

2019-2020

Entregable Publicable

PROTEGEL – DESARROLLO DE
RECUBRIMIENTOS ANTIMICROBIANOS
BASADOS EN NANOPARTÍCULAS DE Ag
SOBRE ALEACIÓN DE TITANIO
EMPLEADA EN PRÓTESIS

Nº Expte IMDEEA/2019/10 (AIDIMME)

Titulo Entregable: RESUMEN EJECUTIVO

Nº Entregable: E 1.2

Este documento recoge información sobre el proyecto Protegel

PARTNERS: AIDIMME





Contenido

1. OBJETIVOS.....	3
2. ACTIVIDADES REALIZADAS	3
3. OBJETIVOS DEL PROYECTO.....	3
4. PT4. ESTADO DEL ARTE Y DEFINICIÓN DE METODOLOGÍAS <i>Error! Marcador no definido.</i> 5	
5. PT5. FABRICACIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS	6
6. PT6. DESARROLLO Y APLICACIÓN DE RECUBRIMIENTOS ANTIBACTERIANOS	11
7. PT7. CARACTERIZACIÓN FÍSICA, QUÍMICA Y MORFOLÓGICA DE LOS RECUBRIMIENTOS	14
8. PT8. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS DE LAS PIEZAS RECUBIERTAS	37



1. OBJETIVOS

El principal objetivo de este documento es mostrar, de manera resumida, los principales resultados obtenidos en la tercera anualidad del proyecto PROTEGEL.

2. ACTIVIDADES REALIZADAS

En este entregable se incluyen las siguientes actividades que han sido realizadas durante la anualidad del proyecto de investigación.

Para la consecución de los objetivos del proyecto se plantearon los siguientes paquetes técnicos de trabajo:

- PT1. Gestión y coordinación.
- PT2. Difusión.
- PT3. Transferencia y promoción de resultados.
- PT4. Estado del arte y definición de metodologías.
- PT5. Fabricación y preparación de muestras.
- PT6. Desarrollo y aplicación de recubrimientos antibacterianos.
- PT7. Caracterización, física, química y morfológica de los recubrimientos.
- PT8. Evaluación de las propiedades antibacterianas de las piezas recubiertas.

3. OBJETIVOS DEL PROYECTO

El objetivo principal del proyecto de investigación es el desarrollo de recubrimientos antibacterianos sobre prótesis de Ti-6Al-4V. El material más empleado para la fabricación de prótesis es la aleación de Ti-6Al-4V debido a su resistencia a la corrosión, buenas propiedades mecánicas y gran biocompatibilidad. Al año se implantan 2.5 millones de implantes de cadera y rodilla. Uno de los principales problemas con la implantación de prótesis son los procesos de infección que tienen lugar en aproximadamente un 2 % de los casos. Ello supone un gran perjuicio económico al tener que reemplazar el implante, además de la necesidad de nuevos procesos quirúrgicos lo que incide en la calidad de vida del paciente. Por ello, el presente proyecto de investigación pretende dar solución a este problema a través del desarrollo de recubrimientos antibacterianos basados en nanopartículas de plata (Ag). La proliferación de bacterias resistentes a los tratamientos mediante antibióticos hace necesario la búsqueda de alternativas a estos tratamientos convencionales. Los iones Ag^+ liberados a partir de las nanopartículas de Ag muestran una actividad antibacteriana de amplio espectro, debido a los diferentes mecanismos con los que puede actuar sobre las bacterias.

Comercialmente, solo existen un par de empresas que comercialicen prótesis con recubrimientos antibacterianos basados en Ag. Por tanto, existe un gran margen de mejora y desarrollo en este campo. Se estima que la cuota de mercado de los productos de Ti puede alcanzar los 26000 millones de dólares el año 2020. Por tanto, una reducción de la incidencia de los procesos de infección tendrá una gran repercusión económica. En el proyecto se pretende desarrollar recubrimientos que incorporen nanopartículas de Ag. Para la fijación de las nanopartículas de plata se emplearán diferentes técnicas químicas de deposición mediante tecnología sol-gel. Se pretende obtener una distribución y un tamaño de nanopartícula adecuado para tal fin.



El proyecto se adecua a la convocatoria ayudas dirigidas a centros tecnológicos de la Comunitat Valenciana para el desarrollo de proyectos de I+D de carácter no económico realizados en cooperación con empresas. Diferentes empresas interesadas participan en el proyecto. Los resultados tienen una clara transferibilidad al sector productivo valenciano, dado que se pretende conseguir un recubrimiento que dote de funcionalidad antibacteriana a las prótesis ya existentes en el mercado.

A continuación, se muestran los objetivos específicos del proyecto:

1. Desarrollar recubrimientos antibacterianos mediante diferentes tecnologías para que se adhiera a la superficie del material Ti6Al4V. Estos recubrimientos incluirán en su estructura nanopartículas inorgánicas con capacidad bactericida (las nanopartículas de Ag han mostrado ser las más efectivas). Se pretende conseguir una liberación progresiva y prolongada Ag^+ de tal manera que el efecto bactericida pueda actuar durante más de 30 días.
2. Aplicar los recubrimientos desarrollados sobre prótesis macizas y sobre prótesis fabricadas mediante procesos de fabricación avanzada.
3. Evaluar el mejor tratamiento superficial para que el recubrimiento quede fijado adecuadamente sobre la superficie de las piezas metálicas.
4. Evaluar el mejor método de síntesis de los recubrimientos entre varias rutas de síntesis sol-gel.
5. Evaluar la liberación de Ag^+ con el tiempo para determinar su posible eficacia bactericida.
6. Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana de los recubrimientos frente *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.
7. Elegir la técnica más adecuada de deposición de recubrimientos antibacterianos a partir de los resultados obtenidos.

A continuación, se muestra un resumen de los diferentes paquetes de trabajo técnicos desarrollados durante la anualidad del proyecto.

PT4. ESTADO DEL ARTE Y DEFINICIÓN DE METODOLOGÍA

Paquete de trabajo 4: Estado del arte y definición de metodologías

Tarea 4.1. Estado del arte sobre recubrimientos antibacterianos para prótesis y métodos de aplicación

Se ha realizado un estudio del estado del arte sobre la obtención de recubrimientos de SiO_2/Ag , HA/Ag y TiO_2/Ag . En el entregable 4.1 del proyecto se puede encontrar un resumen más detallado de cada uno de los estudios.

Tarea 4.2. Estado del arte sobre técnicas de caracterización de los recubrimientos

En el E4.1 se presenta también un resumen de las diferentes técnicas a ser empleadas en la caracterización de los recubrimientos. A continuación se citan las técnicas, en el entregable 4.1 se puede encontrar más información sobre cada una de las técnicas. A priori las técnicas seleccionadas para llevar a cabo la caracterización (así como la información obtenida de la técnica) fueron las siguientes, aunque finalmente no todas ellas han sido empleadas:

- **Microscopía electrónica de barrido de efecto campo (FESEM):** se obtiene la morfología de los recubrimientos en la escala nanométrica.
- **Energía dispersiva de rayos-X (EDX):** se obtiene la composición de los recubrimientos a escala nanométrica.
- **Microscopía electrónica de transmisión (TEM):** se obtiene la morfología de los recubrimientos a escala nanométrica.
- **Microscopía de fuerzas atómicas (AFM):** se obtiene la morfología de los recubrimientos a escala nanométrica, así como una representación 3-D de la morfología de los recubrimientos y la rugosidad de los mismos.
- **Dispersión dinámica de luz (DLS):** se obtiene el tamaño de las partículas de sol-gel, sirve para determinar la estabilidad de las disoluciones sol-gel, así como la evolución temporal del tamaño de las partículas.
- **Ensayos electroquímicos de corrosión (espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS), curvas de polarización (CP) y modulación electroquímica de frecuencia (EFM)):** son técnicas que sirven para determinar la resistencia eléctrica de los recubrimientos, así como la densidad de corriente de corrosión de los mismos, lo que da una idea de la protección que ofrecen los recubrimientos.
- **Plasma acoplado inductivamente (ICP):** esta técnica sirve para cuantificar los elementos en disolución. En el caso del presente proyecto se emplea principalmente para determinar la liberación de Ag, lo que permite determinar su cinética de liberación con el tiempo.
- **Ensayos antibacterianos:** sirven para determinar la eficiencia antibacteriana de los recubrimientos. Para ello se emplearán las siguientes bacterias:
 - Bacteria Gram-positiva: *Staphylococcus aureus* CECT 240
 - Bacteria Gram-negativa: *Staphylococcus epidermidis* CECT 231
- **Espectroscopía de infrarrojos mediante transformada de Fourier:** sirve para determinar los grupos funcionales, así como enlaces de las muestras.
- **Preparación metalográfica:** sirve para realizar una preparación adecuada de la superficie metálica.

4. PT5. FABRICACIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Tarea 5.1. Fabricación de muestras de Titanio por fabricación aditiva (FA)

Se fabricaron probetas metálicas mediante fabricación aditiva a partir de polvo de Ti6Al4V. En la Figura 1 se muestra un diseño CAD de las piezas metálicas con diferente porosidad y fabricadas mediante fabricación aditiva; donde se puede observar el diferente tamaño de poro dependiendo de la muestra (0.98 mm, 0.84 mm y 0.71 mm de tamaño de poro).

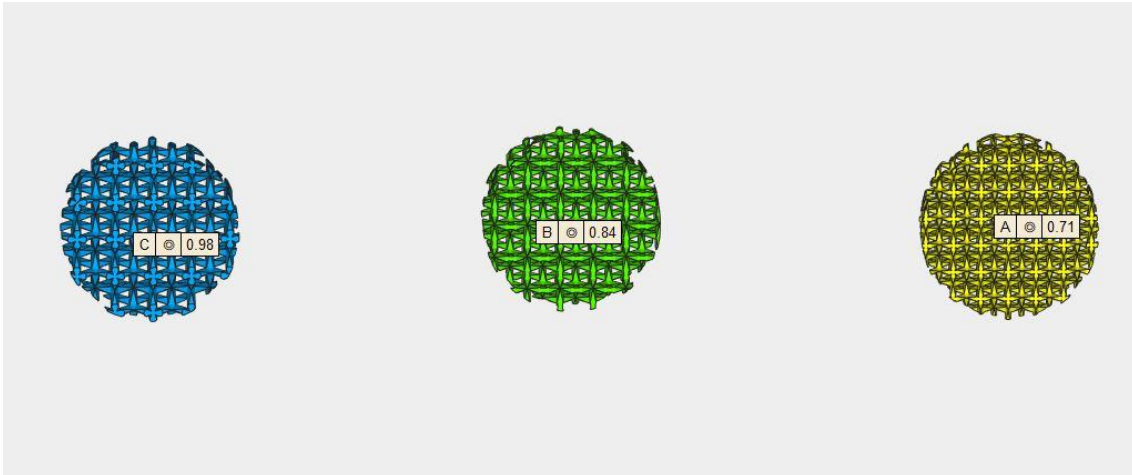


Figura 1. Diseño CAD de las piezas metálicas fabricadas mediante fabricación aditiva.

En la Figura 2 se muestran las diferentes piezas fabricadas mediante fabricación aditiva.



Figura 2. Muestras fabricadas mediante fabricación aditiva.



En la Figura 3 se muestran con mayor detalla cada una de las piezas fabricadas. En la parte superior izquierda se pueden observar las piezas con menor tamaño de poro, siendo casi macizas. Posteriormente se eligieron 3 tamaños de celdilla para fabricar piezas porosas. La mayor porosidad de las piezas de Ti favorece una mayor osteointegración al integrarse el tejido óseo y el músculo en los poros de las piezas metálicas. Así pues, en la parte superior derecha se muestra una pieza metálica con el menor tamaño de poro. En la parte inferior izquierda se muestra la pieza metálica con un tamaño de poro intermedio. Finalmente, en la parte inferior derecha se muestra una probeta metálica con el mayor tamaño de poro.

Con los diferentes tamaños de poro se pretende observar experimentalmente si al recubrir las piezas con los diferentes sol-gel se produce un recubrimiento sobre todo la superficie de la pieza metálica tanto en el exterior como en el interior de los poros. Si el tamaño de poro es muy pequeño no se conseguirá una buena penetración del sol-gel hacia el interior de la pieza metálica, debido a la tensión superficial, por tanto los poros interiores no se recubrirían con el sol-gel. Por ello, con el diferente tamaño de celdilla se quiere determinar el tamaño de celdilla mínimo que sería necesario para que toda la superficie de las piezas metálicas quedara recubierta con el sol-gel.



Figura 3. Detalle de muestras fabricadas mediante fabricación aditiva.

Posteriormente se fabricaron piezas de mayor tamaño para realizar los ensayos antibacterianos. En la Figura 4 se muestran las piezas de 35 mm de diámetro y 5 mm de espesor.

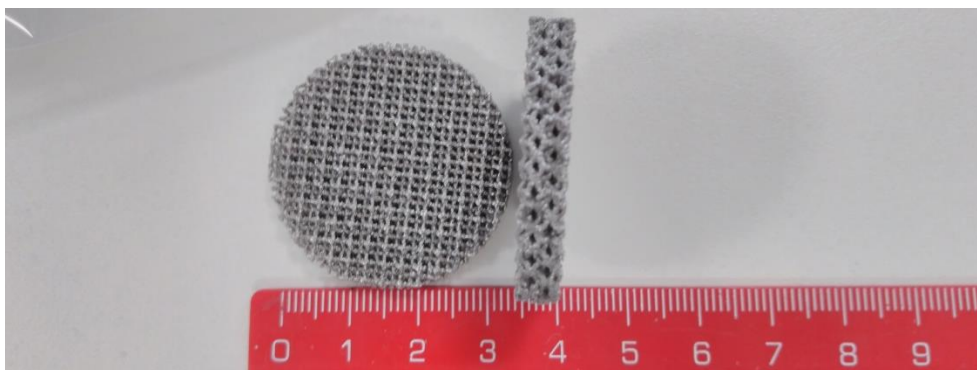




Figura 4. Detalle de muestras fabricadas mediante fabricación aditiva (diámetro 35 mm, espesor 5 mm).

Tarea 5.2. Preparación superficial de piezas macizas y realizadas mediante FA

Para las piezas macizas se compraron barras de Titanio de diferentes diámetros (12 mm, 35 mm y 65 mm). A partir de estas barras, se cortaron probetas de 3 mm de espesor para probetas con un diámetro de 12 mm y 5 mm de espesor para probetas con diámetros de 35 mm y 65 mm.

En la Figura 5 se muestran las barras de diferentes diámetros que se compraron para poder fabricar las probetas para poder realizar los ensayos. Las probetas de 65 mm de diámetro se emplean para realizar los ensayos de corrosión. Las probetas de 35 mm de diámetro se emplean para realizar los ensayos antibacterianos. Las probetas de 12 mm de diámetro se emplean para realizar las pruebas de deposición de las formulaciones sol-gel y poder encontrar las condiciones óptimas de deposición.



Figura 5. Barras de Ti compradas para poder fabricar probetas de diferente diámetro.

En la Figura 6 se muestran las probetas obtenidas al cortar las barras de Ti de diferente diámetro y ser posteriormente mecanizadas y torneadas con un torno de control numérico.

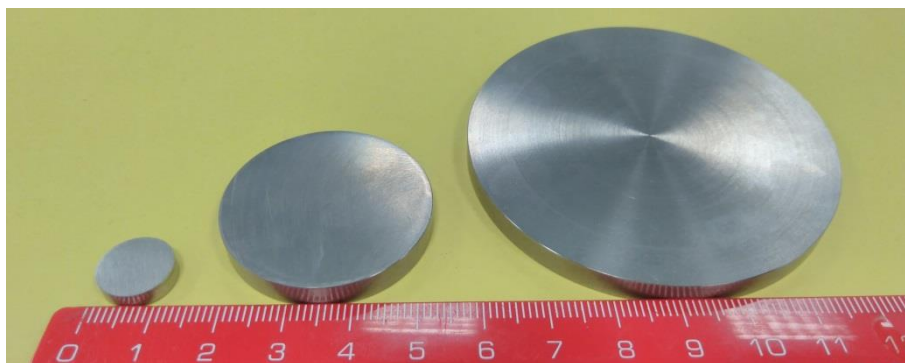


Figura 6. Probetas de Ti de diferente diámetro obtenidas a partir del corte de las barras de diferente diámetro.



Con las probetas metálicas macizas obtenidas se realizó un pulido de la superficie con una pulidora.

Una vez pulidas las muestras metálicas se realizó un lavado de las probetas con agua destilada y finalmente un lavado con etanol en ultrasonidos durante 20 minutos. De esta manera se consigue eliminar los restos de material del pulido.

Finalmente se realiza un tratamiento térmico a 200°C durante 2 horas en una mufla para producir una capa de TiO₂. De esta forma, se puede producir una mejor adhesión del sustrato con los recubrimientos, al reducir la concentración de tensión y la diferencia de los coeficientes de expansión entre los recubrimientos y el sustrato de Ti.¹

En algunas de las muestras se ha realizado un tratamiento superficial mediante decapado; de este modo se consigue eliminar parte del material superficial y se aumenta la rugosidad de la superficie. Sobre esta superficie más rugosa se puede conseguir un mejor anclaje del sol-gel sobre las muestras de Ti6Al4V. Esta técnica se ha aplicado sobre todo sobre las muestras de chapa de Ti, al no poder aplicar la técnica de lijado superficial debido al mayor tamaño de las chapas. Aunque posteriormente se ha aplicado a piezas cilíndricas también, ya que el aumento de la rugosidad de la superficie favorece el anclaje de los recubrimientos aplicados posteriormente. El tratamiento de decapado se realizó con una disolución al 10 % de ácido oxálico.² Finalmente las muestras fueron lavadas con agua destilada y secadas. En la Figura 7 se muestra el proceso de decapado.

En la Figura 7-a se muestra la disolución de decapado tras iniciar el proceso. Se puede observar que la disolución es transparente y va adquiriendo un color amarillento durante los primeros minutos. Tras finalizar el decapado (Figura 7-b) se puede observar el oscurecimiento de la disolución debido al proceso de ataque superficial del ácido oxálico sobre el Titanio y la consiguiente formación de oxalatos de titanio.

En la Figura 7-c,d se muestran muestras de Ti en forma de chapa y en forma de probetas cilíndricas antes de realizar el decapado (izquierda) y tras realizar el decapado (derecha). Tras realizar el decapado se puede observar que las muestras decapadas presentan un aspecto mate, debido a la mayor rugosidad superficial creada durante el proceso de decapado.

¹ A.A. El Hadad et al., Materials 10 (2017) 94.

² F. Montilla et al. J. Phys. Chem. B 108 (2004) 5036-5043

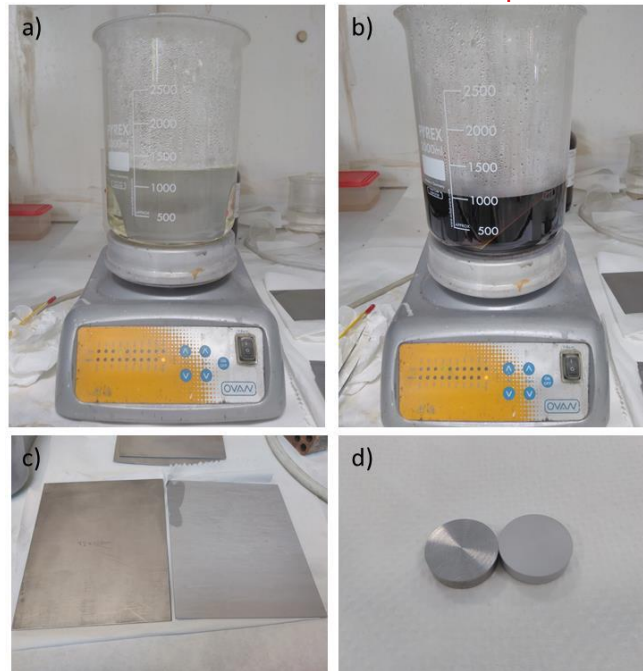


Figura 7. a) Disolución de decapado (ácido oxálico al 10 % en peso en agua) a) tras empezar el decapado, b) al finalizar el decapado. c) Chapas de Ti6Al4V sin decapar (izquierda) y decapada (derecha). d) Probeta cilíndrica de Ti6Al4V sin decapar (izquierda) y decapada (derecha).

5. PT6. DESARROLLO APLICACIÓN DE RECUBRIMIENTOS ANTIBACTERIANOS

Tarea 6.1. Recubrimientos antibacterianos obtenidos mediante técnica química sol-gel

Posteriormente, tanto las muestras obtenidas mediante fabricación aditiva, así como las piezas macizas fueron recubiertas con los diferentes tipos de recubrimiento que se muestran a continuación:

- Recubrimiento sol-gel de SiO_2 + nanopartículas de plata.
- Recubrimiento sol-gel de hidroxiapatita + nanopartícula de plata.
- Recubrimiento sol-gel de TiO_2 + nanopartículas de plata.

Por lo que respecta a las piezas obtenidas mediante fabricación aditiva, se seleccionó el mayor tamaño de poro, ya que si el tamaño de poro era muy pequeño, el mismo quedaba bloqueado por parte de la disolución sol-gel de síntesis.

En la Figura 8 se muestra el proceso de preparación de una formulación sol-gel de SiO_2 + Ag.



Figura 8. Proceso de preparación de la disolución con sol-gel de SiO_2 + Ag.

Uno de los principales parámetros que se emplean a la hora de obtener formulaciones sol-gel es el tamaño de las partículas de sol-gel en disolución. Este tamaño además va evolucionando con el tiempo. Para medir el tamaño de los agregados sol-gel se emplea la técnica de dispersión dinámica de luz (dynamic light scattering). En la Figura 9 se muestra un ejemplo de la distribución de tamaños de nanopartícula en función del número de nanopartículas para un sol-gel acabado de obtener y el mismo sol-gel transcurridas 24 h tras la síntesis. Se puede observar como el tamaño de las partículas de sol-gel tras realizar la síntesis es de unos 10 nm. Sin embargo, tras 24 h tras la síntesis, el tamaño de partícula aumenta hasta unos 700-800 nm. Este aumento del tamaño se debe a las reacciones de condensación de los organosilanos, que van produciendo nuevos enlaces entre las moléculas de los organosilanos y por tanto aumenta el tamaño de las partículas sol-gel en disolución.

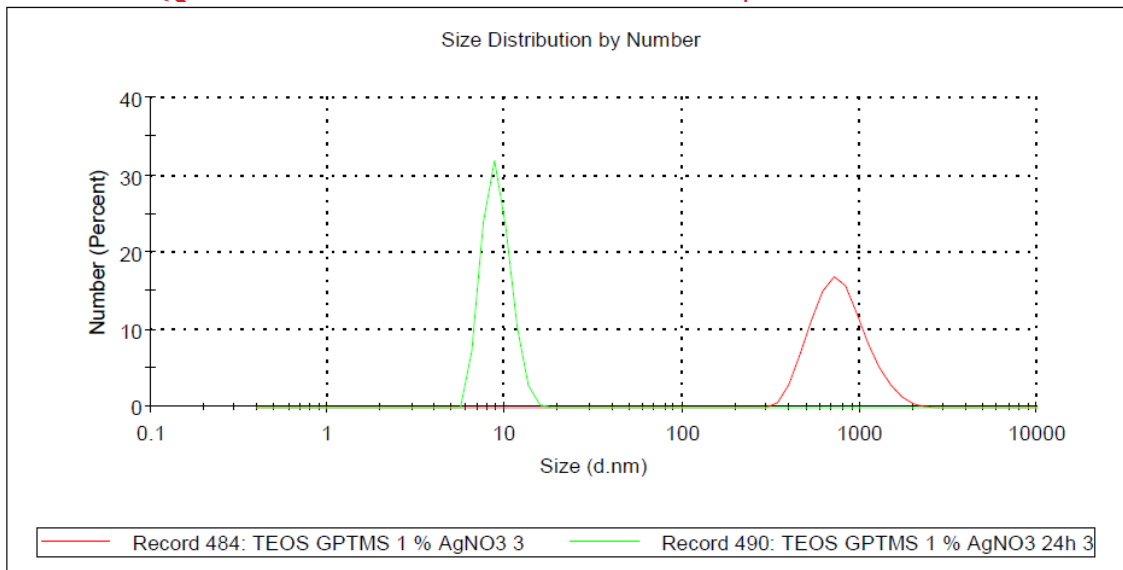


Figura 9. Comparación de la distribución de tamaños en intensidad del sol-gel de SiO₂ + AgNO₃ tras 0 h y 24 h tras realizar la síntesis de la formulación sol-gel.

Tras la etapa de síntesis del sol-gel se realiza el recubrimiento de las muestras. Finalmente se aplica un tratamiento térmico para que se evapore el agua y el disolvente y quede el recubrimiento condensado de sol-gel de SiO₂.

En la Figura 10 se muestran probetas macizas y probetas fabricadas mediante fabricación aditiva de Ti6Al4V. Las muestras han sido recubiertas con un sol-gel de SiO₂-Ag. los recubrimientos presentan una tonalidad amarilla, que se debe a la formación de nanopartículas de plata.

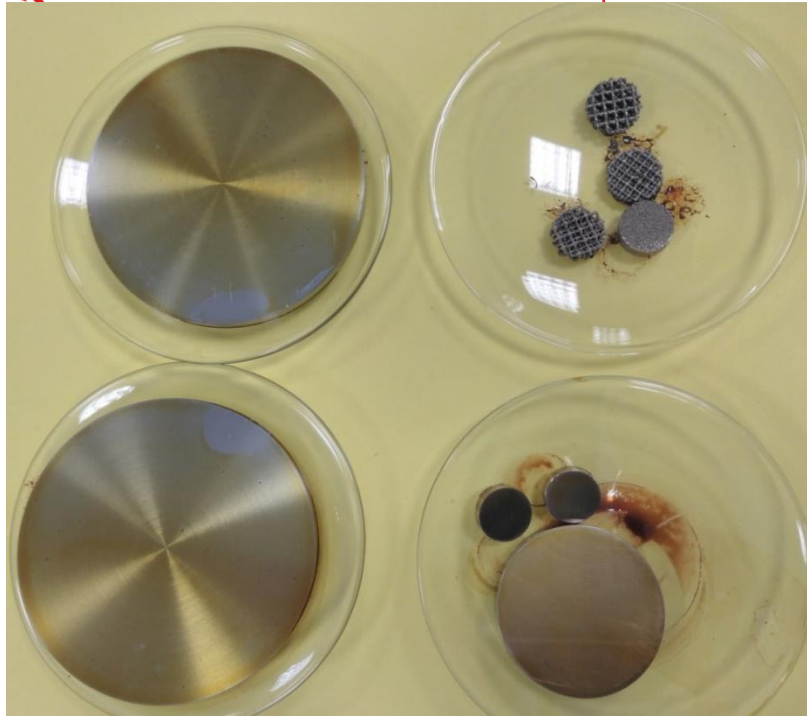


Figura 10. Probetas recubiertas con sol-gel de SiO_2 y Ag.

Se realizaron recubrimientos sobre probetas de fabricación aditiva. En la Figura 11 se muestran de izquierda a derecha las muestras de fabricación aditiva sin recubrir (izquierda), recubiertas con sol-gel sin Ag (centro) y recubiertas con sol-gel con Ag (derecha).

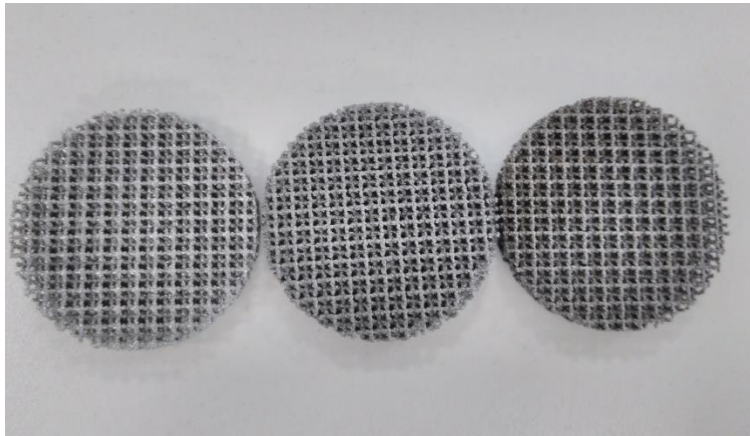


Figura 11. Probetas de fabricación aditiva sin recubrir (izquierda), recubiertas con sol-gel con Ag (centro) y recubiertas con sol-gel con Ag (derecha).

6. PT7. CARACTERIZACIÓN FÍSICA, QUÍMICA Y MORFOLÓGICA DE LOS RECUBRIMIENTOS

Tarea 7.1. Caracterización físico-química de los recubrimientos

Cinéticas de liberación de elementos. Análisis mediante ICP (inductively coupled plasma)

Para obtener la cinética de liberación de los diferentes elementos se pusieron en contacto las probetas recubiertas con fluido corporal simulado (simulated body fluid). Para ello se colocaron en contacto 50 mL del fluido corporal simulado con las piezas recubiertas. Posteriormente, las muestras fueron incubadas en el fluido corporal simulado a 37°C (temperatura del cuerpo humano) en el interior de un incubador. Tras 7 días de contacto del fluido corporal simulado con las probetas se extrajeron unos 10 mL para realizar un análisis de la concentración de los diferentes elementos (Ag, Si, etc.) mediante ICP (inductively coupled plasma). Los 10 mL extraídos fueron reemplazados por 10 mL frescos de fluido corporal simulado. El proceso se repitió, realizando extracciones de 10 mL de fluido corporal simulado en contacto con las muestras a los 13, 20 y 25 días.

Resultados análisis mediante ICP

Piezas macizas de Ti6Al4V

A continuación se muestran los análisis obtenidos para cada una de las muestras de fluido corporal simulado en contacto con las diferentes muestras y a diferentes tiempos de exposición a una temperatura de 37°C (temperatura corporal).

En la Tabla 1 se muestran las concentraciones medidas en las diferentes muestras (HA-Ag y SiO₂-Ag) tomadas a los diferentes tiempos (7 días, 12 días, 20 días, 25 días y 32 días). Para la muestra de HA-Ag solo se mide la concentración de Ag. Para el caso de la muestra de HA-Ag, además de la Ag, se mide la concentración de Si, debido a que el recubrimiento sol-gel se va hidrolizando y se va liberando Si también.

	Concentración medida (mg/L)		
	HA-Ag	SiO ₂ -Ag	
	Ag	Ag	Si
Día 7	0,335	1,187	58,39
Día 12	0,296	1,345	56,50
Día 20	0,27	1,345	75,31
Día 25	0,224	1,383	66,31
Día 32	0,231	1,503	65,98

Tabla 1. Concentraciones medidas de Ag para HA-Ag y SiO₂-Ag.



En la Tabla 2 se muestran las concentraciones liberadas. En la primera muestra (7 días) la concentración medida es igual a la liberada, dado que la concentración de ambos iones es 0 ppm para el fluido corporal simulado. Sin embargo, para los demás tiempos es necesario calcular la cantidad liberada de iones (Ag y Si) dado que de los 50 mL de SBF expuestos con la muestra, solo se toman 10 mL y son reemplazados por 10 mL nuevos de SBF. Por lo tanto quedan 40 mL con la concentración de Ag a ese tiempo, que posteriormente se diluye con 10 mL de la disolución nueva de SBF. A la siguiente toma de muestras a un tiempo diferente, la concentración medida tendrá una contribución de la nueva liberación de iones que se da en ese intervalo de tiempo, pero también de los iones acumulados de las anteriores medidas. En la Tabla 5 se muestran las concentraciones reales liberadas a los diferentes tiempos.

	Concentración liberada (mg/L)		
	HA-Ag	SiO ₂ -Ag	
	Ag	Ag	Si
Día 7	0,335	1,16	58,39
Día 13	0,028	0,3954	9,788
Día 20	0,0332	0,269	30,11
Día 25	0,008	0,307	6,062
Día 32	0,0518	0,3966	12,932

Tabla 2. Concentraciones liberadas de Ag (HA-Ag y SiO₂-Ag) y Si (SiO₂-Ag).

En la Figura 12 se representa la liberación de Ag para las muestras de HA-Ag y SiO₂-Ag. Se puede observar que la liberación es mayor en el caso del sol-gel de Si. Además, en los primeros días se produce una mayor liberación de Ag y posteriormente se estabiliza la liberación.

En la Figura 13 se muestra la liberación de Si que tiene lugar debido a que el sol-gel de Si sufre reacciones de hidrólisis y se produce una liberación de Si a la disolución. En este caso la liberación es mayor en los primeros días, aunque luego no existe una tendencia clara.

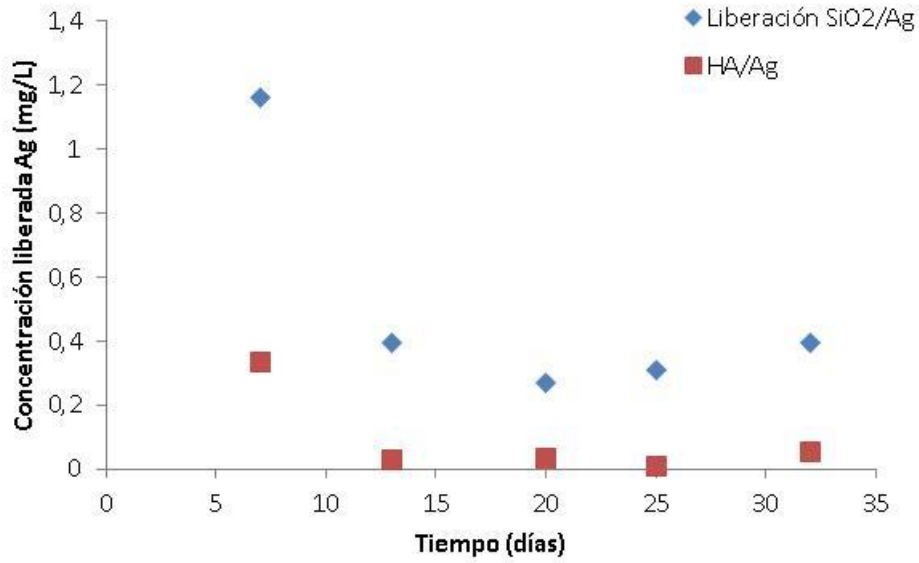


Figura 12. Liberación de Ag a diferentes tiempos de exposición para SiO₂/Ag y HA/Ag.

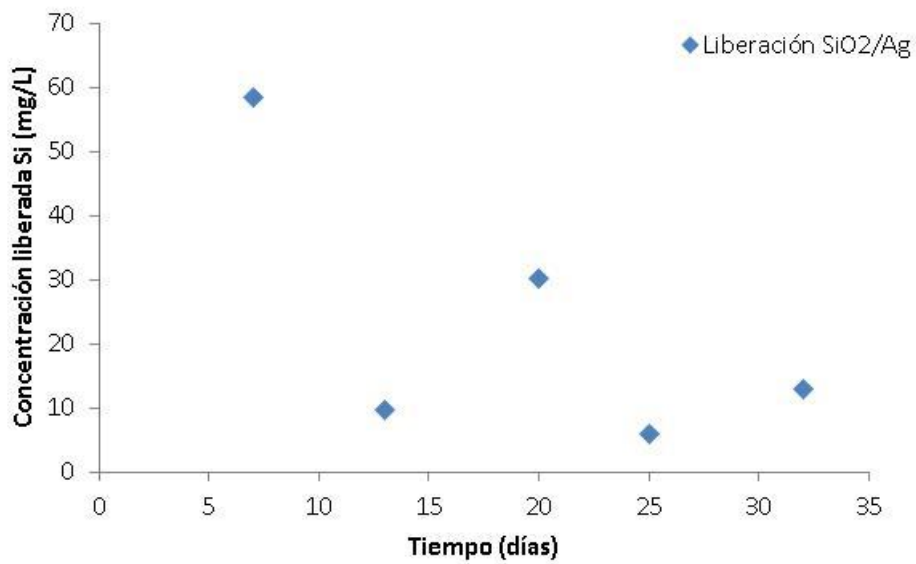


Figura 13. Liberación de Si a diferentes tiempos de exposición para SiO₂/Ag.



Dado que las muestras se toman a intervalos de tiempo de diferentes días, en la Tabla 3 se muestran los valores de la cantidad liberada de Ag por litro y por día.

Rango días	Cantidad liberada (mg/L·día)		
	HA-Ag	SiO ₂ -Ag	
	Ag	Ag	Si
0-7	0,048	0,166	8,341
7-13	0,005	0,066	1,631
13-20	0,005	0,038	4,301
20-25	0,002	0,061	1,212
25-32	0,007	0,057	1,847

Tabla 3. Cantidades liberadas de Ag (HA-Ag y SiO₂-Ag) y Si (SiO₂-Ag) para los diferentes intervalos de tiempo.

En la Figura 14 se muestra una comparación de la liberación normalizada de Ag para muestras recubiertas con sol gel de SiO₂/Ag y HA/Ag. Se puede observar que la mayor liberación de Ag se da para la muestra de SiO₂/Ag. Tras los primeros 7 días (donde se produce una gran liberación de Ag), se produce una estabilización de la liberación en valores alrededor de 0.06 mg/L·día para la muestra de SiO₂/Ag.

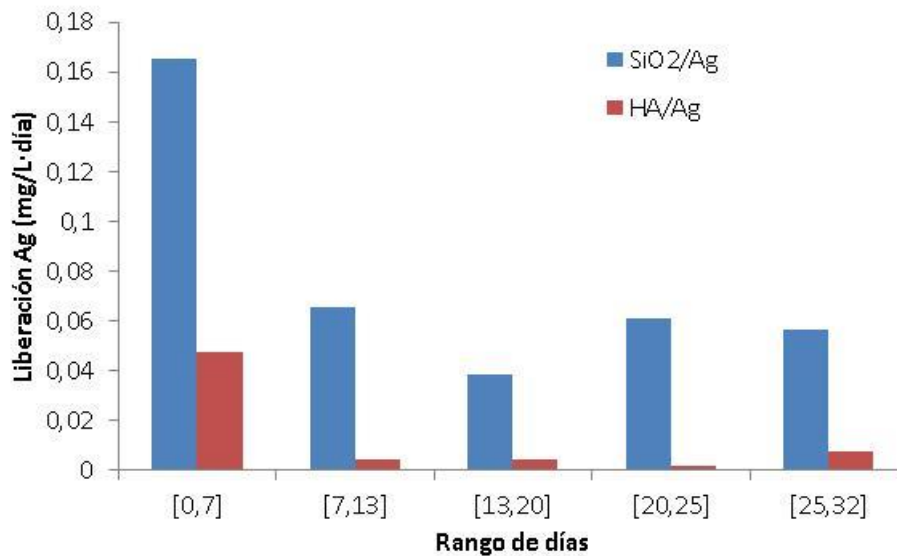


Figura 14. Comparación de la liberación normalizada de Ag (mg/L·día) a diferentes tiempos de exposición para SiO₂/Ag y HA/Ag.



En la Tabla 4 se muestran los valores de liberación acumulada para Ag y Si (mg/L) para las muestras de HA-Ag y SiO₂-Ag.

	Concentración acumulada (mg/L)		
	HA-Ag	SiO ₂ -Ag	
	Ag	Ag	Si
7	0,335	1,187	54,190
13	0,363	1,582	80,018
20	0,396	1,851	111,224
25	0,404	2,158	122,224
32	0,456	2,555	134,022

Tabla 4. Concentración acumulada de Ag (HA-Ag y SiO₂-Ag) y Si (SiO₂-Ag) para los diferentes tiempos de exposición.

En la Figura 15 se muestran los resultados de la liberación acumulada de Ag. En ambos casos se puede observar una liberación aproximadamente lineal con el tiempo. En el caso del recubrimiento de SiO₂/Ag, la pendiente es 11.5 veces mayor que en el del caso de la muestra de HA/Ag, lo que indica que la Ag se libera 11.5 veces más rápido en el recubrimiento de SiO₂/Ag que en el de HA/Ag. Además, inicialmente se libera una mayor cantidad de Ag en el caso del recubrimiento de SiO₂/Ag.

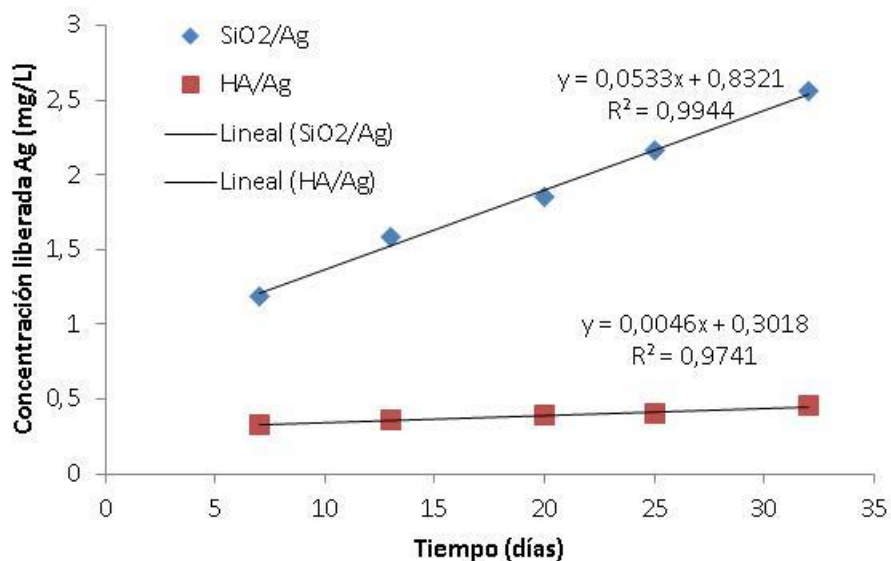


Figura 15. Liberación acumulada de Ag (mg/L) para las muestras de SiO₂/Ag y HA/Ag.



Piezas obtenidas mediante fabricación aditiva de Ti6Al4V

Recubrimiento de SiO₂/Ag sobre piezas de fabricación aditiva

A continuación se muestran los ensayos de liberación de las piezas de Ti6Al4V obtenidas mediante fabricación aditiva y recubierta con SiO₂/Ag. En la tabla 5 se muestran las cantidades liberadas de Ag (mg/L) para cada una de las medidas a diferentes tiempos y en la Figura 16 se muestra la representación de la misma.

	Cantidad liberada Ag (mg/L)
Día 7	2,073
Día 14	-0,3774
Día 22	0,5902
Día 28	0,412
Día 37	0,1768
Día 44	0,623

Tabla 5. Concentraciones liberadas de Ag para la muestra de SiO₂-Ag (FA).

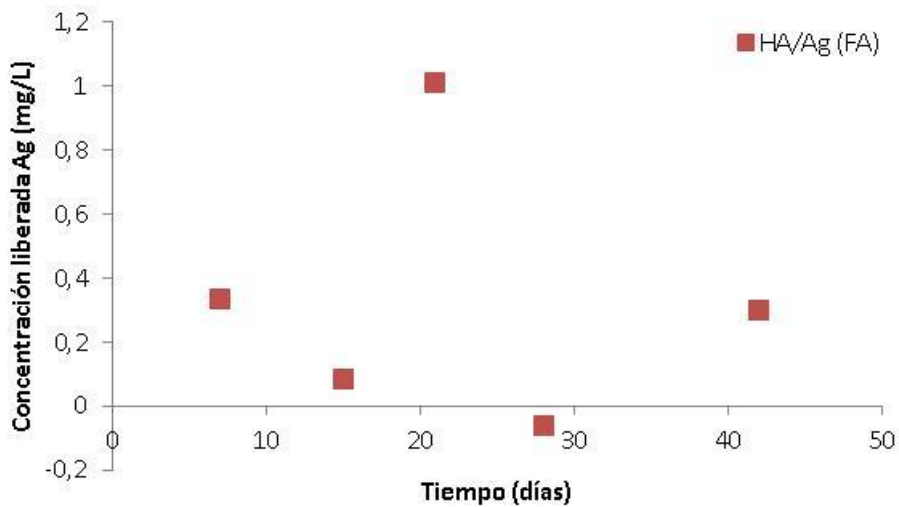


Figura 16. Liberación de Ag a diferentes tiempos de exposición para SiO₂/Ag (FA).

En la tabla 6 se muestran los valores de cantidad liberada de Ag normalizada por día (mg/L-día). En la Figura 17 se muestra la representación de la liberación normalizada para cada uno de los intervalos de tiempo.

	Cantidad liberada (mg/L·día)
Día	Ag
7	0,296
14	-0,054
22	0,074
28	0,069
37	0,020
44	0,089

Tabla 6. Cantidades liberadas de Ag para SiO₂-Ag (FA) para los diferentes intervalos de tiempo.

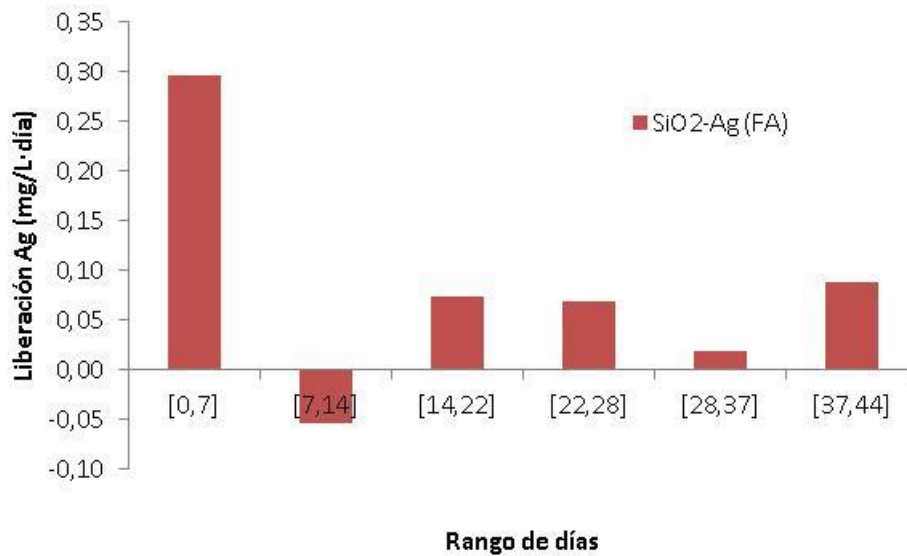


Figura 17. Liberación normalizada de Ag (mg/L·día) para los diferentes intervalos de tiempo para SiO₂/Ag (FA).



En la Tabla 7 se muestra la concentración acumulada de Ag (mg/L) y en la Figura 18 la representación de la concentración acumulada, se puede observar una liberación lineal con el tiempo.

	Concentración acumulada (mg/L)
Día	Ag
7	2,073
14	1,696
22	2,286
28	2,698
37	2,875
44	3,498

Tabla 7. Concentración acumulada de Ag (SiO₂-Ag (FA)) para los diferentes tiempos de exposición.

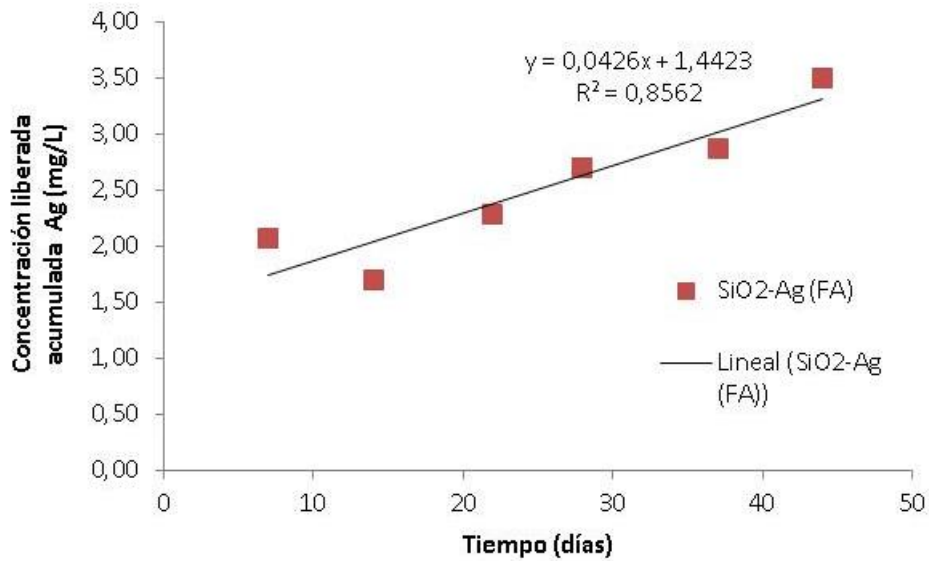


Figura 18. Liberación acumulada de Ag (mg/L) para la muestra de SiO₂/Ag (FA).

Recubrimiento de HA/Ag sobre piezas de fabricación aditiva

A continuación se muestran los ensayos de liberación de las piezas de Ti6Al4V obtenidas mediante fabricación aditiva y recubiertas con HA/Ag. En la tabla 8 se muestran las cantidades liberadas de Ag (mg/L) para cada una de las medidas a diferentes tiempos y en la Figura 19 se muestra la representación de la misma.

	Cantidad liberada Ag (mg/L)
Día 7	0,335
Día 15	0,085
Día 21	1,008
Día 28	-0,0602
Día 42	0,2996

Tabla 8. Concentraciones liberadas de Ag para la muestra de SiO₂-Ag (FA).

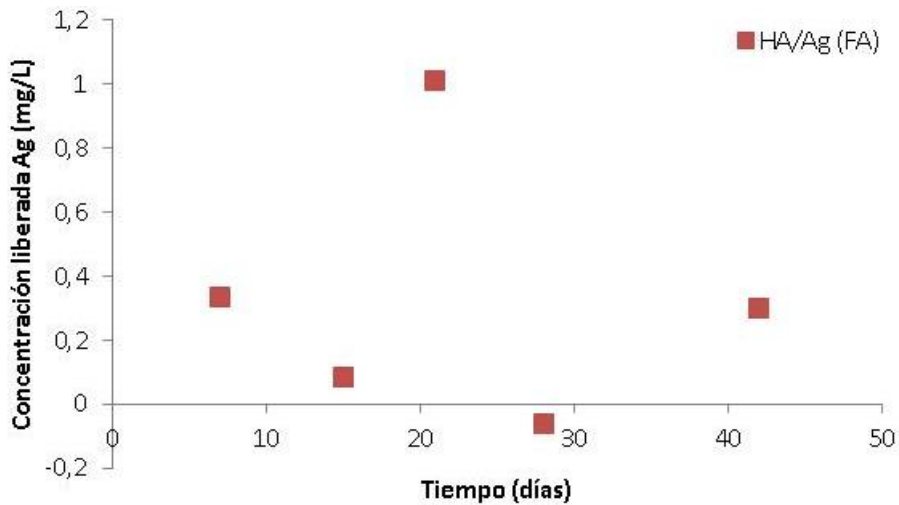


Figura 19. Liberación de Ag a diferentes tiempos de exposición para SiO₂/Ag (FA).

En la tabla 9 se muestran los valores de cantidad liberada de Ag normalizada por día (mg/L·día). En la Figura 20 se muestra la representación de la liberación normalizada para cada uno de los intervalos de tiempo.

	Cantidad liberada (mg/L·día)
Día	Ag
7	0,048
15	0,011
21	0,168
28	-0,009
42	0,021

Tabla 9. Cantidades liberadas de Ag para SiO₂-Ag (FA) para los diferentes intervalos de tiempo.

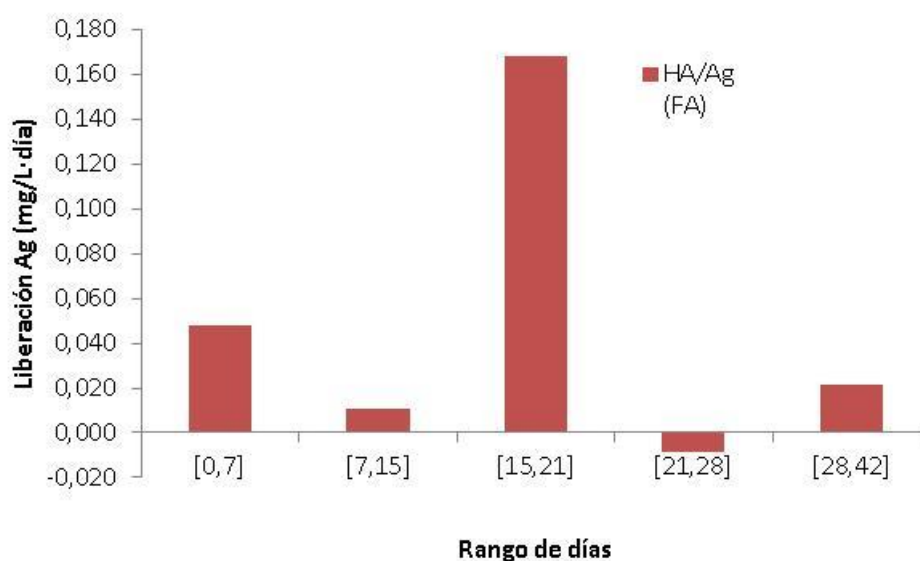


Figura 20. Liberación normalizada de Ag (mg/L·día) para los diferentes intervalos de tiempo para HA/Ag (FA).

En la Tabla 10 se muestra la concentración acumulada de Ag (mg/L) y en la Figura 21 la representación de la concentración acumulada, se puede observar una liberación lineal con el tiempo.

	Cantidad liberada Ag (mg/L)
Día	Ag
7	0,625
15	0,139
21	2,194
28	-0,112
42	0,279

Tabla 10. Concentración acumulada de Ag (SiO₂-Ag (FA)) para los diferentes tiempos de exposición.

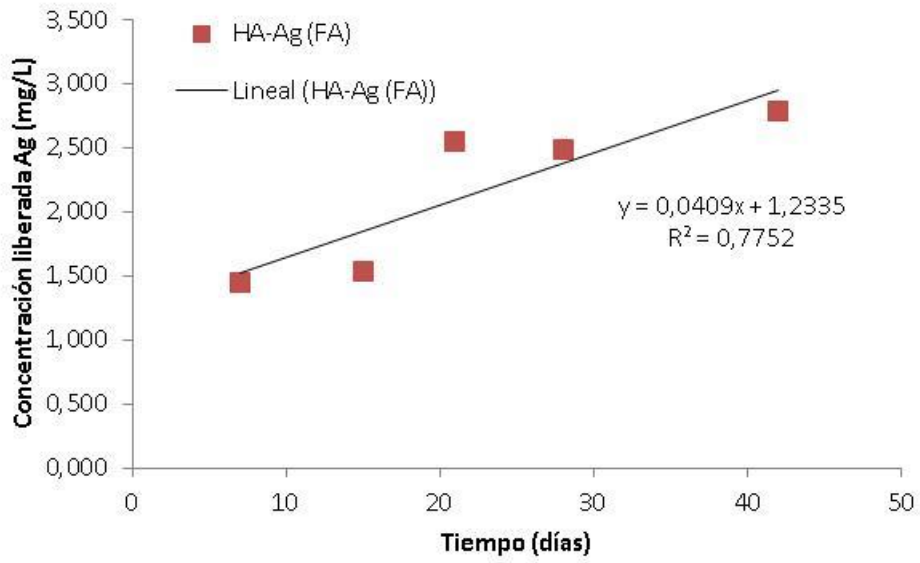


Figura 21. Liberación acumulada de Ag (mg/L) para la muestra de FA recubierta con HA/Ag.

Tarea 7.2. Caracterización morfológica de los recubrimientos

Microscopía electrónica de barrido de efecto campo (FESEM)

A continuación se muestran ejemplos de caracterización de los recubrimientos obtenidos.

Tratamiento de decapado de las muestras de Ti6Al4V

En la Figura 22 se muestran las micrografías de una muestra de Ti decapada. Se puede observar que el tratamiento con oxálico ataca al Ti, se produce una pérdida de material y aumenta la rugosidad de la superficie. La mayor rugosidad obtenida favorecerá la adhesión de los recubrimientos que se depositen sobre las piezas de Ti.

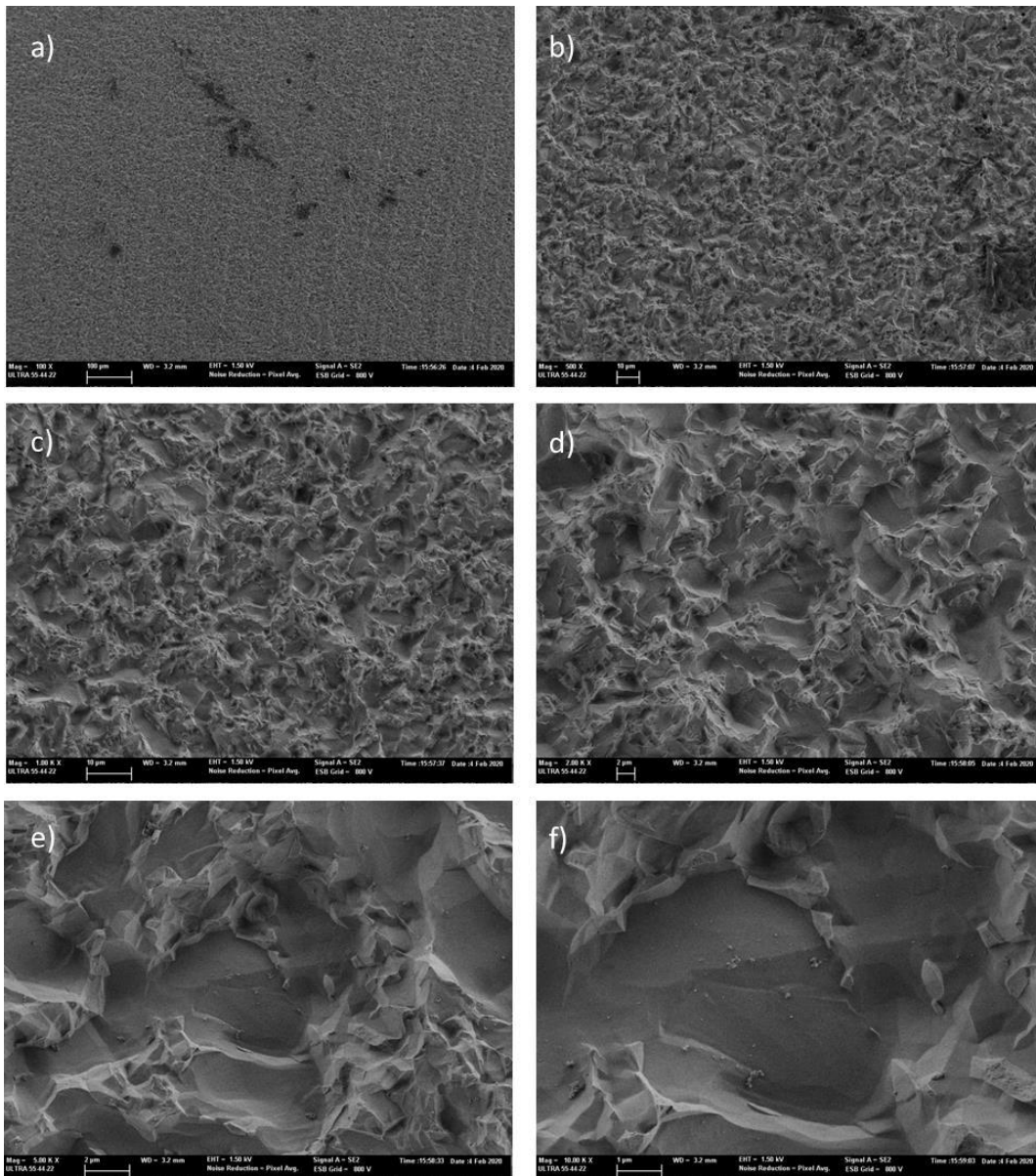


Figura 22. Micrografías FESEM de Ti decapado con ácido oxálico. a) x 100, b) x500, c) x1000, d) x2000, e) x5000, f) x10000. Micrografías obtenidas mediante electrones secundarios.

Recubrimientos de SiO₂/Ag

En la Figura 23 se muestran las micrográficas de una probeta de Ti obtenida mediante fabricación aditiva (el tamaño de poro de la malla es el más pequeño) y recubierta con el sol-gel de SiO₂-Ag. Se puede observar una buena cubrición de las probetas y también la formación de las nanopartículas de Ag.

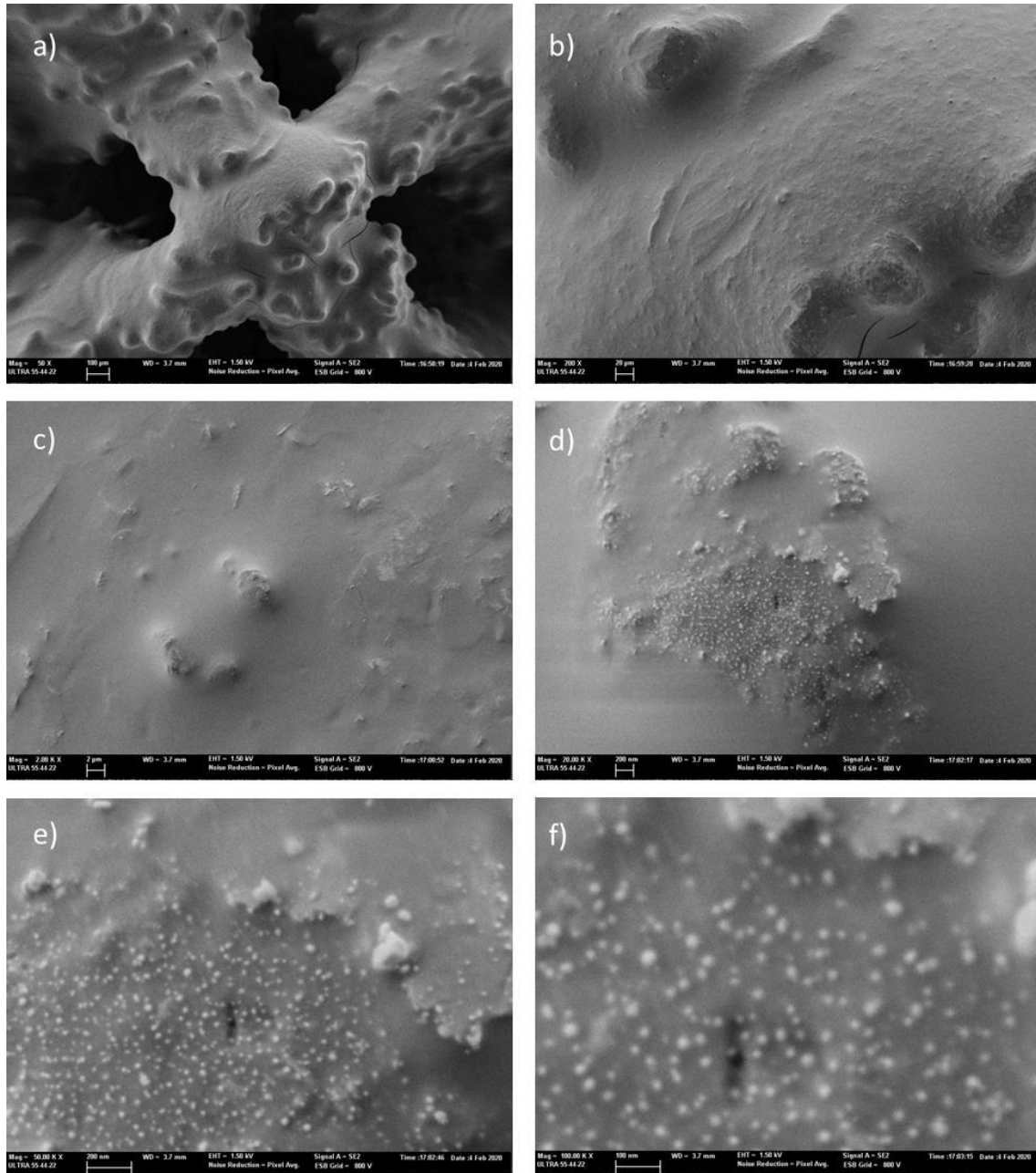


Figura 23. Micrográficas FESEM de piezas de fabricación aditiva (tamaño de malla pequeño) recubiertas con sol gel de SiO₂ + Ag + tratamiento térmico. a) x50, b) x200, c) x2000, d) x20000, e) x50000, f) x100000. Micrográficas obtenidas mediante electrones secundarios.

En la Figura 24 se muestran las micrografías de las muestras de Ti macizo recubiertas con el sol-gel de $\text{SiO}_2\text{-Ag}$. Se puede observar una buena cubrición de la superficie por parte de las nanopartículas de Ag.

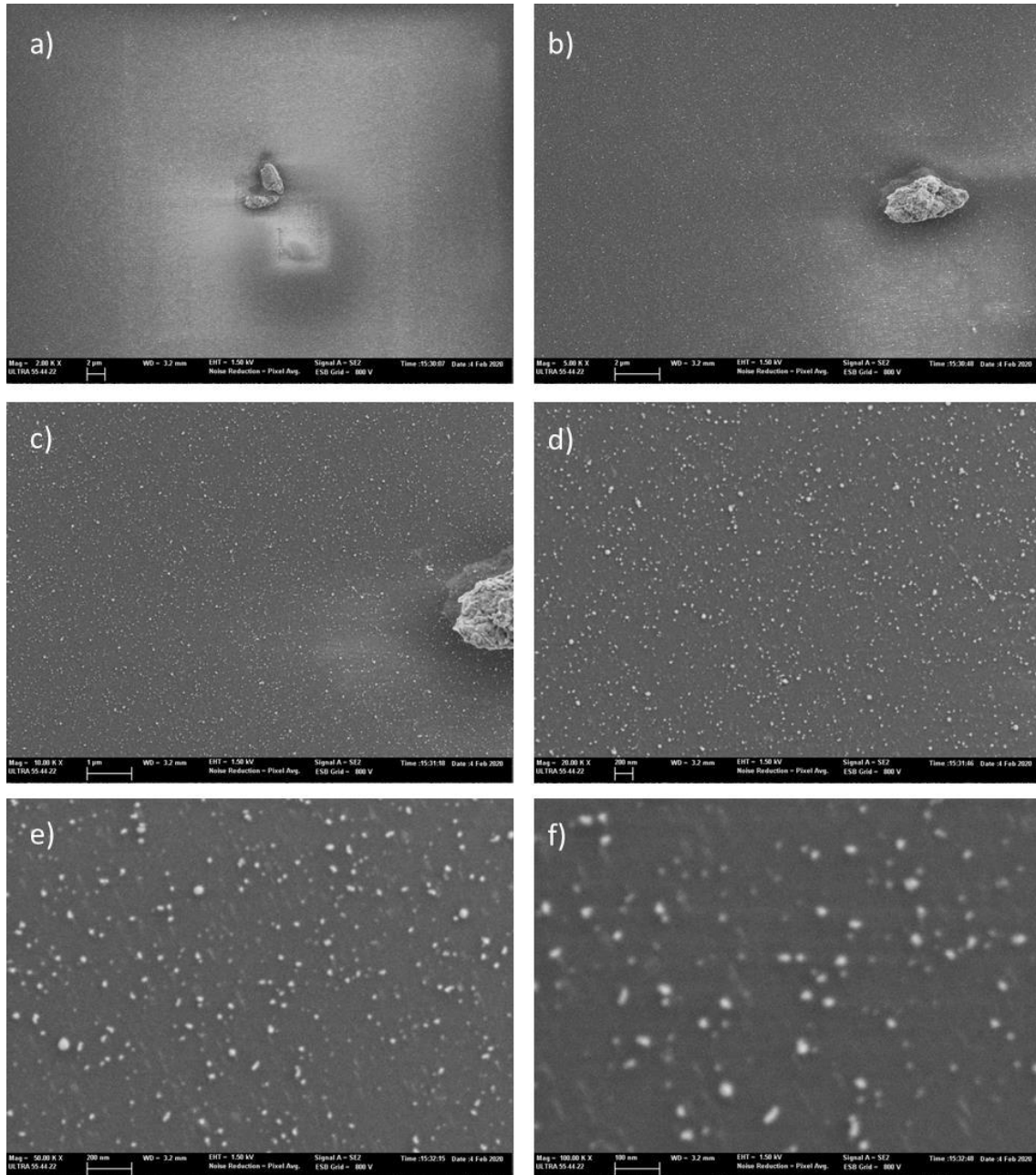


Figura 24. Micrografías FESEM de recubrimientos de $\text{SiO}_2\text{-Ag}$ sobre piezas de Ti macizo. a) x 2000, b) x5000, c) x10000, d) x20000, e) x50000, f) x100000. Micrografías obtenidas mediante electrones secundarios.

Recubrimientos de TiO_2/Ag

En la Figura 25 se muestra la caracterización mediante FESEM de una muestra recubierta con TiO_2/Ag . La micrografía 40-a muestra la caracterización a bajos aumentos mediante electrones secundarios, donde se puede observar la formación de un recubrimiento cuarteado. En el resto de micrografías se muestra la caracterización mediante electrones retrodispersados, lo que facilita la localización de las nanopartículas. Como se puede observar la distribución de las nanopartículas es homogénea y abundante.

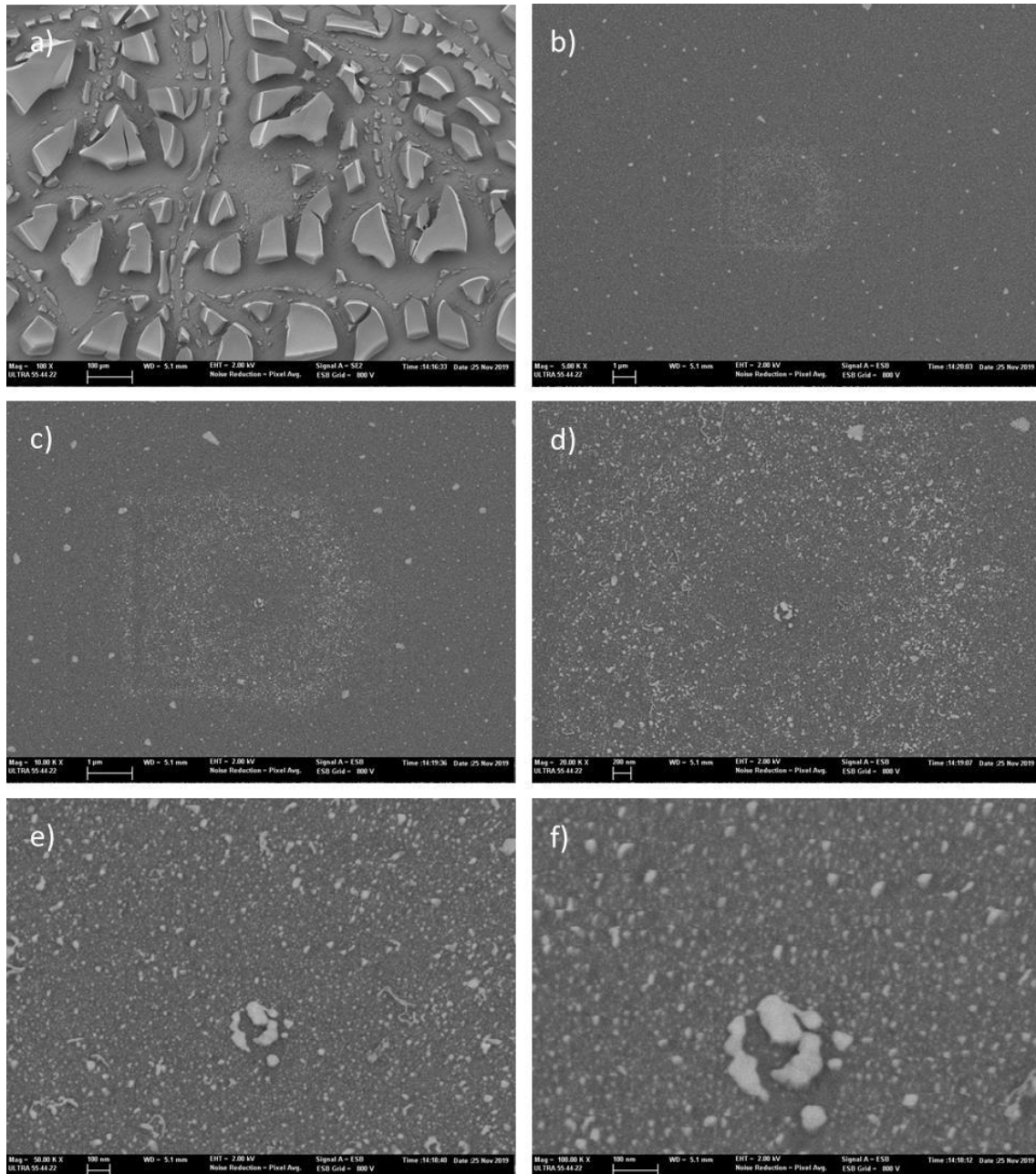


Figura 25. Micrografías FESEM de recubrimientos de TiO_2/Ag sobre piezas de Ti. a) x 100, b) x5000, c) x10000, d) x20000, e) x50000, f) x100000. Micrografías obtenidas mediante electrones secundarios y electrones retrodispersados.



En la Figura 26 se muestran las micrografías obtenidas para la muestra de Ti6Al4V recubierta con TiO_2/Ag_2 . Solo en algunas zonas se puede observar la presencia de nanopartículas de Ag, las nanopartículas de Ag aparecen como puntos blancos, debido a su elevado peso atómico.

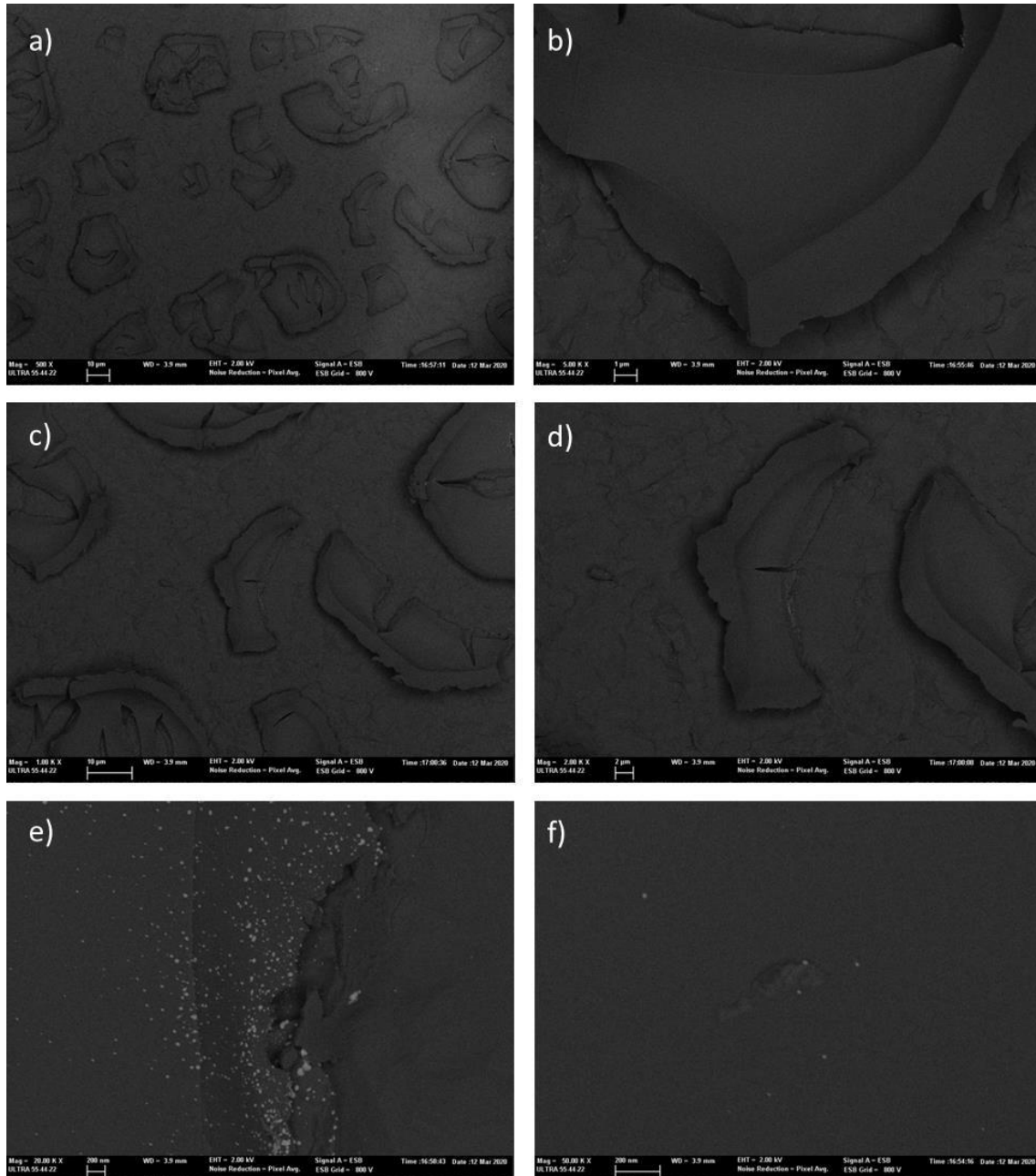


Figura 26. Micrografías FESEM de recubrimientos de TiO_2/Ag sobre piezas de Ti. a) x 1000, b) x200, c) x500, d) 1000, e) x5000, f) x50000. Micrografías obtenidas mediante electrones retrodispersados.

Recubrimientos de hidroxiapatita/Ag

En la Figura 27 se muestra la caracterización de una pieza de Ti recubierta con hidroxiapatita/Ag. Se puede observar también la formación de hidroxiapatita con forma hexagonal.

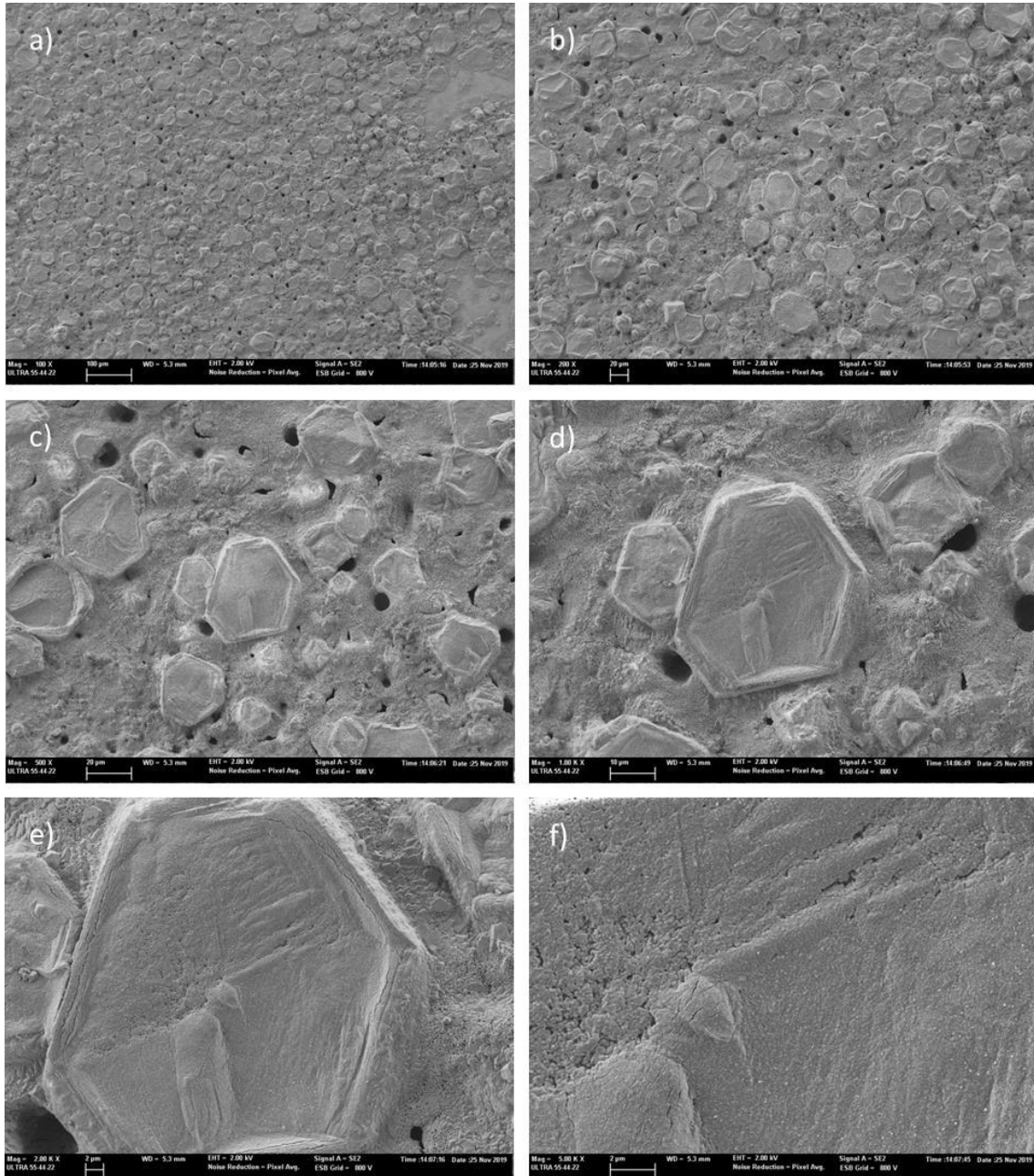


Figura 27. Micrográficas FESEM de recubrimientos de hidroxiapatita/Ag sobre piezas de Ti. a) x 100, b) x200, c) x500, d) x1000, e) x2000, f) x5000. Micrográficas obtenidas mediante electrones secundarios.

En la Figura 28 se muestra la caracterización mediante electrones retrodispersados de la muestra de hidroxiapatita/Ag. En este caso se puede observar fácilmente la localización de las nanopartículas en el recubrimiento.

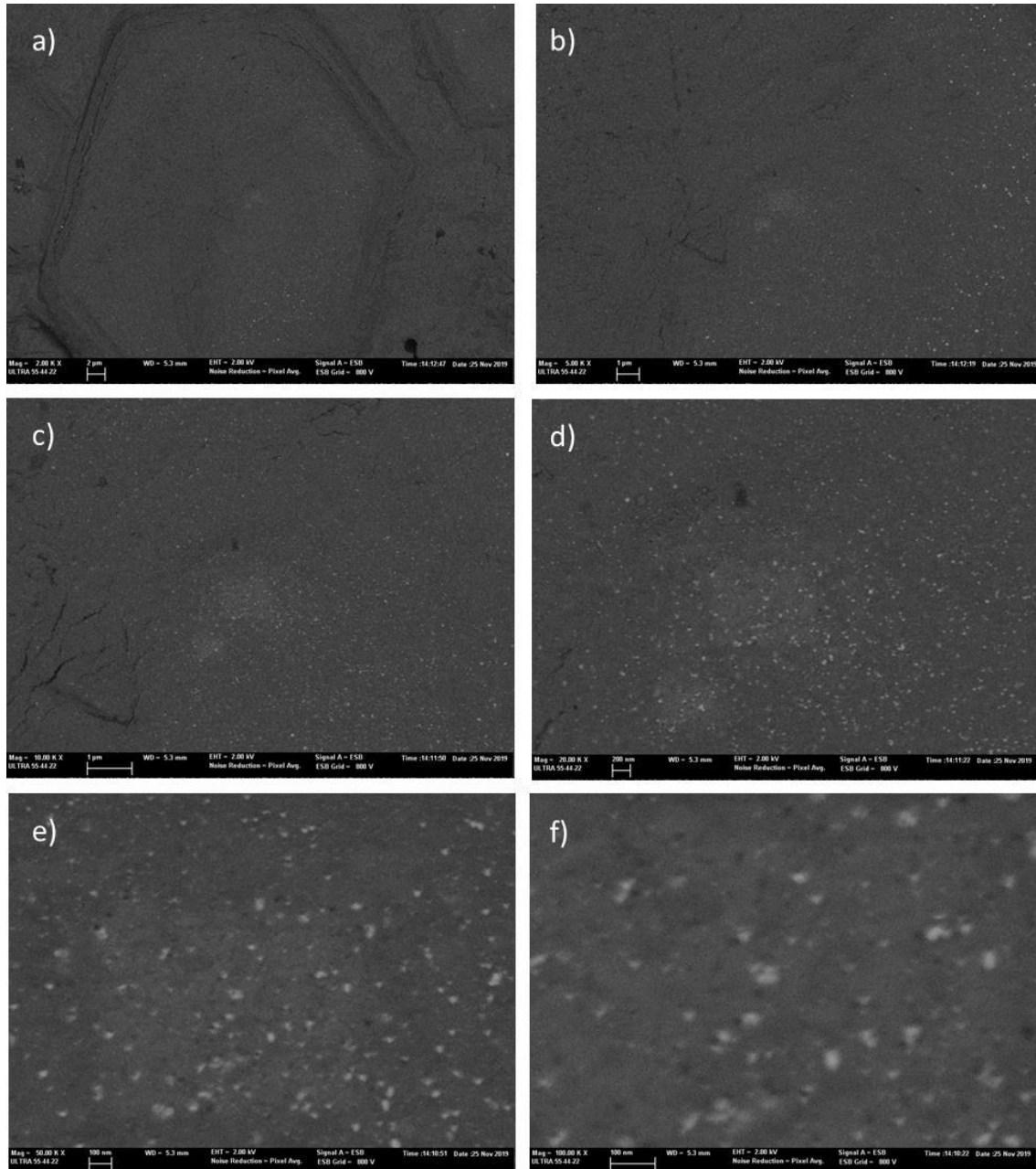


Figura 28. Micrografías FESEM de recubrimientos de hidroxiapatita/Ag sobre piezas de Ti. a) x 2000, b) x5000, c) x10000, d) x20000, e) x50000, f) 100000. Micrografías obtenidas mediante electrones retrodispersados.

Microscopía de fuerzas atómicas (AFM)

A continuación se muestran algunos ejemplos de caracterización AFM llevada a cabo durante el proyecto de investigación.

Muestra Ti6Al4V decapada (10 x 10 μm)

En las Figura 29 se muestra la caracterización de la muestra de Ti6Al4V sometida aun tratamiento de decapado. Se puede observar la generación de rugosidad debido al tratamiento de decapado con ácido oxálico. En la Figura 30 se muestra la representación 2-D, así como el histograma de alturas (con una diferencia entre cota máxima y mínima de $\approx 2 \mu\text{m}$).

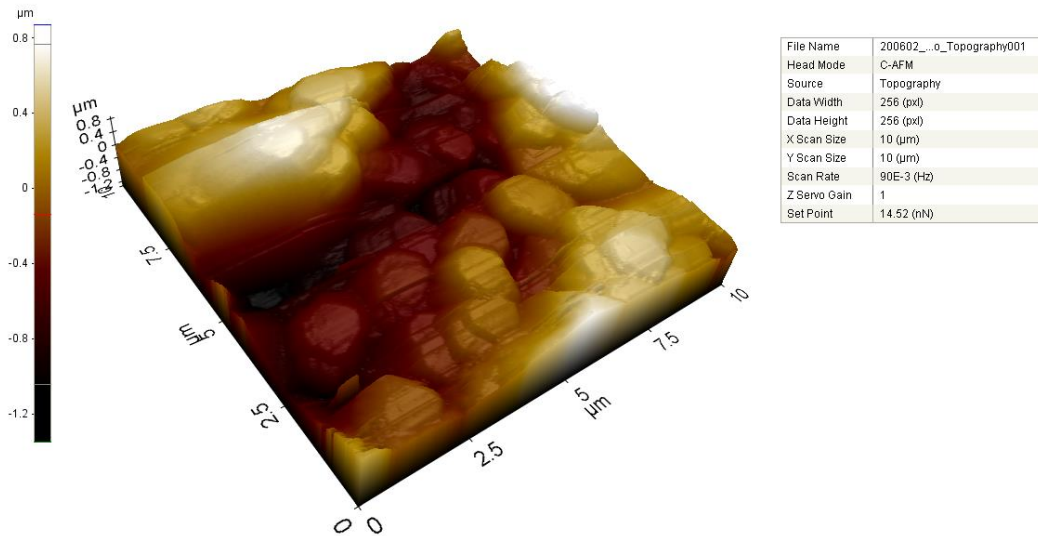


Figura 29. Representación 3-D AFM (10 μm x 10 μm) de una muestra de Ti6Al4V decapada.

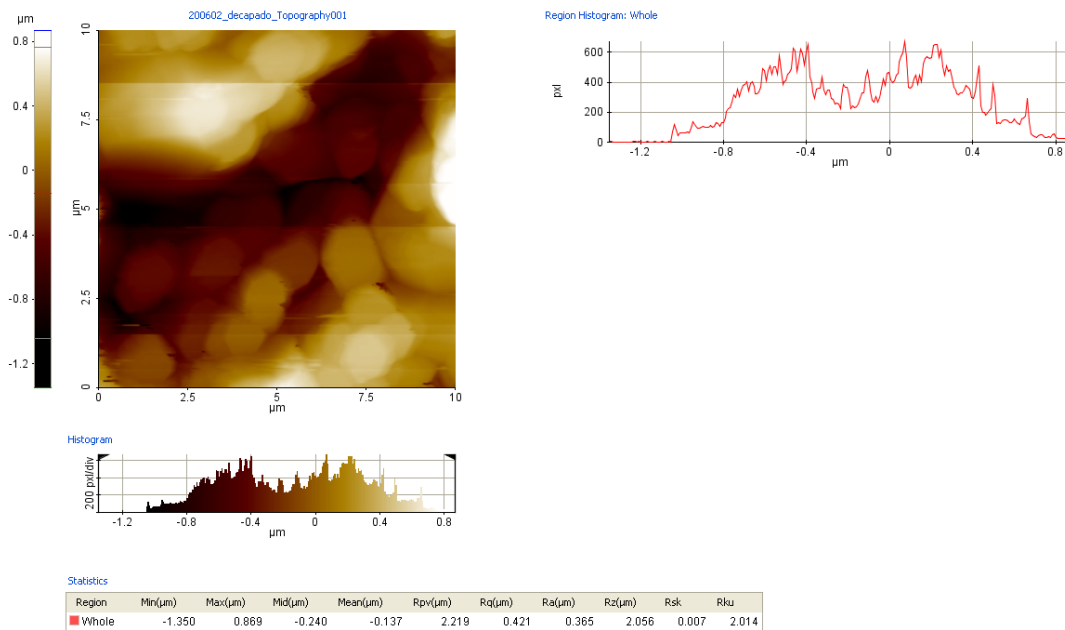


Figura 30. Representación 2-D AFM (10 μm x 10 μm) de una muestra de Ti6Al4V decapada, histograma y valores de rugosidad.

En la Figura 31 se muestra un perfil topográfico de una línea, donde se puede obtener el tamaño de los granos de Ti; como se puede observar el tamaño es de aproximadamente 2 μm .

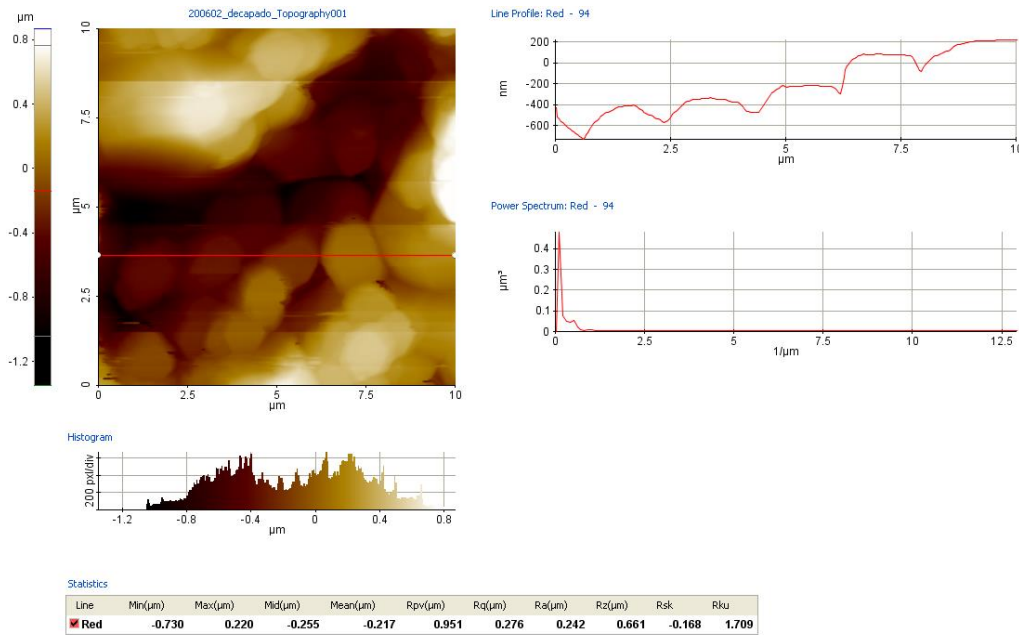


Figura 31. Representación 2-D AFM (10 μm x 10 μm) de una muestra de Ti6Al4V decapada, perfil de línea, valores de rugosidad e histograma.

Muestra Ti6Al4V recubierta con SiO₂-Ag (10 μm x 10 μm)

En la Figura 32, 33 y 34 se muestran las diferentes representaciones AFM del recubrimiento sol-gel de SiO₂ (10 μm x 10 μm). Se puede observar que el recubrimiento es bastante plano y la diferencia de alturas en el histograma es menor de 10 nm (Figura 33).

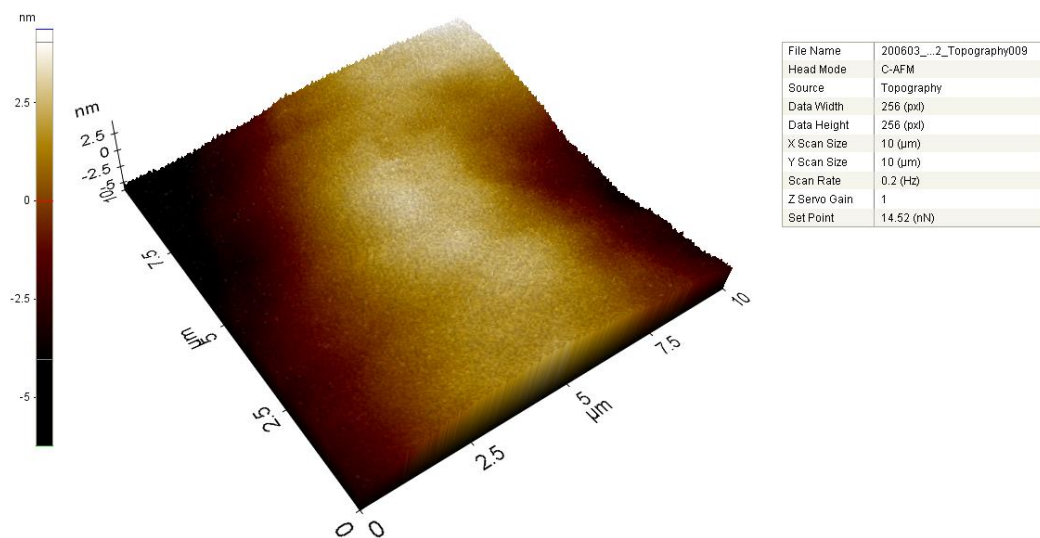


Figura 32. Representación 3-D AFM (10 μm x 10 μm) de una muestra de Ti6Al4V recubierta con sol-gel de SiO₂.

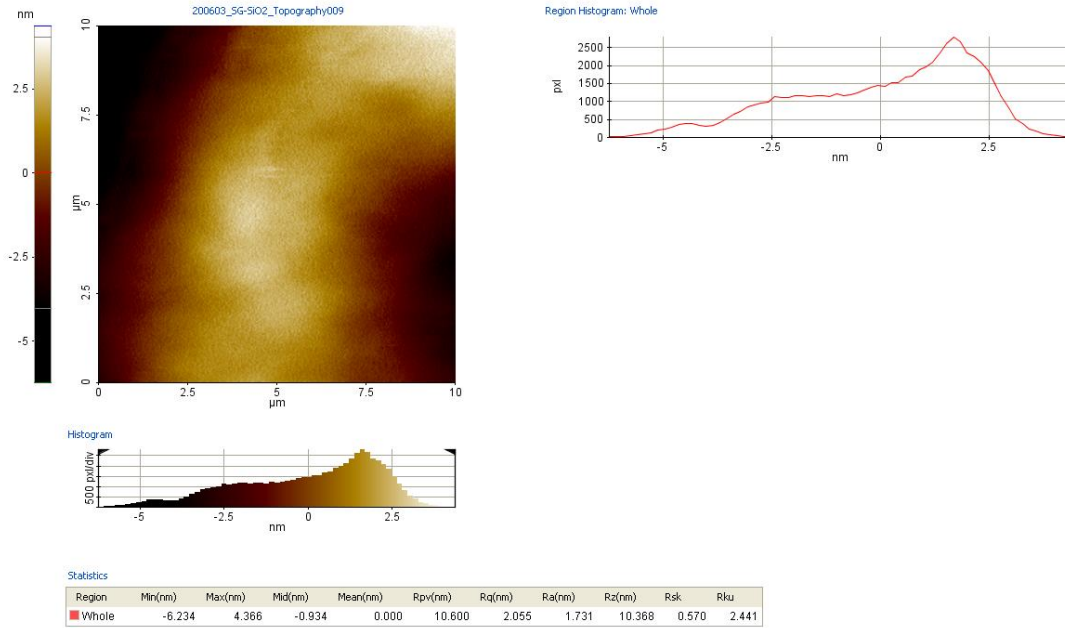


Figura 33. Representación 2-D AFM (10 μm x 10 μm) de una muestra de Ti6Al4V recubierta con sol-gel de SiO₂, histograma y valores de rugosidad.

En el perfil topográfico (Figura 34) la diferencia de alturas es menor de 5 nm, lo que demuestra que el recubrimiento sol-gel de SiO₂ es bastante plano.

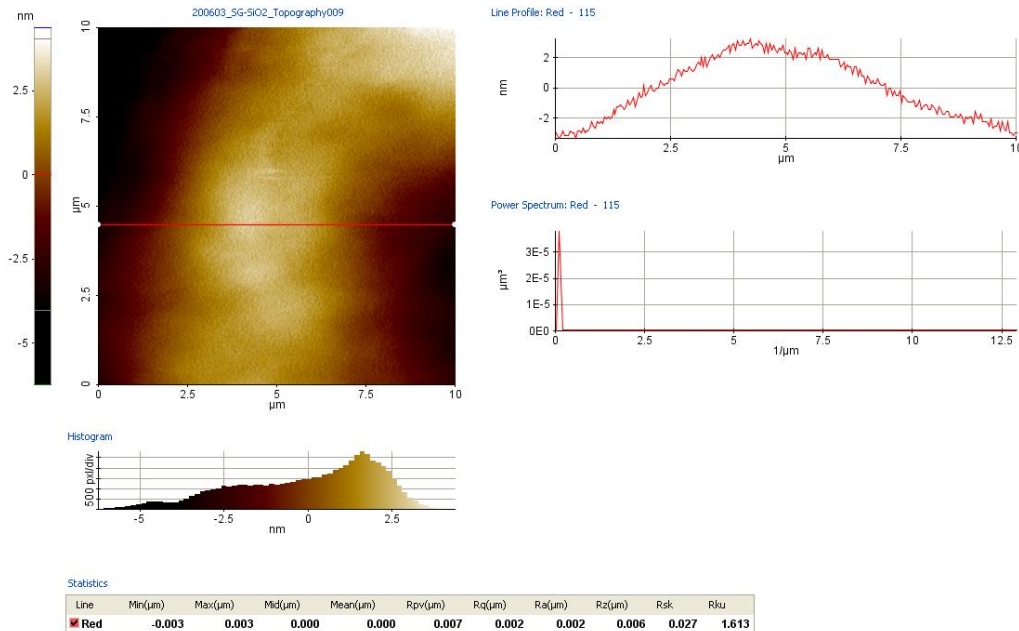


Figura 34. Representación 2-D AFM (10 μm x 10 μm) de una muestra de Ti6Al4V recubierta con sol-gel de SiO₂, perfil de línea, valores de rugosidad e histograma.



Muestra Ti6Al4V recubierta con SiO₂-Ag (10 μm x 10 μm)

En la Figura 35, 36 y 37 se muestran las diferentes representaciones AFM del recubrimiento sol-gel de SiO₂ que incorpora nanopartículas de Ag (10 μm x 10 μm). El recubrimiento es bastante plano como en el caso del sol-gel de SiO₂. Además se puede observar la aparición de nanopartículas de Ag; como se puede observar en la Figura 35.

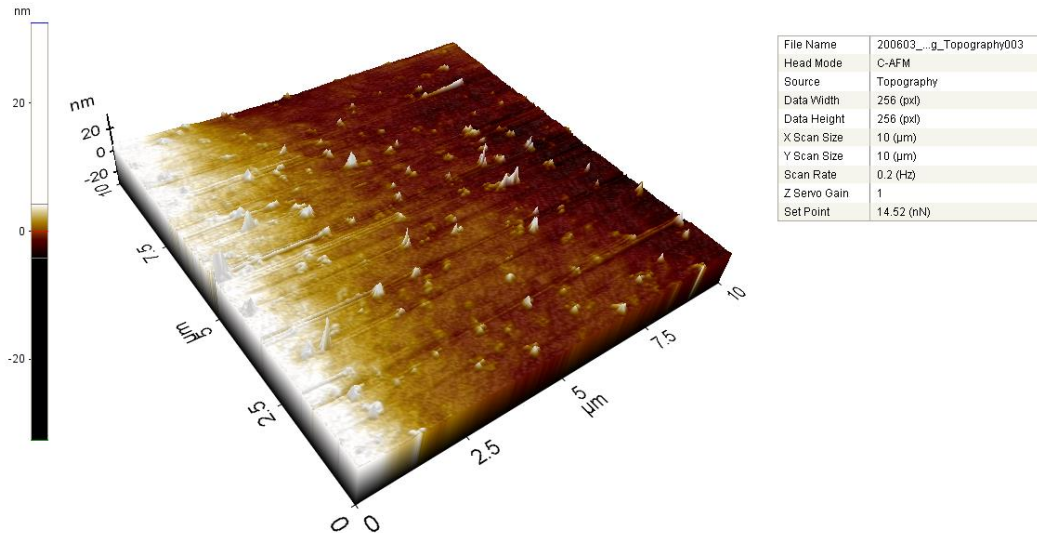


Figura 35. Representación 3-D AFM (10 μm x 10 μm) de una muestra de Ti6Al4V recubierta con sol-gel de SiO₂-Ag.

La muestra es bastante plana y la diferencia de alturas en el histograma es de unos 10 nm (Figura 36). En el perfil topográfico (Figura 37) la diferencia de alturas es de unos 8 nm.

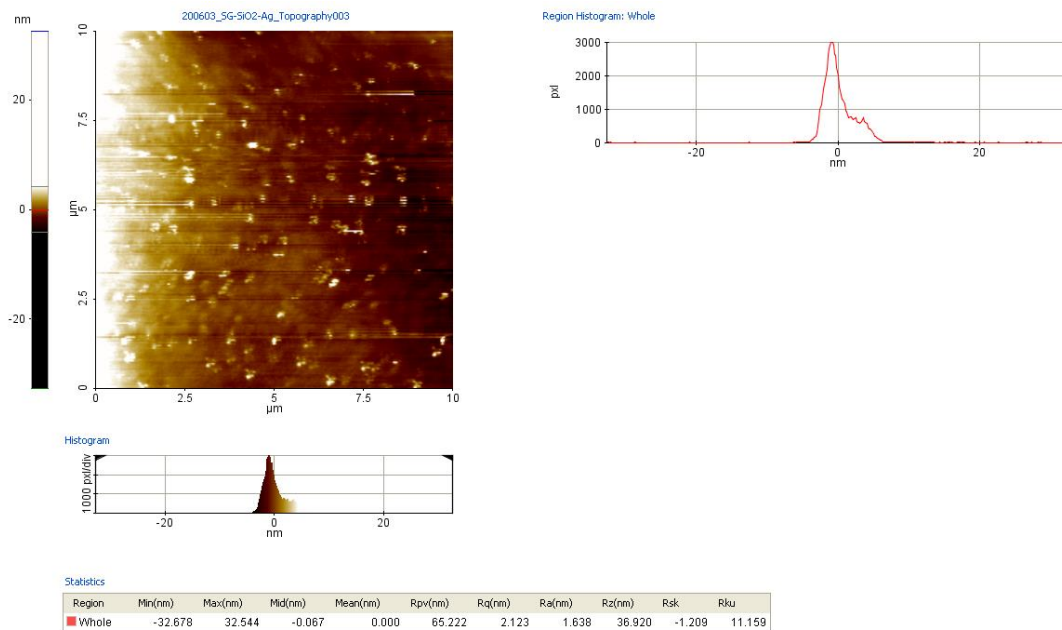


Figura 36. Representación 2-D AFM (10 μm x 10 μm) de una muestra de Ti6Al4V recubierta con sol-gel de SiO₂-Ag, histograma y valores de rugosidad.

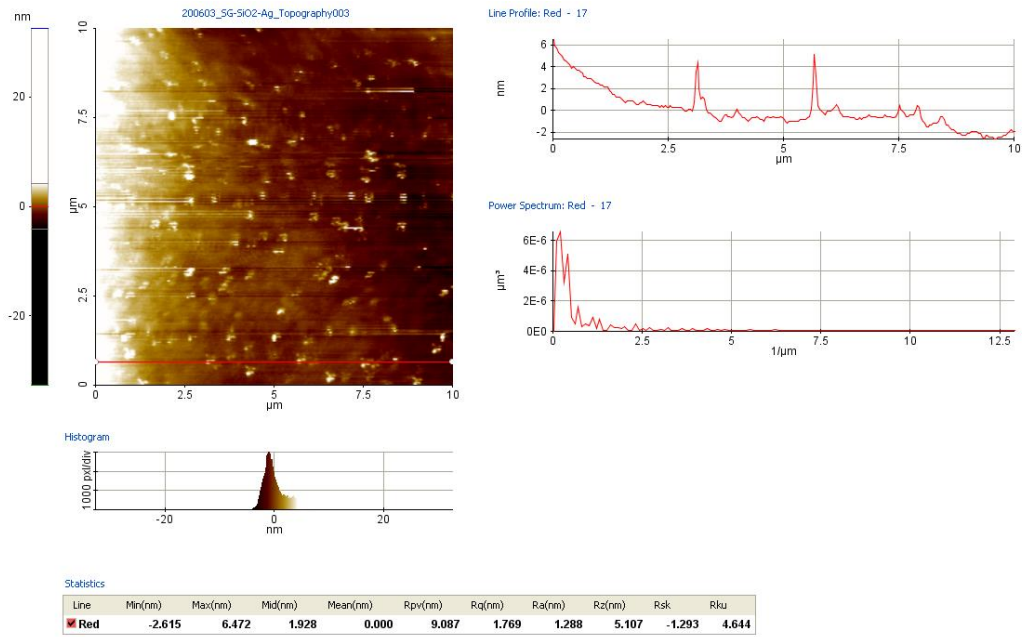


Figura 37. Representación 2-D AFM (10 μm x 10 μm) de una muestra de Ti6Al4V recubierta con sol-gel de SiO₂-Ag, perfil de línea, valores de rugosidad e histograma.

7. PT8. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS DE LAS PIEZAS RECUBIERTAS

Tarea 8.1. Determinación de la actividad antimicrobiana de las diferentes aplicaciones

Recubrimientos sol-gel de SiO₂-Ag

Se determinó la actividad antibacteriana de las muestras de estudio frente a las siguientes cepas de los microorganismos que indica la norma ISO 22196:2011 (ratificada en 2016):

- Bacteria Gram-negativa: *Staphylococcus epidermidis* CECT 231
- Bacteria Gram-positiva: *Staphylococcus aureus* CECT 240

Los cultivos Stock son proporcionados por la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo). Una vez activados los liófilos, las cepas son mantenidas en tubos inclinados con medio TSA (Tryptona Soja Agar) a 4°C.

Este procedimiento de ensayo se lleva a cabo para evaluar la actividad de los agentes antimicrobianos incorporados a materiales poliméricos o hidrófobos. El método se basa en la inoculación de determinados microorganismos sobre la superficie de estudio.

Dado que los mejores resultados de liberación de Ag⁺ fueron obtenidos para la muestra recubierta con sol-gel de SiO₂ con nanopartículas de Ag, a continuación se presentan los resultados obtenidos para este recubrimiento.

Así las muestras de estudio empleadas fueron:

- Muestras internas de carácter inerte: se emplean como control a 0h.
- Muestras de titanio sin recubrimiento sol-gel de SiO₂ ni Ag: se emplean como control a 24h.
- Muestras de titanio con recubrimiento sol-gel de SiO₂ sin Ag: se emplean como control a 24h.
- Muestras de titanio con recubrimiento sol-gel de SiO₂ con Ag: se emplean como muestras de estudio de eficacia antibacteriana a 24h.

La determinación de la actividad antimicrobiana se lleva a cabo mediante la determinación de la reducción logarítmica de una suspensión microbiológica puesta en contacto sobre la superficie de estudio, tomando como control el mismo soporte sin agentes antimicrobianos tras un determinado tiempo de incubación. En la Figura 38 se muestra un ejemplo de inoculación de la superficie con la suspensión bacteriana. La superficie de las probetas de estudio fue inoculada con 1 ml de la suspensión bacteriana de ensayo con agar. El conjunto se incubó a 35°C a 90% de humedad durante 24 h. Tras el tiempo de incubación las probetas fueron lavadas con 35 ml de solución neutralizante (Fluido Neutralizante Farm. Eur. 02-512 *Scharlau*) y, tras agitación vigorosa durante 2 min, una alícuota de esta suspensión se diluyó de forma seriada con tampón PBS (tampón fosfato salino) para llevar a cabo un recuento de las UFC en medio TSA (Figura 39). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h. En la Figura 39 se puede observar que la presencia de Ag en el recubrimiento elimina casi por completo la proliferación bacteriana. En las muestras de Ti y Ti recubiertas con el sol-gel sin Ag no se observa la disminución de la actividad bacteriana. Ello indica la efectividad de los recubrimientos antibacterianos desarrollados.

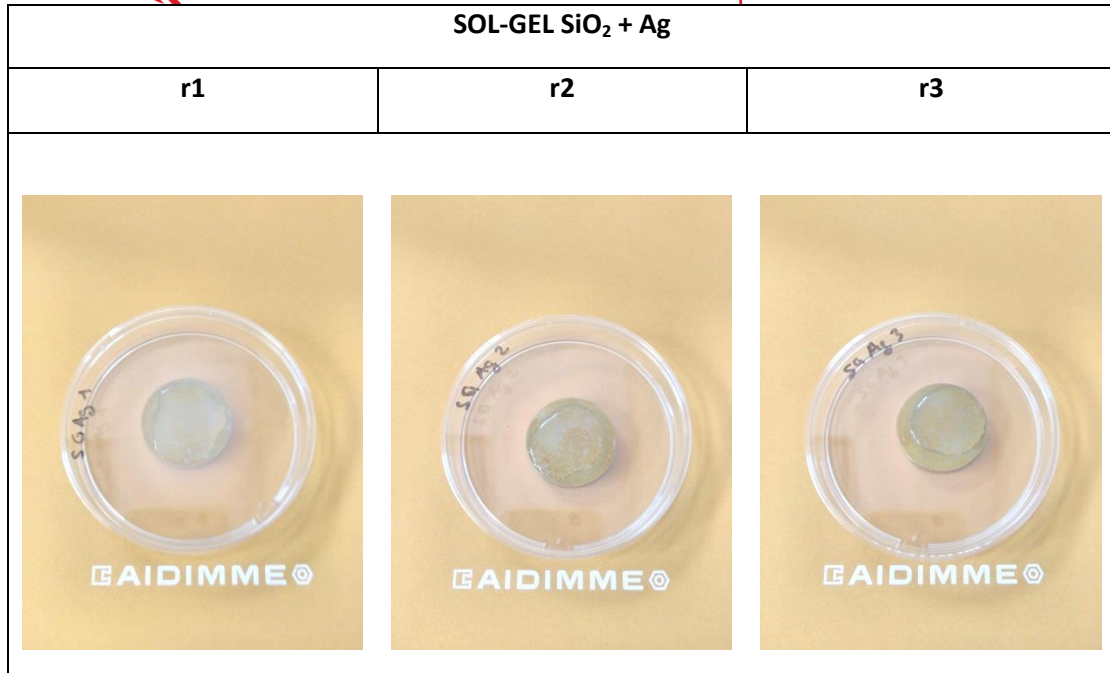


Figura 38. Ejemplo de inoculación de la superficie de una probeta de Ti6Al4V recubierta con Sol-gel SiO₂ + Ag e inoculada con una suspensión bacteriana.

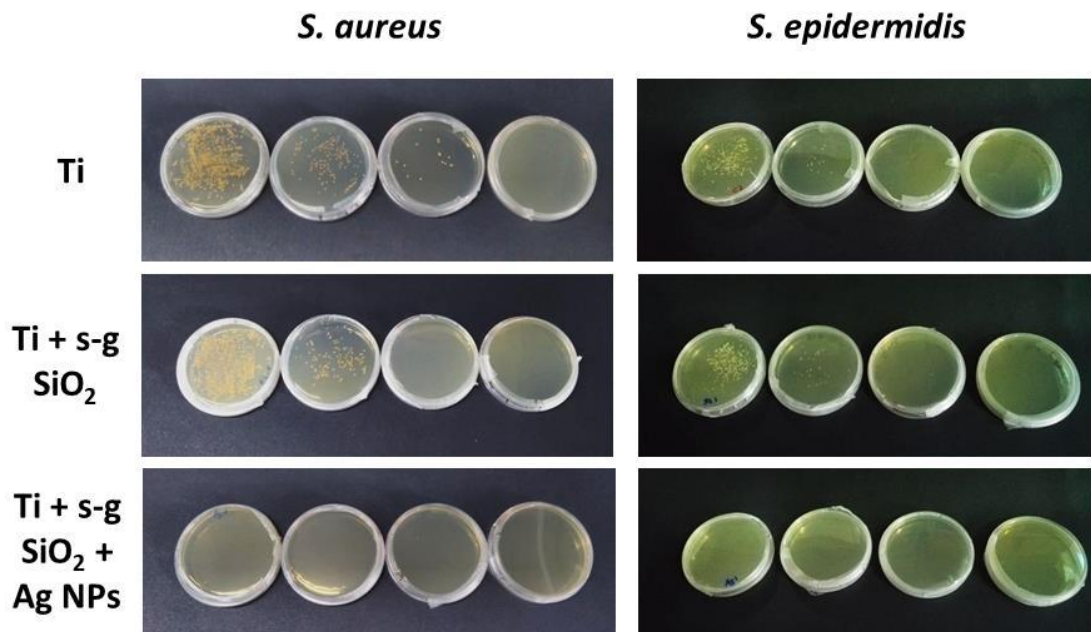


Figura 39. Cultivos de las disoluciones de lavado del inóculo (*S. aureus* o *S. epidermidis*) en contacto con las diferentes probetas (Ti, Ti + sol-gel de SiO₂, Ti + sol-gel de SiO₂ + nanopartículas de plata).



Validación de los resultados

- El estudio queda validado cuando el valor logarítmico del número de UFC (L) viables recuperadas inmediatamente tras la inoculación de las probetas no tratadas cumple con: $(L_{\max} - L_{\min}) / (L_{\text{media}}) \leq 0,2$.
- La media del número de bacterias viables recuperadas tras la inoculación de las probetas no tratadas debe de encontrarse entre $6,2 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^4$ UFC /cm².
- El número de bacterias viables recuperadas de las probetas no tratadas tras el período de 24 h de incubación no debe de ser menor de $6,2 \times 10^1$ UFC/cm².

Obtención de resultados

Los resultados de expresan a través de las siguientes ecuaciones:

- Determinación del número de bacterias viables:

$$N = (100 \times C \times D \times V) / A$$

N: es el número de bacterias viables recuperadas por cm² por cada probeta de estudio
 C: media del número de bacterias por placa
 D: factor de dilución
 V: volumen (ml) empleado del agente neutralizante
 A: área de la superficie (mm²) del inóculo
- Cálculo de la actividad antibacteriana

$$R = (U_t / U_o) - (A_t / U_o) = U_t - A_t$$

R: valor actividad antibacteriana

U_o: media del log del número de células viables (células/cm²) recuperadas de las probetas control negativo inmediatamente después de la inoculación (t=0h)

U_t: media del log del número de células viables (células/cm²) recuperadas de las probetas control negativo tras el tiempo de incubación (t=24h)

A_t: media del log del número de células viables (células/cm²) recuperadas de las probetas de estudio tras el tiempo de incubación (t=24h)

Resultados obtenidos

En las siguientes tablas se muestra el número N de bacterias viables de las muestras de estudio (réplicas: r1 a r3) recuperadas a tiempo 0 h y tras 24 h de contacto. Asimismo, se muestra el valor R como medida de la actividad antibacteriana de las superficies con biocida frente a las muestras control (sin biocida) para cada bacteria de ensayo. El valor de validación L (obtenido a partir de las muestras control) se muestra en la última columna. En todos los casos el valor es $\leq 0,2$.

Como control a t=0 h se emplea una muestra inerte (control interno) obteniendo, según las tablas que se adjuntan a continuación, una correcta viabilidad de los inóculos de *S. aureus* y de *S. epidermidis*.



A $t=24$ h se emplean como control las probetas de titanio sin recubrimiento sol-gel de SiO_2 y sin Ag y las de titanio con recubrimiento sol-gel de SiO_2 y sin Ag. En estos casos se observa la correcta recuperación de los inóculos por la viabilidad de los mismos, lo que indica que ni el titanio ni el recubrimiento sol-gel de SiO_2 actúan como antibacterianos. En la tabla 11 solo se indican los valores para las probetas recubiertas con sol-gel de SiO_2 y sin Ag, ya que son los valores a partir de los cuales se realizan los cálculos de la variable R.

Una vez validados los resultados según los tres puntos del apartado Validación de resultados, se observa que las muestras de estudio con recubrimiento sol-gel de SiO_2 y Ag presentan actividad antibacteriana frente a las dos bacterias de estudio *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* eliminando el 99,9% de la población de estas cepa tras 24 horas de contacto. Los valores R son de 4,2 y 3,5, respectivamente.

Por ello, se concluye que las muestras recubiertas con **sol-gel de SiO_2 y nanopartículas de Ag** presentan **actividad antibacteriana** frente a las bacterias de ensayo gram-positivas y gram-negativas *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, respectivamente.

<i>S. aureus</i>	t (h)	N Bacterias viables (UFC/cm ²)			Promedio	Lmax	Lmin	Media geométrica	Validación $(L_{max}-L_{min})/(L_{media})$ $\leq 0,2$	R Actividad antibacteriana	% Reducción población
		r1	r2	r3							
Control	0 (Control int)	7,6E+04	8,6E+04	7,8E+04	8,0E+04	4,9	4,9	4,9	0,0	4,2	99,9
	24 (Solgel)	5,9E+04	1,0E+05	1,0E+05	8,8E+04	5,0	4,8	4,9			
Muestra (Solgel+Ag)	24	5,0E+00	5,0E+00	5,0E+00	5,0E+00	0,7	0,7	0,7			

<i>S. epidermidis</i>	t (h)	N Bacterias viables (UFC/cm ²)			Promedio	Lmax	Lmin	Media geométrica	Validación $(L_{max}-L_{min})/(L_{media})$ $\leq 0,2$	R Actividad antibacteriana	% Reducción población
		r1	r2	r3							
Control	0 (Control int)	4,2E+04	4,2E+04	4,8E+04	4,4E+04	4,7	4,6	4,6	0,0	3,5	99,9
	24 (Solgel)	1,3E+04	1,1E+04	2,4E+04	1,6E+04	4,4	4,0	4,2			
Muestra (Solgel+Ag)	24	5,0E+00	5,0E+00	5,0E+00	5,0E+00	0,7	0,7	0,7			

Tabla 11. Valores obtenidos para los ensayos antibacterianos de muestras de SiO₂ y SiO₂-Ag.

Recubrimientos sol-gel de HA-Ag

Para el caso de los recubrimientos de HA se realizó el mismo estudio. Así las muestras de estudio empleadas fueron:

- Muestras internas de carácter inerte: se emplean como control a 0h.
- Muestras de titanio sin recubrimiento sol-gel de SiO₂ ni Ag: se emplean como control a 24h.
- Muestras de titanio con recubrimiento sol-gel de HA sin Ag: se emplean como control a 24h.
- Muestras de titanio con recubrimiento sol-gel de HA con Ag: se emplean como muestras de estudio de eficacia antibacteriana a 24h.

En la Figura 40 se muestran los resultados obtenidos. La hidroxiapatita por sí sola no produce inhibición de ninguna de las bacterias como se puede observar. Cuando se incluyen las nanopartículas de Ag se puede observar que la inhibición del crecimiento bacteriano es total.

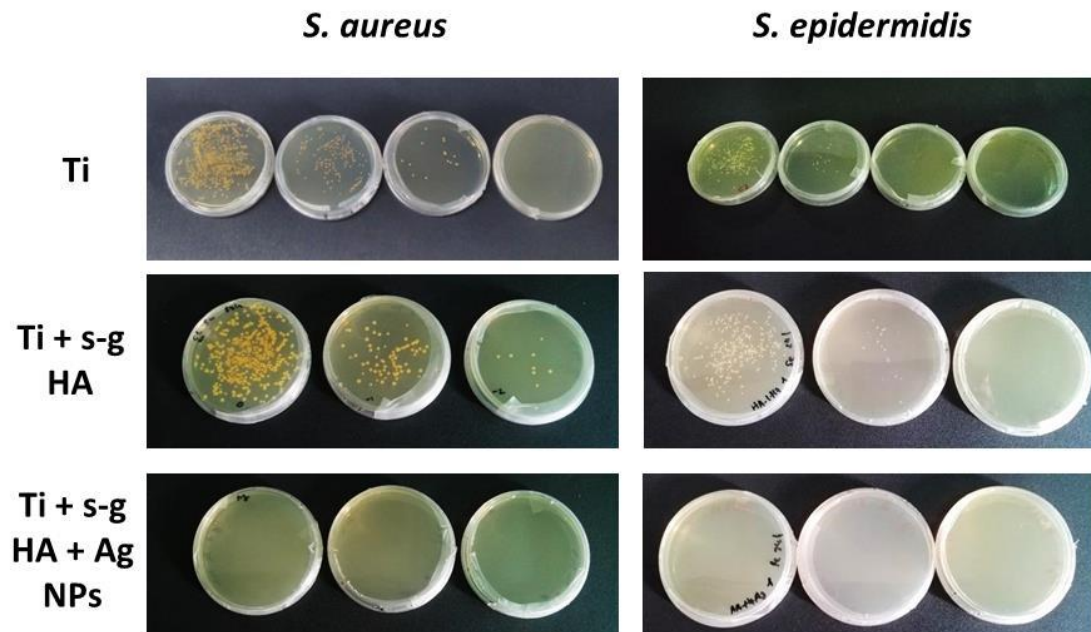


Figura 40. Cultivos de las disoluciones de lavado del inóculo (*S. aureus* o *S. epidermidis*) en contacto con las diferentes probetas (Ti, Ti + sol-gel de HA, Ti + sol-gel de HA + nanopartículas de plata).

En la Tabla 12 se muestran los resultados obtenidos. Las muestras de estudio con recubrimiento sol-gel de HA y Ag presentan actividad antibacteriana frente a las dos bacterias de estudio *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* eliminando el 99,9% de la población de estas cepa tras 24 horas de contacto. Los valores R son de 3,8 y 3,0, respectivamente.

Por ello, se concluye que las muestras recubiertas con sol-gel de HA y nanopartículas de Ag presentan actividad antibacteriana frente a las bacterias de ensayo gram-positivas y gram-negativas *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, respectivamente.

<i>S. aureus</i>	t (h)	N Bacterias viables (UFC/cm ²)			Promedio	Lmax	Lmin	Media geométrica	Validación $(L_{max}-L_{min})/(L_{media})$ $\leq 0,2$	R Actividad antibacteriana	% Reducción población
		r1	r2	r3							
Control	0 (Control int)	1,6E+05	1,1E+05	1,3E+05	1,3E+05	5,2	5,1	5,1	0,0	3,8	99,9
	24 (HA-1-Mz)	3,7E+04	3,1E+04	2,5E+04	3,1E+04	4,6	4,4	4,5			
Muestra (HA-Ag-1-Mz)	24	5,0E+00	5,0E+00	5,0E+00	5,0E+00	0,7	0,7	0,7			

<i>S. epidermidis</i>	t (h)	N Bacterias viables (UFC/cm ²)			Promedio	Lmax	Lmin	Media geométrica	Validación $(L_{max}-L_{min})/(L_{media})$ $\leq 0,2$	R Actividad antibacteriana	% Reducción población
		r1	r2	r3							
Control	0 (Control int)	3,2E+04	3,8E+04	4,2E+04	4,4E+04	4,7	4,6	4,6	0,0	3,0	99,9
	24 (HA-1-Mz)	1,1E+04	9,3E+03	2,1E+04	1,6E+04	4,4	4,0	4,2			
Muestra (HA-Ag-1-Mz)	24	9,9E+01	5,0E+00	5,0E+00	3,6E+01	2,0	0,7	1,1			

Tabla 12. Valores obtenidos para los ensayos antibacterianos de muestras de HA e HA-Ag.

Para el caso de las probetas obtenidas mediante fabricación aditiva se realizó un ensayo cualitativo (ensayo de acuerdo al método difusión en agar), dado que la disolución no se puede depositar sobre el sustrato y ser recuperada posteriormente para llevar a cabo el ensayo anterior.

Se determina la actividad antibacteriana de las muestras de estudio frente a las siguientes cepas de los microorganismos según el método de difusión en agar:

- Bacteria Gram-negativa: Staphylococcus epidermidis CECT 231
- Bacteria Gram-positiva: Staphylococcus aureus CECT 240

Los cultivos Stock son proporcionados por la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo). Una vez activados los liófilos, las cepas son mantenidas en tubos inclinados con medio TSA (Tryptona Soja Agar) a 4°C.

Se sigue la metodología de difusión en agar debido a que al tratarse de un material poroso, resultaba inviable seguir el procedimiento de la norma ISO 22196. Por ello, y para obtener resultados de manera más rápida y de forma cualitativa, se tomó como referencia esta metodología a la espera de aplicar el otro procedimiento en caso de necesitar profundizar en la caracterización del material.

Método de ensayo

Este procedimiento de ensayo se lleva a cabo para evaluar la actividad bactericida de los agentes antimicrobianos incorporados a las muestras de ensayo. La determinación de la actividad antimicrobiana se lleva a cabo mediante la evaluación visual del halo de inhibición que pueda formarse alrededor de la probeta de ensayo. Se toma como control negativo la misma muestra sin el agente biocida, así como muestras inertes. Como control positivo se emplea una solución de isotiazolinon sobre un disco de papel Whatmann nº1 de 8 mm de diámetro.

Preparación de muestras

Las muestras de estudio son de forma circular con un diámetro de unos 3 cm. Se ensayaron tres réplicas por cada tipo de material y cepa bacteriana.

Las probetas fueron limpiadas con agua destilada estéril con un hisopo también esterilizado. Tras un proceso de secado las probetas fueron esterilizadas mediante vapor de agua con autoclave a 120°C durante 15 minutos y se guardaron en recipientes estériles.

Preparación de la suspensión bacteriana de ensayo

Cada cepa se cultivó en medio TSA a 37°C durante 24h. A partir de este cultivo se obtuvo una suspensión de bacteriana de aproximadamente 1×10^8 UFC/ml (UFC: unidades formadoras de

colonias) medido por espectrofotometría a una $\lambda=625$ nm. La concentración celular se comprobó mediante recuento en placa a través de diluciones seriadas.

Inoculación de las muestras de estudio

Las probetas se introducen asépticamente en placas Petri estériles, en las que se va a verter medio TSA inoculado con las cepas bacterianas de estudio. Así pues, se prepara medio TSA, de acuerdo con las indicaciones del fabricante, y tras el proceso de esterilización por autoclave, el medio se enfría a 45°C.

Posteriormente, en condiciones asépticas se inocula cada una de las especies bacterianas de ensayo por separado, para conseguir una concentración celular de 1×10^5 UFC por ml de agar. Se distribuye homogéneamente la suspensión agitándola cuidadosamente. Se dispersan porciones de exactamente 15 ml en cada placa Petri estéril ($d=90$ mm).

Para cada análisis, se prepara una placa sin probetas como control negativo, y con probetas susceptibles al crecimiento bacteriano. Como control positivo se emplea una solución de isotiazolinon sobre un disco estéril.

Las placas una vez preparadas con las probetas se incubaron a 37°C durante 24 h.

Obtención de resultados

El resultado esperado para comprobar el efecto biocida de las probetas es la presencia de un halo de inhibición a su alrededor.

Existen escalas que relacionan el diámetro del halo con la susceptibilidad bacteriana, pero se trata de protocolos destinados para determinar la eficacia de los antibióticos. En este caso se medirá el diámetro del halo de inhibición y se comparará entre las diferentes probetas control. Igualmente, se podrán comparar los halos entre las diferentes probetas de ensayo recubiertas con Ag preparadas en el presente proyecto.

Para las probetas de recubiertas con sol-gel de SiO_2 -Ag se observa la presencia de un halo de inhibición (Figura 41), e incluso en algunas probetas no se llega a ver el límite por lo que el crecimiento bacteriano queda inhibido prácticamente en su totalidad, tanto en los ensayos con *S. aureus* como en *S. epidermidis*. Por tanto el diámetro del halo sería de 90 mm. El control positivo se comporta de forma correcta al presentar halo de inhibición, de las dos especies bacterianas, alrededor del disco inoculado con biocida. La viabilidad de las bacterias es correcta al observarse un adecuado crecimiento de ambas.

Para las probetas recubiertas con HA-Ag no se detecta presencia de halo de inhibición para ninguna de las bacterias de ensayo, *S. aureus* y *S. epidermidis* (Figura 42). El control positivo se comporta de forma correcta al presentar halo de inhibición, de las dos especies bacterianas, alrededor del disco inoculado con biocida. La viabilidad de las bacterias es correcta al observarse un adecuado crecimiento de ambas.

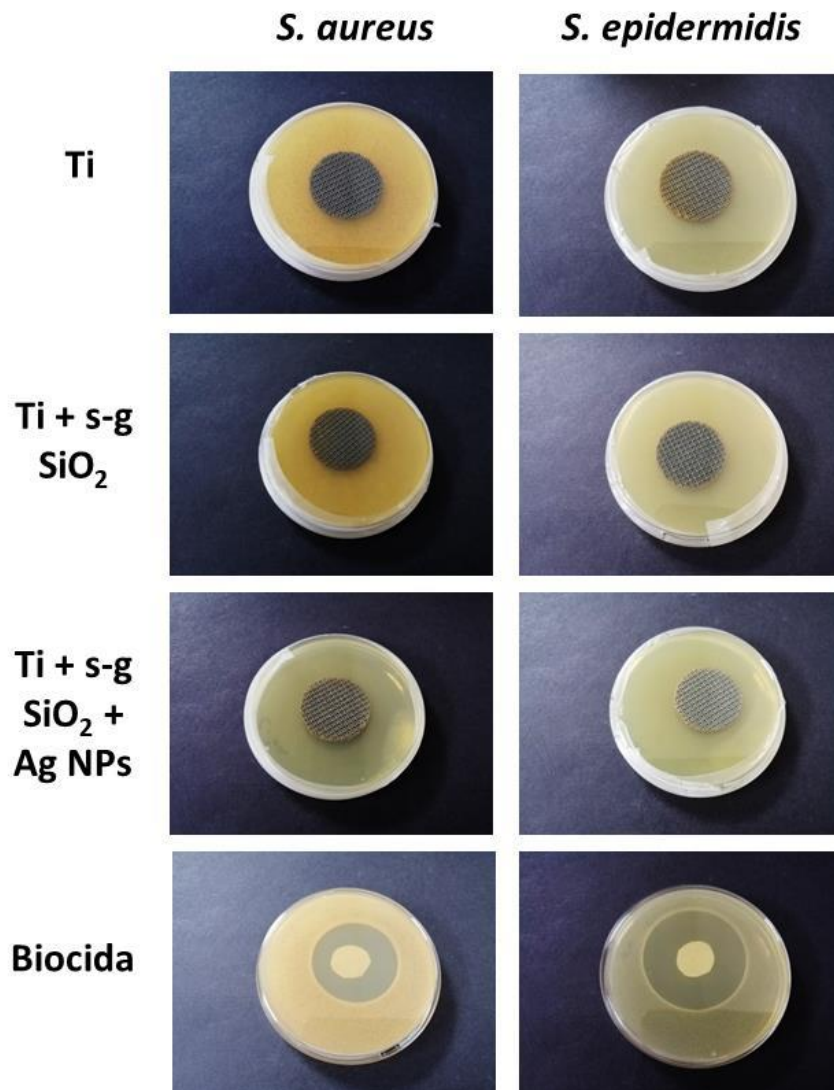


Figura 41. Cultivos de las disoluciones de lavado del inóculo (*S. aureus* o *S. epidermidis*) en contacto con las diferentes probetas (Ti, Ti + sol-gel de SiO₂, Ti + sol-gel de SiO₂ + nanopartículas de plata).

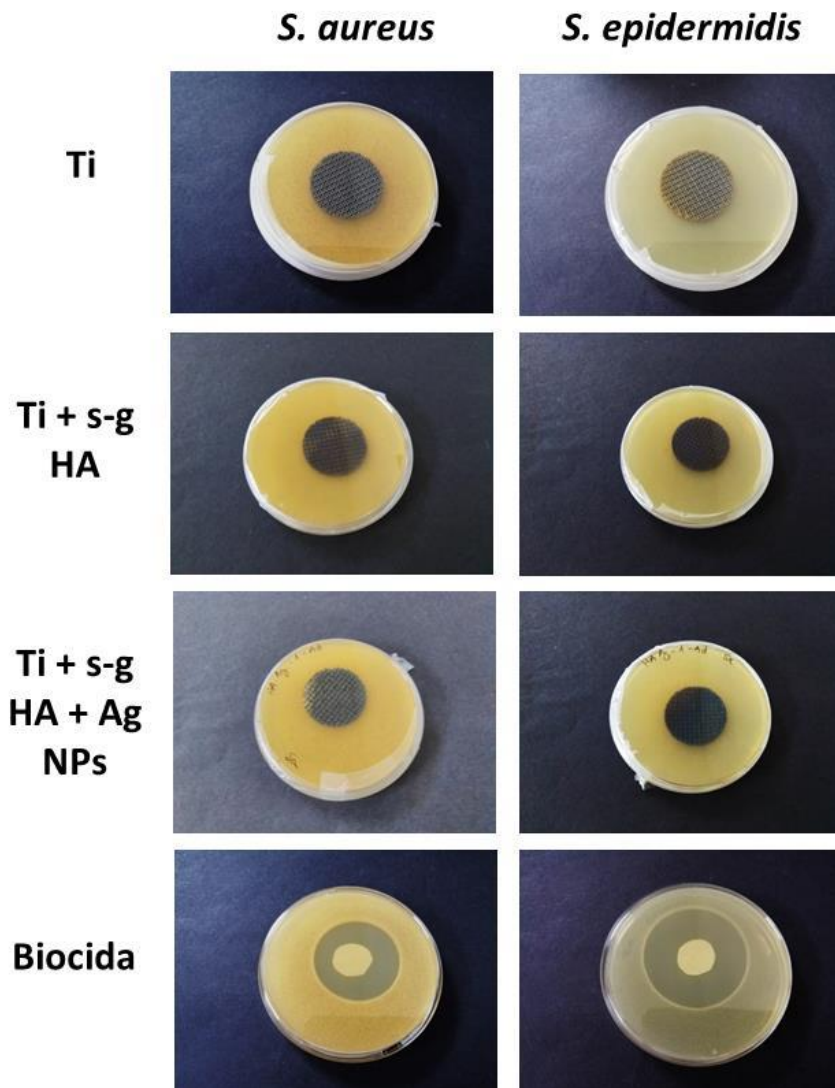


Figura 42. Cultivos de las disoluciones de lavado del inóculo (*S. aureus* o *S. epidermidis*) en contacto con las diferentes probetas (Ti, Ti + sol-gel de HA, Ti + sol-gel de HA + nanopartículas de plata).

CONCLUSIONES:

- Con el tratamiento de decapado se ha conseguido un aumento del área superficial de las probetas metálicas y se ha conseguido un mejor anclaje de los recubrimientos.
- Se han fabricado piezas de Ti6Al4V mediante fabricación aditiva; en este caso y debido a su alta área superficial no ha sido necesario realizar un tratamiento de decapado.
- Se han sintetizado recubrimientos sol-gel basados en SiO₂, hidroxiapatita y TiO₂ sobre las probetas de Ti6Al4V.
- La funcionalidad antibacteriana ha sido aportada por nanopartículas de plata que han sido generadas in-situ durante la síntesis de los recubrimientos.
- La caracterización mediante microscopía electrónica de barrido de efecto campo ha mostrado la formación de los recubrimientos. En los recubrimientos de SiO₂ e hidroxiapatita se ha observado la formación de un recubrimiento continuo y además se ha observado la formación de las nanopartículas de plata. En el caso de los recubrimientos de TiO₂ se ha observado la formación de recubrimientos cuarteados y no continuos, por lo que han sido descartados para posteriores ensayos.
- En los ensayos de liberación se ha observado la liberación progresiva de Ag⁺. En los primeros 7 días se da la mayor liberación de Ag⁺ pero posteriormente hay una liberación continua y progresiva de la misma. La liberación inicial es mayor para el caso del recubrimiento de SiO₂/Ag que para el de hidroxiapatita/Ag. La velocidad de liberación entre los días 7 y 32 es 11.5 veces mayor para el caso del recubrimiento de SiO₂/Ag.
- Para los ensayos antibacterianos se emplearon cepas las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* para testar la eficacia antibacteriana de los recubrimientos. Para ambos recubrimientos (HA-Ag y SiO₂-Ag) y los dos tipos de bacterias testadas se obtuvo una reducción de la actividad bacteriana de un 99.9 %, lo que demuestra la eficacia de los recubrimientos desarrollados.
- En el caso de las probetas de fabricación aditiva se realizó un ensayo cualitativo para determinar el halo de inhibición. En el caso de las probetas de SiO₂-Ag se obtuvo una inhibición total del crecimiento. En el caso de las probetas de HA-Ag no se observó halo de inhibición.