante-hueso será óptima y el grado de infecciones se reducirá considerablemente. En el caso de ALP, no se han podido tomar imágenes en medio de diferenciación por complicaciones durante el proyecto, por lo que se desconoce su comportamiento (Figura 67, f) no se han podido sacar imágenes).

Cabe destacar que el hecho de que en el disco sembrado con células hDPSC en medio de proliferación aparezca un verde que signifique una cierta presencia de osteocalcina que no debería ocurrir ya que las células han crecido en medio de proliferación. Sin embargo, el titanio se considera un elemento osteoinductor que podría haber promovido la diferenciación osteogénica de las hDPSC simplemente debido al hecho de que éstas estaban creciendo sobre su superficie.

Por su parte, otro factor que también ayudó a confirmar esta diferenciación fue la morfología celular. Las células hDPSC en su medio de proliferación mostraron los filamentos de actina propios de las mismas. Sin embargo, estas mismas células cultivadas durante el ensayo con medio de diferenciación modificaron su morfología presentando unos filamentos con tamaño y forma distinta, más estrechos con respecto al medio de proliferación (Figura 67, a) y b) respectivamente).

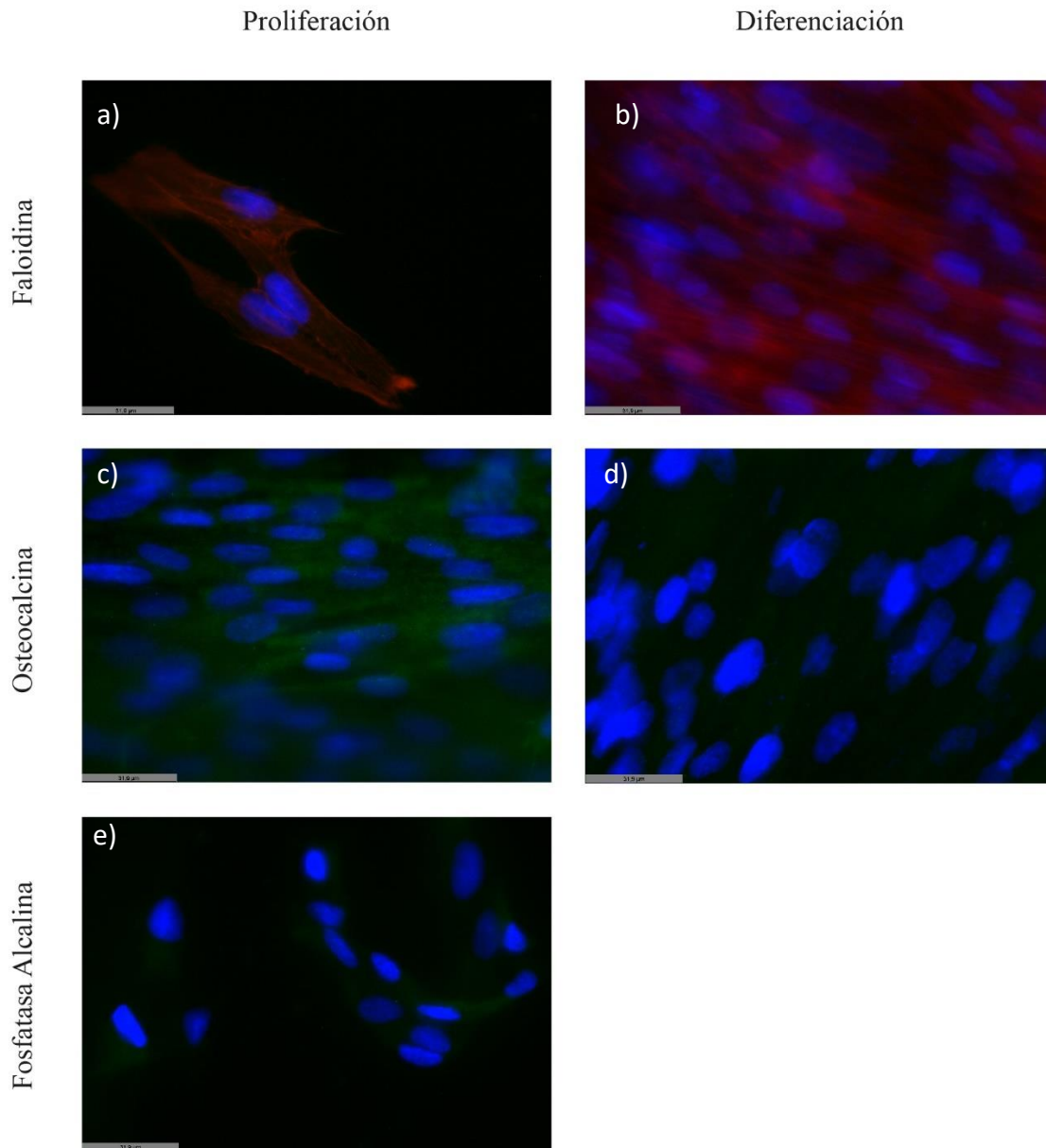


Figura 67. Línea celular hDPC sembrada en discos de la aleación Ti-15Mo-5In con diferente medio (proliferación en las imágenes de la derecha y diferenciación en las imágenes de la izquierda). Tinción con rodamina-faloidina e inmunofluorescencia de fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OC) en hADSC cultivadas en 2D durante 3 semanas con medio de proliferación y de diferenciación osteogénica complementada. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI y se observaron en azul, la distribución de los filamentos de actina en rojo y la presencia de ALP u OC en verde. Barra de escala = 31.8 μm

Cuando se cultivaron células MG-63 en los discos de la aleación Ti-15Mo-5In con medio de cultivo de proliferación, se mostró una expresión real de OC y una baja expresión de ALP en el citoplasma (Figura 68, c) y e), respectivamente). Además, se observó un leve aumento en la expresión de la proteína OC y ALP en células MG 63 cultivadas con el medio de diferenciación osteogénica (Figura 68, d) y f) respectivamente).

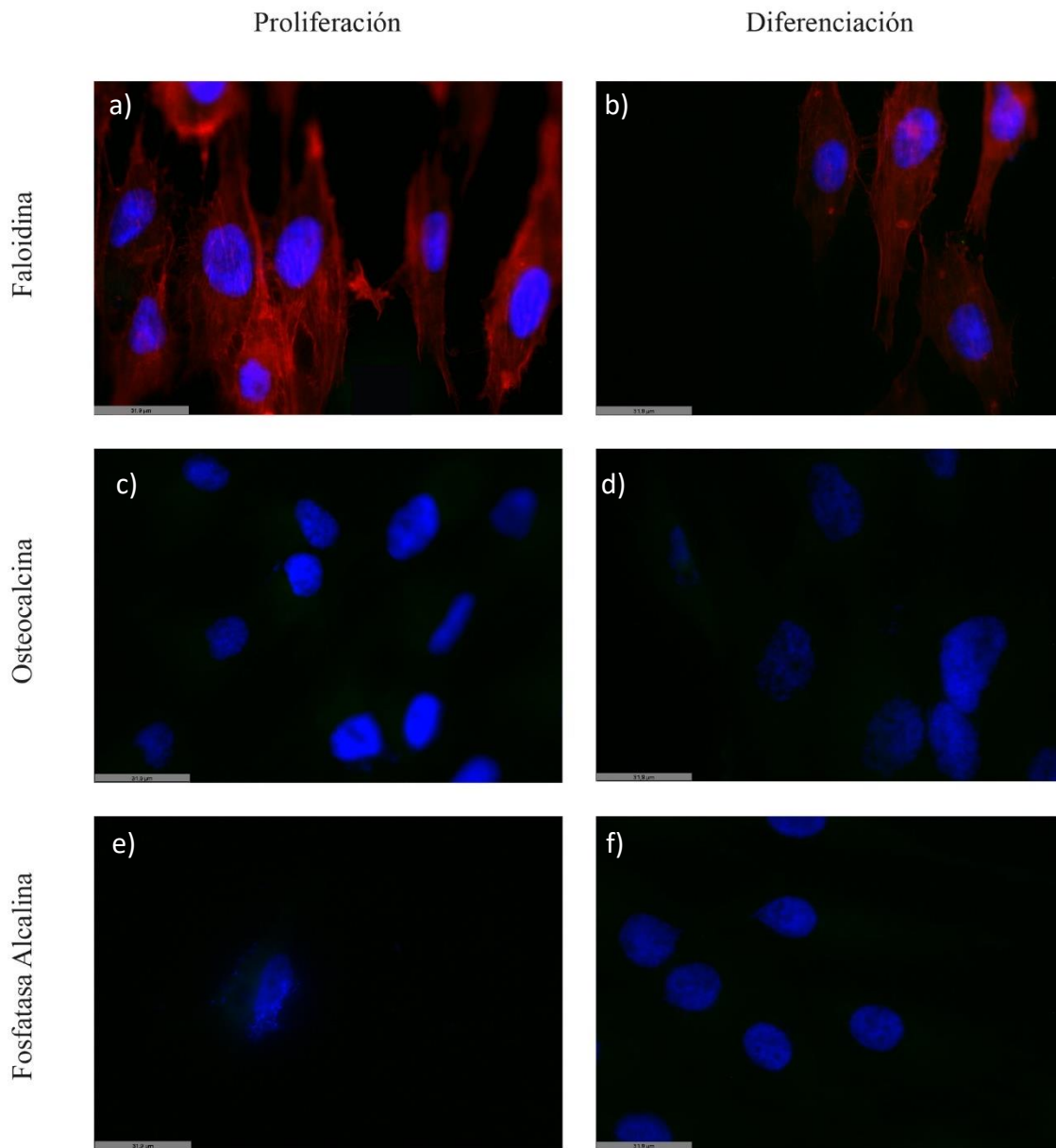


Figura 68. Línea celular MG-63 sembrada en discos de la aleación Ti-15Mo-5In con diferente medio (proliferación en las imágenes de la derecha y diferenciación en las imágenes de la izquierda). Tinción con rodamina-faloidina e inmunofluorescencia de fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OC) en hADSC cultivadas en 2D durante 3 semanas con medio de proliferación y de diferenciación osteogénica complementada. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI y se observaron en azul, la distribución de los filamentos de actina en rojo y la presencia de ALP u OC en verde. Barra de escala = 31.8 μm

Para el cultivo de hDPSCs en discos de la aleación Ti-35Nb-5In, los cambios en el citoesqueleto fueron difíciles de evaluar debido a la alta proliferación de estas células, por lo que fue difícil establecer diferencias entre los grupos experimentales.

La expresión de la proteína OC se vio expresada en los discos sembrados con medio de proliferación (Figura 69, c)). Es decir, se produce el mismo comportamiento que se veía en el caso de la aleación Ti-15Mo-5In, esto no debería ocurrir, pero puede ser debido a la osteoinducción que presenta el propio titanio. En cuanto a la proteína ALP, no se detectó su expresión en células cultivadas con medio de proliferación ni diferenciación (Figura 69, e) y f)).

hDSPC

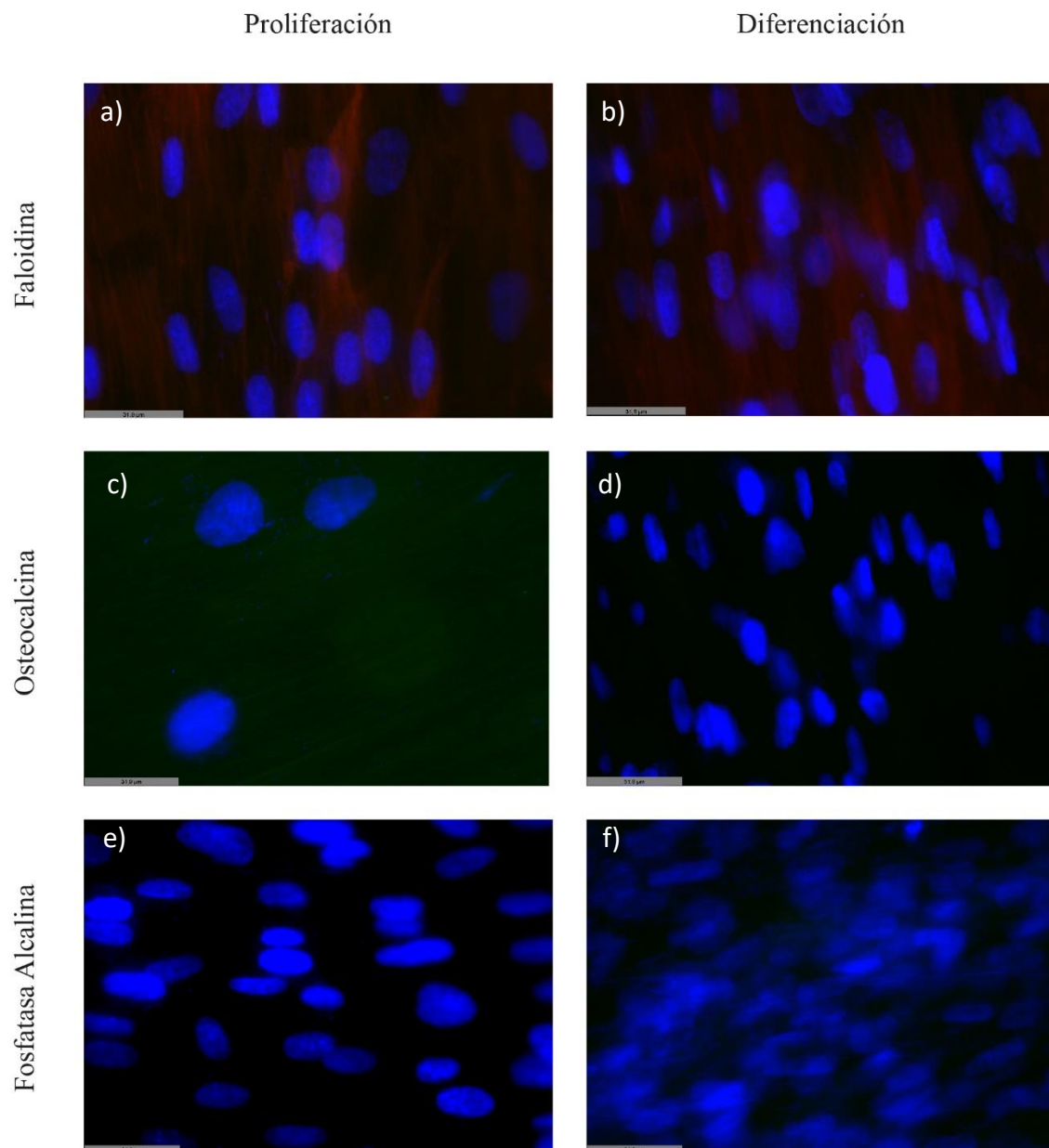


Figura 69. Línea celular hDPSC sembrada en discos de la aleación Ti-35Nb-5In con diferente medio (proliferación en las imágenes de la derecha y diferenciación en las imágenes de la izquierda). Tinción con rodamina-faloidina e inmunofluorescencia de fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OC) en hADSC cultivadas en 2D durante 3 semanas con medio de proliferación y de diferenciación osteogénica complementada. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI y se observaron en azul, la distribución de los filamentos de actina en rojo y la presencia de ALP u OC en verde. Barra de escala = 31.8 μ m

Cuando se cultivaron células MG 63 en discos de la aleación Ti-35Nb-5In con medio de cultivo de proliferación, se mostró una baja expresión de OC y ALP en el citoplasma (Figura 70, c) y e), respectivamente). Sin embargo, se observó un aumento significativo en la expresión de las proteínas ALP y OC en células MG 63 cultivadas con el medio de diferenciación osteogénica (Figura 70, d) y f), respectivamente).

MG-63

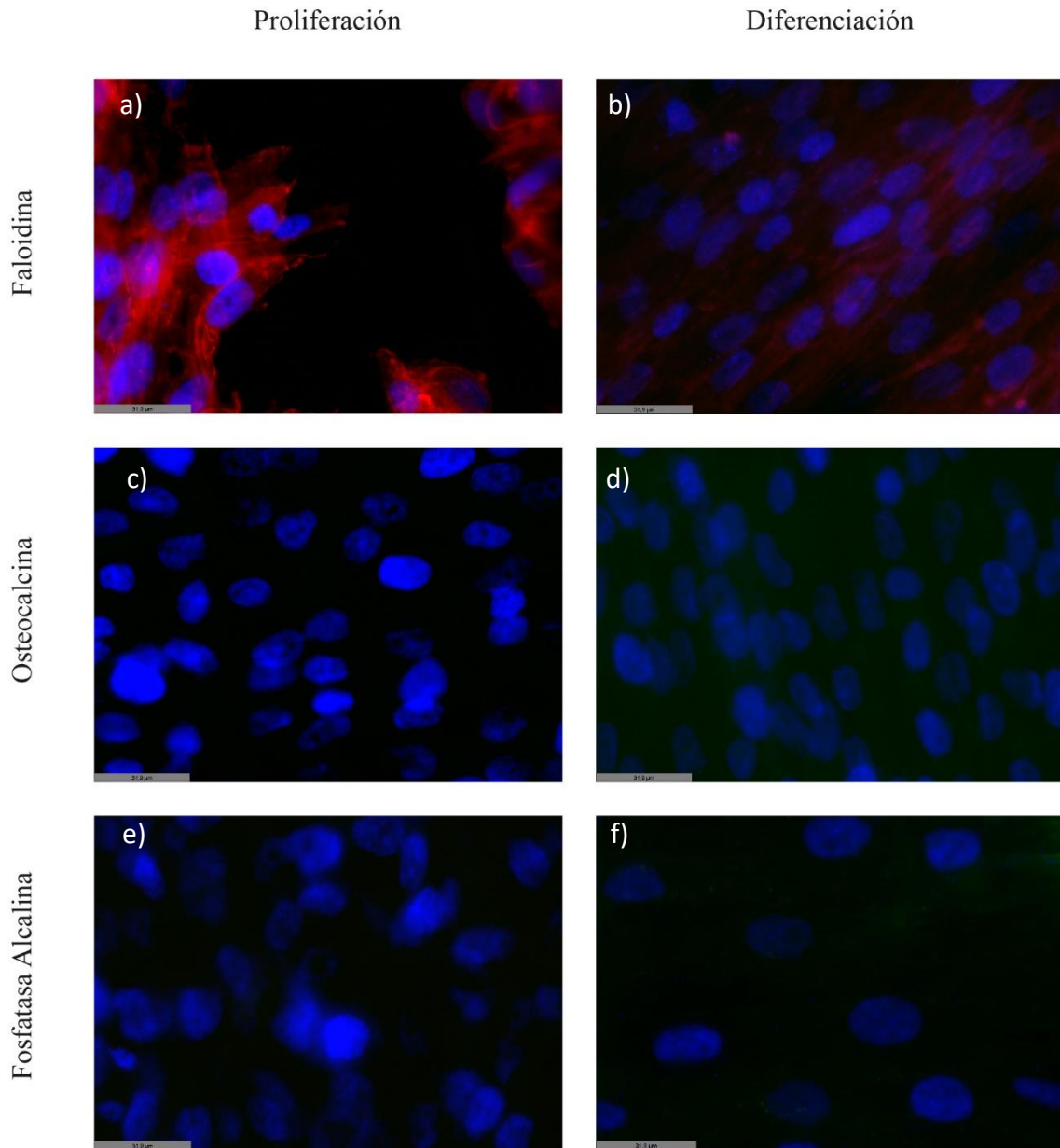


Figura 70. Línea celular MG-63 sembrada en discos de la aleación Ti-35Nb-5In con diferente medio (proliferación en las imágenes de la derecha y diferenciación en las imágenes de la izquierda). Tinción con rodamina-faloidina e inmunofluorescencia de fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OC) en hADSC cultivadas en 2D durante 3 semanas con medio de proliferación y de diferenciación osteogénica complementada. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI y se observaron en azul, la distribución de los filamentos de actina en rojo y la presencia de ALP u OC en verde. Barra de escala = 31.8 μm .

Visto los resultados se concluye que tanto las células hDPSC como las MG-63 proliferaron y se diferenciaron sin problema en los pocillos control. Se ha demostrado la diferenciación de las células hDPSC y las MG-63 en los discos de ambas aleaciones pues se puede ver la expresión de la proteína OC. Sin embargo, en el caso de la fosfatasa alcalina, apenas se ha visto su expresión en ninguna de las aleaciones. Este hecho puede ser debido a que el ensayo ha durado 3 semanas y no 4 semanas, por lo que puede que no le haya dado tiempo a expresarse todavía.

Además, el comportamiento de estas en los discos también fue el idóneo, pues se ha demostrado que las dos líneas celulares presentan buena adhesión y supervivencia en los discos de ambas aleaciones.

5. CONCLUSIONES

Se han obtenido las siguientes conclusiones en base a la metodología seguida y los resultados obtenidos tras la realización de este Trabajo Fin de Grado:

Se han generado las dos aleaciones ternarias Ti-15Mo-5In y Ti-35Nb-5In mediante pulvimetalurgia convencional. Las muestras han sido sometidas a diferentes ensayos para obtener sus características microestructurales, mecánicas, químicas y biológicas. De este modo, se consigue una comparación en cuanto al uso del molibdeno y el niobio.

En el proceso de obtención de las muestras, se han obtenido muestras relativamente homogéneas, a pesar de que en el caso del Molibdeno se han detectado algunas zonas donde este no ha podido solubilizar del todo bien con el resto de la aleación. Además, las muestras de Molibdeno han presentado una menor densidad, y con ello, mayor porosidad con respecto a las obtenidas con Niobio.

La caracterización microestructural de ambas aleaciones por pulvimetalurgia ha permitido definir que ambas se tratan de aleaciones $\alpha + \beta$, siendo mucho más predominante la fase beta en ambas. Mientras que, en la caracterización microestructural de ambas aleaciones obtenidas en este caso por colada, se ha permitido definir la fase beta como su fase mayoritaria tanto en Ti-15Mo-5In como en Ti-35Nb-5In. En consecuencia, se trata de aleaciones que tienen una estructura cúbica centrada en cuerpo que le otorga una mayor ductilidad en comparación con otras aleaciones empleadas actualmente en la industria dental. Además, en el análisis mecánico se ha visto que ambas aleaciones por PM presentan un módulo elástico mucho menor con respecto a otras aleaciones como el Ti-6Al-4V, acercándose al del hueso y disminuyendo el riesgo de fallo final del implante debido a un apantallamiento de tensiones inadecuado.

En cuanto a sus características químicas, se observa que tanto la tasa de liberación de iones como la resistencia a corrosión de ambas aleaciones pertenece a valores muy bajos por lo que se concluye que tanto Ti-15Mo-5In como Ti-35Nb-5In se tratan de aleaciones que tienen alta resistencia a la corrosión cuando se encuentran en un medio de saliva artificial Ringer-Hartmann modificada, situación similar a la que podría ser la cavidad bucal.

En los ensayos de citotoxicidad, se ha demostrado la no citotoxicidad de ambas aleaciones, nunca han mostrado ningún dato significativo frente al control y la viabilidad celular ha sido muy similar a éste. Por otro lado, se ha logrado con éxito la diferenciación osteogénica de las células hDPSC y MG-63 en discos de Ti-15Mo-5In y Ti-35Nb-5In obtenidos por PM con medios de diferenciación analizados respectivamente. También han demostrado una gran adhesión de las células sobre estos discos. El comportamiento de estas células en contacto con la aleación permite intuir cómo actuará la interfase hueso-implante, promoviendo la regeneración de la zona, aumentando el rango de éxito del implante y disminuyendo la prevalencia de la periimplantitis.

De este modo, se ha comprobado la biocompatibilidad que presentan las aleaciones Ti-15Mo-5In y Ti-35Nb-5In y los motivos por los cuales debería seguir siendo una opción a analizar para su empleo en el campo biomédico.

6. FUTUROS TRABAJOS

El estudio de una aleación deja numerosos campos en los que poder seguir trabajando. Algunos de los ensayos que se pueden llevar a cabo son los siguientes:

En primer lugar y puesto que en este Trabajo de Fin de Grado no se ha podido obtener el valor correcto de módulo de elasticidad de la aleación Ti-15Mo-5In con el equipo Sonelastic, sería interesante repetir este ensayo para obtener un resultado más fiable en el que poder basarse.

Por otra parte, surge la idea de ampliar el ensayo de citotoxicidad con los discos metálicos de las dos aleaciones en cuestión. De este modo, se incubarían los discos de Ti-15Mo-5In y Ti-35Nb-5In en contacto con las células al igual que se realizó en el ensayo de inmunofluorescencia explicado anteriormente, pero para el ensayo de citotoxicidad para poder obtener los grados de absorbancia de los pocillos.

En el caso del ensayo de inmunofluorescencia, al igual que este permite conocer de forma cualitativa la cantidad y morfología de las células presentes en las superficies estudiadas, se podría realizar el ensayo de CryoSEM ya que este permitirá además un análisis cuantitativo de esto obteniendo imágenes con una resolución fascinante.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Albright, J.A. and Skinner, H.C.W. (1987) Bone: structural organization and remodeling dynamics. Pp. 161–198 in: *The Scientific Basis of Orthopaedics*, 2nd edition (Albright, J.A. and Brand, R.A., editors). Appleton & Lange, Norwalk CT and Los Altos, CA, USA.
- Alrabeah, G. O., Brett, P., Knowles, J. C., & Petridis, H. (2017). The effect of metal ions released from different dental implant-abutment couples on osteoblast function and secretion of bone resorbing mediators. *Journal of dentistry*, 66, 91-101.
- Banerjee, D., & Williams, J. C. (2013). Perspectives on titanium science and technology. *Acta Materialia*, 61(3), 844-879.
- Brizuela, A., Herrero-Climent, M., Rios-Carrasco, E., Rios-Santos, J. V, Pérez, R. A., Manero, J. M., & Gil Mur, J. (2019). Influence of the Elastic Modulus on the Osseointegration of Dental Implants. *Materials*. <https://doi.org/10.3390/ma12060980>.
- Cano, J., Campo, J., Palacios, B., & Bascones, A. (2007). Mecanobiología de los huesos maxilares: I. Conceptos generales. *Avances en Odontostomatología*, 23(6), 347-358.
- García-Calderón, M., Cabezas Talavera, J., Gallego Romero, D., & Torres Lagares, D. (2004). Diagnóstico y tratamiento de las periimplantitis: Actualización en el diagnóstico clínico y en el tratamiento de las periimplantitis. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, 16(1), 9-18.
- Gaviria, L., Salcido, J. P., Guda, T., & Ong, J. L. (2014). Current trends in dental implants. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 40(2), 50-60.
- Hadjidakis, D. J., & Androulakis, I. I. (2006). Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1092(1), 385-396.
- Hernández-Gil, I. F. T., Gracia, M. A. A., Pingarrón, M. D. C., & Jerez, L. B. (2006). Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 11, 47-51.
- Hornez, J. C., Lefevre, A., Joly, D., & Hildebrand, H. F. (2002). Multiple parameter cytotoxicity index on dental alloys and pure metals. *Biomolecular engineering*, 19(2-6), 103-117.
- Khorasani, A. M., Goldberg, M., Doeven, E. H., & Littlefair, G. (2015). Titanium in Biomedical Applications — Properties and Fabrication: A Review, 5(8), 593–619. <https://doi.org/10.1166/jbt.2015.1361>.
- Kuroda, D., Niinomi, M., Morinaga, M., Kato, Y., & Yashiro, T. (1998). Design and mechanical properties of new β type titanium alloys for implant materials. *Materials Science and Engineering: A*, 243(1), 244–249. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0921-5093\(97\)00808-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0921-5093(97)00808-3).
- Lario Femenia, J., Amigó, A., Vicente-Escuder, A., Segovia, F., & Amigó-Borrás, V. (2016). Desarrollo de las aleaciones de titanio y tratamientos superficiales para incrementar la vida útil de los implantes. *Revista de Metalurgia*, 52, 84. <https://doi.org/10.3989/revmetalm.084>.
- Lavos-Valereto, Ivone & Deboni, Maria & Azambuja, Nilton & Marques, Marcia. (2002). Evaluation of the Titanium Ti-6Al-7Nb Alloy With and Without Plasma-Sprayed

- Hydroxyapatite Coating on Growth and Viability of Cultured Osteoblast-Like Cells. *Journal of periodontology*. 73. 900-5. 10.1902/jop.2002.73.8.900.
- Lee, B. H., Do Kim, Y., & Lee, K. H. (2003). XPS study of bioactive graded layer in Ti–In–Nb–Ta alloy prepared by alkali and heat treatments. *Biomaterials*, 24(13), 2257-2266.
- Leyens, C., & Peters, M. (2003). Titanium and Titanium Alloys. In *Structural Materials and Processes in Transportation*.
- Matsumoto, H., Watanabe, S., & Hanada, S. (2005). Beta TiNbSn alloys with low Young's modulus and high strength. *Materials Transactions*, 46(5), 1070-1078.
- Miura, K., Yamada, N., Hanada, S., Jung, T. K., & Itoi, E. (2011). The bone tissue compatibility of a new Ti–Nb–Sn alloy with a low Young's modulus. *Acta biomaterialia*, 7(5), 2320-2326.
- Miotto, L. N., Fais, L. M. G., Ribeiro, A. L. R., & Vaz, L. G. (2016). Surface properties of Ti-35Nb-7Zr-5Ta: Effects of long-term immersion in artificial saliva and fluoride solution. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 116(1), 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2015.10.024>.
- Mohan, P., Rajak, D. K., Pruncu, C. I., Behera, A., & Amigó-Borrás, V. (2021). Influence of β -phase stability in elemental blended Ti-Mo and Ti-Mo-Zr alloys. *Micron*, 142, 102992.
- Montes, J., Martínez, L., & Romero, J. del R. (2006). *Procesos industriales para materiales metálicos:(2a EDICIÓN)*
- Okazaki, Y., Rao, S., Tateishi, T., & Ito, Y. (1998). Cytocompatibility of various metal and development of new titanium alloys for medical implants. *Materials Science and Engineering: A*, 243(1-2), 250-256.
- Pérez Pevida, Esteban. Tesis doctoral: Análisis biomecánico de la influencia del material de fabricación de implantes dentales en la transferencia de carga al terreno de soporte (2017).
- Romero-Resendiz, L., Gómez-Sáez, P., Vicente-Escuder, A., & Amigó-Borrás, V. (2021). Development of Ti–In alloys by powder metallurgy for application as dental biomaterial. *Journal of Materials Research and Technology*, 11, 1719-1729.
- Segura Andrés G, Gil Pulido R, Vicente González F, Ferreiroa Navarro A, Faus López J, Agustín Panadero R. Periimplantitis y mucositis periimplantaria. Factores de riesgo, diagnóstico y tratamiento. *Av Periodon Implantol*. 2015; 27, 1: 25-36.
- STAEHLKE, Susanne; REBL, Henrike; NEBE, Barbara. Phenotypic stability of the human MG-63 osteoblastic cell line at different passages. *Cell biology international*, 2019, vol. 43, no 1, p. 22-32.
- T. Maity, Ö. Balçı, C. Gammer, E. Ivanov, J. Eckert, K.G. Prashanth, High pressure torsion induced lowering of Young's modulus in high strength TNZT alloy for bio-implant applications, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, Volume 108, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.103839>.
- Vanegas A., Juan & Landinez, Nancy & Garzón-Alvarado, Diego. (2009). Generalidades de la interfase hueso-implante dental. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 28. 130-146.
- Veiga, C., Davim, J. P., & Loureiro, A. J. R. (2012). PROPERTIES AND APPLICATIONS OF TITANIUM ALLOYS: A BRIEF REVIEW. In *Rev. Adv. Mater. Sci* (Vol. 32).

Yang, Y., Pullisaar, H., Landin, M. A., Heyward, C. A., Schröder, M., Geng, T., ... & Reseland, J. E. (2021). FNDC5/irisin is expressed and regulated differently in human periodontal ligament cells, dental pulp stem cells and osteoblasts. *Archives of Oral Biology*, *124*, 105061.

DOCUMENTO 2
PRESUPUESTO

Tabla 1. Cuadro de precios unitarios: mano de obra del personal.....	1
Tabla 2. Cuadro de precios unitarios de materiales, útiles y equipos del proyecto.....	1
Tabla 3. Cuadro precio unitario de maquinaria.....	3
Tabla 4. Cuadro de precios unitarios de servicios contratados para el proyecto.....	3
Tabla 5. Cuadro de precios unitarios de software empleado para el proyecto.....	3
Tabla 6. Cuadro descompuesto planificación del proyecto y revisión de literatura científica.....	4
Tabla 7. Cuadro precio descompuesto obtención de las aleaciones.....	4
Tabla 8. Cuadro precio descompuesto preparación metalográfica.....	6
Tabla 9. Cuadro precio descompuesto caracterización microestructural de las aleaciones.....	7
Tabla 10. Cuadro precio descompuesto caracterización mecánica de las aleaciones.....	8
Tabla 11. Cuadro precio descompuesto estudio químico de las aleaciones.....	9
Tabla 12. Cuadro de precios descompuestos del análisis biológico.....	10
Tabla 13. Cuadro de precios descompuestos del análisis de los resultados y redacción de la memoria.....	13
Tabla 14. Cuadro de presupuesto total de la realización del Trabajo de Fin de Grado.	14

1.1. Coste de personal

Tabla 1.1. Cuadro de precios unitarios: mano de obra del personal

CUADRO DE PRECIOS MANO DE OBRA UNITARIOS	
CONCEPTO	PRECIO UNITARIO (€/h)
Director del proyecto	25.00
Ingeniero Biomédico (Titulado en la escuela)	18.00
Técnico de laboratorio (Técnico)	12.00

1.2. Cuadro de materiales y equipo

Para realizar el cálculo las amortizaciones de los equipos y la maquinaria utilizada se utiliza la ecuación:

$$\text{factor de amortización} = \frac{\text{Precio de compra}}{\text{Horas de uso al año} \cdot \text{Años de vida útil}}$$

Tabla 2. Cuadro de precios unitarios de materiales, útiles y equipos del proyecto.

CUADRO DE PRECIOS MATERIALES UNITARIOS		
CONCEPTO	PRECIO UNITARIO (€/h)	UNIDADES
Polvos Titanio AEE	231.28	€/kg
Polvos Indio AEE	115.00	€/kg
Polvos de Molibdeno	9.82	€/kg
Polvos de Niobio	12.97	€/kg
Matriz flotante 30x12mm	0.48	€/h
Calibre RS Components	0.03	€/h
Balanza Kern modelo PFB 300	0.06	€/h
Balanza de precisión kern modelo 770	0.18	€/h
Montaje Arquímedes	0.10	€/h
Resina	37.45	€/kg
Resina conductora	45.71	€/kg
Lijas de SIC Struers	3.00	€/und
Paño MD Largo Struers	0.05	€/h
Paño MD Chem Struers	0.05	€/h
Suspensión de diamante de 9 µm	2666.67	€/L
Suspension de sílice coloidal	444.44	€/L
Electrodo Ag/AgCl AUTOLAB	0.19	€/h
Contraelectrodo de platino Radiometer Analytical	0.14	€/h
Termopar	0.09	€/h
Lámpara halógena	0.02	€/h
Disolución Acetona-Etanol	10.00	€/L
Laca de uñas	30.00	€/L
Saliva artificial Ringer-Hartmann modificada	6.00	€/L
Alfa MEM de Gibco	0.19	€/mL
Línea celular MG-63	319.50	€/via
MEM	0.09	€/mL
Antibióticos: Penicilina-Estreptomomicina (P/S)	0.13	€/mL

L-Glutamina	0.17	€/mL
Fungizona de Euroclon	1.08	€/mL
Aminoácidos esenciales (NEAA)	0.15	€/mL
Piruvato	0.13	€/mL
Suero fetal bobino (FBS)	0.31	€/mL
Tampón PBS	0.02	€/mL
Tripsina	0.17	€/mL
Frasco de cultivo T75 de Deltalab	1.51	€/u
Frasco de cultivo T25 de Deltalab	1.26	€/u
Trypan blue stain 0,4 %	0.32	€/mL
MTS de Promega	4.62	€/ensayo
Placa de 96 pocillos de Deltalab	1.88	€/u
Placa de 48 pocillos de Deltalab	1.28	€/u
Tubos de micra centrífuga de Eppendorf	0.16	€/u
Tubos de centrífuga de Eppendorf	0.13	€/u
Pipetas plásticas Pasteur de 3 mL de Deltalab	0.09	€/u
Pipetas de serología de 5 ml de Deltalab	0.16	€/u
Pipetas de serología de 10 ml de Deltalab	0.36	€/u
Micropipeta de 10 microlitros de Eppendorf	0.01	€/h
Micropipeta de 100 microlitros de Eppendorf	0.01	€/h
Micropipeta de 1000 microlitros de Eppendorf	0.01	€/h
Puntas de micropipeta de 10 microlitros de Eppendorf	0.30	€/u
Puntas de micropipeta de 100 microlitros de Eppendorf	0.30	€/u
Puntas de micropipeta de 1000 microlitros de Eppendorf	0.30	€/u
Cámara de cultivo Millicell EZ SLIDE Millipore de 8 pocillos	44.00	€/u
Ácido Ascórbico de Sigma Aldrich	0.95	€/g
Proteína morfogénica ósea 2 de Stemcells Technologies	649.00	€/g
Dexametasona de Merck	0.83	€/mg
Osteocalcina de R&D systems	2760.00	€/mg
Anti-ratón de R&D systems	354.00	€/mL
Rodamina-Faloidina de ThermoFisher	656.00	€/mL
Disolvente EnVision™ FLEX de Dako	2.40	€/mL
DAPI	7.91	€/mL
Fosfatasa alcalina	0.01	€/mL

1.3. Cuadro de maquinaria

Para realizar el cálculo las amortizaciones de los equipos y la maquinaria utilizada se utiliza la ecuación:

$$\text{factor de amortización} = \frac{\text{Precio de compra}}{\text{Horas de uso al año} \cdot \text{Años de vida útil}}$$

Tabla 3. Cuadro precio unitario de maquinaria.

CUADRO DE PRECIOS MAQUINARIA UNITARIOS		
CONCEPTO	PRECIO (€)	PRECIO UNITARIO (€/h)
Caja de guantes marca Jacomex	14000.00	0.14
Prensa hidráulica MEGA 30t	589.00	0.54
Horno tubular de alto vacío CARBOLITE HVT	66000.00	7.50
Equipo Sonelastic	5580.00	0.63
Máquina de ensayos universal Shimadzu Autograph AG-100 KN Xplus.	49980.00	5.68
Embutidora CitoPress	13280.00	1.51
Lijadora LaboPol 25	11500.00	1.31
Equipo de ultrasonidos Elmasonic modelo S30H	1825.00	0.21
Pulidora automática LaboPol 5 de Struers	18320.00	2.08
Potenciostato AUTOLAB	14980.00	1.70
Estufa modelo Selecta 2000207 (lib iones)	3200.00	0.16
Microscopio óptico modelo LV100 del fabricante	60000.00	5.77
Técnica de difracción retrodispersión electrónica (EBSD) Zeiss	325000.00	48.94
Equipo de difracción láser Mastersizer 2000 con accesorio Hydro 2000SM	38000.00	4.32
Equipo modelo D2 PHASER de Bruker	118000.00	13.41
Horno de arco eléctrico Compact Arc Melter MAM-1	40000.00	11.10
Microdurómetro HMV Shimadzu	24000.00	6.60
Máquina metalográfica de corte Struers	2900.00	2.11
Contador automático de células, Automatic Cell Counter EVE	2030.00	9.76
Incubadora Forma Scientific	21218.00	0.39
Espectrofotómetro SpectraMax Plus	3297.40	0.89
Ordenador portátil Lenovo	800.00	0.17
Microscopio de fluorescencia Leica DM4000B	2021.44	2.73
Cámara DFC 340 FX	1037.50	1.23

1.4. Cuadro de servicios contratados y de softwares empleados.

Tabla 4. Cuadro de precios unitarios de servicios contratados para el proyecto.

CONCEPTO	PRECIO UNITARIO (€/h)
Liberación de iones (ITQ)	110.00

Tabla 5. Cuadro de precios unitarios de software empleado para el proyecto.

CONCEPTO	PRECIO UNITARIO
Excel 2016 (v16.0)	Software libre
NOVA 2.1 de Metrohm AUTOLAB	Software libre
MAUD (Material Analysis Using Diffraction) 2.94	Software libre
Wolfram Mathematica 11.3	Software libre
Zview 3.4	Software libre
Leica Application Suite Advance Fluorescence	Software libre
GraphPad Prism 7.3.	Software libre

1.5. Presupuesto descompuesto

Tabla 6. Cuadro descompuesto planificación del proyecto y revisión de literatura científica.

1. PLANIFICACIÓN DEL PROYECTO Y REVISIÓN DE LA LITERATURA CIENTÍFICA					
APARTADO	CONCEPTO	PRECIO/UD (€/h)	CANTIDAD	UNIDAD	COSTE TOTAL (€)
1.1. Reunión para planificar el proyecto	<u>Personal</u>				
	Director del proyecto	25.00	4.00	h	100.00
	PRECIO APARTADO 1.1 =				100.00
1.2. Revisión de literatura científica	<u>Personal</u>				
	Ingeniero biomédico (Titulado en la escuela)	18.00	12.00	h	216.00
	PRECIO APARTADO 1.2 =				216.00
1.3. Selección de elementos aleantes y composiciones	<u>Personal</u>				
	Director del proyecto	25.00	3.00	h	75.00
	PRECIO APARTADO 1.3 =				75.00
TOTAL 1. =					391.00

Tabla 7. Cuadro precio descompuesto obtención de las aleaciones.

2. OBTENCIÓN DE LAS ALEACIONES					
APARTADO	CONCEPTO	PRECIO/UD (€/h)	CANTIDAD	UNIDAD	COSTE TOTAL (€)
2.1. Compactación y caracterización de las muestras	<u>Personal</u>				
	Técnico de laboratorio	12.00	8.00	h	96
	<u>Material consumible</u>				
	Molibdeno	9.82	13.58	g	133.35
	Niobio	12.97	34.84	g	451.87
	<u>Esquipo, software</u>				
	Matriz flotante	0.48	3.50	h	1.68
	Balanza Kern Modelo PFB 300	0.06	0.50	h	0.03
	Calibre RS Components	0.03	0.50	h	0.02
	<u>Maquinaria</u>				
	Prensa hidráulica MEGA 30t	0.54	3.50	h	1.89
PRECIO APARTADO 2.1. =					684.84

2.2 Sinterización de los compactos	<u>Personal</u>	Técnico de laboratorio	12.00	0.15	h	1.80
	<u>Material consumible</u>	Horno tubular de alto vacío CARBOLITE HVT	7.50	7.00	h	52.50
	PRECIO APARTADO 2.2 . =					54.30
2.3. Caracterización de las piezas sinterizadas	<u>Personal</u>	Técnico de laboratorio	12.00	2.00	h	24.00
	<u>Esquipo, software</u>	Balanza de precisión Kern Modelo 770	0.18	1.50	h	0.27
		Montaje Arquímedes	0.10	0.75	h	0.08
	PRECIO APARTADO 2.3. =					24.35
2.4. Colada de las aleaciones	<u>Personal</u>	Técnico de laboratorio	12.00	3.00	h	36.00
	<u>Maquinaria</u>	Horno de arco eléctrico Compact Arc Melter MAM-1	11.10	3.00	h	33.30
	PRECIO APARTADO 2.4. =					69.30
TOTAL 2. =					832.78	

Tabla 8. Cuadro precio descompuesto preparación metalográfica.

3. PREPARACIÓN METALOGRÁFICA					
APARTADO	CONCEPTO	PRECIO/UD (€/u)	CANTIDAD	UNIDAD	COSTE TOTAL (€)
3.1. Embutición en resina	<u>Personal</u>				
	Técnico de laboratorio	12.00	5.00	h	60.00
	<u>Material consumible</u>				
	Resina	37.45	150.00	g	5617.50
	Resina Conductora	45.71	30.00	g	1371.30
<u>Maquinaria</u>					
Embutidora CitoPress	1.51	5.00	h	7.55	
PRECIO APARTADO 3.1. =					7056.35
3.2. Debaste en tres fases	<u>Personal</u>				
	Técnico de laboratorio	12.00	7.00	h	84.00
	<u>Material consumible</u>				
	Lijas de SIC Struers	3.00	6.00	u	18.00
	<u>Maquinaria</u>				
Lijadora LaboPol 25	1.31	6.00	h	7.86	
Equipo de ultrasonidos Elmasonic modelo S30H	0.21	1.00	h	0.21	
PRECIO APARTADO 3.2. =					110.07
3.3. Serie de pulidos	<u>Personal</u>				
	Técnico de laboratorio	12.00	5.50	h	66.00
	<u>Material consumible</u>				
Suspensión de diamante de 9 µm	2666.67	50.00	mL	133.33	
Suspensión de sílice coloidal	444.44	100.00	mL	44.44	

	<u>Esquipo, software</u>					
	Paño MD Largo	0.05	1.00		h	0.05
	Struers					
	Paño MD Chem	0.05	1.00		h	0.05
	Struers					
	<u>Maquinaria</u>					
Pulidora automática	2.08	3.00		h	6.24	
LaboPol 5 de Struers						
Equipo de ultrasonidos Elmasonicmodel S30H	0.21	0.50		h	0.11	
PRECIO APARTADO 3.3. =						250.22
TOTAL 3. =						7416.64

Tabla 9. Cuadro precio descompuesto caracterización microestructural de las aleaciones.

4. CARACTERIZACIÓN MICROESTRUCTURAL DE LAS ALEACIONES						
APARTADO	CONCEPTO	PRECIO/UD (€/u)	CANTIDAD	UNIDAD	COSTE TOTAL (€)	
4.1. Análisis superficial mediante microscopía óptica	<u>Personal</u>					
	Técnico de laboratorio	12.00	2.00		h	24.00
	<u>Maquinaria</u>					
	Microscopio óptico modelo LV100 del fabricante NIKON	5.77	2.00		h	11.54
PRECIO APARTADO 4.1. =						35.54
4.2. Estudio microestructural mediante EBSD	<u>Personal</u>					
	Técnico de laboratorio	12.00	6.00		h	72.00
	<u>Maquinaria</u>					
	Técnica de difracción retrodispersión electrónica Zeiss	48.94	6.00		h	293.64
PRECIO APARTADO 4.2. =						365.64

4.3. Estudio de fases mediante difracción de rayos X	<u>Personal</u>	Técnico de laboratorio	12.00	1.00	h	12.00
	<u>Maquinaria</u>	Pulidora automática LaboPol 5 de Struers	13.41	1.00	h	13.41
	PRECIO APARTADO 4.3. =					25.41
TOTAL 4. =					426.59	

Tabla 10. Cuadro precio descompuesto caracterización mecánica de las aleaciones.

5. CARACTERIZACIÓN MECÁNICA DE LAS ALEACIONES						
APARTADO	CONCEPTO	PRECIO/UD (€/u)	CANTIDAD	UNIDAD	COSTE TOTAL (€)	
5.1. Obntención del módulo elástico	<u>Personal</u>	Técnico de laboratorio	12.00	4.00	h	48.00
	<u>Maquinaria</u>	Equipo Sonelastic	0.63	4.00	h	2.52
	PRECIO APARTADO 5.1. =					50.52
5.2. Ensayo de flexión a cuatro puntos	<u>Personal</u>	Técnico de laboratorio	12.00	3.50	h	42.00
	<u>Maquinaria</u>	Máquina de ensayos universal Shimadzu Autograph AG-100 KN Xplus.	5.68	3.50	h	19.88
	PRECIO APARTADO 5.2. =					61.88
5.3. Ensayo de dureza	<u>Personal</u>	Técnico de laboratorio	12.00	1.00	h	12.00
	<u>Maquinaria</u>	Microdurómetro modelo HMV Shimadzu	6.60	1.00		6.60
	PRECIO APARTADO 5.3. =					18.60
TOTAL 5. =					131.00	

Tabla 11. Cuadro precio descompuesto estudio químico de las aleaciones.

6. ESTUDIO QUÍMICO DE LAS ALEACIONES						
APARTADO	CONCEPTO	PRECIO/U D (€/u)	CANTIDA D	UNIDA D	COSTE TOTAL (€)	
6.1. Estudio de liberación de iones de las aleaciones	<u>Personal</u>					
	Técnico de laboratorio	12.00	3.50	h	42.00	
	<u>Material consumible</u>					
	Saliva artificial Ringer-Hartmann modificada	6.00	0.50	L	3.00	
	Laca de uñas	30.00	0.01	L	0.15	
	<u>Esquipo, software</u>					
	Calibre RS Components	0.03	0.50	h	0.02	
	Balanza Kern modelo PFB 300	0.06	1.00	h	0.06	
	<u>Maquinaria</u>					
	Estufa modelo Selecta 2000207	0.16	839.38	h	134.30	
	Equipo ICP-OES Varian-715ES					
	Microscopio óptico modelo LV100 del fabricante NIKON	5.77	2.00	h	11.54	
	PRECIO APARTADO 6.1. =					191.07
	6.2. Estudio resistencia a la corrosión de las aleaciones	<u>Personal</u>				
Técnico de laboratorio		12.00	21.25	h	255.00	
<u>Material consumible</u>						
Electrolito Saliva artificial Ringer-Hartmann modificada		6.00	0.50	L	3.00	
<u>Esquipo, software</u>						
Electrodo Ag/AgCl AUTOLAB		0.19	20.00	h	3.80	
Contraelectrodo de platino Radiometer Analytical		0.14	20.00	h	2.80	
Potenciostato AUTOLAB		1.70	20.00	h	34.00	
Termopar		0.09	20.00	h	1.80	
Lámpara halógena		0.02	20.00	h	0.40	
<u>Maquinaria</u>						
Equipo de ultrasonidos Elmasonic modelo S30H	0.20	1.25	h	0.25		

	<u>Servicios</u>				
	Liberación de iones (ITQ)	110.00	12.00	h	1320.00
	PRECIO APARTADO 6.2 . =				1621.05
	TOTAL 6. =				1812.12

Tabla 12. Cuadro de precios descompuestos del análisis biológico.

7. ESTUDIO BIOLÓGICO DE LAS ALEACIONES					
APARTADO	CONCEPTO	PRECIO/UD (€/u)	CANTIDAD	UNIDAD	COSTE TOTAL (€)
7.1. Ensayo de citotoxicidad y ensayo de inmunofluorescencia	<u>Personal</u>				
	Ingeniero biomédico (Titulado en la escuela)	18.00	230.00	h	4140.00
	<u>Material consumible</u>				
	Alfa MEM de Gibco	0.19	600.00	mL	114.00
	Línea celular MG-63	319.50	6.00	vial	1917.00
	MEM	0.09	6.00	mL	0.54
	Antibióticos: Penicilina-Estreptomicina (P/S)	0.13	6.00	mL	0.78
	L-Glutamina	0.17	6.00	mL	1.02
	Fungizona de Euroclon	1.08	6.00	mL	6.48
	Aminoácidos esenciales (NEAA)	0.15	6.00	mL	0.90
	Piruvato	0.13	6.00	mL	0.78
	Suero fetal bobino (FBS)	0.31	60.00	mL	18.60
	Tampón PBS	0.02	300.00	mL	6.00
	Tripsina	0.17	48.00	mL	8.16
	Frasco de cultivo T75 de Deltalab	1.51	15.00	u	22.65
	Frasco de cultivo T25 de Deltalab	1.26	5.00	u	6.30
	Trypan blue stain 0,4 %	0.32	5.00	mL	1.60
	MTS de Promega	4.62	4.00	ensayo	18.48

Placa de 96 pocillos de Deltalab	1.88	2.00	u	3.76
Placa de 48 pocillos de Deltalab	1.28	2.00	u	2.56
Placa de 24 pocillos de Deltalab	0.88	1.00	u	0.88
Tubos de micra centrífuga de Eppendorf	0.16	60.00	u	9.60
Tubos de centrífuga de Eppendorf	0.13	60.00	u	7.80
Pipetas plásticas Pasteur de 3 mL de Deltalab	0.09	10.00	u	0.90
Pipetas de serología de 5 ml de Deltalab	0.16	10.00	u	1.60
Pipetas de serología de 10 ml de Deltalab	0.36	50.00	u	18.00
Micropipeta de 10 microlitros de Eppendorf	0.01	50.00	h	0.50
Micropipeta de 100 microlitros de Eppendorf	0.01	100.00	h	1.00
Micropipeta de 1000 microlitros de Eppendorf	0.01	150.00	h	1.50
Puntas de micropipeta de 10 microlitros de Eppendorf	0.30	100.00	u	30.00
Puntas de micropipeta de 100 microlitros de Eppendorf	0.30	200.00	u	60.00
Puntas de micropipeta de 1000 microlitros de Eppendorf	0.30	300.00	u	90.00
Cámara de cultivo Millicell EZ SLIDE Millipore de 8 pocillos	44.00	2.00	u	88.00
Cámara de cultivo Millicell EZ SLIDE Millipore de 4 pocillos	22.00	2.00	u	44.00
Ácido Ascórbico de Sigma Aldrich	0.95	4.00	g	3.80
Proteína mrofogénica ósea 2 de Stemcells Technologies	649.00	2.50	g	1622.50

Dexametasona de Merck	0.83	1.00	mg	0.83
Osteocalcina de R&D systems	2760.00	0.02	mg	55.20
Anti-ratón de R&D systems	354.00	0.04	mL	14.16
Rodamina-Faloidina de ThermoFisher	656.00	0.02	mL	13.12
Disolvente EnVision™ FLEX de Dako	2.40	48.00	mL	115.20
DAPI	7.91	0.01	mL	0.08
Fosfatasa alcalina	42.49	0.01	mL	0.42
<u>Esquipo, software</u>				
Leica Application Suite Advance Fluorescence	Software libre	48.00	h	0.00
GraphPad Prism 7.3.	Software libre	6.00	h	0.00
<u>Maquinaria</u>				
Espectrofotómetro SpectraMax Plus	0.89	8.00	h	7.12
Microscopio de fluorescencia Leica DM4000B	2.73	48.00	h	131.04
Cámara DFC 340 FX	1.23	48.00	h	59.04
PRECIO APARTADO 7.1. =				8645.90
TOTAL 7. =				8645.90

Tabla 13. Cuadro de precios descompuestos del análisis de los resultados y redacción de la memoria.

8. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS Y REDACCIÓN DE LA MEMORIA					
APARTADO	CONCEPTO	PRECIO/UD (€/u)	CANTIDAD	UNIDAD	COSTE TOTAL (€)
8.1. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	<u>Personal</u>				
	Ingeniero Biomédico (Titulado en la Escuela)	18.00	20.00	h	360.00
	Director del proyecto	25.00	20.00	h	500.00
	PRECIO APARTADO 8.1. =				860.00
8.2 REDACCIÓN DE LA MEMORIA	<u>Personal</u>				
	Ingeniero Biomédico (Titulado en la Escuela)	18.00	50.00	h	900.00
	Director del proyecto	25.00	4.00	h	100.00
	PRECIO APARTADO 8.2. =				1000.00
TOTAL 8. =					1860.00

1.6. Presupuesto de ejecución material y ejecución por contrata

En la tabla se muestra el presupuesto de ejecución material, que es la suma de todos los costes totales por apartado, y el presupuesto de ejecución por contrata. Se obtiene un presupuesto incrementado añadiéndole al presupuesto de ejecución material un 13% de gastos generales y un 6% de beneficio industrial, a este se le añade el impuesto general del 21% (IVA) para obtener el presupuesto de ejecución por contrata.

Tabla 14. Cuadro de presupuesto total de la realización del Trabajo de Fin de Grado.

CONCEPTO	COSTE TOTAL (€)
1. PLANIFICACIÓN DEL PROYECTO Y REVISIÓN DE LA LITERATURA CIENTÍFICA	391.00
2. OBTENCIÓN DE LAS ALEACIONES	832.78
3. PREPARACIÓN METALGRÁFICA	7416.64
4. CARACTERIZACIÓN MICROESTRUCTURAL DE LAS ALEACIONES	426.59
5. CARACTERIZACIÓN MECÁNICA DE LAS ALEACIONES	131.00
6. ESTUDIO QUÍMICO DE LAS ALEACIONES	1812.11
7. ESTUDIO BIOLÓGICO DE LAS ALEACIONES	8645.90
8. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS Y REDACCIÓN DE LA MEMORIA	1860.00
PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN MATERIAL	21125.02
Gastos generales (13%)	2746.25
Beneficio industria (6%)	1267.50
Suma	25138.77
IVA (21%)	5279.14
TOTAL PRESUPUESTO EJECUCIÓN POR CONTRATO (€)	30417.92

El presupuesto de ejecución por contrata asciende a la cantidad de **treinta mil cuatrocientos diecisiete con noventa y dos euros**.

