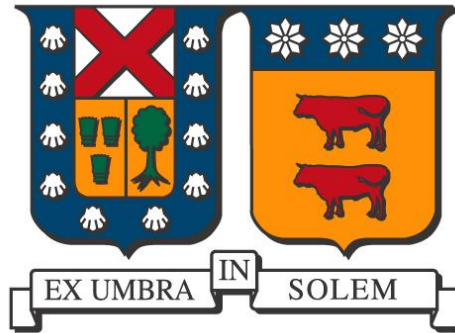


**UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA**  
**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA METALÚRGICA**  
**Y DE MATERIALES**



**ESTUDIO DEL EFECTO DEL ESTAÑO SOBRE PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS**  
**DE LA ALEACIÓN Ti – 13% Ta – x% Sn**

Proyecto de trabajo de titulación presentado en conformidad a los requisitos y reglamentos requeridos para obtener el título de Ingeniero Civil Metalúrgico

**Profesor Guía: Claudio Aguilar R.**

**JAVIERA ESCOBAR JEREZ**

**2019**

**Agradecimientos**

**Dedicatoria**

## Resumen

En las últimas décadas se han estudiado y utilizado diversos materiales metálicos, cerámicos, polímeros y naturales como implantes médicos, incrementando el uso de materiales metálicos. Entre los más utilizados se encuentran los aceros inoxidables, aleaciones base titanio, cobalto, cromo y molibdeno. De estas, las aleaciones base titanio son ampliamente utilizadas en aplicaciones biomédicas debido a sus propiedades tales como buena resistencia a la fatiga, durabilidad, resistencia a la corrosión y biocompatibilidad.

Las aleaciones de Ti tipo  $\beta$ , presentan excelentes propiedades como la resistencia a la corrosión y resistencia mecánica, por lo que es de gran interés el estudio de esta aleación. Entre los elementos estabilizadores de la fase  $\beta$ , se encuentra el tántalo y estaño, siendo ambos elementos biocompatibles. Sin embargo, el efecto del estaño como elemento en aleaciones a base Ti para aplicaciones biomédicas aún no ha sido investigado en profundidad, por lo que actualmente existe una escasez de las aleaciones Ti-Ta-Sn.

En el presente trabajo se tiene como objetivo general analizar el efecto de la microestructura de la aleación Ti – 13% Ta – x% Sn (x= 3, 6, 9, 12% atómico) sobre la respuesta antibacteriana tanto bactericidas y bacteriostáticas al contacto con las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Se fabricaron espumas metálicas de la aleación Ti-Ta-Sn mediante la vía pulvimetalúrgica, realizando el proceso de aleado mecánico y sinterización de polvos metálicos de titanio, tántalo y estaño, caracterizando los polvos metálicos y espumas metálicas obtenidos mediante, difracción de rayos X (DRX), microscopia electrónica de barrido (MEB) y microscopia óptica (MO). Además se realizó la cuantificación del crecimiento de las cepas bacterianas por medio de densidad óptica (DO) y microscopia óptica (MO).

## **Abstract**

In recent decades various metallic, ceramic, polymer and natural materials have been studied and used as medical implants, In recent years the use of metallic materials has increased, and among the most used is stainless steels, titanium, cobalt, chromium and molybdenum alloys. Of these alloys, titanium base alloys are widely used in biomedical applications due to their properties such as good fatigue resistance, durability, corrosion resistance and biocompatibility.

Ti-type alloys have excellent properties such as corrosion resistance and mechanical resistance, so it is of great interest to study this alloy. Tantalum and tin are the stable elements of the phase, and are both biocompatible elements. However, the effect of tin as an element in Ti-based alloys for biomedical applications has not yet been thoroughly investigated, and as a result there is currently a shortage of Ti-Ta-Sn alloys.

In this work, the goal is to analyze the effect of the microstructure of the alloy Ti – 13% Ta – x% Sn (x 3, 6, 9, 12% atomic) on the antibacterial response both basaltized and bacteriostatic on contact with *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria.

Metal foams of the Ti-Ta-Sn alloy were developed using the pulvimetalúrgica track, performing the mechanical alloy integration process and sintering of metallic powders of titanium, tantalum and tin, characterizing the metal powders and metal foams obtained X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (MEB), and optical microscopy (MO). In addition, the growth of bacterial strains will be quantified by optical density (DO) and optical microscopy (MO).

## Índice

|                                                       |     |
|-------------------------------------------------------|-----|
| AGRADECIMIENTOS .....                                 | 2   |
| DEDICATORIA .....                                     | 2   |
| RESUMEN .....                                         | 3   |
| ABSTRACT .....                                        | 4   |
| ÍNDICE .....                                          | 5   |
| LISTA DE FIGURAS.....                                 | 6   |
| LISTA DE TABLAS .....                                 | 10  |
| CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL .....                | 12  |
| 1.1    Introducción .....                             | 12  |
| 1.2    Definición del problema.....                   | 15  |
| 1.3    Objetivos .....                                | 15  |
| CAPÍTULO 2: ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....          | 16  |
| 2.1    Pulvimetalurgia .....                          | 16  |
| 2.2    Titanio .....                                  | 18  |
| 2.3    Huesos.....                                    | 23  |
| 2.5    Biocompatibilidad .....                        | 26  |
| CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....            | 33  |
| 3.1    Materiales e insumos .....                     | 33  |
| 3.2    Equipos .....                                  | 38  |
| 3.2    Procedimiento experimental.....                | 47  |
| 3.3    Técnicas de caracterización .....              | 56  |
| CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....               | 58  |
| 1.1    Caracterización de los polvos.....             | 58  |
| 1.2    Caracterización de las espumas metálicas ..... | 63  |
| 1.3    Estudio antibacteriano .....                   | 78  |
| CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....                         | 95  |
| CAPÍTULO 6: REFERENCIAS .....                         | 96  |
| CAPÍTULO 7: ANEXO .....                               | 109 |

## Lista de figuras

|                                                                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1. ETAPAS DEL PROCESO PULVIMETALÚRGICO [19]. .....                                                                                                                                                 | 17 |
| FIGURA 2. ESTRUCTURA CRISTALINA DEL TITANIO: (A) TITANIO A: ESTRUCTURA HEXAGONAL COMPACTA, (B) TITANIO B; ESTRUCTURA CÚBICA CENTRADA EN CUERPO.....                                                       | 19 |
| FIGURA 3. EFECTO DE LOS ELEMENTOS DE ALEACIÓN EN EL DIAGRAMA DE FASES DEL TITANIO: (A) ESTABILIZADOR A, (B) ESTABILIZADOR B ISOMORFO Y (C) ESTABILIZADOR B EUTECTOIDE [3,14]. .....                       | 20 |
| FIGURA 4. SECCIÓN ISOTERMA EXPERIMENTAL DEL SISTEMA TERNARIO Ti-Ta-Sn A 900 [°C], ADAPTADO DE [26]. .....                                                                                                 | 21 |
| FIGURA 5. EFECTO DE LA POROSIDAD EN EL MÓDULO DE ELASTICIDAD [GPa] DE LA ALEACIÓN Ti-Ta-12% AT [31]. .....                                                                                                | 23 |
| FIGURA 6. RESISTENCIA MECÁNICA DEL HUESO CORTICAL PARA DISTINTAS EDADES (A) ÚLTIMO ESFUERZO (B) ÚLTIMA DEFORMACIÓN [36].....                                                                              | 24 |
| FIGURA 7. CURVA ESFUERZO VS DEFORMACIÓN DE UN ENSAYO DE COMPRESIÓN LLEGANDO A LA FRACTURA [38]. .....                                                                                                     | 25 |
| FIGURA 8. TASA ANTIBACTERIANA (R): (A) DESPUÉS DE 2 HORAS Y (B) DESPUÉS DE 6 HORAS PARA LAS ALEACIONES DE Ti-Cu [43]. .....                                                                               | 27 |
| FIGURA 9. ETAPAS DE UN PROCESO DE FORMACIÓN DE UNA BIOPELÍCULA 1. ADHERENCIA PRIMARIA O INESPECÍFICA; 2 ADHERENCIA SECUNDARIA O ESPECÍFICA; 3 Y 4 FASE DE ACUMULACIÓN Y 5 FASES DE SEPARACIÓN [48]. ..... | 30 |
| FIGURA 10. CEPA STAPHYLOCOCCUS AUREUS INCUBADA EN PLASMA HUMANO EN PRESENCIA DE EFB (PROTEÍNA DE UNIÓN A FIBRINÓGENO EXTRACELULAR). ENSAYO SEM AUMENTÓ 10.000x [53]. .....                                | 31 |
| FIGURA 11. CEPA ESCHARICHIA COLI - ENSAYO SEM 24.000x [58]. .....                                                                                                                                         | 32 |
| FIGURA 12 ESQUEMA EN CORTE DE LA MATRIZ Y PUNZONES UTILIZADA EN EL PROCESO DE (A) COMPACTACIÓN (B) SINTERIZACIÓN. ....                                                                                    | 36 |
| FIGURA 13. BALANZA DIGITAL [67]. .....                                                                                                                                                                    | 38 |
| FIGURA 14. CÁMARA DE GUANTES [68]. .....                                                                                                                                                                  | 39 |
| FIGURA 15. MOLINO PLANETARIO RETSCH MODELO PM 400 [69]. .....                                                                                                                                             | 40 |
| FIGURA 16. (A) MOLINO MEZCLADOR RESTSCH MODELO MM 400 (B) RECIPIENTE DE MOLIENDA Y/O MEZCLADO [70]. .....                                                                                                 | 41 |
| FIGURA 17. MÁQUINA DE ENSAYO DE MATERIALES ZWICK/ROELL MODELO Z030 [72]. ..                                                                                                                               | 42 |
| FIGURA 18. ESQUEMA DEL EQUIPO HOT PRESSING. ....                                                                                                                                                          | 43 |

|                                                                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 19. EQUIPO METALLOGRAPHIC SAMPLE GRINDING AND POLISHIN MACHINE MODELO GP-2-200 [73]. .....                                                                                                                            | 44 |
| FIGURA 20. (A) INCUBADORA ESTÁTICA (B) INCUBADORA CON AGITACIÓN ORBITAL. ....                                                                                                                                                | 44 |
| FIGURA 21. AUTOCLAVE DE LABORATORIO [76]. .....                                                                                                                                                                              | 45 |
| FIGURA 22. CAMPANA FLUJO LAMINAR VERTICAL [77]. .....                                                                                                                                                                        | 46 |
| FIGURA 23. ESPECTROFOTÓMETRO AGILEN 8453 [78]. .....                                                                                                                                                                         | 46 |
| FIGURA 24. ESQUEMA GENERAL DEL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL. ....                                                                                                                                                              | 47 |
| FIGURA 25. PERFIL TÉRMICO DE SINTERIZACIÓN .....                                                                                                                                                                             | 50 |
| FIGURA 26. CRECIMIENTO DE CULTIVO PURO MEDIANTE LA TÉCNICA DE AISLAMIENTO DE PLACAS EN ESTRÍAS O POR AGOTAMIENTO EN SUPERFICIE [61]. .....                                                                                   | 52 |
| FIGURA 27. PLACA DE VARIOS POCILLOS O PLACA 12. ....                                                                                                                                                                         | 53 |
| FIGURA 28. ESQUEMA DE DILUCIONES DECIMALES EMPLEADO EN TUBOS DE 1 [ML]. ....                                                                                                                                                 | 55 |
| FIGURA 29. IMÁGENES MED DE POLVOS DE Ti PURO CON UN AUMENTO DE A) 200x, B) 500x Y C) 1000x. ....                                                                                                                             | 58 |
| FIGURA 30. IMÁGENES MED DE POLVOS DE Ta PURO CON UN AUMENTO DE A) 1000x B) 5000x. ....                                                                                                                                       | 59 |
| FIGURA 31. IMÁGENES MED DE POLVOS DE Sn PURO CON UN AUMENTO DE A) 1000x B) 5000x. ....                                                                                                                                       | 60 |
| FIGURA 32. IMÁGENES MED DE POLVOS DE Ti-Ta-Sn CON UN AUMENTO DE A) 500x B) 5000x. ....                                                                                                                                       | 62 |
| FIGURA 33. PATRONES DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE LOS POLVOS METÁLICOS COMERCIALMENTE PUROS DE A) Ti, B) Ta Y C) Sn. ....                                                                                                      | 63 |
| FIGURA 34. IMÁGENES DE MICROSCOPIA ÓPTICA DE LAS ESPUMAS A) Ti-13Ta-3Sn, B) Ti-13Ta-6Sn, C) Ti-13Ta-9Sn Y D) Ti-13Ta-3Sn .....                                                                                               | 63 |
| FIGURA 35. DIMENSIONES DE LAS PROBETAS SINTERIZADAS DE LA ALEACIÓN Ti-13Ta-xSn (x= 3, 6, 9 Y 12% At.) A) DIÁMETRO Y B) ALTURA. ....                                                                                          | 64 |
| FIGURA 36. (A) VOLUMEN Y (B) CONTRACCIÓN VOLUMÉTRICA DE LAS PROBETAS DE Ti-13Ta-xSn (x= 3, 6, 9 Y 12% ATÓMICO) EN RELACIÓN AL CONTENIDO DE ESTAÑO. ....                                                                      | 65 |
| FIGURA 37. DISTRIBUCIÓN DE POROS PARA LA ALEACIÓN Ti-Ta-Sn CON DIFERENTE CANTIDAD DE ESTAÑO; A) 3%, B) 6%, C) 9% Y D) 12% ATÓMICO. ....                                                                                      | 66 |
| FIGURA 38. DISTRIBUCIÓN DE POROS DE LAS ESPUMAS DE (A) Ti <sub>13</sub> Ta <sub>3</sub> Sn, (B) Ti <sub>13</sub> Ta <sub>6</sub> S, (C) Ti <sub>13</sub> Ta <sub>9</sub> Sn Y (D) Ti <sub>13</sub> Ta <sub>12</sub> Sn. .... | 68 |
| FIGURA 39. CURVA GRANULOMETRÍA DE NaCl. ....                                                                                                                                                                                 | 69 |

|                                                                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 40. POROSIDAD EXPERIMENTAL OBTENIDA SEGÚN LA ADICIÓN DE ESTAÑO DE LA ALEACIÓN Ti-13Ta-xSn (% ATÓMICO). .....                                                                                       | 70 |
| FIGURA 41. GRÁFICOS DE LA CINÉTICA DE DISOLUCIÓN DE NaCl EN AGUA DESTILADA A 50 [°C] (A) ALEACIÓN Ti-Ta-3Sn (B) ALEACIÓN Ti-Ta-6Sn (C) ALEACIÓN Ti-Ta-9Sn (D) ALEACIÓN Ti-Ta-12Sn.....                    | 71 |
| FIGURA 42. A) TAMAÑO DE CRISTALITA Y B) MICRODEFORMACIÓN DE LAS FASES A, B, $\Gamma$ Y LA CONTAMINACIÓN ( $ZrO_2$ )( $Y_2O_3$ ) SEGÚN LA CANTIDAD DE Sn PRESENTE. ....                                    | 74 |
| FIGURA 43. DIFRACTOGRAMA DE LA ALEACIÓN Ti-Ta-3Sn (% ATÓMICO). ....                                                                                                                                       | 75 |
| FIGURA 44. DIFRACTOGRAMA DE LA ALEACIÓN Ti-Ta-6Sn (% ATÓMICO). ....                                                                                                                                       | 76 |
| FIGURA 45. DIFRACTOGRAMA DE LA ALEACIÓN Ti-Ta-9Sn (%ATÓMICO). ....                                                                                                                                        | 77 |
| FIGURA 46. DIFRACTOGRAMA DE LA ALEACIÓN Ti-Ta-12Sn (%ATÓMICO). ....                                                                                                                                       | 77 |
| FIGURA 47. CULTIVO CEPA (A) <i>ESCHERICHIA COLI</i> (COLI) Y (B) <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> (STAU) EN MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO. ....                                                                     | 78 |
| FIGURA 48. CULTIVO DE LAS CEPAS A) <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> (STAU) Y (B) <i>ESCHERICHIA COLI</i> (COLI) EN C) MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO O BROTH.....                                                   | 79 |
| FIGURA 49. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL MÉTODO DE ABSORCIÓN Y CONTEO DE CULTIVO VIABLE DE LAS BACTERIAS <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> Y <i>ESCHERICHIA COLI</i> . ....                                         | 81 |
| FIGURA 50. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> (STAU) Y <i>ESCHERICHIA COLI</i> (COLI).....                                                                             | 82 |
| FIGURA 51. SENSIBILIDAD DE LOS MICROORGANISMOS (A) STAU Y (B) COLI A LOS ANTIBIÓTICOS GENTAMICINA (G), AMPICILINA (A), KANAKICINA (K), ESTREPTOMICINA (S) Y TETRACICLINA (T). ....                        | 84 |
| FIGURA 52. RESULTADO DE CONTROL NEGATIVO EN ENSAYO BACTERIANO DE LA ALEACIÓN TiTaSn SOBRE LAS BACTERIAS A) <i>ESCHERICHIA COLI</i> Y B) <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>                                      | 86 |
| FIGURA 53. RESULTADO DE CONTROL POSITIVO EN ENSAYO BACTERIANO DE LA ALEACIÓN TiTaSn SOBRE LAS BACTERIAS A) <i>ESCHERICHIA COLI</i> Y B) <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> .                                    | 86 |
| FIGURA 54. RESULTADO DE CONTROL NEUTRO EN ENSAYO BACTERIANO SOBRE LAS ALEACIÓN Ti-13Ta-xSn A) 0%Sn, B) 3% Sn, C) 6% Sn, D) 9% Sn Y E) 12%Sn.....                                                          | 87 |
| FIGURA 55. RESULTADO DE CONTROL BLANCO EN ENSAYO BACTERIANO DE LA ALEACIÓN Ti-Ta-Sn. ....                                                                                                                 | 87 |
| FIGURA 56. RESULTADO DE ENSAYO BACTERIANO SOBRE <i>ESCHERICHIA COLI</i> (COLI) EN LAS SOBRE LAS ALEACIONES A) Ti-13Ta, B) Ti-13Ta-3Sn, C) Ti-13Ta-6Sn, D) Ti-13Ta-9Sn Y E) Ti-13Ta-12Sn (% ATÓMICO). .... | 88 |

|                                                                                                                                                                                                                                           |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| FIGURA 57. RESULTADO DE ENSAYO BACTERIANO SOBRE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> (STAU) EN LAS SOBRE LAS ALEACIONES A) Ti-13TA, B) Ti-13TA-3Sn, C) Ti-13TA-6Sn, D) Ti-13TA-9Sn Y E) Ti-13TA-12Sn (% ATÓMICO).....                             | 89  |
| FIGURA 58. ABSORBANCIA RELATIVA DE LAS CEPAS (A) <i>ESCHERICHIA COLI</i> (COLI) Y (B) <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> (STAU) TRAS EL TEST MTS DE 24 Y 18 [H] CON RESPECTO AL CONTROL [119].....                                              | 90  |
| FIGURA 59. CURVA DE CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> (STAU) Y <i>ESCHERICHIA COLI</i> (COLI) EN UN MEDIO DE CULTIVO CON Y SIN LA PRESENCIA DE POLVOS DE Ti-13TA-3Sn.....                                         | 93  |
| FIGURA 60. CURVA DE CRECIMIENTO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> (COLI) FRENTE A DIFERENTES CANTIDADES DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA [128].....                                                                                                    | 94  |
| FIGURA 61. FORMAS TÍPICAS DE PARTÍCULAS: A) POLVO ACICULAR, B) POLVO ANGULAR, C) POLVO DENDRÍTICO, D) POLVO FIBROSO, E) POLVO EN HOJUELAS, F) POLVO GRANULAR, G) POLVO IRREGULAR, H) POLVO NODULAR E I) POLVO ESFEROIDAL [129].           | 109 |
| FIGURA 62. CURVA TÍPICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO [110].                                                                                                                                                                                  | 110 |
| FIGURA 63. PRUEBA CONTROL POSITIVO SOBRE LA BACTERIA <i>ESCHERICHIA COLI</i> (COLI) CON OD Y CONCENTRACIÓN DE ANTIBIÓTICO VARIABLE; A) OD=0,1 [-] - 50 [ $\mu$ M], B) O.D=0,2 [-] - 50 [ $\mu$ M] Y C) O.D=0,1 [-] - 100 [ $\mu$ M].      | 110 |
| FIGURA 64. PRUEBA CONTROL POSITIVO SOBRE LA BACTERIA <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> (STAU) CON OD Y CONCENTRACIÓN DE ANTIBIÓTICO VARIABLE; A) OD=0,1 [-] - 50 [ $\mu$ M], B) O.D=0,2 [-] - 50 [ $\mu$ M] Y C) O.D=0,1 [-] - 100 [ $\mu$ M]. | 110 |
| FIGURA 65. ENSAYO BACTERIANO DE LA ALEACIÓN Ti-13TA-12Sn SOBRE EL CULTIVO DE BACTERIA <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> (STAU) Y <i>ESCHERICHIA COLI</i> (COLI).                                                                               | 111 |
| FIGURA 66. DIFRACTOGRAMA DE LA ALEACIÓN Ti35NbXAg A PARTIR DEL ENSAYO DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X. LOS CRUCES ROJOS Y AZULES INDICAN LA LOCALIZACIÓN DE LOS PICOS DE FASE TIPO A Y B [119].                                                  | 112 |
| FIGURA 67. DIFRACTOGRAMA DE LA ALEACIÓN Ti35NbXCu A PARTIR DEL ENSAYO DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X. LOS CRUCES ROJOS Y AZULES INDICAN LA LOCALIZACIÓN DE LOS PICOS DE FASE TIPO A Y B [119].7                                                 | 112 |

## Lista de tablas

|                                                                                                                                                                                       |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| TABLA 1. PROPIEDADES MECÁNICAS Y FÍSICAS DEL TITANIO PURO [24].                                                                                                                       | 18  |
| TABLA 2. PROPIEDADES MECÁNICAS SEGÚN LA FASE PREDOMINANTE ALEACIÓN DE Ti.                                                                                                             | 21  |
| TABLA 3. SOLUBILIDAD DEL TITANIO (Ti) Y TÁNTALO (Ta) EN FASES ESTABLES DEL SISTEMA TERNARIO Ti-Ta-Sn A 900 [°C] [27].                                                                 | 22  |
| TABLA 4. IMPACTO BIOLÓGICO EN EL CUERPO HUMANO DE LOS ELEMENTOS UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO [40].                                                                                      | 26  |
| TABLA 5. CARACTERÍSTICAS POLVOS METÁLICOS.                                                                                                                                            | 33  |
| TABLA 6. ESPECIFICACIÓN ÁCIDO ESTEÁRICO.                                                                                                                                              | 33  |
| TABLA 7. ESPECIFICACIÓN GAS ARGÓN.                                                                                                                                                    | 34  |
| TABLA 8. CARACTERÍSTICAS DE MEDIO DE MOLIENDA.                                                                                                                                        | 34  |
| TABLA 9. DETALLE TÉCNICO RECIPIENTES.                                                                                                                                                 | 35  |
| TABLA 10. ANÁLISIS QUÍMICO DEL CLORURO DE SODIO (NaCl).                                                                                                                               | 35  |
| TABLA 11. COMPOSICIÓN MEDIO DE CULTIVO                                                                                                                                                | 37  |
| TABLA 12. ESPECIFICACIONES CÁMARA DE GUANTES [68].                                                                                                                                    | 39  |
| TABLA 13. CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS MOLINO PLANETARIO RETSCH PM 400 [69].                                                                                                              | 40  |
| TABLA 14. CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS MOLINO MEZCLADOR MM 400 [70].                                                                                                                      | 41  |
| TABLA 15. CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS MAQUINA ZWICK/ROELL MODELO Z030 [72].                                                                                                              | 42  |
| TABLA 16. MASA DE LOS ELEMENTOS SEGÚN LA ALEACIÓN.                                                                                                                                    | 48  |
| TABLA 17. TIEMPO DE MOLIENDA SEGÚN LA ALEACIÓN.                                                                                                                                       | 49  |
| TABLA 18. FASES Y ÓXIDOS PRESENTEN EN LA ESPUMA DE Ti-Ta-Sn.                                                                                                                          | 72  |
| TABLA 19. PORCENTAJE DE LAS FASES OBTENIDAS DE LAS ALEACIONES Ti35NbxCu Y Ti35NbxAg A PARTIR DEL ANÁLISIS DE LOS DIFRACTOGRAMAS DE CADA ALEACIÓN MEDIANTE EL SOFTWARE MAUD [119].     | 90  |
| TABLA 20. PORCENTAJE DE LAS FASES OBTENIDAS DE LAS ALEACIONES Ti13TaxSn A PARTIR DEL ANÁLISIS DE LOS DIFRACTOGRAMAS DE CADA ALEACIÓN MEDIANTE EL SOFTWARE MAUD [119].                 | 91  |
| TABLA 21. PORCENTAJE DE POROSIDAD EXPERIMENTAL DE LAS ALEACIONES Ti-Ta-Sn, Ti-Nb-Cu Y Ti-Nb-Ag [119].                                                                                 | 92  |
| TABLA 22. TAMAÑO DE CRISTALITA Y MICRODEFORMACIÓN DE LAS FASES A, B, $\Gamma$ Y LA CONTAMINACIÓN (ZrO <sub>2</sub> )(Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) SEGÚN LA CANTIDAD DE Sn PRESENTE | 109 |

TABLA 23. PATRONES ESTÁNDAR DE HALO DE INHIBICIÓN, PUNTOS DE CORTE EQUIVALENTES A LA CMI PARA ENTEROBACTERIAS Y DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN PARA LA CEPA *E. COLI* ATCC25922 EMPLEADA COMO CONTROL DE CALIDAD [82]..... 111

TABLA 24. PATRONES ESTÁNDAR DEL HALO DE INHIBICIÓN PARA ESTAFILOCOCOS , PUNTOS DE CORTE EQUIVALENTES A LA CMI Y DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN PARA LA CEPA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ATCC 25923 EMPLEADA COMO CONTROL DE CALIDAD .... 111

## **Capítulo 1: Introducción general**

### **1.1 Introducción**

A nivel mundial, existe una tendencia al incremento de la expectativa de vida y de la población sobre 60 años. Según estudios de la Organización Mundial de la Salud en el año 2015 en el mundo existían 901 millones de personas (12% de la población) mayores a 60 años, se estima que para los años 2030 y 2050 aumentará en un 17% y 22% respectivamente [1].

Chile y sus países vecinos no son la excepción, ya que son una de las regiones más longevas del mundo. Según el Instituto Nacional de Estadísticas la población sobre 60 años para el 2018 fue de 3 mil habitantes. Se estima que esta cifra aumentará para el 2025 y 2050 en un 50% y 200% respectivamente [2].

Se ha observado que a medida que se incrementa la edad del paciente incrementa la probabilidad de sufrir una intervención quirúrgica. Esto ha llevado a mejorar el desarrollo de implantes, que presenten un periodo de vida útil cada vez mayor. El éxito clínico de los implantes se basa en la consecuencia de la osteointegración.

Para elegir correctamente el biomaterial con el que se debe sintetizar el implante, es esencial entender las relaciones existentes entre su estructura, sus propiedades y la función que va a desarrollar [3].

Los biomateriales metálicos tienen distintos usos, su empleo en implantes estructurales es básico, reemplazando determinados componentes del cuerpo humano, fundamentalmente cuando se requiere soportar cargas (implantes dentales, huesos y articulaciones), o también como elementos de fijación temporales [4-5]. Por lo tanto, los implantes metálicos además de ser biocompatibles necesitan disponer de una compatibilidad mecánica con el hueso que sustituye, que se consigue mediante una combinación de bajo modulo elástico, alta resistencia a la corrosión, alta resistencia a la rotura y fatiga [5].

Entre los biomateriales, las aleaciones de base Ti son las más frecuentes en la industria de fabricación de implantes en el último tiempo, este elemento presenta una transformación alotrópica presentando la fase  $\alpha$  (hcp) a temperatura ambiente y una fase  $\beta$  (bcc) a temperatura sobre 823 [°C], esta última fase es la de mayor interés debido a la similitud de propiedades mecánicas con el hueso [6].

La fase tipo  $\beta$  no es estable a temperatura ambiente por lo que se adicionan elementos estabilizadores como el tántalo, niobio, circonio, rubidio y molibdeno, los cuales tienen un alto costo, además de los elementos de menor costo como manganeso, hierro, cromo y estaño [7-8].

Las aleaciones de titanio, pueden ser aplicadas como biomédicos pero tienen como desventaja el valor del módulo elástico se encuentran en el rango de 50 a 120 [GPa] que es más alto que el de las estructuras óseas, que se encuentran entre 3 a 30 [GPa] dependiendo del tipo de hueso y la dirección en que se realice la medición [9-10]. Esta diferencia de valores genera un efecto conocido como “apantallamiento de tensiones”, que consiste en que el metal soporta una parte desproporcionada de la carga frente a lo que soporta el hueso. Otra desventaja de esta aleación, es su alta reactividad a temperatura superior a 600 [°C], lo que provoca que son propensos a la rápida oxidación.

Las posibles alternativas para disminuir el módulo elástico son: i) formación de una solución sólida, ii) síntesis de materiales compuestos y iii) síntesis de espumas [11]. En donde esta última alternativa es utilizada para la disminución del módulo elástico y para ajustar las propiedades mecánicas de los implantes de titanio a las condiciones del hueso. Esto minimiza o elimina el apantallamiento de tensiones, aumenta la probabilidad del crecimiento del nuevo tejido óseo y eventualmente prolonga la vida útil del implante [11].

Una posible falla o complicación en relación al uso de implantes, prótesis y otros elementos artificiales, es el desencadenamiento de procesos infecciosos originados por colonización por microorganismos.

La incidencia de este proceso infeccioso es bastante habitual, estudios anteriores en catéteres vasculares o sondas vesiculares posterior a 1000 [d] de uso, mostraron que en 5 a 15 % de los casos se presentaron infecciones bacterianas.

En el caso de implantes metálicos en ortopedia, la tasa de infección oscila entre 2 – 4 % en implantes fijos y para los clavos empleados como fijadores externos se eleva hasta un 45% [12].

El rechazo del implante médico debido a la presencia de bacterias oscila entre un 7 a 10%, en donde las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* generan un 27% y 4% respectivamente del total de los rechazos de los implantes médicos producto de infecciones bacterianas [12].

La causa directa del desarrollo de los procesos infecciosos en un implante se debe a la formación de una biopelícula sobre la superficie del material. Números estudios han demostrado que la biopelículas se encuentra presente en todos los ecosistemas y actualmente se admite que en ambientes naturales entre 95 – 99% de los microorganismos, se tienden a formar una biopelícula sobre superficies sólidas, siendo la forma de vida planctónica no más que un medio de traslado de una superficie a otra. La capacidad de formación de esta capa no parece restringida a ningún grupo específico de microorganismos y se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas se podrían encontrar cepas formadoras de biopelículas de cualquiera de ellos [13].

Este trabajo consiste en determinar el efecto del estaño en la aleación Ti - 13%Ta - x% Sn, con un porcentaje atómico del estaño es de un 3, 6, 9 y 12, mediante la vía pulvimetalúrgica. Se confeccionaron espumas metálicas con un 50% v/v de porosidad para evaluar sus propiedades antibacterianas.

El procedimiento experimental se inicio en el aleado mecánico, se realizó una caracterización de los polvos metálicos mediante difracción de rayos X (DRX) y microscopia electrónica de barrido (MED), posteriormente estos polvos fueron compactados y sinterizados por el método de Hot Pressing, se realizó la caracterización de las probetas metálicas mediante microscopia óptica (OP) y difracción de rayos X (DRX). Por último, para determinar las propiedades antibacterianas se realizó ensayo de microscopia óptica al cultivo de bacteria, además de sus controles negativos y positivos.

## **1.2 Definición del problema**

Las aleaciones Ti-Ta-Sn han mostrado buenas características mecánicas y de corrosión, para ser utilizado como implante médico. Sin embargo no existe información acerca de la influencia y efecto del estaño sobre la respuesta antibacteriana de las espumas de Ti-13Ta-xSn ( $x = 3, 6, 9$  y 12% atómico), en contacto con las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo principal**

Analizar el efecto de la cantidad de estaño en la aleación Ti – 13% Ta –  $x\%$  Sn ( $x = 3, 6, 9$  y 12% atómico) sobre el cambio de la microestructura y la respuesta antibacteriana, para ser utilizado como biomateriales en reemplazo del hueso humano.

### **1.3.2 Objetivo específicos**

- Analizar el efecto del estaño en la aleación Ti13TaxSn ( $x = 3, 6, 9$  y 12% atómico) sobre las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.
- Analizar el efecto de la fase  $\beta$ , presente en la aleación Ti13TaxSn ( $x = 3, 6, 9$  y 12% atómico), sobre la formación de la biopelícula.

## **Capítulo 2: Antecedentes bibliográficos**

Los biometales se clasifican en cuatro grandes grupos según la necesidad del hueso que se quiere reemplazar, debido a que cada hueso y tejido presentan diferentes propiedades químicas y físicas. Estos grupos: polímeros, cerámicos, naturales y metálicos, siendo este último de nuestro interés.

En la actualidad, la industria médica utiliza implantes metálicos como aceros inoxidables y aleaciones en base titanio, magnesio, tántalo, zirconio, niobio y cobalto [14].

El material utilizado en la fabricación de implantes médicos, debe tener en consideración que existe una compatibilidad mecánica con el hueso, para así evitar una pérdida del implante y en consecuencia un largo periodo de servicio.

Para escoger un material que será utilizado en la fabricación de los implantes se debe tener especial consideración en que existe una compatibilidad mecánica entre el hueso y el biomaterial utilizado, para así evitar una pérdida del implante y un largo periodo de servicio.

El proceso de fabricación es de gran importancia, en donde la pulvimetalurgia presenta la ventaja de fabricar piezas de forma complejas y dimensiones cercanas a las del producto final, con excelentes tolerancias y alta calidad.

### **2.1 Pulvimetalurgia**

La pulvimetalúrgica (PM) es el estudio de tratamientos de polvos metálicos, incluyendo su fabricación, caracterización y conversión en componentes útiles de ingeniería [15]. La principal ventaja de la PM es la elaboración de piezas de forma complejas y dimensiones cercanas a las del producto final, con excelentes tolerancias y alta calidad. Para así obtener piezas con una alta homogeneidad y control del tamaño de grano, generando la formación de enlaces fuertes entre las partículas lo que conlleva a un aumento de la dureza y tenacidad [16-17].

Algunas desventajas del proceso de PM consiste en el alto costo de maquinaria y equipos, la presencia de variación de densidad especialmente en geometrías complejas, alta dificultad de producción con diseños complicados con pequeño tamaño, el alto costo de los polvos metálicos y por último algunos de estos presentan riesgos de explosión, como el aluminio, magnesio, zirconio y titanio [18].

En el diagrama que se aprecia en la Figura 1 se describe de modo esquemático las etapas más relevantes en el proceso PM. El proceso se inicia en el procesamiento de los polvos metálicos, para luego fabricar probetas en verde y finalmente probetas metálicas consolidadas. Las características que se deseen en la pieza final dependen de las técnicas y condiciones operacionales en que esta fue fabricada.

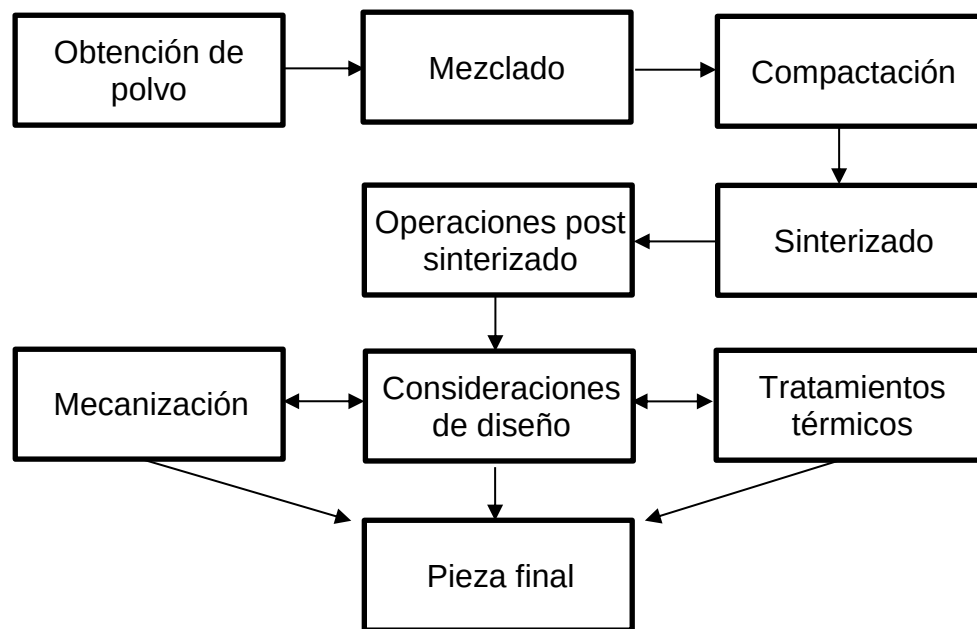


Figura 1. Etapas del proceso pulvimetalúrgico [19].

El proceso inicia en el procesamiento de los polvos metálicos, los cuales son mezclados para obtener una buena homogeneidad y luego en el proceso de compactación estos promuevan los compactos con pequeños gradientes de densidad para así generar una mayor resistencia y mejor sinterización de éstos. Finalmente, el proceso de sinterizado se emplea para mejorar las propiedades internas y superficiales del producto final [19].

## 2.2 Titanio

El titanio se descubrió hace más de 200 años, pero este comenzó su producción comercial alrededor del año 1950, debido a la alta reactividad y su compleja extracción, en esa época fue reconocida por su importancia estratégica en la industria. En la actualidad, el Ti es el cuarto elemento más abundante en la superficie terrestre, esto lo hace un metal fácilmente disponible para la confeccionar aleaciones [20].

Es un elemento de transición que presenta una estructura electrónica con una capa d incompleta, formando soluciones sólidas con elementos sustitucionales<sup>1</sup>, con un factor de tamaño atómico hasta de un 20% [21].

El titanio metálico puro es de color blanco y lustroso, que presenta una excelente resistencia a la corrosión, soportando el ataque de ácidos inorgánicos, de la mayoría de los orgánicos y cloruros.

Sin embargo, el Ti reacciona muy rápido en contacto con oxígeno, nitrógeno, hidrógeno y carbono, cuya respuesta se acrecienta exponencialmente al aumentar la temperatura. A una temperatura superior a 700 [°C] los gases llegan a difundirse en la red cristalina del Ti.

Entre otras propiedades destacables del Ti se encuentran: su alto punto de fusión, elevada dureza, bajo coeficiente de conductividad y dilatación térmica. En la Tabla 1 muestran algunas propiedades mecánicas y físicas del titanio puro[22-23].

Tabla 1. Propiedades mecánicas y físicas del titanio puro [24].

| Propiedad                 | Valor                  | Unidad                          |
|---------------------------|------------------------|---------------------------------|
| Densidad                  | 4,51                   | [g/cm <sup>3</sup> ]            |
| Temperatura fusión        | 1660                   | [°C]                            |
| Calor específico          | 519                    | [Cal/g]                         |
| Conductividad térmica     | ~9                     | [Btu ft <sup>2</sup> / ft h °F] |
| Expansión térmica         | ~3                     | [µm/m °C]                       |
| Susceptibilidad magnética | 3,17                   | [Emu/g]                         |
| Modulo tensión            | ~101 · 10 <sup>3</sup> | [MPa]                           |
| Módulo compresión         | ~103 · 10 <sup>3</sup> | [MPa]                           |

---

<sup>1</sup> Elemento sustitucionales: Acción que ocurre cuando átomo con mayor tamaño sustituye a un átomo original cuando su punto de la red cristalina.

**i) Estructura cristalina titanio**

El titanio es el único metal ligero que presenta dimorfismo, y en estado puro presenta una transformación alotrópica a 882 [°C] cambiando de una estructura cristalina hexagonal compacta, que presenta una fase  $\alpha$  a una estructura centrada en el cuerpo que presenta una fase  $\beta$ . En la Figura 2 se observan ambas estructuras cristalinas:

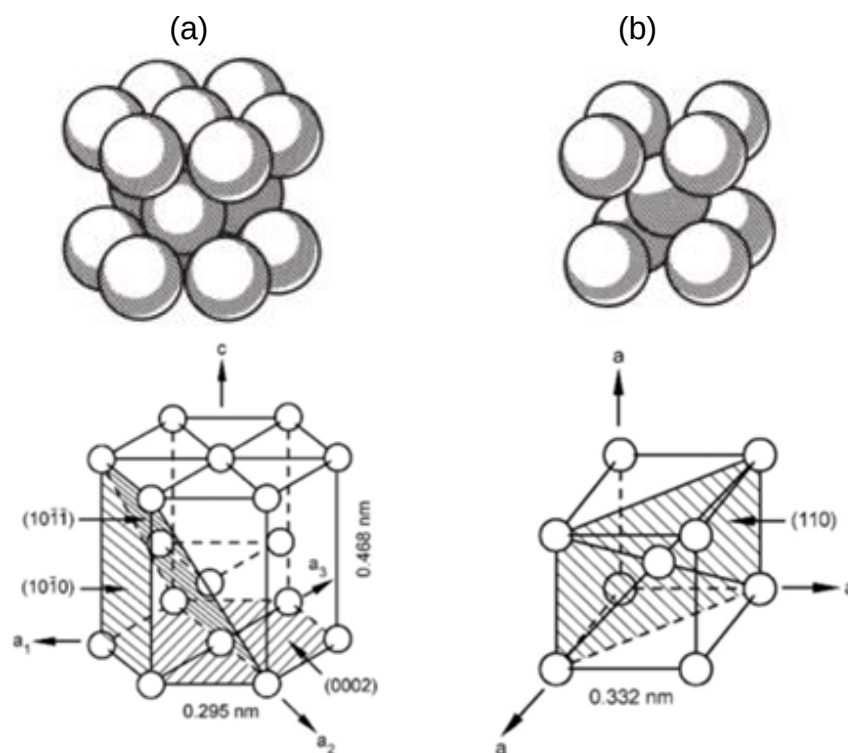


Figura 2. Estructura cristalina del titanio: (a) titanio  $\alpha$ : estructura hexagonal compacta, (b) titanio  $\beta$ ; estructura cúbica centrada en el cuerpo [24].

Este cambio de estructura permite que el Ti presente una transformación reversible, además de generar las posibles transformaciones del tipo  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\alpha+\beta$ , dependiendo de los elementos aleantes que estabilizan una u otra fase [24].

Los elementos aleantes generan un cambio en la temperatura de transformación alotrópica y se clasifican en tres grupos (ver Figura 3): i)  $\alpha$ -estabilizadores (Al, O, N, C) incrementan la temperatura de transformación, ii)  $\beta$ -estabilizadores permiten que sea estable a temperaturas menores de la temperatura de transformación y se subdividen en dos grupos  $\beta$  isomorfos (V, Mo, Nb, Ta) y  $\beta$  eutectoides (Fe, Mn, Cr, Ni, Cu, Si) y iii) neutralizadores (Zr, Sn) [14]. En la Figura 3 se puede apreciar el efecto de las aleaciones en el diagrama de fases del titanio.

El estaño es un elemento neutro (ver Figura 3 (a)), pero en ciertas adiciones de Sn produce endurecimiento por solución sólida sin afectar la temperatura de transformación [25].

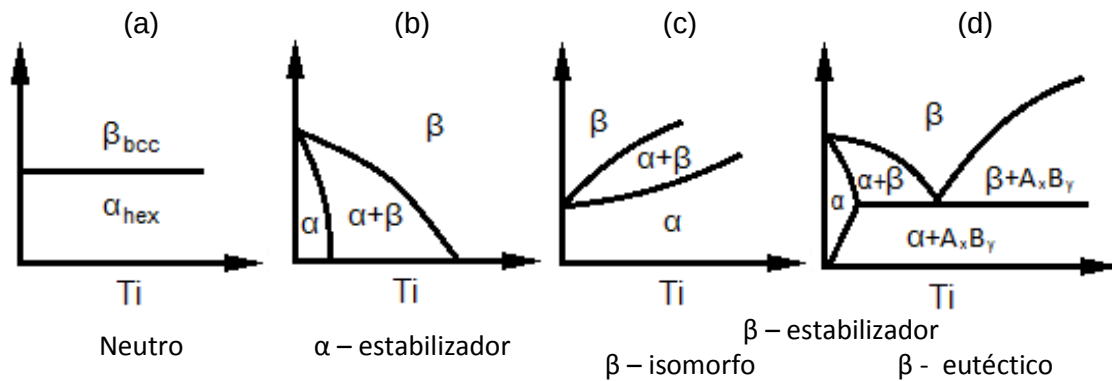


Figura 3. Efecto de los elementos de aleación en el diagrama de fases del titanio: (a) estabilizador  $\alpha$ , (b) estabilizador  $\beta$  isomorfo y (c) estabilizador  $\beta$  eutéctico [3,14].

Las aleaciones de titanio tipo  $\alpha$  son utilizadas para aplicaciones a temperaturas elevadas y criogénicas, estas no son sensibles a tratamientos térmicos por lo que se utiliza en combinación de trabajo en frío y enfriamiento para modificar sus propiedades. Esta fase en comparación a las del tipo  $\alpha$  y  $\alpha+\beta$  presenta una mayor resistencia a la fluencia en caliente, como también un menor límite elástico y resistencia a la tracción como se observa en la Tabla 2. Las aleaciones del tipo  $\alpha+\beta$  generalmente poseen una buena capacidad de fabricación, una alta resistencia a temperatura ambiente y una resistencia moderada a temperatura elevadas. Por ende las propiedades pueden controlarse mediante tratamiento térmico, que se utiliza para ajustar los estados microestructurales y precipitaciones del componente  $\beta$  [24].

Finalmente, las aleaciones tipo  $\beta$  se separan en dos grupos; el beta isomorfo consiste en elementos que son miscibles en la fase beta y el tipo beta eutéctico con el titanio con temperaturas eutécticas como máximo de 300 [°C] por debajo de la temperatura de transformación del titanio sin alear.

Las aleaciones  $\beta$  se caracterizan por su elevada capacidad de endurecimiento, alta resistencia a corrosión, alta templabilidad, bajo modulo elástico, alta resistencia a la tracción y límite elástico (ver Tabla 2), pero algunas desventajas en comparación a las del tipo  $\alpha$  son su alta densidad, menor resistencia a la fluencia y menor ductilidad en la condición de envejecimiento [26].

Tabla 2. Propiedades mecánicas según la fase predominante en la aleación de titanio [26].

| Material                | Resistencia a la tracción [MPa] | Límite elástico [MPa] | Alargamiento % |
|-------------------------|---------------------------------|-----------------------|----------------|
| Ti puro                 | 241-552                         | 172-483               | 15-24          |
| Fase Ti- $\alpha$       | 862                             | 779                   | 15             |
| Fase Ti- $\beta$        | 1290                            | 1214                  | 5              |
| Fase Ti- $\alpha+\beta$ | 966-1103                        | 862-1034              | 8-15           |

Se observa en la Figura 3 la isoterma experimental del sistema ternario Ti-Ta-Sn a 900 [°C], la línea continua se ajusta con las condiciones y la línea punteada se deduce de la extrapolación termodinámica de los sistema binario de estos elementos.

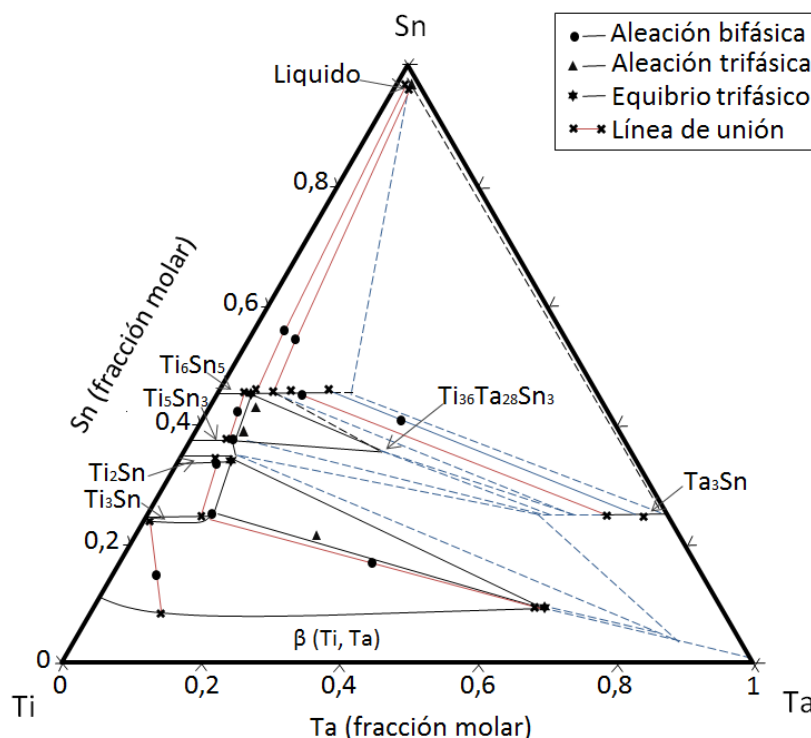


Figura 4. Sección isoterma experimental del sistema ternario Ti-Ta-Sn a 900 [°C], adaptado de [26].

Existen ocho regiones monofásicas y siete regiones trifásicas en la isoterma de Ti-Ta-Sn, el compuesto ternario  $Ti_{36}Ta_{28}Sn_{36}$  y las dos regiones trifásicas:  $\beta-Ti_6Sn_5 + Ti_{36}Ta_{28}Sn_{36} + Ta_3Sn$  y  $Ti_2Sn + Ti_3Sn + \beta (Ti, Ta)$  (% atómico), se detectaron experimentalmente. Las fases estables en el sistema ternario son:  $\beta (Ti, Ta)$ ,  $Ti_3Sn$ ,  $Ti_2Sn$ ,  $Ti_5Sn_3$ ,  $\beta-Ti_6Sn_5$ ,  $Ti_{36}Ta_{28}Sn_{36}$  y líquido (Sn).

Los compuestos  $Ti_3Sn$ ,  $Ti_2Sn$ ,  $Ti_5Sn_3$  y  $\beta-Ti_6Sn_5$  se extienden a lo largo de la concentración iso de Sn. Este resultado indica que el Ti se reemplaza por Ta en los cuatro compuestos de Ti-Sn y que el Ta se reemplaza por Ti en  $Ti_3Sn$ .

En la Tabla 3 se presentan las solubilidades del Ta y Sn en las fases estables presentes en el sistema ternario a 900 [°C]. Se presenta la solubilidad máxima del Ta en la fase líquida a 2,1% (% atómico), cuyo valor disminuye a 900 [°C] debido a la alta temperatura de fusión de este elemento. En el caso del Sn, presenta una mayor solubilidad sólida en  $\beta (Ti, Ta)$  del orden de 21,2% (% atómico) y finalmente la fase líquida existe principalmente en la esquina rica en Sn.

Tabla 3. Solubilidad del titanio (Ti) y tántalo (Ta) en fases estables del sistema ternario Ti-Ta-Sn a 900 [°C] [27].

| Elemento<br>(% atómico) | $\beta (Ti, Ta)$ | $\beta-Ti$ | $\beta-Ta$  | $\beta-Ti_6Sn_5$ | $\beta-Ti_3Sn$ | $\beta-Ti_5Sn_3$ | $\beta-Ti_2Sn$ | $\beta-Ta_3Sn$ | Líquido    |
|-------------------------|------------------|------------|-------------|------------------|----------------|------------------|----------------|----------------|------------|
| Ta                      | -                | -          | -           | $\geq 15,5$      | $\leq 9,3$     | $\leq 5,9$       | $\geq 7,3$     | $\geq 8,8$     | $\leq 2,1$ |
| Sn                      | $\leq 21,2$      | 0-11       | $\approx 0$ | -                | -              | -                | -              | -              | 98,9-100   |

## ii) *Espumas metálicas*

Las espumas metálicas son sólidos celulares artificiales que emulan microestructuras relativamente comunes en la naturaleza, es decir, son materiales porosos que presentan una relevante combinación de propiedades físicas y mecánicas, como la alta rigidez junto con un peso específico muy bajo [27][28].

Los poros de las espumas pueden ser cerrados o abiertos, en ambos casos tienen diferentes beneficios, en el caso que presenten poros abiertos permiten la disipación de calor y sirven de filtros o catalizadores, en cambio los materiales con poros cerrados presentan gran rigidez y aislamiento acústico [29].

Al variar la porosidad algunas propiedades del material cambian, la variable más estudiado corresponde al módulo de Young, el cual tiene un crecimiento inversamente proporcional, es decir, al aumentar la porosidad el módulo de Young disminuye como se puede apreciar en la Figura 5 [30-31]. Por lo tanto, el aumento de porosidad nos ayuda a combatir la problemática del apantallamiento de tensiones generando que este disminuya o se elimine [32-33].

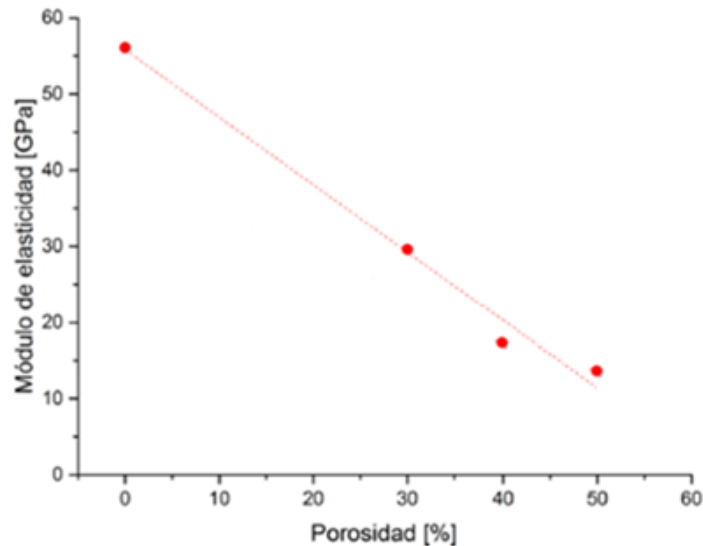


Figura 5. Efecto de la porosidad en el módulo de elasticidad [GPa] de la aleación Ti-Ta-12% at [31].

### 2.3 Huesos

El cuerpo humano está formado por 206 huesos, los que se encuentran sometidos a diferentes cargas y múltiples tipos de esfuerzos, estos se clasifican en tres grandes grupos [34-35]:

- i) Huesos largos: Son aquellos de mayor longitud, que corresponde a los huesos de los brazos y piernas, es decir, extremidades.
- ii) Huesos cortos: Son los huesos de las muñecas, manos, pies y vertebras.
- iii) Huesos planos: los representan a su vez, aquellos huesos que conforman la estructura ósea de la cabeza y la zona torácica del cuerpo humano.

Además los huesos del cuerpo humano son sometidos a múltiples tipos de esfuerzos, tales como i) compresión: por la acción de los músculos, la gravedad y cargas externas, necesarias para el crecimiento y depósito de material óseo, ii) tracción: producto a la acción de los tendones en la contracción muscular, iii) flexión: debido a la falla del lado convexo por aumentó de las fuerzas de tracción, cizallamiento y torsión.

Los diferentes huesos necesitan soportar diferentes cargas, por lo que existe una gran variación en los valores de resistencia a la tracción, compresión, doblado y torsión. A continuación, se presentan las propiedades mecánicas del hueso en relación a la edad de la persona (ver Figura 6) [34 - 36].

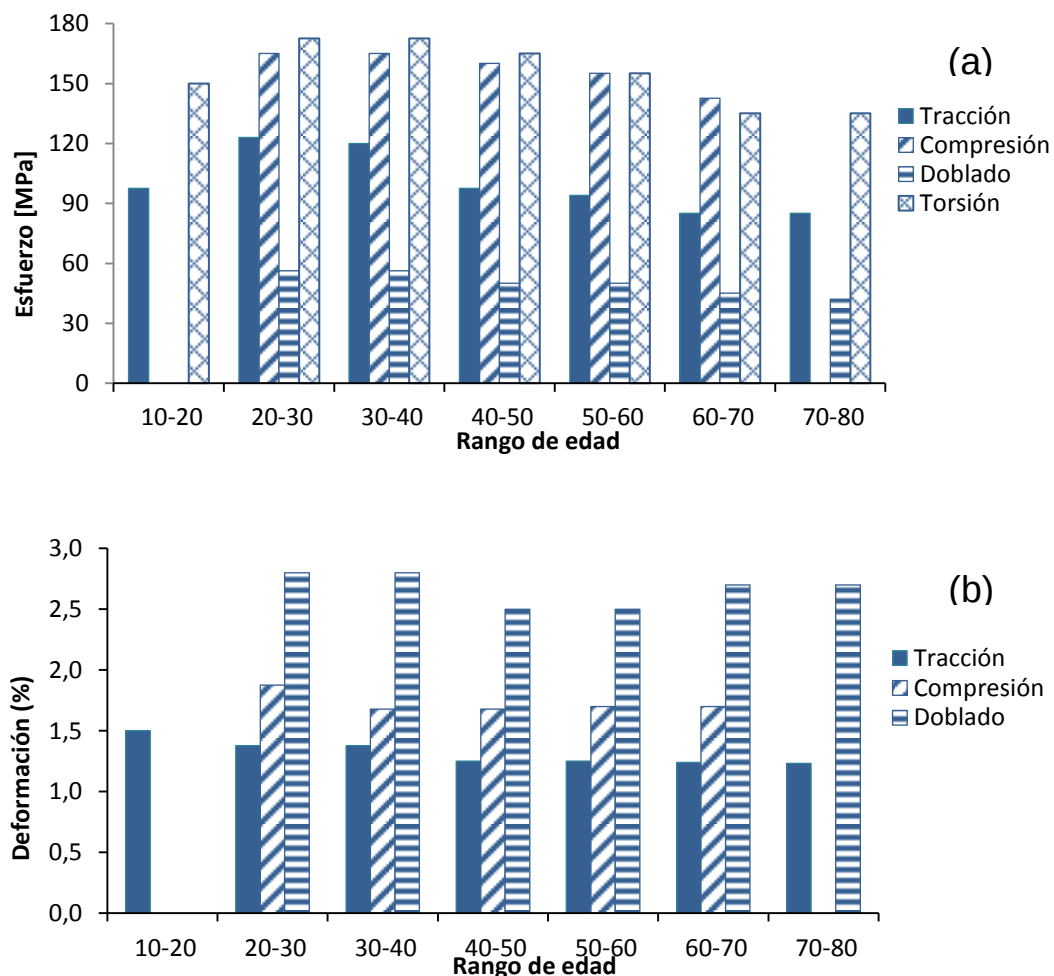


Figura 6. Resistencia mecánica del hueso cortical para distintas edades (a) último esfuerzo (b) última deformación [36].

Como se mencionó anteriormente y como se observa en la Figura 6, las propiedades mecánicas de los huesos están sujetas al tipo de ensayo que se aplique, ya que el hueso presenta anisotropía, es decir, las propiedades varían de acuerdo a la dirección en que se esté realizando el ensayo [37].

Además, los huesos no son compactos, es decir, presentan porosidad, por lo que se puede clasificar según su densidad: i) compactos o corticales; ii) esponjosos [34]. Estudios anteriores han demostrado que existe relación entre las propiedades mecánicas y la porosidad, por ejemplo el modulo elástico presenta una relación inversamente proporcional con la porosidad del hueso.

Cabe destacar que el esfuerzo al que el hueso puede fracturarse es muy variable, normalmente se produce la rotura antes del esfuerzo máximo, esto debido a la existencia de microfracturas que producen un deslizamiento a nivel microestructural facilitando la fractura a menor carga. A su vez, la fractura del hueso se encuentra directamente ligada al tiempo de carga, es decir, si este se aplica con un alto impacto, el esfuerzo para alcanzar la fractura será menor en comparación si este esfuerzo se aplicara en un mayor tiempo, como se aprecia en la Figura 7. El esfuerzo de rotura en un ensayo de compresión varía entre 0,8 y 1 [MPa] [38].

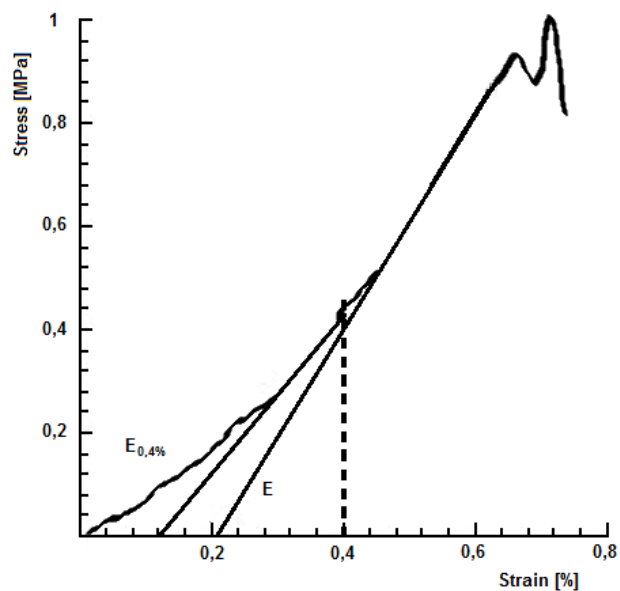


Figura 7. Curva esfuerzo vs deformación de un ensayo de compresión llegando a la fractura [38].

## 2.5 Biocompatibilidad

El estudio de la biocompatibilidad se entiende como la descripción y caracterización de una respuesta reproducible por parte del tejido biológico relativo a los materiales diseñados para actuar interfacialmente con sistemas biológicos con la finalidad de evaluar, tratar, aumentar o sustituir algún tejido, órgano o función del cuerpo [39].

A partir del desarrollo de los biomateriales, es posible definir cuatro fases o tipos de materiales según la respuesta del organismo [39-40]:

1. Inerte: materiales implantes que generan poco o ninguna respuesta.
2. Interactivos: materiales implantables que están diseñados para generar una respuesta específica y beneficiosa.
3. Viable: materiales implantables, posiblemente con incorporación de células vivas, que son tratados por organismo como tejido normal y son reabsorbidos o remodelados raras veces.
4. Replante: materiales implantable consistentes de tejido nativo, desarrollo in vitro a partir de celular previamente obtenidas del paciente.

Es importante conocer si los elementos presente para la fabricación del biomaterial son cancerígeno, mutagénico, genotóxico, citotóxico, alergénico, y si resiste el entorno biológico corrosivo. En la Tabla 4 se presenta un resumen del impacto biológico de los elementos utilizados en éste estudio.

Tabla 4. Impacto biológico en el cuerpo humano de los elementos utilizados en este estudio [40].

| Elemento | Bio-compatibilidad | Cancerígeno | Genotóxico | Citotóxico | Alergénico | Propenso a corrosión |
|----------|--------------------|-------------|------------|------------|------------|----------------------|
| Ti       | Si                 | No          | No         | Mediano    | No         | No                   |
| Ta       | Si                 | No          | No         | Bajo       | No         | No                   |
| Sn       | Si                 | No          | No         | Bajo       | No         | No                   |

### i) **Propiedad antibacteriana**

En la actualidad, la prevención de las potenciales infecciones asociadas al procedimiento clínico en las cirugías de implante, que se puede realizar de dos formas: i) implante-fármaco antibacteriano y ii) implantes confeccionados por biomateriales con propiedades antibacterianas. Dentro de este segundo grupo se centra el trabajo a realizar.

Las interacciones de un biomaterial con los componentes de la sangre conducen a la alteración de mecanismos fisiopatológicos asociados al proceso clínico tratado [41]. En particular, la respuesta y la inflamación que se origina a consecuencia del material implando favorecen la intensidad de esta interacciones e incrementa la probabilidad de colonización bacteriana y la formación de un biopeícula, lo que deriva en el establecimiento de la infección [42].

Un estudio previo afirma que las aleaciones Ti-Cu exhiben propiedades antibacterianas en contacto con las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escheriachia coli*, dado el aumentó de la fracción de área de  $Ti_2Cu$  donde se liberan más iones para comprometer el crecimiento bacteriano y la morfología de la fase  $\beta$ . En la Figura 8, se aprecia que la fatalidad de las bacterias parece ser proporcional a la adición de cobre. Este metal es un elemento estabilizador de la fase  $\beta$ , por lo que existe una relación directamente proporcional entre las propiedades antibacteriana de la aleación y la fase beta [43].

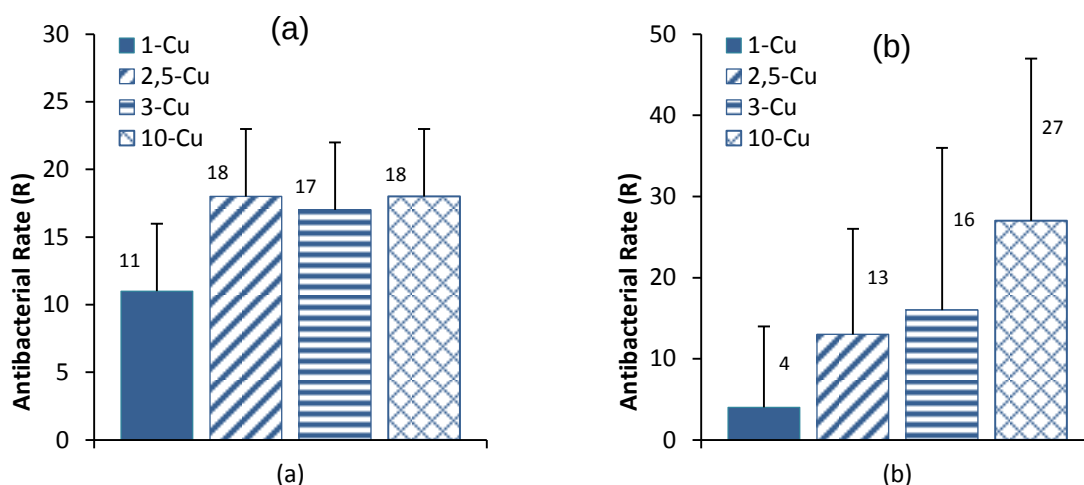


Figura 8. Tasa antibacteriana (R): (a) después de 2 horas y (b) después de 6 horas para las aleaciones de Ti-Cu [43].

En la Figura 8 se presentan los resultados de las aleaciones base Ti con adición de cobre de 1, 2,5, 3 y 10 % (% atómico), para dos tiempos de crecimiento bacteriano: 2 y 6 [h]. Este estudio considero como control las probetas de Cu puro, dicho de otra manera, la respuesta antibacteriana de esta probeta es el 100%.

Las aleaciones Ti-Cu en contacto con el cultivo bacteriano durante 2 [h], no presenta diferencia estadística significativa. Por el contrario, las probetas que estuvieron en contacto durante 6 [h], presentan una relación directamente proporcional entre la respuesta antibacteriana y la adición de Cu [43].

Se establece que la fatalidad de las bacterias de este estudio puede aumentar hasta un 90% después de un periodo de 24 [h] (ver Figura 9), pero esto se puede atribuir a la falta de alimento producto de la delicadeza y sensibilidad del procedimiento de agregar un medio adicional intermitente [44].

## ***ii) Rutas de infección***

La principal ruta de infección es el cultivo intraoperatorio positivo (CIOP) que son originadas por la contaminación del implante antes o durante el proceso quirúrgico, por exposición del implante y/o del lugar de su alojamiento a las bacterias ambientales y a las portadas por los profesionales sanitarios [42, 45-46].

La segunda ruta de infección es la que se genera durante el periodo de hospitalización postoperatorio, es causada por la contaminación directa de las heridas abiertas, o bien el uso de dispositivos invasivos como tubos de perfusión, catéteres o drenajes[42, 45-46].

La tercera ruta posible es la de infecciones derivadas por la propagación hematógena de bacterias desde otras partes del cuerpo con infección al biomaterial implantado [42, 45-46].

A su vez las infecciones posquirúrgicas precoces (IPP) aparecen con menor frecuencia. Este tipo de infecciones aparecen dentro del primer mes posterior a la intervención quirúrgica, estas se manifiestan con celulitis local, dolor y fiebre. Las infecciones protésicas tardía (PT) aparecen luego del segundo mes de la implantación y puede manifestarse incluso años después del procedimiento. Éstas son detectadas por los síntomas: un alto dolor, aparición de un trayeco fistuloso y puede estar ausente la inflamación.

La última ruta de infección consiste en la infección hematógeno aguda (IHA) que se puede presentar en cualquier momento, apareciendo de forma brusca la fiebre, dolor y elementos fluxivos locales [46].

### ***iii) Formación de la biopelícula***

Al momento de ponerse en contacto las bacterias con los biomateriales, se inicia la formación de la biopelícula. Esta inicia con la fase de adherencia primaria (fase reversible o inespecífica), en donde los microorganismos se acercan y sitúan sobre la superficie del biomaterial, como se observa en la Figura 9. Las bacterias Gram negativo presentan flagelos, ayudando a que las bacterias se aproximen al implante, pero este desplazamiento es contrarrestado con posibles repulsivas

La segunda fase se llama irreversible o específica (ver Figura 9), las bacterias comienzan a producir adhesinas<sup>2</sup>, generando los procesos de adherencia intercelular que consolidan la biopelícula, llamada fase de acumulación [47].

Finalmente, cuando las bacterias se adhieren al implante, estas comienzan a multiplicarse y se acumulan como un conglomerado de células en múltiples capas (ver Figura 9), generando componentes extracelulares que interaccionan con las moléculas orgánicas e inorgánicas para la formación de una matriz extracelular, llamada glicocálix o slime. Esta matriz corresponde al 85% de la biopelícula y mantiene unidas a las células, ayudando a atrapar y retener nutrientes para el crecimiento de la biopelícula y protegiendo a las células de la deshidrataciones y de la acción de los antimicrobianos [48].

---

<sup>2</sup> Adhesinas: Proteínas de superficie implicadas en la interacción permanente de la película precursora de proteínas absorbidas.

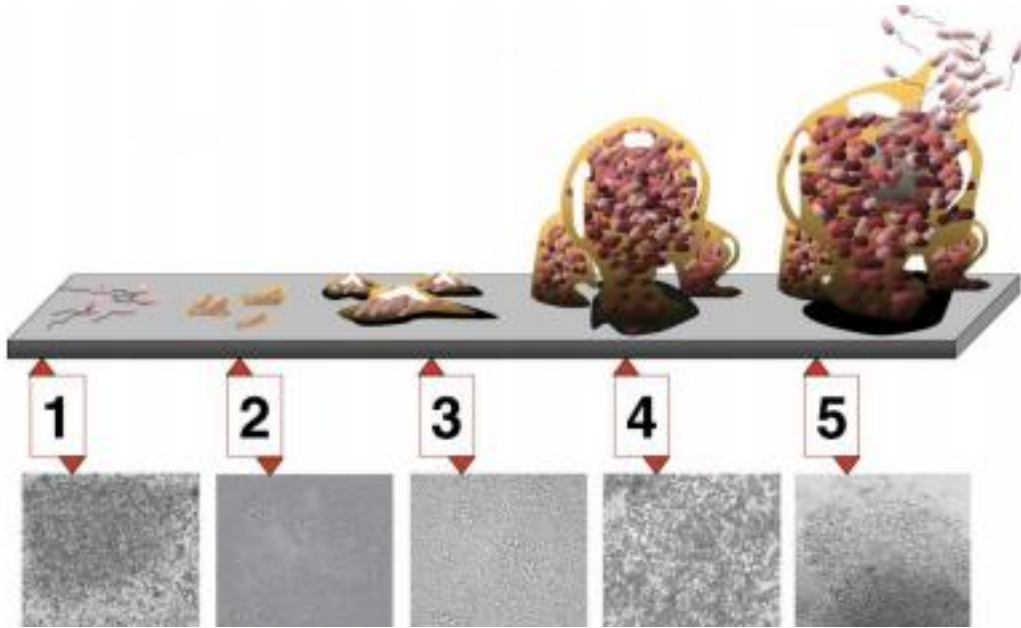


Figura 9. Etapas de un proceso de formación de una biopelícula 1. Adherencia primaria o inespecífica; 2 Adherencia secundaria o específica; 3 y 4 fase de acumulación y 5 fases de separación [48].

#### iv) **Cepas bacterianas**

La cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* fue descrita por primera vez en 1880 por el cirujano Alexander Ogston en Escocia, pero en Chile hay referencia de esta cepa desde el año 1967. Recién en la década del 80 comenzó adquirir relevancia, causando entre un 14 y 32% de las infecciones intrahospitalarias. El incremento de las prevalencia de STAU implica un serio problema terapéutico en el ambiente hospitalario, ya que estos organismos con sus amplios patrones de resistencia. La variabilidad de STAU debido su rápida respuesta adaptativa frente a cambios del medio y su continua adaptación a los antibióticos, han hecho de este un residente habitual del hábitat hospitalario [49].

La *Staphylococcus aureus* es anaerobias, Gram positiva, productora de enterotoxinas termoestables, formadora de toxinas más resistentes y puede sobrevivir durante largos periodos de tiempo en un ambiente seco, son muy persistentes en alimentos con contenido alto en sales y azúcares [50]. La bacteria STAU son adaptables y se desarrollan en un amplio rango de temperatura (10 - 48 [°C]), pH (4 - 9,6 [-]) y actividad del agua (0,85 - 0,99 8[-]) [51].

La pared celular (ver Figura 10) está compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano, este se trata de un polímero polisacárido compuesto por cadenas con uniones de tipo  $\beta$  no ramificadas, que contienen subunidades alternantes de ácido N-acetil muránico y N-acetil glucosamina. La función del polímero es mantener rigidez de la pared bacteriana y su resistencia osmótica. El otro componente mayor de la pared son los ácidos teicoicos, estos son polímeros de glicerol o ribitol fosfato, azúcares y algunas veces D-alanina [52].

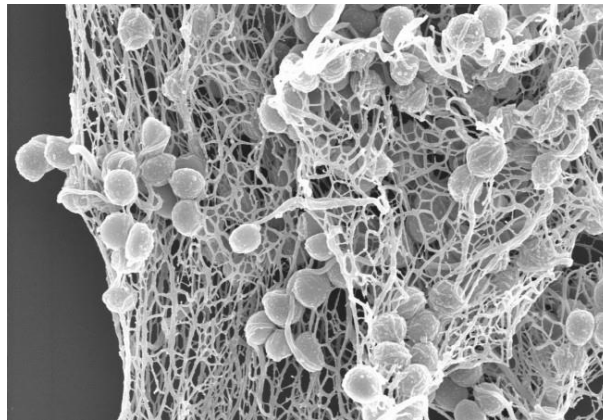


Figura 10. Cepa *Staphylococcus aureus* incubada en plasma humano en presencia de Efb (proteína de unión a fibrinógeno extracelular). Ensayo MED aumentó 10.000x [53]

La *Escherichia coli* es una bacteria patógeno, anaeróbica facultativa, Gram negativo, perteneciente a la familia enterobacteriaceae, estas son móviles por flagelos peritricos, no esporuladas, fermentan la glucosa y la lactosa son catalasa positivas, oxidasa negativo y reduce nitratos a nitritos. Estas bacterias se multiplican a temperaturas entre 6 y 50 [°C], con una temperatura óptima de 37 [°C] [54-56].

La cepa COLI coloniza el intestino del ser humano en pocas horas, luego del nacimiento y es considerado un microorganismo de flora normal, es decir, se encuentra de forma natural en nuestros intestinos y además desempeña un rol importante en ayudar al sistema digestivo, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos [56-57].

Las células de *E. coli* son bacilos con un largo de 4 [μm], un ancho de 0,5 [μm] y una superficie que presenta fimbrias, las cuales les permiten adherirse a las

paredes adyacentes como se aprecia en la Figura 11. Además estas presentan entrecruzamiento en el peptidogluano generando un enlace directo, compuesto por dos aminoazúcares: N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, mientras que el esqueleto del polímero está formado por residuos alternantes de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico [58-59].

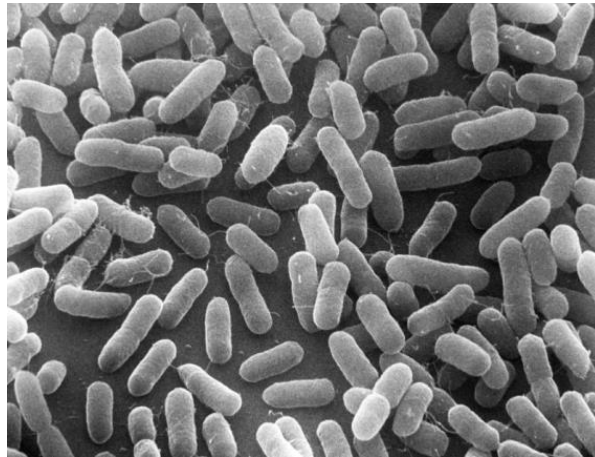


Figura 11. Ceba *Escherichia coli* - Ensayo MED 24.000x [58].

### Capítulo 3: Metodología experimental

En este capítulo se explicará el procedimiento experimental llevado a cabo para obtener las espumas de la aleación Ti-Ta-Sn, detallando los equipos, materiales e insumos que se utilizaron.

#### 3.1 Materiales e insumos

##### a) *Polvos metálicos*

Se utilizaron como materia prima los polvos metálicos de titanio (Ti), tantalio (Ta) y estaño (Sn) comercialmente puro, cuyas características se aprecian en la Tabla 5.

Tabla 5. Características polvos metálicos.

| Característica | Titanio        | Tántalo       | Estaño        |
|----------------|----------------|---------------|---------------|
| Marca          | NAOH Tech. Co. | Sigma-Aldrich | Sigma-Aldrich |
| Pureza         | 99,5%          | 99,9%         | 99,5%         |
| Tamaño         | -149 [µm]      | -44 [µm]      | <150 [µm]     |

##### b) *Agente controlador del proceso*

Se utilizó el ácido esteárico ( $C_{18}H_{35}O_2$ ) como agente controlador. Este ácido es del tipo graso saturado y posee una temperatura de fusión de 342 [K], dada esta temperatura se garantiza la sublimación completa durante el proceso de sinterización. En la Tabla 6 se presentan las características del ácido esteárico utilizado.

Tabla 6. Especificación ácido esteárico.

| Ácido esteárico |                                       |
|-----------------|---------------------------------------|
| Marca           | G.A. Insumos y Equipos de Laboratorio |
| Pureza          | 97%                                   |

### **c) Gas argón**

El gas inerte utilizado es el argón (Ar) ultra puro, suministrado por la empresa LINDE, en la Tabla 7 se presenta la composición de este gas según la ficha técnica del proveedor. El Ar se utilizó en la cámara de guantes y el equipo Hot Pressing, para evitar la oxidación de los polvos metálicos.

Tabla 7. Especificación gas Argón.

| Impurezas        | Especificación [ppm] |
|------------------|----------------------|
| O <sub>2</sub>   | < 3                  |
| N <sub>2</sub>   | < 5                  |
| CH <sub>4</sub>  | < 0,2                |
| H <sub>2</sub> O | < 3                  |
| CO <sub>2</sub>  | < 0,3                |

### **d) Medios de molienda**

Las bolas utilizadas durante el aleado mecánico, son de óxidos de circonio estabilizadas con Ltria (YSZ) altamente pulido, suministradas por la empresa ACROSS INTERNATIONAL. En la Tabla 10 se aprecian las características de los medios de molienda.

Se utilizaron bolas con un diámetro promedio de 5 [mm] y 10 [mm], en una relación de bolas 1:1 p/p y una relación bolas/polvo de 10:1 p/p.

Tabla 8. Características de los medios de molienda.

| Parámetro                      | Valor   | Unidad               |
|--------------------------------|---------|----------------------|
| Densidad aparente              | 5,95    | [g/cm <sup>3</sup> ] |
| Zr(Hf)O <sub>2</sub>           | 94,48   | %                    |
| Y <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  | 5,15    | %                    |
| TiO <sub>2</sub>               | 0,0018  | %                    |
| P                              | < 0,035 | %                    |
| SiO <sub>2</sub>               | 0,007   | %                    |
| Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 0,0009  | %                    |
| S                              | < 0,03  | %                    |
| N                              | < 2,78  | %                    |

#### **e) Recipientes**

Los recipientes de molienda son de óxidos de circonio YSZ ( $\text{ZrO}_2$  estabilizado con itria). Se utilizó este tipo de recipiente ya que son compuesto por elementos biocompatibles (ver Tabla 8). Estos fueron fabricados por la empresa Across International, en las Tabla 8 y Tabla 9 se presenta el detalle técnico de estos recipientes.

Tabla 9. Características técnico recipientes de molienda.

| Característica técnicas |                          |
|-------------------------|--------------------------|
| Molino compatible       | PQ-N2, PQ-N4             |
| Diámetro externo        | 106 [mm]                 |
| Diámetro interno        | 90 [mm]                  |
| Altura total            | 105 [mm]                 |
| Profundidad             | 87 [mm]                  |
| Peso                    | 5,5 [lb]                 |
| T máx. operación        | 320 [°C]                 |
| Dureza Rockwell         | > 89 HRA                 |
| Densidad                | 5,5 [g/cm <sup>3</sup> ] |

#### **f) Material espaciador (space holder)**

Se utilizó la sal de cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ) como espaciador, fabricada en India y distribuida por la empresa G.A. Ventas. El análisis químico de la sal utilizada se aprecia en la Tabla 10, según ficha técnica entregada por el proveedor.

La ventaja principal que posee este espaciador es que no reacciona con titanio durante el proceso y se elimina por el aporte de calor durante el tratamiento térmico.

Tabla 10. Análisis químico del cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ).

|                           |                 |
|---------------------------|-----------------|
| Yodo                      | $\leq 0,002 \%$ |
| Bromo                     | $\leq 0,01 \%$  |
| Clorato y nitrato         | $\leq 0,003 \%$ |
| Fosfato ( $\text{PO}_4$ ) | $\leq 5$ [ppm]  |
| Sulfato ( $\text{SO}_4$ ) | $\leq 0,004 \%$ |
| Metales pesados           | $\leq 5$ [ppm]  |
| Hierro                    | $\leq 2$ [ppm]  |

#### g) Matriz

Durante el proceso de compactación se utilizó la matriz y punzones de acero endurecido (ver Figura 12 (a)). Esta matriz encamisa los polvos metálicos y el agente espaciador, para ser compactado por el punzón superior que posee un diámetro de 8 [mm].

En el caso del proceso de sinterización se utiliza una matriz y punzones de grafito de igual diámetro (ver Figura 12 (b)).

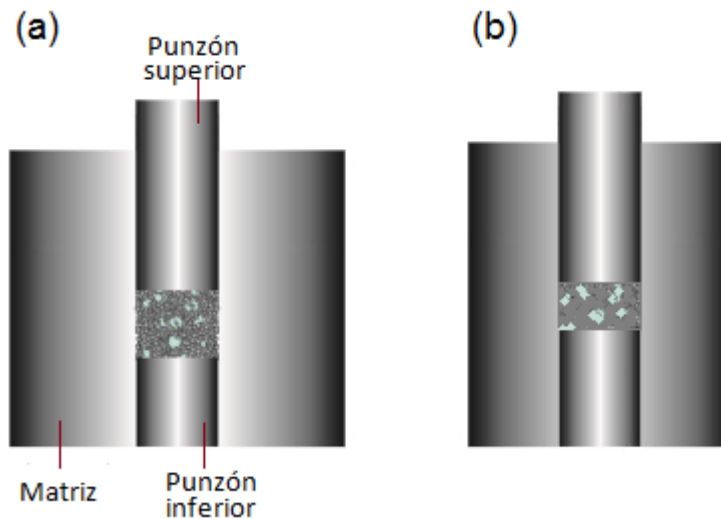


Figura 12 Esquema en corte de la matriz y punzones utilizada en el proceso de (a) compactación (b) sinterización.

#### h) Cepa modelo de las bacterias

Se utilizaron las cepas modelos de las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, la primera de ellas es un patógeno que presenta una alta tasa de infección en los humanos y animales, conformada por cocos Gram positivos. Esta bacteria son no esporuladas, no móviles, no poseen capsula, aunque existe algunas cepas que desarrollan una capsula de limo, son anaeróbicas facultativas y la mayoría produce catalasa [59]. La segunda bacteria, es decir, *Escherichia coli* es del tipo Gram negativo, móvil debido a la presencia de un flagelo polar, aerobio, catalasa positivo y oxidasa positivo[60].

### **i) Medio de cultivo**

El material alimenticio para que los microorganismo crezcan bajo condiciones de laboratorio se llama medio de cultivo, el cual puede ser líquido, sólido y semi sólido.

Para el trabajo en el laboratorio se utilizó un medio de cultivo artificial con las condiciones para generar un ambiente adecuado para el crecimiento de las bacterias. Estas condiciones son: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno, grado correcto de acidez o alcalinidad [61].

El medio de cultivo debe poseer los nutrientes adecuados y estos deben estar esterilizados. En la Tabla 11 se presentan los compuestos presentes en el medio de cultivo utilizado.

Tabla 11. Composición medio de cultivo.

| Compuesto            | Masa [g] |
|----------------------|----------|
| Tryptona             | 10       |
| Extracto de levadura | 5        |
| NaCl                 | 10       |
| Agar                 | 0 – 18   |
| Agua                 | 1        |

El agar es un elemento solidificante, que con una adición entre 1-2% p/p genera un medio de cultivo sólido, si se añade entre 0,3-0,7% p/p es considerado medio semisólido o blando y sin agar correspondiente a un medio líquido [61].

### **j) Antibiótico**

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por microorganismos de diversas especies capaces de detener el crecimiento (efecto bacteriostático) o destruir (efecto bactericida) una población microbiana. Estos antibióticos se pueden clasificar según diversos criterios, en este caso se clasifican según la respuesta que presentan al contacto con la bacteria, es decir, la lectura de los halos de inhibición se interpreta como sensible (S), intermedia (I) y resistente (R).

Para realizar las pruebas de sensibilidad se analizaron los efectos de los siguientes antibióticos:

- I. Kanamicina ( $C_{18}H_{36}N_4O_{11}$ ): Antibiótico aminoglucósidos, básico e hidrosoluble, este actúa afectando la síntesis de proteínas [62].
- II. Gentamicina ( $C_{21}H_{43}N_5O_7$ ): Antibiótico aminoglucósidos de amplio espectro, producida por un *Actinomicete micromonospora purpurea* [63].
- III. Estreptomycin ( $C_{21}H_{39}N_7O_{12}$ ): Antibiótico aminoglucósidos derivado de *Streptomyces griseus*, actúa mediante la inhibición de la síntesis proteica a nivel de la subunidad 30S del ribosoma [64].
- IV. Tetraciclina ( $C_{22}H_{24}N_2O_8$ ): Antibiótico de amplio espectro producido por el actinomiceto *Streptomyces griseus*. Este fármaco ejerce un efecto bacteriostático por inhibición de la síntesis de proteínas [65].
- V. Ampicilina ( $C_{16}H_{18}N_3O_4S$ ): Antibiótico betalactámico con efecto bactericida inhibiendo la síntesis y la reparación de la pared bacteriana [66].

### 3.2 Equipos

#### a) *Balanza digital*

La balanza digital marca PCE-Instrument (modelo AB 200-C) (ver Figura 13), presenta una capacidad máxima y mínima de 200 [g] y 10 [mg] respectivamente, con una alta precisión y un tiempo de respuesta menor a 5 [s]. Esta balanza posee una protección contra el viento y amortiguación de las vibraciones, generando la reducción de las fuerzas externas.



Figura 13. Balanza digital [67].

**b) Cámara de guantes**

En interior de la cámara de guantes (ver Figura 14), se añaden los polvos metálicos y bolas a los tarros de molienda, para luego ser cerrados y sellados. Esta genera una atmosfera rica en argón al interior de estos tarros, con el objetivo de evitar la oxidación de los polvos metálicos y mantener un medio inerte en el AM.

Esta cámara fue fabricada por la empresa Plus Labs, Inc. correspondiente a la marca PLAS-LABS y modelo 850-NB, cuyas características se aprecian en la Tabla 12.

Tabla 12. Especificaciones cámara de guantes [68].

| Ítem                                        | Valor                                                                  |
|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Dimensiones<br>(Alto x Ancho x Profundidad) | 25 x 41 x 26 [in] (dim. internas)<br>38 x 55 x 35 [in] (dim. externas) |
| Volumen cámara                              | 489 [L]                                                                |
| Volumen pre-cámara                          | 18,7 [L]                                                               |
| Peso nave                                   | 250 [lb]                                                               |

La cámara de guantes presenta un sistema de abrazaderas para así nivelar y compensar el desgaste natural de los empaques, garantizando una hermeticidad interna. Además presenta una pre-cámara como medida de seguridad, en donde se ingresan previamente los materiales de trabajo y luego se realiza una purga de oxígeno para poder ingresar a la cámara principal.



Figura 14. Cámara de guantes [68].

### c) *Molino planetario*

La principal característica del molino de bolas planetario es el movimiento que efectúa similar al de los planetas del sistema solar, los contenedores se sitúan sobre un disco rotatorio de soporte y además rotan sobre su eje. En el interior de los recipientes, se genera una fuerza centrífuga proveniente del movimiento.

El Molino planetario RETSCH modelo PM400 (ver Figura 15) es resistente y compacto montado sobre ruedas, con cuatro estaciones de molienda para contenedores con un volumen de 12 [mL] a 500 [mL], se utilizada para la reducción de tamaño sin pérdidas de sustancias fibrosas suaves, duras y frágiles, en seco y en suspensión [69]. Las principales especificaciones técnicas se presentan la Tabla 13.



Figura 15. Molino planetario RETSCH modelo PM 400 [69].

Tabla 13. Características técnicas molino planetario RETSCH PM 400 [69].

|                                          |                                                                          |
|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Tamaño material de alimentación          | < 10 [mm]                                                                |
| Tamaño final                             | < 1 [ $\mu$ m]                                                           |
| Dimensiones (alto x ancho x profundidad) | 836 x 1220 x 780                                                         |
| Peso aproximado                          | 285 [Kg]                                                                 |
| Velocidad disco sol                      | 30 – 400 [rpm]                                                           |
| Operación por intervalo                  | Si, con dirección reversa                                                |
| Aplicaciones                             | Pulverizado, mezclado, homogenizado, molienda coloidal y aleado mecánico |

#### **d) Molino mezclador de polvos**

El molino mezclador RETSCH modelo MM 400 (ver Figura 16 (a)) es un aparato de sobremesa compacto, especialmente concebido para la molienda en seco, húmedo y criogénica. Utilizada a su vez para realizar el mezclado y homogenización de los polvos metálicos y NaCl, para obtener una estructura homogénea en las espumas de Ti-Ta-Sn.

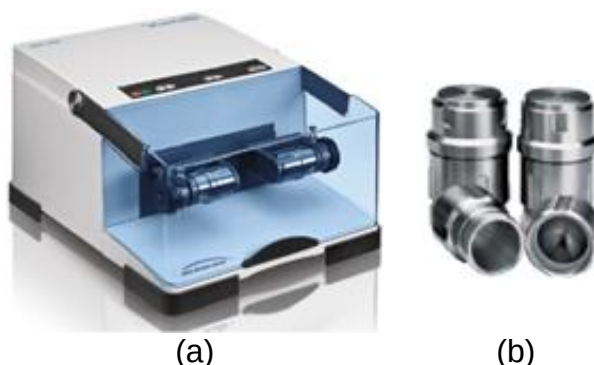


Figura 16. (a) Molino mezclador RESTSCH modelo MM 400 (b) Recipiente de molienda y/o mezclado [70].

Los recipientes de molienda (ver Figura 16 (b)), se encuentran en posición horizontal y realiza un movimiento en forma de arco circular [70]. Una de las ventajas de este equipo, es que no genera un aumentó significativo de la temperatura de los polvos. La mayoría de los materiales se puede triturar y mezclar, sin la necesidad de realizar un proceso enfriado posterior. Las principales especificaciones técnicas se presentan la Tabla 14.

Tabla 14. Características técnicas molino mezclador MM 400 [70].

|                                             |                                                                                         |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Principio de molienda                       | Impacto, fricción                                                                       |
| N° de recipientes                           | 2                                                                                       |
| Ajustes frecuencia de vibración             | Digital, 3-30 [Hz]                                                                      |
| Tiempo de molienda                          | 10 [s] a 99 [min]                                                                       |
| Dimensiones<br>(alto x largo x profundidad) | 371 x 266 x 461 [mm]                                                                    |
| Peso neto                                   | 26 [kg]                                                                                 |
| Aplicación                                  | Reducción de tamaño, mezcla, homogeneización, ruptura de células y molienda criogénica. |

**e) Máquina de ensayo de materiales estática**

La máquina de ensayo de materiales Zwick/Roell modelo Z030 Universal Mechanical Tester (ver Figura 17), está diseñada para realizar ensayos de tracción, compresión, flexión, cizallamiento y torsión. Esta máquina se utilizó en el proceso de compactación y sinterización para comprimir los polvos metálicos y las probetas en verde respectivamente [71]. Las principales especificaciones técnicas se encuentran en la Tabla 15.



Figura 17. Máquina de ensayo de materiales Zwick/Roell modelo Z030 [72].

Tabla 15. Características técnicas Máquina Zwick/Roell modelo Z030 [72].

|                             |               |
|-----------------------------|---------------|
| Carga máxima                | 30 [kN]       |
| Altura máxima               | 1370 [mm]     |
| Ancho máximo                | 440 [mm]      |
| Profundidad máxima          | Infinito [mm] |
| Máx. crosshead-speed        | 300 [mm/min]  |
| Crosshead travel resolution | 1,2 [nm]      |
| Máx. consumo de energía.    | 800 [VA]      |

**f) Equipo Hot pressing**

Para llevar a cabo el proceso de sinterización se utilizó el equipo Hot Pressing (HP), construido por la Universidad Técnica Federico Santa María (UTFSM), el cual se utilizó en conjunto con la máquina de ensayo de materiales Zwick/Roell, para aplicar la carga sobre la probeta.

EL HP posee una resistencia al interior del crisol que se encuentra conectado a una termocupla, para controlar la temperatura del interior del crisol mediante un sistema ON/OFF. A su vez se encuentra conectado a una bomba que recircula agua para regular y/o enfriar las paredes del equipo que se aprecia en la Figura 18.

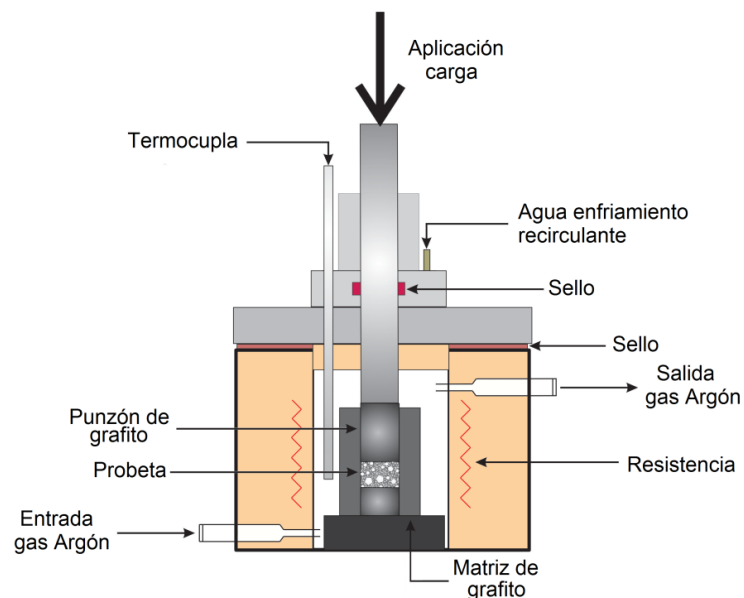


Figura 18. Esquema del equipo Hot Pressing.

**g) Equipo de lijado y pulido**

Para el lijado y pulido de las probetas se utilizó el equipo Metallographic Sample Grinding and Polishin Machine modelo Gp-2-200, este cuenta con una superficie de pulido igual a 200 [mm], una velocidad ajustable de 150 a 300 [rpm] y como se puede ver en la Figura 19 presenta disco dobles.



Figura 19. Equipo Metallographic Sample Grinding and Polishin Machine modelo Gp-2-200 [73].

#### ***h) Incubadoras***

Utilizado para mantener y generar un ambiente adecuado para el crecimiento de los microorganismos, regulando factores de crecimiento viables como la temperatura, humedad y otras condiciones en grado óptimo, entre ellos el monóxido de carbono y oxígeno.

La única diferencia entre la incubadora estática (ver Figura 20 (a)) y la incubadora con agitación orbital (ver Figura 20 (b)), es que esta última puede operar generando giros hasta 300 [rpm] dada la presencia de clamps se puede utilizar a gran velocidad sin problema.



Figura 20. a) Incubadora estática(b) incubadora con agitación orbital [74-75].

**i) Autoclave**

Para trabajar con condiciones esterilizadas todo el material o insumo utilizado en los ensayos experimentales, se ingresó a este equipo previo a su utilización.

El autoclave es un recipiente metálico de paredes gruesas con cierre hermético óptimo para trabajar con vapor de agua a alta presión y una temperatura de 120 [°C], para esterilizar material de laboratorio eliminando completamente virus y bacterias (ver Figura 21).



Figura 21. Autoclave de laboratorio [76].

**j) Campana flujo laminar**

Una cámara con un recinto que emplea un ventilador para forzar el paso de aire a través de un filtro HEPA y proporciona aire limpio a la zona de trabajo libre de partículas y esta además cuenta con una lámpara de rayos ultravioleta (ver Figura 22), montada en el interior con la finalidad de ser estéril.

Para trabajar en condiciones estériles se debe encender la luz UV presente en el interior de la cámara, durante 10 [min] al inicio y final de la operación, además desinfectar con etanol al 70% el interior de esta y todo elemento que ingrese en ella.



Figura 22. Campana flujo laminar vertical [77].

**k) Espectrofotómetro**

El espectrofotómetro UV/Vis Agilent 8453 (ver Figura 23) es un instrumento que mide en función de la longitud de onda, relacionando los valores una misma magnitud fotométrica relativos a dos haces de radiaciones y la concentración que se miden en una muestra.

Este equipo proyecta un haz de luz monocromático con un rango de longitud de onda de 190 a 1100 [nm], con una precisión de 0,5 [nm]. El haz de luz pasa a través del medio de cultivo líquido bacteriano y mide la cantidad de luz que es absorbida por la muestra, indicando la cantidad de la sustancia que nos interesa está presente [78].



Figura 23. Espectrofotómetro Agilent 8453 [78].

### 3.2 Procedimiento experimental

El procedimiento experimental que se realizó el presente trabajo se puede apreciar en la Figura 24.

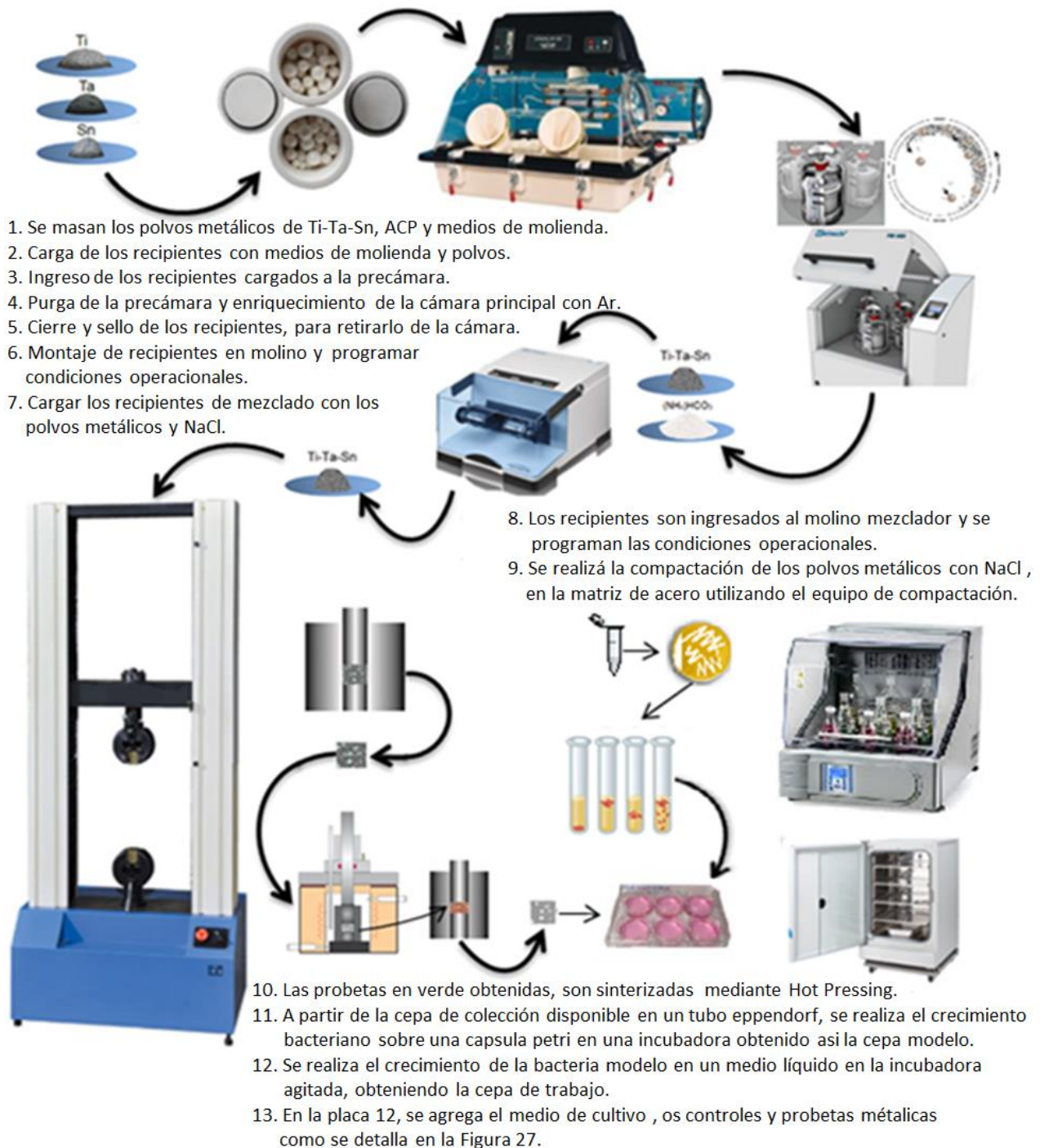


Figura 24. Esquema general del procedimiento experimental.

### **a) Preparación de los polvos metálicos**

Se calculó la masa teórica (ver Tabla 16), que se debe añadir para generar una probeta cilíndrica con un diámetro y alto de 8 [mm] y 3 [mm] respectivamente, con una porosidad teórica de 50% v/v, la cual se forma con la adición del espaciador NaCl.

Los polvos metálicos de cada aleación, son masados en báscula PCE-ABZ 200C. De igual forma, se masa el material espaciador cuyo valor es de 0,163 [g] para cada probeta metálica.

Además se masa los medios de molienda y el agente controlador del proceso, correspondiente al ácido esteárico ( $C_{18}H_{35}O_2$ ) en un 2% p/p.

Tabla 16. Masa de los elementos según la aleación.

| Aleación (% Atómico)<br>Ti-13Ta-xSn | Masa [g] |       |       |
|-------------------------------------|----------|-------|-------|
|                                     | Ti       | Ta    | Sn    |
| 3                                   | 0,279    | 0,163 | 0,025 |
| 6                                   | 0,265    | 0,161 | 0,049 |
| 9                                   | 0,250    | 0,158 | 0,072 |
| 12                                  | 0,237    | 0,155 | 0,094 |

Finalmente se masa las bolas de molienda y el agente controlador del proceso, correspondiente al ácido esteárico ( $C_{18}H_{35}O_2$ ) en un 2% p/p.

### **b) Atmosfera de control**

Al interior de los tarros de molienda se debe tener una atmosfera neutra, con objetivo de evitar la oxidación y mantener un medio inerte en el aleado mecánico, se utilizó la cámara de guante PLAS-LABS 850-NB/EXP con una atmosfera de argón extra puro.

Se ingresan los medios de molienda y polvos metálicos a la cámara de guantes, se cierra y comienza la purga de esta hasta alcanzar una presión de 2200 [Psi]. Se realizó el cierre y sello de los tarros de molienda con los polvos metálicos y espaciador NaCl en su interior. De igual forma se realiza el retiro de los polvos finalizada la molienda.

**c) Aleado mecánico**

Para realizar la molienda de los polvos metálicos, se utilizó el molino planetario Retsch PM. Se ingresa los tarros de molienda previamente sellados al molino, se programada una velocidad de 250 [rpm] y los tiempos de molienda se aprecian en la Tabla 17, las cuales poseen un ciclo de 30 [min] de operación y detención.

Tabla 17. Tiempo de molienda según la aleación.

| Aleación (% Atómico)<br>Ti-13Ta-xSn | Tiempo efectivo<br>molienda [h] | Tiempo<br>total [h] |
|-------------------------------------|---------------------------------|---------------------|
| 3                                   | 30                              | 60                  |
| 6                                   | 10                              | 20                  |
| 9                                   | 10                              | 20                  |
| 12                                  | 15                              | 30                  |

**d) Mezclado**

Se mezclan los polvos metálicos y el espaciador NaCl (ver Tabla 16 para ver masa de cada elemento a agregar), en el molino mezclador RETSCH modelo MM 400. Estos son introducidos en los tarros de mezclado (ver Figura 16 (b)) y se homogeniza durante 45 [min] a una frecuencia de 30 [Hz].

**e) Compactación**

Los polvos metálicos son compactados utilizando el equipo zwick / roell z030, estos son ingresados a una matriz de acero endurecido y son comprimidos por punzón superior hasta una presión de 550 [MPa], luego se retira los punzones y la matriz, para obtener una probeta en verde de diámetro y alto de 8 [mm] y 3 [mm] respectivamente.

**f) Sinterización**

Se realiza la sinterización de la pieza en verde, obtenida anteriormente, para lo cual se utiliza el equipo de Hot-Pressing. La probeta en verde es introducida en la matriz de grafito, siguiendo la configuración que se aprecia en la Figura 18 para que el punzón superior pueda ejercer la carga de trabajo. Luego de sellar el equipo, se compacta hasta una presión de 40 [MPa], carga ejercida por la máquina Zwick/roell Z030 durante 30 [min].

Previamente, se programa la temperatura en el equipo para realizar el ciclo térmico que se aprecia en la Figura 25 hasta alcanzar los 780 [°C], se utiliza dos temperaturas previas antes de llevar a la temperatura objetivo, esto es para aumentar la vida útil de la resistencia del horno y asegurar un calentamiento uniforme tanto de la matriz de grafito como del volumen interior del horno.

Cabe destacar que la temperatura de operación debe ser menor a la temperatura de fusión de la mezcla, para así obtener una pieza consolidada y compacta.

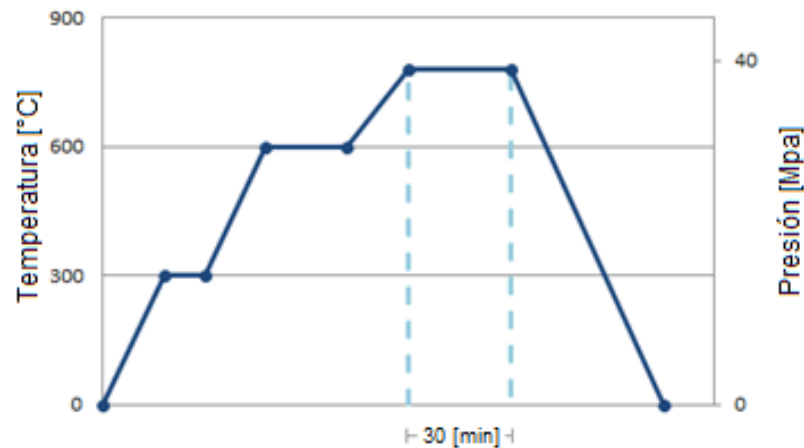


Figura 25. Perfil térmico de sinterización.

El equipo posee una entrada para el gas de argón en la parte inferior y la salida en la parte superior, generando así una presión positiva para obtener una atmósfera protectora en el proceso de sinterización, se utilizó un flujo inicial de 5 [L/min] durante 30 [s] para desplazar el aire e impurezas presentes en el interior del horno. Posteriormente, se redujo a un flujo de 1 [L/min] durante el proceso de sinterización.

La sinterización genera una alta cohesión de los polvos, creando enlaces fuertes entre las partículas, las que acaban uniéndose en un solo bloque con la forma de un molde determinado, en este caso una probeta cilíndrica de diámetro y alto de 8 [mm] y 3 [mm] respectivamente.

**g) Eliminación del cloruro de sodio en las probetas Ti-Ta-Sn**

Finalizada la sinterización de las probetas metálicas, se procede a eliminar el espaciador NaCl. El ciclo inicia sumergiendo las probetas en agua destilada con un soporte que permite que estas se encuentren completamente sumergidas e inmóviles, sin tocar las paredes del recipiente. Este recipiente se encuentra sobre el equipo de agitación magnética, sesteada a una temperatura de 50 [°C] y una agitación que no permite la formación del vórtice [31, 80].

Cada ciclo de lavado dura 1 [h], en donde se realiza el cambio de agua para evitar la saturación de la solución con NaCl. Luego son secadas a 110 [°C] durante 1 [h] en el horno eléctrico, el ciclo culmina cuando la diferencia de masa de cada probeta es  $\leq 0,01$  [g] [80].

**h) Montaje de probetas en resina fría**

Se utilizó la mezcla de resina (RESIN IP marca PRESI) y catalizador (REF IP marca PRESI) en una razón 10:1 v/v. Luego se ingresa la mezcla en un molde de polímero que contiene las probetas de Ti-Ta-Sn en forma vertical, dejando fraguar al vacío dentro del equipo desecador durante 12 [h] con el fin de eliminar las burbujas de aire presente en la mezcla.

**i) Etapa de lijado y pulido de probetas**

Se utilizó el equipo Metallographic Sample Grinding and Polishing Machine, para el lijado de las espumas metálicas. Se empleó las lijas con granos de 240, 320, 400, 600, 800 y 1000 [n° partículas/in<sup>2</sup>] y etanol para lubricar la superficie durante el lijado.

Cabe destacar que estas lijas deben ser utilizadas en orden ascendente, luego de hacer el cambio se gira la superficie expuesta al lijado de la probeta metálica en 90°, para mantener un control adecuado de las líneas formadas.

De igual manera se realizó el pulido de las probetas, utilizando paños de pulido y pasta de diamante LDP (policristalino) marca Presi de 6, 1 y ¼ [µm]. Además de aceite de la marca Buehler Ltda modelo Automet Lapping Oil, que actuó como agente lubricante.

**j) Preparación cepa modelo**

La preparación de las cepas bacterianas se realizó en la incubadora con agitación orbital, utilizada para mantener y hacer crecer los cultivos microbiológicos, regulando factores de crecimiento viable como la temperatura, humedad y otras condiciones en grado óptimo entre ellos el monóxido de carbono y oxígeno [61].

Inicialmente se distribuye el medio de cultivo fundido sobre la capsula petri, dejando enfriar y solidificar a temperatura ambiente. Luego se deposita con una ansa de inoculación una pequeña cantidad de la cepas modelos de las bacterias STAU y COLI, para ser distribuida rayando la superficie generando estrías como se puede apreciar en la Figura 26 [81]. Finalmente se ingresa la capsula petri a la estufa a 37 [°C] durante 18 [h].

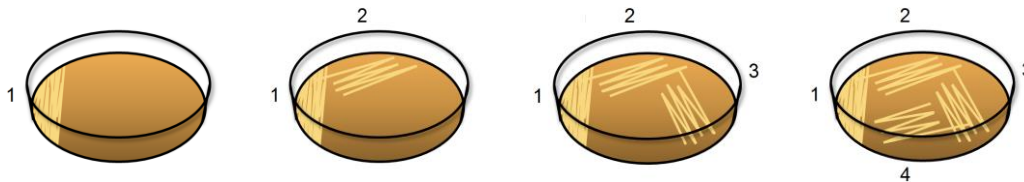


Figura 26. Crecimiento de cultivo puro mediante la técnica de aislamiento de placas en estrías o por agotamiento en superficie [61].

En esta operación se van extendiendo las bacterias y/o diluyendo sus concentraciones sobre la superficie del medio de cultivo sólido, obteniendo así colonias aisladas. En donde cada colonia está formada por la descendencia de una sola celular, por lo que genera un cultivo puro.

**k) Crecimiento cepa modelo**

Para el crecimiento de la cepa bacteriana, se inocula un medio de cultivo líquido, con una pequeña cantidad de bacterias que proveniente del medio sólido anteriormente preparado [81].

Este procedimiento se realizó utilizando un mondadientes, con el cual se toma una pequeña cantidad de cultivo bacteriano y se introduce en 5 [ml] de medio de cultivo líquido contenido en un tubo de ensayo, luego es introducido en una incubadora con una agitación de 250 [rpm] a 37 [°C] durante 18 [h].

Cabe destacar que el tubo de ensayo debe estar levemente abierto para generar una ventilación, permitiendo obtener un mayor crecimiento de las bacterias aeróbicas, ya que para su mejor desarrollo necesitan la presencia de oxígeno libre.

La cepa bacteriana anteriormente preparada se debe diluir con un medio líquido hasta obtener una densidad óptica (DO) de  $0,1 \text{ [g/cm}^3\text{]}$ , para obtener un número representativo de cepas bacterianas y estas puedan crecer y generar las colonias.

### **I) Crecimiento bacteriano**

La cualificación del efecto que presentan las probetas metálicas al contacto con las bacterias, se realizó en una caja de 12 compartimientos. Esta caja se subdividió según el tipo de bacteria, control y ensayo con las espumas metálicas, cuya configuración se aprecia en la Figura 27. Cada pocillo contiene 3 [ml] de medio de cultivo semi sólido y se agregó además:

- **A:** Probeta metálica + 15 [μl] bacteria ( $\text{DO}=0,1 \text{ [g/cm}^3\text{]}$ ).
- **-C:** Control negativo: 15 [μl] bacteria + probeta metálica.
- **+C:** Control positivo: 15 [μl] bacteria + 20 [μl] antibiótico estreptomicina.
- **-B:** Control blanco: sólo medio de cultivo.
- **+B:** Control neutro: probeta metálica.

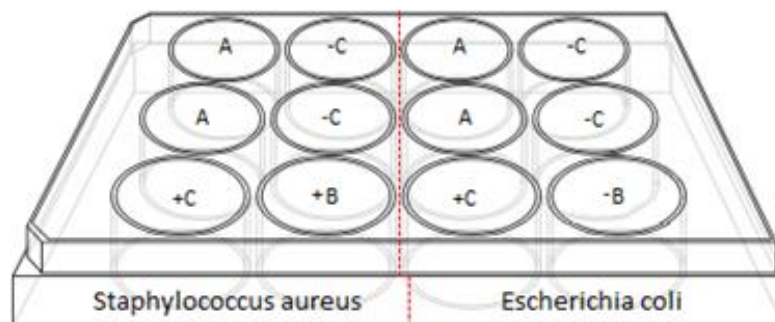


Figura 27. Placa de varios pocillos o placa 12.

Los controles anteriormente mencionados sirven para identificar, monitorear, evaluar y aprobar el método experimental, con el objetivo de ratificar que no existe contaminación cruzada o externa de algún microorganismo.

#### **m) Método del antibiograma disco- placa**

El antibiograma disco-placa es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. Este método consiste en depositar, en la superficie del medio de cultivo sólido previamente inoculada con el microorganismo dispuesto en una placa petri, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos.

El antibiótico se difunde radialmente a través del espesor del medio de cultivo semi sólido, a partir del disco formando un gradiente de concentración [82].

Luego de 18 [h] de incubación los disco aparecen rodeados por una zona de inhibición o halo, este se cuantifica midiendo el radio de la zona de inhibición obtenido por cada una de las cepas y se procede a calcular el área de acción. Para realizar una comparación se calcula el área porcentual de acción, cuya relación se aprecia en la ecuación (1).

$$\% \Delta \text{ Area} = \frac{\text{Area zona inhibición}}{\text{Area placa petri}} \cdot 100 \quad (1)$$

#### **n) Método de goteo en placa**

La técnica se basa en contar las unidades formadoras de colonias o UFC presentes en un gramo o milímetro de muestra, estas colonias se desarrollan en un medio de cultivo, después de un cierto tiempo de incubación a una temperatura adecuada.

En una placa con medio de cultivo sólido se subdivide en la cantidad de diluciones a realizar, en un tubo eppendorf se realizan las diluciones seriadas en factores 1:10 %v/v. Utilizando una micropipeta con punta estériles se toman 100 [μL] de la cepa de trabajo y se transfiere a otro tubo eppendorf que contiene 900 [μL] de agua destilada estéril, diluyendo y homogenizando las muestras por medio de resuspensión durante 10 [s].

Luego se cambia la punta de la micropipeta y se toman 100 [μL] de la dilución 1/10 %v/v y se transfiere a un nuevo tubo eppendorf que contiene agua destilada, volviendo a diluir y homogenizar la muestra durante 10 [s] esta muestra se encuentra en la dilución 1/100 %v/v [83]. Este procedimiento se continua hasta diluir la muestra  $10^{-8}$ , como se aprecia en la Figura 28.

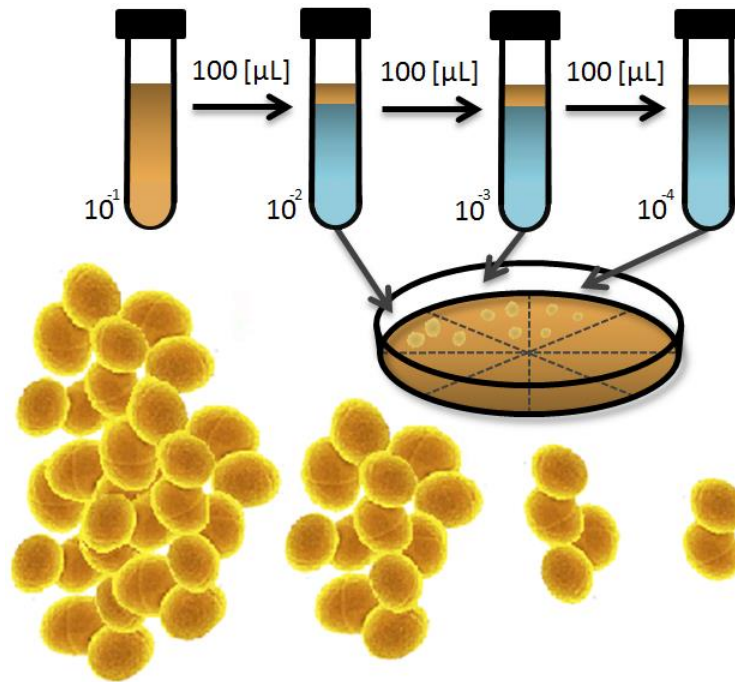


Figura 28. Esquema de diluciones decimales empleado en tubos de 1 [mL] [84-85].

De cada dilución se agrega 100 [μL] en triplicado sobre la placa petri, como se aprecia en la Figura 28. Esta placa se ingresa a la incubada estática a 37 [°C] durante 18 [h] para generar el crecimiento del cultivo bacteriano, para finalmente contar las colonias bacterianas y obtener el valor de UFC/mL dada la ecuación (2) [84].

$$\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = \text{N}^{\circ} \text{ dilución} \cdot \text{factor de dilución} \cdot 10^{-\text{N}^{\circ} \text{ dilución}} \quad (2)$$

### 3.3 Técnicas de caracterización

#### **a) Microscopía óptica (MO)**

La microscopía óptica (MO) se realizó en el Laboratorio de Metalografía del Departamento de Ingeniería Metalúrgica y de Materiales, de la Universidad Técnica Federico Santa María (UTFSM). El microscopio utilizado corresponde al modelo DM500 marca Leica, en conjunto con el software Leica Application Suite (LAS) para el procesamiento de las imágenes.

#### **b) Microscopía electrónica de barrido (MED)**

Se utilizó el equipo de barrido modelo QUANTA FEG 250, sistema de tercera generación basada en el modelo ESEM Schottky FEG que cuenta con un detecto marca EDAX modelo OCTANE PRO. Este equipo pertenece a la empresa FEI, ubicada en las dependencias del laboratorio Fe-SEM de CIEN-UC, de la Pontificia Universidad Católica de Chile (PUC), San Joaquín, Chile.

#### **c) Difracción de rayos X (DRX)**

El equipo utilizado para el análisis de difracción fue STOESTADI MP equipado con un detector con DECTRIS MYTHEN 1K y con una radiación  $\text{CuK}\alpha 1$  ( $\lambda=0.15406$  nm), en las dependencias del Departamento de Ingeniería Metalúrgica y Materiales de la Universidad Técnica Federico Santa María (UTFSM), Valparaíso, Chile.

Los patrones de difracción fueron refinados con el software Materials Analysis Using Diffraction (MAUD), usando un standard de LaB6 ( $a=4.1565915$  [Å]) para la determinación del ensanchamiento instrumental. Las difracciones se midieron en un rango angular de  $2\theta$  entre  $20^\circ$  y  $120^\circ$ , con un ángulo de paso de  $0.12^\circ$  y un tiempo por cada paso de 10 [s], lo que da como resultado un tiempo de medición por cada probeta de 35 [min] y 2 [h].

**d) Método de turbidez**

El instrumento usado para medir la turbiedad es el espectrofotómetro de modelo UV/Vis Agilent 8453 (ver Figura 23), del Centro de Biotecnología de la Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile. En este equipo genera un haz de luz de 600 [nm] a través de la suspensión bacteriana a un detector sensible de luz, esta luz se registra como el porcentaje de transmisión pero el equipo nos entrega la absorbancia o densidad óptica (OD), un valor derivado del porcentaje de transmisión que puede ser reportado en relación al medio de cultivo utilizado [85].

**e) Conteo en caja de petri**

Método utilizado para la enumeración de bacterias viables en una muestra de acuerdo al medio empleado, tiempo y temperatura de incubación, se basa en la cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC) por [ml] o [g] de muestra, este se realizó en el Centro de Biotecnología de la Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile.

## Capítulo 4: Resultados y discusión

### 1.1 Caracterización de los polvos

#### a) Microscopia electrónica de barrido (MED)

##### I. Titanio

En la Figura 29 se observan las imágenes tomadas del polvo de titanio, que presenta una morfología irregular, según la clasificación presente en el Anexo 1. Con una apariencia esponjosa de aspecto aglomerando con fibras y caras facetadas, estas características facilitan la capacidad de sinterización del compacto [86]. Este elemento presenta el mayor tamaño de partículas en comparación a los polvos de estaño y tántalo, con un tamaño  $\leq 150 \mu\text{m}$  [87].

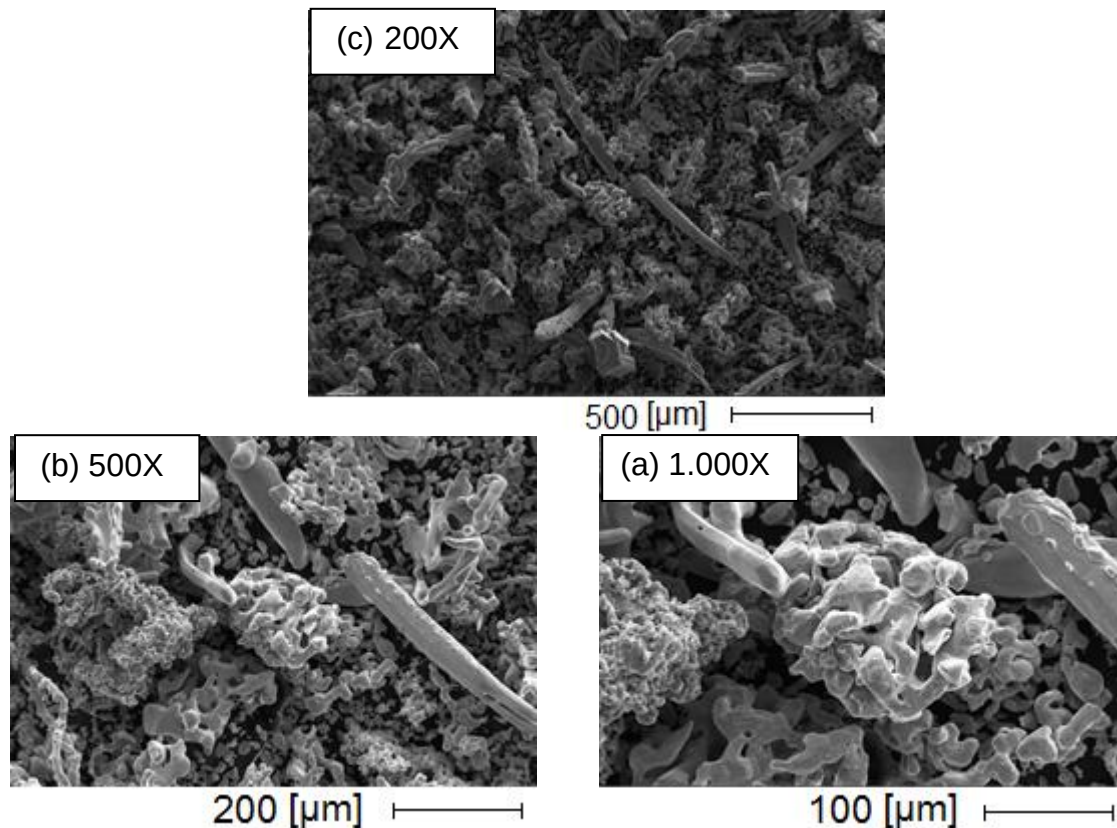


Figura 29. Imágenes MED de polvos de Ti puro con un aumentó de a) 200x, b) 500x y c) 1000x.

## II. *Tántalo*

En la Figura 30 se observan las imágenes tomadas a los polvos de tántalo, esta presenta un tamaño promedio menor a 45  $\mu\text{m}$ , presentando el menor tamaño de partícula en comparación a los polvos de titanio y estaño [88]. Se aprecia una morfología irregular y aglomerada con bordes redondeados, de acuerdo a la clasificación dada en el Anexo 1, estas características son típicas de la producción por el método de reducción de sales de sodio del fluotantalato de potasio ( $\text{K}_2\text{TaF}_7$ ) [90- 92].

Se observa en la Figura 30 (b) la presencia de partículas con forma cúbica con un tamaño promedio 18  $\mu\text{m}$ , se presume que esta se encuentra por la contaminación con partículas  $\text{NaCl}$  que presentan un tamaño y forma similar, esto se verificó posterior a la entrega de este informe mediante DRX y SEM.

Se descarta que los polvos metálicos utilizados para fabricar las espumas metálicas estuvieran contaminados, ya que estos estaban nuevos y fueron utilizados exclusivamente para realizar las probetas, finalizada la elaboración de las probetas fueron utilizados por terceros.

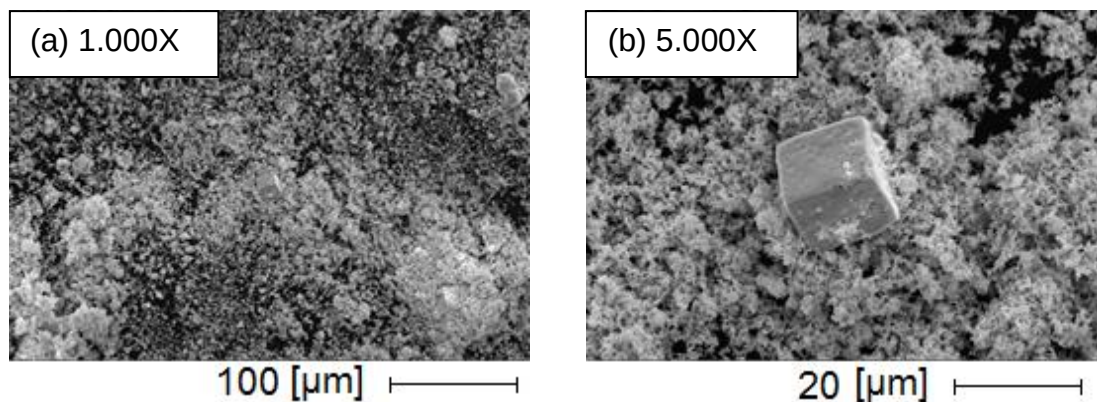


Figura 30. Imágenes MED de polvos de Ta puro con un aumentó de a) 1000x  
b) 5000x.

### III. Estaño

En la Figura 31 se observan las imágenes tomadas a los polvos de estaño, estos presentan una morfología esférica o esferoidal (ver clasificación presente en Anexo 1), esta morfología es típica de los procesos de atomización, uno de los más comunes en la producción de este elemento [91]. Además presenta una distribución de tamaño heterogénea, con un tamaño promedio menor a 50  $\mu\text{m}$ .

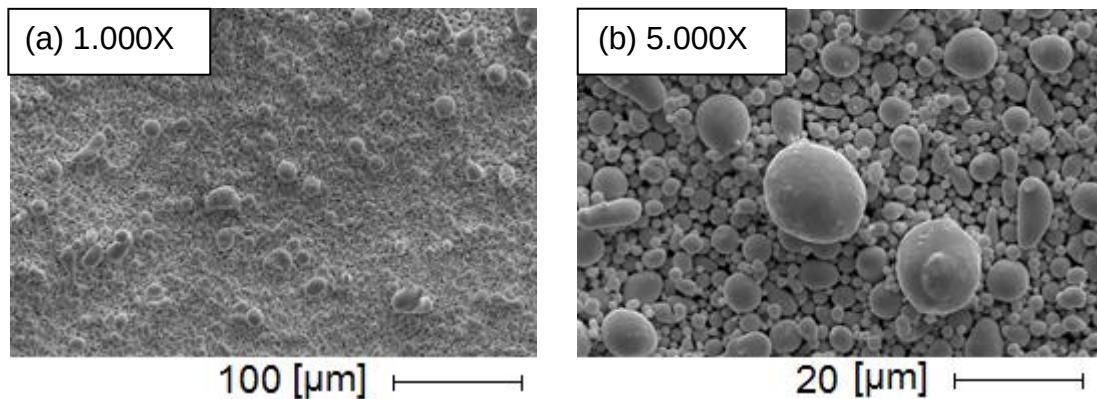


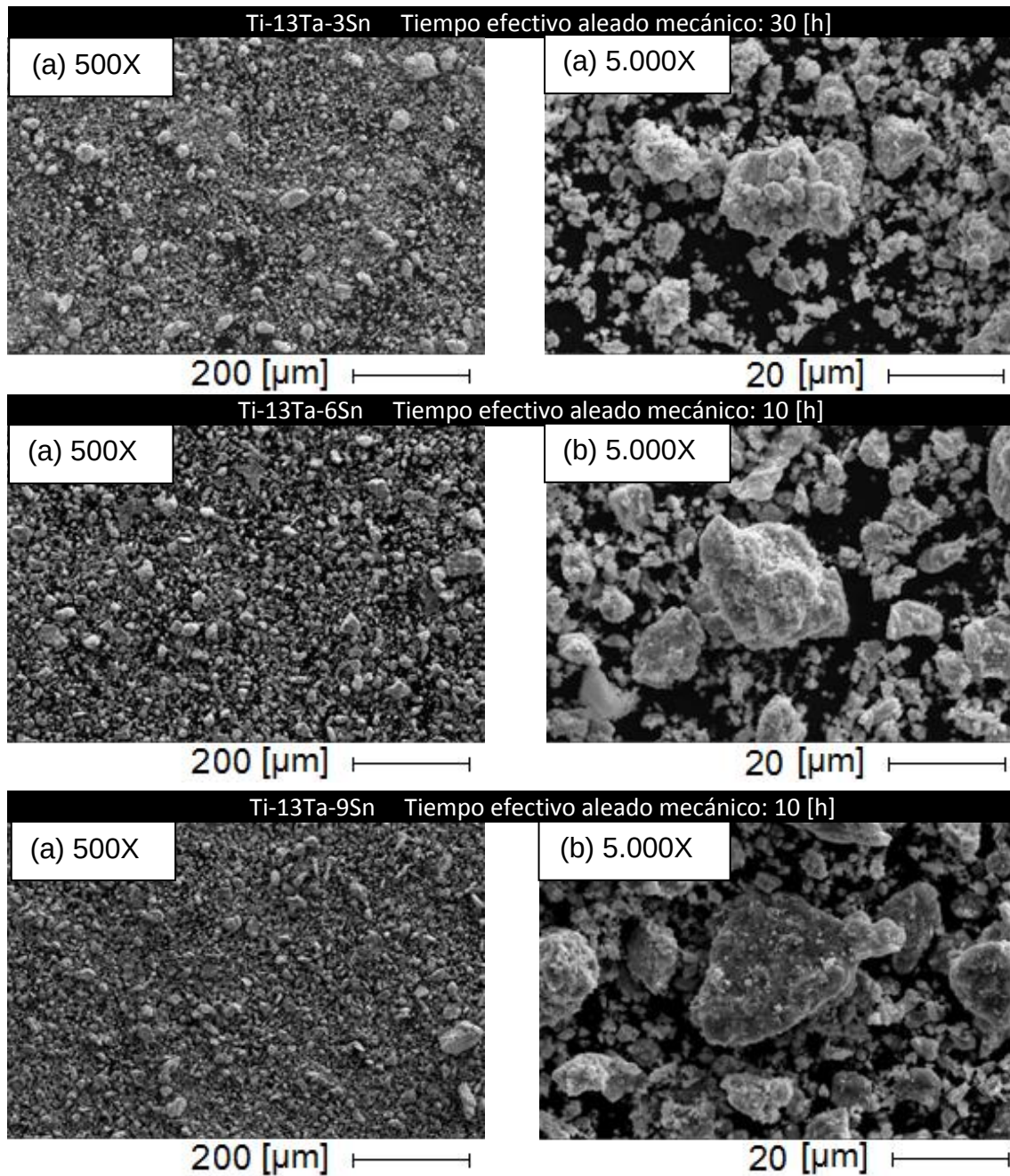
Figura 31. Imágenes MED de polvos de Sn puro con un aumentó de a) 1000x  
b) 5000x.

### IV. Ti-Ta-Sn

En la Figura 41 se presentan las imágenes tomadas a las aleaciones de Ti-Ta-Sn luego de realizado el aleado mecánico de 30, 10, 10 y 15 [h] para la aleación que presentan 3, 6, 9 y 12 % atómico de estaño respectivamente.

Se observa una morfología irregular, con algunas partículas aglomeradas, bordes redondeados y otras dispersas. Se aprecia una tendencia a la formación de una morfología esférica, se debe a que este tipo de morfología minimiza la energía libre de Gibbs durante el aleado mecánico y además de que se produjo soldadura en frío durante el proceso que se aprecia la adhesión de los polvos en formas de capas indicando la presencia del fenómeno de interacción dúctil-frágil de los polvos aleados, finalmente se descarta la predominancia de la fractura de los polvos durante el proceso dada la morfología observada [94- 95].

El tamaño de las partículas es considerablemente menor en comparación a los polvos iniciales, además la aleación Ti13Ta12Sn (ver Figura 32) presenta un tamaño alrededor de 140  $\mu\text{m}$  siendo superior al tamaño de las otras aleaciones estudiadas, las cuales presentan un tamaño similar del orden de 25  $\mu\text{m}$ .



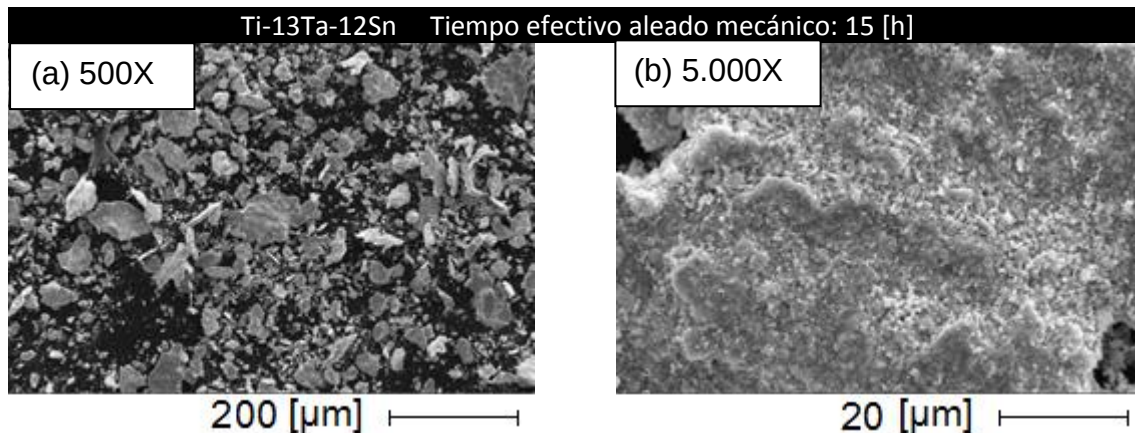
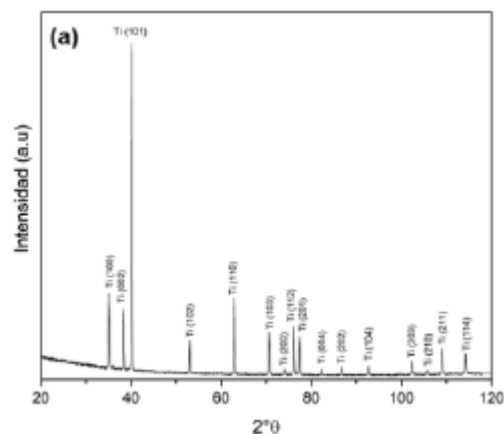


Figura 32. Imágenes MED de polvos de Ti-Ta-Sn con un aumentó de a) 500x b) 5000x.

### **b) Difracción de rayos X (DRX)**

En la Figura 33 se presentan los patrones de difracción de rayos X de los polvos comercialmente puros de Ti, Ta y Sn. Se observó en el patrón del Ti (ver Figura 33 (a)) una estructura hexagonal compacta (HCP) con grupo espacial P63/mmc característicos de la fase Ti- $\alpha$ , en el caso del Ta (ver Figura 33 (b)) se identifica la estructura cúbica centra en el cuerpo (BCC) con grupo espacial Im-3m propio de la fase Ta- $\alpha$  y finalmente el Sn (ver Figura 33 (c)) se identificó una estructura tetragonal con grupo espacial I41/am d propio de la fase Sn- $\beta$ , todas las fases mencionadas son estables a temperatura ambiente[95- 98].

Las estructuras cristalinas fueron indexadas con la base de datos Powder Diffraction File (PDF) y el programa Match, este análisis es de gran ayuda debido a que nos permite identificar el comportamiento de los elementos [97].





En la Figura 35 se observa el cambio de dimensiones que presenta la probeta previo y posterior a la sinterización. Se generó una relación directamente proporcional entre la altura y la adición de Sn (Figura 35 (a)), con un aumento promedio del diámetro equivalente en un orden de 0,15 [mm].

La altura de la probetas (Figura 35 (b)) disminuyó en un rango de 0,2 - 0,5 [mm], existiendo una relación inversamente proporcional en la adición de estaño, es decir, a menor cantidad de estaño presente en la aleación mayor es la variación de la altura.

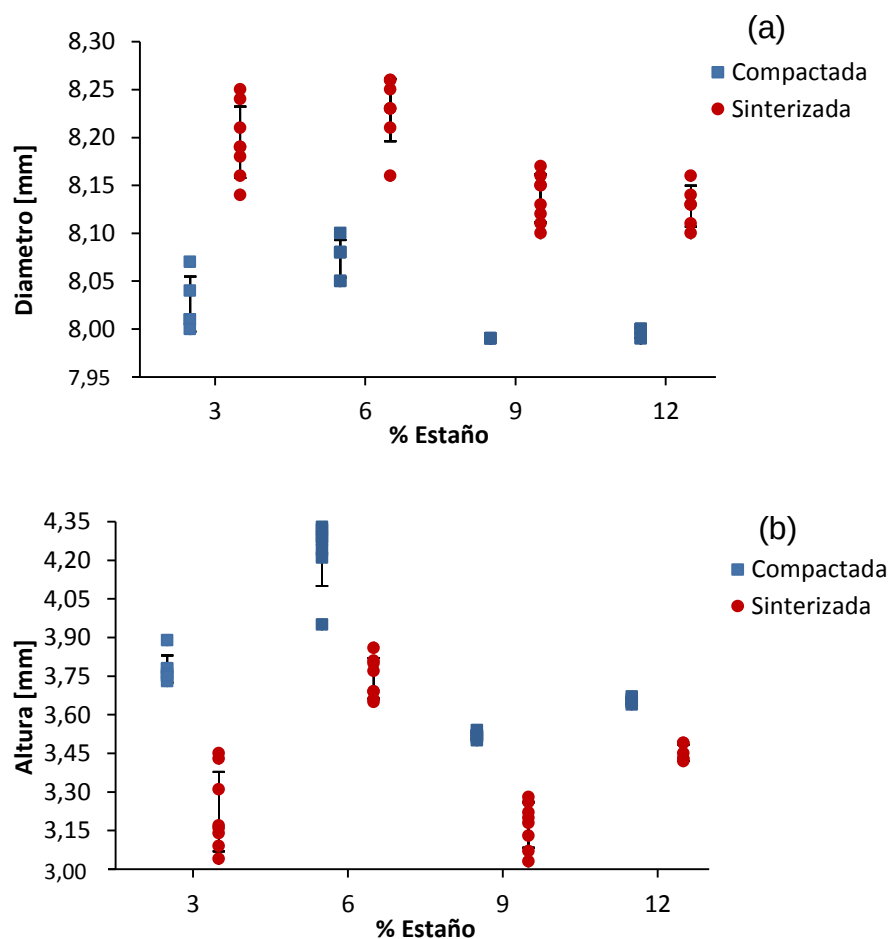


Figura 35. Dimensiones de las probetas sinterizadas de la aleación Ti<sub>13</sub>Ta<sub>x</sub>Sn (x= 3, 6, 9 y 12% atómico) a) diámetro y b) altura.

Se calculó el volumen de las probetas compactadas y sinterizadas, según la ecuación (3). Con estos valores se obtiene la contracción volumétrica que sufre la probeta metálica, cuyos valores se obtiene con la ecuación (4).

$$V = \frac{\pi \cdot D^2 \cdot h}{4} \quad (3)$$

$$\Delta V = \frac{(V_{\text{sinterizado}} - V_{\text{compactado}})}{V_{\text{compactado}}} \cdot 100 \quad (4)$$

Dado el registro de las dimensiones de las probetas compactadas y sinterizada, se calcula el volumen de estas y la contracción volumétrica que sufre cuyos resultados se aprecian en la Figura 36.

Como se mencionó anteriormente existe una relación entre la adición de estaño y variación de las dimensiones de las probetas metálicas. A su vez generó una relación inversamente proporcional entre la contracción volumétrica y la adición de estaño, esto se asocia a la porosidad experimental que se detallará en profundidad en el siguiente ítem.

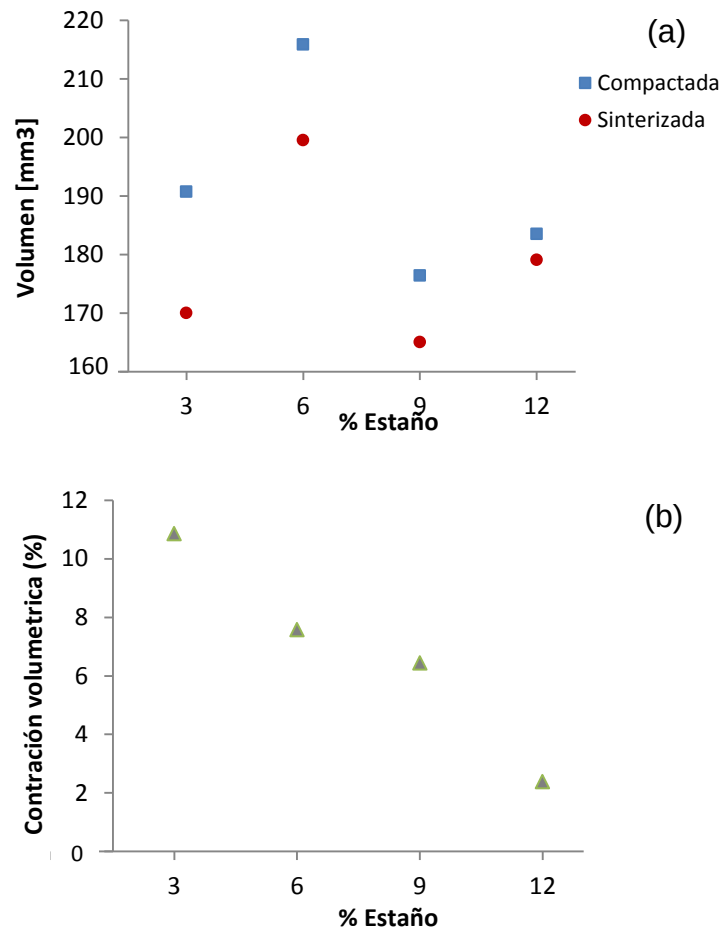


Figura 36. (a) Volumen y (b) contracción volumétrica de las probetas de Ti-13Ta-xSn (x= 3, 6, 9 y 12% atómico) en relación al contenido de estaño.

### ***b) Distribución de poros***

Las espumas metálicas se montaron en resina en frío, para ser lijadas y pulidas, para así realizar la caracterización de la distribución de los poros, cuyos resultados se observan en la Figura 37. A partir de las imágenes obtenidas, se utilizó el software Imagen J para cuantificar la distribución de los poros mediante los histogramas que se aprecian en la Figura 38.

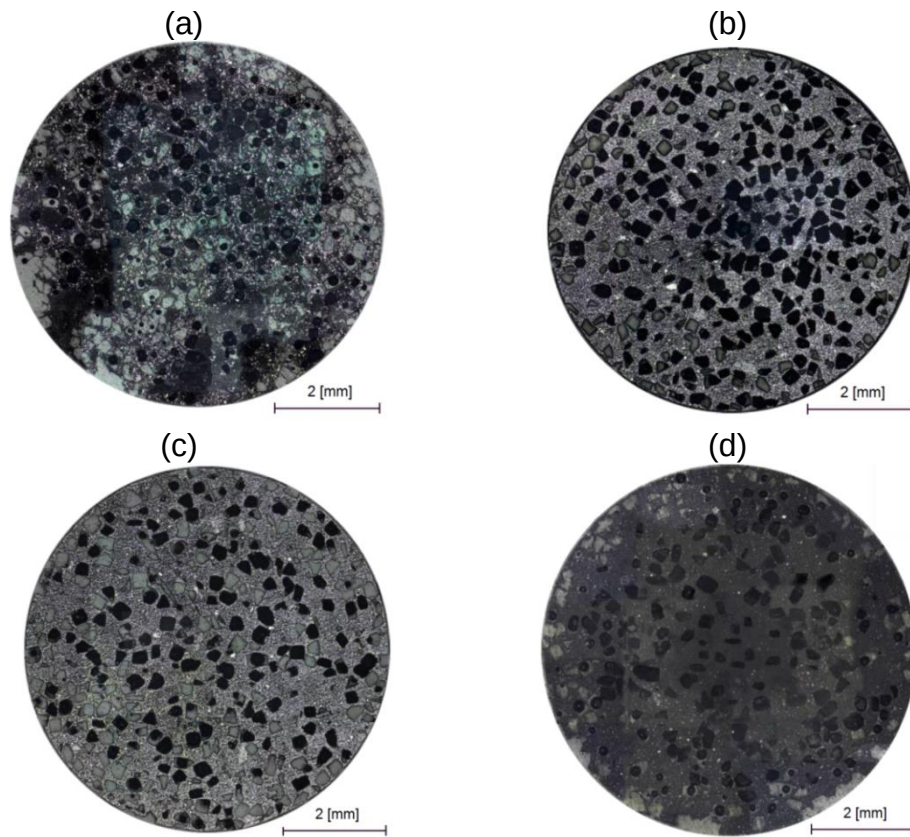


Figura 37. Distribución de poros para la aleación Ti-Ta-Sn con diferente cantidad de estaño; a) 3%, b) 6%, c) 9% y d) 12% atómico.

En la Figura 37 se observa la homogeneidad de los poros, esto se debe a la eficiencia del proceso de mezclado de los polvos y que no se segregaron durante el vaciado de los polvos en la matriz de acero para la compactación.

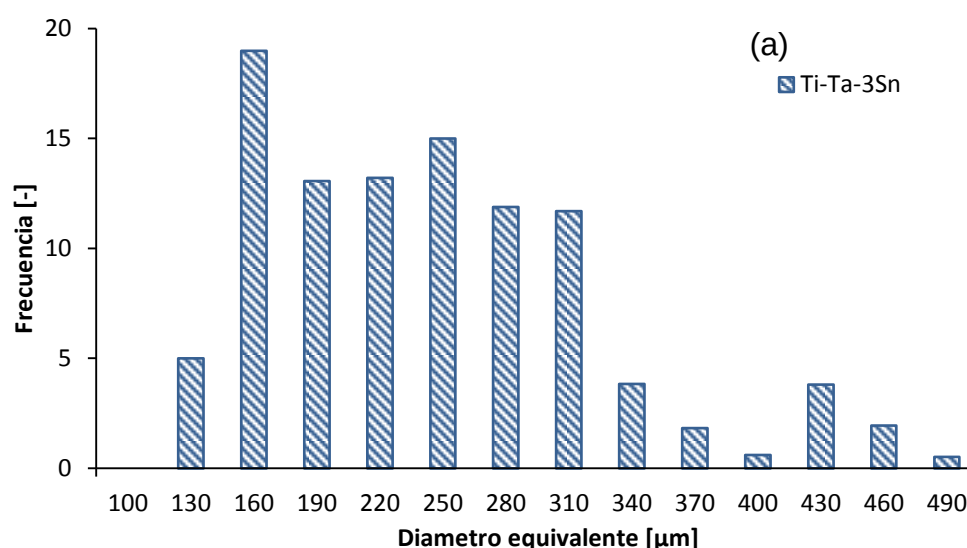
Se aprecia la predominancia en que los poros se encuentren adyacentes o muy próximos entre ellos, los cuales se aprecian en la Figura 37 de color negro y/o gris. El color negro se debe a la existencia de la cavidad del poro generada por el espaciador y el color gris es producto del reflejo de la luz que muestra el inicio del poro.

Se observó que la morfología de los poros fue afectada durante el proceso de consolidación, que produjo la deformación del espaciador debido a la combinación de temperatura y presión aplicada durante la sinterización. Estos se presentan con mayor predominancia con una forma cúbica, pero en ciertas zonas se aprecia que estos presentan diferentes formas lo cual se debe a la dirección del corte que se realizó al momento de lijar.

Los reportes bibliográficos indican que las espumas metálicas de Ti con poros esferoidal, presentan una mayor resistencia a la compresión y módulo elástico en comparación a la presencia de poros cúbicos. Puesto que la porosidad con forma esferoidal tiene una superficie más lisa o suave, generando una disminución de las concentraciones de esfuerzos, ya que disminuyen los bordes o los cantos en la forma del poro [25].

En los histogramas de la Figura 38 se observa la distribución del tamaño de los poros, que presenta un diámetro equivalente en el rango de 200 a 400  $\mu\text{m}$ . Estos resultados concuerdan con el tamaño inicial de las partículas del espaciador reportador en la curva granulometría presente en la Figura 39.

Se detectó la presencia de poros con un tamaño superior a 400  $\mu\text{m}$ , generados por los cortes de forma diagonal de los poros o la unión de dos partículas de NaCl. De igual forma se detectaron poros con un tamaño menor a 200  $\mu\text{m}$ , producto de la existencia del corte en alguna fracción al borde del poro.



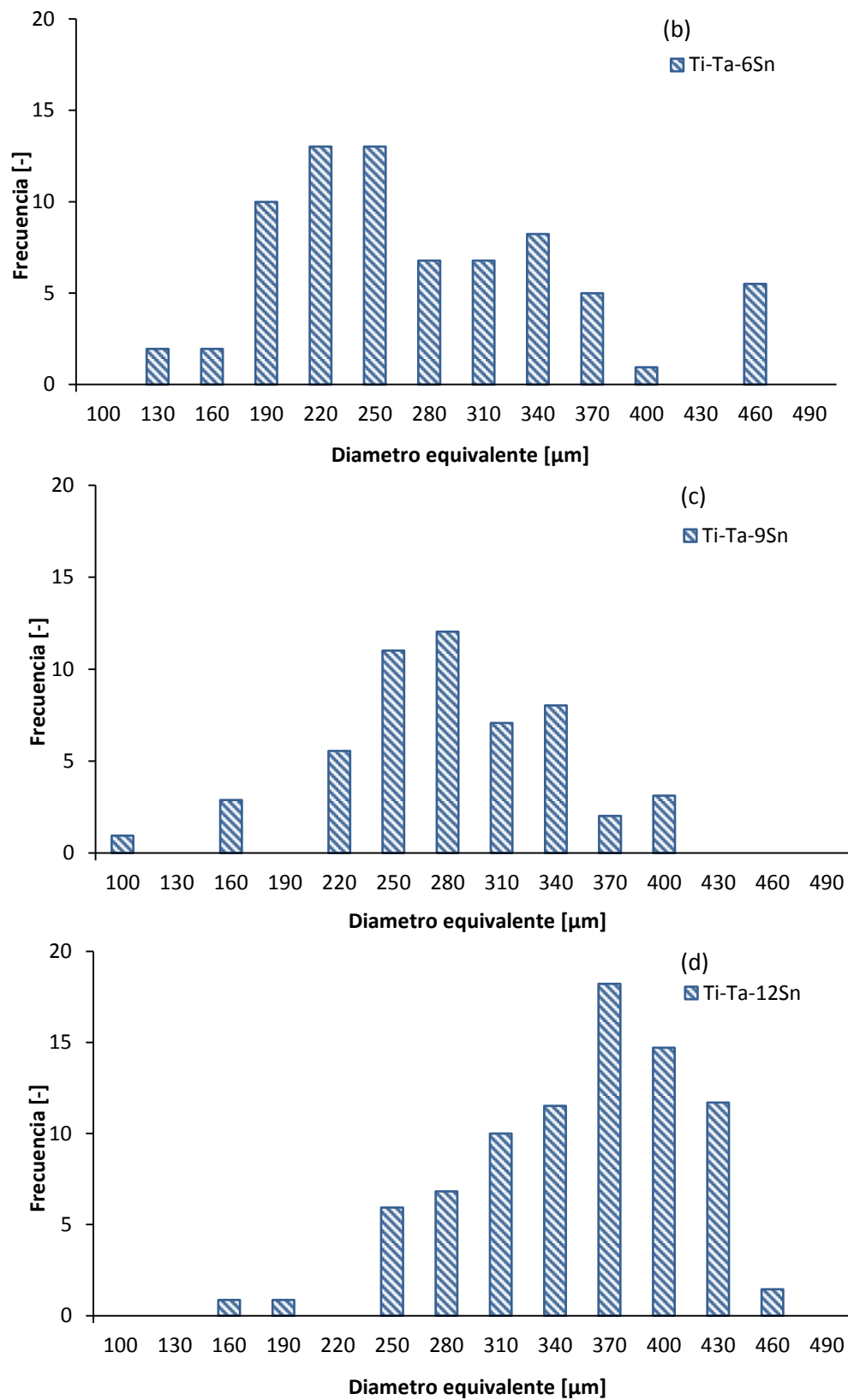


Figura 38. Distribución de poros de las espumas de (a) Ti<sub>13</sub>Ta<sub>3</sub>Sn, (b) Ti<sub>13</sub>Ta<sub>6</sub>Sn, (c) Ti<sub>13</sub>Ta<sub>9</sub>Sn y (d) Ti<sub>13</sub>Ta<sub>12</sub>Sn.

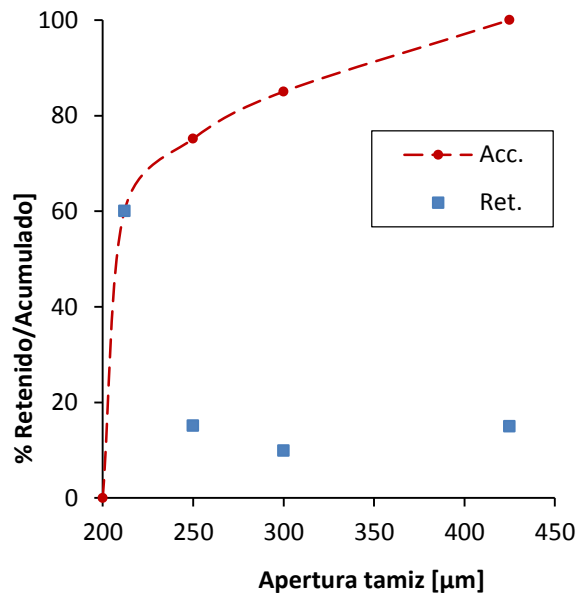


Figura 39. Curva granulometría de NaCl.

En la Figura 38 se observa que existe una relación directamente proporcional entre la adición de estaño y la porosidad, es decir, la porosidad de las aleaciones aumenta con la adición de estaño.

La porosidad teórica fijada en 50% v/v es mayor a la porosidad experimental, cuyos valores se aprecian en la Figura 40. La variación de la porosidad se asocia a la calidad de imagen obtenida en el borde de las probetas, producto de la alta dificultad de la distinción de los poros debido a la presencia de resina en algunas cavidades, lo que genera la distorsión de los resultados obtenidos.

Este resultado resuelve la problemática del ítem anterior, en donde se obtuvo contracción volumétrica de 11, 8, 6 y 2% para la aleación con 3, 6, 9 y 12% Sn respectivamente. Se generó una deformación de los poros, ya que las condiciones de temperatura y presión durante el proceso de sinterización, en consecuencia las probetas metálicas son más compactas.

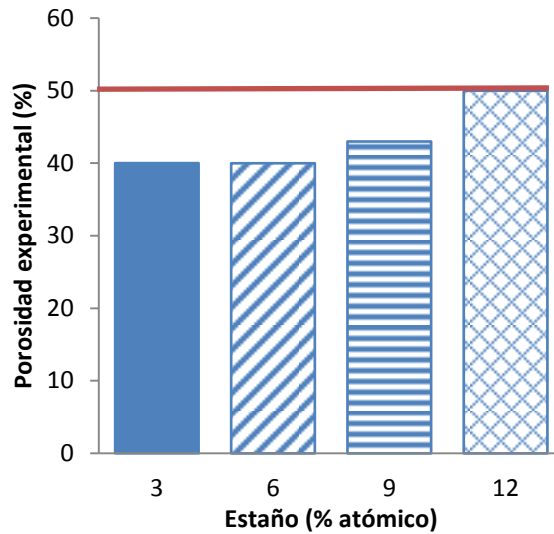
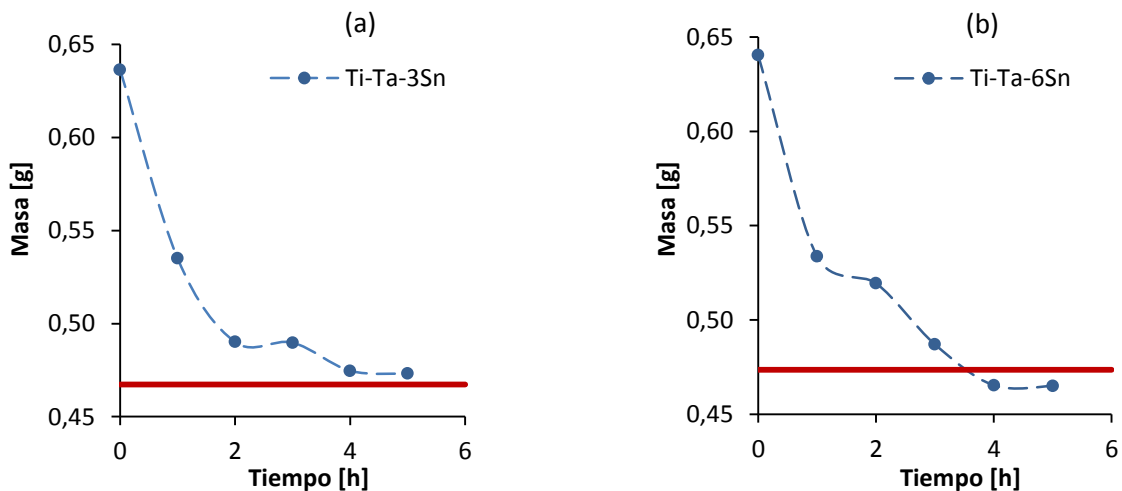


Figura 40. Porosidad experimental obtenida según la adición de estaño de la aleación Ti-13Ta-xSn (% atómico).

### c) Remoción del agente espaciador (NaCl)

Los gráficos de dilución del NaCl para las aleaciones que presentan un 50% v/v de porosidad añadida teóricamente se presentan en la Figura 41. La línea horizontal de color rojo, representa la masa final teórica a la cual deben llegar las muestras luego de la remoción total del espaciador.

Estudios previos determinaron que el proceso de remoción del espaciador presenta un fuerte efecto en la integridad estructural de las muestras, ya que la remoción del NaCl se llevó a cabo después de la consolidación de las muestras sinterizada mediante Hot Pressing [98].



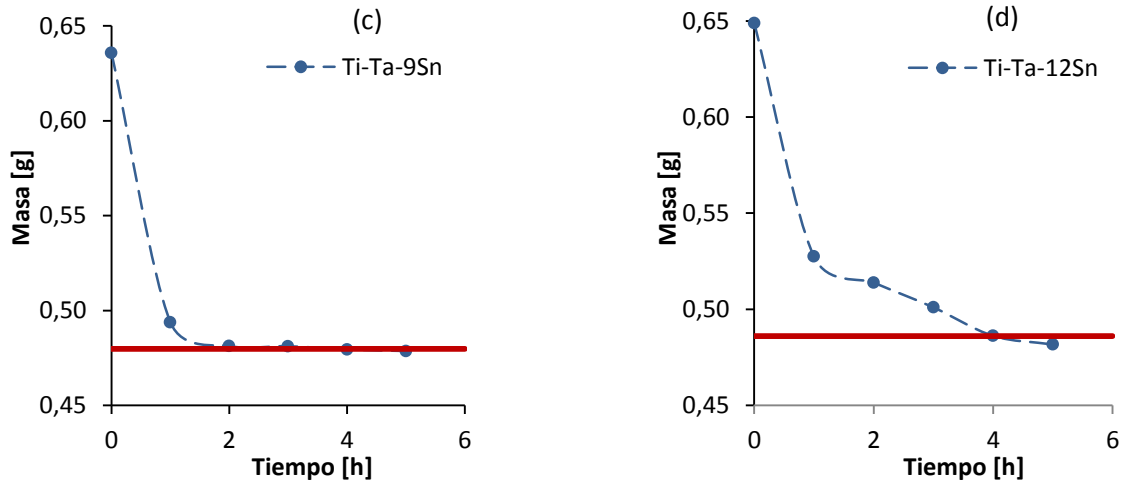


Figura 41. Gráficos de la cinética de disolución de NaCl en agua destilada a 50 [°C] (a) Aleación Ti<sub>13</sub>Ta<sub>3</sub>Sn (b) Aleación Ti<sub>13</sub>Ta<sub>6</sub>Sn (c) Aleación Ti<sub>13</sub>Ta<sub>9</sub>Sn (d) Aleación Ti<sub>13</sub>Ta<sub>12</sub>Sn.

Se observa en la Figura 41 el tiempo requerido para la remoción total del espaciador asciende a 5 [h] de lavado efectivo (equivalente a 5 ciclos). La aleación Ti<sub>13</sub>Ta<sub>3</sub>Sn (ver Figura 41 (a)) no logra la eliminación completa del espaciador, producto que el NaCl queda en el interior de la espuma metálica y el agua no logra penetrar hasta esa zona.

En cambio, para las aleaciones Ti<sub>13</sub>Ta<sub>6</sub>Sn, Ti<sub>13</sub>Ta<sub>9</sub>Sn y Ti<sub>13</sub>Ta<sub>12</sub>Sn (ver Figura 41 (a), (b) y (c) respectivamente), se obtiene una masa final menor a la masa teórica, producto de las pérdidas de masa durante el trabajo. Algunos poros se encontraban contiguos y al eliminar el espaciador no se encuentran enlaces en la estructura, generando la fractura de dichas zonas.

Estudios anteriores han reportado que las espumas de Ti, obtenidas mediante Hot Pressing presentan una mayor cinética de la remoción del espaciador NaCl. Se obtuvo un tiempo de 2 a 3 [h] para muestras de 1,5 [g] con una porosidad de 30 a 70 % v/v y un espaciador de tamaño entre 50 a 500 [μm] [99].

#### **d) Difracción de rayos X (DRX)**

Se identificó la estructura cristalina de las espumas metálicas de Ti-Ta-Sn mediante DRX, cuyos resultados fueron interpretados por el programa Match y la base de datos Powder Diffraction File (PDF), para indexar las fases en los patrones de difracción de rayos X. Finalmente estos patrones fueron refinados con el software Materials Analysis Using Diffraction (MAUD), en donde se considera correcta refinación cuando el programa genera una bondad de ajuste  $\sigma [-] \leq 2$  y un factor de difractograma ponderado  $R_{wp} < 10\%$ .

En la Tabla 18 se presentan los porcentajes en peso de las fases presentes Ti- $\beta$  (bcc), Ti- $\alpha$  (hcp) y Ti- $\gamma$  (fcc), además de la contaminación de óxido de circonio estabilizado con ytria (ZrO<sub>2</sub>)(Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) para cada aleación. Asimismo se presentan los respectivos valores de bondad de ajuste ( $\sigma [-]$ ) y el factor de difractograma ponderado ( $R_{wp} \%$ ) .

Se aprecia la predominancia de la fase Ti- $\beta$  (bcc) en todas las espumas analizadas, confirmando los estudios anteriores que relacionan el tiempo de molienda seleccionado y la cantidad de Sn utilizado [100].

Tabla 18. Fases y óxidos presenten en la espuma de Ti-Ta-Sn.

| Ti-13Ta-xSn<br>(% At.) | Tiempo<br>AM [h] | Fase<br>Ti- $\alpha$<br>(% peso) | Fase<br>Ti- $\beta$<br>(% peso) | Fase<br>Ti- $\gamma$<br>(% peso) | (ZrO <sub>2</sub> )(Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )<br>(% peso) | Rwp<br>(%) | $\sigma [-]$ |
|------------------------|------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------|------------|--------------|
| 3                      | 30               | 34                               | 55                              | 8                                | 3                                                               | 10         | 1,0          |
| 6                      | 10               | 33                               | 57                              | 1                                | 9                                                               | 11         | 1,1          |
| 9                      | 10               | 41                               | 58                              | 0                                | 1                                                               | 11         | 1,1          |
| 12                     | 15               | 43                               | 52                              | 0                                | 5                                                               | 11         | 1,1          |

El tántalo es un estabilizador  $\beta$ -isomorfo, es decir, la adición de este disminuye la temperatura de transición de la fase  $\beta$  generando que esta sea estable a menores temperaturas, en la Tabla 18 se observa que es posible encontrar la presencia de la fase  $\beta$  a 780 [°C] [101].

Cabe destacar que la difusión tanto del Ta y Sn ocurre como sustituciones en la fase Ti- $\beta$  y Ti- $\alpha$ , ya que el Ta a 800 [°C] presenta un coeficiente de autodifusión igual a  $1,6 \cdot 10^{-9}$  [cm<sup>2</sup>/s], un radio atómico de 1,44[Å] y un parámetro de red de 0,332 [-]. A una temperatura ambiente el radio atómico del Sn y Ta es 1,62 [Å] y 2,09 [Å] respectivamente [104-105].

La contaminación de (ZrO<sub>2</sub>)(Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) se presenta en 1 - 9% p/p (ver Tabla 18), que proviene del desgaste de los tarros y bolas de circonia utilizado en el AM. Los resultados muestran un tamaño similar de cristalita y microdeformación de las aleaciones, esta contaminación se debe a que los reflejos del óxido son bajos por lo que permanecen en el background y no existe relación en la adición de Sn. Como se mencionó anteriormente, los elementos Zr y Y presentan una excelente biocompatibilidad, no es problema si existe una cantidad moderada de este óxido en las espumas de Ti para ser utilizado como un biomaterial. [104].

En la Tabla 18 se establece la relación entre la adición de Sn y el porcentaje que se forma de cada fase presente, se obtiene una relación inversamente proporcional entre la adición de Sn y fase  $\gamma$ , en donde esta fase no se encuentra presente en aleaciones con una adición superior a 6% Sn. En cambio las fases  $\alpha$  y  $\beta$  presentan una relación directamente proporcional con el contenido de Sn, en donde la fase  $\beta$  alcanza un máximo en 58% p/p para 9% de Sn y la fase  $\alpha$  aumenta continuamente hasta un máximo de 43% p/p para 12% de Sn.

En la Figura 42 se observan el tamaño de cristalita y microdeformación ( $\eta$ ) que presentan las aleaciones de Ti-Ta-Sn (ver Tabla 22 en Anexo 2 los resultados con mayor detalle). La microdeformación corresponde al valor de la deformación isotrópica que representa el valor máximo de microdeformación ( $\epsilon^2 > 1/2$ ) presente en el material.

Los resultados del tamaño de cristalita se clasifica como un tamaño a nivel nanométrico, ya que el rango establecido para un nanocrystal se encuentra entre 1 a 250 [nm].

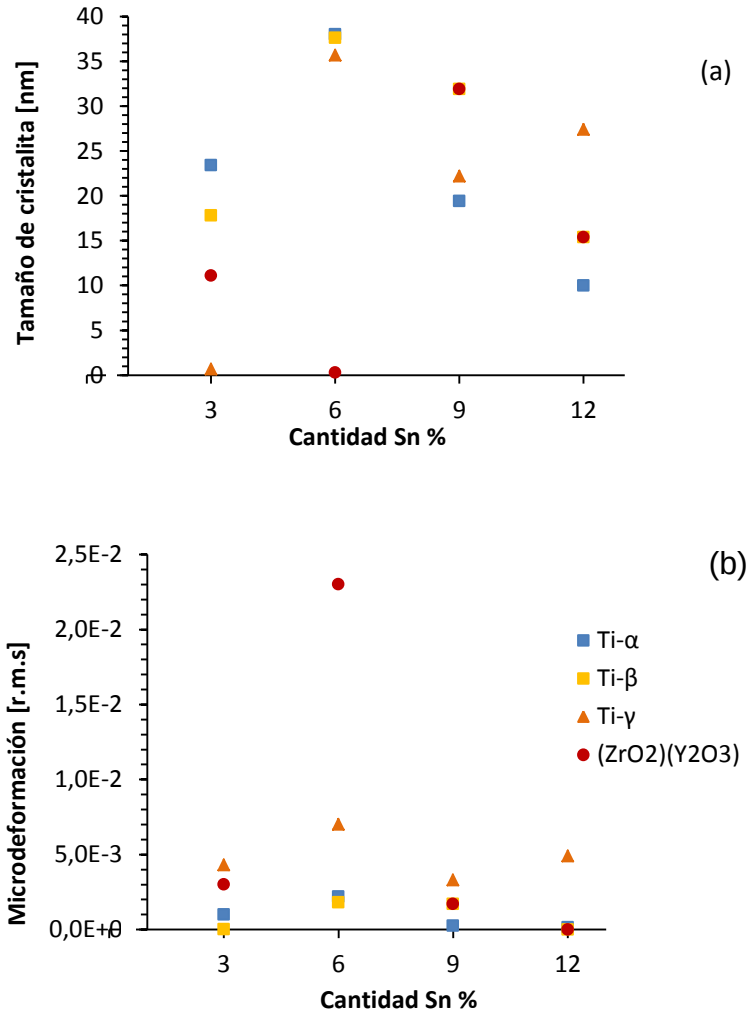


Figura 42. a) Tamaño de cristalita y b) Microdeformación de las fases  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y la contaminación (ZrO<sub>2</sub>)(Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) según la cantidad de Sn presente.

Los difractogramas de rayos X refinados se presentan en las Figura 43, Figura 44, Figura 45 y Figura 46 para un contenido de estaño de 3, 6, 9 y 12% respectivamente. Cada patrón de difracción de rayos X presenta una curva de color roja que corresponde al patrón simulado, resultado del refinamiento.

La simulación ajusta el valor teórico de los parámetros estructurales y microestructurales como: parámetros de red, deslizamientos atómicos, anisotropía y tensiones de red [105].

La Figura 43 muestra el difractograma de rayos X de la aleación Ti13Ta3Sn, presentando la integración de las fases Ti- $\alpha$ , Ti- $\beta$  y Ti- $\gamma$ , que se formaron producto de los defectos cristalinos y refinamiento microestructural por la energía mecánica entregada por el AM, lo que conllevó a la cristalización de algunos átomos de soluto y solvente hacia la formación de una estructura fcc.

La mayor microdeformación se presenta en la fase Ti- $\gamma$  con un resultado de 0,0043 [-], debido a la presencia de elementos sustitucionales, dislocaciones y vacancias generadas durante el AM. Además, se observa la fase Ti- $\gamma$  en la Figura 43 representada por la línea de color azul, se aprecia su primer pico de intensidad (para bajos ángulos) es el más intenso de esta fase y de mayor representatividad.

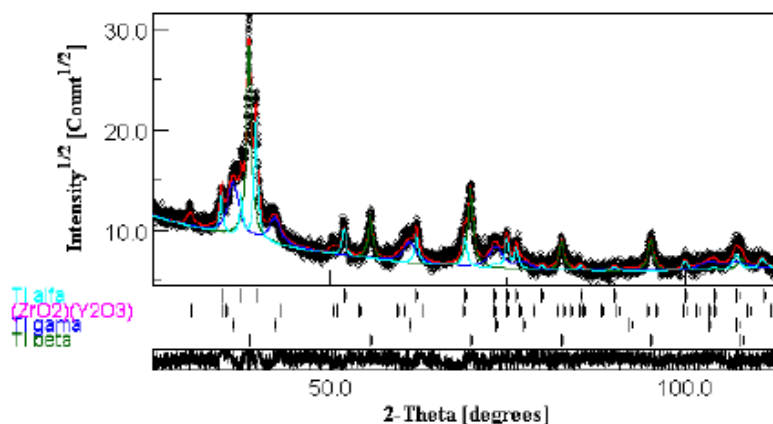


Figura 43. Difractograma de la aleación TiTa3Sn (% atómico).

La Figura 44 se observa el DRX para la aleación Ti13Ta6Sn, presentando la integración de las fases Ti- $\alpha$ , Ti- $\beta$  y Ti- $\gamma$ . En este caso la fase tipo Ti- $\gamma$  presenta picos de baja intensidad, pero con un mayor ensanchamiento de estos lo que se debe a un bajo tamaño de cristalita y la presencia de defectos cristalinos [106].

Se realizó una comparación entre la aleación con 3% y 6% Sn, que presentan un tiempo de AM de 30 y 10 [h] respectivamente. La espuma con 6% Sn presenta una menor microdeformación, generando una menor anchura de los picos (ver Figura 44), debido al menor tiempo efectivo del AM. Este tiempo se traduce a la cantidad de energía entregada a los polvos, transformándose en deformación plástica, fractura de partículas, entre otras características, lo que se confirmó dado los resultados mencionados [107].

Se aprecia en la Figura 44 una mayor cantidad de microdeformación para la fase tipo-  $\beta$ , en comparación a los resultados obtenidos para la aleación Ti13Ta3Sn. Esto se debe a que la energía transferida por los medios de molienda no es suficiente para ser absorbida para la deformación y transformación de las fases Ti- $\alpha$  y Ti- $\beta$ , generando que esta energía se refleje como una acumulación de defectos cristalinos aumentando la microdeformación.

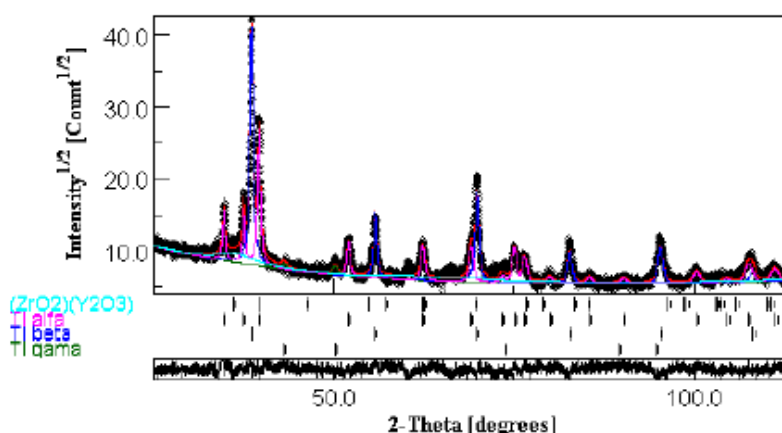


Figura 44. Difractograma de la aleación Ti-Ta-6Sn (% atómico).

La Figura 44 muestra el difractograma de rayos X para la aleación Ti13Ta9Sn, presentando la integración de las fases Ti- $\alpha$  y Ti- $\beta$ , pero a diferencia de las otras aleaciones esta no presenta la cristalización de la fase tipo Ti- $\gamma$ . El tiempo de molienda no es suficiente para lograr la cristalización de los átomos hacia la formación de la fase tipo Ti- $\gamma$  (fcc) [100].

Se realiza una comparación entre la aleación con 6% y 9% Sn, que tienen un tiempo de AM equivalente a 10 [h]. Se obtiene que para un menor contenido de Sn, los picos son más angostos (ver Figura 44), producto a una menor deformación de los planos atómicos al aplicar un bajo tiempo de AM. Pero la microdeformación para ambas aleaciones es similar, dado los resultados del tamaño de cristalita y microdeformación que se aprecian en la Figura 45.

En la aleación Ti13Ta9Sn se detecta la completa solubilidad de este elemento en las fases Ti- $\alpha$  y Ti- $\beta$  (ver Figura 45), generando la estabilización de estas fases.

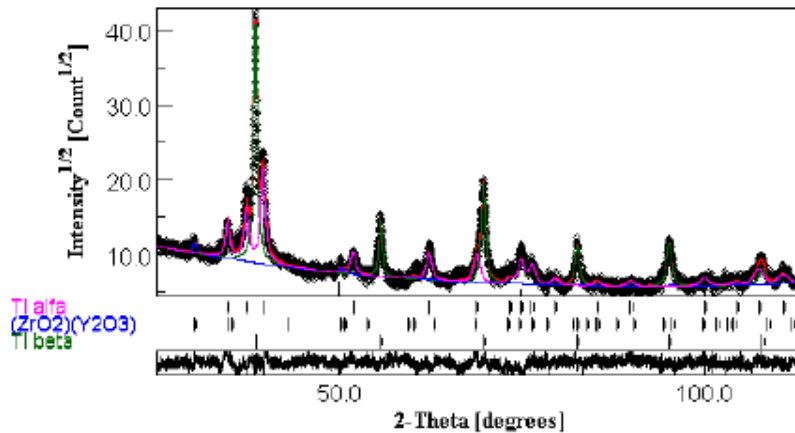


Figura 45. Difractograma de la aleación Ti<sub>13</sub>Ta<sub>9</sub>Sn (%atómico).

La Figura 46 muestra el difractograma de rayos X para la aleación Ti<sub>13</sub>Ta<sub>12</sub>Sn, presentando la integración de las fases Ti- $\alpha$  y Ti- $\beta$ . De igual forma que la aleación con 9% Sn, no presenta la cristalización de la fase tipo Ti- $\gamma$ . Esto se debe a que el tiempo de 15 [h] para el AM no es suficiente para generar la transformación de esta fase.

Al comparar esta aleación con las espumas que contiene 6 y 9% Sn, se observa la presencia de picos con una mayor anchura. Esto se debe a que un mayor tiempo de AM genera un aumentó en la transferencia de la energía de impacto y desgaste hacia las fases estables Ti- $\alpha$  y Ti- $\beta$ , provocando defectos cristalinos puntuales y de red, refinamiento microestructural (modificación del tamaño de cristalita) como; vacancias, intersticios y sustitucionales [108]. También se observa una disminución gradual de la intensidad de los picos en comparación a las aleaciones con un contenido de 6 y 9% Sn.

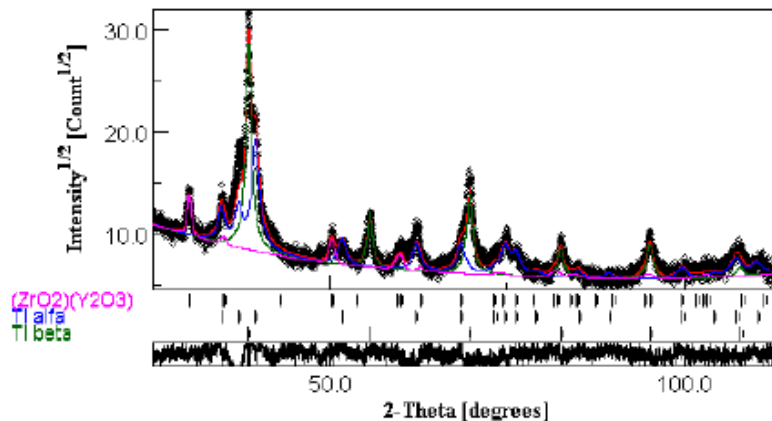


Figura 46. Difractograma de la aleación Ti-Ta-12Sn (%atómico).

Finalizado el proceso de aleado mecánico, se presenta un sistema metaestable donde conviven las fases Ti- $\alpha$ , Ti- $\beta$  y Ti- $\gamma$ , en un estado que corresponde a un mínimo local de energía. Para alcanzar un estado de equilibrio termodinámico fuertemente estable es necesario suministrar una perturbación externa llamada energía de activación, que se logra mediante condiciones de presión y temperatura mediante la sinterización [107].

### 1.3 Estudio antibacteriano

#### a) *Cultivo cepa bacteriana*

Se realizaron los cultivos de las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* a partir de las cepas de colección ATCC 6538 y ATCC 8739 respectivamente, disponible en el Centro de Biotecnología de la UTFSM [109].

Se escoge una colonia de bacteria representativa con una asa de alambre previamente esterilizada y se coloca sobre el medio de cultivo sólido dispuesto en una capsula petri, para luego ser ingresada a la incubada durante 18 [h] a 37 [°C] para generar una cepa de reserva o modelo. Cabe destacar que se debe realizar de la forma detallada en el ítem “preparación cepa modelo” y generar un crecimiento más cercano a la Figura 26, los resultados se aprecian en la Figura 47.

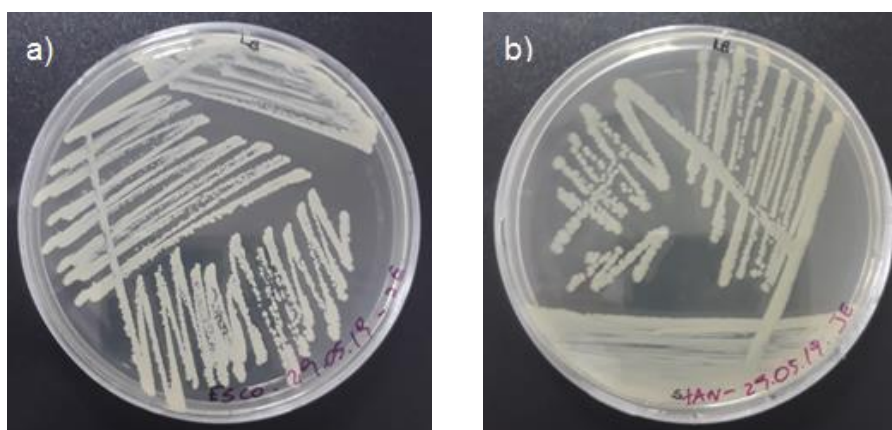


Figura 47. Cultivo cepa (a) *Escherichia coli* y (b) *Staphylococcus aureus* en medio de cultivo sólido.

A partir de la cepa modelo, se realizó el crecimiento bacteriano en un medio de cultivo líquido llamada cepa de trabajo. Estas cepas se utilizan para realizar los ensayos en el laboratorio, debido a que en este estado es posible ajustar la densidad óptica y generar un crecimiento inicial controlado.

En un tubo de ensayo con 5 [ml] de medio de cultivo líquido, se ingresa un asa de madera o moldadientes, que contiene una colonia bacteriana representativa de la cepa de la Figura 47. Luego se ingresan a la incubadora orbital durante 18 [h] a 37 [°C] y 250 [rpm], obteniendo la cepa bacteriana en un medio de cultivo líquido como se aprecia en la Figura 48.

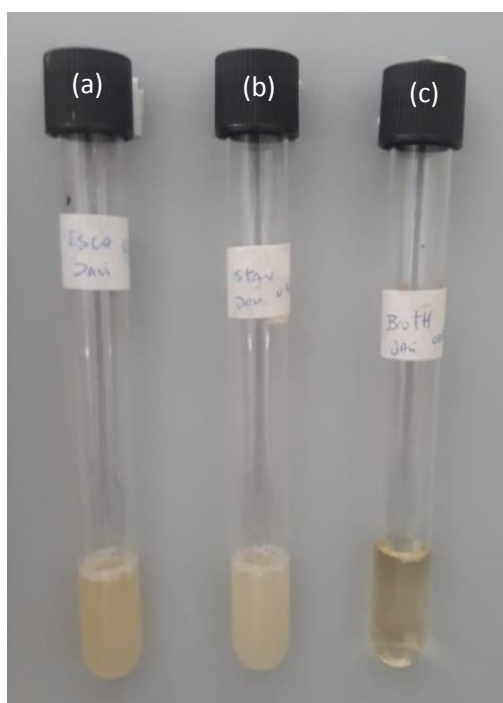


Figura 48. Cultivo de las cepas a) *Staphylococcus aureus* y b) *Escherichia coli* en c) medio de cultivo líquido o broth.

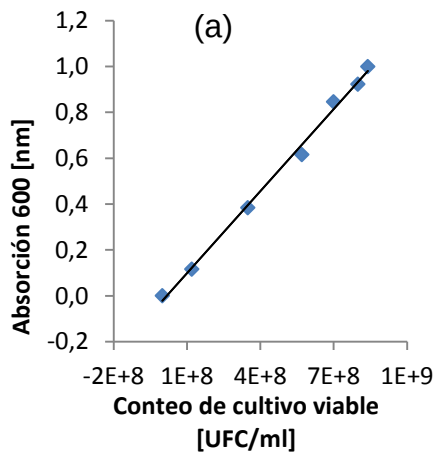
En cada ensayo se realizó un nuevo crecimiento de las cepas bacterianas. Si estas cepas permanecen un mayor tiempo, comienzan las etapas estacionaria y de muerte, generando una disminución de los microorganismos presentes. Estas etapas se detallan en el ítem de resultado “curva de crecimiento bacteriano”.

### **b) Curva de calibración**

Para realizar ensayos microbiológicos bajo condiciones equivalentes, se requiere trabajar con la misma cantidad de biomasa en una fase de crecimiento similar. Las formas para medir la biomasa y determinar las fases de crecimiento en la misma es utilizando el equipo de espectrofotómetro y el método de conteo en placa.

El espectrofotómetro entrega la absorbancia medida, la cual no es una medida directa del número de células viables ya que esta considera las bacterias presente tanto vivas o muertas. En cambio, el método de conteo en placa permite cuantificar el número de bacterias viables, es decir, bacterias vivas capaces de formar colonias.

En la Figura 49 se muestra la curva de calibración realizada que relaciona la absorbancia con las unidades formadoras de colonias por ml [UFC/ml] para las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Para obtener una curva de calibración representativa, los ensayos se realizaron por duplicado y cada ensayo se repitió tres veces en forma independiente.



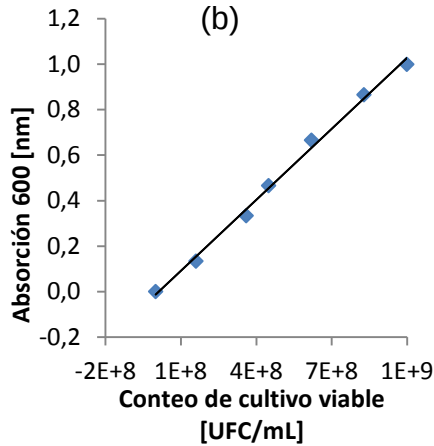


Figura 49. Curva de calibración del método de absorción y conteo de cultivo viable de las bacterias (a) *Staphylococcus aureus* (STAU) y (b) *Escherichia coli* (COLI).

Se obtuvo un coeficiente de regresión (R) de 0,9958 y 0,9955 [-] para las cepas bacteriana STAU y COLI respectivamente, además de la ecuación de la línea de mejor ajuste es:

$$Y_{\text{abs}}(\text{STAU}) = 1,19 \cdot 10^{-9} \frac{\text{abs}}{\text{ufc} \cdot \text{ml}^{-1}} X_{\text{ufc}} \frac{\text{ml}}{\text{ml}} + 0,0215_{\text{abs}} \quad (5)$$

$$Y_{\text{abs}}(\text{COLI}) = 1,04 \cdot 10^{-9} \frac{\text{abs}}{\text{ufc} \cdot \text{ml}^{-1}} X_{\text{ufc}} \frac{\text{ml}}{\text{ml}} + 0,0127_{\text{abs}} \quad (6)$$

El alto coeficiente de regresión confirma que hay una relación lineal entre la absorbancia y el cultivo viable de las bacterias STAU y COLI.

**c) Curva de crecimiento bacteriano**

Se realizó la curva de crecimiento de las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Un tubo de ensayo que contiene 5 [ml] de medio de cultivo, se inoculó con las cepas bacterianas en la fase exponencial de crecimiento con una densidad óptica de 0,1 [-].

En la Figura 50 se observa la curva de crecimiento de las colonias viables de las cepas STAU y COLI. Los ensayos para determinar la cinética de crecimiento se realizó en duplicado y tres veces en forma independiente.

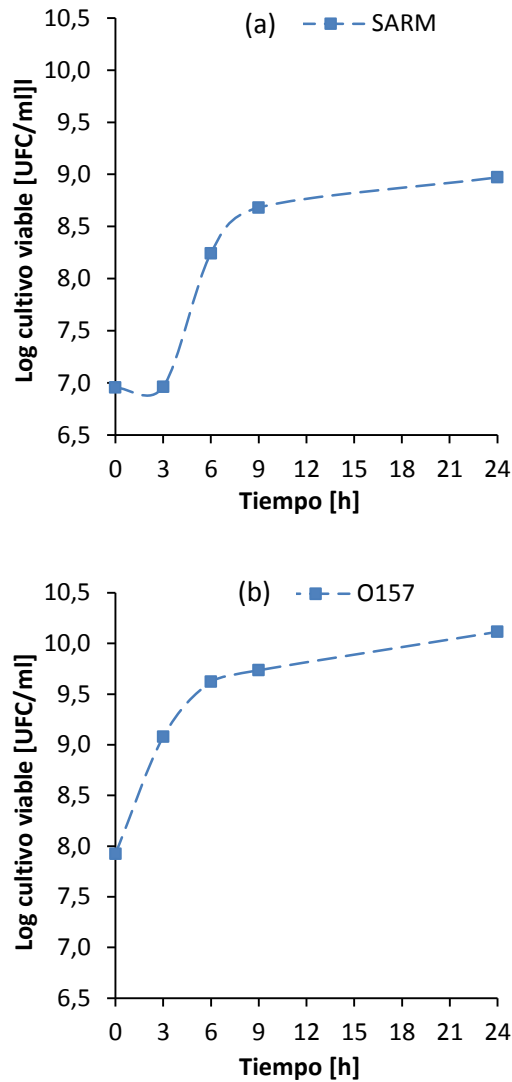


Figura 50. Cinética de crecimiento de las bacterias *Staphylococcus aureus* (STAU) y *Escherichia coli* (COLI).

A partir de la curva de coordenadas logarítmicas, se deduce que la bacteria *Staphylococcus aureus* (ver Figura 50 (a)) presenta una fase de latencia o adaptación en un rango de 3 a 6 [h] y la fase estacionaria presenta un tiempo superior a 24 [h].

La cepa bacteriana *Escherichia coli* (ver Figura 50 (b)) presenta una fase de adaptación con un tiempo menor a 3 [h] y la fase estacionaria presenta un tiempo superior a 24 [h].

Según la clasificación descrita en el Anexo 3, no se lograron las fases estacionarias y de muerte para las cepas STAU y O15, dado que el ciclo total de estas es superior a 1 día [112-113].

Estudios anteriores han demostrado que la fase estacionario de la bacteria COLI se logra en tiempo superiores a 40 [h] y para la bacteria STAU se logra alrededor de 140 [h] [112].

Dado los resultados obtenidos, se realizaron los ensayos bacterianos de las cepas STAU y COLI en contacto a las espumas metálicas de Ti-Ta-Sn a un tiempo de 18 [h], con el objetivo de operar en la fase exponencial y tener un cultivo bacteriano con una alta viabilidad.

***d) Selección de antibiótico como control positivo***

Se estudia la sensibilidad de los microorganismos STAU y COLI a los antibióticos gentamicina (G), ampicilina (A), kanakicina (K), estreptomicina (S) y tetraciclina (T). Se utiliza el método del antibiograma disco-placa, en donde se midió el área de inhibición utilizando el software Imagen J y se calculó el área porcentual (ver ecuación (2)) para realizar una comparación entre las diferentes variables [113]. Se consideró el área total de cada pocillo como control.

Los resultados del área porcentual obtenidos para las dos se observan en la Figura 51 y en el Anexo 6 se aprecia las imágenes obtenidas experimentalmente de los halos formados. Los ensayos se realizaron, variando la densidad óptica de las bacterias entre 0,1 - 0,2 [-] y una adición de antibiótico 50 - 100 [ $\mu$ L].

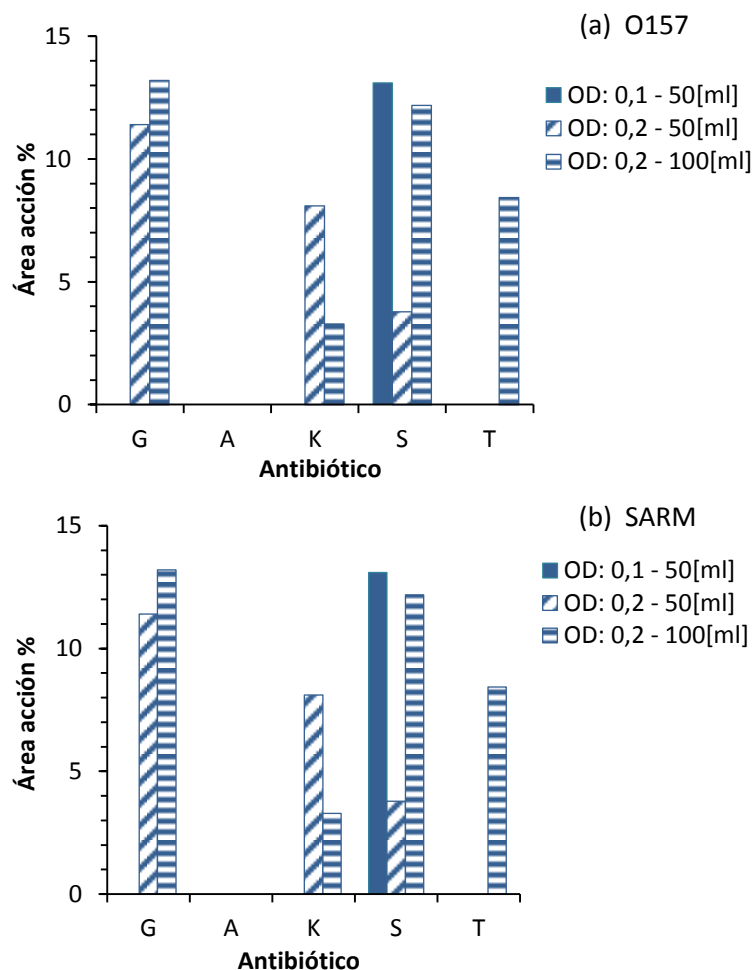


Figura 51. Sensibilidad de los microorganismos (a) STAU y (b) COLI a los antibióticos gentamicina (G), ampicilina (A), kanakicina (K), estreptomicina (S) y tetraciclina (T).

La bacteria *Escherichia coli* (ver Figura 51 (a)) presenta una actividad sensible para los antibióticos gentamicina (G) para una densidad óptica (OD) de 0,2 [-] y estreptomicina (S) con una OD de 0,1[-] con la adición de 50 [μL] y una OD de 0,2[-] y 50 [μL] de antibiótico. A su vez una actividad intermedia para una OD de 0,2 [-] con una adición de 50 [μL] y 100 [μL] de kanakicina (K), a su vez los antibióticos con una OD de 0,2[-] y 50 [μL] de estreptomicina (S), OD de 0,2[-] y 100 [μL] de kanakicina (K). Finalmente, se observa una actividad resistente en relación al antibiótico ampicilina (A) en todas las variables estudiadas, para el antibiótico tetraciclina (T) con una OD de 0,2[-] y 50 [μL] y los antibióticos G, K y T con una densidad óptica de 0,1[-] y una adición de 50 [μL] [82].

La bacteria *Staphylococcus aureus* (ver Figura 51 (b)) presenta una actividad sensible frente a los antibióticos S y K para una OD 0,2 [-] y adición de 100 [μL], de igual forma los antibióticos G y S con una OD de 0,2[-] y 0,1[-] respectivamente con la adición de 50 [μL]. Se presenta una actividad intermedia para los antibióticos K y S con una OD de 0,2[-] con 50 [μL] y para K y T con una OD de 0,2[-] con 100 [μL]. Finalmente una respuesta resistente en contacto a los antibióticos G, K y T con una OD de 0,1[-] con 50 [μL], además de T a OD de 0,2[-] con 50 [μL] y A en todas las variables [82].

Dado los resultados se utiliza el antibiótico estreptomycin (S) con una adición de 50 [μL] y un ajuste de la densidad óptica de 0,1 [-] de las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

**e) Control negativo, positivo, neutro y blanco en el ensayo bacteriano en relación a las probetas de Ti-Ta-Sn**

Se realizaron pruebas de control negativo, positivo, neutro y blanco en celdillas aisladas de cada placa 12 (ver Figura 27), para los ensayos bacterianos en contacto con las espumas metálicas de Ti-Ta-Sn.

Los controles se realizan para identificar la contaminación cruzada o externa de algún microorganismo, con una lectura inmediata.

**i. Control negativo**

En la Figura 52 se observa el control negativo de las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* con una densidad óptica de 0,1 [-], luego de 18 [h] de incubación. Se obtiene un medio turbio y homogéneo, sin crecimientos anormales por lo que no existió contaminación cruzada entre las cepas bacterianas u otro microorganismo.

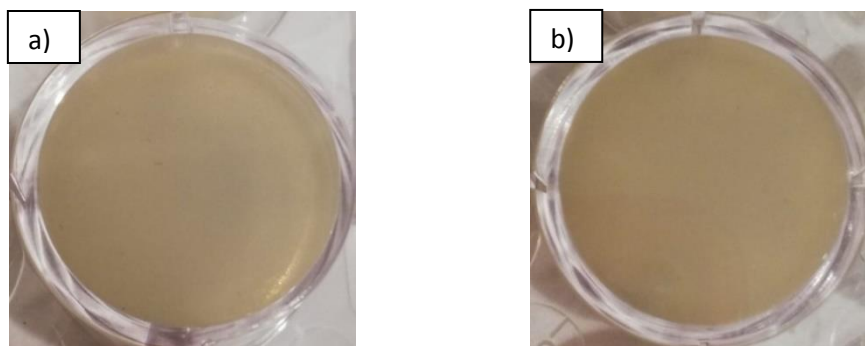


Figura 52. Resultado de control negativo en ensayo bacteriano de la aleación Ti-Ta-Sn sobre las bacterias a) *Escherichia coli* y b) *Staphylococcus aureus*.

### **ii. Control positivo**

Se observa en la Figura 53 los resultados del control positivos, los discos impregnados con 50 [μL] de estreptomicina generan un halo homogéneo y sólido por lo que se confirma la acción sensible del antibiótico, además no se encuentra la presencia de contaminación bacteriana.

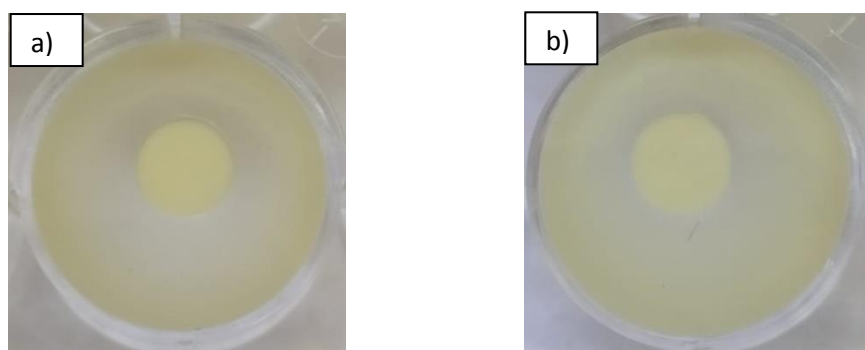


Figura 53. Resultado de control positivo en ensayo bacteriano de la aleación Ti-Ta-Sn sobre las bacterias a) *Escherichia coli* y b) *Staphylococcus aureus*.

### **iii. Control neutro**

En la Figura 54 se encuentran los resultados de controles neutros en cada celdilla contiene medio de cultivo semi sólido con una probeta de la aleación a estudiar. Se observa que no existe contaminación cruzada o la presencia otro microorganismo, de igual forma se confirma la eficiencia del procedimiento de esterilización con el equipo autoclave de las espumas de Ti.

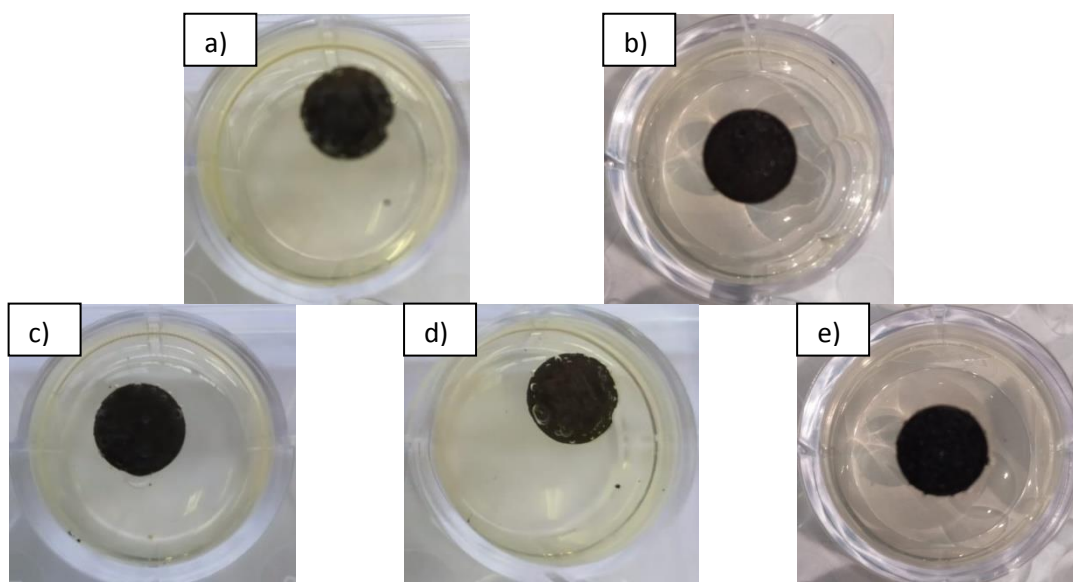


Figura 54. Resultado de control neutro en ensayo bacteriano sobre las aleación Ti-13Ta-xSn (% atómico) a) 0%Sn, b) 3% Sn, c) 6% Sn, d) 9% Sn y e) 12%Sn.

#### **iv. Blanco**

Finalmente en la Figura 53 se observa el resultado del control blanco, que contiene solo medio de cultivo semi sólido sin ninguna cepa bacteriana agregada. Se observa que el medio de cultivo no presenta turbidez, es homogéneo y transparente, por lo que se confirma que no existe contaminación bacteriana u otro microorganismo.



Figura 55. Resultado de control blanco en ensayo bacteriano de la aleación Ti-Ta-Sn.

#### **f) Crecimiento bacteriano en probetas de Ti-Ta-Sn**

En la Figura 56 y Figura 57 se observan el crecimiento de la cepa bacteriana *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* respectivamente, en contacto con las espumas metálicas de Ti-Ta-Sn. Dada la nula respuesta, la variación de estaño en las espumas de Ti no presenta propiedades bactericidas y bacteriostáticas.

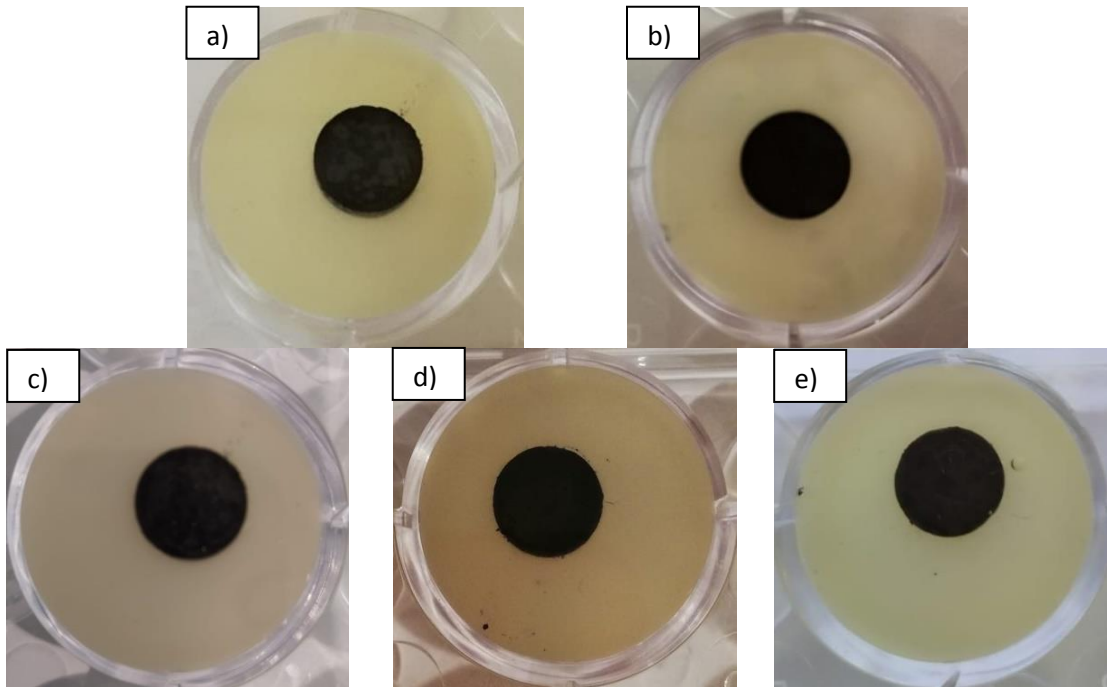


Figura 56. Resultado de ensayo bacteriano sobre *Escherichia coli* en las sobre las aleaciones a) Ti-13Ta, b) Ti-13Ta-3Sn, c) Ti-13Ta-6Sn, d) Ti-13Ta-9Sn y e) Ti-13Ta-12Sn (% atómico).

Se realizaron pruebas con la aleación Ti13Ta (ver Figura 56 (a) y Figura 57 (a)) para ser utilizada como control, pero no se obtuvo una respuesta positiva. Estudios anteriores evaluaron la eficiencia de esta aleación para eliminar bacterias, virus, hongos o levaduras. Sin embargo, la mayoría de estas pruebas se realizaron en soluciones acuosas, lo que puede generar una variación en el crecimiento producto que este medio de cultivo genera una mayor penetración en la espuma metálica, generando una mayor superficie de contacto y a su vez una mayor área de acción de la aleación metálica sobre las cepas bacterianas [116-118].

Otras variaciones que pueden presentarse entre estos estudios son la humedad, agitación, dimensiones de las probetas metálicas, la cepa bacteria objetivo, concentración inicial de las bacterias y tiempo del crecimiento bacteriano [116-117, 119-120].

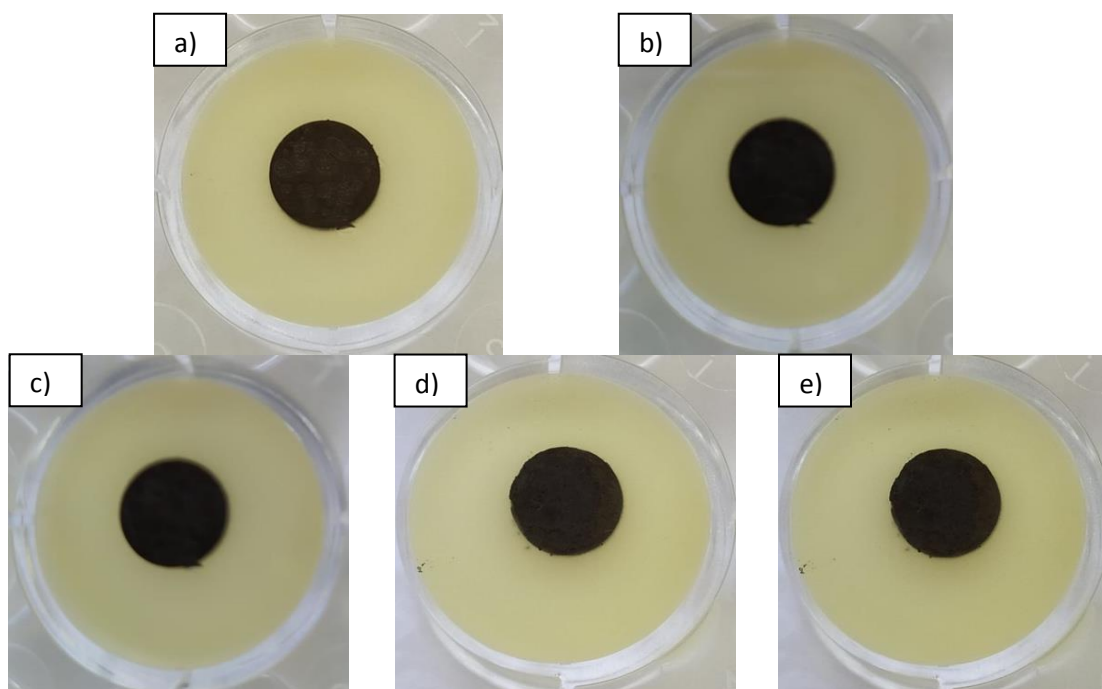
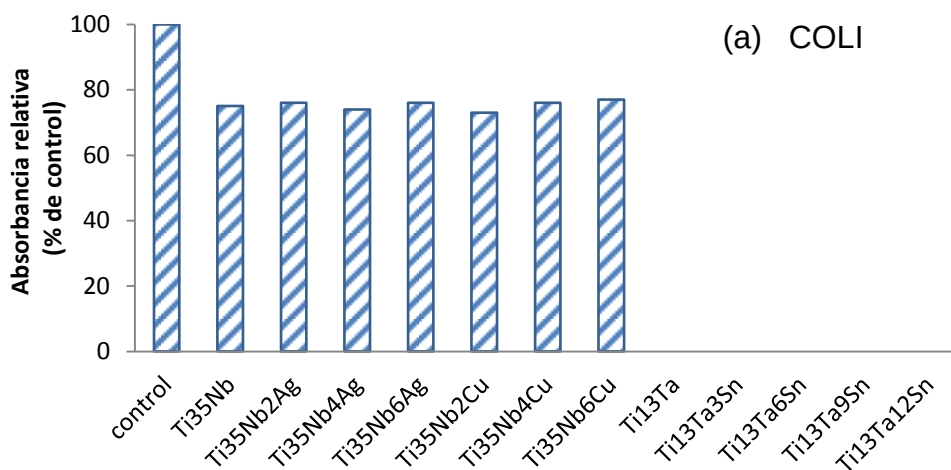


Figura 57. Resultado de ensayo bacteriano sobre *Staphylococcus aureus* en las sobre las aleaciones a) Ti-13Ta, b) Ti-13Ta-3Sn, c) Ti-13Ta-6Sn, d) Ti-13Ta-9Sn y e) Ti-13Ta-12Sn (% atómico).

Estudios realizados a espumas metálicas de Ti-Ni-Cu y Ti-Nb-Ag utilizando el mismo método de crecimiento bacteriano de las cepas STAU y COLI durante 24 [h] obtuvieron resultados positivos. Se logró la inhibición de la cepa COLI y STAU alrededor de un 75% y 68% respectivamente en relación al control de probetas de Cu puro, cuyos resultados se aprecian en la Figura 58 [119].



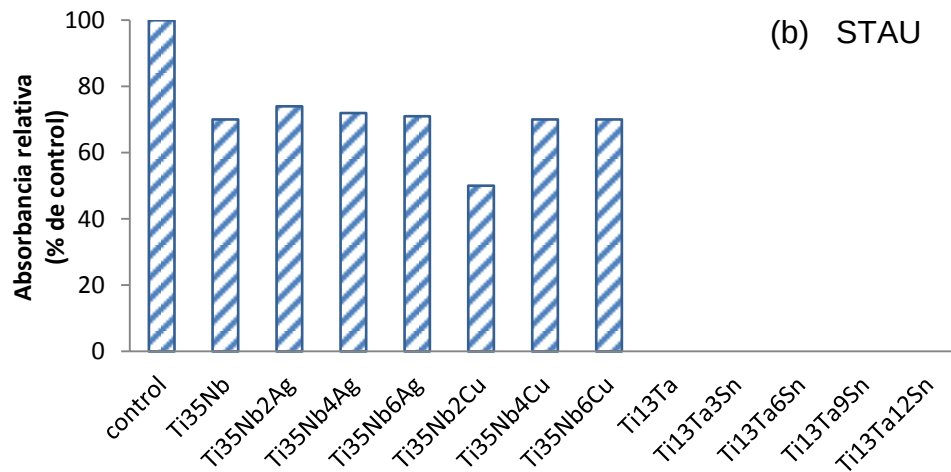


Figura 58. Absorbancia relativa de las cepas (a) *Escherichia coli* (COLI) y (b) *Staphylococcus aureus* (STAU) tras el test MTS de 24 y 18 [h] con respecto al control [119]

En la Tabla 19 se presenta el porcentaje de las fases tipo  $\alpha$  y  $\beta$  de las espumas Ti-Ni-Cu y Ti-Nb-Ag, obtenidas mediante difracción de rayos X (DRX). En los difractogramas (ver Figura 66 y Figura 67 en Anexo 7) de las aleaciones Ti35NbxCu y Ti35NbxAg son muy similares a las espumas de Ti-Ta-Sn y predomina la fase tipo  $\beta$ , la diferencia principal se encuentra en el pico de fase  $\alpha$  en los  $38^\circ$ , los cuales es marcado en las aleaciones Ti35NbxCu, pero es difícil de apreciar para las aleaciones Ti35NbxAg.

Tabla 19. Porcentaje de las fases obtenidas de las aleaciones Ti35NbxCu y Ti35NbxAg a partir del análisis de los difractogramas de cada aleación mediante el Software MAUD [119].

| Aleación  | Fase Ti- $\alpha$ (% peso) | Fase Ti- $\beta$ (% peso) |
|-----------|----------------------------|---------------------------|
| Ti35Nb2Cu | 33,6                       | 61,3                      |
| Ti35Nb4Cu | 34,0                       | 61,0                      |
| Ti35Nb6Cu | 33,6                       | 61,4                      |
| Ti35Nb2Ag | 33,4                       | 61,7                      |
| Ti35Nb4Ag | 33,0                       | 62,0                      |
| Ti35Nb6Ag | 33,2                       | 61,8                      |
| Ti35Nb    | 33,2                       | 61,8                      |

Se realizó una comparación con los resultados obtenidos de DRX de la aleación Ti-Ta-Sn (ver Tabla 20) con las espumas de Ti-Ni-Cu y Ti-Nb-Ag. En todos los casos existe una predominancia de la fase tipo  $\beta$ , con similares valores y picos que se observan en los difractogramas (ver Figura 66 y Figura 67 en Anexo 7 y Figura 43, Figura 44, Figura 45 y Figura 46) que presentan una similar predominancia.

Por lo tanto, estas espumas metálicas son similares en relación a las fases presentes, pero la actividad bacteria es nula para la aleación Ti-Ta-Sn por lo que se presume que el tipo de fase presente no tiene influencia en la cinética bacteriana de las cepas STAU y COLI, lo cual es abalado por otros estudios anteriores [44,120-123].

Tabla 20. Porcentaje de las fases obtenidas de las aleaciones Ti<sub>13</sub>Ta<sub>x</sub>Sn a partir del análisis de los difractogramas de cada aleación mediante el Software MAUD [119].

| Aleación                             | Fase Ti- $\alpha$<br>(% peso) | Fase Ti- $\beta$<br>(% peso) | Fase Ti- $\gamma$<br>(% peso) |
|--------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Ti <sub>13</sub> Ta <sub>3</sub> Sn  | 34                            | 55                           | 8                             |
| Ti <sub>13</sub> Ta <sub>6</sub> Sn  | 33                            | 57                           | 1                             |
| Ti <sub>13</sub> Ta <sub>9</sub> Sn  | 41                            | 58                           | 0                             |
| Ti <sub>13</sub> Ta <sub>12</sub> Sn | 43                            | 52                           | 0                             |

Otra variable presente a estudiar es el tamaño y porcentaje de porosidad presente en las espumas metálicas, ya que este valor cambia el área de contacto entre la aleación y las cepas bacterianas. En la Tabla 21 se observan las porosidades de las aleaciones Ti-Ta-Sn en comparación a las aleaciones Ti-Nb-Cu y Ti-Nb-Ag. Se obtiene una relación inversamente proporcional entre la porosidad y la cinética de crecimiento de las cepas STAU y COLI. Sin embargo, no se puede confirmar el efecto de esta variable, ya que existen otros estudios que contradicen lo planteado [44, 121-125].

Tabla 21. Porcentaje de porosidad experimental de las aleaciones Ti-Ta-Sn, Ti-Nb-Cu y Ti-Nb-Ag [119].

| Aleación   | Porosidad (% v/v) | Aleación  | Porosidad (% v/v) |
|------------|-------------------|-----------|-------------------|
| Ti13Ta3Sn  | 40                | Ti35Nb2Cu | 7,4               |
| Ti13Ta6Sn  | 40                | Ti35Nb4Cu | 5,3               |
| Ti13Ta9Sn  | 43                | Ti35Nb6Cu | 3,6               |
| Ti13Ta12Sn | 50                | Ti35Nb2Ag | 7,0               |
|            |                   | Ti35Nb4Ag | 8,0               |
|            |                   | Ti35Nb6Ag | 10,0              |
|            |                   | Ti35Nb    | 7,0               |

**g) Crecimiento bacteriano en polvos de Ti13Ta3Sn (% atómico).**

Para complementar el estudio de la aleación, se cuantifico el crecimiento bacteriano en contacto a polvos de la aleación Ti13Ta3Sn obtenidos mediante el AM.

Los estudios sobre el mecanismo de acción antibacteriana de las partículas, que causa inhibición del crecimiento bacteriano es atribuido principalmente a dos factores: i) capacidad de la nanopartículas de unirse a la membrana bacteriana por interacción electrostática causando despolarización y alteración de su integridad lo que produce filamentación de la bacteria y ii) internalización de las nanopartículas a través de los poros de la membrana bacteriana produciendo la desestabilización de la composición de la membrana e interrupción del transporte de electrones, oxidación de proteínas, degradación del DNA, perturbaciones y destrucción de las mitocondrias, lo que conduce a la muerte de la bacteria.

En la Figura 59 se presentan los resultados obtenidos para determinar la actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano por nanopartículas de Ti-Ta-Sn. Se observa que las nanopartículas no mostraron ningún efecto inhibitorio en las dos cepas bacterianas estudiadas.

Estudios anteriores han demostrado que el rol de las nanopartículas obtenidas y la sensibilidad de las bacterias, no solo se relaciona a la estructura de la pared bacteriana, si no que existen factores adicionales que influyen en la susceptibilidad o tolerancia de las bacterias a estas nanoestructuras [126- 127].

Los resultados de crecimiento bacteriano en contacto con los polvos de Ti-Ta-Sn se cuantificaron mediante la densidad óptica y unidad formadora de colonias [UFC/ml]. Pero como se mencionó anteriormente, la DO se relaciona con la turbidez que presente el medio de cultivo. Se infiere, que la presencia de los polvos metálicos aumentó la turbidez dada la naturaleza de estos, por lo que este resultado no fue tomado en consideración y se trabajó con los resultados obtenidos mediante unidad formadora de colonias por ml [125].

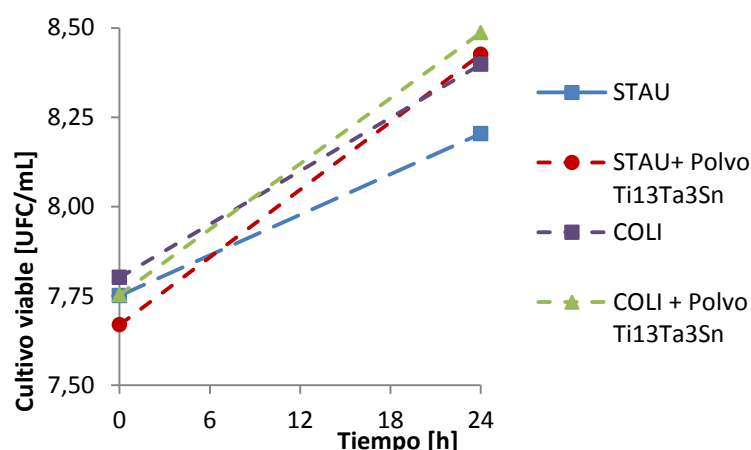


Figura 59. Curva de crecimiento de las bacterias *Staphylococcus aureus* (STAU) y *Escherichia coli* (COLI) en un medio de cultivo con y sin la presencia de polvos de Ti13Ta3Sn.

Otro parámetro relevante es el tamaño de las partículas, ya que reportes anteriores han descrito el comportamiento de las nanopartículas de CuO sobre las bacterias, obteniendo resultados negativos para polvos obtenidos por AM. En cambio, para nanopartículas del mismo material obtenida mediante otro método, determinó que la bacteria *Escherichia coli* es susceptible a nanopartículas de CuO y la bacteria *Staphylococcus aureus* es menos susceptible. Por lo tanto el tamaño de grano del cobre es determinante para inhibir el crecimiento de las bacterias, lo que se podría extrapolar para la aleación Ti-Ta-Sn [126, 129-130].

La concentración mínima inhibitoria (CMI) que corresponde a la concentración mínima de nanopartículas necesaria para la inhibición del crecimiento de los microorganismos, y por otro lado, la concentración bactericida mínima (CMB) que es la concentración mínima de nanopartículas necesaria para eliminar el 99,9%

o más del inoculó bacteriano inicial son parámetros relevante para cuantificar la actividad antimicrobiana que presentan las nanopartículas.

Estudios anteriores, han investigado los valores de CMI y CMB de las nanopartículas en función de la concentración de plata en la bacteria *Escherichia coli*, como se aprecia en Figura 60.

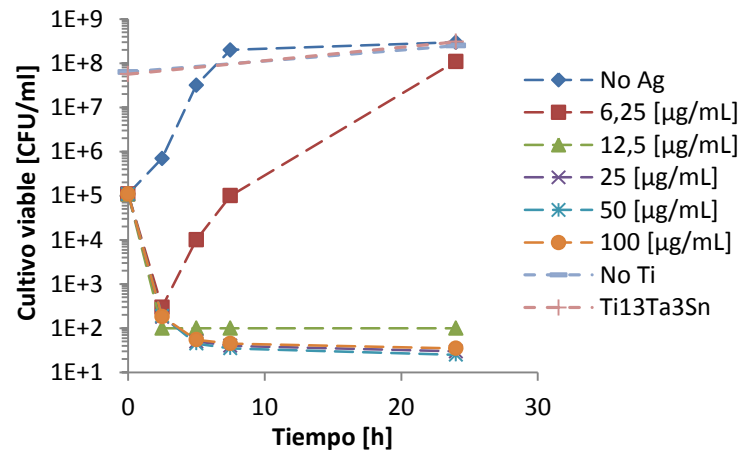


Figura 60. Curva de crecimiento de *Escherichia coli* frente a diferentes cantidades de nanopartículas de plata [128].

En la Figura 60 se observa que a concentraciones igual o mayor a 12,5 [µg/ml] resulta casi completa la inhibición de la bacteria *Escherichia coli*, después de su adición al agente bactericida durante solamente 2,5 [h]. Pero a concentraciones de 6,25 [µg/ml] esta presenta una disminución del crecimiento bacteriano pero no logra inhibir completamente este crecimiento. Durante el procedimiento experimental con las nanopartículas de Ti-Ta-Sn, se utilizó una concentración inicial de 2,5 [µg/ml], se infiere que este valor inicial es significativo en relación al contacto con la bacteria *Escherichia coli* [128].

Cabe destacar, que los resultados obtenidos son considerados inconcluyentes, debido a que los ensayos se realizaron en duplicados y solo se repitió una vez de forma independiente. Además se sugiere para próximos investigaciones, la medición de la densidad óptica en mayores intervalos de tiempo y cuantificar mediante el procedimiento de UFC, para realizar una comparación entre ambos métodos y determinar claramente el efecto de las partículas en la medición de las colonias bacterias.

## Capítulo 5: Conclusiones

Posterior al aleado mecánico los polvos presentaron una morfología irregular, con algunas partículas aglomeradas con bordes redondeados y otros dispersos. Con una tendencia a una morfología esférica, ya que representan el estado de mínima energía libre de Gibbs y el efecto de soldadura en frío durante el proceso, descartando la predominancia de la fractura de los polvos.

Luego de la sinterización las probetas sufren un aumento del diámetro y disminución de la altura, generando una mayor contracción volumétrica. Existe una relación inversamente proporcional entre la contracción y la adición de Sn, a su vez una relación directamente proporcional respecto a la porosidad. Esto ocurre debido a que los poros son deformados o sustituidos a una mayor contracción y el Sn evita este problema ya que aumenta la fuerza de unión entre las partículas.

Las espumas de Ti-Ta-Sn presentan poros homogéneos, confirmando la eficiencia del proceso de mezclado, ya que no existe una segregación durante el proceso. El diámetro equivalente se encuentra en el rango 200 a 400  $\mu\text{m}$ , revalidando que no existe cambio significativo de morfología del espaciador durante el proceso.

La cinética de crecimiento de las bacterias STAU y COLI, presenta una fase latente entre 3 a 6 [h] y  $\leq 3$  [h] respectivamente. La fase estacionaria de esta es  $\geq 24$  [h], los experimentos se realizaron en la fase exponencial a 18 [h]. El coeficiente de regresión entre la absorbancia y UFC/ml es superior a 0,99 [-], confirmando la viabilidad de las bacterias.

Los controles negativos, positivos, neutros y blancos presentan un crecimiento normal, con halos homogéneos y no existe contaminación producto de otro microorganismo, ratificando la eficiencia de esterilización y el método experimental. Se logra una respuesta resistente con estreptomicina con una adición de 50  $\mu\text{L}$  y una densidad óptica 0,1 [-] para ambas cepas bacterianas.

Las espumas metálicas de Ti-Ta-Sn no generaron la inhibición de las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Dado los objetivos planteados, se obtiene una respuesta negativa en relación a la variación de Sn y tipo de fases presente, ya que no tienen propiedades bactericidas y bacteriostáticas.

## Capítulo 6: Referencias

- [1] M. Windows, M. Corporation, K. Hori, and A. Sakajiri, "Informe mundial sobre el envejecimiento," p. 282, 2015.
- [2] INE|Instituto Nacional de Estadísticas Chile, "Compendio Estadístico 2018 | Encuesta de cosecha de cultivos anuales (2017-2018)," p. 348, 2018.
- [3] Y. Li, C. Yang, H. Zhao, S. Qu, X. Li, and Y. Li, "New developments of ti-based alloys for biomedical applications," *Materials (Basel)*., vol. 7, no. 3, pp. 1709–1800, 2014.
- [4] T. Hanawa, "Recent development of new alloys for biomedical use," *Mater. Sci. Forum*, vol. 512, pp. 243–248, 2006.
- [5] A. Carman, L. C. Zhang, O. M. Ivasishin, D. G. Savvakín, M. V. Matviychuk, and E. V. Pereloma, "Role of alloying elements in microstructure evolution and alloying elements behaviour during sintering of a near- $\beta$  titanium alloy," *Mater. Sci. Eng. A*, vol. 528, no. 3, pp. 1686–1693, 2011.
- [6] J. F. Smith, "Introduction To Phase Diagrams," *Methods Phase Diagr. Determ.*, vol. 3, pp. 1–21, 2007.
- [7] F. H. Froes, "History and Extractive Metallurgy\*," *Titanium—Physical Metall. Process. Appl.*, p. 29, 2015.
- [8] Murray, J. L., Liao, P. K. and Spear, K. E., *The Ti–B (titanium–boron) system. In Phase Diagrams of Binary Titanium Alloys*. 1987.
- [9] M. Geetha, A. K. Singh, R. Asokamani, and A. K. Gogia, "Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review," *Prog. Mater. Sci.*, vol. 54, no. 3, pp. 397–425, 2009.
- [10] G. He and M. Hagiwara, "Ti alloy design strategy for biomedical applications," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 26, no. 1, pp. 14–19, 2006.
- [11] X. Jian, C. Hao, Q. Guibao, and Y. Yang, "Titanium foam for cancellous bone

implant prepared by space holder technique,” *TMS Annu. Meet.*, no. CONF CODEN NUMBER, pp. 737–744, 2016.

- [12] S. D. M. Dr. Marco Fernández Blest, Dr. Miguel García Deltoro. Interna and C. Valenciana, “Infecciones asociadas a dispositivos.”
- [13] F. Rojas, “Cepas: Material de referencia, manejo y aplicaciones en el área de microbiología,” 2016.
- [14] F. H. Froes, “Titanium Physical Metallurgy Processing and Applications,” 2015.
- [15] I. Conference *et al.*, “Sintering and Reaction Behaviour in Ni-Ti Powder Mixtures Sina, Hossein; Iyengar, Srinivasan; Melin, Solveig,” 2019.
- [16] C. M. Villar, “Pulvimetalurgia: En busca de nuevos materiales,” *Met. actual*, vol. 14, pp. 4–9, 2009.
- [17] A. Nouri, K. A. Nazari, and T. B. Hilditch, “Advances in powder metallurgy and particulate materials,” *Ind. Lubr. Tribol.*, vol. 50, no. 3, pp. 167–174, 1998.
- [18] A. Cervantes, “Construcción de un atomizador con agua para obtener polvos de aluminio.” 2006.
- [19] D. G. Oribe, “Compactación en Caliente de Polvo de Zinalco,” 2006.
- [20] T. Doctoral, “EL TITANIO Y SUS ALEACIONES.”
- [21] J. L. Femenía, “Caracterización de aleaciones Ti-Nb-Ta obtenidas por vía pulvimetalúrgica TESIS FINAL DE MASTER Caracterización de aleaciones Ti-Nb-Ta obtenidas por vía pulvimetalúrgica DEPARTAMENTO DE INGENIERIA MECÁNICA Y DE MATERIALES,” *Tesis de magister*, pp. 1–180, 2014.
- [22] T. Gessner, “Triarylmethane and Diarylmethane Dyes,” *Ullmanns Encycl. Ind. Chem.*, vol. 37, no. January 2018, pp. 425–474, 2012.

- [23] Y. M. Ahmed, K. Salleh, M. Sahari, M. Ishak, and B. A. Khidhir, "Titanium and its Alloy," vol. 3, no. 10, pp. 1351–1361, 2014.
- [24] A. V. Escuder and V. A. Borrás, "Análisis del efecto de los aleantes en titanio pulvimetalúrgico.," p. 117, 2014.
- [25] B. Arifvianto and J. Zhou, "Fabrication of metallic biomedical scaffolds with the space holder method: A review," *Materials (Basel)*., vol. 7, no. 5, pp. 3588–3622, 2014.
- [26] F. Gil and J. Planell, "Aplicaciones biomédicas del titanio v sus aleaciones," *Biomecánica*, no. JANUARY 1993, pp. 34–42, 1993.
- [27] C. Darwin, "Un Nuevo Método para la Fabricación de Espumas Metálicas Aleatorias de Célula Abierta con Regularidad Controlada," vol. 38, no. 2, 2017.
- [28] J. A. Gutiérrez-Vázquez and J. Oñoro, "Espumas de aluminio. Fabricación, propiedades y aplicaciones," *Rev. Metal.*, vol. 44, no. 5, pp. 457–476, 2008.
- [29] I. A. I. CASTRO, "Caracterización mecánica de espumas metálicas y su aplicación en sistemas de absorción de energía," p. 330, 2012.
- [30] Á. Roberto, C. Pérez, H. P. Mora, L. Antonio, and A. Cortés, "Obtención del módulo de young efectivo de una espuma de celda cerrada 1," pp. 725–734, 2011.
- [31] T. Alejandra and A. Barrientos, "ESFUERZO DE FLUENCIA EN ESPUMAS DE Ti-Ta-Sn," 2018.
- [32] R. A. Tolosa, "Influencia de la porosidad sobre la resistencia del aluminio sinterizado," *Cienc. e Ing.*, vol. 25, no. 1, pp. 67–73, 2004.
- [33] L. Pérez, S. Lascano, C. Aguilar, D. Domancic, and I. Alfonso, "Simplified fractal FEA model for the estimation of the Young's modulus of Ti foams obtained by powder metallurgy," *Mater. Des.*, vol. 83, pp. 276–283, 2015.

- [34] Y. Ginebra Molins, Maria Pau, Maazouz, "Cementos de fosfato tricálcico sustituidos con silicio: estudio de la bioactividad y de la liberación de iones."
- [35] "Anatomía, Fisiología e Higiene - Mario Rodríguez Pinto - Google Libros." [Online]. Available: <https://n9.cl/3f0e>. [Accessed: 16-Oct-2019].
- [36] B. Mubeen, I. Ahmed, and A. Jameel, "Study of Mechanical Properties of Bones and Mechanics of Bone Fracture," *Proc. 60th Congr. ISTAM*, no. December 2015, pp. 1–7, 2016.
- [37] J. P. Ruíz, "Estudios sobre la efectividad de los distintos tratamientos de la osteoporosis."
- [38] J. R. Z. J. R. Talbot, B. Aires, and E. Médica, "LA FUNDACIÓN HISPANA DE OSTEOPOROSIS Y ENFERMEDADES METABÓLICAS ÓSEAS ( FHOEMO )," vol. 11, no. 1, p. 28001, 2002.
- [39] I. Ntroducción, "Capítulo 6. Estudio de la biocompatibilidad," pp. 119–133, 2011.
- [40] "Biological Performance of Materials: Fundamentals of Biocompatibility ... - Jonathan Black - Google Libros." [Online]. Available: <https://n9.cl/j8eo> [Accessed: 16-Oct-2019].
- [41] A. Curiá Chíncoa, "Vidrios bioactivos para la fabricación de scaffolds en la regeneración del tejido óseo," p. 20, 2011.
- [42] P. Gonzales, *Biomateriales: Diseño, producción y caracterización*. 2015.
- [43] L. Fowler, O. Janson, H. Engqvist, S. Norgren, and C. Öhman-Mägi, "Antibacterial investigation of titanium-copper alloys using luminescent *Staphylococcus epidermidis* in a direct contact test," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 97, pp. 707–714, 2019.
- [44] X. Wang, H. Dong, J. Liu, G. Qin, D. Chen, and E. Zhang, "In vivo antibacterial property of Ti-Cu sintered alloy implant," *Mater. Sci. Eng. C*, vol.

100, pp. 38–47, 2019.

- [45] L. J. Saavedra, “Infecciones bacterianas de la piel y tejidos blandos,” *Hosp. Gen. Univ. Gregor. Maranon*, pp. 159–175, 2013.
- [46] K. Tenaglia, “Infección de prótesis articulares,” *Cátedra Enfermedades Infecc.*, pp. 1–5, 2013.
- [47] L. Hall-Stoodley, J. W. Costerton, and P. Stoodley, “Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 2, no. 2, pp. 95–108, 2004.
- [48] D. Monroe, “Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms,” *PLoS Biology*, vol. 5, no. 11, pp. 2458–2461, Nov-2007.
- [49] D. D. M. Monica Gil, “Staphylococcus aureus: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina,” *Rev. Chil. Infectol.*, vol. 17, no. 2, pp. 145–152, 2000.
- [50] F. Marco, “Infección por Staphylococcus aureus resistente a la meticilina,” 2013.
- [51] B. П. Бердник and O. B. Тімченко, “Staphylococcus Aureus - Fundacion vasca para la seguridad agroalimentaria,” *Вісник Полтавської Державної Аграрної Академії*, no. 2, pp. 81–83, 2013.
- [52] G. Mandell and J. Bennett, “Etiopatogenia microbiológica 16.,” “*Enfermedades Infecc. Principios y práctica*,” pp. 255–272, 2012.
- [53] A. Kuijpers, “S. Aureus with Efb – Bacterial Infections and Immunity.” [Online]. Available: <https://www.evasionutrecht.nl/portfolio/aureus-with-efb/>. [Accessed: 09-Oct-2019].
- [54] C. Tambi, C. Tabla, and E. Etiolog, “ESCHERICHIA COLI 1. Descripción de la bacteria,” pp. 1–5, 2013.
- [55] S. Beverages and C. Disease, “Boston Public Health Commission | Fact

Sheet,” pp. 2–5, 2005.

- [56] M. G. Rodríguez-Angeles, “Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*,” *Salud Publica Mex.*, vol. 44, no. 5, pp. 464–475, 2002.
- [57] R. Kaur and M. A. Embi, “Self-directedness through asynchronous online interactions: A Malaysian experience,” *Eur. J. Soc. Sci.*, vol. 9, no. 1, pp. 48–60, 2009.
- [58] R. Xue *et al.*, “Shape changes and interaction mechanism of *Escherichia coli* cells treated with sericin and use of a sericin-based hydrogel for wound healing,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 82, no. 15, pp. 4663–4672, 2016.
- [59] F. P. A. Robinson and M. Shalit, “The dezincification of brass,” *Anti-Corrosion Methods Mater.*, vol. 11, no. 4, pp. 11–14, 1964.
- [60] V. M. Paz-Zarza, S. Mangwani-Mordani, A. Martínez-Maldonado, D. Álvarez-Hernández, S. G. Solano-Gálvez, and R. Vázquez-López, “*Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria,” *Rev. Chil. infectología*, vol. 36, no. 2, pp. 180–189, 2019.
- [61] M. Arce Paniagua, M. Ulloa Carmona, P. Pozo Hernández, and J. Bravo Bown, “Detección de *Porphyromonas gingivalis* en Pacientes Adultos con Periodontitis Crónica,” *Int. J. Odontostomatol.*, vol. 11, no. 1, pp. 13–18, 2017.
- [62] T. R. O. Contra, D. E. Microorganismos, and A. L. O. S. Demas, “El nuevo antibiotico.”
- [63] N. D. E. L. Medicamento, “Véase 5.1. ) Ficha técnica: Gentamicina.”
- [64] S. A. Laboratorios NORMAN, “Estreptomicina Norman,” *הנוטע נעלו*, vol. 66, pp. 37–39, 2012.
- [65] N. Mendoza and A. Campos, “Tetraciclinas,” *Rev Fac Med UNAM*, vol. 51,

no. 1, pp. 29–32, 2008.

- [66] C. Electr and N. Sugerencias, “BRITAPEN 1 g polvo y disolvente para solución inyectable.”
- [67] “Balanza de densidad PCE-ABZ 200C.” [Online]. Available: <https://n9.cl/7g2j> [Accessed: 30-Sep-2019].
- [68] “Serie 818 | Plas-Labs, Inc <sup>TM</sup>.” [Online]. Available: <https://www.plas-labs.com/products/glove-boxes/818-series>. [Accessed: 30-Sep-2019].
- [69] “Molino planetario PM 400, RETSCH®.” [Online]. Available: <http://www.ictsl.net/productos/aparatos/0000009f3a130765a.html>. [Accessed: 30-Sep-2019].
- [70] “Molino mezcladora MM 400 - RETSCH - potente molienda por impacto y fricción.” [Online]. Available: <https://n9.cl/7izu> [Accessed: 30-Sep-2019].
- [71] “ZwickRoell Ensayos de materiales y componentes.” [Online]. Available: <https://www.zwickroell.com/es-es>. [Accessed: 30-Sep-2019].
- [72] “Máquina de ensayos de materiales AllroundLine de ZwickRoell.” [Online]. Available: <https://n9.cl/ptv9> [Accessed: 30-Sep-2019].
- [73] “Metallurgical Grinder Polisher.” [Online]. Available: <https://n9.cl/mtnc> [Accessed: 16-Oct-2019].
- [74] “Wpl Laboratorio Automática Controlador De Humedad Temperatura Constante Cámara Clima Controlado Incubadora - Buy Controlador De Humedad Automático Incubadora,Incubadora De Cámara,Incubadora Controlada Por El Clima Product on Alibaba.com.” [Online]. Available: <https://n9.cl/j1qk> [Accessed: 16-Nov-2019].
- [75] M. Tecnal, “Incubadora con agitacion orbital TE-4200,” vol. 55, no. 19.
- [76] “Autoclave de Laboratorio » TP - Laboratorio Químico.” [Online]. Available: <https://n9.cl/b8h6> [Accessed: 16-Nov-2019].

- [77] Airstream Esco, "Cabinas de flujo laminar, horizontal y vertical La mejor solución para los laboratorios de investigación," p. 2, 2017.
- [78] I. Agilent Technologies, "Agilent 8453 Sistema de Espectroscopía UV-visible," 2003.
- [79] V. Castillo Uribe, "Design and calculation of a fluid agitator," pp. 26–50, 2013.
- [80] M. Andrea and A. Arriagada, "Base a Titanio Con Microestructura Bimodal Por Método Space-Holder," 2014.
- [81] O. Fernández, "Cultivos de Bacterias," *Fac. Ciencias Nat. y ciencias la salud, Univ. Nac. la Patagon. San Juan Bosco*, pp. 385–388, 2017.
- [82] R. De, S. Española, E. J. J. Picazo, R. Cantón, M. L. Gómez-lus, and C. Rodríguez-avial, "Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a loa antimicrobianos SEEIMC," 2015.
- [83] A. Corral-lugo, Y. E. Morales-garcía, and L. A. Pazos-rojas, "Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de 'Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo,'" *Rev. Colomb. Biotecnol.*, vol. 14, no. 2, pp. 147–156, 2012.
- [84] A. Camacho, M. Giles, A. Ortegón, M. Palao, B. Serrano, and O. Velázquez, "Técnicas para el Análisis Microbiológico: cuenta en placa de bacterias," pp. 1–10, 2009.
- [85] K. P. M. & L. Á. T. P. Elianeth Romero, José Cobo, "Cuantificación de microorganismo," *Univ. Sucre - Programa Biol. - Microbiol. Gen.*, vol. 66, pp. 37–39, 2012.
- [86] Y. Torres, J. J. Pavón, and J. A. Rodríguez, "Processing and characterization of porous titanium for implants by using NaCl as space holder," *J. Mater. Process. Technol.*, vol. 212, no. 5, pp. 1061–1069, 2012.

- [87] K. Nakamura, T. Iida, N. Nakamura, and T. Arai, "Titanium sponge production method by Kroll process at OTC," *Mater. Trans.*, vol. 58, no. 3, pp. 319–321, 2017.
- [88] B. Yuan and T. H. Okabe, "Production of fine tantalum powder by electrochemical method," *Mater. Trans.*, vol. 48, no. 10, pp. 2687–2694, 2007.
- [89] I. R. T. Rigg, S. Gardens, P. A. Petro, J. A. Szveda, and R. Vale, "United States Patent [19]," 1995.
- [90] A. D. Styrkas and R. A. Oganyan, "Production and properties of tin powders produced by ultrasonic atomisation and solid state transformation," *Powder Metall.*, vol. 35, no. 2, pp. 117–119, 1992.
- [91] "ASTM E1316-02a Standard Terminology for Nondestructive Examinations.pdf." [Online]. Available: <https://n9.cl/gbhh> [Accessed: 16-Oct-2019].
- [92] C. Suryanarayana, "Mechanical alloying and milling," *Mech. Alloy. Milling*, vol. 46, pp. 1–472, 2004.
- [93] J. S. Benjamin, "Fundamentals of Mechanical Alloying," *Mater. Sci. Forum*, vol. 88–90, pp. 1–18, 1992.
- [94] R. W. G. Wyckoff, "Second edition. Interscience Publishers, New York, New York rocksalt structure," 1963.
- [95] I. V. Pekov *et al.*, "Kononovite, NaMg(SO<sub>4</sub>)F, a new mineral from the arsenatnaya fumarole, tolbachik volcano, Kamchatka, Russia," *Eur. J. Mineral.*, vol. 27, no. 4, pp. 575–580, 2015.
- [96] M. C. Allison, M. Avdeev, S. Schmid, S. Liu, T. Söhnel, and C. D. Ling, "Synthesis, structure and geometrically frustrated magnetism of the layered oxide-stannide compounds Fe(Fe<sub>3</sub>-XMnx)Si<sub>2</sub>Sn<sub>7</sub>O<sub>16</sub>," *Dalt. Trans.*, vol. 45, no. 23, pp. 9689–9694, 2016.

- [97] "Match! - Phase Identification from Powder Diffraction." [Online]. Available: <http://www.crystalimpact.com/match/>. [Accessed: 16-Oct-2019].
- [98] Y. Torres, S. Lascano, J. Bris, J. Pavón, and J. A. Rodriguez, "Development of porous titanium for biomedical applications: A comparison between loose sintering and space-holder techniques," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 37, no. 1, pp. 148–155, 2014.
- [99] B. Ye and D. C. Dunand, "Titanium foams produced by solid-state replication of NaCl powders," *Mater. Sci. Eng. A*, vol. 528, no. 2, pp. 691–697, 2010.
- [100] C. E. A. R. Edgar ivan Pio Lopez, "Síntesis de la aleación Ti-13%Ta-X%Sn mediante aleado mecánico.," *Высшей Нервной Деятельности*, vol. 2, pp. 227–249, 2018.
- [101] J. F. Murdock and C. J. McHargue, "Self-diffusion in body-centered cubic titanium-vanadium alloys," *Acta Metall.*, vol. 16, no. 4, pp. 493–500, 1968.
- [102] "Tantalum." [Online]. Available: <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbasees/pertab/Ta.html>. [Accessed: 16-Oct-2019].
- [103] "Estaño (Sn) Propiedades químicas y efectos sobre la salud y el medio ambiente." [Online]. Available: <https://www.lenntech.es/periodica/elementos/sn.htm>. [Accessed: 16-Oct-2019].
- [104] I. Contreras Molina, C. A. Maziero Volpato, M. <sup>a</sup> J. Suárez García, M. del Piñal Luna, and D. Klee de Vasconcellos, "Consideraciones mecánicas y biológicas sobre el envejecimiento del óxido de circonio odontológico," *Rev. Int. prótesis estomatológica*, ISSN 1139-9791, Vol. 16, N<sup>o</sup>. 1, 2014, págs. 15-23, vol. 16, no. 1, pp. 15–23, 2014.
- [105] L. Fuentes, "Sociedad Mexicana de Cristalografía, A. C. Introducción al Método de Rietveld," 2004.
- [106] M. M. Cely Bautista, J. Jaramillo Colpas, I. Romero Mejía, O. Pinilla Navarro,

and A. Siado Guillen, "Microstructural characterization of titanium alloy Ti6Al4V thermally oxidized/Caracterización microestructural de la aleación de titanio Ti6Al4V oxidada térmicamente," *Prospectiva*, vol. 16, no. 2, pp. 68–74, 2018.

- [107] C. Aguilar, "Análisis del tamaño de cristalita en aleaciones Cu-Mo procesadas por aleado mecánico," *Rev. la Fac. Ing.*, vol. 23, pp. 1–8, 2009.
- [108] J. J. M. Medina, "Estudio de las fases amorfas y nanocristalinas del sistema Fe2Zr obtenidas por técnicas de mecano síntesis," 1385.
- [109] C. Eseverri, "Control de calidad," *Rev. Enferm.*, vol. 4, no. 34, pp. 24–28, 1981.
- [110] D. El and C. Bacteriano, "Como Abordar Y Resolver Aspectos Prácticos De Microbiología 4. Cálculo De Los Parámetros Que."
- [111] C. M. R. Pérez, "Cultivo y crecimiento de los microorganismos," no. January 2001, pp. 45–54, 2016.
- [112] L. I. Larcher and C. A. Cattaneo, "Obtenidas Mediante Autómatas Celulares Bi Y Tridimensionales," *Asoc. Argentina Mec. Comput.*, vol. 28, pp. 2085–2099, 2009.
- [113] "Noticias, análisis y descargas de software, guía de las mejores apps - Softonic." [Online]. Available: <https://www.softonic.com/>. [Accessed: 21-Oct-2019].
- [114] C. Chawengkijwanich and Y. Hayata, "Development of TiO<sub>2</sub> powder-coated food packaging film and its ability to inactivate Escherichia coli in vitro and in actual tests," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 123, no. 3, pp. 288–292, 2008.
- [115] C. J. Chung, H. I. Lin, H. K. Tsou, Z. Y. Shi, and J. L. He, "An antimicrobial TiO<sub>2</sub> coating for reducing hospital-acquired infection," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 85, no. 1, pp. 220–224, 2008.

- [116] T. D. Pham and B. K. Lee, "Effects of Ag doping on the photocatalytic disinfection of E. coli in bioaerosol by Ag-TiO<sub>2</sub>/GF under visible light," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 428, pp. 24–31, 2014.
- [117] I. B. Ditta *et al.*, "Photocatalytic antimicrobial activity of thin surface films of TiO<sub>2</sub>, CuO and TiO<sub>2</sub>/CuO dual layers on Escherichia coli and bacteriophage T4," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 79, no. 1, pp. 127–133, 2008.
- [118] M. L. Paret, G. E. Vallad, D. R. Averett, J. B. Jones, and S. M. Olson, "Photocatalysis: Effect of light-activated nanoscale formulations of TiO<sub>2</sub> on Xanthomonas perforans and control of bacterial spot of tomato," *Phytopathology*, vol. 103, no. 3, pp. 228–236, 2013.
- [119] C. Lara and M. Medina, "DESARROLLO DE ALEACIONES TITANIO-NIOBIO-COBRE Y TITANIO- NIOBIO-PLATA MEDIANTE APLICACIÓN COMO BIOMATERIALES," 2018.
- [120] Y. F. Joya, Z. Liu, K. S. Joya, and T. Wang, "Preparation and antibacterial properties of laser-generated silver-anatase nanocomposite film against Escherichia coli and Staphylococcus aureus," *Nanotechnology*, vol. 23, no. 49, pp. 0–7, 2012.
- [121] H. Koseki *et al.*, "Clinical and histomorphometrical study on titanium dioxide-coated external fixation pins," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 8, pp. 593–599, 2013.
- [122] J. Wang *et al.*, "Antibacterial Surface Design of Titanium-Based Biomaterials for Enhanced Bacteria-Killing and Cell-Assisting Functions Against Periprosthetic Joint Infection," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 8, no. 17, pp. 11162–11178, 2016.
- [123] Y. W. Baek and Y. J. An, "Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) to Escherichia coli, Bacillus subtilis, and Streptococcus aureus," *Sci. Total Environ.*, vol. 409, no. 8, pp. 1603–1608, 2011.

- [124] J. Sánchez-Venegas *et al.*, “Actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano por cobre nanoestructurado obtenido de minerales de la región Marañón: comparación con cobre comercial,” *Rev. Peru. Biol.*, vol. 23, no. 3, pp. 305–310, Dec. 2016.
- [125] D. Hernández and A. González, “Turbimetria,” 2013.
- [126] A. K. Chatterjee, R. K. Sarkar, A. P. Chattopadhyay, P. Aich, R. Chakraborty, and T. Basu, “A simple robust method for synthesis of metallic copper nanoparticles of high antibacterial potency against *E. coli*,” *Nanotechnology*, vol. 23, no. 8, 2012.
- [127] R. Katwal, H. Kaur, G. Sharma, M. Naushad, and D. Pathania, “Electrochemical synthesized copper oxide nanoparticles for enhanced photocatalytic and antimicrobial activity,” *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 31, pp. 173–184, 2015.
- [128] M. M. Real Sociedad Española de Química., “Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericida,” *An. la Real Soc. Española Química*, ISSN 1575-3417, N<sup>o</sup>. 1, 2009, págs. 33-41, no. 1, pp. 33–41, 1990.
- [129] “Handbook of Non-Ferrous Metal Powders: Technologies and Applications - N. A. Yefimov, Stanislav Naboychenko - Google Libros.” [Online]. Available: <https://n9.cl/h322> [Accessed: 16-Oct-2019].

## Capítulo 7: Anexo

### Anexo 1

Morfología básica de partículas de polvo

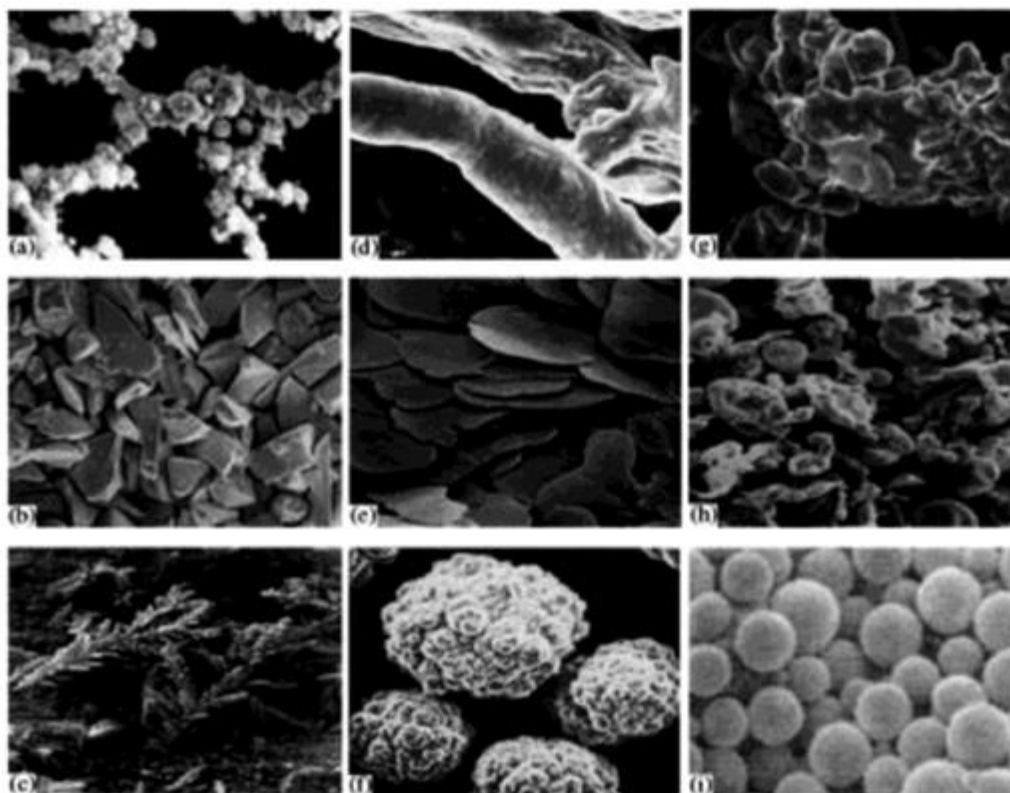


Figura 61. Formas típicas de partículas: a) Polvo acicular, b) Polvo angular, c) Polvo dendrítico, d) Polvo fibroso, e) Polvo en hojuelas, f) Polvo granular, g) Polvo irregular, h) Polvo nodular e i) Polvo esferoidal [129].

### Anexo 2

Tabla 22. Tamaño de cristalita y microdeformación de las fases  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y la contaminación  $(\text{ZrO}_2)(\text{Y}_2\text{O}_3)$  según la cantidad de Sn presente

| Ti-13Ta-xSn | Parámetro de red         | Ti- $\alpha$ | Ti- $\beta$ | Ti- $\gamma$ | $(\text{ZrO}_2)(\text{Y}_2\text{O}_3)$ |
|-------------|--------------------------|--------------|-------------|--------------|----------------------------------------|
| 3 Sn        | Tamaño cristalita [nm]   | 23,4         | 17,8        | 0,7          | 11,1                                   |
|             | Microdeformación [r.ms.] | 1,0E-03      | 1,7E-05     | 4,3E-03      | 3,0E-03                                |
| 6 Sn        | Tamaño cristalita [nm]   | 38           | 37,6        | 35,7         | 0,3                                    |
|             | Microdeformación [r.ms.] | 2,2E-03      | 1,8E-03     | 7,0E-03      | 2,3E-02                                |
| 9 Sn        | Tamaño cristalita [nm]   | 19,4         | 31,9        | 22,2         | 31,9                                   |
|             | Microdeformación [r.ms.] | 2,4E-04      | 1,7E-03     | 3,3E-03      | 1,7E-03                                |
| 12 Sn       | Tamaño cristalita [nm]   | 10           | 15,4        | 27,4         | 15,4                                   |
|             | Microdeformación [r.ms.] | 1,5E-04      | 8,1E-08     | 4,9E-03      | 8,1E-08                                |

### Anexo 3

Curva típicas del crecimiento bacteriano sub-dividido en sus etapas.

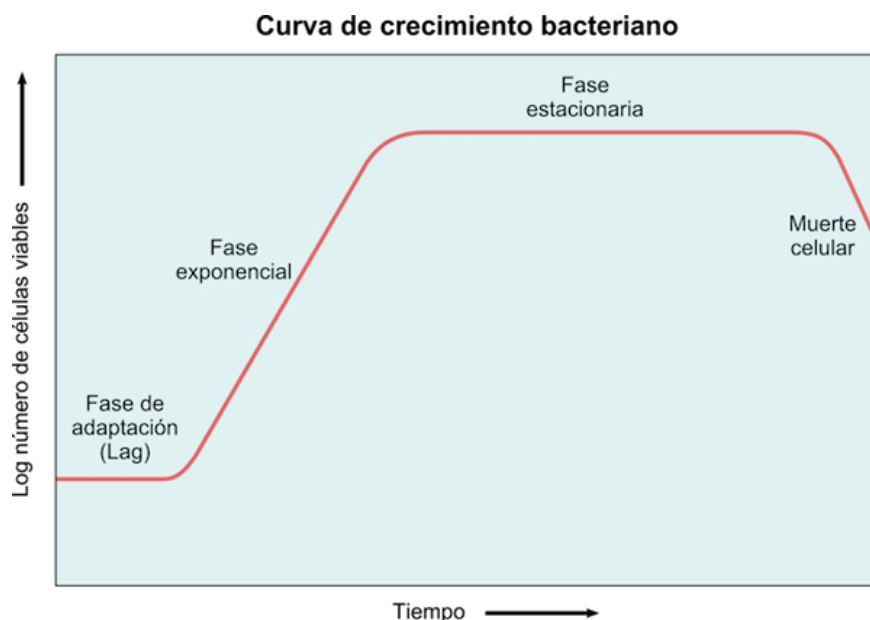


Figura 62. Curva típica de crecimiento bacteriano [110].

### Anexo 4

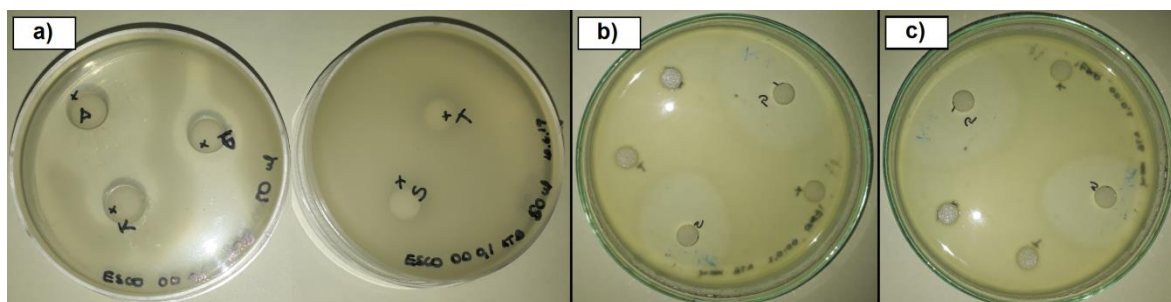


Figura 63. Prueba control positivo sobre la bacteria *Escherichia Coli* con OD y concentración de antibiótico variable; a) OD=0,1 [-] - 50 [µm], b) O.D=0,2 [-] - 50 [µm] y c) O.D=0,1 [-] - 100 [µm].

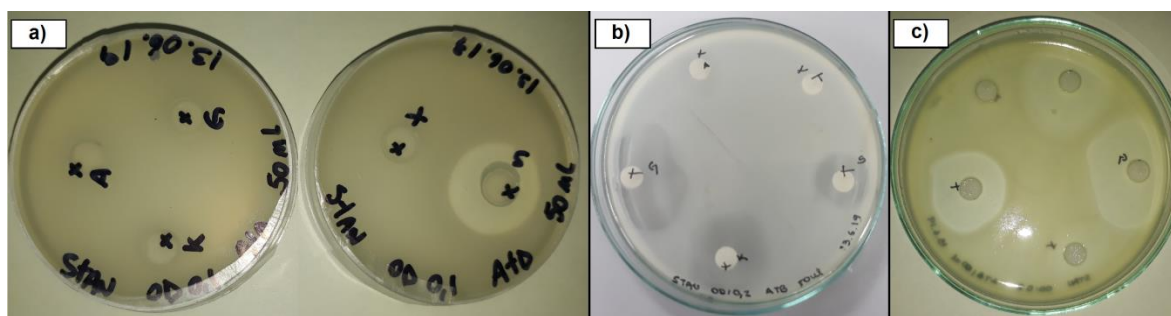


Figura 64. Prueba control positivo sobre la bacteria *Staphylococcus Aureus* con OD y concentración de antibiótico variable; a) OD=0,1 [-] - 50 [µm], b) O.D=0,2 [-] - 50 [µm] y c) O.D=0,1 [-] - 100 [µm].

## Anexo 5

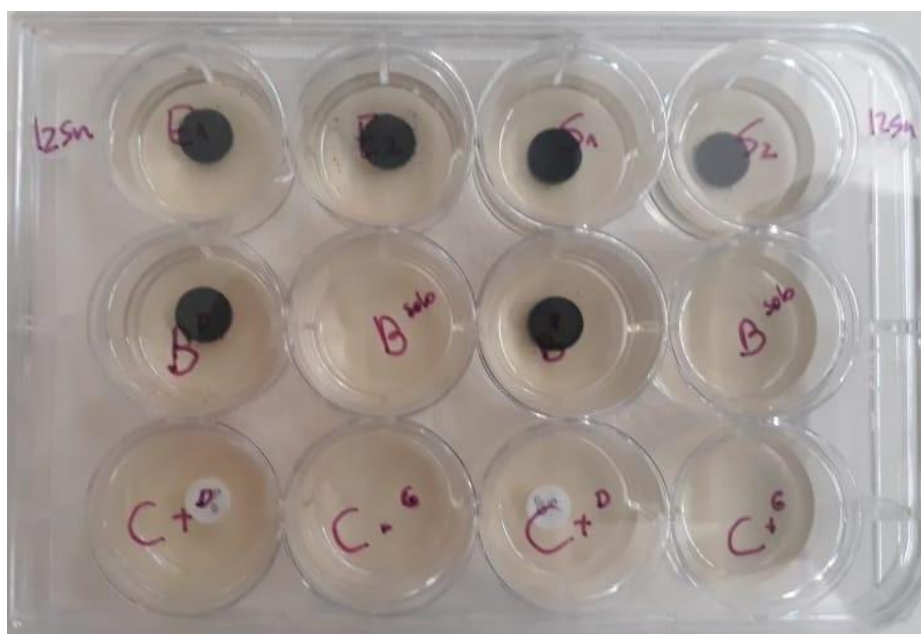


Figura 65. Ensayo bacteriano de la aleación Ti-13Ta-12Sn sobre el cultivo de bacteria *Staphylococcus Aureus* y *Escherichia coli*.

## Anexo 6

Tabla 23. Patrones estándar de halo de inhibición, puntos de corte equivalentes a la CMI para enterobacterias y diámetro del halo de inhibición para la cepa *E. coli* ATCC25922 empleada como control de calidad [82].

| Anti-microbiano | Carga del disco [µg] | Diámetro del halo de inhibición [mm] |            |          | Punto de corte equivalente a la CMI [µg/ml] |          | E. coli ATCC 25922 intervalo |
|-----------------|----------------------|--------------------------------------|------------|----------|---------------------------------------------|----------|------------------------------|
|                 |                      | Resistente                           | Intermedia | Sensible | Resistente                                  | Sensible |                              |
| Ampicilina      | 10                   | ≤13                                  | 14-16      | ≥17      | ≥32                                         | ≤8       | 16-22                        |
| Gentamicina     | 10                   | ≤12                                  | 13-14      | ≥15      | ≥8                                          | ≤4       | 19-26                        |
| Kanamicina      | 30                   | ≤13                                  | 14-17      | ≥18      | ≥25                                         | ≤6       | 17-25                        |
| Tetraciclina    | 30                   | ≤14                                  | 15-18      | ≥19      | ≥16                                         | ≤4       | 18-25                        |

Tabla 24. Patrones estándar del halo de inhibición para estafilococos , puntos de corte equivalentes a la CMI y diámetro del halo de inhibición para la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 empleada como control de calidad [82].

| Anti-microbiano | Carga del disco [µg] | Diámetro del halo de inhibición [mm] |            |          | Punto de corte equivalente a la CMI [µg/ml] |          | S. aureus ATCC 25923 intervalo |
|-----------------|----------------------|--------------------------------------|------------|----------|---------------------------------------------|----------|--------------------------------|
|                 |                      | Resistente                           | Intermedia | Sensible | Resistente                                  | Sensible |                                |
| Gentamicina     | 10                   | ≤12                                  | 13-14      | ≥15      | ≥ 8                                         | ≤ 4      | 19-27                          |
| Tetraciclina    | 30                   | ≤14                                  | 15-18      | ≥19      | ≥16                                         | ≤4       | 24-30                          |
| Ampicilina      | 10                   | ≤16                                  | --         | ≥19      | ≥16                                         | ≤8       | --                             |

## Anexo 7

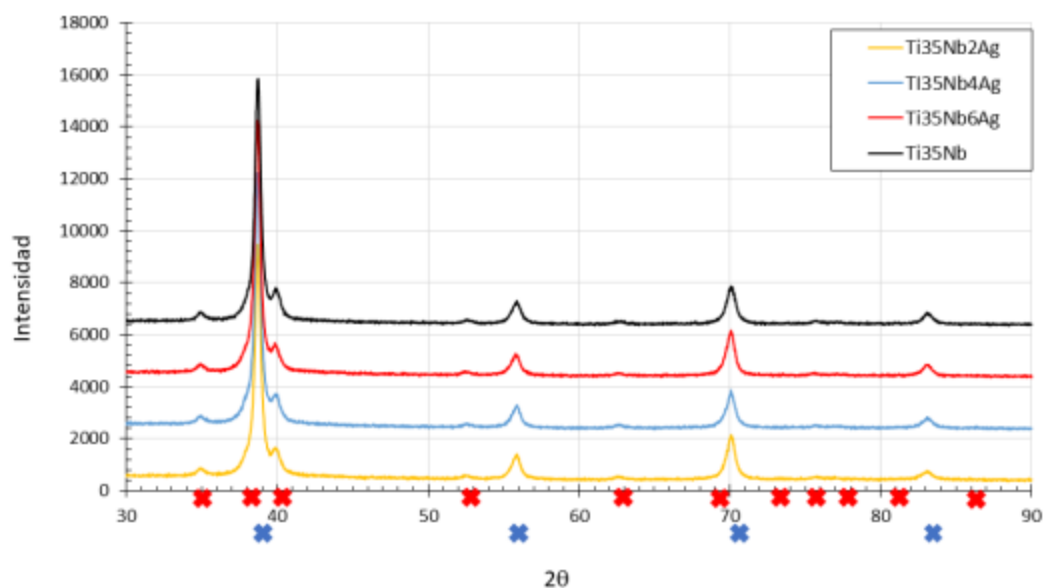


Figura 66. Difractograma de la aleación Ti35NbxAly a partir del ensayo de difracción de rayos X. Los cruces rojos y azules indican la localización de los picos de fase tipo  $\alpha$  y  $\beta$  [119].

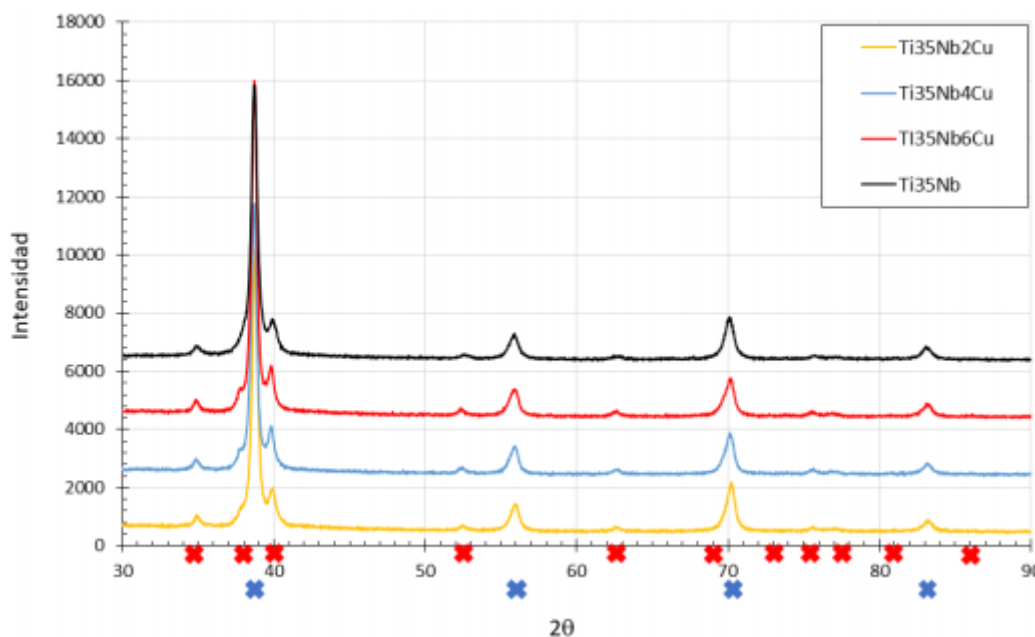


Figura 67. Difractograma de la aleación Ti35NbxCu a partir del ensayo de difracción de rayos X. Los cruces rojos y azules indican la localización de los picos de fase tipo  $\alpha$  y  $\beta$  [119].<sup>7</sup>