



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIERÍA
INDUSTRIAL VALENCIA

TRABAJO FIN DE MASTER EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

AUTOR: ADRIÁN ÁLVAREZ CASTAÑO
TUTOR: VICENTE AMIGÓ BORRÁS
COTUTOR: JAVIER PEMÁN GARCÍA
COTUTOR: EMILIO FRANCISCO SEGOVIA LÓPEZ

Curso Académico: 2019-2020

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quería agradecer a mi tutor Vicente el haberme aceptado un año más como alumno, y especialmente el esfuerzo que ha hecho durante este fatídico 2020 para que haya podido ejecutar la parte experimental de este proyecto. Quiero también darle las gracias por el inmejorable ambiente laboral y el trato personal que ha tenido conmigo durante estos últimos dos años, y puedo confirmar que se esfuerza por mantener con todas las personas que trabajan con él.

También quiero agradecer al personal de investigación del ITM, especialmente a Montse y Mariana, el haberme hecho sentir tan cómodo trabajando y la ayuda desinteresada que me han prestado.

Igualmente, merece una mención el equipo de investigación de infecciones graves del Instituto de Investigación Sanitaria de la Fe, liderado por Javier Pemán y M^a Ángeles Tormo, por el enorme esfuerzo que ha supuesto el permitirme acceder a las instalaciones y hacer este trabajo con ellos.

A Patricia, por toda la paciencia que ha tenido conmigo a la hora de realizar los ensayos con bacterias, por todos los conocimientos que me ha transmitido sobre microbiología y por la amabilidad con la que me ha tratado durante mi breve estancia en la Fe.

RESUMEN

Las infecciones periprotéticas (IPP) son causadas por microorganismos que colonizan prótesis, siendo los principales causantes el *S.epidermidis* y *S.aureus*. En la literatura científica se ha abordado la interacción bacteria-sustrato en superficies funcionalizadas de Ti6Al4V, sin estudiar la influencia de su microestructura, la cual depende del método de fabricación empleado (fabricación aditiva) o tratamiento aplicado (forjado). El objetivo de este estudio es desarrollar aleaciones de Ti6Al4V mediante forja, EBM y DMLS y comprobar el efecto que tiene la microestructura de cada una de ellas en la adhesión y colonización de bacterias (*S.epidermidis* y *S.aureus*). Para ello se caracterizaron microestructural, mecánica y biológicamente muestras de Ti6Al4V de forja, EBM y DMLS mediante: difracción de Rayos X, microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido, perfilometría óptica, ensayo de dureza y microdureza, ensayo de cultivo bacteriano y microscopía confocal de fluorescencia. Los resultados muestran un patrón de XRD similar entre muestras, con mayor presencia de $Ti\alpha$ en las de fabricación aditiva. La microestructura característica en las muestras de forjado fue de mill annealing, en EBM y una de DMLS sometida a recocido fue de Windmastätten mientras que en la otra de DMLS fue martensítica con acículas de $Ti\alpha'$. La rugosidad fue similar entre todas las muestras ($>0,5 \mu\text{m}$). La microdureza fue semejante entre muestras, mientras que en la dureza la muestra DMLS recocida presentó el menor valor. Debido a la elevada dispersión no se pudieron obtener datos concluyentes del ensayo de cultivo, pero las muestras de fabricación aditiva presentaron una tendencia a mayor colonización, especialmente las de DMLS (entre 134-155% más de UFC/cm²ml para *S.aureus*, y 80-119% para *S.epidermidis* en la dilución 10^{-3} vs. forjado). En la microscopía confocal destaca la ausencia de muerte bacteriana después de 48h de cultivo y la mayor colonización de las muestras de fabricación aditiva, al igual que en el FESEM.

Palabras clave: titanio, Ti6Al4V, biomateriales, microestructura, fabricación aditiva, DMLS, EBM, forja, microbiología, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, colonización bacteriana, biofilm

RESUM

Les infeccions periprostètiques (IPP) són causades per microorganismes que colonitzen pròtesis, sent els principals causants el *S.epidermidis* i *S.aureus*. En la literatura científica s'ha abordat la interacció bacteri-substrat en superfícies funcionalitzades de Ti6Al4V, sense estudiar la influència de la seua microestructura, la qual depén del mètode de fabricació emprat (fabricació additiva) o tractament aplicat (forjat). L'objectiu d'aquest estudi és desenvolupar aliatges de Ti6Al4V mitjançant forja, EBM i DMLS i comprovar l'efecte que té la microestructura de cadascuna d'elles en l'adhesió i colonització de bacteris (*S.epidermidis* i *S.aureus*). Per a això es van caracteritzar microestructural, mecànica i biològicament mostres de Ti6Al4V de forja, EBM i DMLS mitjançant: difracció de Raigs X, microscòpia òptica, microscòpia electrònica d'escombratge, perfilometria òptica, assaig de duresa i microduresa, assaig de cultiu bacterià i microscòpia confocal de fluorescència. Els resultats mostren un patró de XRD similar entre mostres, amb major presència de $Ti\alpha$ en les de fabricació additiva. La microestructura característica en les mostres de forjat va ser de mill annealing, en EBM i una de DMLS sotmesa a recuita va ser de Windmastätten mentre que en l'altra de DMLS va ser martensítica amb acícules de $Ti\alpha'$. La rugositat va ser similar entre totes les mostres ($>0,5 \mu m$). La microduresa va ser semblant entre mostres, mentre que en la duresa la mostra DMLS recuita va presentar el menor valor. A causa de l'elevada dispersió no es van poder obtindre dades concloents de l'assaig de cultiu, però les mostres de fabricació additiva van presentar una tendència a major colonització, especialment les de DMLS (entre 134-155% més de UFC/cm²ml per a *S.aureus*, i 80-119% per a *S.epidermidis* en la dilució 10⁻³ vs. forjat). En la microscòpia confocal destaca l'absència de mort bacteriana després de 48h de cultiu i la major colonització de les mostres de fabricació additiva, igual que en el FESEM.

Paraules clau: titani, Ti6Al4V, biomaterials, microestructura, fabricació additiva, DMLS, EBM, forjat, microbiologia, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, colonització bacteriana, biofilm

ABSTRACT

The periprostheses infections (PPI) are caused by microorganisms that colonize prosthesis, being the main causes the *S.epidermidis* and *S.aureus*. Scientific literature has addressed the interaction between bacteria and substrate in functionalized surfaces of Ti6Al4V, without studying the influence of its microstructure, which depends on the manufacturing method used (additive manufacturing) or treatment applied (forging). The aim of this study is to develop Ti6Al4V alloys by means of forging, EBM and DMLS and to check the effect of the microstructure of each one of them has on the adhesion and colonization of bacteria (*S.epidermidis* and *S.aureus*). For this purpose, microstructural, mechanical and biological samples of Ti6Al4V from forging, EBM and DMLS were characterized by means of: X-ray diffraction, optical microscopy, scanning electron microscopy, optical profilometry, hardness and microhardness test, bacterial culture test and fluorescence confocal microscopy. The results show a similar XRD pattern among samples, with a higher presence of $Ti\alpha$ in the additive manufacturing ones. The characteristic microstructure in the forging samples was of mill annealing, in EBM and one of DMLS submitted to annealing was of Windmastätten while in the other of DMLS it was martensitic with $Ti\alpha'$ needles. The roughness was similar among all samples ($>0.5 \mu\text{m}$). The microhardness was similar among samples, while in hardness the annealed DMLS sample presented the lowest value. Due to the high dispersion, it was not possible to obtain conclusive data from the culture test, but the samples of additive manufacture showed a tendency to higher colonization, especially those of DMLS (between 134-155% more CFU/cm²ml for *S.aureus*, and 80-119% for *S.epidermidis* in the 10^{-3} vs. forged dilution). In confocal microscopy, the absence of bacterial death after 48h of culture and the greater colonization of the samples of additive manufacture stand out, as in the FESEM.

Keywords: titanium, Ti6Al4V, biomaterials, microstructure, additive manufacturing, DMLS, EBM, forging, microbiology, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, bacterial colonization, biofilm

ÍNDICE DE LA MEMORIA

1.	Introducción	9
1.1.	Objetivos	20
2.	Planificación	21
2.1.	Elaboración de las muestras.....	21
2.2.	Preparación de las probetas.....	22
2.3.	Análisis microestructural y topográfico	23
2.3.1.	Difracción de Rayos X (XRD)	23
2.3.2.	Microscopía Óptica (MO)	24
2.3.3.	Perfilometría óptica.....	25
2.4.	Caracterización mecánica.....	25
2.4.1.	Ensayo de dureza.....	25
2.4.2.	Ensayo de microdureza (Voort, 2000).....	27
2.5.	Caracterización microbiológica	28
2.5.1.	Ensayo de colonización.....	28
2.5.2.	Microscopía confocal de fluorescencia	32
2.5.3.	Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM).....	33
3.	Material y métodos	35
3.1.	Preparación de las probetas.....	35
3.2.	Caracterización microestructural y topográfica	37
3.2.1.	Difracción de Rayos X (XRD)	37
3.2.2.	Microscopía óptica (MO).....	37
3.2.3.	Perfilometría óptica.....	37
3.3.	Caracterización mecánica.....	38
3.3.1.	Ensayo de dureza Vickers	38
3.3.2.	Ensayo de microdureza Vickers.....	38
3.4.	Caracterización microbiológica	38
3.4.1.	Ensayo de colonización.....	39
3.4.2.	Microscopía confocal de fluorescencia	41
3.4.3.	Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM).....	41

**Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación
aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V**

4.	Resultados y discusión.....	43
4.1.	Caracterización microestructural y topográfica.....	43
4.1.1.	Difracción de Rayos X (XRD).....	43
4.1.2.	Microscopía óptica (MO).....	45
4.1.3.	Perfilometría óptica.....	48
4.2.	Caracterización mecánica.....	50
4.2.1.	Ensayo de dureza.....	50
4.2.2.	Ensayo de microdureza.....	51
4.3.	Caracterización microbiológica.....	52
4.3.1.	Ensayo de colonización.....	52
4.3.2.	Microscopía confocal de fluorescencia.....	57
4.3.3.	Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM).....	60
5.	Conclusiones.....	64
6.	Futuras investigaciones.....	66
7.	Bibliografía.....	67

ÍNDICE DEL PRESUPUESTO

1.	Presupuesto.....	73
1.1.	Cuadro de precios.....	74
1.1.1.	Cuadro de precios: mano de obra.....	74
1.1.2.	Cuadro de precios: maquinaria.....	75
1.1.3.	Cuadro de precios: materiales.....	77
1.3.	Mediciones.....	90
1.4.	Presupuesto de ejecución por contrata.....	91

MEMORIA DEL PROYECTO

1. Introducción

El desarrollo y avance de la medicina e ingeniería biomédica en el tratamiento de las enfermedades junto a los cambios en los hábitos de vida se encuentran entre los factores que han propiciado un aumento en el envejecimiento poblacional.

Según el INE, en 2018 en España la población mayor de 65 años supuso aproximadamente un 19,2% del total mientras que se estima que para 2033 esta cifra alcance el 25,2%, lo que supondría aproximadamente un total de 12.500.000 personas.

Tal como se indica en el *“Informe mundial sobre el envejecimiento y la salud”* publicado por la OMS en 2015, el envejecimiento es un proceso natural que conlleva la acumulación de daños en los tejidos que con el tiempo se traducen en una merma en las capacidades físicas y mentales y una mayor probabilidad de padecer enfermedades, por lo que en un futuro nos encontraremos con una parte importante de la población que las tenga o en riesgo de padecerlas.

Una enfermedad tradicionalmente asociada al envejecimiento es la artrosis. Esta enfermedad está caracterizada principalmente por la destrucción del cartílago hialino cuya función es la de lubricar y facilitar el movimiento entre las superficies articulares en contacto. La alteración de su matriz extracelular (EMC) conlleva la muerte de los condrocitos, encargados de regenerarlo y esto a su vez genera cambios en los tejidos circundantes como pueden ser el hueso subcondral y la membrana sinovial provocando en quienes la padecen dolor, inflamación y rigidez articular dificultando la movilidad y por ende la calidad de vida (López-armada, M.J., et al., 2004).

El tratamiento inicial de esta enfermedad suele ser conservador y enfocado a paliar el avance y la sintomatología mediante antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), ejercicio físico moderado, pérdida de peso y fisioterapia. No obstante, la ausencia de vascularización en el cartílago es el principal obstáculo para la regeneración de este tejido, por lo que en ocasiones esta degeneración continúa hasta hacer necesario el abordaje quirúrgico comúnmente conocido como artroplastia (Mayo Clinic, n.d.).

La artroplastia es una intervención quirúrgica ortopédica que consiste en la resección de las superficies articulares de forma parcial o total y su sustitución por una prótesis, siendo la rodilla y la cadera las articulaciones más propensas a ello debido a que están sometidas a más cargas (Ferguson et al., 2018). En España, a nivel nacional no existe un registro del número de artroplastias de cadera o rodilla realizadas, sin embargo, en Cataluña el Servicio Catalán de Salud a través del Registro de Artroplastias de Cataluña (RACat) recoge información estadística respecto a estos procedimientos indicando que en el periodo 2005-2014, únicamente en esta región, se realizaron 51.742 artroplastias de cadera y 66.882 de rodilla con una previsión de que se mantenga el incremento interanual que se ha dado durante el intervalo de tiempo analizado (Arias-de la Torre et al., 2017)

Una posible complicación derivada de esta intervención es la infección periprotésica (IPP). La IPP, tal como su nombre indica, es la colonización y crecimiento de microorganismos en el implante, provocando un cuadro sintomatológico en el paciente y el posterior fallo de la prótesis haciendo necesaria su sustitución por otra más grande debido a la pérdida de tejido infectado y a la necesidad

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

de realizar una resección de tejido sano para asegurar que no se desarrolle una sobreinfección (Gutiérrez Zuñiga et al., 2017).

En 2017 Gutiérrez Zúñiga señaló que la incidencia de este suceso en la artroplastia total de rodilla y de cadera fue del 2% y 2,4% respectivamente, mientras que en el caso de las artroplastias de revisión la cifra se duplicaba hasta un 5,6% y un 3,2%. El coste derivado del tratamiento de cada paciente oscila entre 59.601-65.439\$ (10 veces más que su precio basal). Por ello, en 2009 el impacto económico de esta complicación en EEUU ascendió hasta 566 millones de dólares y se estima que para este año (2020) sea de 1.620 millones (Lalani et al., 2008).

Algunos de los microorganismos más frecuentes en estas infecciones se muestran en la tabla 1. Muchos de ellos forman parte de la microbiota de la piel y son conocidos en microbiología médica como patógenos oportunistas, siendo el *Staphylococcus epidermidis* y el *Staphylococcus aureus* los causantes de 2/3 de las infecciones. La colonización de estas bacterias se puede producir de dos formas: directamente durante el acto quirúrgico o por vía hematológica, siendo esta la principal vía de entrada del *Staphylococcus aureus*, por lo que muchas veces, a pesar de las medidas de profilaxis tomadas en el quirófano, al estar presentes en el paciente la exposición a las mismas es elevada, pudiendo originar una infección, motivo por el cual serán estudiadas en el presente proyecto. (Ariza & Euba, 2008)

Tabla 1. Microorganismos más comunes en las IPP (Trampuz & Zimmerli, 2005)

Microorganismo	Frecuencia (%)
Estafilococo de coagulasa negativa	30-43
<i>Staphylococcus aureus</i>	12-23
Estreptococos	9-10
Enterococos	3-7
Bacilos gran-negativos	3-6
Anaerobios	2-5
Polimicrobios	10-12
Otros	10-11

En relación a estas bacterias, ambas pertenecen al género de las *Staphylococcus*, que está caracterizado por presentar una forma esférica con un diámetro entre 0,5-1,5 μm y un crecimiento en forma de racimos de uva, tal como se observa en la figura 1 (Murray, Rosenthal & Pfaller, 2017).

Otra característica destacada es su capacidad de crecer a temperatura comprendidas entre 18-40°C y su metabolismo anaerobio facultativo, el cual les otorga la capacidad de reproducirse tanto en condiciones aerobias como anaerobias, aumentando el rango de entornos en los que pueden desarrollarse.

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

Asimismo, el *S.aureus* y *S.epidermidis* son dos bacterias Gram-positivas y catalasa-positivas. Las bacterias Gram-positivas son aquellas que presentan una envoltura compuesta por una membrana plasmática y una pared celular formada por peptidoglicanos unidos gracias a moléculas de ácido lipoteicoico (figura 2), mientras que las bacterias catalasa-positivas son aquellas que producen la enzima catalasa, encargada de descomponer el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Esto supone una ventaja frente a los macrófagos, los cuales secretan peróxido de hidrógeno con una finalidad microbicida. Un efecto colateral de la secreción de catalasa es el aumento de la respuesta inflamatoria local debido a la liberación de citocinas inflamatorias como la Interleucina-6 (IL-6) y Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α) por parte de los macrófagos debido a su incapacidad para contener la infección. (Das, Saha, & Bishayi, 2008)(Namvar et al., 2014)

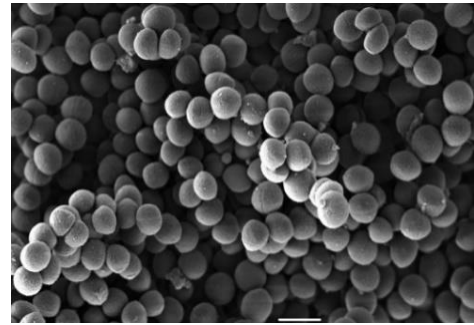


Figura 1. Microscopía electrónica de *Staphylococcus aureus* (Murray, Rosenthal & Pfaller, 2017).

Además, el *S.aureus* es coagulasa-positivo, lo que significa que libera coagulasa, que en la sangre reacciona con la protrombina. Esto forma un complejo que produce la conversión de fibrina en fibrinógeno, generando una barrera de coágulo alrededor de sí y que la protege de la acción de las células inmunes.

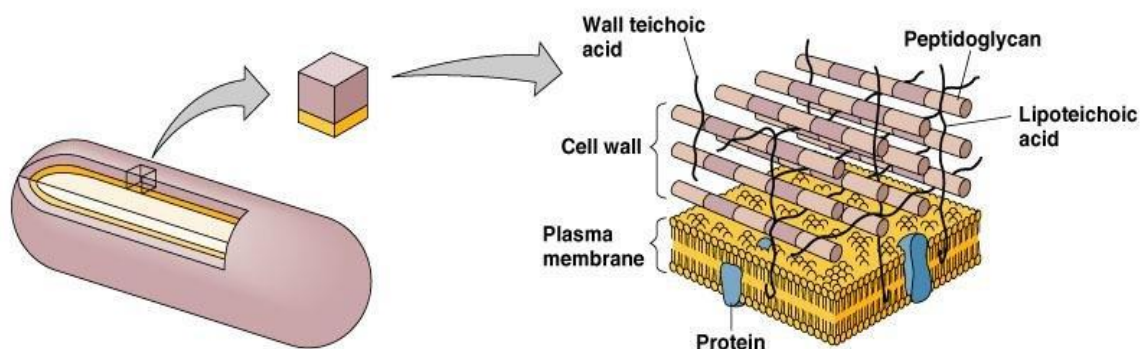


Figura 2. Pared celular de las bacterias Gram-positivas. Fuente: Pearson education inc.

En relación a como estas bacterias colonizan las superficies de los implantes y prótesis, cada vez existe más consenso de que lo hacen en forma de biofilms (figura 3). A consecuencia de esto, cada vez hay un mayor interés por parte de la comunidad científica en comprender los fenómenos de generación de estas películas para poder elaborar estrategias de prevención y diagnóstico precoz. Tal como indica Dibartola (2017), esto se puede observar en el número de publicaciones que relacionan los biofilms y las prótesis ortopédicas, que en el periodo comprendido entre 2001-2017 pasaron de apenas 10 publicaciones al año a más de 120.

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

Los biofilms son estructuras organizadas compuestas por una matriz extracelular autoproducida formada de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) adherida a la superficie y en cuyo interior se pueden encontrar diferentes tipos de bacterias e incluso hongos organizados en comunidades complejas y heterogéneas con una función definida similar a los organismos multicelulares. La comunicación entre ellos se da mediante moléculas señalizadoras (DNA, proteínas, polisacáridos, etc) a través de un rudimentario sistema circulatorio compuesto por canales. Este fenómeno es conocido como *quorum sensing* y permite a las bacterias intercambiar patrones de expresión génica induciendo cambios en el fenotipo. Un ejemplo de la sinergia que se da en estas comunidades es el intercambio de resistencia frente a un agente antimicrobiano entre una bacteria que posee esta capacidad y las otras que no la poseen en la misma colonia o la capacidad de camuflarse frente al sistema inmune del organismo huésped (Trampuz & Zimmerli, 2005) (Flemming & Wingender, 2010).

La suma de la matriz, los productos metabólicos de la actividad bacteriana y los cambios en el fenotipo inducidos por la comunicación interbacteriana otorgan a estas estructuras 1000 veces más resistencia a los agentes antimicrobianos que si crecieran de forma aislada. Por ello, el manejo de este tipo de infecciones muchas veces se torna complicado, pues son necesarios periodos prolongados de toma de múltiples antibióticos (3-6 meses), hospitalización, y en el peor de los casos múltiples cirugías de revisión y la sustitución de la prótesis por otra más grande aún (Trampuz & Zimmerli, 2005)(Dibartola et al., 2017).

La formación de estos biofilms sobre las superficies se puede sintetizar en 5 pasos tal como se muestra en la figura 4:

1. Unión inicial (reversible) de la bacteria con la superficie
2. Unión irreversible con la superficie gracias a la secreción de EPS
3. Crecimiento y división de la colonia donde empieza a definirse la arquitectura organizada
4. Maduración de la estructura del biofilm
5. Dispersión de bacterias con movilidad y colonización de nuevas superficies

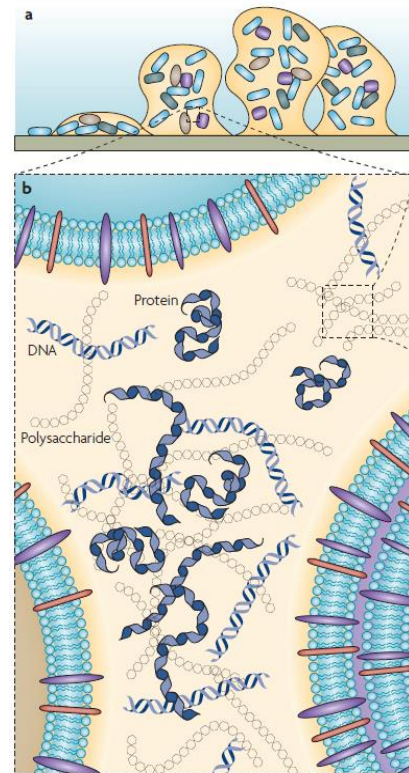


Figura 3. Biofilm sobre una superficie (a) y canales de comunicación del biofilm (b) (Flemming & Wingender, 2010)

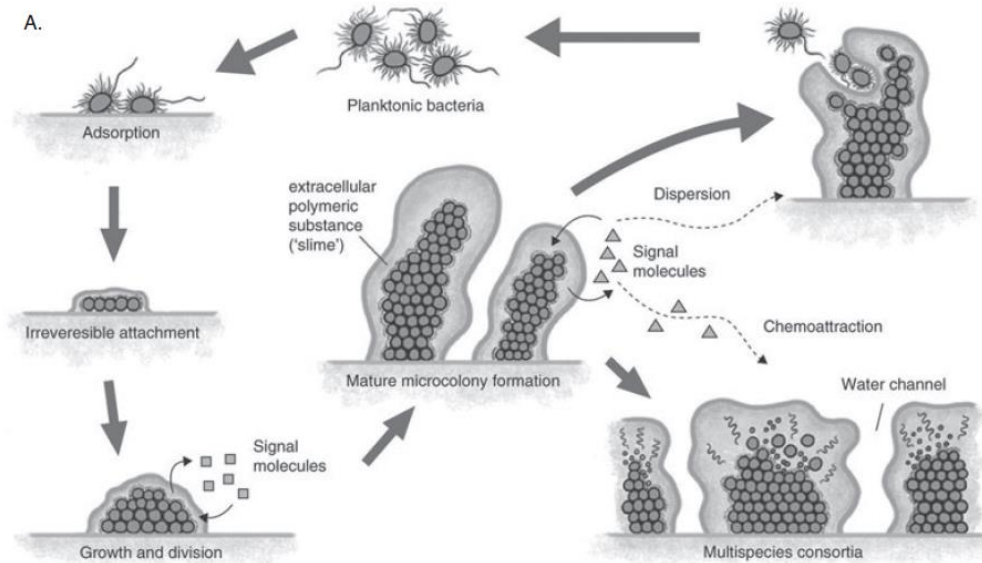


Figura 4. Desarrollo del biofilm (Jacques, Aragon, & Tremblay, 2010)

Durante la unión inicial (paso 1), la adhesión de las bacterias con la superficie del biomaterial depende de dos tipos de factores: los factores inespecíficos relacionados con parámetros fisicoquímicos o eléctricos de la superficie (hidrofobicidad, tensión superficial, rugosidad, etc.) y factores específicos del tipo adhesina (Ábalos, 2005)(Trampuz & Zimmerli, 2005)(Donlan, 2001).

Por ejemplo, el *S. epidermidis* y *S.aureus*, ven favorecida su adhesión al sustrato durante su fase de crecimiento gracias a factores de tipo específico. En esta fase las bacterias se adhieren entre sí mediante adhesinas, que en el caso del *S.aureus* dependen de ligandos como el fibrinógeno o el colágeno presentes de forma natural en el tejido huésped. La presencia de fibrinógeno o colágeno en el sustrato disminuye hasta en 10.000 veces la dosis mínima infecciosa de esta bacteria haciendo más propenso el desarrollo de una infección. Esto es importante en el caso de los recubrimientos protésicos de hidrogeles basados en colágeno o ácido hialurónico ya que la liberación de un AINEs o mejora de la osteointegración puede suponer un aumento en la probabilidad de desarrollar una infección (Trampuz & Zimmerli, 2005).

Es por ello que las estrategias de prevención de la adhesión bacteriana suponen un punto importante de acción por parte de la comunidad científica y médica para prevenir las IPP, pues son el paso inicial en la formación de los biofilms. Durante los últimos años se ha puesto énfasis en conocer la relación entre este fenómeno y los factores inespecíficos, que en última instancia dependen de las características del material con el que se han fabricado las prótesis e implantes.

Una forma de conocer las características del material es a partir de su microestructura. A pesar de que tradicionalmente se ha estudiado la relación entre esta y las cualidades mecánicas, eléctricas y químicas del material, no se ha estudiado en profundidad su relación con la interacción con microorganismos o como también podrían llamarse: propiedades microbiológicas.

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

La microestructura de un material es la disposición que adoptan los átomos que lo componen a nivel microscópico. En el caso de los metales, los enlaces de tipo metálico entre los elementos que conforman la aleación hacen posible la adopción de cuatro estructuras cristalinas, que dependiendo de los elementos o temperatura alcanzada son: cubica centrada en la cara (FCC), cubica centrada en el cuerpo (BCC), hexagonal compacta (HCP) y tetragonal.

Los principales parámetros que se estudian para determinarla son el tamaño de grano, fases presentes y su composición, presencia de precipitados descripción de la estructura, tamaño y forma de la distribución, bordes de grano, interfaz entre distintas fases, dislocaciones y defectos puntuales entre otros (Clemens, Mayer, & Scheu, 2017).

Por ejemplo, en la figura 5 se muestra un esquema de la microestructura de un metal policristalino con diferentes fases. En ella se puede observar la presencia de dos fases distintas: una fase alfa (BCC) y una fase beta (FCC), cada una con una composición y estructura cristalina concretas. Cada una de estas fases forma una solución sólida donde la estructura cristalina es homogénea y esto es importante pues puede existir cierta heterogeneidad en las propiedades superficiales a nivel microscópico que dé lugar a una variabilidad en la interacción con los microorganismos (Clemens et al., 2017).

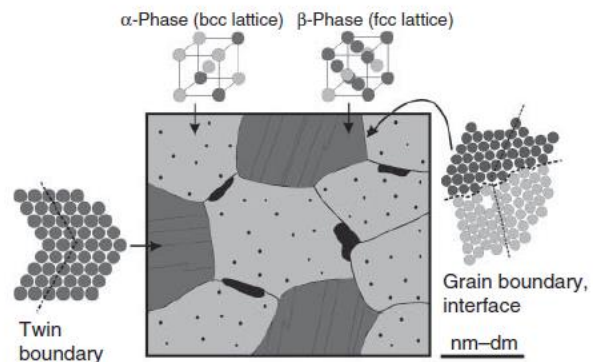


Figura 5. Microestructura de una aleación policristalina heterofásica (Clemens et al., 2017)

Uno de los materiales más extendidos en la fabricación de prótesis e implantes quirúrgicos es el Ti y sus aleaciones, especialmente el Ti6Al4V. Su uso se debe a su elevada resistencia específica, biocompatibilidad, módulo elástico cercano al del hueso y elevada resistencia a la corrosión y al desgaste en el medio fisiológico entre otros aspectos (Khorasani et al., 2015). No obstante, el Ti presenta una escasa actividad bactericida por lo que muchas publicaciones han intentado elaborar recubrimientos superficiales basados en nanotubos, implantación iónica de otros elementos bactericidas, anodizado o recubrimiento de antibióticos para prevenir la colonización bacteriana, así como intentar determinar la relación entre la adhesión y crecimiento bacterianos y parámetros superficiales como pueden ser la hidrofobicidad, la tensión superficial o la rugosidad. Sin embargo, ninguno de estos estudios ha abordado la microestructura y su relación con la actividad bacteriana (Valdez-Salas et al., 2019) (Li et al., 2016).

Respecto a su microestructura, el Ti puro a temperatura ambiente posee una estructura hexagonal compacta (HCP), comúnmente conocida como $Ti\alpha$, sin embargo, a temperaturas superiores a 882 °C (temperatura de transición β o β -transus) el Ti sufre una transformación alotrópica donde pasa a mostrar una estructura cúbica centrada en el cuerpo (BCC) llamada $Ti\beta$. Mediante la adición de aleantes se puede conseguir una estabilización de esta fase a temperatura ambiente. Por ello, en el ámbito biomédico se pueden encontrar tres tipos de aleaciones de Ti en función de las fases que las

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

compongan: las aleaciones tipo α , las tipo β y las $\alpha+\beta$, siendo estas últimas las más usadas y las que se tratarán en este trabajo (Veiga, Loureiro, & Davim, 2012).

La existencia de mayor o menor cantidad de cada una de estas fases dependerá del aleante que se añada al Ti y de las temperaturas alcanzadas durante el proceso de fabricación. En la figura 6 se pueden visualizar los diagramas de fases de los principales aleantes del Ti agrupados en cuatro grupos según la fase que estabilicen, siendo estos (Veiga et al., 2012) :

- α -estabilizadores: incrementan la temperatura de transición β estabilizando la fase α
- β -estabilizadores (isomorfos): incrementan la estabilidad de la fase β en toda la composición de la aleación
- β -estabilizadores (eutectoides): promueven la transformación eutectoide de la fase β
- Neutrales: apenas provocan variaciones en la temperatura de transición β

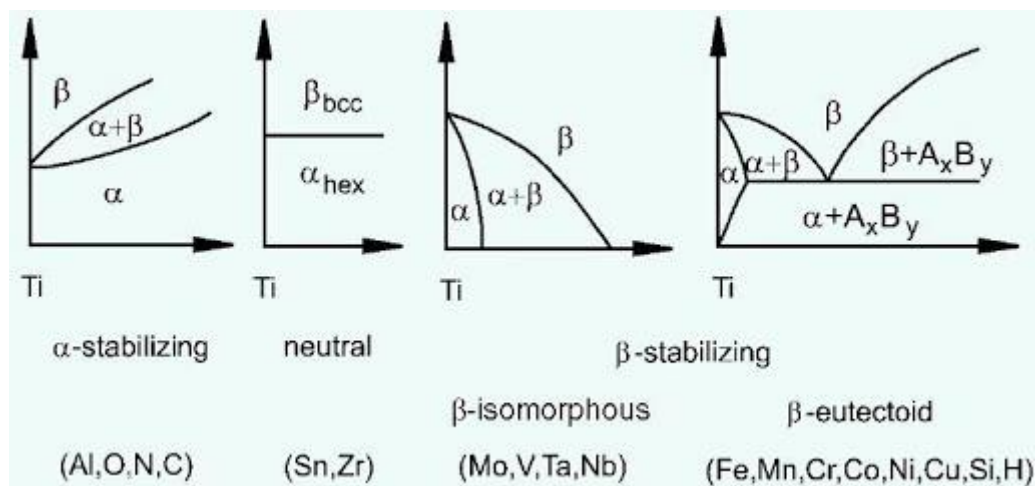


Figura 6. Diagramas de fase de los aleantes más comunes del Ti (Max-Planck-Institut Für Eisenforschung . (s. f.))

A nivel biológico la presencia de fase β a temperatura ambiente reviste especial interés debido a que permite disminuir el módulo elástico a valores más cercanos a los del hueso a diferencia de otras aleaciones como las de CoCrMo, evitando de este modo el fenómeno de apantallamiento de tensiones por el cual la absorción de las tensiones por parte de la prótesis genera la pérdida de masa ósea en la interfaz de contacto y el fracaso del dispositivo implantado (Niinomi & Nakai, 2011).

En la aleación de Ti6Al4V, el Al actúa como aleante α -estabilizante mientras que el V lo hace como β -estabilizante, dando lugar a una aleación $\alpha+\beta$, que en equilibrio y a temperatura ambiente presenta alrededor de un 95% de fase α y un 5% de fase β , distribuida principalmente en el borde de grano (Babu, 2008) (Murr et al., 2009). Sin embargo, la microestructura no está únicamente caracterizada por la proporción de las fases presentes en el material, sino que también está definida por el tamaño, orientación y morfología de los granos, presencia de defectos o dislocaciones e incluso la distribución de las fases, y todos estas variables pueden ser controlados mediante la manipulación de las

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

parámetros en los diferentes métodos de fabricación y mediante la aplicación de tratamientos posteriores, por lo que debido a ello, para una misma aleación es posible encontrar diferencias en la microestructura.

Por ejemplo, la morfología de los granos en el Ti6Al4V puede ser lamelar, equiaxial o una mezcla de ambas. Mediante la velocidad de enfriamiento desde la temperatura de transición β es posible controlar el grosor de las lamelas, de modo que, a mayor velocidad, más finas serán estas. Asimismo, si se aplica trabajo mecánico en el rango de temperaturas de fase $\alpha + \beta$ (figura 7), es posible obtener granos equiaxiales debido a la rotura de las lamelas.

Si se atiende al diagrama de fase pseudo-binario de la (figura 7) en la fase $\alpha + \beta$ existe una temperatura de transición martensítica. Si la aleación es calentada por encima de esta y luego se realiza un enfriamiento muy rápido, aparecerá en la microestructura una estructura martensítica de fase α' metaestable, caracterizada por su forma acicular y por presentar unas propiedades mecánicas superiores a la fase α (Moiseyev, 2006) (Martin, 2006).

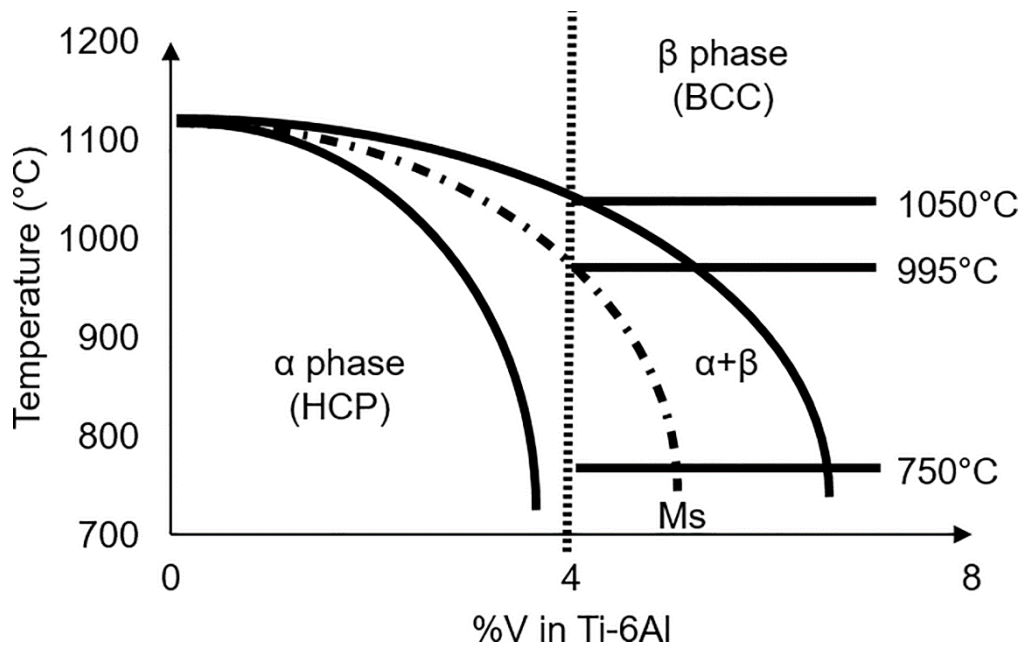


Figura 7. Diagrama de fase pseudo-binario de la aleación de Ti6Al4V (Majumdar et al., 2019)

En este trabajo se han analizado y comparado las microestructuras de una aleación de Ti6Al4V obtenido a partir de tres tipos de fabricación diferentes: forja, sinterizado del metal por láser directo (DMLS) y fusión por haz de electrones (EBM). Por ello, es importante explicar brevemente en que consiste cada uno de ellos.

El proceso de forjado es un método de deformación plástica en el que se modifica la microestructura del material mediante compresiones a elevada temperatura aplicadas a una pieza sólida. En el titanio,

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

los rangos de temperatura en los que se trabaja oscilan entre los 750-1065 °C, y en función de los mismos y la deformación que se aplique, se obtendrá una microestructura determinada.

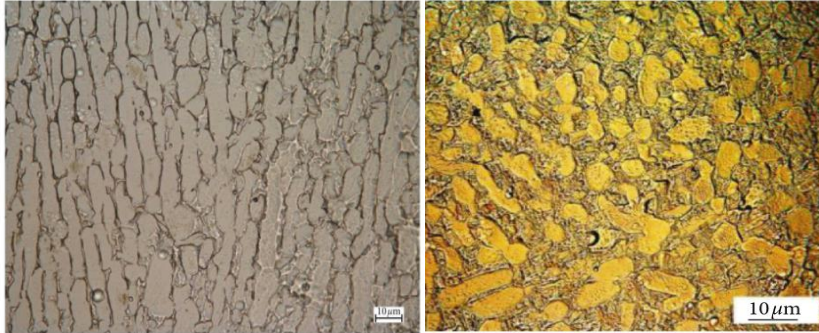


Figura 8. Ti6Al4V as-cast (a) y forjado a 925°C (Fang et al., 2019)

Por ejemplo, tal como se observa en la figura 8, de una microestructura “as-cast” (a), caracterizada por lamelas de fase α (fase clara) rodeada de estructura β en el borde de grano (fase más oscura), a 925°C se pasa a una microestructura con unos granos de fase alfa algo más redondeados y equiaxiales y con mayor presencia de fase beta.

Si se eleva la temperatura hasta alcanzar casi la temperatura de transición β (1065 °C) o superarla, la proporción de fase alfa disminuye debido a la transformación $\alpha+\beta\rightarrow\beta$ lo que propicia la aparición de unas estructuras aciculares compuestas de fase $\alpha+\beta$ en la matriz del grano (figura 9)

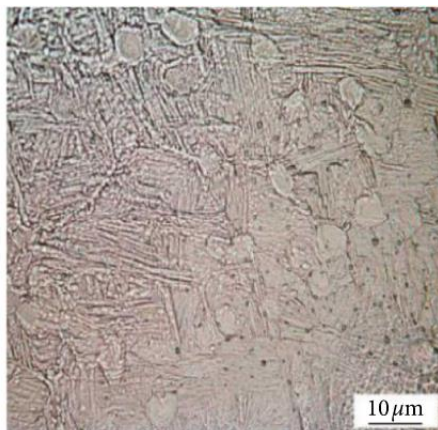


Figura 9. Ti6Al4V forjado a 1025°C (Fang et al., 2019)

Por tanto, dependiendo de la temperatura de forjado y la deformación aplicada, se generarán unos cambios tanto en la orientación y tamaño de los granos como de las proporciones de fase presentes a temperatura ambiente, lo que finalmente se traducirá en unas propiedades distintas.

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

En la otra parte se encuentran el DMLS y EBM, los cuales forman parte de las tecnologías conocidas como de fabricación aditiva. Estos procesos están basados en la obtención del sólido capa por capa a partir de polvos o hilos de material, que son calentados por debajo de la temperatura de fusión o hasta ella mediante una fuente de energía que puede estar basada en el láser o en los electrones (Herzog et al., 2016).

El DMLS (figura 10) consiste en generar una pieza sólida a partir de un modelo CAD. Para ello en primer lugar se genera una capa de polvo elemental y mediante un haz láser de alta energía localizado sobre las partículas hace que estas sean capaces de fusionarse a nivel molecular sin alcanzar el punto de fusión. Este proceso se repite generando capa por capa en el eje Z mientras que el polvo se deposita en el plano XY (Gardan, 2016).

Durante este proceso se alcanzan pronunciados gradientes de temperatura y altas velocidades de enfriamiento que producen tensiones internas en la pieza. Asimismo, es frecuente la aparición de poros debido a que no se alcanza el 100% de la densidad total, además de cierta anisotropía en la microestructura debido al escaneo del haz láser en una dirección determinada. Por ello y por la presencia de una estructura de tipo martensítico que genera una baja ductilidad y elevado módulo elástico, la ASTM en sus estándares F1427 no recomienda el uso de este método para fabricar implantes y prótesis (Becker, T.H., Beck, M. & Scheffer, 2015) (Mierzejewska, Hudák, & Sidun, 2019).

El EBM (figura 11) está basado en el uso de un haz de electrones de alta energía para transferir su energía cinética y fusionar las partículas de polvo entre sí. Para ello en primer lugar se genera una capa de polvo con un espesor de entre 50 μm y 200 μm y posteriormente el haz de electrones calienta el material hasta fusionarlo en una atmósfera inerte y a baja presión ($<10^{-2}$ Pa). El haz se genera mediante una pistola de electrones que los acelera con un voltaje de 60kV. Posteriormente estos se concentran a partir de lentes electromagnéticas y se dirigen con una bobina magnética en el plano XY fusionando la capa de polvo. Asimismo, antes de la fusión existe un precalentamiento de la capa por medio de un haz desenfocado que escanea la superficie varias veces (Herzog et al., 2016) (Gibson, Rosen & Stucker, 2015).

En resumen, los diferentes métodos de fabricación y tratamientos dan lugar a diferencias en parámetros de la microestructura, entre los que se encuentran el tamaño y borde de grano, orientación, proporción de fases presentes a temperatura ambiente, porosidad, presencia de

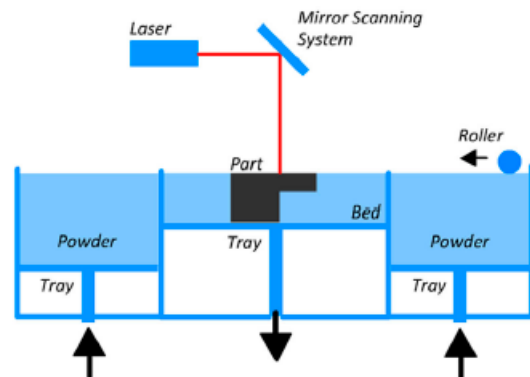


Figura 10. Esquema de una máquina de DMLS (Gardan, 2016)

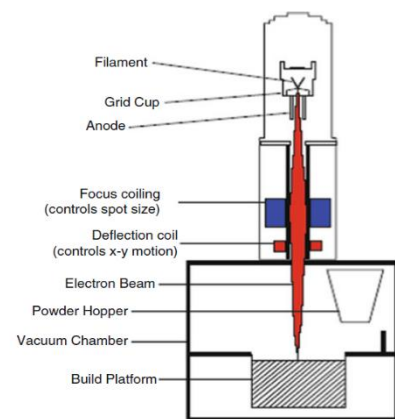


Figura 11. Esquema de una máquina de EBM (Gibson, Rosen & Stucker, 2015)

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

precipitados en la matriz o variaciones en el perfil que pueden inducir un aumento o disminución de la colonización de bacterias. Estas diferencias a nivel microestructural pueden afectar a los anteriormente mencionados parámetros inespecíficos como la rugosidad, tensión superficial o hidrofobicidad, generando “microceldas” donde las bacterias puedan sentirse más o menos cómodas para colonizar, lo que puede dar lugar a una distribución asimétrica de las bacterias sobre la superficie del material.

En la literatura científica no se ha estudiado la interacción entre la microestructura del Ti6Al4V y la colonización de bacterias como el *S.epidermidis* o *S. aureus*. Por ejemplo, es posible que estas presenten una mayor predisposición a colonizar estructuras con mayor proporción de fase beta como puede ser el borde de grano, por lo que en el caso de que esto se confirmara, se recomendaría evitar tratamientos o métodos de fabricación que aumentaran su presencia en la superficie de la prótesis o implante.

1.1. Objetivos

Por lo tanto, con todo lo comentado el objetivo general de este estudio es:

1. Desarrollar aleaciones de Ti6Al4V mediante forja, EBM y DMLS y comprobar el efecto que tiene la microestructura de cada una de ellas en la adhesión y colonización de bacterias.

Para alcanzarlo, se han desarrollado los siguientes objetivos específicos:

- 1.1.** Generar las probetas para caracterizar cada método de fabricación
- 1.2.** Determinar las diferencias microestructurales generadas por los distintos procedimientos de fabricación
- 1.3.** Conocer las diferencias respecto a las propiedades mecánicas producto de emplear distintos métodos de fabricación
- 1.4.** Analizar la relación entre la microestructura y la colonización y adhesión de las bacterias más comunes en las IPP.

2. Planificación

En este apartado se expone el plan de trabajo para poder llevar a cabo el proyecto en cinco bloques: elaboración de las muestras, preparación de las probetas, análisis microestructural, análisis mecánico y análisis microbiológico.

2.1. Elaboración de las muestras

En este trabajo se van a emplear 5 discos de Ti6Al4V obtenidos por diferentes métodos (forja, EBM y DMLS) con unas dimensiones de 25 mm de diámetro y 10 mm de espesor.

La elección de 10 mm de espesor responde a poder simular las condiciones de fabricación del cuello cónico de un vástago femoral protésico (figura 12), cuyas dimensiones se sitúan alrededor de los 12 mm. De este modo, se obtendría un disco cuyas características serían similares a si se realizara un corte en el cuello de una prótesis fabricada mediante estos métodos y se empleara en la realización de este trabajo.

Las probetas que se van a estudiar en este proyecto serán suministradas por tres empresas: Aimee, 3D y Eurocoating

Aimee suministrará un disco obtenido mediante EBM, 3D aportará un disco fabricado por DMLS y EU proporcionará un disco de EBM y otro de DMLS, junto al disco de forja fabricado por el Instituto Tecnológico de Materiales (ITM) de la Universitat Politècnica de València (UPV).

A pesar de que los parámetros de fabricación y tratamiento suponen un factor decisivo a la hora de comprender la microestructura de las muestras analizadas, por motivos de secreto industrial las empresas suministradoras no los van a facilitar.

Asimismo, para asegurar la trazabilidad de las diferentes probetas, se asignará un código correspondiente al método de fabricación, tal como se muestra en la tabla 2, acompañado de un número identificador de la muestra. Estos códigos también se utilizarán como abreviatura a lo largo del proyecto para hacer referencia a los cinco grupos.

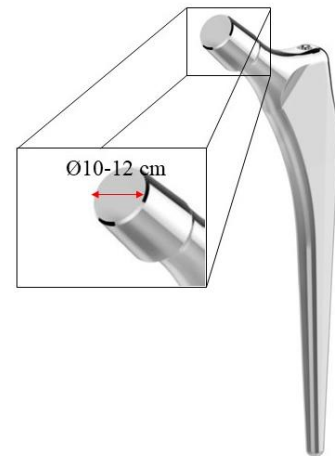


Figura 12. Cuello de vástago femoral

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

Tabla 2. Códigos de identificación de las muestras

Método de fabricación	Fabricante	Código
Forja	ITM	ELI_FOR
EBM	Aimee	EBM_A
	Eurocoating	EBM_EU
DMLS	3D	DMLS_3D
	Eurocoating	DMLS_EU

2.2. Preparación de las probetas

Este proceso es común para todos los especímenes ya que en cada uno de ellos se parte de un disco que ha de ser cortado en fragmentos más pequeños y su superficie ha de ser tratada en función del tipo de ensayo que se vaya a realizar.

En primer lugar, se cogerá un disco cilíndrico como el que se muestra en la figura 13, se introducirá en una máquina de corte y se realizarán cortes perpendiculares de 1.5 mm de grosor para obtener tantas láminas como sea posible.

Una de estas láminas se reservará para realizar la prueba de DRX, mientras que la media luna fruto del primer corte del disco se reservará para la prueba de FESEM.

Dichas láminas se cortarán longitudinalmente por la mitad y posteriormente se realizarán cortes en las mismas de entre 5 y 10 mm, dependiendo de la longitud total de la media lámina y buscando optimizar el número de muestras que se puedan obtener de cada una.

El número deseable de muestras rectangulares que se ha de obtener para poder realizar los ensayos de microbiología es entre 20 y 30 muestras, con un tamaño entre 0,5-1 mm de largo y 0,5 mm de ancho, ya que será necesario que entren en tubos eppendorf de 1,5 ml.

Para poder realizar el análisis microestructural mediante FESEM es necesario que las muestras presenten una superficie lisa libre de imperfecciones y rugosidades. Por tanto, para poder llevar a cabo el primer paso es necesario embutir las probetas en una máquina de embutición con resina conductora, aplicando una fuerza de 15 kN con 7' de calentamiento a 180°C y 7' de enfriamiento por recirculación de agua.



Figura 13. Disco de Ti6Al4V

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

Después de la embutición, para nivelar la superficie de las muestras se lijarán sus superficies en un equipo de esmerilado y pulido mediante discos de lija con distinta granulometría por orden: 200, 500 y 1000 mallas.

Finalmente se pulirán las muestras para descartar cualquier imperfección que pudiera quedar en la superficie. Para ello en primer lugar se llevará a cabo un pulido mediante paño grueso y suspensión de diamante de 9 μm y a continuación se realizará un pulido final mediante paño fino y suspensión coloidal de sílice y H_2O_2 .

2.3. Análisis microestructural y topográfico

El objetivo de este análisis es identificar las fases presentes junto a su proporción y distribución en las muestras. Para ello se efectuará un ensayo de difracción por Rayos X (XRD), microscopía óptica (MO) y perfilometría óptica.

2.3.1. Difracción de Rayos X (XRD)

La difracción de Rayos X es una prueba cuyos objetivos son:(Clegg, 2003.)

- Conocer las fases presentes a partir de patrones de difracción que actúan como identificadores característicos de cada una
- Determinar cuantitativamente la concentración de cada fase en el espécimen

Para ello se usará una fuente de radiación de $\text{CuK}\alpha$ en la que se aplicará una diferencia de potencial de 30 kV e intensidad de 10 mA para generar Rayos X con una longitud de onda de 1,54 Å capaz de interferir en el espacio interatómico del material. Con estos Rayos X se realizará un barrido desde 20 ° a 90 ° sobre la muestra interaccionado con los electrones de los átomos, siendo dispersados elásticamente en distintas direcciones y detectados por un sensor. Las direcciones en las que son dispersados están relacionadas con la repetición geométrica cristalina en una celda unitaria mientras que la intensidad está relacionada con la distribución de la densidad electrónica en una celda unidad. (Clegg, 2003.)

Aplicando la ley de Bragg (1) a las direcciones e intensidades de dispersión se obtiene un patrón de difracción compuesto por picos y líneas de difracción las cuales son función del ángulo de difracción 2θ .

$$\lambda = 2d_{hkt} \sin\theta \quad (1)$$

Donde d_{hkt} es la distancia perpendicular entre planos cristalográficos, λ es la longitud de onda de los Rayos X y θ es el ángulo entre el haz incidente y la normal al plano cristalográfico reflector. A partir de la medición de los ángulos en los que los Rayos X abandonan la estructura cristalina se puede determinar la distancia interplanar de cualquier fase cristalográfica (Chatterjee, 2001).

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

Finalmente, comparando el patrón de difracción con bases de datos se pueden determinar el plano cristalográfico, fase y porcentaje de la misma presente en cada muestra.

Para poder llevar a cabo esto, en primer lugar, el software integrado en el difractor de Rayos X ofrecerá varios archivos entre los cuales se encuentra un .txt con el patrón de difracción. En él figurarán entre otros parámetros dos columnas donde se muestran las cuentas y el ángulo 2θ (entre 20° y 90°). Para poder procesarlo se usará el software Maud que además de poseer una base de datos con patrones de difracción de una gran variedad de materiales y fases, ofrece la posibilidad de importar patrones de otras bibliotecas.

Una vez seleccionados los datos del ensayo y las fases con las que se quieren comparar, se realizarán múltiples ajustes por mínimos cuadrados (tantas veces como sea necesario hasta que el valor R_w permanezca invariable). En cada iteración, el software realiza un ajuste entre los datos en crudo obtenidos del ensayo y los patrones característicos de cada fase. Gracias a ello, será posible saber el porcentaje de cada fase presente en las muestras además de poder identificar las fases y planos cristalográficos de cada pico en el patrón de difracción.

Puesto que las muestras de este estudio son de Ti6Al4V, las fases con las que se va a realizar la comparación serán principalmente $Ti\alpha$ y $Ti\beta$. En el caso de que el ajuste fuese poco preciso o hubiesen picos sin poder identificar se valoraría la adición de óxidos de Ti o compuestos intermetálicos.

La representación gráfica del patrón de difracción se realizará mediante OriginPro 9.0 importando las columnas de cuentas y ángulo del archivo .txt y representando las cuentas/seg vs. ángulo 2θ .

2.3.2. Microscopía Óptica (MO)

El objetivo de la microscopía óptica es observar la superficie y con ello la microestructura de las muestras que previamente habrán sido pulidas y atacadas químicamente.

El ataque químico de la superficie tiene como objetivo diferenciar a partir de un efecto corrosivo las diferencias microestructurales debido a una diferencia en la intensidad de corrosión superficial o coloración.

Para ello se utilizará el reactivo de Kroll compuesto por 100 ml de agua destilada, 3 ml de HF y 6 ml de HNO_3 .

El microscopio empleado será un microscopio óptico de luz reflejada donde la muestra se iluminará desde arriba, y la luz reflejada por la superficie de la aleación generará en el objetivo una imagen.

Se tomarán imágenes de la superficie a 100, 200 y 500 aumentos de cada una de los cinco tipos diferentes de Ti6Al4V que se dispondrá.

2.3.3. Perfilometría óptica

La perfilometría óptica tridimensional es una técnica de caracterización no destructiva cuyo objetivo es obtener información respecto a la rugosidad superficial de la muestra examinada.

Mediante un microscopio óptico se obtienen múltiples imágenes en el eje Z de la muestra, obteniendo una imagen tridimensional de la misma. Posteriormente, realizando un tratamiento digital de las imágenes mediante un software, se obtienen parámetros referentes a la rugosidad superficial.

Para llevar a cabo este ensayo se tomará una lámina de la superficie cortada de cada espécimen y se tomarán tres medidas en puntos diferentes de la misma, obteniendo en cada una de ellas la rugosidad superficial, que se representará mediante la media aritmética (S_a) y la media cuadrática (S_q) según la ISO 25178.

Asimismo, se tendrán en cuenta los valores de asimetría (S_{sk}) y curtosis (S_{ku}) ya que como Sedlaček, Gregorčič, & Podgornik indicaron en 2017, estos parámetros ofrecen información respecto a la presencia de valles, picos y su densidad en la superficie de las muestras.

Los datos finales se presentarán como la media y desviación típica de las tres mediciones realizadas en cada muestra.

2.4. Caracterización mecánica

La caracterización de las propiedades mecánicas es otro punto en el estudio de los materiales. No obstante, puesto que el objetivo final no es la caracterización mecánica completa de las aleaciones se han realizado un pequeño número de ensayos entre los que se encuentran los ensayos de dureza y microdureza Vickers.

2.4.1. Ensayo de dureza

La dureza de un material es la oposición que ofrece su superficie a ser rayada o penetrada por otro material. Esta propiedad es importante en el ámbito biomédico pues ofrece información respecto a su comportamiento tribológico permitiendo diseñar y elegir los materiales de las superficies que estarán en contacto (Zhang, H., 2011).

La medición de esta propiedad se lleva a cabo aplicando una fuerza contra su superficie mediante un indentador fabricado con un material más duro (esférico o piramidal).

En este estudio, la dureza se determinará a partir un ensayo de dureza Rockwell que posteriormente se transformarán a dureza Vickers (HV) mediante una tabla de conversión.

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

El ensayo de dureza Rockwell consistirá en aplicar una fuerza de 15kp sobre el material mediante una bola de acero de diámetro 1/16" (escala HR15T) siguiendo la norma ASTM E18-20 sobre ensayos de dureza Rockwell en materiales metálicos.

En esta norma el ensayo consta de tres pasos tal como se muestra en la figura 14:

1. En primer lugar, el indentador entra en contacto con la muestra aplicando una fuerza inicial F_0 mantenida en el tiempo midiendo la profundidad h_1 .
2. A continuación, se añade una fuerza adicional (F_1) de forma controlada alcanzando la F total (15 kp en este caso) que de nuevo se mantendrá durante un tiempo.
3. Seguidamente, se eliminará la fuerza adicional (F_1) volviendo a la fuerza inicial (F_0) que se mantendrá durante un tiempo específico midiendo la profundidad final de indentación (h_2).

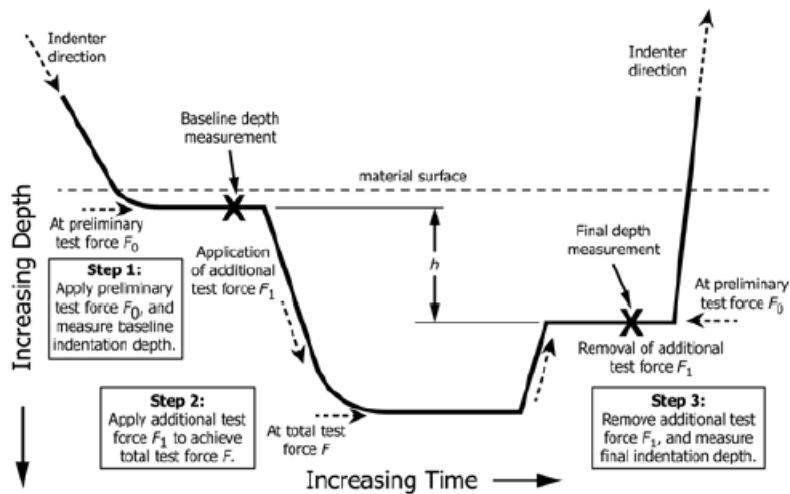


Figura 14. Diagrama del test de dureza Rockwell (ASTM E18-20, 2020)

Para un indentador tipo bola, la dureza Rockwell y la dureza superficial se obtendrán a partir de las siguientes ecuaciones:

$$h \text{ (mm)} = h_2 - h_1 \quad (2)$$

$$\text{Dureza Rockwell (HR15T)} = 130 - \frac{h}{0,002} \quad (3)$$

$$\text{Dureza superficial Rockwell (HR15T)} = 100 - \frac{h}{0,001} \quad (4)$$

El ensayo se realizará cinco veces en puntos diferentes de la superficie obteniéndose como valor representativo de la dureza de esa muestra la media junto a la desviación estándar.

En último lugar, siguiendo las tablas de conversión proporcionadas por la ASTM en su norma ASTM E140-12b (2019) se realizará el cambio de los valores obtenidos a dureza Vickers (HV).

2.4.2. Ensayo de microdureza (Voort, 2000)

El propósito de este ensayo es el de obtener información respecto a la dureza de un grano o compuesto homogéneo a diferencia del ensayo de dureza, donde el tamaño del indentador abarca varios granos siendo el valor obtenido resultado de la heterogeneidad de los mismos.

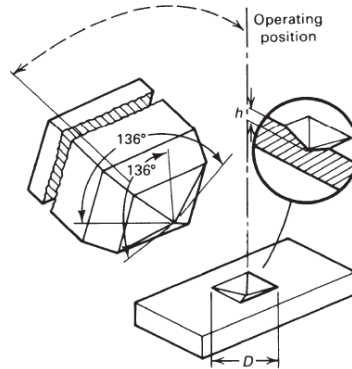


Figura 15. Identación de una muestra

En este caso se realizará un ensayo de microdureza Vickers en el que mediante un microscopio óptico se realizará un barrido de la superficie de la muestra para seleccionar un punto de aplicación del indentador piramidal de diamante donde no existan poros u otras imperfecciones, teniendo asimismo en cuenta que la zona en la que se aplica la carga ha de ser homogénea.

A continuación, el microscopio se intercambia con el indentador y se aplica una carga mantenida durante un tiempo concreto. Tras ello, el indentador se intercambia de nuevo con el objetivo y mediante un software se calcula la longitud de las diagonales.

La microdureza Vickers (HV) se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

$$HV = \frac{1854,4 * P}{d^2} \quad (5)$$

Donde:

P= carga aplicada en gramos

d= longitud de la diagonal mayor en μm

El cálculo de este valor se realiza de forma automática por el programa integrado, no obstante, también ofrece los valores de la longitud de las diagonales para poder realizarse de forma manual.

Para conocer la microdureza, se realizará un ensayo de dureza HV 0.3 con indentador piramidal de diamante en cada uno de los especímenes (figura 15). Para ello se partirá de una muestra cuya superficie haya sido previamente lijada y pulida y se realizará la medición en 5 puntos distintos, con

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

una P=300 gramos y $t_{\text{aplicación}}=12$ seg. Finalmente, el resultado de cada espécimen se mostrará a partir de la media y desviación típica de dichas mediciones.

2.5. Caracterización microbiológica

En este apartado se pretende determinar el grado de interacción entre la superficie de las diferentes muestras y las cepas bacterianas de *S.epidermidis* y *S.aureus*.

Para ello se realizará un ensayo de colonización durante 48 horas, un estudio de microscopía confocal de las superficies colonizadas y un análisis de las superficies también colonizadas, pero utilizando microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM).

La parte correspondiente a este apartado, salvo la realización de la prueba de FESEM, se llevará a cabo bajo la tutela del equipo de Infecciones Graves del Instituto de Investigación Sanitaria de la Fe.

2.5.1. Ensayo de colonización

El objetivo de la caracterización microbiológica es determinar mediante un ensayo de colonización el grado de interacción entre la superficie del material y las bacterias estudiadas.

Antes de llevar a cabo el mismo, es necesario que las muestras sean sometidas a una preparación previa que consiste en una limpieza de la superficie y una posterior esterilización, para asegurar de este modo que la superficie que se va a examinar no presente ningún compuesto o microorganismo que interaccione con el ensayo alterando los resultados.

La limpieza se efectuará mediante un baño en ultrasonidos a 40°C en una disolución 50/50 de acetona y alcohol durante 10 min y un posterior baño en ultrasonidos a 40°C en agua destilada durante 10 min para eliminar cualquier rastro de la acetona. A continuación, se secarán las muestras y se introducirán una a una en un sobre para esterilización, que será adecuadamente etiquetado para no perder la trazabilidad durante el proceso de esterilización.

Durante la esterilización, se llevará a cabo un autoclavado de las muestras a una temperatura de 121°C y presión máxima de 110 kPa durante 30-50 minutos.

Asimismo, como se ha de realizar una inoculación de las muestras también será necesario la preparación de un cultivo en TSA (Agar Triptona-Soja) de las cepas cedidas por el Instituto de Investigación Sanitaria de la Fe, que en este caso serán la *Staphylococcus aureus* V329 y *Staphylococcus epidermidis* RP62A. Este cultivo en placa se realizará 24 horas antes de la inoculación y para ello se sembrarán directamente las cepas almacenadas del stock congelado a -80°C.

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

Una vez hecha esta preparación previa, el esquema que se va a seguir para llevar a cabo el **método de diluciones seriadas** será como el que se muestra en la figura 16, el cual consta de los siguientes pasos:



Figura 16. Pasos del ensayo de colonización (1: generación del inóculo, 2: inoculación de las muestras, 3: incubación, 4: limpieza de los discos y medio, 5: sonicación, 6: diluciones seriadas, 7: siembra en placa agar, 8: incubación y 9: conteo de UFC)

1. Generación de un inóculo de la cepa bacteriana.

Este inóculo se preparará en condiciones de esterilidad bien en campana de bioseguridad o por proximidad a una llama.

Para ello, con un asa de siembra se tomará una colonia y se resuspenderá dentro del tubo, para posteriormente disgregar la colonia mediante un agitador vórtex. Después se medirá la turbidez del inóculo con un turbidímetro, teniendo que obtener un valor de 0,5 en el estándar McFarland el cual corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml.

En el caso de que la turbidez sea inferior se repetiría el proceso tomando una nueva colonia, resuspendiéndola y agitando mediante agitador vórtex. En el caso opuesto, donde el valor fuese mayor a 0,5 se tomarían 200 μ l del inóculo, se desecharían y se verterían 200 μ l de PBS, midiendo de nuevo la turbidez repitiendo este paso tantas veces como fuesen necesarias.

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

2. Inoculación de la cepa bacteriana sobre las muestras.

Para ello, dentro de la campana de bioseguridad se depositarán tres muestras de cada tipo (forja, EBM_AI, EBM_EU, DMLS_3D y DMLS_EU) en pocillos separados, obteniendo un total de 15 muestras por microplaca. A continuación, se verterá 1 ml de una disolución de TBS (caldo de soja tripticaseína) + 0,25 % glucosa en cada pocillo y en cuatro pocillos más sin muestras de titanio, de los cuales dos serán el control positivo que asegurará que el inóculo preparado previamente era viable, y las otras dos serán controles negativos para asegurar que el medio de cultivo de TBS + 0,25% glucosa no estaba contaminado.

Después se verterán 20 μ l del inóculo bacteriano en cada pocillo y en los dos pocillos destinados a control positivo.

3. Incubación en estufa.

Una vez inoculadas las muestras, se introducirá la microplaca en la estufa a 37°C durante 48 horas

Puesto que cabe la posibilidad de que los controles negativos puedan contaminarse durante el proceso de inoculación, para aumentar el control sobre el proceso también se introducirá durante 48h en la estufa el tubo Falcon o frasco con el medio de cultivo utilizado para rellenar los pocillos. De este modo, si hay crecimiento bacteriano en el control negativo, pero no en el medio de cultivo se sabrá que ha sido durante el proceso, en caso de no hacerlo no se podrá saber si estaba contaminado o no.

4. Limpieza del medio de cultivo y eliminación de bacterias no adheridas

Este paso también se realizará en condiciones de esterilidad, por lo que se llevará a cabo de nuevo en la campana de bioseguridad. En él se realizará una extracción aséptica del medio de cultivo de cada pocillo mediante un aspirador de vacío evitando tocar la muestra para no dañar el posible biofilm generado sobre su superficie. Después se verterá en cada pocillo 1 ml de PBS para lavarlo y se volverá a succionar el líquido. Posteriormente, se introducirá cada muestra en un tubo Eppendorf con 1 ml de TSB estéril previamente cargado.

5. Desprendimiento de las bacterias adheridas a la superficie

Mediante agitación y sonicación se pretende desprender el biofilm de la superficie de la muestra para que este pase al medio. Para ello, en cada tubo Eppendorf se realizará una agitación vorticial durante 1 min a 2500 rpm. Después se realizará una sonicación durante 5 min a 50 kHz y finalmente se volverá a realizar una agitación vorticial, 1 min a 2500 rpm.

6. Diluciones seriadas

El **método de diluciones seriadas** es una técnica que permite conocer el número de gérmenes viables en una muestra a partir de la determinación del parámetro de unidades formadoras de colonias /ml*cm² (UFC/ml*cm²). Puesto que una colonia puede estar formada por uno o más microorganismos viables, para evitar esta infraestimación se efectúan sucesivas diluciones y posteriores sembrados.

Para realizar las diluciones, en condiciones de esterilidad, se preparará en una regleta 5 tubos eppendorf por cada muestra y se cargarán con 0,9 ml de solución fisiológica NaCl al 0,9%. Para llevar a cabo la primera dilución (1/10) se tomarán 100 μ l de TSB del tubo eppendorf con la muestra

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

inoculada de titanio y se verterán en un tubo eppendorf. A continuación, se cargarán 100 µl de este tubo que se verterán en el tubo de la dilución 1/100, repitiendo este proceso hasta alcanzar la dilución 1/10⁵.

7. Siembra en placas agar

De nuevo en condiciones de esterilidad, se realizará el sembrado de las muestras en placas agar de TSA. Para ello se rotularán las placas con el identificador de la muestra y en una fila se indicará el factor de dilución que se va a sembrar en cada columna de la placa (sin diluir, -1, -2, -3, -4 o -5) tal como se observa en la figura 17. A continuación, se verterán de dos en dos 10 µl de cada eppendorf correspondientes al factor de dilución rotulado en la placa, y se inclinará esta ligeramente para que la gota caiga formando una columna, evitando que cada columna se fusione o que toque el borde de la placa (figura 18).

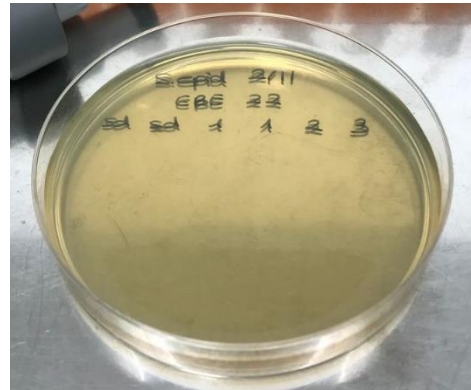


Figura 17. Placa agar rotulada

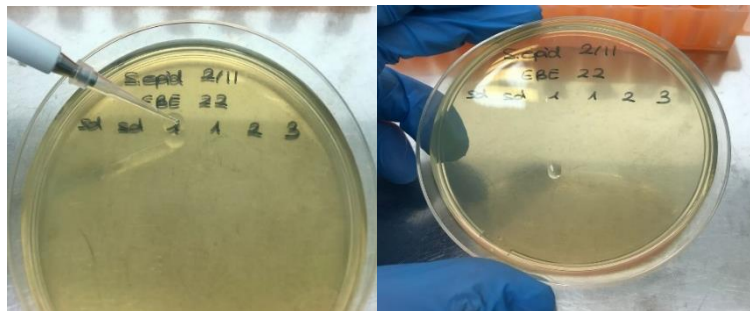


Figura 18. Siembra de 10µl (izquierda) y extensión por inclinación de la placa (derecha)

8. Incubación de las placas agar

Después del sembrado, se incubarán las placas sembradas durante 48h a 37°C en estufa.

9. Conteo de UFC

En último lugar, se realizará un conteo de las colonias formadas en cada columna, correspondiente a un factor de dilución determinado, para poder obtener las UFC/cm²ml.

Para calcular este parámetro se empleará la fórmula que se muestra a continuación:

$$\frac{UFC}{ml \cdot cm^2} = \frac{N^{\circ} \text{ colonias}}{ml \text{ sembrados en placa} \cdot \text{superficie expuesta}} * \text{inversa factor de dilución} \quad (6)$$

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

A la hora de realizar el conteo, es necesario considerar que para diluciones donde el número de colonias es elevado (>300) y estas crezcan de forma agregada, el error durante el conteo será muy alto por lo que se considerarán como no contables. Asimismo, si en una dilución hay alrededor de 20 colonias, es posible que la dilución menor sea ya no contable.

De igual modo, es importante aplicar este protocolo una vez por cada cepa antes de determinar los factores de dilución finales, sembrando todas las diluciones (de -1 a -5) y sin diluir, con el objetivo de observar en cuales hay un crecimiento o no. Por ejemplo, puede darse el caso que para las diluciones a la -4 o -5 no hubiese un crecimiento de UFC y en las diluciones a la -1 fuesen no contables, por tanto, se ajustarían los sembrados en placa a las diluciones -2 y -3.

2.5.2. Microscopía confocal de fluorescencia

La microscopía confocal es un tipo de microscopía de fluorescencia que permite obtener imágenes de muestras biológicas con una elevada resolución gracias a la posibilidad de captar secciones a lo largo del eje z de una muestra que previamente ha sido marcada mediante fluorescencia.

Para obtener las imágenes utiliza una fuente de luz láser capaz de focalizar la luz en un punto del plano a una longitud de onda que abarca desde el azul hasta el rojo lejano. Este haz láser realiza un escaneo rápido a lo largo del plano, recogiendo la fluorescencia emitida en cada punto y filtrando la señal procedente de fuera del foco gracias a un diafragma denominado *pinhole* (figura 19) (Universitat d'Alacant, 2011).

El objetivo final de esta prueba será analizar cualitativamente si existen diferencias atribuibles a la microestructura en la colonización superficial de las muestras por parte de las bacterias *S.epidermidis* y *S.aureus*.

Para llevarlo a cabo, en primer lugar, se ejecutarán los pasos 1 a 3 explicados en el apartado 2.5.2 de planificación (ensayo de colonización). A continuación, puesto que es necesario el fenómeno de fluorescencia para analizar las muestras y las cepas bacterianas analizadas no son fluorescentes, se marcarán mediante un kit de fluorescencia vida/muerte las bacterias.

Este kit consta de dos colorantes con afinidad por los ácidos nucleicos y que difieren en sus características espectrales y en su capacidad de penetración en bacterias sanas. El fenómeno de fluorescencia se da gracias a que el colorante SYTO® 9 tiñe de verde todas las bacterias cuando se usa por sí solo, sin embargo, junto al yoduro de propidio, el cual penetra únicamente en las bacterias con

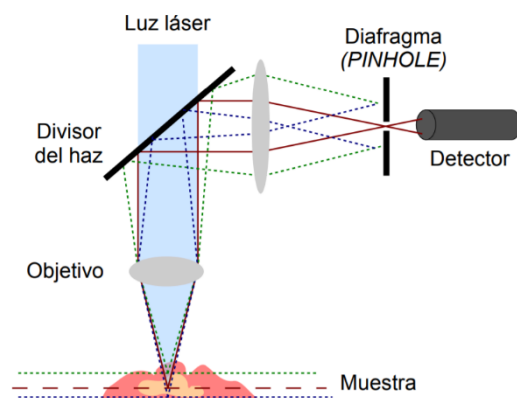


Figura 19. Esquema básico de funcionamiento del microscopio confocal (Universitat d'Alacant, 2011)

membranas dañadas (muertas), la tinción fluorescente del SYTO 9 disminuye, y las bacterias muertas se tiñen de color rojo.

Finalmente, se analizarán las muestras en el microscopio confocal, tomando imágenes a 50 y 100 aumentos observando si existen diferencias cualitativas en la fluorescencia o distribución de las bacterias sobre la superficie.

2.5.3. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)

El FESEM es una técnica que permite analizar y examinar muestras biológicas con una gran resolución.

Sus fundamentos físicos son iguales a los del SEM y para ello emplea un haz de electrones que interactuará elástica e inelásticamente con la muestra. En la dispersión elástica el electrón incidente es desviado por el núcleo o por electrones de la capa externa que tengan una energía similar, disminuyendo su energía y cambiando su ángulo de incidencia debido a la interacción. Aquellos que son dispersados a más de 90° se llaman electrones retrodispersados los cuales presentan energías mayores a 50 eV y son empleados para conocer la composición superficial y obtener información sobre la topografía de la muestra (Zhou, Apkarian, Wang, & Joy, 2007).

Por otra parte, en la dispersión inelástica hay una transferencia de energía entre los electrones del haz y los de los átomos del material que da lugar a una excitación y generación de electrones secundarios caracterizados por energías menores a 50 eV, utilizados para visualizar la rugosidad y superficie en el orden de 10 nm (Zhou et al., 2007).

Asimismo, fruto de la interacción del haz de electrones con el material también se generan Rayos X. Estos rayos se generan cuando un electrón del haz colisiona y desplaza un electrón de la capa interna del material. Para reestablecer el equilibrio de cargas, un electrón de la capa externa se desplazada hasta esa vacante ionizándose. Para volver a su estado neutro, el átomo libera un fotón de Rayos X, que tendrá un pico e intensidad característicos en función del átomo o compuestos presentes, pudiendo obtener información sobre la composición química superficial del espécimen (Zhou et al., 2007).

La principal diferencia entre el SEM y el FESEM es que en el FESEM se emplea un cañón de electrones de emisión de campo capaz de generar electrones de alta y baja energía localizados, incrementando la resolución espacial, pudiendo trabajar a potenciales muy bajos (0,02-5 kV) y evitando el daño de muestras sensibles como pueden ser las muestras biológicas (Universidad Politécnica de Valencia (UPV), s.f.).

Asimismo, presenta detectores en la lente capaces de detectar los electrones retrodispersados y secundarios además de los característicos rayos X, mejorando la resolución, contraste y capacidad de detección de la composición química en puntos concretos de la superficie.

En el examen de muestras biológicas serán necesario realizar una preparación previa de las mismas, pues la interacción del haz de electrones con las bacterias las rompería y disgregaría, haciendo imposible su análisis.

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

En primer lugar, siguiendo los pasos 1 a 4 del apartado de planificación 2.5.2. (ensayo de colonización), se llevará a cabo una inoculación e incubación durante 48 h de dos muestras de los cinco tipos diferentes analizados durante este proyecto, una de ellas se inoculará con *S.epidermidis* mientras que la otra con *S.aureus*.

Una vez retirado el medio de cultivo, se realizará la criofijación de las bacterias mediante nitrógeno líquido (-196 °C). De esta forma, a partir de un enfriamiento ultrarrápido (10^6 K/S) de las muestras se congelarán las fases líquidas evitando la formación de cristales de hielo y manteniendo su estructura (Pilhofer et al., 2010).

A continuación, se introducirá la muestra en una cámara de alto vacío y se llevará a cabo la sublimación del agua de las muestras a -90°C durante 7 minutos. El objetivo de este paso es desecar las muestras para posteriormente poder recubrirlas con un material conductor.

El recubrimiento conductor será de platino y se efectuará por pulverización catódica durante 60 segundos a 10 mA.

Una vez estén las muestras preparadas, se introducirán en el microscopio y se realizará un análisis a 2 kV, tomando imágenes a 1000, 5000, 15000 y 50000 aumentos en distintas zonas cada muestra.

En el caso de que fuese necesario, se realizará un análisis de las imágenes mediante el software ImageJ con tal de analizar parámetros como longitudes o áreas.

3. Material y métodos

En esta sección se mostrarán los materiales y maquinaria empleados, así como los métodos para ejecutar los apartados expuestos en el apartado 2 de planificación.

3.1. Preparación de las probetas

A continuación, se muestran los materiales y métodos para llevar a cabo el corte, embutición, lijado, pulido y desembutición de las muestras.

Las máquinas empleadas fueron:

- Máquina de corte Accutom-5 de Struers
- Embutidora Labo-Press3 de Struers
- Lijadora Knoth-Rotor-3 de Struers
- Pulidora semiautomática Rotopo-11 de Struers
- Secador de pelo HT3393 de Clatronic
- Microscopio óptico Eclipse LV100 de Nikon

Mientras que los materiales fueron:

- Polvo de embutición de resina conductora PolyFast de Struers
- Suspensión de diamante de 9 μm DiaPro de Struers
- Agua oxigenada
- Alcohol etílico (95^º)
- Agua destilada

El **corte** de las muestras se realizó con la máquina de corte Accutom-5. Para ello en primer lugar, se colocó la correspondiente hoja de sierra con un grosor de 0,5 mm y se fijó la muestra cilíndrica de forma que su superficie plana quedara horizontal y paralela al suelo. A continuación, mediante la máquina de control numérico incorporada en la máquina, se acercó la hoja de sierra el máximo posible a la muestra sin llegar a contactar y se calibró esa posición como el origen.

Teniendo en cuenta que el diámetro de la muestra es de 25 mm se determinó un desplazamiento en el eje X (horizontal) de 28 mm con tal de asegurar que la hoja de sierra atravesara completamente el fragmento. Asimismo, como el objetivo era obtener probetas con un grosor de 1,5 mm, después de cada corte se desplazó la hoja de sierra 2 mm en el eje Y, llevando a cabo estos pasos tantas veces como fueron necesarias hasta obtener el número de láminas necesarias.

A continuación, dichas láminas se cortaron por la mitad y posteriormente, las dos mitades obtenidas de cada lámina se cortaron en fragmentos de entre 3 y 6 mm de anchura.

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

El proceso de **embutición** se efectuó mediante la embutidora Labo-Press3 de Struers. Se introdujo la muestra, se cubrió con resina conductora, se introdujeron los parámetros indicados en el apartado 2.2. de planificación (preparación de las probetas) en la embutidora y se ejecutaron. Como la resina conductora es de color negro, para asegurar la trazabilidad de las muestras embutidas al final de cada embutición, mediante un punzón se escribió el identificador de cada muestra en el lateral de la pastilla embutida.

A continuación, se llevó a cabo el proceso de **lijado**. Antes de iniciarlo, se vertió en un crisol suficiente alcohol etílico como para sumergir la muestra embutida y se llenó una botella de compresión con agua destilada.

Posteriormente se colocó el disco de lija de granulometría 220 en la lijadora Knoth-Roto-3, se seleccionaron 300 revoluciones/min, se abrió la llave del agua de la lijadora y se encendió la máquina. Para llevar a cabo el lijado de la muestra, la superficie de esta se colocó de forma paralela al disco, manteniendo una misma orientación y se aplicó una presión suave y distribuida homogéneamente sobre la misma para que entrara en contacto con la lija.

Lijada la superficie, se apagó la máquina, se limpió la muestra con agua destilada, se sumergió en el crisol con alcohol y finalmente se secó mediante el secador.

Con tal de comprobar que se realizó correctamente el lijado, después del secado se colocó la muestra en el microscopio óptico y se observó que la muestra presentaba líneas de lijado sobre toda su superficie y que estas llevaban una misma orientación.

Hecho esto, se procedió a realizar el lijado con los discos de mayor granulometría: 500 y 1000 μm . El procedimiento fue el mismo que para el lijado con 220 μm con la particularidad de que al cambiar de disco se ha de cambiar también la orientación de la muestra colocándola perpendicular al anterior lijado. Asimismo, se comprobó entre cada lijado que toda la superficie presentaba líneas de lijado en una misma dirección.

Para el **pulido** de las muestras se utilizó una pulidora semiautomática Rotopol-11 de Struers. Este proceso constó de dos pasos: un pulido grueso y un pulido fino.

Para el pulido grueso se colocó el paño MD-grueso en la pulidora, se dispusieron tres muestras en el portamuestras, se seleccionaron 300 revoluciones/min y se cargaron 3 ml con la suspensión de diamante de 9 μm DiaPro de Stuers. A continuación, se encendió la máquina y cada 10 segundos se vertió una gota en el centro del paño hasta que se acabó el contenido de la jeringuilla.

Después, se sacaron las muestras y se lavaron las superficies con cuidado con agua para eliminar los restos de la suspensión de diamantes, se sumergieron en alcohol y se secaron de nuevo.

Para el pulido fino se acopló el paño fino MD-Chem, se colocaron las muestras en el portamuestras, se seleccionaron 300 revoluciones/min y en un vaso de precipitados se mezclaron 10 ml de suspensión de sílice coloidal OP-S Suspensión con 1 ml de agua oxigenada con los que posteriormente se cargó una jeringuilla.

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

Una vez encendida la pulidora, se vertió una gota/seg de la jeringuilla en el centro del paño hasta que se acabó su contenido y se limpiaron las muestras tal como en el paso anterior: agua destilada, alcohol y secado.

Al final del proceso, la superficie de la muestra ha de presentar un efecto espejado. En el caso de que hubiese un efecto biselado o el efecto no fuese homogéneo se repetiría el proceso de pulido desde el principio e incluso si fuese necesario el lijado.

3.2. Caracterización microestructural y topográfica

3.2.1 Difracción de Rayos X (XRD)

La maquinaria empleada en este ensayo fue:

- Difractómetro de Rayos X D2 Phaser de Bruker

Para llevar a cabo la XRD se colocó la muestra dentro del difractómetro, se indicaron en el software los parámetros especificados en el apartado 2.3.1 de planificación y se efectuó el ensayo.

El procesamiento y análisis de los datos obtenidos se ejecutó igualmente siguiendo las pautas explicadas en el apartado 2.3.1. de planificación.

3.2.2. Microscopía óptica (MO)

El microscopio empleado en esta prueba fue un Nikon Eclipse LV100.

Siguiendo las directrices expuestas en el apartado 2.2.2 de planificación, se realizó un ataque químico de la superficie de las muestras pulidas tomando un algodón, mojándolo del reactivo de Kroll y frotándolo suavemente contra la superficie.

Se dejó actuar al reactivo durante 2-3 seg, tras los cuales se sumergió la muestra en alcohol etílico (96°), se lavó con agua y finalmente se aclaró con agua destilada.

En el microscopio se realizó un barrido de la superficie y se tomaron imágenes a 50, 100 y 200.

3.2.3. Perfilometría óptica

La maquinaria utilizada para la perfilometría fue el perfilómetro óptico Profilm3D de Filmtec.

En esta prueba se colocó la muestra en el centro del perfilómetro y mediante el software se autoenfocó el microscopio sobre la misma. A continuación, se inició la captura de imágenes en el eje Z de forma

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

automática gracias al software Profilm, incorporado en el ordenador, y posteriormente se analizaron los parámetros de rugosidad S_a , S_q , S_{kw} , y S_{ku} .

Puesto que la superficie de las muestras no era completamente horizontal, antes de calcular los parámetros se realizó una normalización de las imágenes obtenidas mediante el propio software.

3.3. Caracterización mecánica

3.3.1 Ensayo de dureza Vickers

La única máquina usada en este caso fue el durómetro HD9-45 de Centaur.

Siguiendo los pasos indicados en el apartado 2.4.1. de planificación, se acopló el indentador tipo bola 1/16" en el durómetro, se colocó la muestra y se aplicó la fuerza en 5 puntos diferentes de la muestra anotando el valor en cada medición.

3.3.2. Ensayo de microdureza Vickers

En este caso, la máquina usada fue el microdurómetro HMV de Shimadzu.

En este caso el propio software del microdurómetro permitió establecer el tipo de ensayo (0.3 HV) y por tanto, los parámetros de fuerza y tiempo descritos en el apartado 2.4.2. de planificación.

En primer lugar, con el microscopio incorporado al microdurómetro se realizó un escaneo a 40 aumentos de la superficie de la muestra pulida y se seleccionó como punto de aplicación de la fuerza aquella donde no habían irregularidades ni bordes de grano.

Una vez seleccionado el punto, la propia máquina intercambió el objetivo del microscopio por el indentador y aplicó la carga.

Pasado el tiempo de aplicación de la carga, se volvió a intercambiar el indentador por el objetivo del microscopio, y mediante el propio software integrado, se calculó la longitud de las diagonales de la indentación y con ello los valores de microdureza y dureza Vickers HR15N.

El proceso se repitió en 5 puntos distintos de la superficie de cada muestra y se anotaron los valores obtenidos en cada uno de ellos.

3.4. Caracterización microbiológica

En este apartado se mostrarán los materiales y métodos realizados en los ensayos de colonización, microscopía confocal y FESEM de las muestras colonizadas.

3.4.1. Ensayo de colonización

Los materiales empleados en este apartado fueron:

- *Staphylococcus epidermidis* (V329)
- *Staphylococcus aureus* (RP92A)
- Microplaca de 24 pocillos
- Bolsa de esterilización autosellable
- Caldo de cultivo digerido de soja y caseína (TSB)
- Solución tampón fosfato alcalino (PBS)
- Agar Triptona-Soja (TSA)
- Solución de glucosa al 20%
- Alcohol etílico (90º)
- Puntas de pipetas de 10, 100 y 1000 µl
- Alcohol etílico (96º)
- Acetona
- Agua destilada
- Placas de Petri

La maquinaria fue:

- Pie de rey digital
- Balanza de precisión XB 120A de Precisa
- Pipeteador automático EppendorfResearch Plus de Eppendorf
- Incubadora IN450plus de Memmert
- Autoclave STE-8-D de icanClave
- Limpiador de ultrasonidos Emasonic S30H de Elma
- Aspirador de vacío FTA-1 de Biosan
- Agitador vorticial ZX3 de Velp Scientifica
- Cabina de bioseguridad clase II AC2-4E de Esco

Puesto que para el ensayo microbiológico es necesario conocer la superficie de las muestras expuesta a las bacterias, antes de la limpieza y esterilización se midieron las dimensiones de cada muestra mediante un pie de rey digital.

A continuación, se limpiaron y esterilizaron las muestras siguiendo los pasos descritos en el protocolo del apartado 2.5.1.

Asimismo, 24 horas antes del ensayo se realizó un pase de las correspondientes cepas directamente desde el stock congelado a -80ºC. Para ello, en condiciones de esterilidad se sembraron en una placa agar y se introdujeron en estufa de incubación.

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

Para la generación del inóculo, siguiendo los pasos indicados en el apartado 2.5, se tomó una colonia aislada de *S.epidermidis* o *S.aureus*, se introdujo en 2 ml de PBS y se aplicó agitación vorticial hasta disgregarla.

Antes del proceso de inoculación, fue necesaria la elaboración de una disolución de medio de cultivo TSB con glucosa con tal de facilitar el crecimiento de las bacterias. Como se disponía de una solución de glucosa filtrada al 20% y se querían preparar 24 ml de TSB+0,25% glucosa, se vertieron en un tubo Falcon 23,7 ml de TSB y 0,3 ml de glucosa al 20%.

En el paso de inoculación e incubación se siguieron los pasos descritos en el apartado de planificación 2.5.1.

Para la limpieza de los discos, se sacó la placa microtituladora de la incubadora y se introdujo en la cabina de bioseguridad. A continuación, con un aspirador de vacío se eliminó el medio de cultivo de los pocillos uno a uno, cambiando la punta de pipeta entre cada pocillo para evitar contaminar las muestras entre sí. Después, se vertió cuidadosamente y sin apuntar directamente a la superficie de la muestra 1 ml de PBS en cada pocillo con el objetivo de lavar y eliminar aquellas bacterias planctónicas que no estaban adheridas y posteriormente, se eliminó el ml de PBS con el aspirador de vacío.

Antes de sacar las muestras, se cargaron 15 tubos eppendorf (2 ml) con 1 ml de TSB y con una pinza estéril por cada muestra se sacaron las mismas de los pocillos y se introdujeron en los tubos, rotulados con el correspondiente código de identificación de cada muestra.

Después, siguiendo los pasos indicados en el apartado 2.5. de planificación, se realizó una agitación vorticial, sonicación y posterior agitación vorticial.

El siguiente paso consistió en realizar las diluciones seriadas. Para ello, en la campana de bioseguridad se dispusieron por cada muestra 5 tubos eppendorf (1,5 ml) cargados previamente con 0,9 ml de una disolución de NaCl 0,9%. En concreto, cada tubo se usó para una dilución, que fue desde 10^{-1} hasta 10^{-5} . Para realizar la primera dilución (10^{-1}), se aplicó una breve agitación vorticial (3 seg) al tubo eppendorf con la muestra y TSB y se tomaron 100 μ l del mismo que se vertieron en el tubo rotulado con la dilución a la -1. A continuación, a este tubo (dilución a la -1) se le aplicó de nuevo agitación vorticial, se tomaron 100 μ l del mismo y se introdujeron en el tubo de la dilución a la -2, repitiendo este proceso hasta que se alcanzó el tubo de la última dilución (10^{-5}).

Después, se procedió a realizar la siembra de las diluciones en las placas agar. Para ello se rotuló la base de la placa con el número correspondiente a la dilución que se vertió en cada columna y se tomaron 10 μ l del eppendorf pertinente a cada dilución, se vertieron cual gota sobre el agar y se inclinó ligeramente la placa para que la misma corriera sobre la superficie del agar.

Para las cepas de *S. aureus* las columnas sembradas correspondieron a las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} (2 columnas) y 10^{-4} . Para el *S.epidermidis* se sembraron diluciones de 10^{-1} (2 columnas), 10^{-2} , 10^{-3} y sin diluir (2 columnas). La elección de las mismas responde al ensayo previo realizado por cada cepa tal como se indicó en el apartado 2.5. de planificación. En dicho ensayo previo se observó que para el *S. epidermidis* a las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} no hubo crecimiento, mientras que las UFC en las diluciones 10^{-1} aún eran contables.

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

Una vez sembradas las placas agar, se introdujeron en incubadora a 37°C durante 24 horas y posteriormente se sacaron y se contaron el número de colonias en cada columna de dilución, calculando el UFC/ml*cm².

3.4.2. Microscopía confocal de fluorescencia

Los materiales utilizados han sido:

- *Staphylococcus epidermidis* (V329)
- *Staphylococcus aureus* (RP92A)
- Microplaca de 24 pocillos
- Caldo de cultivo digerido de soja y caseína (TSB)
- Solución tampón fosfato alcalino (PBS)
- Solución de glucosa al 20%
- Puntas de pipetas de 10, 100 y 1000 µl
- Kit de viabilidad bacterial LIVE/DEATH™ BacLight™

Mientras que la maquinaria usada fue:

- Pipeteador automático EppendorfResearch Plus de Eppendorf
- Incubadora IN450plus de Memmert
- Agitador vorticial ZX3 de Velp Scientifica
- Cabina de bioseguridad clase II AC2-4E de Esco
- Microscopio Confocal TCS-SP5-AOBS de Leica

Para realizar el ensayo de microscopía confocal en primer lugar se realizó un ensayo de colonización en microplaca siguiendo la misma metodología que la explicada en el apartado anterior (3.4.1.) e inoculando *S.aureus* y *S.epidermidis* en una muestra de cada tipo.

Pasadas las 48 horas, se sacó la microplaca de la estufa de cultivos, se tiñeron las muestras con el kit de viabilidad bacterial siguiendo las instrucciones marcadas por el fabricante y se tomaron imágenes de cada muestra a 50 y 100 aumentos.

3.4.3. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)

Los materiales utilizados han sido:

- *Staphylococcus epidermidis* (V329)
- *Staphylococcus aureus* (RP92A)
- Microplaca de 24 pocillos

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

- Caldo de cultivo digerido de soja y caseína (TSB)
- Solución tampón fosfato alcalino (PBS)
- Solución de glucosa al 20%
- Puntas de pipetas de 10, 100 y 1000 μ l

Mientras que la maquinaria usada fue:

- Pipeteador automático EppendorfResearch Plus de Eppendorf
- Incubadora IN450plus de Memmert
- Agitador vorticial ZX3 de Velp Scientifica
- Cabina de bioseguridad clase II AC2-4E de Esco
- Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo modelo Ultra 55 de Zeiss

Siguiendo los mismos pasos que para el ensayo microbiológico explicado en el apartado 3.4.1., se llevó a cabo la inoculación de las muestras con ambas cepas y se incubaron en estufa durante 48h a 37°C.

A continuación, se eliminó el medio, y se lavaron las muestras mediante PBS dos veces para descartar las bacterias no adheridas.

Para asegurar la correcta criogenización de las muestras, en primer lugar, se introdujo el nitrógeno líquido en una cámara de vacío hasta que alcanzó el punto de nieve. Una vez alcanzado, se eliminó el vacío para que se volviera líquido de nuevo y se sumergió la muestra en el nitrógeno, observando la formación de burbujas alrededor de la misma. Cuando el nitrógeno paró de hervir, se sacó la muestra y se selló de nuevo el nitrógeno y la muestra en la cámara de vacío.

Cuando se obtuvo el vacío, se volvió a introducir la muestra en nitrógeno y se sacó un poco antes de que alcanzara el punto de nieve y solidificara.

Manteniendo el vacío, se realizó una sublimación de la muestra durante 7 minutos a -90°C y a continuación se recubrió la misma con Pt mediante pulverización catódica para asegurar la conducción electrónica.

Finalmente se tomaron imágenes a 100, 1000, 5000, 15000 y 50000 aumentos de distintas zonas de la superficie.

4. Resultados y discusión

En esta sección se mostrarán los resultados de los tres principales bloques de ensayos realizados:

- Caracterización microestructural y topográfica
- Caracterización mecánica
- Caracterización microbiológica

4.1. Caracterización microestructural y topográfica

En este apartado se mostrarán los resultados de la difracción de Rayos X, FESEM y perfilometría óptica.

4.1.1. Difracción de Rayos X (XRD)

En primer lugar, antes de analizar y discutir los resultados de este ensayo es necesario mencionar que se realizó un tratamiento de los datos eliminando aquellos comprendidos entre los 20 y 30º debido a la aparición de ruido en todas las muestras. No obstante, la eliminación de estos datos no supone una pérdida de información pues no existen picos característicos en el patrón de difracción del Ti6Al4V hasta pasados los 30º (Safdar et al., 2012).

Por motivos desconocidos, el ajuste no fue el deseado y los valores de R_w se situaron entre el 15 y 23%. Tal como se indicó en el apartado de planificación (2.1.1.) se añadieron otras fases de Ti como el Ti α' y TiO₂ obteniendo peor ajuste por lo que se decidió hacerlo finalmente con las fases de Ti α y β .

A consecuencia de ello, no se pudo obtener información válida respecto al porcentaje en peso de cada fase en las diferentes muestras. Sin embargo, sí que se pudo obtener el patrón de difracción de cada tipo de muestra, tal como se muestra en la figura 20.

En ellos destaca la aparición de cuatro picos de intensidad. Los tres picos que se visualizan con mayor facilidad son el primero (35,3º), segundo (38,6º) y cuarto (40,4º). Son característicos de la fase de Ti α y representan los planos cristalográficos (100), (002) y (101) respectivamente.

Por otra parte, si se presta mayor atención se puede apreciar la aparición de un tercer pico a los 39,4º, camuflado entre las pendientes descendente y ascendente del segundo y cuarto pico. Teniendo en cuenta el artículo publicado por Safdar et al. en 2012 y las indicaciones del propio software, se puede afirmar que este pico corresponde a la fase de Ti β y al plano cristalográfico (110).

En cuanto a la intensidad de los picos, se puede observar que el pico principal de Ti α aumenta en los métodos de fabricación aditiva respecto al forjado. En las dos muestras de EBM se aprecia que el valor es similar (alrededor de 7500 u.a.), sin embargo, en las de DMLS hay una diferencia de alrededor de 2500 u.a. lo que implica que en la muestra de DMLS_3D hay una mayor cantidad de granos de Ti α con una orientación (101).

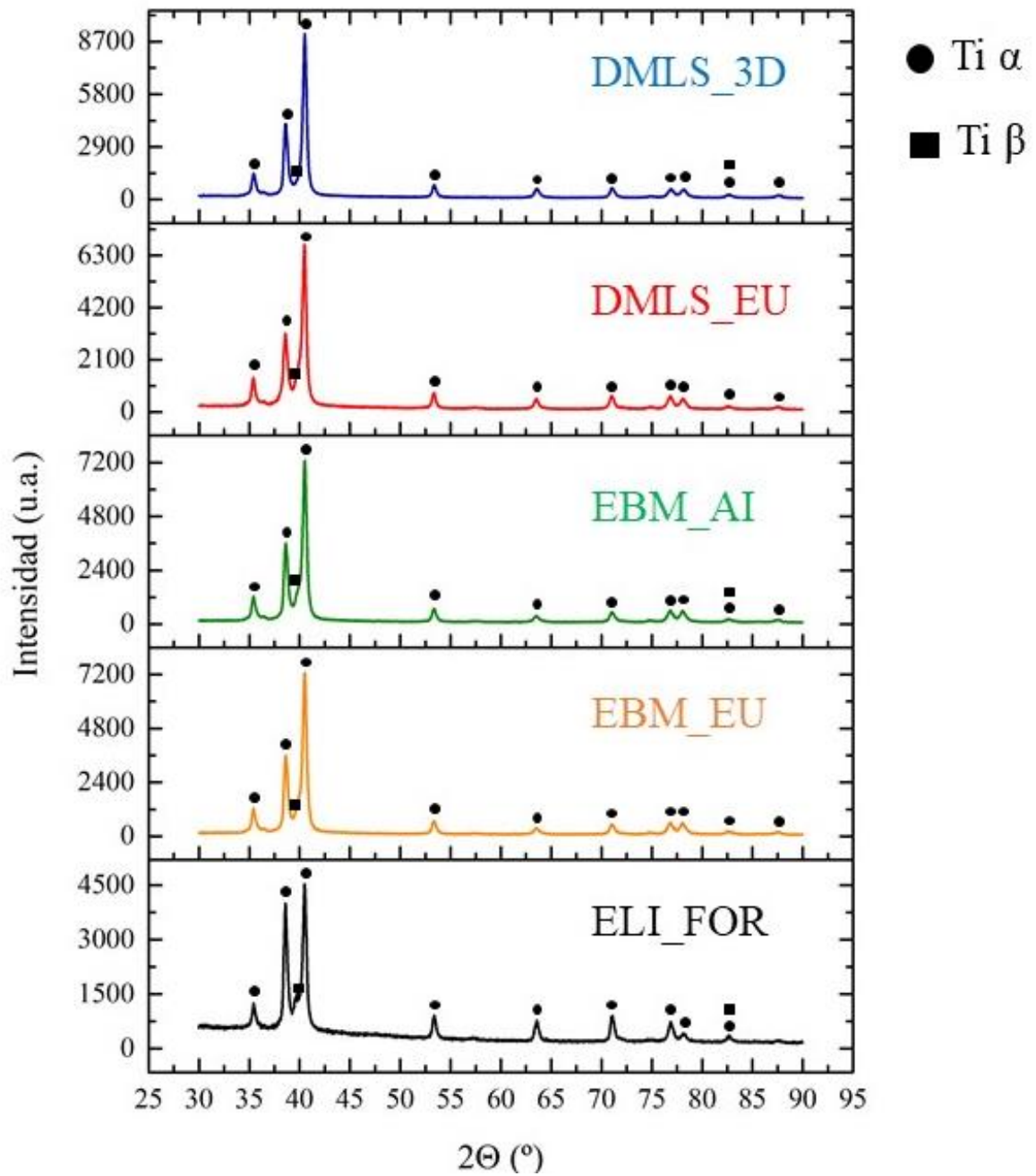


Figura 20. Patrones de difracción de las muestras de Ti6Al4V obtenidas mediante forja (ELI_FOR), DMLS (DMLS_EU y DMLS_3D) y EBM (EBM_EU y EBM_AI)

4.1.2. Microscopía óptica (MO)

En este apartado se realizará el análisis de la microestructura de las muestras observadas mediante microscopía óptica.

En la figura 21 se muestra la microestructura del Ti6Al4V sometido a un tratamiento de forjado. A 50 aumentos (img. a) se visualiza una distribución de las fases α y β de Ti con una orientación vertical en el sentido de la deformación durante el forjado. A 200 aumentos (img. b) se observa mejor la estructura mill annealing representativa del forjado, caracterizada por la presencia de granos α (fase más clara) más o menos equiaxiales rodeados de Ti β (fase más oscura) en borde de grano que también se agrupa para formar pequeñas ínsulas a lo largo de la superficie.

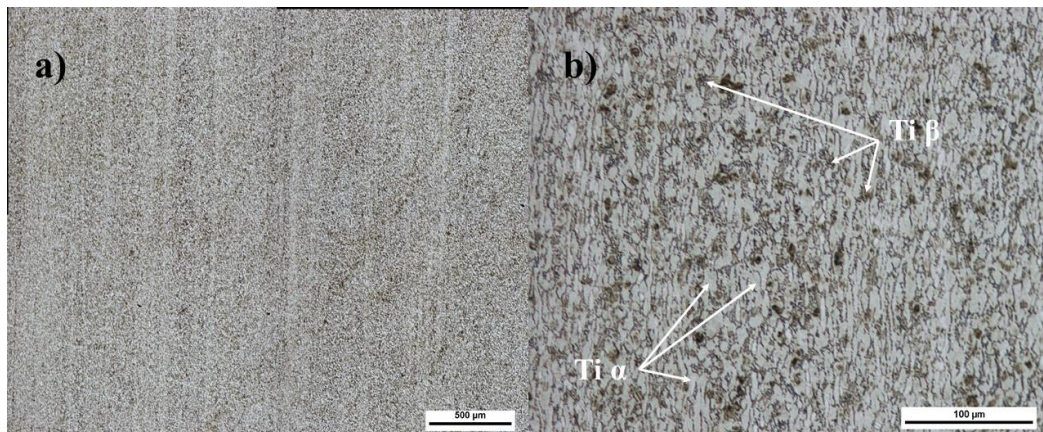


Figura 21. Microscopía óptica de Ti6Al4V forjado a 50 aumentos (a) y a 200 aumentos (b)

En la figura 22 se muestra la microestructura de una muestra fabricada mediante EBM de la empresa Aimee. A 50 aumentos (img. a), tal como era esperable se advierte una direccionalidad de los granos determinada por la propagación del haz de electrones y resaltada mediante una flecha amarilla. Asimismo, teniendo en cuenta que la superficie analizada corresponde a un corte transversal al eje z de formación de la muestra, también se visualiza la presencia de capas, separadas en la imagen mediante una línea discontinua blanca y cuyo grosor se encuentra alrededor de los 200 μm .

De igual modo, se puede comprobar la presencia de poros en la superficie de la muestra, lo que indica que no se alcanzó la densificación de la probeta durante su fabricación.

En relación a las fases, a 200 aumentos (img. b) se observa la organización de los granos en una estructura de Windmástätten o laminar, donde la fase α ha crecido en forma de láminas gruesas y está rodeada de láminas finas de fase β formando pequeñas agrupaciones (Boyer, Collings & Welsch, 2007).

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

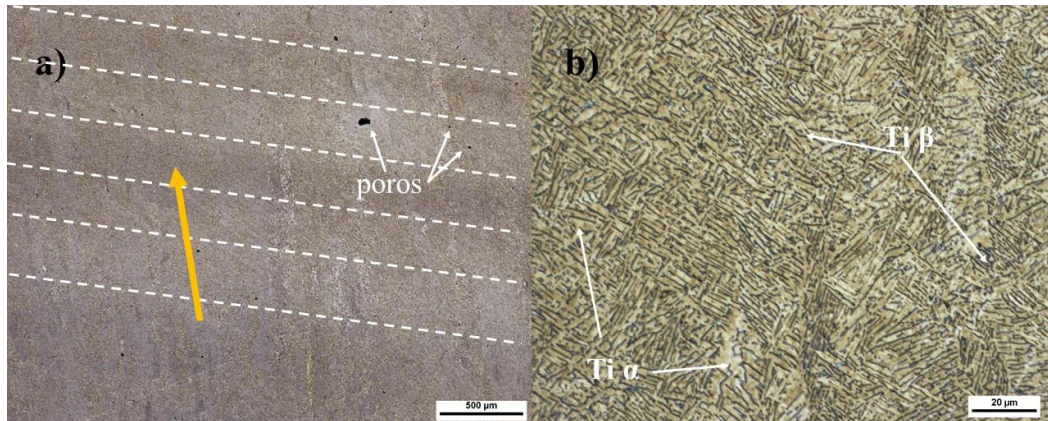


Figura 22. Microscopía óptica de Ti6Al4V obtenido mediante EBM (Aimme) a 50 aumentos (a) y 500 aumentos (b)

En la figura 23 se muestra la microestructura de la aleación obtenida mediante EBM por la empresa EU. De nuevo se advierte la direccionalidad de los granos (flecha amarilla en la img. a) y la presencia de poros y capas de formación de un grosor aproximado de 200 μm.

Asimismo, se vuelve a observar una estructura de tipo Windmástätten, aunque con una menor presencia de láminas finas de fase β y mayor proporción de fase α.

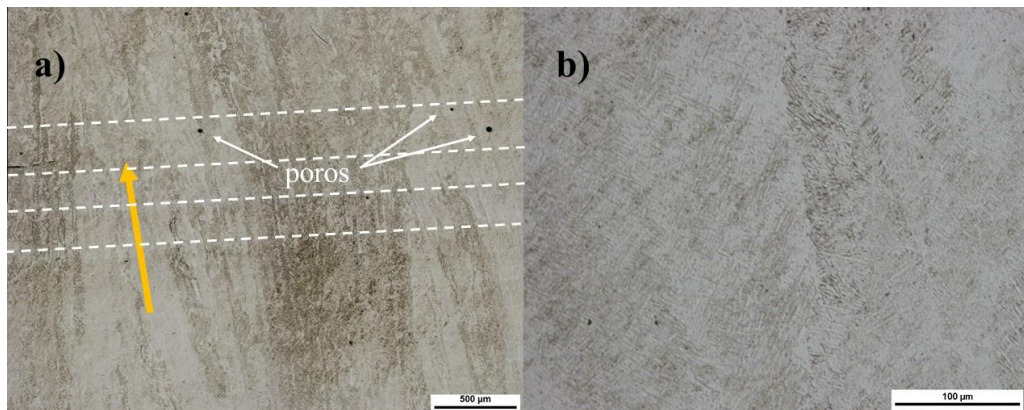


Figura 23. Microscopía óptica de Ti6Al4V obtenido mediante EBM (EU) a 50 aumentos (a) y a 200 aumentos (b)

En la figura 24. se visualiza la microestructura de la muestra obtenida mediante DMLS por parte de la empresa 3D. A 50 aumentos (img. a) se percibe una mayor porosidad superficial (pequeños puntos negros) en comparación al resto de muestras analizadas. Asimismo, también se advierte la anisotropía de la microestructura causada por el barrido del haz láser, marcada en la instantánea por una flecha amarilla y al igual que en las muestras de EBM, la presencia de capas de formación de un grosor de aproximadamente 150 μm.

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

A 200 aumentos (img. b), tal como indicaba la ASTM en sus estándares F1427, se puede visualizar rodeada por rectángulos la microestructura martensítica caracterizada por finas acículas de Ti α' rodeadas de Ti β .

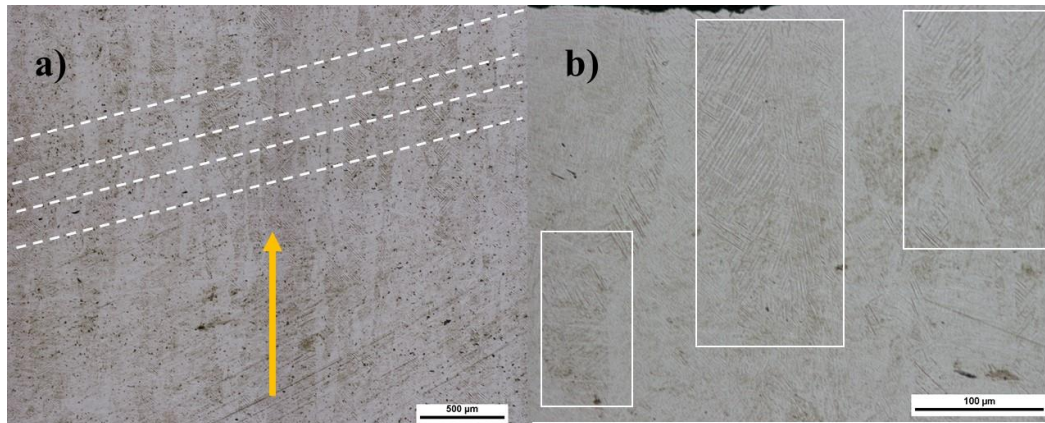


Figura 24. Microestructura de Ti6Al4V obtenido mediante DMLS (3D) a 50 aumentos (a) y a 200 aumentos (b)

Finalmente, en la figura 25 se presenta la microestructura de la muestra fabricada mediante DMLS por la empresa EU.

En este caso, a 50 aumentos (img. a) debido al ataque químico de la superficie solo se puede advertir la direccionalidad de la microestructura, así como la aparición de poros, cuya presencia es menor en comparación a la muestra anterior.

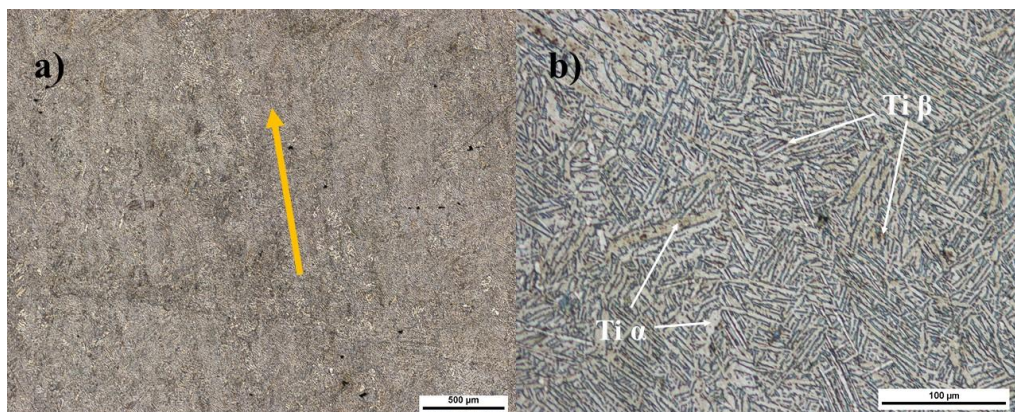


Figura 25. Microestructura de Ti6Al4V obtenido mediante DMLS (EU) a 50 aumentos (a) y a 200 aumentos (b)

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

A 200 aumentos (img. b) se advierte una microestructura de tipo Windmástätten en lugar de la característica microestructura martensítica de Ti α' del DMLS, lo que indica la aplicación de un tratamiento térmico de recocido con el objetivo de aumentar el tamaño de los granos y con ello incrementar la ductilidad y eliminar las tensiones internas.

De nuevo, debido al secreto industrial se desconocen los parámetros de tiempo, temperatura y enfriamiento aplicados a la muestra.

4.1.3. Perfilometría óptica

En la figura 26 se muestran los resultados de la rugosidad superficial de las muestras.

Respecto al S_a , los valores de las muestras de forja, EBM (EU) y DMLS (3D), se encuentran entre 550 y 590 nm mientras que en el caso de EBM (AI) y DMLS (EU), estos valores se incrementan ligeramente hasta los 708 y 747 nm.

Lo mismo sucede con la S_q , donde las muestras de forja, EBM (EU) y DMLS (3D) presentan valores menores (entre 700 y 750 nm) en contraste con los más elevados de EBM (AI) y DMLS (EU), que alcanzan los 878 nm y 950 nm respectivamente.

Independientemente de los valores más elevados de rugosidad en las muestras de DMLS_EU y EBM_AI, en todas las muestras la rugosidad se encuentra por encima del diámetro medio de las bacterias ($0,5\mu\text{m}$), por lo que las bacterias se encontrarán con una superficie donde puedan adherirse fácilmente, tal como indicaron de la Pinta et al. en 2019.

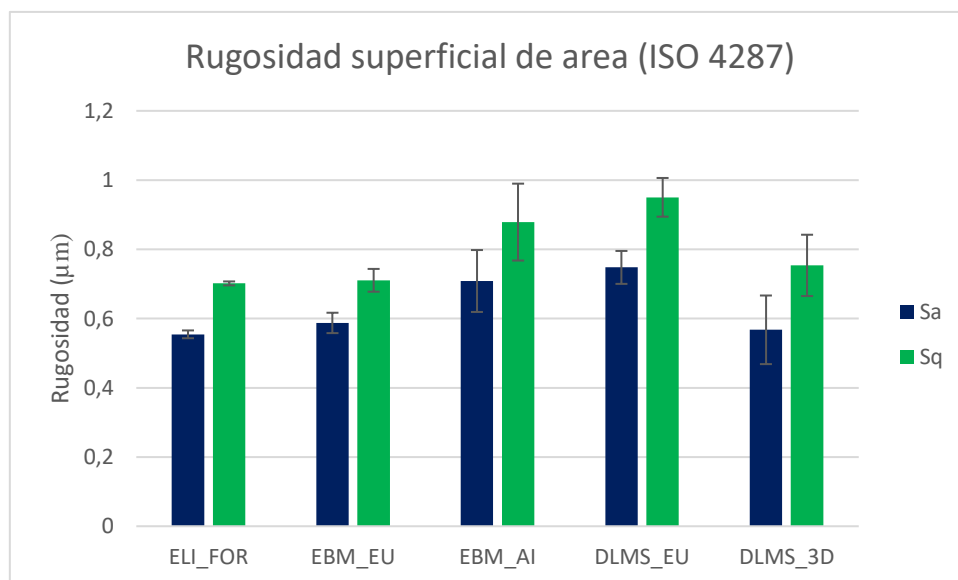


Figura 26. Media aritmética (S_a) y media cuadrática (S_q) de la rugosidad superficial

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

A pesar de que la superficie de todas las muestras se encuentra en el mismo estado, ya que ha sido sometida a maquinado, la mayor rugosidad de las muestras de EBM_AI y DMLS_EU puedan deberse a su microestructura de tipo Windmastätten ya que en la microscopía óptica eran las dos muestras en las que se presentaba de forma más clara esta organización.

En la tabla 3 se muestran los valores de S_{sk} y S_{ku} , los cuales ofrecen información respecto a la distribución de los picos y valles presentes en la superficie de las muestras.

Tabla 3. Coeficientes de asimetría (S_{sk}) y curtosis (S_{ku}) de la rugosidad superficial de las muestras.

	Forja	EBM_EU	EBM_AI	DMLS_EU	DMLS_3D
S_{sk}	$0,43 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,33$	$-0,13 \pm 0,16$	$0,63 \pm 0,20$	$0,70 \pm 0,23$
S_{ku}	$3,45 \pm 0,72$	$2,54 \pm 0,53$	$2,85 \pm 0,19$	$3,22 \pm 0,46$	$3,75 \pm 1,03$

S_{sk} mide las variaciones en la simetría respecto a la media de su superficie. Valores positivos de este parámetro indican la presencia de picos que sobresalen mientras que valores negativos señalan una mayor existencia de valles. Por otra parte, S_{ku} indica la densidad de probabilidad de la aspereza superficial. Por debajo de 3 significa que existen pocos picos o valles mientras que por encima de 3 indica que habrán muchos (Sedlaček et al., 2017).

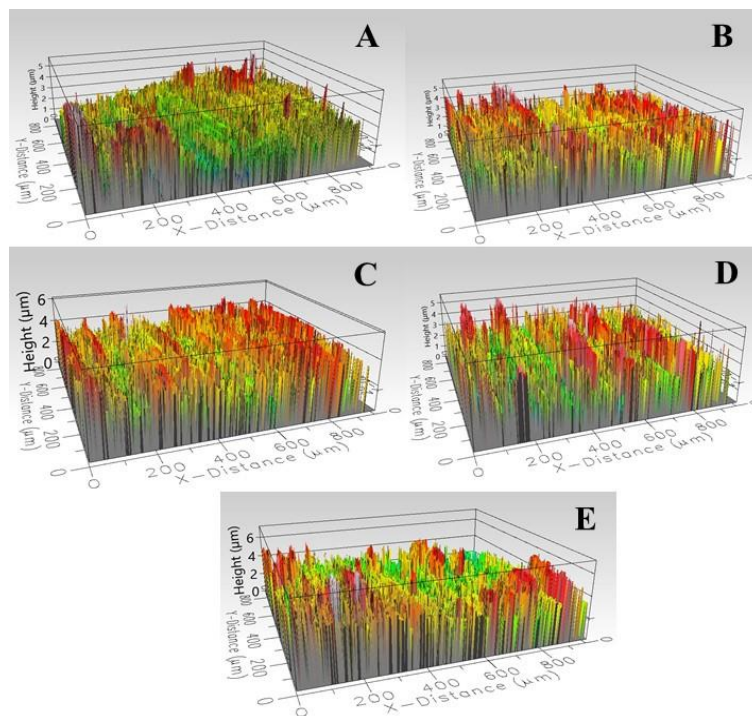


Figura 27. Reconstrucción tridimensional de la superficie de Ti6Al4V obtenido mediante forja (A), EBM (EU:B y AI:C) y DMLS (3D:D y EU:E).

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

En las muestras de forja y DMLS el perfil es principalmente puntiagudo con una mayor aspereza que en el caso de las muestras de EBM, ya que sus valores de S_{sk} y S_{ku} se encuentran por encima de 0 y 3 respectivamente. Por otra parte, en la muestra de EBM (EU), a pesar de que existen picos estos aparecen poco en la superficie ($S_{sk} = 2.54 < 3$) mientras que en la muestra EBM (AI), a diferencia del resto, destaca la aparición de más valles ($S_{sk} = -0.13$) aunque la presencia de estos no es predominante, tal como indica su valor de S_{ku} ($2,85 < 3$).

4.2. Caracterización mecánica

En los siguientes subapartados se muestran los resultados de los ensayos de dureza Rockwell y microdureza Vickers.

4.2.1. Ensayo de dureza

En la figura 28 se muestran los resultados de la prueba de dureza Rockwell HR15T transformado a dureza Vickers. Por cada tipo de muestra se tomaron 5 valores de dureza.

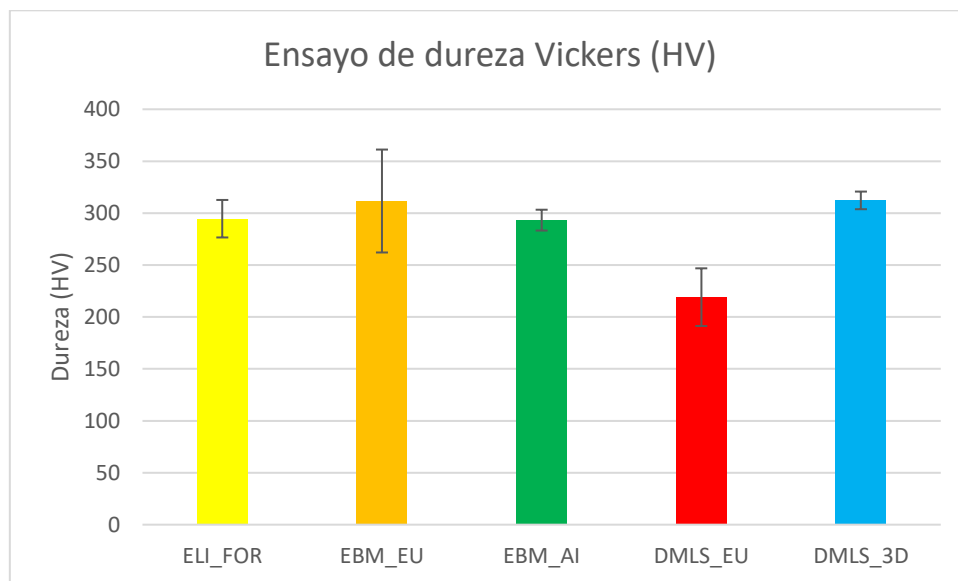


Figura 28. Ensayo de dureza Vickers (HV) de las muestras de Ti6Al4V

A primera vista, en el gráfico de barras destaca el reducido valor de la muestra de DMLS (EU), cuyo valor de dureza es entre un 33% y un 42% menor que el resto de los especímenes. No obstante, este valor puede ser explicado a través de su microestructura.

A pesar de que las muestras fabricadas mediante DMLS presentan una microestructura de acículas de $Ti\ \alpha'$, de las cuales se espera que aumenten la dureza y reduzcan la ductilidad, como ya se mencionó en el anterior apartado de resultados (4.1.4), la muestra DMLS (EU) fue sometida a un tratamiento térmico de recocido donde la microestructura se reorganizó en una de tipo Windmastätten, en la que los granos vieron aumentado su tamaño, disminuyendo de este modo la dureza.

Respecto al resto de valores de dureza (HV), los obtenidos en las muestras de forja (294 ± 18 HV) son similares a los obtenidos en otros estudios (Poondla et al., 2009). De igual modo sucedió con las muestras de EBM_EU y EBM_AI (311 ± 49 HV y 293 ± 10 HV), cuyo valor se asemeja a los 313 ± 4 HV obtenidos por Kok et al. en 2015.

En último lugar, la muestra de DMLS (3D) es la que mayor media posee ($312\pm 8,5$ HV) además de presentar valores similares a los obtenidos en otros estudios (Chikwanda, Africa, Booyesen, & Ngonda, 2010).

Al igual que sucedió con el análisis de la microestructura, conocer los parámetros de fabricación en el caso de los especímenes obtenidos por fabricación aditiva ayudaría tanto a comprender los resultados como a poder compararlos con otros estudios.

4.2.2. Ensayo de microdureza

En la figura 29 se muestran los resultados del ensayo de microdureza Vickers HV 0.3.

Tal como se puede observar, a diferencia del ensayo de dureza, donde el hecho de que el indentador abarque varios granos de distintas fases e introduzca cierto sesgo en los resultados, en el ensayo de microdureza como la medición se realizó sobre un mismo grano, la desviación es menor y la variación entre las muestras se aproxima más al valor real de las mismas.

Prueba de ello es que el rango en el ensayo de dureza tuvo un valor de 92 HV mientras que en el ensayo de microdureza 59 HV.

En este caso, se puede observar que los menores valores se encuentran en las muestras de EBM_EU y EBM_AI ($312,4 \pm 16,3$ HV y $313,8 \pm 5,4$ HV), siendo similares a los obtenidos por Kok et al. en 2015 (320 HV)

En un punto intermedio se situó la muestra de forjado (ELI_FOR), con un valor de $332,8 \pm 7,9$ HV, que de igual modo se situó en el rango de valores (330-340 HV) observado en otros estudios (Poondla et al., 2009).

Finalmente, tal como era de esperar, los mayores valores de dureza los presentaron las muestras de DMLS_EU y DLMS_3D, con $343 \pm 15,7$ HV y $371 \pm 7,9$ HV respectivamente. Esto fue causado por la presencia de $Ti\ \alpha'$, el cual incrementa la dureza en detrimento de una pérdida de ductilidad, haciendo que el espécimen de DMLS_3D tuviera el mayor valor de entre todas las muestras ya que presentaba la típica estructura martensítica de $Ti\ \alpha'$, tal como se pudo observar en el la figura 24 de microscopía óptica (Becker, T.H., Beck, M. & Scheffer, 2015).

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

En relación a la diferencia entre las muestras de DMLS, tal como se mostró durante la microscopía óptica las muestras de DMLS_EU fueron sometidas a un tratamiento de recocido, lo que provocó un descenso ligero en la dureza, similar a los resultados obtenidos por Brezinová et al. que en 2016 analizaron muestras obtenidas mediante DMLS sin tratamiento y tras un recocido, obteniendo valores similares a los de este proyecto además de observar el mismo fenómeno.

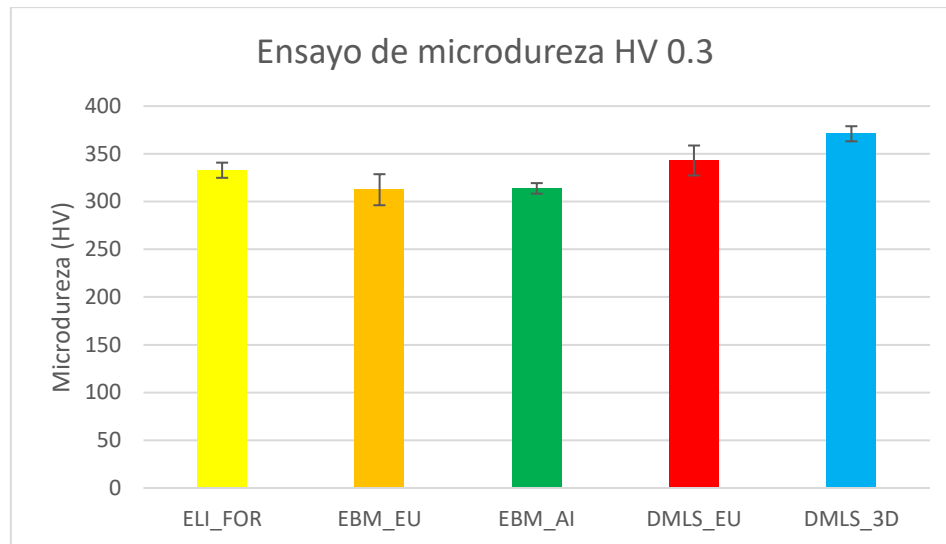


Figura 29. Resultados del ensayo de microdureza HV 0.3 de las muestras de Ti6Al4V

4.3. Caracterización microbiológica

En este apartado se mostrarán y discutirán los resultados obtenidos en el ensayo de colonización, microscopía confocal y FESEM de la superficie de las muestras colonizadas.

4.3.1. Ensayo de colonización

En el presente apartado se muestran los resultados obtenidos de los ensayos de colonización durante 48h de las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

En los ensayos realizados para la *S.aureus*, tal como se explicó en el apartado 3.4.1. de material y métodos, se sembraron en las placas agar diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-3} y 10^{-4} , siendo contables las colonias correspondientes a las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} , ya que en el caso de las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} el número de colonias era tan elevado (>300) que su contabilización se hacía imposible. Con ello, el tamaño muestral de las diluciones de 10^{-3} y 10^{-4} fueron n=18 y n=9 respectivamente en cada uno de los cinco grupos de Ti6Al4V.

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

En la tabla 4 se muestran las UFC/cm²ml para los ensayos realizados con *S.aureus*. Respecto a los mismos, en primer lugar, es necesario destacar la elevada dispersión que muestran los valores en ambas diluciones, lo que imposibilitó la realización de pruebas de estadística inferencial.

Tabla 4. Media y desviación típica de las UFC /cm²ml de las muestras de Ti6Al4V colonizadas mediante *Staphylococcus aureus*

Muestra	Dilución 10⁻³ (UFC/cm²ml)	Dilución 10⁻⁴(UFC/cm²ml)
ELI_FORJA	4,7x10 ⁶ ±3,7 x10 ⁶	3,7x10 ⁶ ±6,5 x10 ⁶
EBM_EU	7,5x10 ⁶ ±3,2 x10 ⁶	5,6x10 ⁶ ±3,1 x10 ⁶
EBM_AIMEE	8,4x10 ⁶ ±4,7 x10 ⁶	5,8x10 ⁶ ±5,3 x10 ⁶
DMLS_3D	1,2x10 ⁷ ±4,1 x10 ⁶	9,6x10 ⁶ ±5,2 x10 ⁶
DMLS_EU	1,1x10 ⁷ ±9,6 x10 ⁶	2,2x10 ⁷ ±1,0 x10 ⁷

No obstante, si se atiende a las medias, en la dilución de 10⁻³ se puede observar una mayor colonización en las muestras obtenidas mediante fabricación aditiva (EBM y DMLS) respecto a la muestra convencional de forjado. En concreto, las muestras de EBM presentan un 59% (EBM_EU) y un 78% (EBM_AIMEE) más de colonización que las muestras de forjado, mientras que, las muestras fabricadas con DMLS aumentaron el crecimiento bacteriano entre un 155% y un 134% (3D y EU) más.

Respecto a la dilución de 10⁻⁴, se puede observar la misma tendencia incremental. Las muestras de EBM presentaban un 51% (EU) y un 56% (AIMEE) más de bacterias que el forjado, mientras que las obtenidas por DMLS un 159% (3D) y un 494% (EU) más, algo que se puede visualizar mejor en la figura 30.

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

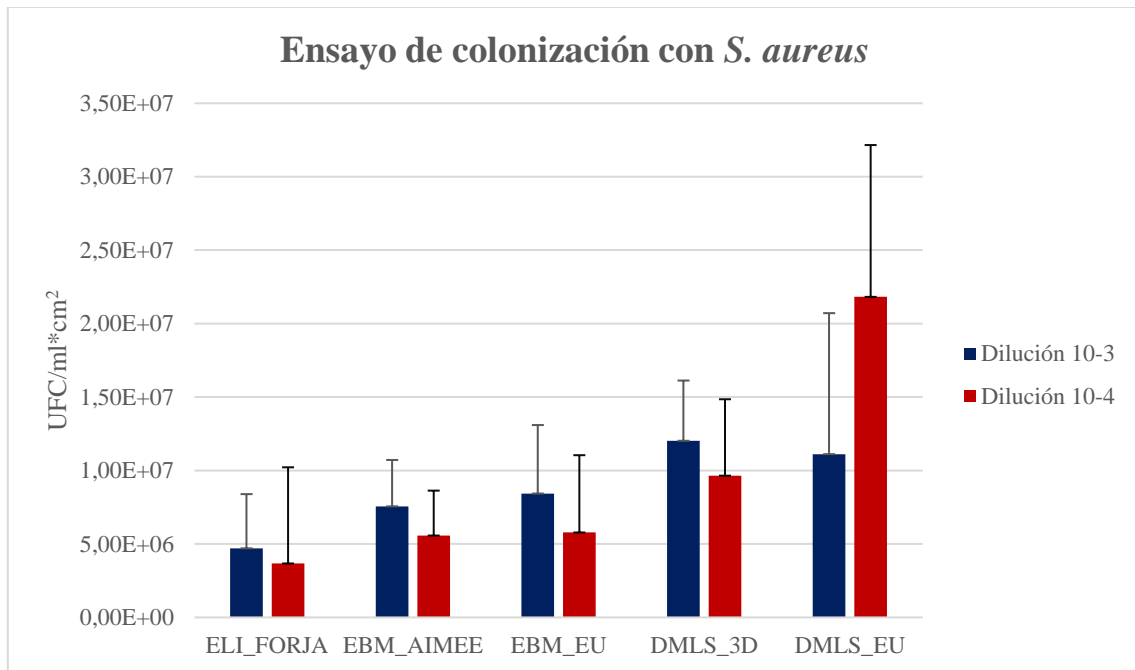


Figura 30. Gráfico de barras del ensayo de colonización con *S. aureus*.

En relación a las muestras colonizadas con *S.epidermidis*, es necesario aclarar que en el ensayo de colonización previo, cuyo objetivo era determinar las diluciones en las que las UFC eran contables, se observaron colonias contables en las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , sin embargo, en los ensayos posteriores las UFC en las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} eran incontables (>300) por lo que solo se pudieron adquirir datos de la dilución de 10^{-3} , contando finalmente con una muestra de $n=9$ en cada tipo.

Tabla 5. Media y desviación típica de las UFC /cm²ml de las muestras de Ti6Al4V colonizadas mediante *Staphylococcus epidermidis*

Muestra	Dilución 10^{-3} (UFC/cm ² ml)
ELI_FORJA	$6,1 \times 10^6 \pm 1,9 \times 10^6$
EBM_EU	$5,6 \times 10^6 \pm 4,5 \times 10^6$
EBM_AIMEE	$7,3 \times 10^6 \pm 4,0 \times 10^6$
DMLS_3D	$1,4 \times 10^7 \pm 8,7 \times 10^6$
DMLS_EU	$1,1 \times 10^7 \pm 9,7 \times 10^6$

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

Tal como se puede observar en la tabla 5 y figura 31, a excepción de la muestra de EBM (EU) que presentó un 9% menos de UFC/cm²ml, el resto de especímenes obtenidos mediante fabricación aditiva muestran una mayor colonización superficial que el forjado. En concreto, la muestra de EBM (Aimee) presenta un 19% más de UFC/cm²ml que la muestra de forja. Por otra parte, las muestras de DMLS mostraron un 119% (3D) y un 80% (EU) más de colonias.

Por tanto, pese a la elevada dispersión obtenida, se puede observar en ambas cepas que la colonización de superficies de Ti6Al4V fabricadas mediante DMLS parece ser mayor.

Debido a la ausencia de tiempo y la disponibilidad del equipo necesario, no se pudieron analizar parámetros de superficie importantes como pueden ser la mojabilidad o tensión superficial, los cuales podrían haber proporcionado más información respecto al comportamiento de las bacterias ante las diferentes superficies. Por ejemplo, diversos estudios indican que las superficies hidrófobas presentan una mayor colonización bacteriana que las hidrófilas, ya que en estas últimas las bacterias tienen que competir con el agua para adherirse a la superficie del material (Cerca, Pier, Vilanova, Oliveira, & Azeredo, 2005).

No obstante, otros estudios señalan que parámetros como la composición química, mojabilidad y tensión superficial ejercen influencia sobre la colonización en superficies principalmente pulidas, y marcan como límite de rugosidad los 0,2 µm, por encima de los cuales es la rugosidad la que toma un rol determinante en la proliferación y adhesión de las bacterias, desplazando a las otras variables a un papel secundario. (Elias et al., 2008) (Ivanov a et al., 2010) (Teughels, Van Assche, Sliepen, & Quiryne, 2006).

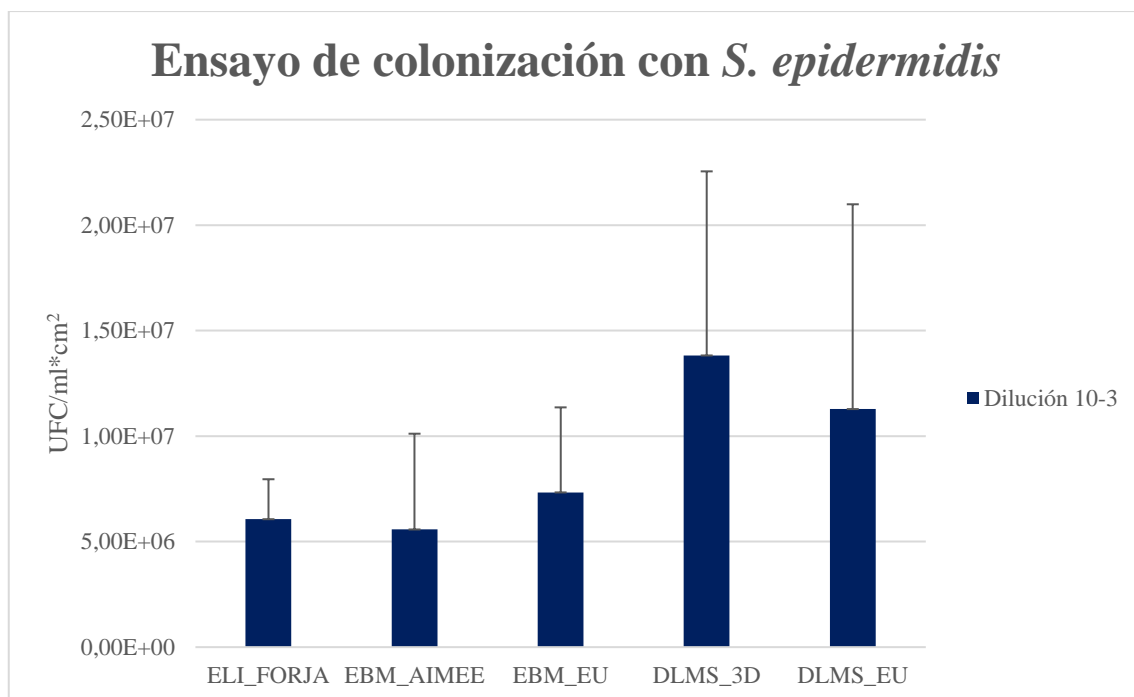


Figura 31. Gráfico de barras del ensayo de colonización con *S. aureus*

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

En el estudio publicado por Szymczyk-Ziółkowska et al. en 2020, analizaron la tensión superficial y ángulo de contacto de muestras obtenidas mediante EBM con la superficie tras fabricación, después de maquinado y sometidas a arenado o etching. En dicho estudio encontraron que un aumento en la rugosidad se trasladaba en un aumento del ángulo de contacto (hidrofobicidad) debido a la formación de pequeñas bolsas de aire que alteraban las interacciones intermoleculares entre la fase sólida (material) y líquida (medio interno), por lo que mayores valores de rugosidad conllevarían una mayor colonización bacteriana.

Asimismo, para el ensayo de colonización mediante *S.aureus*, obtuvieron que una mayor rugosidad se traducía en valores más elevados de UFC además de mostrar unos valores similares de UFC ($\approx 10^6$) a los de este proyecto en las muestras tras maquinado.

En el caso de las muestras de DMLS, en los resultados de la perfilometría óptica (apartado 4.1.3) los valores de S_{sk} y S_{ku} indicaban la ligera presencia de un perfil con picos ($S_{sk}>0$) a lo largo de la superficie de las muestras (S_{ku}), lo que podría conllevar la aparición de esas pequeñas bolsas de aire que acabarían provocando un aumento de la hidrofobicidad y por ende de la colonización bacteriana. Asimismo Wu et al. en su estudio realizado en 2011 observaron una concentración de *S.epidermidis* en zonas con una rugosidad superior a su tamaño (0,5 μm) algo que se dio en todas las muestras y especialmente en aquellas obtenidas mediante fabricación aditiva, donde los valores de rugosidad eran ligeramente superiores.

También es importante destacar que, aunque no se realizara una medición de la porosidad, durante la inspección visual mediante microscopía óptica sí que se detectó de forma cualitativa una mayor presencia de poros en la superficie de las muestras obtenidas mediante DMLS, lo que también supone un aumento de la superficie y rugosidad.

Otros estudios indican que sí que es posible observar una diferencia en la colonización, en este caso del *S.epidermidis*, cuando aparece segregación de elementos con efecto bactericida, como el aluminio, algo que no se ha dado en este estudio (Wang et al., 2018).

De igual modo, la ausencia de bibliografía o estudios que relacionen las variaciones en la microestructura del Ti6Al4V con diferencias en la colonización de bacterias, ha conllevado una dificultad para discutir y contrastar los resultados obtenidos. En concreto, se realizó una búsqueda exhaustiva en las principales bases científicas de datos (Google Scholar, PubMed, Scopus y Web Of Science) hallando artículos en los que solo se estudiaban tratamientos superficiales y su efecto en parámetros superficiales como la mojabilidad, tensión superficial y rugosidad, así como su repercusión en la colonización bacteriana.

También es conveniente subrayar que a pesar de que distintos métodos de fabricación den lugar a diferencias en la microestructura en una misma aleación, estas diferencias no son tan notables como en el caso de que se comparasen distintas aleaciones de titanio. Es posible que, si se hubiesen analizado y comparado aleaciones por ejemplo de Ti tipo α , tipo $\alpha+\beta$ y tipo β , donde las variaciones microestructurales son más notables, pese a la elevada dispersión producida por trabajar con muestras biológicas, se hubiese podido hallar alguna tendencia o diferencia en el comportamiento de las bacterias.

La ausencia de una metodología común en la caracterización de los biomateriales viene siendo un problema recurrente, especialmente en los apartados más biológicos de la misma como pueden ser la corrosión y cultivos biológicos (células y microorganismos). Si bien es importante y fundamental para el progreso y descubrimiento de nuevos hallazgos la libertad creativa de los investigadores, también lo es la capacidad de poder comparar resultados entre los mismos, especialmente cuando estos tienen aplicaciones que conllevan su introducción en el cuerpo humano, y para ello es necesario que exista una normativa sobre qué parámetros es necesario analizar y cómo hacerlo.

A lo largo de este trabajo y especialmente en el apartado de resultados y discusión se han encontrado dificultades ya no solo a la hora de comparar los resultados obtenidos con los de otras investigaciones, sino los de diferentes publicaciones entre sí. Ejemplo de ello son los diferentes métodos empleados para medir el grado de colonización. Unos estudios utilizan las UFC/ml, pero con diferencias en el protocolo que van desde los medios de cultivo, las condiciones de cultivo (estáticas vs. dinámicas) o el tiempo de incubación hasta el tratamiento del biofilm. Unos utilizan la espectrofotometría y otros emplean técnicas más digitales como la monitorizar mediante un microscopio que permite medir las variaciones en la extensión superficial que ha sido colonizada. Otro ejemplo importante es la ausencia de normalización por la superficie que ha sido expuesta a las bacterias en el caso del conteo de UFC.

4.3.2. Microscopía confocal de fluorescencia

En este apartado se mostrarán las imágenes tomadas a 100 aumentos de las superficies colonizadas.

En la figura 32 se presentan las muestras que han sido colonizadas por el *S.aureus*. En ellas destaca la ausencia de color rojo, lo que sería sinónimo de muerte bacteriana, algo que no ha sucedido durante las 48 horas de incubación.

También es posible observar el crecimiento de las bacterias en agrupaciones, algo que se visualiza mejor en las zonas con mayor concentración de intensidad de verde en las muestras fabricadas por EBM (B y C).

Asimismo, también es posible apreciar el contraste en la colonización entre las muestras de forjado y EBM y las muestras de DMLS, lo que está en consonancia con los resultados obtenidos en el ensayo de colonización.

En la figura 33 se presentan las imágenes tomadas de las muestras colonizadas por el *S.epidermidis*, donde de nuevo destacó la ausencia de bacterias muertas en todas las muestras.

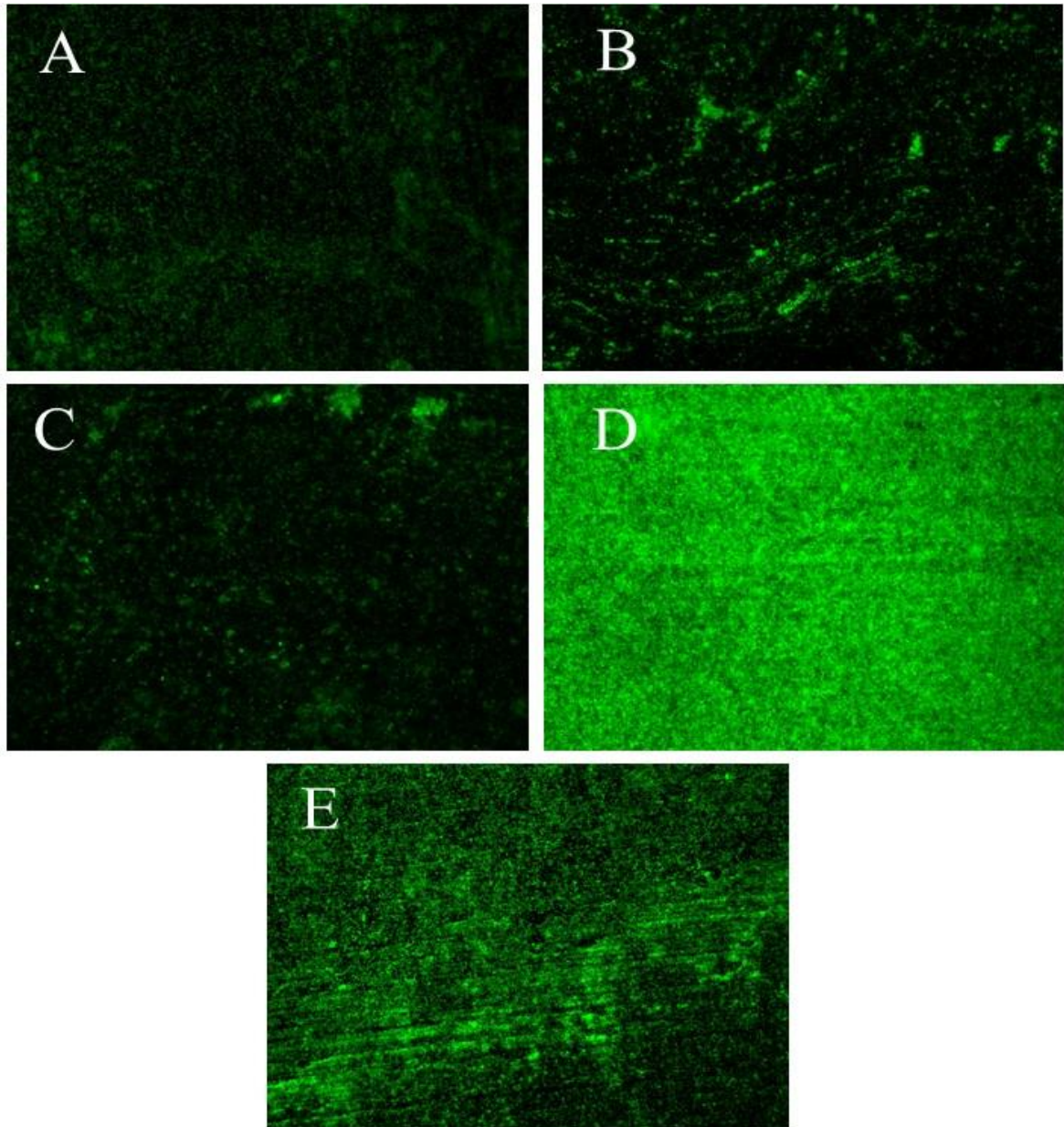


Figura 32. Microscopía confocal fluorescente a 100 aumentos de muestras de Ti6Al4V forjado (A), obtenido mediante EBM (B: Aimee, C: Eurocoating) y obtenido mediante DMLS (D: 3D y E: Eurocoating) colonizadas por *S.aureus*

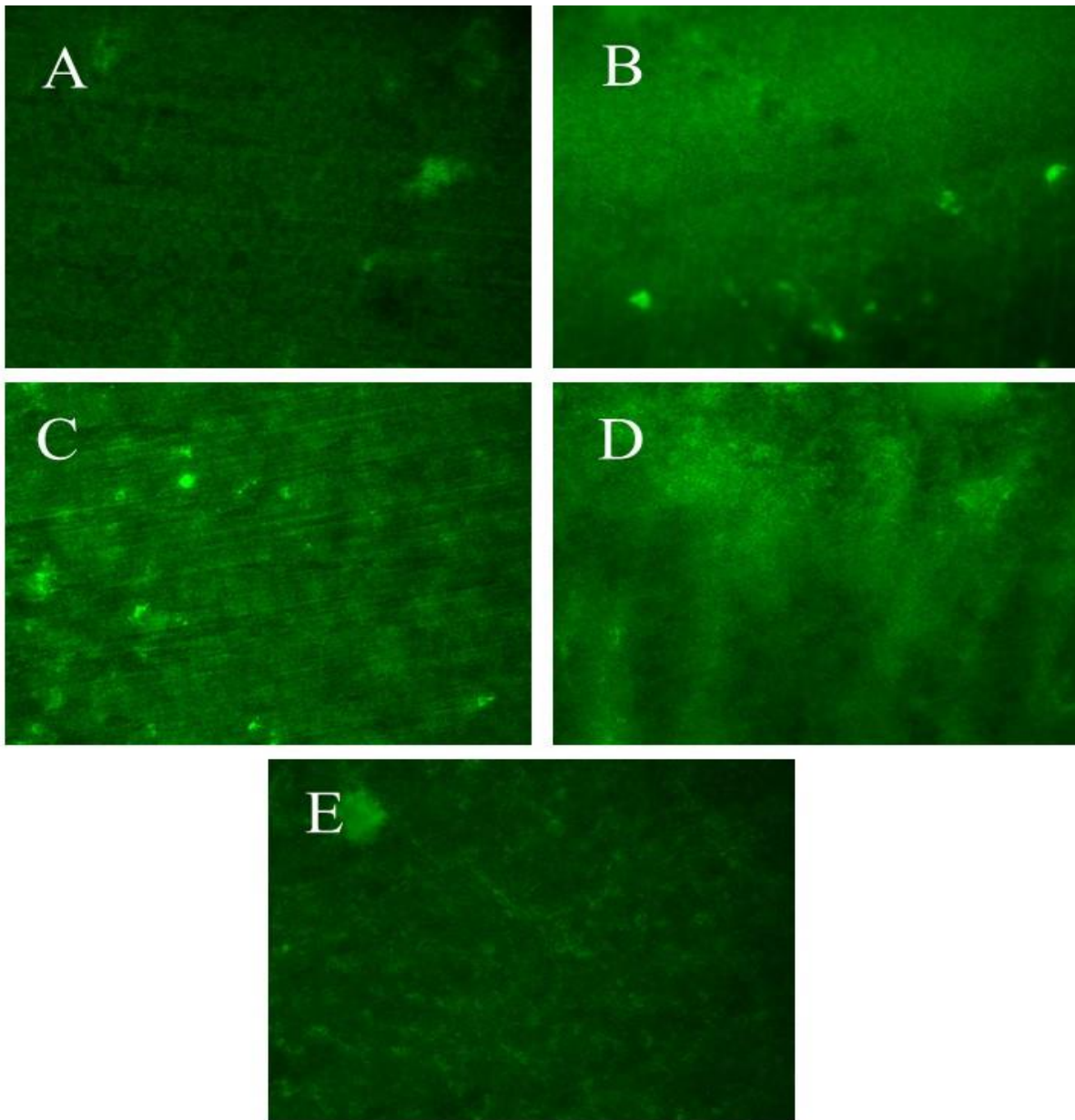


Figura 33. Microscopía confocal fluorescente a 100 aumentos de muestras de Ti6Al4V forjado (A), obtenido mediante EBM (B: Aimee, C: Eurocoating) y obtenido mediante DMLS (D: 3D y E: Eurocoating) colonizadas por *S.epidermidis*

En comparación al *S.aureus*, el patrón de colonización que sigue el *S.epidermidis*, parece ser diferente. En este caso, la distribución y colonización por parte de las bacterias se realiza de forma más homogénea a lo largo de la superficie a pesar de que existan zonas puntuales donde la intensidad verde sea mayor.

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

Asimismo, en contraste al *S.aureus*, a pesar de que se puede apreciar una leve variación en la intensidad de verde entre las muestras de forjado y fabricación aditiva, la diferencia no es tan llamativa y especialmente no lo es en el caso de las muestras obtenidas por DMLS.

4.3.3. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)

A continuación, se muestran diferentes imágenes del examen de microscopía electrónica realizado a las muestras colonizadas por *S. aureus* y *S.epidermidis*, que por cuestiones logísticas se pudo realizar a todas las muestras salvo a las de EBM de la empresa Eurocoating (EBM_EU).

En la figura 34 se muestra un montaje de imágenes tomadas a 1000 aumentos de la superficie de las muestras obtenidas mediante forja (1ª columna), EBM (2ª columna) y DMLS (3ª columna) y que han sido colonizadas por *S.epidermidis* (1ª fila) y *S.aureus* (2ª fila). Durante la inspección mediante el microscopio destacó la presencia de bacterias a lo largo de la superficie en todas las muestras sin detectarse diferencias cualitativas entre los distintos métodos de fabricación estudiados en este proyecto.

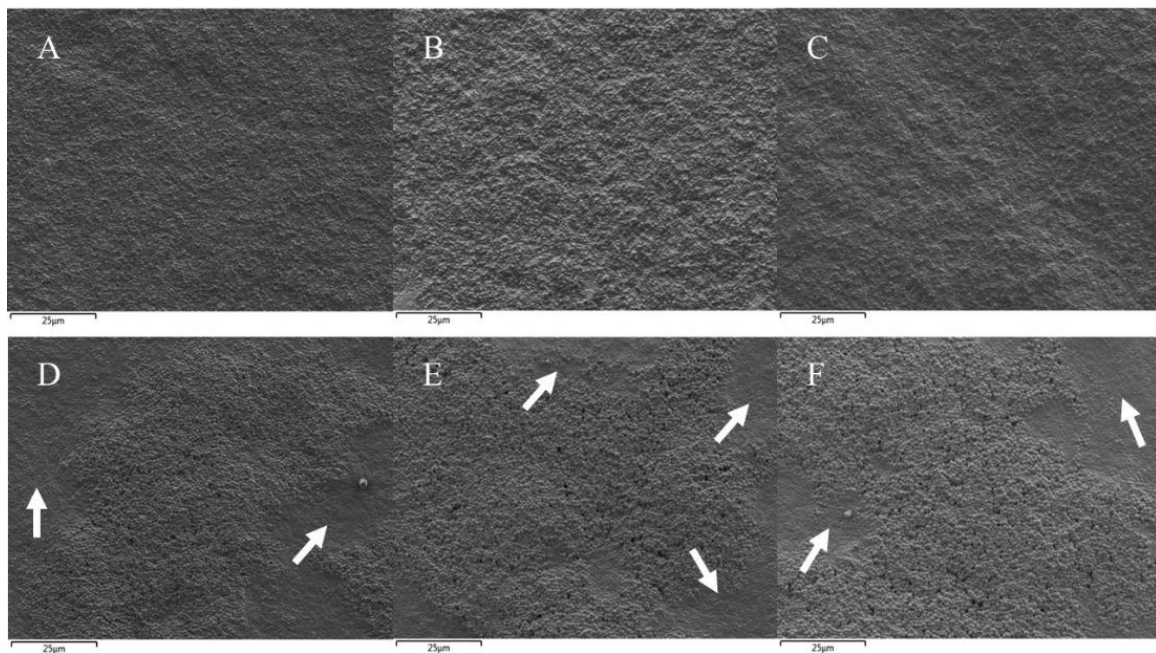


Figura 34. Imágenes tomadas a 1000 aumentos de muestras colonizadas por *S.epidermidis* (A:forja, B:EBM_Aimee, C:3D) y *S.aureus* (D:forja, E: EBM_Aimee, F:3D)

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

No obstante, sí que se pudieron observar diferencias en el patrón de colonización entre ambas cepas al igual. Tal como se señaló en la microscopía confocal, el *S.epidermidis* colonizó de forma más homogénea todas las superficies mientras que el *S.aureus* lo hizo más heterogéneamente, formando una capa más lisa de bacterias, señalada en la imagen mediante flechas blancas, sobre la que crecieron pequeñas colonias o agrupaciones de cientos de miles de bacterias.

En la imagen 35 se presenta a 100 aumentos la superficie de una muestra fabricada mediante DLMS y colonizada por *S.aureus*. En ella se puede visualizar mejor el fenómeno de crecimiento en colonias mencionado anteriormente.

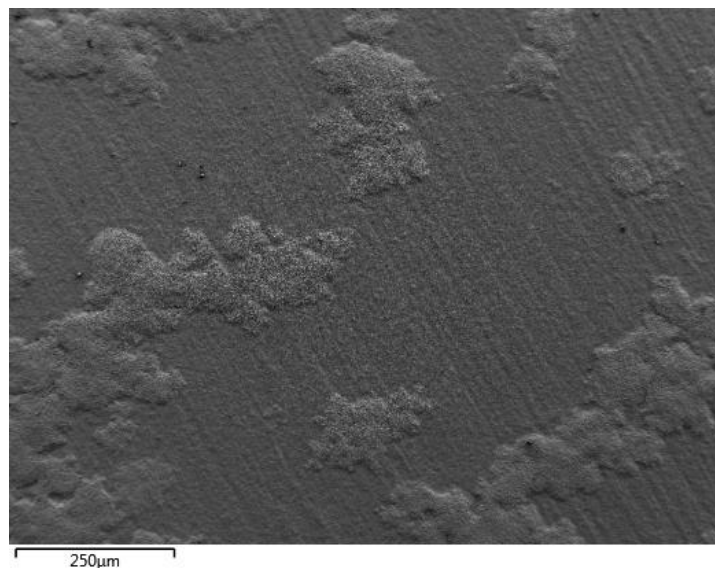


Figura 35. Superficie de Ti6Al4V obtenida mediante DMLS colonizada por *S.aureus* (100 aumentos)

En la figura 36 se presentan a 5000 aumentos las superficies de Ti6Al4V obtenidas mediante forjado colonizadas por *S.epidermidis* y *S.aureus*. Para el *S.aureus* las instantáneas fueron tomadas de una de las colonias mostradas en la figura 36.

En ella se visualizan algunas diferencias entre ambas bacterias. Por una parte, las bacterias en el *S.epidermidis* adoptan una forma redondeada pero más compactada, intentando dejar el menor hueco posible entre ellas, mientras que en el *S.aureus* destaca por su forma más redondeada y crecimiento en racimos de uva, dejando algunos huecos entre las mismas.

Asimismo, en los círculos en blanco se resaltan bacterias en fisión binaria, fenómeno que se observa mejor en la siguiente figura a 15000 aumentos.

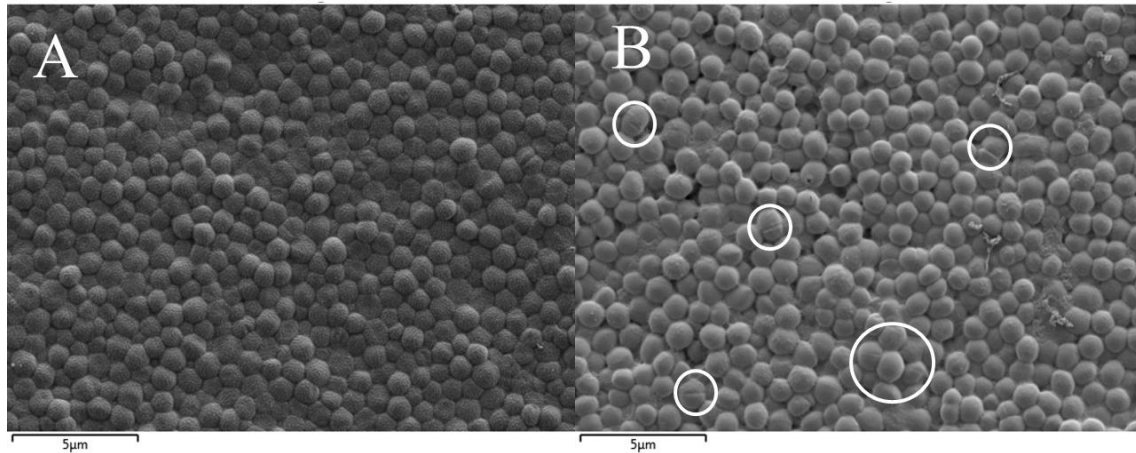


Figura 36. Imágenes tomadas a 5000 aumentos de superficies de Ti6Al4V de forja colonizado por *S.epidermidis* (A) y *S.aureus* (B).

En la figura 37 se muestran imágenes tomadas a 15000 aumentos de muestras de DMLS colonizadas por *S. epidermidis* (A) y *S.aureus* (B).

Mediante el software ImageJ se realizó una medición del diámetro de diversas bacterias aisladas, situándose todas en el rango de 0,5-1,5 μm . De igual modo, se observó en las bacterias una forma redondeada y de crecimiento en forma de racimo de uva característicos mencionados en la literatura (Murray, Rosenthal & Pfaller, 2017).

A estos aumentos se pueden observar mejor las diferencias en la distribución y crecimiento entre las dos bacterias estudiadas. En concreto, se percibe que las bacterias de *S.epidermidis* generaron un biofilm con mayor compactación a diferencia del *S.aureus*, donde las bacterias destacan por su forma más redondeada además de estar envueltas en algunas zonas de lo que parece ser una matriz de sustancias extrapoliméricas (EPS), rodeada por círculos en rojo. Esto podría explicar la mayor acumulación del *S.aureus* en ciertas zonas, mientras que el *S.epidermidis* se distribuyera de forma más homogénea.

Finalmente, en la imagen del *S.aureus* (B) se señalan mediante flechas en blanco bacterias en fisión binaria, algo que no se visualizó en el *S.epidermidis*.

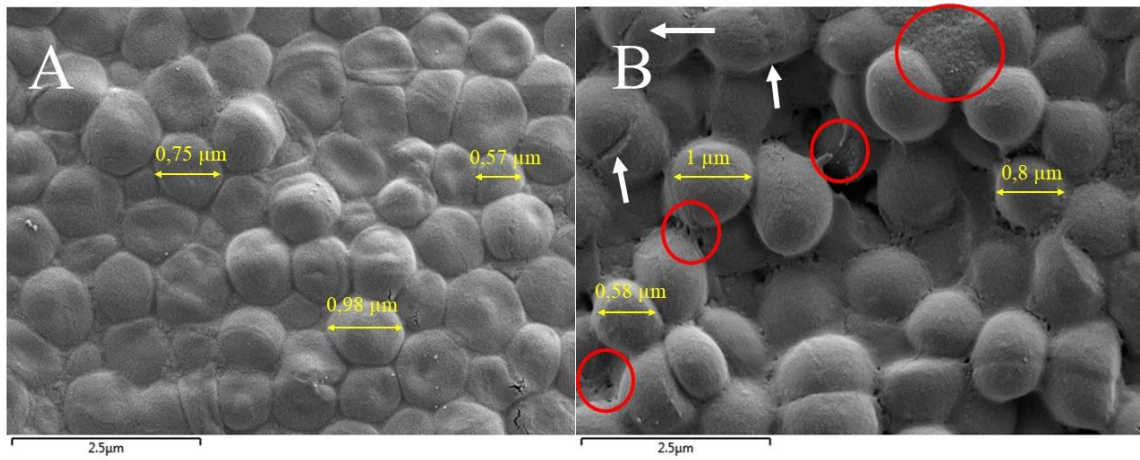


Figura 37. Imágenes a 15000 aumentos de muestras de DLMS colonizadas por *S. epidermidis* (A) y *S. aureus* (B).

5. Conclusiones

En base a los objetivos definidos, las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

- En la difracción de Rayos X todas las muestras presentan un patrón similar caracterizado por tres picos de mayor intensidad de fase α y la presencia de un pico de menor intensidad de fase β .
- En todas las muestras predomina una orientación de los granos de Ti α en el plano (101), cuyo pico característico presenta una intensidad mayor en las muestras de fabricación aditiva respecto al forjado, similar entre las dos muestras obtenidas por EBM y mayor en las muestras DMLS_3D respecto a la de DMLS_EU debido al tratamiento térmico de recocido al que fueron sometidas las últimas.
- Las muestras de forjado presentan una microestructura de mill annealing, con granos equiaxiales de fase α orientados en la dirección de la deformación y presencia de fase β en borde de granos y formando insulas. Las muestras de EBM están caracterizadas por una estructura lamelar de tipo Windmastätten con una orientación en el sentido de barrido del haz, la presencia de pequeños poros y la visualización de las capas de formación. En las muestras de DMLS_3D destaca la presencia de una microestructura martensítica de acículas de Ti α' con una orientación en la dirección de barrido del haz, presencia de pequeños poros distribución por toda la superficie y la separación de las capas de formación, mientras que la microestructura de las muestras de DMLS_EU debido al tratamiento de recocido ha pasado de una martensítica a una de tipo Windmastätten en la que también se puede observar la orientación causada por el barrido del haz.
- La rugosidad superficial de área (S_a) es en todas las muestras mayor al límite marcado en la literatura de $0,2 \mu\text{m}$ a partir del cual la rugosidad favorece la colonización, así como al diámetro medio de las bacterias ($0,5 \mu\text{m}$), lo que ha favorecido la colonización bacteriana. Asimismo, la rugosidad es similar en todas las muestras salvo en las de EBM_AI y DMLS_EU, donde era mayor debido posiblemente a la microestructura de tipo Windmastätten.
- En base a los parámetros de asimetría (S_{sk}) y curtosis (S_{ku}) de la perfilometría, las muestras de forja y DMLS mostraron un perfil ligeramente puntiagudo, las de EBM_EU algo puntiagudo y las de EBM_AI tuvieron una mayor presencia de valles, aunque estos no fueron predominantes.
- En el ensayo de dureza Vickers todas las muestras presentaron valores similares en un rango comprendido entre 293 HV y 313 HV salvo la muestra de DMLS_EU, cuya dureza fue entre un 33 y un 42% menor al resto debido al tratamiento de recocido que aumento el tamaño del grano en detrimento de la dureza.
- En el ensayo de microdureza los valores fueron de nuevo similares entre las muestras salvo en el caso del DMLS_3D, que fue ligeramente mayor (+8-18%) debido a su microestructura martensítica de acículas de Ti α' , las cuales incrementan la dureza.
- La elevada dispersión de los resultados impidió la realización de pruebas de estadística inferencial.
- En los ensayos realizados con *S.epidermidis* se pudo visualizar en la dilución 10^{-3} una tendencia a colonizar más las muestras obtenidas por fabricación aditiva en relación al forjado, salvo en

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

las muestras de EBM_EU, cuyas UFC/cm²ml fueron un 9% menores. Entre las dos tecnologías analizadas destacó la mayor colonización de las muestras de DMLS, que presentaron entre un 119% (DMLS_3D) y un 80% (DMLS_EU) más de UFC.

- En el *S.aureus* también se visualizó una tendencia de mayor formación de biofilm en las muestras obtenidas por fabricación aditiva, especialmente en las de DMLS, respecto al forjado. En concreto, para la dilución 10⁻³, las UFC contabilizadas en EBM_EU y EBM_AI fueron un 59% y 78% mayor, mientras que en el DMLS_3D y DMLS_EU fueron entre un 155% y 134%. Para la dilución 10⁻⁴, se observó el mismo comportamiento, con un 51% y 56% más de colonización en EBM_EU y EBM_AI y un 159% y 494% más en DMLS_3D y DMLS_EU.
- La mayor colonización de las muestras de DMLS pudo ser debida a la presencia de mayor porosidad en estas muestras, un perfil ligeramente puntiagudo y más áspero que el resto de muestras y una mayor rugosidad, especialmente en las muestras de DMLS_EU.
- En la microscopía confocal de fluorescencia se observa una ausencia de muerte bacteriana y una mayor colonización de las muestras de fabricación aditiva, siendo particularmente mayor en las de DMLS.
- El patrón de colonización del *S.aureus* es en pequeñas colonias a lo largo de la superficie, mientras que el *S.epidermidis* destaca por una distribución más homogénea a lo largo de la muestra.
- En el FESEM se observa un mayor compactación de las bacterias de *S.epidermidis*, mientras que las de *S.aureus* exhiben una forma más redondeada en racimos de uva y la adopción de una estructura tridimensional. También se observó la presencia de bacterias de *S.aureus* en fisión binaria, algo que no sucedió en el *S.epidermidis*.

6. Futuras investigaciones

Tal como se ha mencionado, sería interesante investigar otros parámetros que no se han analizado en este trabajo como pueden ser la tensión superficial o hidrofobicidad, señalados en diversos estudios como determinantes del grado de colonización, así como su relación con la microestructura.

De igual modo, para eliminar el efecto dominante que tiene la rugosidad sobre otras variables superficiales y poder estudiar desde un punto de vista más estricto la interacción microestructura-bacteria, se propone para futuros estudios la realización de los ensayos sobre superficies pulidas, especialmente con una R_a menor a los $0,2 \mu\text{m}$ señalada como punto de inflexión en la colonización bacteriana (Elias et al., 2008).

En relación a los ensayos microbiológicos, el elevado grado de colonización y dispersión de los resultados ha impedido la obtención de resultados concluyentes. Para ello se propone realizar una siembra con diluciones menores, un mayor número de experimentos, así como incubar las muestras durante menos tiempo (12 o 24h) de cara a poder detectar mejor las diferencias entre las muestras.

Asimismo, a pesar de que el *S.aureus* y *S.epidermidis* sean las bacterias causantes de 2/3 de las infecciones periprotéticas, ampliar el estudio a otras bacterias u hongos como *Pseudomona aeruginosa* o *Candida albicans*.

Como se ha comentado, de cara a detectar mejor la influencia de la microestructura se propone el análisis y comparación de diferentes aleaciones de Ti como puede ser cp Ti (tipo α), Ti6Al4V (tipo $\alpha+\beta$) y Ti35Nb (tipo β) así como la aplicación de tratamientos que den lugar a grandes contrastes en parámetros de la microestructura como pueden ser el tamaño del grano o distribución de las fases. Un ejemplo de ello sería el recocido, que genera un engrosamiento de los granos y redistribución del Ti β en borde de grano, o un enfriamiento rápido en agua, que provoca la aparición de acículas.

Finalmente, se propone el uso de ensayos y técnicas que permitan cuantificar mejor el grado de colonización como puede ser la medición de la absorbancia a diferentes horas después de la inoculación (2, 16, 24, 36 y 48 h), cuantificar la intensidad de luz en la microscopía confocal u otras técnicas como la monitorización a tiempo real de la colonización mediante microscopía confocal.

7. Bibliografía

- Ábalos, C. (2005). Adhesión bacteriana a biomateriales. *Avances En Odontoestomatología*, 21(1), 347–353. <https://doi.org/10.4321/s0213-12852005000100003>
- Arias-de la Torre, J., Capdevila, A., Martínez, O., Domingo, L., Marinelli, M., Robles, N., Nardi, J., Puig-verdié, L., Pallisó, F., & Espallargues, M. (2017). A decade of the Catalan Arthroplasty Register (RACat): Variability, exhaustivity, and survival of prostheses between 2005 and 2014. *Revista Espanola de Cirugia Ortopedica y Traumatologia*, 61(2), 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.recot.2017.01.001>
- Ariza, J., & Euba, G. (2008). Infecciones relacionadas con las prótesis articulares. *Enfermedades Infecciones y Microbiología clínica*, 26(6), 380–390.
- ASTM International (2014). *Standard Test Methods for Bend Testing of Material for Ductility*. ASTM E209-14. Recuperado 27 de Mayo de 2020, de <https://www.astm.org/Standards/E290.htm>
- ASTM International (2019). *Standard Hardness Conversion Tables for Metals Relationship Among Brinell Hardness, Vickers Hardness, Rockwell Hardness, Superficial Hardness, Knoop Hardness, Scleroscope Hardness and Leeb Hardness*. ASTM E140-12b. Recuperado 22 de Mayo de 2020 de <https://www.astm.org/Standards/E140.htm>
- ASTM International (2020). *Standard Test Methods for Rockwell Hardness of Metallic Materials*. ASTM E18-20. Recuperado 22 de Mayo de 2020 de <https://www.astm.org/Standards/E18.htm>
- Babu, B. (2008). *Physically based model for Plasticity and Creep of Ti-6Al-4V* [tesis de licenciatura, Luleå University of Technology]. <http://tu.diva-portal.org/smash/record.jsf?pid=diva2%3A991292&dswid=2750>
- Becker, T.H., Beck, M. & Scheffer, C. (2015). Microstructure and mechanical properties of direct metal laser sintered Ti-6Al-4V. *South African Journal of Industrial Engineering*, 26(1), 1–10.
- Brezinová, J., Hudák, R., Guzanová, A., Draganovská, D., Ižáriková, G., & Koncz, J. (2016). Direct metal laser sintering of Ti6Al4V for biomedical applications: Microstructure, corrosion properties, and mechanical treatment of implants. *Metals*, 6(7). <https://doi.org/10.3390/met6070171>
- Boyer, R., Collings, E.W., & Welsch, G. (2007). Capítulo 1: Introducción. En Boyer, R., Collings, E.W., & Welsch, G. (4ª ed.), *Material Properties Handbook: Titanium Alloys* (pp.4-21). United States of America, ASM International.
- Cerca, N., Pier, G. B., Vilanova, M., Oliveira, R., & Azeredo, J. (2005). Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of Staphylococcus epidermidis. *Research in Microbiology*, 156(4), 506–514. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.01.007>
- Chatterjee, A. K. (2001). Handbook of Analytical Techniques in Concrete Science and Technology. *Handbook of Analytical Techniques in Concrete Science and Technology*, 275–332. <https://doi.org/10.1016/B978-081551437-4.50011-4>
- Chikwanda, H., Africa, S., Booyesen, G., & Ngonda, T. (2010). Additive manufacturing : Characterization of Ti-6Al-4V alloy intended for biomedical application. *Light Metals Conference 2010*. Conferencia llevada a cabo en Johannesburgo, Sudáfrica.
- Clegg, W. (2003). X-ray Diffraction. En J.A. McCleverty & T. Meyer. (2ª ed), *Comprehensive Coordination*

Chemistry II (pp. 57-64). Elsevier.

- Clemens, H., Mayer, S., & Scheu, C. (2017). Microstructure and Properties of Engineering Materials. *Neutrons and Synchrotron Radiation in Engineering Materials Science: From Fundamentals to Applications: Second Edition*, 3–20. <https://doi.org/10.1002/9783527684489.ch1>
- Das, D., Saha, S. S., & Bishayi, B. (2008). Intracellular survival of *Staphylococcus aureus*: Correlating production of catalase and superoxide dismutase with levels of inflammatory cytokines. *Inflammation Research*, 57(7), 340–349. <https://doi.org/10.1007/s00011-007-7206-z>
- De-la-Pinta, I., Cobos, M., Ibarretxe, J., Montoya, E., Eraso, E., Guraya, T., & Qiundós, G. (2019). Effect of biomaterials hydrophobicity and roughness on biofilm development. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30(77), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6281-3>
- Dibartola, A. C., Swearingen, M. C., Granger, J. F., Stoodley, P., & Dusane, D. H. (2017). Biofilms in orthopedic infections: a review of laboratory methods. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 125, 418–428. <https://doi.org/10.1111/apm.12671>
- Donlan, R. M. (2001). Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. *Clinical Infectious Diseases*, 33(8), 1387–1392. <https://doi.org/10.1086/322972>
- Elias, C. N., Oshida, Y., Lima, J. H. C., & Muller, C. A. (2008). Relationship between surface properties (roughness, wettability and morphology) of titanium and dental implant removal torque. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 1(3), 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2007.12.002>
- Fang, X., Wu, J., Ou, X., Yang, F., & Haque, R. (2019). Microstructural characterization and mechanical properties of Ti-6Al-4V alloy subjected to dynamic plastic deformation achieved by multipass hammer forging with different forging temperatures. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2019, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2019/6410238>
- Ferguson, R. J., Palmer, A. J., Taylor, A., Porter, M. L., Malchau, H., & Glyn-Jones, S. (2018). Hip replacement. *The Lancet*, 392(10158), 1662–1671. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31777-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31777-X)
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Gardan, J. (2016). Additive manufacturing technologies: State of the art and trends. *International Journal of Production Research*, 54(10), 3118–3132. <https://doi.org/10.1080/00207543.2015.1115909>
- Gibson, I., Rosen, D., & Stucker, B. (2015). *Additive Manufacturing Technologies*. Boston, Massachusetts, EEUU: Springer. New York: Springer.
- Gutiérrez Zúñiga, D., Manrique Succar, J., Restrepo, C., Parvizi, J., & Eduardo Manrique, J. (2017). Infecciones periprotésicas de cadera y rodilla: diagnóstico y manejo. Revisión de conceptos actuales. *Revista Colombiana de Ortopedia y Traumatología*, 31(2), 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.rccot.2017.03.008>
- Herzog, D., Seyda, V., Wycisk, E., & Emmelmann, C. (2016). Additive manufacturing of metals. *Acta Materialia*, 117, 371–392. <https://doi.org/10.1016/j.actamat.2016.07.019>
- Instituto Nacional de Estadística (INE). (2018). *Proyecciones de población 2018*. Recuperado 13 de mayo de 2020, de https://www.ine.es/prensa/pp_2018_2068.pdf
- Ivanova, E. P., Truong, V. K., Wang, J. Y., Bemdt, C. C., Jones, R. T., Yusuf, I. I., Peke, I., Schmidth, H.W., Fluke, C., Barnes, D., & Crawford, R. J. (2010). Impact of nanoscale roughness of titanium thin film

surfaces on bacterial Retention. *Langmuir*, 26(3), 1973–1982. <https://doi.org/10.1021/la902623c>

Jacques, M., Aragon, V., & Tremblay, Y. D. N. (2010). Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. *Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, 11(2), 97–121. <https://doi.org/10.1017/S1466252310000149>

Khorasani, A. M., Goldberg, M., Doeven, E. H., & Littlefair, G. (2015). Titanium in biomedical applications—properties and fabrication: A review. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 5(8), 593–619. <https://doi.org/10.1166/jbt.2015.1361>

Kok, Y., Tan, X., Tor, S. B., & Chua, C. K. (2015). Fabrication and microstructural characterisation of additive manufactured Ti-6Al-4V parts by electron beam melting. *Virtual and Physical Prototyping*, 10(1), 13–21. <https://doi.org/10.1080/17452759.2015.1008643>

Lalani, T., Chu, V. H., Grussemeyer, C. A., Reed, S. D., Bolognesi, M. P., Friedman, J. Y., Griffiths, R. I., Crosslin, D. R., Kanafani, Z. A., Kate, K. S., Corey, G. R., & Fowler Jr, V. G. (2008). Clinical outcomes and costs among patients with Staphylococcus aureus bacteremia and orthopedic device infections. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 40, 973–977 <https://doi.org/10.1080/00365540802245146>

Li, G., Zhao, Q., Yang, H., Cheng, L., & Province, J. (2016). Antibacterial and Microstructure Properties of Titanium Surfaces Modified with Ag-Incorporated Nanotube Arrays. *Materials Research*, 19(3), 735–740 <http://dx.doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2015-0534>

López-armada, M. J., Carames, B., Cillero-pastor, B., & García, F. J. B. (2004). Fisiopatología de la artrosis: ¿cuál es la actualidad?, *Revista Española de Reumatología*, 31(6), 379–393.

Majumdar, T., Bazin, T., Ribeiro, E. M. C., Frith, J. E., & Birbilis, N. (2019). Understanding the effects of PBF process parameter interplay on Ti-6Al-4V surface properties. *PLoS ONE*, 14(8), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221198>

Martin, J. W. (2006). Metals and alloys. *Materials for Engineering*, 71–132. <https://doi.org/10.1533/9781845691608.2.71>

Mayo Clinic. (s. f.). *Osteoarthritis*. Recuperado 13 de mayo de 2020, de <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/osteoarthritis/symptoms-causes/syc-20351925>

Max-Planck-Institut Für Eisenforschung. (s. f.). Introduction to Titanium alloys. Recuperado 21 de mayo de 2020, de <http://www.dierk-raabe.com/titanium-alloys/>

Mierzejewska, Z. A., Hudák, R., & Sidun, J. (2019). Mechanical properties and microstructure of DMLS Ti6Al4V alloy dedicated to biomedical applications. *Materials*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/ma12010176>

Moiseyev, V.N. (2006). *Titanium Alloys: Russian Aircraft and Aerospace Applications*, Florida. Editorial Taylor & Francis Group.

Murr, L. E., Quinones, S. A., Gaytan, S. M., Lopez, M. I., Rodela, A., Martinez, E. Y., Hernández, D. H., Martínez, E., Medina, F., & Wicker, R. B. (2009). Microstructure and mechanical behavior of Ti-6Al-4V produced by rapid-layer manufacturing, for biomedical applications. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2(1), 20–32. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2008.05.004>

Murray, P.R., Rosenthal, K.S., & Pfaller, M.A. (2017). Staphylococcus y cocos grampositivos relacionados. En Murray, P.R., Rosenthal, K.S., & Pfaller, M.A. (8ª ed.), *Microbiología médica*, (pp. 174–189). Barcelona, España: Elsevier editorial.

- Namvar, A. E., Bastarahang, S., Abbasi, N., Ghehi, G. S., Farhadbakhtarian, S., Arezi, P., Hosseini, M., Baravati, S. Z., Jokar, Z., & Chermahin, S. G. (2014). Clinical characteristics of Staphylococcus epidermidis: a systematic review. *GMS Hygiene and Infection Control*, 9(3), 1-10. <https://doi.org/10.3205/dgkh000243>
- Niinomi, M., & Nakai, M. (2011). Titanium-based biomaterials for preventing stress shielding between implant devices and bone. *International Journal of Biomaterials*, 2011, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2011/836587>
- OMS. (2015). *Informe mundial sobre el envejecimiento y la salud* (pp. 27-45). Recuperado de <https://www.who.int/ageing/publications/world-report-2015/es/>
- Pilhofer, M., Ladinsky, M. S., McDowall, A. W., & Jensen, G. J. (2010). Bacterial TEM. New insights from cryo-microscopy. *Methods in Cell Biology*, 96, 21-45. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(10\)96002-0](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(10)96002-0)
- Poondla, N., Srivatsan, T. S., Patnaik, A., & Petraroli, M. (2009). A study of the microstructure and hardness of two titanium alloys: Commercially pure and Ti-6Al-4V. *Journal of Alloys and Compounds*, 486(1-2), 162-167. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2009.06.172>
- Safdar, A., Wei, L. Y., Snis, A., & Lai, Z. (2012). Evaluation of microstructural development in electron beam melted Ti-6Al-4V. *Materials Characterization*, 65, 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.matchar.2011.12.008>
- Sedlaček, M., Gregorčič, P., & Podgornik, B. (2017). Use of the Roughness Parameters Ssk and Sku to Control Friction — A Method for Designing Surface Texturing. *Tribology Transactions*, 60(2), 260-266. <https://doi.org/10.1080/10402004.2016.1159358>
- Szymczyk-Ziółkowska, P., Hoppe, V., Rusińska, M., Gąsiorek, J., Ziółkowski, G., Dydak, K., Czajkowska, J., & Junka, A. (2020). The Impact of EBM-Manufactured Ti6Al4V ELI Alloy Surface Modifications on Cytotoxicity toward Eukaryotic Cells and Microbial Biofilm Formation. *Materials*, 13(12), 2822. <https://doi.org/10.3390/ma13122822>
- Teughels, W., Van Assche, N., Sliepen, I., & Quirynen, M. (2006). Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clinical Oral Implants Research*, 17(SUPPL. 2), 68-81. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01353.x>
- Trampuz, A., & Zimmerli, W. (2005). Prosthetic joint infections : update in diagnosis and treatment. *Swiss Medical Weekly*, 135, 243-252.
- Universitat d'Alacant. (2011). *Fundamentos de la microscopía confocal espectral*. Servicio de Selección y Formación de la Universidad de Alicante. <https://ssyf.ua.es/es/formacion/documentos/cursos-programados/2011/especifica/microscopia-optica/microscopia-optica-y-laser-confocal-2a-ed/tema-6.pdf>
- Universidad Politécnica de Valencia (UPV). (s. f.). *Servicio de Microscopía Electrónica: Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)*. Recuperado 18 de mayo de 2020, de <http://www.upv.es/entidades/SME/info/859071normalc.html>
- Valdez-Salas, B., Beltrán-Partida, E., Nedev, N., Ibarra-Wiley, R., Salinas, R., Curiel-Álvarez, M., Valenzuela-Ontiveros, Y., & Pérez, G. (2019). Controlled antifungal behavior on Ti6Al4V nanostructured by chemical nanopatterning. *Materials Science and Engineering C*, 96(2019), 677-683. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.11.086>
- Veiga, C., Loureiro, A. J. R., & Davim, J. P. (2012). Properties and applications of titanium alloys. *Reviews*

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

on *Advanced Materials Science*, 32 (2012), 133-148.

Voort Vander, G. F. (2000). Microindentation Hardness Testing. *ASM Handbook*, 8, 221–231. <https://doi.org/10.1361/asmhba0003272>

Wang, A., Jones, I. P., Landini, G., Mei, J., Tse, Y. Y., Li, Y. X., Ke, L., Huang, Y., Liu, L., Wang, C., & Sammons, R. L. (2018). Backscattered electron imaging and electron backscattered diffraction in the study of bacterial attachment to titanium alloy structure. *Journal of Microscopy*, 270(1), 53–63. <https://doi.org/10.1111/jmi.12649>

Wu, Y., Zitelli, J. P., TenHuisen, K. S., Yu, X., & Libera, M. R. (2011). Differential response of Staphylococci and osteoblasts to varying titanium surface roughness. *Biomaterials*, 32(4), 951–960. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.10.001>

Zhang, H. (2011). The basic properties of Building Materials. En H. Zhang (Ed.), *Building materials in civil engineering* (pp.7-28). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845699567.7>

Zhou, W., Apkarian, R., Wang, Z. L., & Joy, D. (2007). Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM). *Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications*, 1–40. https://doi.org/10.1007/978-0-387-39620-0_1

PRESUPUESTO

1. Presupuesto

En este apartado se muestra el presupuesto del presente trabajo final de máster.

Este se ha desglosado en tres partes:

- Una primera parte donde se muestran los cuadros de precios
- Una segunda en la que se desglosan los cuadros de precios descompuestos, los cuales están constituidos por las diferentes unidades de obra
- Una tercera y última en la cual se realizan las mediciones de las distintas unidades de obra que dan lugar a los capítulos de este trabajo

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

1.1. Cuadro de precios

A continuación, se muestra los cuadros de precios de la mano de obra, materiales y maquinaria

1.1.1. Cuadro de precios: mano de obra

Código	Nombre del recurso	Unidades	Precio
MOTL	Técnico de laboratorio	Hora (h)	23,55 €
MOIB	Ingeniero Biomédico	Hora (h)	39,21 €
MOIJ	Ingeniero jefe	Hora (h)	61,55 €

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

1.1.2. Cuadro de precios: maquinaria

Código	Nombre del recurso	Precio inversión (€)	Vida útil (años)	Horas/año	Precio(€)/hora
MQ1	Máquina de corte Accutom 100 de Struers y utillajes	18.100	10	1826	0,99
MQ2	Embutidora LaboPress-3 de Struers	19.000	10	1826	1,04
MQ3	Lijadora Knoth-Rotor-3 de Struers y utillajes	14.500	10	1826	0,79
MQ4	Pulidora semiautomática Rotopol-11 de Struers y utillajes	27.000	10	1826	1,47
MQ5	Difractómetro de Rayos X D2 Phaser de Bruker	59.545	7	1826	4,66
MQ6	Microscopio electrónico (FESEM) Ultra 55 de Zeiss	-	-	-	25
MQ7	Perfilómetro óptico Profilm 3D de Filmetrics	21.000	10	1826	1,15
MQ8	Durómetro HD9-45 de Centaur	4.400	15	1826	0,16
MQ9	Microdurómetro HMV de Shimadzu	28.000	10	1826	1,53
MQ10	Limpiador de ultrasonidos Elmasonic S30H de Elma	850	5	1826	0,10
MQ11	Autoclave STE-8-D de icanClave	1.850	5	1826	0,20
MQ12	Balanza de precisión XB 120A de Precisa	495	5	1826	0,05
MQ13	Pipeteador automático EppendorfResearch Plus de Eppendorf	91,50	10	1826	0,01
MQ14	Incubadora IN450plus de Memmert	5.450	10	1826	0,3
MQ15	Estufa de secado Conterm de J.P.Selecta	4.600	10	1826	0,25
MQ16	Microscopio óptico Eclipse LV100 de Nikon	1.104,95	10	1826	0,06
MQ17	Agitador vorticial ZX3 de Velp Scientifica	345	10	1826	0,02

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

MQ18	Turbidímetro DensiCheck Plus de Biomerieux	650	12	1826	0,03
MQ19	Aspirador de vacío FTA-1 de Biosan	220	5	1826	0,02
MQ20	Contador de colonias CL-570 de Sibata	1.450	15	1826	0,05
MQ21	Cabina de bioseguridad clase II AC2-4E de Esco	10.550	10	1826	0,6
MQ22	Microscopio confocal TCS-SP5-AOBS de Leica	-	-	-	30

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

1.1.3. Cuadro de precios: materiales

Código	Nombre del recurso	Unidades	Precio (€)
MA1	Agua destilada	Litro (l)	0,70
MA2	Etanol 96º	Litro (l)	21
MA3	Acetona	Litro (l)	4,25
MA4	Polvo de resina conductora	Kilogramo (kg)	47
MA5	Suspensión de diamante 9 µm	Litro (l)	204,2
MA6	Suspensión de sílice coloidal	Litro (l)	50
MA7	Agua oxigenada	Litro (l)	3,5
MA8	PBS	Litro (l)	32,42
MA9	TSB	Litro (l)	3,1
MA10	TSA	Litro (l)	4,5
MA11	Solución salina 0,9% NaCl	Litro (l)	0,72
MA12	Tubo eppendorf 1,5 ml	Unidades (ud)	0,03
MA13	Tubo eppendorf 2 ml	Unidades (ud)	0,03
MA14	Placa microtituladora	Unidades (ud)	2,40
MA15	Placa petri	Unidades (ud)	0,27
MA16	Puntas de pipeta (50-1000 µl)	Unidades (ud)	0,01
MA17	Puntas de pipeta (2.0-200 µl)	Unidades (ud)	0,01
MA18	Puntas de pipeta (0.1-20 µl)	Unidades (ud)	0,01
MA19	Bolsas de esterilización	Unidades (ud)	0,03
MA20	Tubo Falcon de 50 ml	Unidades (ud)	0,4
MA21	Pipeta graduada estéril 30 ml	Unidades (ud)	0,12

**Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación
aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V**

MA22	Ácido fluorhídrico	Litro (l)	126
MA23	Ácido nítrico	Litro (l)	286
MA24	Kit de viabilidad bacterial LIVE/DEATH BacLight (4800 ensayos)	Ensayos (ens)	707,45

1.2. Cuadro de precios descompuestos

En este apartado se muestran los cuadros de precios descompuestos de las siguientes ocho unidades de obra definidas en este proyecto:

- UO1: Difracción de Rayos X
- UO2: Perfilometría óptica
- UO3: Microscopía óptica
- UO4: Ensayo de dureza
- UO5: Ensayo de microdureza
- UO6: Ensayo de colonización bacteriana
- UO7: Microscopía confocal de fluorescencia
- UO8: Microscopía electrónica (FESEM) del biofilm

De igual modo, se han incluido las siguientes unidades auxiliares:

- UA1: Análisis de resultados
- UA2: Preparación de las muestras: corte
- UA3: Preparación de las muestras: embutición
- UA4: Preparación de las muestras: lijado y pulido
- UA5: Preparación de las muestras: limpieza y esterilización

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

Código	Descripción del recurso	Rendimiento	Precio (€)	Importe (€)
UO1	<i>Difracción de Rayos X de una muestra (ud)</i>			
MOTL	Técnica de laboratorio (h)	10	23,55	235,5
MQ5	Difractómetro de Rayos X (h)	9,5	4,66	44,27
UA1	Análisis de resultados (ud)	3	54,59	163,77
UA2	Preparación de las muestras: corte (h)	0,16	24,54	3,93

Clase: Mano de obra 235,5 €
 Clase: Maquinaria 44,76 €
 Clase: Unidad auxiliar 167,77 €
 Coste total: 447,96 €

Código	Descripción del recurso	Rendimiento	Precio (€)	Importe (€)
UO2	<i>FESEM de una muestra (ud)</i>			
MOTL	Técnico de laboratorio (h)	0,33	23,55	7,77
MQ6	Microscopio electrónico (FESEM) (h)	0,33	25	25
UA1	Análisis de resultados (ud)	1	54,59	54,59
UA2	Preparación de las muestras: corte (ud)	0,16	24,54	3,93
UA3	Preparación de las muestras: embutición (ud)	0,16	7,34	1,17
UA4	Preparación de las muestras: lijado y pulido (ud)	0,5	37,19	18,6

Clase: Mano de obra 7,77 €
 Clase: Maquinaria 25 €
 Clase: Unidad auxiliar 78,28 €
 Coste total: 111,05 €

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

Código	Descripción del recurso	Rendimiento	Precio (€)	Importe (€)
U03	<i>Perfilometría óptica de una muestra (ud)</i>			
MOTL	Técnica de laboratorio (h)	0,33	23,55	7,77
MQ7	Perfilómetro óptico (h)	0,33	1,15	0,38
UA1	Análisis de resultados (ud)	1	54,59	54,59

Clase: Mano de obra 7,77 €
 Clase: Maquinaria 0,38 €
 Clase: Unidad auxiliar 54,59 €
 Coste total: 62,74 €

Código	Descripción del recurso	Rendimiento	Precio (€)	Importe (€)
U04	<i>Microscopía óptica de una muestra (ud)</i>			
MOTL	Técnica de laboratorio (h)	0,75	23,55	17,66
MQ16	Microscopio óptico (h)	1	0,06	0,06
MA1	Agua destilada (l)	0,1	0,70	0,07
MA22	Ácido fluorhídrico (l)	0,003	126	0,38
MA23	Ácido nítrico (l)	0,006	286	1,72
UA1	Análisis de resultados (ud)	0,5	54,59	27,29

Clase: Mano de obra 17,66 €
 Clase: Maquinaria 0,06 €
 Clase: Material 2,17 €
 Clase: Unidad auxiliar 27,29 €
 Coste total: 47,18 €

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

Código	Descripción del recurso	Rendimiento	Precio (€)	Importe (€)
UO5	<i>Ensayo de dureza Rockwell de 5 muestras (ud)</i>			
MOTL	Técnica de laboratorio (h)	1,5	23,55	35,32
MQ8	Durómetro HD9-45 de Centaur (h)	1,5	0,16	0,24
UA1	Análisis de resultados (ud)	1	54,59	54,59

Clase: Mano de obra 35,32 €

Clase: Maquinaria 0,24€

Clase: Unidad auxiliar 54,59 €

Coste total: 90,15 €

Código	Descripción del recurso	Rendimiento	Precio (€)	Importe (€)
UO6	<i>Ensayo de microdureza Vickers de 5 muestras (ud)</i>			
MOTL	Técnica de laboratorio (h)	1,5	23,55	35,32
MQ9	Microdurómetro (h)	1,5	1,53	2,29
UA1	Análisis de resultados (ud)	1	54,59	54,59

Clase: Mano de obra 35,32 €

Clase: Maquinaria 2,29€

Clase: Unidad auxiliar 54,59 €

Coste total: 92,20 €

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

Código	Descripción del recurso	Rendimiento	Precio (€)	Importe (€)
UO7	<i>Ensayo de colonización bacteriana de 15 muestras (ud)</i>			
MOTL	Técnica de laboratorio (h)	15	23,55	353,25
MA1	Agua destilada (l)	2	0,70	1,40
MA2	Etanol 96º (l)	0,5	21	10,50
MA8	PBS (l)	0,017	32,42	0,55
MA9	TSB (l)	0,04	3,10	0,12
MA10	TSA (l)	1	4,50	4,50
MA11	Solución salina 0,9% NaCl (l)	0,7	0,72	0,51
MA12	Tubo eppendorf 1,5 ml (ud)	75	0,03	2,25
MA13	Tubo eppendorf 2 ml (ud)	15	0,03	0,45
MA14	Placa microtituladora (ud)	1	2,40	2,40
MA15	Placa Petri (ud)	15	0,27	4,05
MA16	Puntas de pipeta (100-1000 µl) (ud)	50	0,01	0,5
MA17	Puntas de pipeta (2.0-200 µl) (ud)	105	0,01	1,05
MA18	Puntas de pipeta (0.1-20 µl) (ud)	75	0,01	0,75
MA20	Tubo Falcon 50 ml (ud)	1	0,4	0,4
MA21	Pipeta graduada estéril 30 ml (ud)	1	0,12	0,12
MQ10	Limpiador de ultrasonidos Elmasonic S30H de Elma (h)	0,16	0,10	0,02
MQ12	Balanza de precisión XB 120A de Precisa (h)	0,16	0,05	0,01
MQ13	Pipeteador automático EppendorfResearch Plus de Eppendorf (h)	12	0,01	0,12
MQ14	Incubadora IN450plus de Memmert (h)	48	0,3	14,40
MQ17	Agitador vorticial ZX3 de Velp Scientifica (h)	1	0,02	0,02
MQ18	Turbidímetro DensiCheck Plus de Biomerieux (h)	0,16	0,03	0,01
MQ19	Aspirador de vacío FTA-1 de Biosan (h)	0,5	0,02	0,01
MQ20	Contador de colonias CL-570 de Sibata (h)	1	0,05	0,05
MQ21	Cabina de bioseguridad clase II AC2-4E de Esco (h)	12	0,6	7,20

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

UA1	Análisis de resultados (ud)	1	54,59	54,59
UA2	Preparación de las muestras: corte (ud)	7	24,54	171,78
UA5	Preparación de las muestras: limpieza y esterilización de 15 muestras (ud)	1	42,68	42,68

Clase: Mano de obra	353,25€
Clase: Materiales	29,55 €
Clase: Maquinaria	21,84€
Clase: Unidad auxiliar	269,05 €
Coste total:	673,69 €

Código	Descripción del recurso	Rendimiento	Precio (€)	Importe (€)
UO8	<i>Microscopía confocal de 10 muestras (ud)</i>			
MOTL	Técnica de laboratorio (h)	5	23,55	117,75
MA8	PBS (l)	0,017	32,42	0,55
MA9	TSB (l)	0,04	3,10	0,12
MA14	Placa microtituladora (ud)	2	2,40	4,80
MA16	Puntas de pipeta (100-1000 µl) (ud)	25	0,01	0,25
MA17	Puntas de pipeta (2.0-200 µl) (ud)	20	0,01	0,20
MA20	Tubo Falcon 50 ml (ud)	1	0,40	0,40
MA21	Pipeta graduada estéril 30 ml (ud)	1	0,12	0,12
MA24	Kit de viabilidad bacterial LIVE/DEATH BaCLight (4800 ensayos)	20	707,45	2,94
MQ13	Pipeteador automático EppendorfResearch Plus de Eppendorf (h)	1	0,01	0,01
MQ14	Incubadora IN450plus de Memmert (h)	48	0,3	14,40
MQ18	Turbidímetro DensiCheck Plus de Biomerieux (h)	0,16	0,03	0,01
MQ19	Aspirador de vacío FTA-1 de Biosan (h)	0,5	0,02	0,01
MQ21	Cabina de bioseguridad clase II AC2-4E de Esco (h)	1	0,6	0,6

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

MQ22	Microscopio confocal TCS-SP5-AOBS de Leica (h)	2	30	60
UA1	Análisis de resultados (ud)	1	54,59	54,59
UA2	Preparación de las muestras: corte (ud)	3	24,54	73,62
UA5	Preparación de las muestras: limpieza y esterilización de 15 muestras (ud)	1	42,68	42,68

Clase: Mano de obra 117,75 €

Clase: Materiales 9,38 €

Clase: Maquinaria 75,02 €

Clase: Unidad auxiliar 170,89 €

Coste total: 373,04 €

Código	Descripción del recurso	Rendimiento	Precio (€)	Importe (€)
UO9	<i>Microscopía electrónica (FESEM) del biofilm de 10 muestras(ud)</i>			
MOTL	Técnico de laboratorio (h)	5	23,55	117,75
MA8	PBS (l)	0,017	32,42	0,55
MA9	TSB (l)	0,04	3,10	0,12
MA14	Placa microtituladora (ud)	2	2,40	4,80
MA16	Puntas de pipeta (100-1000 µl) (ud)	25	0,01	0,25
MA17	Puntas de pipeta (2.0-200 µl) (ud)	20	0,01	0,20
MA20	Tubo Falcon 50 ml (ud)	1	0,40	0,40
MA21	Pipeta graduada estéril 30 ml (ud)	1	0,12	0,12
MA24	Kit de viabilidad bacterial LIVE/DEATH BacLight (4800 ensayos)	20	707,45	2,94
MQ6	Microscopio electrónico (FESEM) (h)	3	25	75
MQ13	Pipeteador automático EppendorfResearch Plus de Eppendorf (h)	1	0,01	0,01
MQ14	Incubadora IN450plus de Memmert (h)	48	0,3	14,40

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

MQ18	Turbidímetro DensiCheck Plus de Biomerieux (h)	0,16	0,03	0,01
MQ19	Aspirador de vacío FTA-1 de Biosan (h)	0,5	0,02	0,01
MQ21	Cabina de bioseguridad clase II AC2-4E de Esco (h)	1	0,6	0,6
UA1	Análisis de resultados (ud)	1	54,59	54,59
UA2	Preparación de las muestras: corte (ud)	3	24,54	73,62
UA5	Preparación de las muestras: limpieza y esterilización de 15 muestras (ud)	1	42,68	42,68

Clase: Mano de obra	117,75€
Clase: Materiales	10,89 €
Clase: Maquinaria	90,02 €
Clase: Unidad auxiliar	170,89 €
Coste total:	389,55 €

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

Código	Descripción del recurso	Rendimiento	Precio (€)	Importe (€)
UA1	<i>Análisis de resultados (ud)</i>			
MOIB	Ingeniero biomédico (h)	1	39,21	39,21
MOIJ	Ingeniero Jefe (h)	0,25	61,55	15,38

Clase: Mano de obra 54,59 €

Coste total: 54,59 €

Código	Descripción del recurso	Rendimiento	Precio (€)	Importe (€)
UA2	<i>Preparación de las muestras: corte (ud)</i>			
MOTL	Técnico de laboratorio (h)	1	23,55	23,55
MQ1	Máquina de corte (h)	1	0,99	0,99

Clase: Mano de obra 23,55 €

Clase: Maquinaria 0,99 €

Coste total: 24,54 €

Código	Descripción del recurso	Rendimiento	Precio (€)	Importe (€)
UA3	<i>Preparación de las muestras: embutición de una muestra (ud)</i>			
MOTL	Técnico de laboratorio (h)	0,25	23,55	5,88
MQ2	Embutidora (h)	0,25	1,04	0,26
MA4	Polvo de resina conductora (kg)	0,01	47	0,47

Clase: Mano de obra 5,88 €

Clase: Maquinaria 0,99 €

Clase: Materiales 0,47 €

Coste total: 7,34 €

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

Código	Descripción del recurso	Rendimiento	Precio (€)	Importe (€)
UA4	<i>Preparación de las muestras: lijado y pulido de una muestra (ud)</i>			
MOTL	Técnico de laboratorio (h)	1,25	23,55	29,44
MQ3	Lijadora (h)	0,75	0,79	0,59
MQ4	Pulidora (h)	0,5	1,47	0,735
MA1	Agua destilada (l)	0,1	0,70	0,07
MA2	Etanol (96º) (l)	0,25	21	5,25
MA5	Suspensión de diamante 9µm (l)	0,003	204,2	0,61
MA6	Suspensión sílice coloidal (l)	0,01	50	0,5
MA7	Agua oxigenada (l)	0,001	3,5	0,003

Clase: Mano de obra 29,44 €

Clase: Maquinaria 1,32 €

Clase: Materiales 6,43€

Coste total: 37,19 €

Código	Descripción del recurso	Rendimiento	Precio (€)	Importe (€)
UA5	<i>Preparación de las muestras: limpieza y esterilización de 15 muestras (ud)</i>			
MOTL	Técnico de laboratorio (h)	1,5	23,55	35,32
MQ10	Limpiador de ultrasonidos (h)	0,16	0,10	0,02
MQ11	Autoclave (h)	0,84	0,20	0,17
MA1	Agua destilada (l)	0,50	0,70	0,35
MA2	Etanol (96º) (l)	0,25	21	5,25
MA3	Acetona (l)	0,25	4,25	1,06
MA19	Bolsas de esterilización (ud)	17	0,03	0,51

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

Clase: Mano de obra 35,32 €

Clase: Maquinaria 0,19 €

Clase: Materiales 7,17 €

Coste total: 42,68 €

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

1.3. Mediciones

(C1) Capítulo 1: Caracterización microestructural y topográfica de las muestras				
Código	Descripción	Medición	Precio	Importe
U01	<i>Difracción de Rayos X de una muestra (ud)</i>	5	447,96 €	2.239,80 €
U02	<i>Perfilometría óptica de una muestra (ud)</i>	5	62,74 €	313,70 €
U03	<i>Microscopía óptica de una muestra (ud)</i>	5	47,18 €	235,90 €
UA1	<i>Análisis de resultados (ud)</i>	125	54,59 €	6.823,75 €
TOTAL			9.613,15 €	

(C2) Capítulo 2: Caracterización mecánica de las muestras				
Código	Descripción	Medición	Precio	Importe
U04	<i>Ensayo de dureza Rockwell</i>	1	90,15 €	90,15 €
U05	<i>Ensayo de microdureza Vickers</i>	1	92,20 €	92,20 €
UA1	<i>Análisis de resultados (ud)</i>	50	54,59 €	2.729,5 €
TOTAL			2.911,85 €	

(C3) Capítulo 3: Ensayos microbiológicos				
Código	Descripción	Medición	Precio	Importe
U06	<i>Ensayo de colonización bacteriana de 15 muestras</i>	8	673,69 €	5.389,52 €
U07	<i>Microscopía confocal de 10 muestras (ud)</i>	1	373,04 €	373,04 €
U08	<i>Microscopía electrónica (FESEM) del biofilm de 10 muestras(ud)</i>	1	389,55 €	389,55 €
UA1	<i>Análisis de resultados (ud)</i>	175	54,59 €	9.553,25 €
TOTAL			15.705,36 €	

Análisis de la influencia del proceso de fabricación utilizado (forja y fabricación aditiva) en el crecimiento de colonias bacterianas en la aleación Ti6Al4V

1.4. Presupuesto de ejecución por contrata

Código	Descripción	Importe
C1	Capítulo 1: caracterización microestructural y topográfica de las muestras	9.613,15 €
C2	Capítulo 2: caracterización mecánica de las muestras	2.911,85 €
C3	Capítulo 3: ensayos microbiológicos	15.705,36 €
TOTAL PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN MATERIAL		28.230,36 €
+ 15 % GASTOS GENERALES		4.234,55 €
+ 6% BENEFICIO INDUSTRIAL		1.693,82 €
SUMA PARCIAL		34.158,73 €
+ 21% IVA		7.173,33 €
PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN POR CONTRATA		41.332,07 €

Asciende el presupuesto de ejecución por contrata a la expresada cantidad de **CUARENTA Y UN MIL TRESCIENTOS TREINTA Y DOS EUROS CON SIETE CÉNTIMOS.**