



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



Tecnológico Nacional de México

Campus Querétaro

TESIS:

***DISEÑO E IMPRESIÓN 3D DE COMPOSITOS DE PLA
REFORZADOS CON NANOHIIDROXIAPATITA Y SU
ESTUDIO EN COMPATIBILIDAD ÓSEA***

Que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN INGENIERÍA

Presenta:

DIANA GONZÁLEZ SÁNCHEZ

Dirigida por:

Director: Dra. Ana Laura Martínez Hernández

Codirector: Dr. Ventura Rodríguez Lugo

Asesor: Dra. Esperanza Rodríguez Morales

Diciembre, 2023

Querétaro, Qro. **11/septiembre/2023**
OFICIO No. DEPIN/183/2023

DIANA GONZÁLEZ SÁNCHEZ
ESTUDIANTE
MAESTRÍA EN INGENIERÍA
PRESENTE

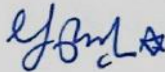
De acuerdo con el Reglamento para Exámenes Profesionales de la Dirección General de Educación Superior Tecnológica, se le autoriza la impresión de la Tesis, para obtener el Grado de MAESTRÍA EN INGENIERÍA, titulada:

"DISEÑO E IMPRESIÓN 3D DE COMPOSITOS DE PLA REFORZADOS CON NANOHIDROXIAPATITA Y SU ESTUDIO EN COMPATIBILIDAD ÓSEA"

Para el correspondiente Examen de Grado.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica
"La tierra será, como sean los hombres"



GABRIELA PINEDA CHACÓN
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



c.c. Coordinación de Maestría
Archivo

Jany*

Santiago de Querétaro., Qro. **26/septiembre/2023**
OFICIO No. DEPIN/192/2023
ASUNTO: CONSTANCIA DE NO PLAGIO

**A QUIEN CORRESPONDA:
PRESENTE**

Por medio de la presente se hace constar que el trabajo de tesis con título: **"DISEÑO E IMPRESIÓN 3D DE COMPOSITOS DE PLA REFORZADOS CON NANOHIPOXIPATITA Y SU ESTUDIO EN COMPATIBILIDAD ÓSEA"**; ha sido revisado por medio de la herramienta de software TURNITIN, cuyo resultado se anexa a la presente y **no se ha encontrado evidencias de plagio en su realización**. El autor de dicho trabajo, estudiante de **Maestría en Ingeniería, DIANA GONZÁLEZ SÁNCHEZ**, es el responsable de la autenticidad y originalidad del mismo y manifiesta que para su desarrollo ha utilizado diversas citas para su soporte, mismas que han sido marcadas a lo largo del mismo y listadas al final como REFERENCIAS bibliográficas.

Se extiende la presente para la continuación del proceso de obtención del grado de Maestría en Ingeniería, y a petición de la interesada.

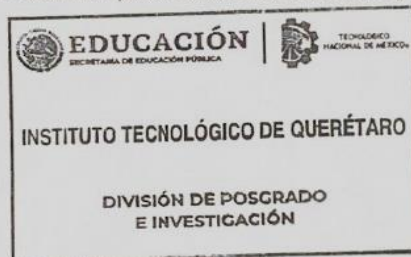
ATENTAMENTE
*Excelencia en Educación Tecnológica
La tierra será, como sean los hombres*



GABRIELA PINEDA CHACÓN
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

ccp. Coordinación de Posgrado

Jany*



Santiago de Querétaro, Qro. a 16 de noviembre del 2023.

El que suscribe, egresado de MAESTRÍA EN INGENIERÍA; de manera libre y voluntaria autorizo al Centro de Información del Tecnológico Nacional de México Campus Querétaro a difundir la obra de mi autoría con el Título del trabajo DISEÑO E IMPRESIÓN 3D DE COMPOSITOS DE PLA REFORZADOS CON NANOHIPOXIPATITA Y SU ESTUDIO EN COMPATIBILIDAD ÓSEA. Para fines académicos, científicos y tecnológicos, mediante formato CD-ROM o digital, desde Internet, Intranet y en general cualquier formato conocido o por conocer.

Dicha obra estará disponible al estudiantado de esta Institución a partir del 16 de noviembre del 2023, fecha en la cual se puede difundir la obra.

Postulante: DIANA GONZÁLEZ SÁNCHEZ

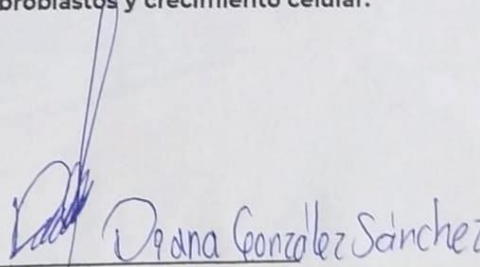
No. de Control: M21141378

Correo electrónico: cottyglezs@gmail.com

Título de la obra: DISEÑO E IMPRESIÓN 3D DE COMPOSITOS DE PLA REFORZADOS CON NANOHIPOXIPATITA Y SU ESTUDIO EN COMPATIBILIDAD ÓSEA

Área del conocimiento: MATERIALES COMPUESTOS Y NANOTECNOLOGÍA

Palabras clave de la obra: Modelado por deposición fundida, diseño de biomateriales, entramado, fibroblastos y crecimiento celular.



DIANA GONZÁLEZ SÁNCHEZ

ÍNDICE GENERAL	
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	XIV
ACRÓNIMOS	XV
AGRADECIMIENTOS	XVI
RESUMEN	XVII
ABSTRACT	XIX
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I ESTADO DEL ARTE	6
1.1 Marco Teórico	7
1.2 Polímeros	7
1.2.1 Ácido poliláctico (PLA)	8
1.3 Materiales compuestos	11
1.4 Refuerzos inorgánicos	12
1.4.1 Hidroxiapatita	12
1.4.2 Método hidrotermal	13
1.4.3 Nanohidroxiapatita	13
1.5 Materiales compuestos poliméricos	13
1.6 Biomateriales	14
1.7 El hueso	15
1.7.1 Crecimiento celular óseo	18
1.7.2 Fibroblastos	19
1.7.3 Andamios óseos conectivos	20

1.8 Impresión 3D	21
1.8.1 Algunas técnicas de impresión 3D	21
1.8.2 Modelado por deposición fundida (FDM)	22
1.9 Antecedentes	24
1.9.1 Desarrollo previo	31
CAPÍTULO II DESARROLLO EXPERIMENTAL	35
2.1 Metodología	36
2.2 Materiales y equipos	39
2.2.1 Ácido poliláctico (PLA)	39
2.2.2 Nanopartículas de hidroxiapatita (nHAp)	40
2.2.3 Difracción de rayos X (DRX)	40
2.2.4 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	41
2.2.5 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	41
2.2.6 Calorimetría diferencial de barrido DSC	43
2.2.7 Análisis mecánico dinámico (DMA)	43
2.2.8 Pruebas de Tensión	45
2.2.9 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	45
2.2.10 Ensayo de viabilidad celular, MTT	47
2.2.11 Microscopía confocal	53
2.3 Caracterización de nHAp	56
2.4 Desarrollo de materiales compuestos	56
2.4.1 Diseño	58
2.4.2 Preparación de filamentos	58
2.4.3 Impresión de probetas con compositos	59

2.5 Caracterización de los andamios	60
CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
3.1 Caracterización de nHAp	62
3.2 Desarrollo de materiales compuestos	62
3.2.1 Diseño	63
3.2.2 Preparación de filamentos.....	64
3.2.3 Impresión de probetas con compositos	65
3.2.4 Caracterización de filamentos por FTIR	66
3.2.5 Caracterización de filamentos por DSC.....	67
3.3 Caracterización de los andamios	68
3.3.1 Análisis mecánico dinámico	69
3.3.2 Pruebas de tensión	70
3.3.3 Análisis de la zona de fractura por SEM.....	77
3.3.4 Pruebas de biocompatibilidad por ensayo MTT	79
3.3.5 Microscopia confocal.....	83
Conclusiones	89
Referencias Bibliográficas	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema de producción de PLA.....	8
Figura 2 Materiales compuestos y sus variables	11
Figura 3 Estructura cristalina de la HA.....	12
Figura 4 Patinadora en pie debido al implante de fémur insertado con éxito	15
Figura 5 Ejemplo de hueso largo Fémur	15
Figura 6 Ejemplo de vertebra, hueso corto	16
Figura 7 Ejemplo de hueso plano, Omoplato.....	16
Figura 8 Ejemplo de hueso irregular, Maxilar superior	16
Figura 9 Muestra de tejido óseo cortical (izquierda) y tejido óseo trabecular (derecha).....	17
Figura 10 Amplificación 10X de línea celular Fibroblastos	20
Figura 11 Ejemplos de las posibles celdas unitarias para la creación de andamios porosos.....	21
Figura 12 Proceso de producción de una pieza	23
Figura 13 Método hidrotérmal, mediante el cual se obtienen nHAp a diferentes pH.....	31
Figura 14 Resultados DRX de nHAp en diferentes pH a) fase monoclinica y b) fase hexagonal	32
Figura 15 Porcentaje en peso y tamaño de cristales de las fases	32
Figura 16 Resultados SEM de los diferentes pH	34
Figura 17 FTIR de nHAp a diferentes pH	34
Figura 18 Formaciones cristalinas reportadas a diferentes pH y temperatura ..	37
Figura 19 Directrices del proyecto.....	39

Figura 20 Polímero PLA comercial adquirido	39
Figura 21 Hidroxiapatita nanoestructural proporcionada, sintetizada previamente por el equipo de trabajo del Dr. Ventura en la UAEH	40
Figura 22 Mecanismo de funcionamiento de la difracción de rayos X.....	40
Figura 23 Estructura del TEM.....	41
Figura 24 Esquema FTIR	42
Figura 25 Equipo FTIR del Tecnológico de Querétaro	42
Figura 26 Esquema del equipo de calorimetría diferencial de barrido.....	43
Figura 27 Componentes del equipo para DMA	44
Figura 28 Equipo para medición DMA en el Tecnológico de Celaya.....	44
Figura 29 Equipo para pruebas de Tensión en CIDESI	45
Figura 30 Microscopio electrónico de barrido (SEM)	46
Figura 31 Equipo de para microscopía SEM	46
Figura 32 Protocolo para el ensayo MTT.....	47
Figura 33 A la izquierda congelador, a la derecha línea celular 3T3-L1 a descongelar.....	48
Figura 34 A la izquierda suero fetal bovino, al centro antibiótico y a la derecha DMEM.....	48
Figura 35 Incubadora y caja con cultivo	49
Figura 36 Monitoreo de células al día 1 y 2	49
Figura 37 A la izquierda el Tríplex, al centro las células en cúmulos despegándose, a la derecha las células por individual.....	50
Figura 38 Centrifuga y pellet obtenido a los 6 minutos.....	50
Figura 39 Cámara de Neubauer y vista al microscopio del primer cuadrante para conteo celular.....	51

Figura 40 Colocación de número de células deseadas en 3 cajas para experimento de seguimiento a 3 días.....	51
Figura 41 Proceso de inmersión en etanol para esterilización y lámpara de luz ultravioleta.....	52
Figura 42 A la izquierda células petrificadas con formación de cristales, al centro la dilución de los cristales y a la derecha pase de caja de 24 pozos a 96 pocillos	53
Figura 43 Configuración del software del equipo lector de densidad óptica en microplatos.....	53
Figura 44 Estructura del Microscopio confocal	54
Figura 45 A la izquierda proceso de tinción con TRITC y DAPI, al centro lavados y a la derecha colocación en fluorodish	55
Figura 46 Equipo de Microscopía Confocal CFATA	55
Figura 47 A la izquierda los cortes en segmentos de filamento comercial para posterior ser llevados al molino de la figura de la derecha.	56
Figura 48 Molino pelletizador de polímero en CIDETEQ	57
Figura 49 Molino pulverizador de polímero del Tecnológico campus Querétaro	57
Figura 50 Equipo Filabot, extrusor y aireador de filamento polimérico para biomateriales empleado en el Tecnológico.....	58
Figura 51 Embobinador, complemento final a Filabot del tecnológico.....	58
Figura 52 Pinza para cable de STEREN	59
Figura 53 Equipo empleado para impresión 3D de probetas.....	59
Figura 54 Micrografías TEM de las nHAp que corroboran la presencia de varillas como las que se reportan por la UAEH de cristales con fase monoclinica y hexagonal	62

Figura 55 Mecanismo para mezcla integración de componentes del nuevo filamento.....	62
Figura 56 Probeta para prueba de biocompatibilidad de 10mmx10mmx5mm....	63
Figura 57 Propuestas una con gran cantidad de poros y la otra adaptada a capacidad de boquilla de impresión considerando el gradiente de porosidad e interconectividad	63
Figura 58 Probeta para DMA de 35mmx10mmx3.2mm.....	64
Figura 59 Probeta a emplear para ensayo de tensión	64
Figura 60 A la izquierda filamento blando PLA, al centro BAJnHAp y a la derecha ALTnHAp	64
Figura 61 Probeta de biocompatibilidad con entramado de concentración 0% nHAp	65
Figura 62 Probeta para pruebas DMA de concentración 0% nHAp.....	65
Figura 63 Probeta para prueba de tensión de concentración 0% nHAp	66
Figura 64 FTIR de las diferentes muestras obtenidas	66
Figura 65 Resultados de DSC diferentes muestras	67
Figura 66 Curvas DSC con valor de integrales de cada pico.....	68
Figura 67 Resultados de Modulo de almacenamiento de los diferentes compositos.....	69
Figura 68 Termograma con resultados del Tan Delta de los diferentes lotes	70
Figura 69 Lote Tensión PLA Blanco sólido.....	71
Figura 70 Gráfica esfuerzo deformación de PLA Blanco sólido.....	71
Figura 71 Lote de tensión PLA BLANCO con entramado	72
Figura 72 Gráfica esfuerzo deformación de PLA Blanco entramado	72
Figura 73 Lote tensión PLA-BAJnHAp sólida.....	73
Figura 74 Gráfica esfuerzo deformación de PLA-0.005% nHAp sólida	73

Figura 75 Lote tensión PLA-ALTnHAp con entramado	74
Figura 76 Gráfica esfuerzo deformación de PLA-0.005% nHAp entramado	74
Figura 77 Lote tensión PLA-ALTnHAp sólida	75
Figura 78 Gráfica esfuerzo deformación de PLA-0.05% nHAp sólida	75
Figura 79 Lote tensión PLA-ALT nHAp con entramado	76
Figura 80 Gráfica esfuerzo deformación de PLA-0.05% nHAp entramado	76
Figura 81 Resultados de SEM a)probeta PLA BLANCO sólido, b)probeta PLA-BAJnHAp sólido, c)probeta PLA-ALTnHAp sólido, d)probeta PLA BLANCO con entramado, e)probeta PLA-BAJnHAp con entramado, f)probeta PLA-ALTnHAp con entramado (todas a 40X, 100X, 200X y 500X en ampliaciones de la misma zona)	78
Figura 82 Línea celular fibroblastos posterior al cultivo, esterilización de material	79
Figura 83 Diseño de experimento para hallar la cantidad de células con mejor crecimiento.....	80
Figura 84 Resultado del primer experimento, determinando usar 3000 células	80
Figura 85 Segundo experimento usando probetas y diferente cantidad de células	81
Figura 86 Resultado de segundo experimento, donde destacan 3000 células al día 7	81
Figura 87 Resultado final, donde PLA-ALTnHAp muestra la mayor proliferación entre los compositos al día 7	82
Figura 88 Resultado final en gráfico de caja y bigote, donde PLA-ALTnHAp muestra la mayor proliferación entre los compositos al día 7.....	83
Figura 89 a)Probeta de PLA-nHAp sin células, b)match de probeta con tinción de nHAp con PKH26, c)campo oscuro de la tinción.....	84

Figura 90 Resultado de tinción de la probeta PLA-BAJnHAp al día 7, a) poro de la probeta, b) tinción con DAPI, c) tinción con TRITC d) por último el match84

Figura 91 Resultado de tinción de la probeta PLA-ALTnHAp al día 7, a) filamento en probeta, b) tinción con DAPI, c)tinción con TRITC d) por último el match85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Diferentes compuestos con base PLA, donde YM: módulo de Young; TS: Resistencia a la tracción; CS: resistencia a la compresión; R: resistencia; EM: módulo de elasticidad; S: rigidez; TM: módulo de tracción; CM: Módulo de compresión.....	9
Tabla 2 Tasa de degradación y mecanismo de diversos polímeros.....	10
Tabla 3 Valores medios de esfuerzos y resistencia óseos	18
Tabla 4 Estado del arte de los artículos revisados	27
Tabla 5 Relación de concentraciones y probetas requeridas de cada una, así como el material teórico a emplear.	37
Tabla 6 Resultados de lecturas de picos en curvas DSC.....	68
Tabla 7 Resultados y promedio de esfuerzo máximo en PLA Blanco sólido en MPa	71
Tabla 8 Resultados y promedio de esfuerzo máximo en Blanco entramado en MPa	73
Tabla 9 Resultados y promedio de esfuerzo máximo en PLA-0.005% nHAp sólidas en MPa	74
Tabla 10 Resultados y promedio de esfuerzo máximo en PLA-0.005% nHAp entramado	75
Tabla 11 Resultados y promedio de esfuerzo máximo en PLA-0.05% nHAp sólido en MPa	76
Tabla 12 Resultados y promedio de esfuerzo máximo en PLA-0.05% nHAp entramado en MPa	77
Tabla 13 Comparativa de promedios de tensión	77
Tabla 14 Comparativa de resultados de tensión con artículos base	86
Tabla 15 Comparativa de biocompatibilidad con artículos iniciales	87

ACRÓNIMOS

Abreviatura	Descripción
FDM	Modelado por Deposición Fundida
PLA	Ácido Poliláctico
nHAp	Nanohidroxiapatita
DMA	Análisis Mecánico Dinámico
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
FTIR	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
DRX	Difracción de Rayos X
µm	Micrómetros
nm	Nanómetros
PBS	Solución Buffer Salina
DMEM	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
°C	Grados centígrados
3T3-L1	Línea celular fibroblastos de ratón
PLA BLANCO	Solo PLA vuelto a extruir
PLA-BAJnHAp	Composito PLA con 0.005% de nHAp
PLA-ALTNHAp	Composito PLA con 0.05% de nHAp
TRITC	Tetrametilrodamina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
MTT	(3- (4,5-dimetiltiazol-2-ilo) -2,5-bromuro de difeniltetrazolio)

AGRADECIMIENTOS

Al tecnológico Nacional de México campus Querétaro, nada más cierto que la “Tierra será como sean los hombres” hoy egreso con un gran compromiso, el de representar mi alma mater, los valores y aptitudes que a lo largo de estos 2 años cultive, zorros hoy, zorros siempre...

Se otorga el reconocimiento público al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología (CONAHCYT), como patrocinador en los productos generados durante el estudio del programa de la Maestría en Ingeniería, a través del apoyo recibido por la convocatoria Becas Nacionales.

A mis profesores, técnicos de laboratorio, doctorantes y postdoctorantes de la línea que me asesoraron, así como mis compañeros de línea y de generación por el acompañamiento y vivencias.

A la Dra. Ana Laura Martínez Hernández, al Dr. Carlos Velasco Santos, a la Dra. Esperanza Rodríguez Morales, al Dr. Ventura Rodríguez Lugo, a la Dra. Luz María López Marín, al Dr. Alejandro Magallanes por su acompañamiento, asesoría y aportes al proyecto.

A Dios por conducir mis pasos de forma sabia y responsable, lo reitero, como dijo en algún momento el profesor Saúl: somos unos consentidos de Dios.

A mi padre y madre por ser mi fortaleza en los días difíciles, gracias por tanto y he aquí un triunfo más que me han ayudado a conseguir, los amo. Gracias por entender que este era ¿uno más de mis sueños.

A mis hermanos por estar presentes con una palabra de aliento y por ser mis revisores primarios. Hoy yo logro culminar la maestría, pero espero que muchos éxitos vengan para ustedes. Siempre se puede...

A mis conocidos y familiares que siempre estuvieron al tanto y me echaron porras en el camino, gracias, hablar de lo que me gusta me apasiona y amo compartirlo con ustedes.

A mis diferentes teams, las Bambis, Los Elotes, que son mi familia por elección, por creer en mí siempre, por las risas, la empatía y el apoyo, por los jueves de desestres, por ser parte de mi grupo de amistades, son para mí una parte esencial de mi vida. Agradezco a la vida por cruzarnos.

Dedicado a la Diana del pasado, del presente y del futuro, hace aproximadamente 6 años lo soñaste, hoy lo estas logrando, reiterando que el conocimiento es tu tesoro y que nadie jamás podrá arrebatártelo.

“Vacía tu bolsillo en tu mente, y tu mente llenará tu bolsillo”.

Benjamín Franklin

RESUMEN

En este trabajo se presentan diferentes modelos de andamios basados en geometría mimética ósea, que se desarrollaron por impresión 3D con la técnica de FDM y utilizando un material compuesto generado en este mismo proyecto de investigación. El material compuesto utiliza una matriz de Ácido Poliláctico (PLA) y Partículas de Nanohidroxiapatita (nHAp) al 0.05% y 0.005% para obtener por extrusión los filamentos que se usaron en la impresora 3D. La investigación contempló variables de entramado, porcentaje de porosidad, tamaño e interconectividad de los poros y un gradiente decreciente del exterior hacia el centro. Los modelos se desarrollaron mediante el software SolidWorks™ y Flash Printing™. La caracterización de los materiales compuestos y de los andamios contempló pruebas de tensión, análisis mecánico-dinámico (DMA), calorimetría diferencial de barrido (DSC), SEM y biocompatibilidad por MTT y microscopía confocal para monitorear los beneficios del uso de un material polimérico biocompatible en unión a un refuerzo, para integrarse como un material compuesto que genere estructuras que permitan crecimiento celular en la superficie de las mismas.

Los resultados de la caracterización térmica (DSC y Tan Delta del DMA) evidencian las condiciones de reblandecimiento en cada una de las variantes de composites, permitiendo usar diferentes grados de temperatura para conseguir el conformado por FDM, siendo requerida una menor temperatura en el uso de alta concentración de nHAp. Como parte de las pruebas para rendimiento termomecánico se obtiene también una mayor respuesta a deformación en función de una mayor concentración de nHAp (0.05%), así como mayor facilidad en la obtención de las probetas que contienen esta concentración, además en ausencia de calor, bajo análisis de tensión, se nota un aumento en la resistencia mecánica de las probetas con y sin entramado también de la alta concentración de nHAp (0.05%). El estudio por SEM muestra la zona de fractura de los composites, dónde pueden apreciarse los agregados de nHAp como refuerzo a la matriz de PLA, mostrando mayor presencia en las altas concentraciones de nHAp, además de mostrar rupturas limpias y frágiles.

Por otra parte en las pruebas de biocompatibilidad, se empleó la línea celular 3T3-L1 fibroblastos correspondiente a tejido conectivo. En los resultados se observan mayores lecturas de absorbancia media con la variante de alta concentración de nHAp (0.05%). Lo cual evidencia la mejora en condiciones de biocompatibilidad, ya que las células en presencia del composito presentan una fase adaptativa al mismo, antes de proliferar. Con el uso de la

microscopía confocal se logra visualizar el anclaje de las células a las paredes del andamio y a los poros generados como guía para el crecimiento. Probando la biocompatibilidad del mismo, así como las condiciones aptas para coexistir con material celular y proveerle las características necesarias para proliferar células.

Palabras clave: Modelado por deposición fundida, diseño de biomateriales, entramado, fibroblastos y crecimiento celular.

ABSTRACT

In this work, different scaffold models based on bone mimetic geometry are presented, which were developed by 3D printing with the FDM technique and using a composite material generated in this same research project. The composite material uses a matrix of Polylactic Acid (PLA) and Nanohydroxyapatite Particles (nHAp) at 0.05% and 0.005% to obtain by extrusion the filaments that were used in the 3D printer. The research included framework variables, percentage of porosity, size and interconnectivity of the pores and a decreasing gradient from the outside to the center. Models were developed using SolidWorks™ and Flash Printing™ software. The characterization of the composite materials and scaffolds included tensile tests, dynamic mechanical analysis (DMA), differential scanning calorimetry (DSC), SEM and biocompatibility by MTT and confocal microscopy to monitor the benefits of using a biocompatible polymeric material. in conjunction with a reinforcement, to integrate as a composite material that generates structures that allow cell growth on their surface.

The results of the thermal characterization (DSC and Tan Delta of the DMA) show the softening conditions in each of the composite variants, allowing the use of different degrees of temperature to achieve the FDM forming, with a lower temperature being required in the use of high concentration of nHAp. As part of the tests for thermomechanical performance, a greater response to deformation is also obtained based on a higher concentration of nHAp (0.05%), as well as greater ease in obtaining specimens containing this concentration, also in the absence of heat, under stress analysis, an increase in the mechanical resistance of the specimens with and without framework is noted also from the high concentration of nHAp (0.05%). The SEM study shows the fracture zone of the composites, where the nHAp aggregates can be seen as reinforcement to the PLA matrix, showing a greater presence in high concentrations of nHAp, in addition to showing clean and fragile breaks.

On the other hand, in the biocompatibility tests, the 3T3-L1 fibroblast cell line corresponding to connective tissue was used. The results show higher mean absorbance readings with the high nHAp concentration variant (0.05%). Which shows the improvement in biocompatibility conditions, since the cells in the presence of the

composite present an adaptive phase to it, before proliferating. With the use of confocal microscopy, it is possible to visualize the anchoring of the cells to the walls of the scaffold and to the pores generated as a guide for growth. Testing its biocompatibility, as well as the conditions suitable for coexisting with cellular material and providing it with the necessary characteristics to proliferate cells.

Keywords: Fused deposition modeling, biomaterials design, framework, fibroblasts and cell growth

INTRODUCCIÓN

Situando a la época actual como la era de los materiales compuestos, cuyo título deriva de la amplia gama de composites que pueden obtenerse y mejorar, cambiar o perfeccionar las propiedades de los materiales ya existentes. Resaltando que cada descubrimiento es orientado a cubrir una necesidad de la población desde el sector energético, ambiental, hasta la aplicación médica.

Establecidos en este rubro es importante señalar las condiciones que los compuestos deben contar con propiedades de acuerdo a la aplicación que se les pretende dar. Además de considerar los diversos métodos de conformado existentes.

Con la naciente industria 4.0 la manufactura aditiva se ha posicionado en los sitios más importantes, ya que cuenta con diferentes técnicas aplicadas a materiales poliméricos, de las cuáles se puede destacar a la técnica de Modelado por Deposición Fundida (FDM), por su fácil implementación, teniendo una oferta de bajo costo comparada con otras en el mercado, además de su versatilidad en el conformado, ya que permite obtener gran cantidad de geometrías complejas y desarrollar prototipos novedosos y precisos. Así, el uso de FDM ha venido a complementar el procesado de nuevos materiales, permitiendo una amplia diversidad de aplicaciones en ámbitos importantes, como lo es el área de la salud. La capacidad de innovación y diversidad de obtención de los mismos, abre una gran puerta de posibilidades haciendo uso de diferentes técnicas de manufactura, cada una de ellas con ventajas y desventajas desde diferentes rubros. Para la obtención de composites con matriz polimérica, es de gran apoyo la técnica FDM.

Un reto que afronta la impresión 3D para el desarrollo de biomateriales poliméricos, radica en desarrollar modelos apropiados que sustituyan las funciones de diferentes tejidos del cuerpo con los que se pretende que interactúen. En el caso de biomateriales para aplicaciones óseas se busca generar materiales ligeros, que permitan la migración, soporte y proliferación de células como los osteoblastos, que son células iniciadoras de la formación de hueso, que permiten la integración del biomaterial polimérico como prótesis o implante en los organismos (Fernández Tresguerras, Hernández , Alobera Gracia, Del Canto Pingarrón , & Blanco Jérez, 2004).

El ser humano enfrenta diferentes situaciones a diario, mismas en las que desgasta, debilita o fractura diferentes partes del cuerpo, obligando al organismo a regenerar de manera natural las células dañadas, pero no siempre es posible, dependiendo de la magnitud del evento, por

ello se necesitan andamios en los cuales sea posible acarrear células del tejido dañado a fin de impulsar un crecimiento y resanar la zona o el sitio afectado. En respuesta a ello y con la reciente tecnología de impresión 3D y sus múltiples aplicaciones se desarrollan materiales que puedan ser el principal componente de estos sustitutos. Una característica de estos materiales es que al estar en contacto con el tejido no generen respuestas contradictorias, sino que permitan recuperar las funciones de la parte afectada.

Las prótesis empleadas hasta ahora, en su mayoría metálicas y cerámicas recrean las propiedades mecánicas y estructurales, sin embargo el medio en el que se desarrollan propicia cierto nivel de desgaste por corrosión, mismo que puede causar afecciones en el organismo y ser también parte de un rechazo posterior a él (Martín, y otros, 2019). Aunados a ello los mecanismos empleados hasta ahora de uso de autoinjertos (porciones correspondientes al mismo paciente) y aloinjertos (material proveniente de un donador) generan la tendencia a desarrollar infecciones o cierto grado de rechazo, estableciendo una importante línea de investigación en este campo para minimizar la tasa de estos sucesos (Esposito Corcione, y otros, 2017).

En este ámbito es reciente el uso masivo de los polímeros, materiales que podemos encontrar en nuestro alrededor en casi cualquier cosa, se han vuelto tan variadas sus aplicaciones en utensilios, envases, infraestructura, medicina y en este campo derivado de sus propiedades pertinentes de biodegradación y afinidad a organismos, también la generación de biomateriales que hoy en día se encargan de cubrir la demanda de piezas, armazones y desarrollo de tejido para sustitutos en seres humanos con el fin de resanar lesiones. Aunado al uso de polímeros se encuentra la creciente formación de composites, es decir, tomado un polímero biocompatible, unir a este a una serie de refuerzos que posean gran afinidad con los organismos vivos y potencialicen las probabilidades de adaptación, crecimiento y éxito de los componentes desarrollados. Mostrando como un parteaguas el uso de la cerámica hidroxiapatita que es un componente primordial del hueso y demás partes activas de los seres humanos.

El uso de los injertos y/o andamios es ya extendido en todo el mundo y aplicado a las diferentes ramas quirúrgicas, rescatando que al 2006, en Estados Unidos de Norteamérica se realizaban ya 289,000 procedimientos anuales de operación de columna y todas ellas involucraban el uso de algún tipo de sustituto (Zárate-Kalfópulos & Reyes-Sánchez, 2006). Cabe resaltar que a 2012 en la documentación del IMSS se tiene recuento de intervenciones en el área de trauma por fracturas y luxaciones de fémur, pelvis, tibia, peroné, coxis, hombro, brazo, pierna, cráneo,

antebrazo, mandíbula, etc., logrando con ello un total de 60,076 cirugías entre 4 de las unidades médicas de alta especialidad en el país (Echevarría Zuno, 2013).

La literatura reporta los beneficios de ambos materiales por separado (PLA e hidroxiapatita) ambos biocompatibles y fáciles de obtener y a la par la amplia gama de aplicación de la impresión 3D y el seguimiento de las diferentes interacciones mediante los equipos de caracterización adecuados permitirá conocer cuál es la repuestas de este composite.

Por ello se convierte en un asunto importante el conseguir sustitutos óseos, biomateriales que permitan acarrear material celular para posteriormente permitir su proliferación y crecimiento a medida que la matriz comienza a desintegrarse y absorberse.

Mediante el desarrollo del siguiente proyecto se pretenden evidenciar mejoras en biomateriales ya existentes haciendo uso de variantes de herramientas actuales como lo son métodos de síntesis hidrotermal de nanopartículas y la impresión 3D las cuáles impactan el mercado con sus bajos costes. Razón por la que se diseña el seguimiento a esta vía alterna probando la optimización de recursos comparado con otros métodos tanto de síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita como para la obtención del polímero reforzado impreso. Convirtiéndose en una consideración generar prototipos que figuran como potenciales portadores y proliferadores de células, por lo que debe asegurarse que su diseño y estructura logran biocompatibilidad, porosidad ideal, soporte mecánico a estructuras, mojabilidad, adhesión e infiltración para el crecimiento celular (Rojas Martínez, y otros, 2020).

Este trabajo tiene como objetivo principal el diseño e impresión de andamios pensados en la proliferación de material celular que provean de biocompatibilidad y respuesta termomecánica ideal para ser considerados en lo posterior como posibles sustitutos y como hipótesis se persigue probar que el biopolímero PLA con diferentes concentraciones de nHAp permite desarrollar andamios capaces de reproducir en diferente proporción células y posee las propiedades termomecánicas adecuadas, generando así conocimiento en el área de bioingeniería de materiales.

El agente dominante del composite que corresponde al ácido poliláctico, también denominado PLA, corresponde a un poliéster alifático, un polímero termoplástico y biodegradable, con la inconveniencia de ser hidrofóbico, de esta manera al añadir los refuerzos nanoestructurales de hidroxiapatita (nHAp) se busca reducir la incertidumbre que pudiera generar, creando una fase continua que permita un intercambio mayor entre los componentes y asegure la máxima compatibilidad, considerando que la hidroxiapatita es un cerámico totalmente afín a la estructura y composición ósea (Flores Hernández, y otros, 2020).

Con la variante de la inmersión y el conjugado de PLA y nanohidroxiapatita se elabora un andamio que tiene la finalidad de crear una matriz temporal que pueda ser portadora de células y permita que éstas proliferen sobre la superficie dando paso a rehabilitación de la zona afectada.

El proyecto parte del uso de un polímero comercial de PLA de la marca Color Plus como matriz o fase continua y nanopartículas de hidroxiapatita de pH 7 (proporcionadas por la UAEH). El polímero es llevado a trituración y molienda para adicionar a él por método físico el refuerzo de nHAp en dos diferentes concentraciones (0.05 % alta nHAp y 0.005% baja nHAp), se extruye un nuevo filamento a 180°C y posteriormente se imprimen con él las probetas requeridas para DMA (10*35*3.2 mm), tensión tipo IV (con y sin entramado de mimética ósea) y biocompatibilidad (10*10*5 mm) con gradiente creciente del centro hacia el exterior y mimética ósea. Las impresiones se consiguen con una temperatura de 220°C en boquilla y 70°C en cama de la impresora Creality a una velocidad de 100mm/min.

Las pruebas de DSC se llevan a cabo con un trozo de filamento previamente extruido con rampas de 10°C de 25°C a 200°C.

Los ensayos DMA se generan en rampas de 10°C de 30°C a 100°C. El ensayo de tensión se evalúa en 5 probetas. El SEM de la zona de ruptura retoma los especímenes de Tensión.

Las pruebas de biocompatibilidad se llevan a cabo con la línea celular 3T3-L1 bajo ensayo MTT por 7 días.

Los compositos generados muestran cambios en comparativa con el PLA comercial, a primera vista la baja concentración presenta una distribución de puntos atribuida a la nHAp, mientras que la alta concentración cambia su coloración a blanquizca, además de proveer mayor maleabilidad al material en conformado en función del aumento de nHAp.

Los detalles e información de resultados se abordan como se menciona a continuación.

Para ello en el capítulo I se describe el estado de arte, partiendo del marco teórico y los conceptos que facilitarán el abordaje del proyecto. Además de contener una retrospectiva de los avances en el campo de andamios en biomedicina de los últimos años, mismos que proveen de las directrices al proyecto. Se completa con un apartado extra del desarrollo previo de la síntesis y caracterización de la nHAp que juega un papel sumamente importante en el proyecto.

El capítulo II presenta un detallado listado de metodología, materiales y métodos para concretar cada una de las fases experimentales del proyecto. Así como la información técnica y útil para comprender cada una de las técnicas de caracterización.

Finalmente en el capítulo III se abordan los resultados de las pruebas de caracterización tanto de los filamentos, como de los andamios, se realiza la discusión de los mismos llevándolos a un compendio de artículos que se tomaron como base con sus respectivos resultados y la comparativa con lo que se obtuvo en el proyecto. Cerrando con el apartado de conclusiones y sugerencias para próximas búsquedas en el área de ingeniería de tejidos.

CAPÍTULO I ESTADO DEL ARTE

1.1 Marco Teórico

1.2 Polímeros

Los polímeros son grandes moléculas o cadenas formadas por la adición de monómeros, generalmente por enlaces covalentes.

Estos materiales existen desde la antigüedad y los hay naturales y sintéticos, ofertando en cada una de estas presentaciones diferentes propiedades físicas químicas y mecánicas. Los naturales a menudo son quebradizos y pueden deformarse fácilmente, mientras que los sintéticos son trajes a la medida, manipulando sus propiedades de acuerdo a las aplicaciones y generándose en masa, en el sentido de la búsqueda de un costo-beneficio óptimo.

Son múltiples las aplicaciones de este tipo de materiales dada su versatilidad y características como; fragilidad semejante al vidrio, sólidos a bajas temperaturas, aislantes eléctricos y una alta capacidad de formación por diversas vías de manufactura.

Es importante señalar que de los polímeros desglosa el apartado lo que conocemos como plásticos, cuya clasificación oscila en torno a la numeración del 1 al 7 con tereftalato de polietileno (PET), polietileno de alta densidad (HDPE), cloruro de polivinilo (PVC), polietileno de baja densidad (LDPE), polipropileno (PP), poliestireno (PS) y otros (Ministerio de Educación. Instituto Nacional de Educación Tecnológica., 2011).

Los polímeros pueden también clasificarse en termofijos, termoplásticos y elastómeros: donde existe una reacción de los mismos ante la aplicación de la llama o el fuego sobre la superficie, de modo que los termofijos se incineran, mientras que los termoplásticos se reblandecen y pueden volver a moldearse y a su vez los elastómeros contienen una propiedad de memoria de forma o resiliencia como las ligas.

Recientemente se ha hecho uso de este tipo de materiales en la formación de compuestos, donde el polímero se convierte en la fase continua o matriz, quién aporta las principales características estructurales del material final buscado. Es amplio el campo de aplicación de los polímeros en cosmética, medicina, construcción y utilería, haciendo paso por quitosano, queratina, PLA, nylon, silicona, PCL, etc.

Siendo así, en esta ocasión el uso de PLA será como fase continua con un refuerzo de nHAp a manera de nanopartículas.

1.2.1 Ácido poliláctico (PLA)

El ácido poliláctico pertenece al grupo de los poliésteres alifáticos, es un polímero termoplástico y biodegradable que posee alta rigidez y resistencia, se emplea en la fabricación de envases, botellas, bolsas y en la automoción (Serna C., Rodríguez de S., & Albán A., 2011). En la **Figura 1** se muestra el esquema de producción del PLA, obtenido de almidones de maíz y otras especies vegetales. Es un polímero altamente transparente, muy versátil, pues se puede compostar y reciclar, su alto peso molecular le da una fácil procesabilidad. Se considera un polímero termoplástico.

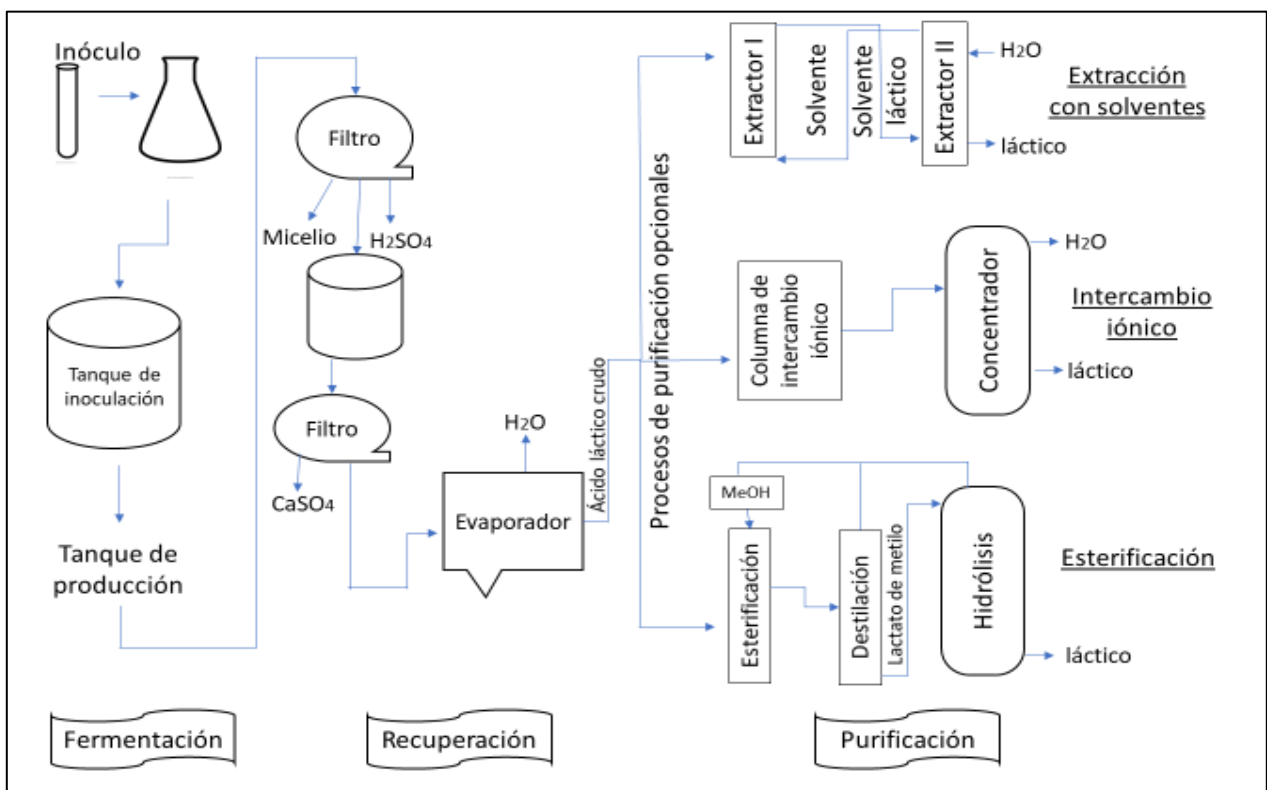


Figura 1 Esquema de producción de PLA.

Adaptación de (Serna C., Rodríguez de S., & Albán A., 2011).

Actualmente se encuentra entre los polímeros naturales más empleados en impresión 3D dadas sus condiciones termoplásticas, biocompatibles y biorreabsorbibles, teniendo como condicionante el hecho de que posee baja tenacidad.

A continuación la **Tabla 1** muestra la unión de PLA con diferentes refuerzos y sus resultados mecánicos obtenidos de acuerdo al grado de porosidad y la aplicación efectiva por sus

características mecánicas, donde es usado un 50% de HA en nivel micro y con mejoras considerables, mientras que la **Tabla 2** muestra la tasa de degradación en comparación a otros polímeros, habiendo algunos con tiempos menores que el PLA, pero que en investigaciones previas han tenido desventaja por los componentes residuales en el organismo, con el PLA se mejora esta condición y se resalta de no ser un proceso de degradación extenso, ponderándose como un material con altos beneficios:

Tabla 1 Diferentes compuestos con base PLA, donde YM: módulo de Young; TS: Resistencia a la tracción; CS: resistencia a la compresión; R: resistencia; EM: módulo de elasticidad; S: rigidez; TM: módulo de tracción; CM: Módulo de compresión

Adaptación de (Manavitehrani, y otros, 2016).

Poliéster	Modificador	Concentración en peso%	Porosidad %	Propiedades mecánicas (MPa)	Propiedades mejoradas
PLA	PU	50	79	80 (CM)	Rendimiento mecánico
	PCL	50	81.5 ± 1.2	0.3 (CS)	
	PEG	20	86.75	1830 (YM) (Método de nano indentación)	
	Triclosán	20	Estructura sólida	61.98 ± 0.3 (TS)	Unión celular
	Quitosano y Queratina	30% Quitosano y 4% Queratina	Estructura sólida	35 (TS)	
	BG	40	0.211 (cm ³ /g)	0.3 (CS)	Bioactividad y neutralización de degradación ácida
	Apatita carbonatada	30	70	2.2 (R)	
	HA	50	85	857 ± 0.268 (EM)	
	Fosfato de calcio	50	96.58 ± 0.85	0.147 ± 0.02 (S)	
	Nanotubo de Halosita	10	Fibras solidas	10.4 (TM)	

Tabla 2 Tasa de degradación y mecanismo de diversos polímeros.

Adaptación de (Manavitehrani, y otros, 2016).

Poliésteres	Subproductos de degradación (pKa)	Tasa de degradación In vivo	Mecanismo de degradación
PLA (PLLA Y PDLA)	Ácido láctico (3.85), (3.08)	50% en 1-2 años, 98% en 12 meses, 100% en > 12 meses, 100% en 12-16 meses	Hidrólisis por acción de enzimas
PGA	Ácido Glicólico (3.83)	100% en 2-3 meses, 100% en 6-12 meses	Hidrólisis enzimática y no enzimática
PLGA	Ácido láctico (3.85), (3.08), Ácido Glicólico (3.83)	100% en 00 días (75%LA: 25% GA), 100% en 50-100 días	Hidrólisis por acción de enzimas
PPC	CO ₂ y agua (vía e intermediarios desconocidos)	6% en 200 días, sin degradación después de 2 meses	Hidrólisis o mediación enzimática
PHB	Ácido 3-hidroxi-butírico (4.41 o 4.7)	35% de degradación del peso molecular después de 6 meses, 60% de degradación a través del espesor del pellet después de 24 semanas	Hidrólisis vía inespecíficas enzimas enteras
PHBV	Ácido 3-hidroxi-butírico (4.41 o 4.7), Ácido 3-hidroxi-valérico (4.72)	75% de degradación a través del esperar del pellet después de 24 semanas	Hidrólisis vía inespecíficas enzimas enteras
PBS	Ácido succínico (4.21 y 5.64 para el primero y segundo grupo hidroxilo)	5-10% en peso en 100 días (In vitro)	Degradación hidrolítica enzimática
PCL	Ácido caproico (4.88)	50% en 4 años, 1% en 6 meses	Degradación hidrolítica
PPF	Ácido fumárico (pKa ₂ = 4.44)	Depende de la formulación y composición, varios meses >24	Hidrólisis

1.3 Materiales compuestos

Un material compuesto “es aquél constituido por dos, o más, agentes cuyas propiedades son superiores a las que tienen cada uno por separado, permaneciendo todos perfectamente identificables en la masa del elemento” (Olivares Santiago, Galán Marín , & Roa Fernández, 2003). No todos los composites son fabricados por el hombre, es decir, existen algunos que se obtienen de la naturaleza (como la madera o el hueso), podemos determinar que en su mayoría los que empleamos día a día han sido producto de procesos manufacturados por la inteligencia humana. A partir de los años 70 se considera el auge de los denominados “Compositos” por el aumento de su producción y aplicaciones en torno a la facilitación de nuestras tareas.

En general lo que determinamos como un compuesto es un material sintético que se logra de la adición de dos fases, una continua y una de refuerzo, generalmente la fase continua o matriz es la más tenaz y el refuerzo por su parte aporta mayor elasticidad (Ministerio de Educación. Instituto Nacional de Educación Tecnológica., 2011). A continuación en la **Figura 2** se indican las posibles formaciones de materiales compuestos.

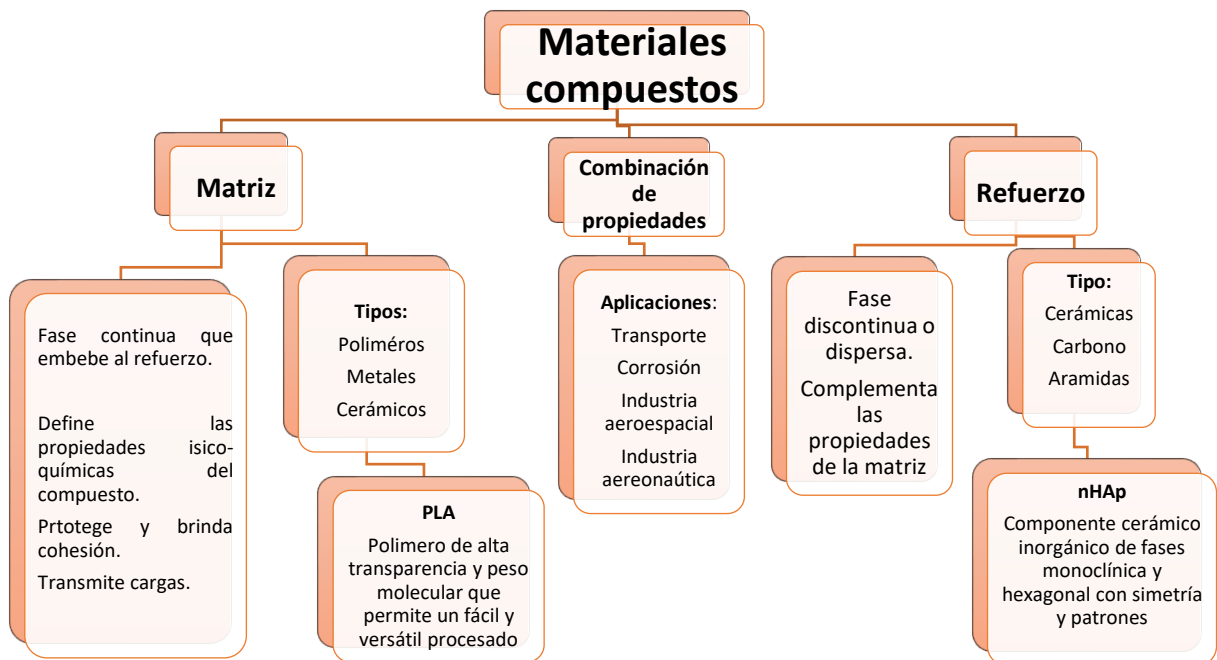


Figura 2 Materiales compuestos y sus variables

Tomado de (Ministerio de Educación. Instituto Nacional de Educación Tecnológica., 2011)

Se hace uso de las diferentes clasificaciones de los materiales tradicionales, tomando para este proyecto una fase continua o matriz polimérica y un refuerzo a manera de nanopartícula (Olivares Santiago, Galán Marín , & Roa Fernández, 2003), el cual se busca se disperse de manera homogénea en el polímero a fin de generar un composito con las mismas características en todas sus zonas.

1.4 Refuerzos inorgánicos

La reciente búsqueda en la obtención de materiales biodegradables ha llevado a estudios para generar compuestos con diferentes grados de combinación de refuerzos en una matriz a fin de evaluar su respuesta e interacción.

Convirtiendo a la parte que se adiciona al composito en el refuerzo, que será quién le aporte rigidez y modifique la estructura general de la fase continua, estos a su vez pueden ser fibras, partículas, pellets, que representarán incrustaciones (Olivares Santiago, Galán Marín , & Roa Fernández, 2003).

1.4.1 Hidroxiapatita

La Hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) es un biomaterial cerámico de la familia fosfato cálcico, generalmente usada en implantes de diversos tipos, desde tejidos blandos, rígidos, piel y músculo, como consecuencia de su composición similar a los minerales de huesos y dientes (Rodríguez Lugo , y otros, 2018). Estos minerales poseen estructuras hexagonales y monoclinicas (ver **Figura 3**) (Gómez Ortega , Elizondo Villareal , & Guerrero Villa, 2004).

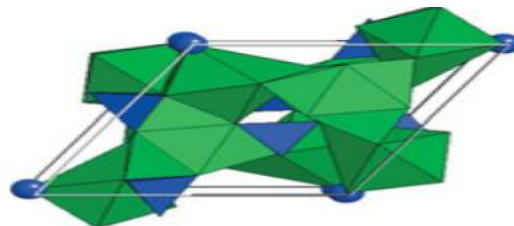


Figura 3 Estructura cristalina de la HA

Tomado de (Gómez Ortega , Elizondo Villareal , & Guerrero Villa, 2004).

Es la fase fosfato más estable termodinámicamente dentro del organismo humano, bioactiva, capaz de generar osteoinducción, no tóxica y osteogénica.

La hidroxiapatita puede sintetizarse por diversos métodos: por precipitación, hidrólisis, sol-gel, hidrotermal y emulsión.

1.4.2 Método hidrotermal

Técnica de obtención de nanopartículas, mediante la cual se consiguen polvos homogéneos, dado la importancia de controlar el tamaño de partícula y grado de cristalinidad.

Se sigue una metodología simple, rápida y a bajas temperaturas lo que la postula como una vía rentable y la pureza del nHAp es alta (Rodríguez Lugo , y otros, 2018).

Dentro de lo histórico de esta técnica se ha probado que tan importante es el factor pH en combinación con la morfología de las nanopartículas. El procedimiento de Dr. Ventura Rodríguez Lugo en la síntesis de nHAp señala que el cambio de pH repercute en la fase cristalina y el tamaño de la misma. Pudiéndose obtener esferas, rodillos, agujas, alambres, hojas, esferulitas, cinturones, etc.

1.4.3 Nanohidroxiapatita

Este cerámico es enlistado entre los materiales bioactivos, es decir, se le atribuyen beneficios en la adhesión y crecimiento osteogénico, pero dada su condición de cerámico posee una baja resistencia mecánica y una lenta reabsorción.

Por ello disminuir el tamaño de la partícula asegura una correcta migración (dosificación de material) al sitio de implante, con lo que se minimizan los riesgos o daños, una vez colocado la nanopartícula en la matriz se mediaran sus propiedades mecánicas y al permanecer dispersa en ella el contacto será paulatino, en sentido de la degradación permitiendo así el crecimiento (López Ortiz, y otros, 2020).

Cada método de síntesis de las nanopartículas de HA otorga variables en las propiedades y características que son desencadenadas por el tamaño de las mismas, cabe denotar que a escalas nanométricas se mimetiza o asemeja al tejido implantado, aumenta su área superficial y en cuanto al comportamiento físico, químico y biológico da lugar a propiedades que no son visibles fuera de esta escala (Maldonado, Domínguez, Rubío, & Padilla, 2016).

De acuerdo al método y condiciones de síntesis las características estructurales y las fases presentes varían yendo desde nanoesferas, escamas hasta varillas.

1.5 Materiales compuestos poliméricos

Los materiales compuestos de matriz polimérica generalmente muestran mejoras en las propiedades mecánicas, por ello tienen una finalidad de uso en elementos estructurales y cubiertas (Ministerio de Educación. Instituto Nacional de Educación Tecnológica., 2011).

Los composites de matriz orgánica presentan una baja densidad y una gran versatilidad en cuanto a manufactura y obtención de piezas en comparación con otros, además de que esto los convierte en los materiales más empleados en la actualidad pese a su baja resistencia ante el fuego (Manavitehrani, y otros, 2016).

Este tipo de compuestos son usados en la industria aeronáutica, automovilística, aeroespacial, naval, electrónica, también en la manufactura de material de uso deportivo y de construcción (AMFAB, 2015).

1.6 Biomateriales

Se define como el material que es capaz de estar en contacto con tejidos vivos durante algún periodo de tiempo, ya sea para subsanar, completar o sustituir el funcionamiento parcial sin alterar al resto del organismo (Piña Barba, 2007).

Para cada caso de la zona a colocar dependerán las características y cualidades que este material tendrá, como ejemplo el hilo de sutura interna en quirúrgica, está diseñado para la absorción por el organismo al pasar cierto tiempo. El hecho de pensar en el uso de materiales para ser incrustados dentro de un factor biótico, conlleva también el asegurar la ausencia de toxicidad de los componentes, así como conservar sus características de biocompatibilidad y biofuncionalidad.

Recientemente y con el incremento de enfermedades que ponen en riesgo la prevalencia de la vida humana, surge mayor énfasis en el tratamiento con materiales alternativos, que provean las condiciones hechas a la medida, conforme al caso específico. Llevando a estos materiales a un sector de interés para el área de la medicina, dándoles aplicaciones clínicas en implantes (**Figura 4**), ya que con ellos se pueden rediseñar piezas moldeadas o mecanizadas, recubrimientos, fibras, películas, espumas y telas para su uso en productos y dispositivos biomédicos. El caso de la patinadora olímpica Sonia Stravinsky, quien pudo volver a caminar y competir gracias al implante de cabeza de fémur y a un proceso adecuado de rehabilitación.

Con los biomateriales se pueden fabricar válvulas cardíacas, reemplazos de articulaciones de cadera, implantes dentales, lentes de contacto entre muchas otras aplicaciones (Cerdeña Meneses, 2019).



Figura 4 Patinadora en pie debido al implante de fémur insertado con éxito

Tomado de (Piña Barba, 2007)

Los biomateriales pueden ser naturales, sintéticos o la combinación de ambos, según sea el requerimiento, pueden finalmente absorberse o degradarse, permiten llegar a sitios que no han sido totalmente explorados, tanto por la ciencia como la medicina, por ello la importancia de su estudio y la constante experimentación del sector.

De este modo la ciencia de los biomateriales esta cimentada en la evidencia de las propiedades físicas y químicas de su comportamiento en un organismo, especialmente por la interacción que se desarrolla entre ambos.

1.7 El hueso

Corresponde a un órgano y/o tejido vivo cuyas funciones en el organismo radican en dar estructura, sostén, articulación, palanca, protección, producción de sangre, respiración, equilibrio mineral, audición y habla, entre otras tareas biológicas. Existen cuatro tipos de él; cortos, largos, planos e irregulares (García Barea, 2015).

Los huesos largos (**Figura 5**) generalmente son cilíndricos y en ellos predomina la dimensión de longitud sobre la de ancho y grosor, suelen ser más rígidos y son los que otorgan movilidad y resistencia.



Figura 5 Ejemplo de hueso largo Fémur

En los huesos cortos no predomina ninguna de las dimensiones (ver **Figura 6**), tienden a parecer cuboides y cumplen la tarea de amortiguar sitios de soporte de grandes movimientos y esfuerzos, generalmente se hallan en las vértebras.



Figura 6 Ejemplo de vertebra, hueso corto

En el caso de los huesos planos (ver **Figura 7**), se carece de un grosor considerable y estos fungen como protección de órganos como la caja torácica.

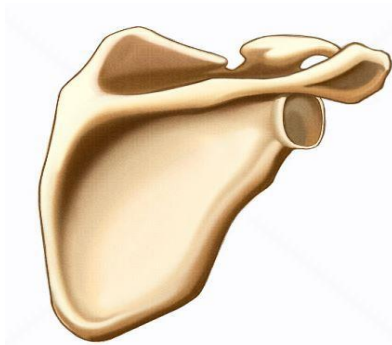


Figura 7 Ejemplo de hueso plano, Omoplato

Por su parte los huesos irregulares (ver **Figura 8**) se encasillan aquí dado que su geometría es diferente a las antes mencionadas.



Figura 8 Ejemplo de hueso irregular, Maxilar superior

El esqueleto humano está conformado por 206 huesos y corresponden aproximadamente al 14% del peso neto de cada individuo.

“El hueso es un tejido conjuntivo mineralizado muy vascularizado e innervado, que está estructurado en laminillas de matriz osteoide calcificada, el acomodo de estas laminillas es el que determina si el hueso es cortical (compacto) o trabecular (esponjoso)” (ver **Figura 9**) (Fernández Tresguerras, Hernández , Alobera Gracia, Del Canto Pingarrón , & Blanco Jérez, 2004).

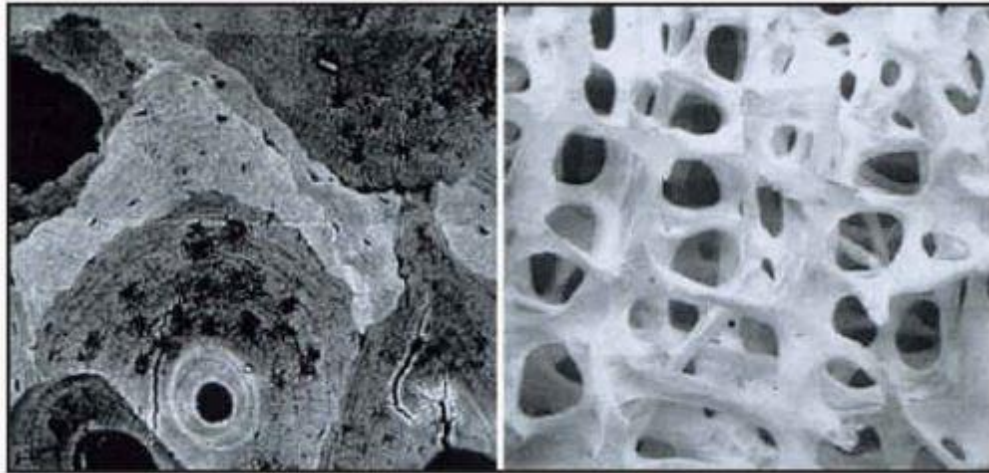


Figura 9 Muestra de tejido óseo cortical (izquierda) y tejido óseo trabecular (derecha)

Tomado de (García Barea, 2015)

Ambos se constituyen de osteonas, el hueso cortical se estructura en conductos de Havers recubiertos de laminillas en disposición concéntricas, ahí es donde se sitúan los osteocitos. El hueso esponjoso o trabecular lo constituyen laminillas en forma de red que delimitan cavidades y en su interior se encuentra médula ósea.

El hueso posee de manera natural un potencial regenerativo para la reparación de fracturas y defectos esqueléticos, por ello, en cirugía ortopédica y maxilofacial un injerto de hueso ayuda a completar la cicatrización y reparación de las deformidades. Partiendo de esta premisa, un injerto de hueso es el material óptimo, sin embargo, su uso es problemático debido a la morbilidad del sitio donador, cantidades insuficientes de material y la reabsorción incontrolada. Por tal motivo, se han buscado alternativas a este tipo de injertos, que incluyen cerámicas tipo fosfato de calcio (Pareja, Escobar, Ossa, & Echevarría , 2008).

La estructura de este tejido es muy organizada y posee principalmente componentes inorgánicos. El tejido óseo es el segundo con mayor índice de reemplazo, al año se llevan a

cabo más de 4 millones de tratamientos quirúrgicos de este tipo debido a daño óseo que es causado por osteoporosis, tuberculosis, osteoartritis, entre otras (Radwan Praglowska, Janus, Piatkowski, Bogdal, & Matysek, 2020). Cabe resaltarse que el tejido por sí mismo solo regenera pequeños defectos, pero fracturas y lesiones de gran dimensión no totalmente, este campo aún está limitado.

En la siguiente **Tabla 3** se enuncian los valores medios de elasticidad y resistencia de los diferentes tipos de hueso:

Tabla 3 Valores medios de esfuerzos y resistencia óseos

Adaptado de (Karageorgiou & Kaplan, 2005)

Tipo de hueso	Dirección y tipo de carga	Fuerza máxima (MPa)	Módulo de elasticidad (GPa)
Cortical (medio femoral)	Tensión longitudinal	133	17
	Compresión longitudinal	193	17
	Cizalla longitudinal	68	3
	Tensión transversal	51	11.5
	Compresión transversal	33	11.5
Trabecular (tibia proximal)	-	5.3	0.445
Trabecular (femoral proximal)	Axial	6.8	0.441

1.7.1 Crecimiento celular óseo

El crecimiento de los huesos comienza desde la vida embrionaria y disminuye después de la pubertad, deteriorándose al llegar a la vida adulta. El crecimiento, remodelado y regeneración del hueso ha sido atribuido a la proliferación de células osteoprogenitoras que es un proceso complejo que involucra a otros conjuntos de células y proteínas (Elorriaga, Martínez, Lecanda, & Larralde, 1996).

Se tienen 4 tipos de células óseas:

-Osteogénicas: Corresponden a las células madre, que provienen del tejido embrionario, se dividen (forman a os osteoblastos) y se encuentran en el endostio.

-Osteoblasto: Conocidas como células formadoras de hueso que sintetizan y secretan colágeno, con ello inician la calcificación (posterior forman osteocitos), se les adjudica un poder de reparación de matriz.

-Osteocitos: Células que han madurado y que intercambian nutrientes con la sangre.

-Osteoclastos: Células gigantes cuya tarea radica en liberar enzimas que digieren poco a poco a los minerales, por tanto, van descomponiendo la matriz, se hallan en la periferia y su tarea es degradarse para dar paso a reestructuración.

-Fibroblastos: Contribuye a la formación de tejido conectivo, secretan colágeno que permite mantener el marco estructural de otros tejidos, pueden hallarse en el hueso como sostén o matriz y del tejido dónde se localicen depende su composición. Posee un alto parecido al osteoblasto, además de que este en su condición inicial de preostoblasto requiere un tratamiento y suplementación especial, de otra forma se transmuta a fibroblasto.

1.7.2 Fibroblastos

Los fibroblastos pertenecen a las células mesenquimales, son altamente reconocidas por su capacidad de proliferar tejido conectivo, que muestra presencia en casi todos los órganos, debido a la producción de una matriz extracelular compleja como las de la piel, pulmones, corazón y músculo esquelético e inclusive se discute actualmente la posibilidad de reparación de los tejidos que en la matriz celular puede llegar a albergar (ver **Figura 10**) (Plikus, y otros, 2021).

Pertenecen al grupo de células denominadas inmortales, por su alta proliferación, equiparada a las células cancerígenas. Poseen una estructura alargada y dendrítica, teniendo una longitud de 50 a 100 μm .

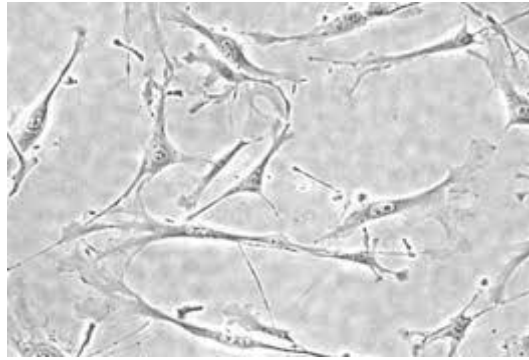


Figura 10 Amplificación 10X de línea celular Fibroblastos

Tomado de (Plikus, y otros, 2021)

1.7.3 Andamios óseos conectivos

De acuerdo con el Lic. en Biología Pello Sánchez “Cuando el propio organismo no es capaz de regenerar los defectos óseos que sufre, suele ser de gran ayuda colocar estructuras compatibles y biodegradables que sirvan como andamios temporales en el tejido dañado.” (2017)

Actualmente el área de la medicina aplicando a sus bases la sustentabilidad y sostenibilidad busca aumentar los casos de regeneración en mayor medida que los de sustitución, propiciando una puerta de oportunidades a la creación de andamios; estructuras diseñadas semejantes al tejido con la posibilidad de portar células, fármacos, proteínas, etc.

El reto de estas estructuras radica en simular lo más certeramente posible al tejido a sustituir “temporalmente” por lo cual debe elaborarse de los materiales propicios y facilitadores de esta tarea.

“Un andamio debe proporcionar biocompatibilidad, alta porosidad y biodegradabilidad con el fin de convertirse en un candidato apto como soporte mecánico con cierta geometría” (Rojas Martínez, y otros, 2020) “Los andamios deben poseer poros iguales o menores a 100 micrómetros a fin de promover crecimiento óseo y lograr el transporte de nutrientes” (Li, Liao, & Tjong, 2019). Sin embargo, saturar de poros también afecta a la composición final del andamio, disminuyendo su resistencia mecánica y aportándole rigidez. A continuación se muestra un ejemplo del entramado tentativo a emplear en el conjugado nHAp (ver **Figura 11**).

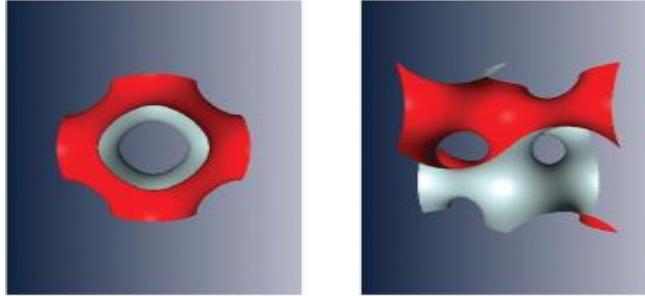


Figura 11 Ejemplos de las posibles celdas unitarias para la creación de andamios porosos

Tomado de (Zadpoor, 2015)

De este modo los andamios se convierten en una alternativa diferente a los injertos propios y a los de donantes que son propensos a acarrear enfermedades e infecciones, dejando atrás también al uso de prótesis sintéticas cuyas composiciones limitaban el uso (Radwan Praglowska, Janus, Piatkowski, Bogdal, & Matysek, 2020).

1.8 Impresión 3D

“La técnica de impresión 3D permite generar adecuada porosidad para el suministro de nutrientes y actividad proliferante de células óseas, consiguiendo adherencia celular e inmigración” (Li, y otros, 2018).

Esta tecnología materializo la posibilidad de obtención de piezas en 3 dimensiones, modeladas mediante un software, de tal manera que la computadora recrea cada capa del sólido haciendo uso de polvos o arenas a altas temperaturas y al finalizar el enfriados se obtiene un sólido resistente.

1.8.1 Algunas técnicas de impresión 3D

- **Estereolitografía (SLA):** Mediante este mecanismo de prototipado se obtienen sólidos en tres dimensiones, partiendo del procesamiento de datos de una tomografía computarizada o de la imagen por una resonancia magnética. La técnica ofrece variedad de aplicaciones en odontología, medicina y tratamientos quirúrgicos (Trevejo Bocanegra, Fernández , & Calderón Ubaqui, 2013).
- **Sinterizado selectivo por láser (SLS):** Esta técnica permite obtener guías en el molde de manera directa, funciona depositando una capa de polvo en un molde precalentado, posteriormente un láser pasa sinterizando el polvo, creando así una capa

tridimensional por la fusión de las partículas con el calor del láser, quienes van tomando la forma descrita por el CAD de diseño (Coba Salcedo & Serres Moliner, 2006).

- Sinterizado láser directo sobre metal (DMLS): Es una de las técnicas de impresión más empleadas para la formación de prótesis removibles, se puede realizar por dos métodos, deposición de polvo y lecho de polvo, por ambos métodos las capas se van construyendo una encima de otra por fundición de los polvos, logrando piezas precisas y detalladas con calidad en superficie y buenas propiedades mecánicas (Fernández W. , 2021).
- Fusión selectiva por láser (SLM): Esta técnica de fabricación de prototipado, que puede ser empleada para fabricar implantes, pero debe cumplir con algunos parámetros importantes, como el espesor de la capa, la distancia, orden y dirección entre escaneos, la velocidad. Genera piezas con porosidad gradiente, debido a que el polvo no solo se sinteriza si no se funde agrega una mayor cohesión el polvo y no lo funde se sugiere para aleaciones (Pérez Martínez , 2016).
- Fusión por haz de electrones (EBM): En esta técnica un cañón generador de un haz de electrones se hace incidir sobre una capa de material de metal en polvo semisinterizado (obtenido de un previo precalentamiento) esta precapa; traza las trayectorias para la pieza a fabricar y asegura el conformado (García Montoro, 2017).
- Drop on Demand (DOD): La técnica de caída por demanda tiene como principio el goteo de material sobre una placa de construcción, se suelen utilizar materiales cuyas tintas curan a la exposición con luces potentes. Posee alta calidad en impresión, es de bajo costo y muy flexible (Karakaya, y otros, 2022).
- Fabricación basada en litografía (LM): Técnica de manufactura que emplea fuerza mecánica para imprimir un patrón, como limitante se señala que deben usarse materiales cuya elasticidad les permita distribuirse por todo el molde, así como mantener un ambiente controlado durante la impresión (Jarrouj Zoudi, 2017).

1.8.2 Modelado por deposición fundida (FDM)

La manufactura aditiva de impresión 3D es un método sofisticado y de bajo costo que a su vez permite obtener geometrías complejas (ver **Figura 12**).

“Las tecnologías de fabricación aditiva (FDM) son tecnologías a partir de las cuales se fabrican modelos en 3D usando el proceso de fabricación capa a capa, en el cual se produce el apilamiento y la unión de capas delgadas de material en una dirección” (AMFAB, 2015).

El proceso consiste en un filamento polimérico que es alimentado a la impresora, quién en su interior procede a reblandecerlo hasta fundirlo y con ayuda de softwares que dirigen a la boquilla comienza a depositarse el material bajo el diseño solicitado.

Cabe mencionar que no requiere herramientas adicionales costosas, por lo que se encuentra entre las técnicas de manufactura más empleadas. Sin embargo, la calidad de la impresión en cuanto a propiedades mecánicas, acabado superficial y precisión dimensional serán resultado de la interacción de diversos factores involucrados, tales como: el grosor de la capa, orientación, ancho de entramado, velocidad de impresión y la configuración de parámetros específicos para cada modelo de impresora. Dentro del ancho del entramado es importante que dimensionalmente se considere el diámetro de la boquilla de extrusión para evitar complicaciones.

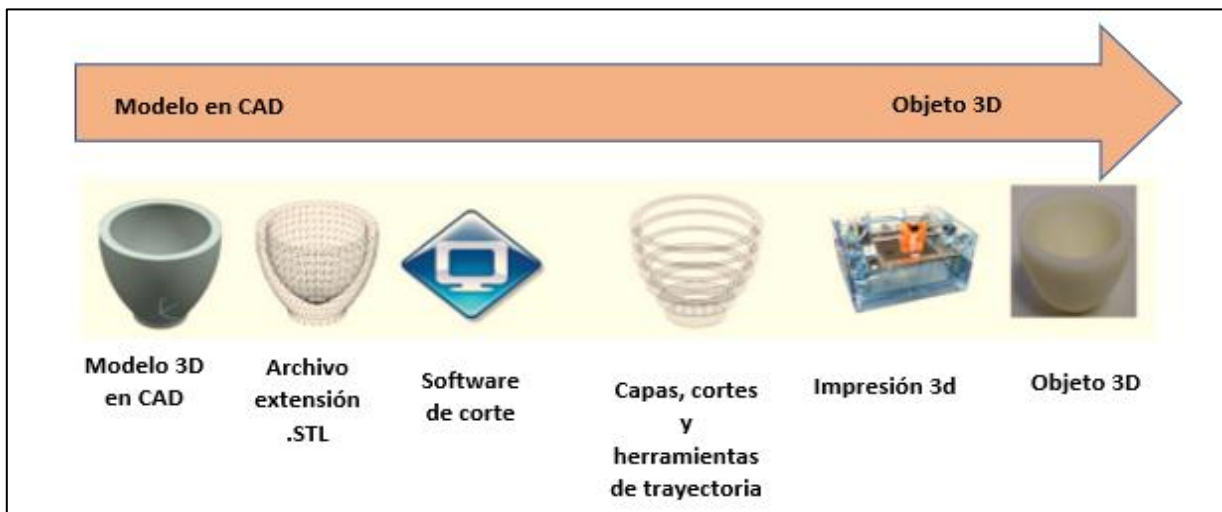


Figura 12 Proceso de producción de una pieza

Adaptado de (AMFAB, 2015)

Un factor ajeno al equipo de impresión y que es también de suma importancia radica en la elección del polímero a trabajar, dado que el proceso exige el uso de polímeros termoplásticos para lograr calentar, reblandecer y finalmente fundirlo para darle la forma precisa. Algunos de los polímeros más comunes empleados en esta técnica de impresión son Acrilonitrilo butadieno estireno (ABS), Ácido poliláctico (PLA), Policarbonatos (PC), Poliéter éter cetona (PEEK), Polieterimida (PEI), Nailon, poliuretano termoplástico (TPU), etc.

1.9 Antecedentes

Como punto parteaguas de esta investigación se retoman resultados afines a las técnicas y materiales a usar, tomando en cuenta los resultados anteriores respecto a las tareas a desempeñar.

Es desde 2016 que se señala la viabilidad de modelar compuestos, no solo de PLA/nanohidroxiapatita, sino de muchos otros dados los resultados de distribución uniforme y con ello mejora de las propiedades mecánicas, teniendo una herramienta totalmente versátil (Esposito Corcione, y otros, 2017).

Una técnica empleada en la fabricación de andamios ha hecho uso del electrohilado vertical donde se transfieren nanotubos de carbono funcionalizados a fibras de PLA asociadas a nanohidroxiapatita (Rodríguez, Razzino, Olivera, Marciano, & Lobo, 2017). La superficie con nanotubos presenta propiedades piezoeléctricas aumentando también la propiedad de mojabilidad de las probetas. Se insertan osteoblastos monitoreando las fases de adhesión e incubación, sin embargo se destaca mayor viabilidad en la técnica de impresión 3D que en esta.

Xiaoyuan Li propone que los andamios tradicionales conlleven el dopaje con Ponericina quién llevada en la gelatina de las estructuras juega un papel de antibacterial a largo plazo, asegurando la viabilidad y biocompatibilidad de los injertos de una forma más certera, facilitando la osteointegración subsecuente (Li, y otros, 2018). Además el artículo "Surface functionalization of 3D printed polymer scaffolds to augment stem cell response" propone la impresión de un andamio 3D base PLA con HA y una porosidad al 70.2 %, adicionando un tratamiento alcalino a la superficie reduciendo así la hidrofobicidad del polímero, alcanzando una mayor proliferación celular en la superficie modificada (Jaidev & Kaushik Chatterjee, 2018). A la par la revista Science Direct en Preparación de PLA compuesto de nanohidroxiapatita en andamios por impresión 3D, reporta una propuesta de método para preparación de andamios PLLA-HAp por la técnica FDM (Molienda de PLLA y adición de HAp, llevar a un molde y fabricar un filamento a diferentes proporciones de refuerzo 12.5, 25 y 50%) para el estudio de propiedades morfológicas y mecánicas del cuál puede rescatarse una distribución homogénea de HAp y que a mayor presencia de estas se obtiene un mayor módulo de Young (Dubinenko, Zinoviev, Bolbasov, Novikov, & Tverdokhlebov, 2018).

Víctor Martín en su artículo (Martín, y otros, 2019) refleja la eficiencia de andamios impresos en 3D recubiertas para reducir las películas bacterianas y favorecer la formación de células

madre, mediante la concepción de un composite PLA/colágeno/MH/CHA obteniendo arquitectura, resistencia y humectabilidad adecuadas, la adhesión y proliferación de médula ósea en un ambiente donde se regula la actividad microbiana en tamaños de poro de entre 400 y 1000 micrómetros con un 75% de porosidad. A la par el artículo “Three-dimensional bone printing using hydroxyapatite-PLA composite” (Zare , Doustkhah, & Husse, 2019) prueban realizando compositos de PLA-HA a concentraciones 95-5%, 90-10%, 85-15% y 50-50%, obteniendo que a mayor PLA aparece un mayor alargamiento y a medida que se disminuye HA también lo hace el módulo de Young, determinando que una proporción de 90-10% provee las propiedades mecánicas más parecidas al hueso real.

En 2019 Wardani y sus colaboradores reportan la creación de un andamio óseo impreso por FDM en 3D, mismo que hace uso de PLA, nHAp, gelatina y HPMC (Hidroxipropilmetilcelulosa) con la finalidad e inyectar en este prototipo células que combaten y contrarrestan los males devenidos de la tuberculosis espinal; el procedimiento de síntesis empleado les asegura un tamaño de poro de 1172.614 micrómetros y aseguran su estabilidad monitoreando el pH. Consiguen así un andamio un 97.71 de similitud al hueso, indican que su matriz podría propiciar el crecimiento de osteoblastos y se considera como apto a la degradación con los fluidos corporales, el agente activo también funge como antibacterial asegurando una etapa menos riesgosa y la correcta integración de los minerales para la regeneración ósea. La meta de este tipo de proyectos es acercarse a controlar la liberación del fármaco mediante el tamaño de poro y su diseño (Whardani, Samudra, Katherine, Hikmawati, & Aminatum, 2019).

Mientras Yuchao Li y colaboradores desarrollan una investigación exhaustiva nanocompuestos sintéticos reforzados con nanohidroxiapatita y oxido de grafeno con posible regeneración ósea. Haciendo un paso por el uso de PLA, PCL, PLA/PGA concretados por diferentes métodos de donde cabe resaltar la relación de PLA con 20.85 % en peso de nanohidroxiapatita reproduce las propiedades mecánicas que coinciden con el hueso y que el uso de grafeno (OG) potencia el módulo elástico del mismo, como también la movilidad eléctrica. Aseverando que el 20% en peso de OG muestra los mejores resultados para el caso de PLA/nHAp. Dentro de la investigación se resalta también el uso del método de impresión 3D por sus altos beneficios y versatilidad (Li, Liao, & Tjong, 2019).

En contraparte, Mondal y colaboradores examinan andamios de PLA-HA con 3 diferentes orientaciones en los discos a 0°, 45°, 90°, hallando a la de 90° con mejores resultados de compresión. El proceso de adición de las nanopartículas a las probetas de PLA se lleva a cabo

mediante un sonicado en solución con nHAp, resaltando que el exceso de estas puede llegar a obstruir los poros del composito (Mondal, y otros, 2019).

El artículo “3D Hierarchical, Nanostructured Chitosan/PLA/HA Scaffolds Doped with TiO₂/Au/Pt NPs with Tunable Properties for Guided Bone Tissue Engineering” (Radwan Praglowska, Janus, Piatkowski, Bogdal, & Matysek, 2020) enmarca la viabilidad de conformar andamios 3D de nanohidroxiapatita con PLA, quitosano y agregados de TiO₂/Au/Pt, donde se reducen los riesgos de infección debido a la aplicación de las nanopartículas. Los armazones surgen de colocar una esfera 3D (fibrosa) sobre el aerogel de quitosano y posteriormente en él se incrustan las nanopartículas, de este modo cuando se degrada el quitosano permite la cristalización de la hidroxiapatita y posibilita la formación de hueso. Los mejores resultados se obtienen de la impresión dopada con TiO₂, quién provee de mayor bioactividad y bimineralización.

Chen y su equipo revisan la viabilidad de agregar un tratamiento alcali (con amoníaco) en la superficie para una mejora de proliferación celular de andamios PLA-nHAp, cuyo objetivo es alcanzado, pero no se reflejan mejoras en las propiedades mecánicas (Chen, y otros, 2020).

Por otro lado, en el artículo “3D printed bone tissue regenerative PLA/HA scaffolds with comprehensive performance optimizations”, donde se obtienen armazones biomiméticos de PLA-nHAp (Con tratamiento en la interfaz para su mejora del silano dodeciltrimetoxisilano) por FDM a 0%, 30% y 50% de refuerzo se obtiene mayor rango de deformación previo a la rotura con 50% de HA y a la par una pronta degradación comparado con los otros especímenes (Wang, y otros, 2021).

A finales del 2021 Daskalakis y colaboradores incursionan con la obtención de ladrillos óseos para mejoras mecánicas y rendimiento biológico, diseñando estructuras novedosas con dimensiones no uniformes y gradientes de tamaño de poros, los andamios contienen PCL-HA y TCP al 10%, 15% y 20%, preparándose por mezcla es estado fundido (FDM), una vez conseguido el filamento se forman los compositos disminuyendo el poro del exterior al interior y rescatando que a mayor cantidad de cerámico el ancho del filamento disminuye y por ende los poros son más grandes, se logran mejoras mecánicas pero sin alcanzar las óseas, para la respuesta biológica las probetas con 20% presentan mayor fluorescencia en la microscopia confocal (Daskalakis, y otros, 2021) (Véase cronología en **Tabla 4**).

Tabla 4 Estado del arte de los artículos revisados

(Autoría propia)

Artículo	Autores	Año	Contenido
Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering	Guobao Weia, Peter X. Ma	2003	Los andamios con una morfología fibrosa aumentan al triple la adsorción de proteínas en comparativa con los no fibrosos
Biodegradable HA-PLA 3-D porous scaffolds: Effect of nano-sized filler content on scaffold properties	Chandrasekhar R. Kothapalli, Montgomery T. Shaw, Mei Wei	2005	Armazones de PLA-nHAp por hidrotermal con partículas de 25 nm de ancho y 150 nm de largo generan un andamio poroso que aumenta en absorción al 540% y 274 % en peso
Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis	Vassilis Karageorgiou, DavidKaplan	2005	Monitoreo de osteogénesis y propiedades mecánicas in vitro (menor porosidad suprime la proliferación) e in vivo (a mayor porosidad, mayor crecimiento óseo). Se sugieren poros de entre 300 a 700 μm para la formación de hueso nuevo y capilares. Los poros pequeños favorecen la formación de célula osteocondral, previa a la osteogénesis y los poros grandes van a la osteogénesis directa (sin formar cartílago) Tablas de valores de esfuerzos medios
Nanofibrous Poly(lactic acid)/Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Guided Tissue Regeneration	Sung In Jeong, Eun Kyoung Ko, Jungsuk Yum, Chul Ho Jung, Young Moo Lee, Heungsoo Shin	2008	Andamios de PLA-nHAp por electrohilado que permiten proliferación de osteoblastos, se reporta un 20% de refuerzo como el ideal
Air jet spinning of hydroxyapatite/poly(lactic acid) hybrid nanocomposite membrane mats for bone tissue engineering	Abdalla Abdalhaya, Faheem A. Sheikh, Jae Kyoo Lim	2012	Electrohilado de PLA y nHAp implantando osteoblastos, la muestra con mayor presencia de nHAp sedimenta las partículas y las aglomera. Se logran mejoras en compresión y tracción debido a la interacción de matriz refuerzo

Evaluation of the novel three-dimensional porous poly (L-lactic acid)/nanohydroxyapatite composite scaffold	Jianghong Huang, Jianyi Xiong, Jianquan Liu, Weimin Zhu, Jieli Chen, Li Duana, Jufeng Zhang and Daping Wang	2015	Las propiedades mecánicas y la tracción disminuyen con mayor adición de nHAp, la porosidad optima de las partículas se reporta en 80% y se sugiere un refuerzo a 20% como ideal
Bone tissue regeneration: the role of scaffold geometry	Amir A. Zadpoor	2015	La geometría del andamio influye en la respuesta celular y la velocidad de regeneración del tejido óseo, los poros pequeños permiten esparcimiento y los grandes liberan citocinas
The feasibility of printing polylactic acid-nanohydroxyapatite composites using a low-cost fused deposition modeling 3D printer	Carola Esposito Corcione, Francesca Gervaso, Francesca Scaler, Francesco Montagna, Alessandro Sannino, Alfonso Maffezzoli	2016	PLA% nHAp logra una distribución uniforme y mejora de propiedades mecánicas, el FDM se da en 3 etapas
Degradable 3D printed PLA scaffold with long-term antibacterial activity	Xiaoyuan Li, Yu Wang, Min Guo, Zongliang Wang, Nannan Shao, Peibiao Zhang, Xuesi Chen, and Yubin Huang	2017	Por técnica de impresión 3D se consigue hasta un 67% de porosidad (Hueso poroso entre 50 y 90 %); con PLA, Hidroxiapatita, Ponericina y gelatina
Surface functionalization of 3D printed polymer scaffolds to augment stem cell response	L.R. Jaidev, Kaushik Chatterjee	2018	Impresión 3D de andamio de PLA-HA al 70.2% de porosidad (realizando un tratamiento alcalino a la superficie, reduciendo hidrofobicidad del PLA) corroborando al final mayor proliferación celular en los andamios con superficie modificada.

Preparation of Poly(L-lactic acid)/Hydroxyapatite composite scaffolds by fused deposit modeling 3D printing	Gleb E. Dubinenko, Alexey L. Zinoviev, Evgeniy N. Bolbasov, Viktor T. Novikov and Sergey I. Tverdokhlebov	2018	Propuesta de formación de andamios por FDM de una solución de cloroformo con PLLA-HAp (12.56 nm) con 12.5, 25 y 50% de refuerzo, generando compositos con distribución homogénea a manera de discos porosos y con detección da mayor módulo de Young con el incremento de HAp
Synthetic Biodegradable Aliphatic Polyester Nanocomposites Reinforced with Nanohydroxyapatite and/or Graphene Oxide for Bone Tissue Engineering Applications	Yuchao Li, Chengzhu Liao and Sie Chin Tjong	2019	Revisión del PLA en unión con PCL, PGA y grafeno con nHAp, es un compendio de diferentes métodos de síntesis. Indica que el PLA con 70.85 en peso de nHAp logra llevar a unan coincidencia con las propiedades mecánicas del hueso cortical humano, mejorando aún más en conjunto son el GO
Three-dimensional bone printing using hydroxyapatite-PLA composite	Reza Najafi Zare, Esmail Doustkhah, M. Hussein N. Assadi	2019	Se realizan compositos de PLA-HA a concentraciones 95-5%, 90-10%, 85-15% y 50-50%, obteniendo que a mayor PLA se alargan más y conforme disminuye HA también lo hace el módulo de Young. Arroja que la proporción de 90-10% muestra las propiedades mecánicas más parecidas al hueso real.
Hydroxyapatite nano bioceramics optimized 3D printed poly lactic acid scaffold for bone tissue engineering application	Sudip Mondal, Thanh Phuoc Nguyen, Van Hiep Pham, Giang Hoang, Panchanathan Manivasagan, Myoung Hwan Kim, Seung Yun Nam, Junghwan Oh	2019	Andamio de PLA-HA (36nm) a 3 diferentes orientaciones 0°, 45°, 90°, hallando a la de 90° con mejores resultados de compresión. Las probetas se sonicen en nHAp, pero el exceso de esta puede obstruir los poros
3D printing of PLA composites scaffolds reinforced with keratin and chitosan: Effect of geometry and structure	L.E. Rojas-Martínez, C.G. Flores-Hernandez, L.M. López-Marín, A.L. Martínez-Hernandez, S.B. Thorat, C.D. Reyes Vasquez, A.E. Del Rio-Castillo, C. Velasco-Santos	2020	Andamios de PLA con queratina y quitosano, se insertan células en ellos y se monitorea por fluorescencia su adhesión y concentración, aseveran mejores resultados mecánicos y de adsorción con bajos niveles de concentración

Alkali treatment facilitates functional nano-hydroxyapatite coating of 3D printed polylactic acid scaffolds	Weitong Chen, Luke Nichols, Frank Brinkley, Kelson Bohna, Wenmeng Tian, Matthew W. Priddy, Lauren B. Priddy	2020	Diseño de una estructura con poros cúbicos uniformes mediante FDM de PLA-nHAp con tratamiento álcali para mejora de proliferación celular, la cual se consigue. Pero no se logra aumento de propiedades mecánicas
In vitro comparison of 3D printed polylactic acid/hydroxyapatite and Polylactic acid/bioglass composite scaffolds: Insights into materials for bone regeneration	Milda Alksne, Migle Kalvaityte, Egidijus Simoliunas, Ieva Rinkunaite, Ieva Gendviliene, Janis Locs, Vygandas Rutkunas, Virginija Bukelskiene	2020	Se revisa la viabilidad de crear andamios PLA-HA y PLA-BG (biovidrio) se parte del 10% de refuerzo en cada caso y obteniendo que BG aporta una débil adhesión y proliferación celular, pero es más compatible y osteoconductor, en el caso de prueba de adsorción la HA presenta una menor cantidad de agua y proteínas absorbidas, pero una mayor adhesión celular
3D printed poly(lactic acid) scaffolds modified with chitosan and hydroxyapatite for bone repair applications	Muhammad Anwaar Nazeer, Ozgun Can Ondera, Ilkem Sevgili, Emel Yilgor, Ibrahim Halil Kavakli, Iskender Yilgor	2020	Andamios 3D de PLA-HA-CS modificados, se emplea ácido fórmico para diluir a los refuerzos y formar el composite a 10% y 20% el PLA se degrada 50.6% en 15 semanas
Multi-Dimensional Printing for Bone Tissue Engineering	Moyuan Qu, Canran Wang, Xingwu Zhou, Alberto Libanori, Xing Jiang, Weizhe Xu, Songsong Zhu, Qianming Chen, Wujin Sun and Ali Khademhosseini	2021	Resumen de estudios recientes 3D para regenerar hueso y avances 4D. Cuadros comparativos de técnicas, enmarcando al PLA con grandes mejoras
Bone Bricks: The Effect of Architecture and Material Composition on the Mechanical and Biological Performance of Bone Scaffolds	Evangelos Daskalakis, Boyang Huang, Cian Vyas, Anil A. Acar, Fengyuan Liu, Ali Fallah, Glen Cooper, Andrew Weightman, Gordon Blunn, Bahattin Koc, y Paulo Bartolo	2021	Diseño de andamios innovadores bajo un patrón degradado de poros (El tamaño disminuye del exterior al interior) realizados con PCL, HA (10,15 Y 20 %) y TCP por FDM, se emplean filamentos de doble espiral y las células que se insertan son de tejido adiposo. Mientras mayor es la cantidad de cerámica empleada el ancho del filamento disminuye y aumenta el tamaño de poros

3D printed bone tissue regenerative scaffolds with comprehensive performance optimizations	PLA/HA with Boqing Zhang, Ling Wang, Ping Song, Xuan Pei, Huan Sun, LinaWu, Changchun Zhou, Kefeng Wang, Yujiang Fan, Xingdong Zhang	2021	Armazones de PLA-nHAp obtenidos por FDM, biomimética con HA de 50 a 80 nm al 0, 30 y 50% en refuerzo. Los resultados de mayor deformación antes de rotura fueron con 50% de nHAp, quién también provee de una más pronta degradación. Para la interfaz del composito se emplea el silano dodeciltrimetoxisilano
--	--	------	---

1.9.1 Desarrollo previo

La adquisición de las nHAp involucra tomar como punto de partida los reportes de caracterización de la misma, generados en un artículo “The pH Effect on the Growth of Hexagonal and Monoclinic Hydroxyapatite Synthesized by the Hydrothermal Method” del Co-asesor de este proyecto, el Dr. Ventura Lugo en colaboración con otros investigadores (López Ortíz, y otros, 2020).

Las nHAp que se proporcionaron son de un pH neutro (7), sin embargo en el artículo se muestra la obtención en comparativa de un pH 7, 8, 9, 9.6 y 10. Registrando desde el método de obtención (Figura 13), DRX (Figura 14), porcentaje en peso de las fases cristalinas presentes (Figura 15), micrografías AFM (Figura 16), así como espectros de FTIR (Figura 17).

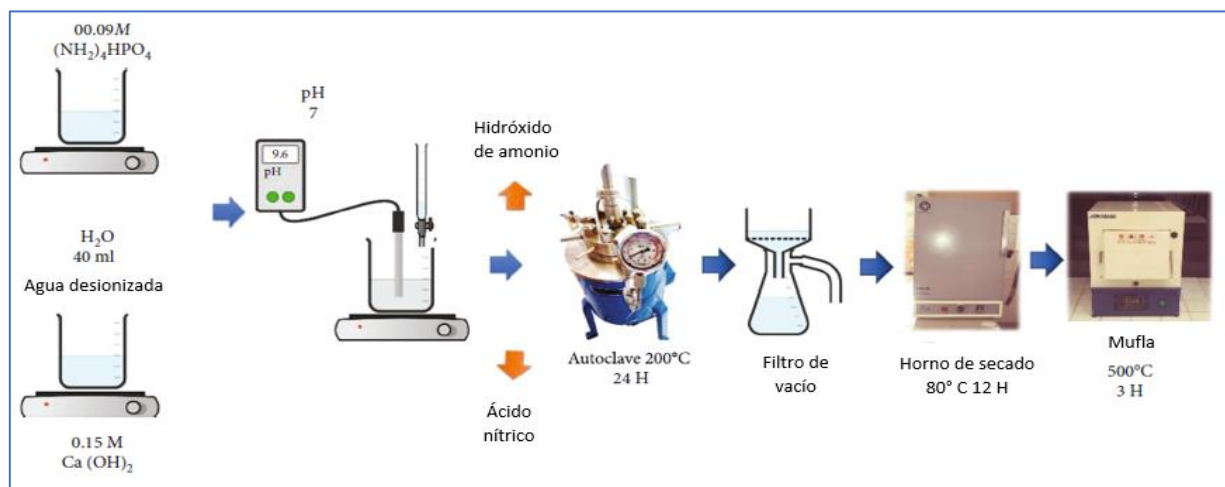


Figura 13 Método hidrotérmico, mediante el cual se obtienen nHAp a diferentes pH

Adaptado de (López Ortíz, y otros, 2020)

El análisis DRX muestra en la figura a) la fase monoclinica y en la b) la fase hexagonal de los cuales se encontró alta coincidencia con las tarjetas del Joint Comit on Powder Difraccion

Standers. (76-0694 para monoclinica y 79-0565 para hexagonal) Resaltando que la línea amarilla es la del espécimen de interés.

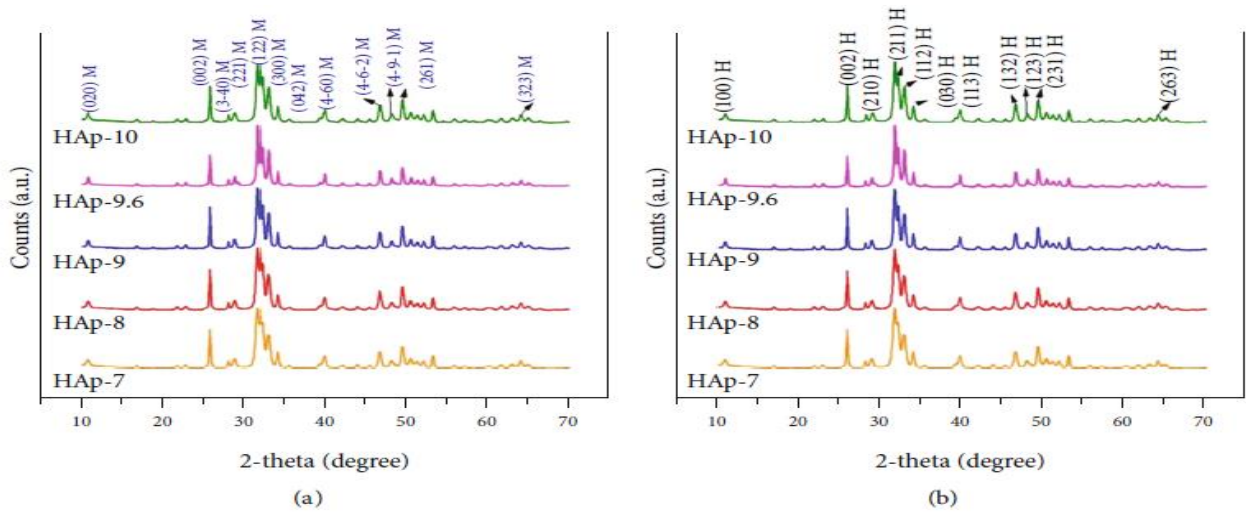


Figura 14 Resultados DRX de nHAp en diferentes pH a) fase monoclinica y b) fase hexagonal

Tomado de (López Ortiz, y otros, 2020)

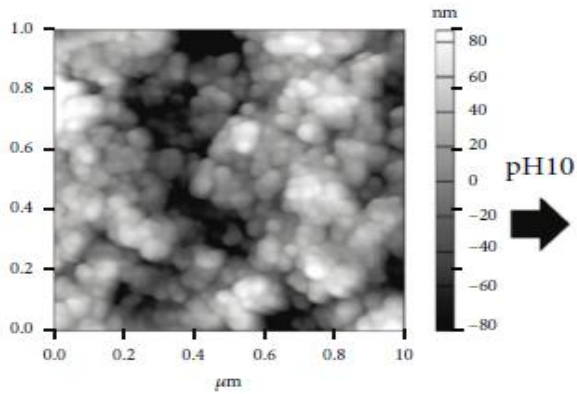
El comportamiento de las nHAp mediante sus fases cristalinas expresa el aumento de fase monoclinica y la disminucion de la fase hexagonal en función de la disminucion del pH. Así como también la disminucion del tamaño de los cristales.

pH	Hexagonal (wt%)	Monoclinic (wt%)	Hexagonal crystallite size (nm)	Monoclinic crystallite size (nm)	χ^2
10	5.65	94.35	41.73	28.90	1.02
9.6 (ipH)	17.36	82.64	40.86	46.70	1.27
9	4.67	95.33	13.11	27.36	1.06
8	4.01	95.99	10.31	22.32	1.09
7	2.58	97.42	15.51	19.56	1.14

Figura 15 Porcentaje en peso y tamaño de cristales de las fases

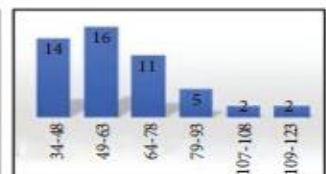
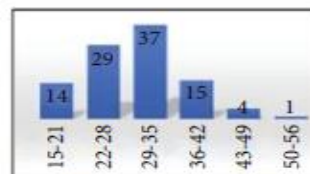
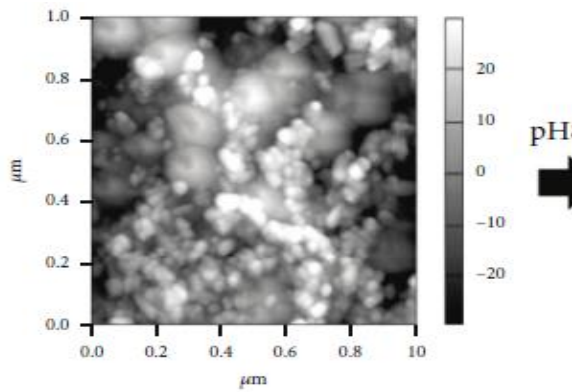
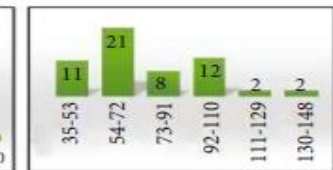
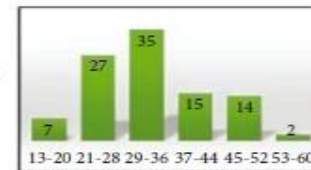
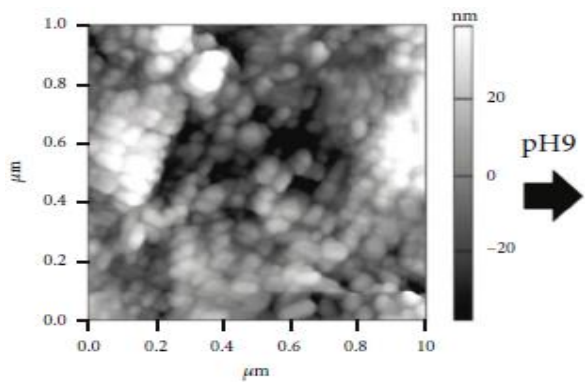
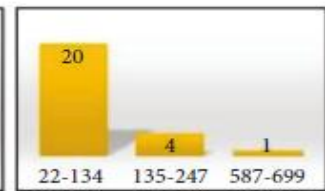
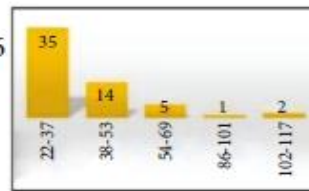
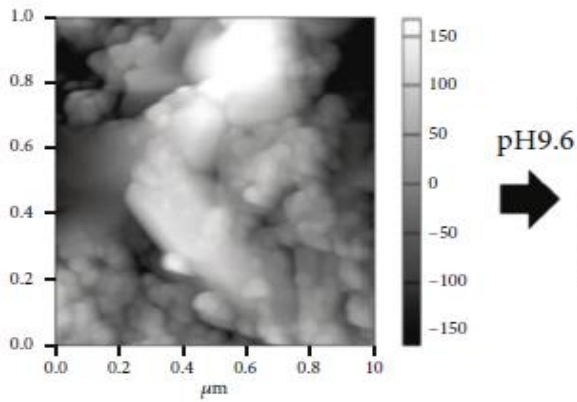
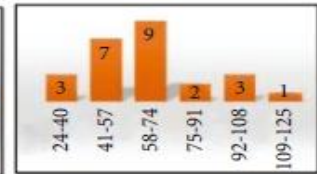
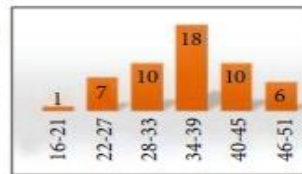
Tomado de (López Ortiz, y otros, 2020)

La microscopia de fuerza atómica muestra la distribución de las nHAp y los tamaños de las mismas (ver **Figura 16**).



Diámetro (nm)

Longitud (nm)



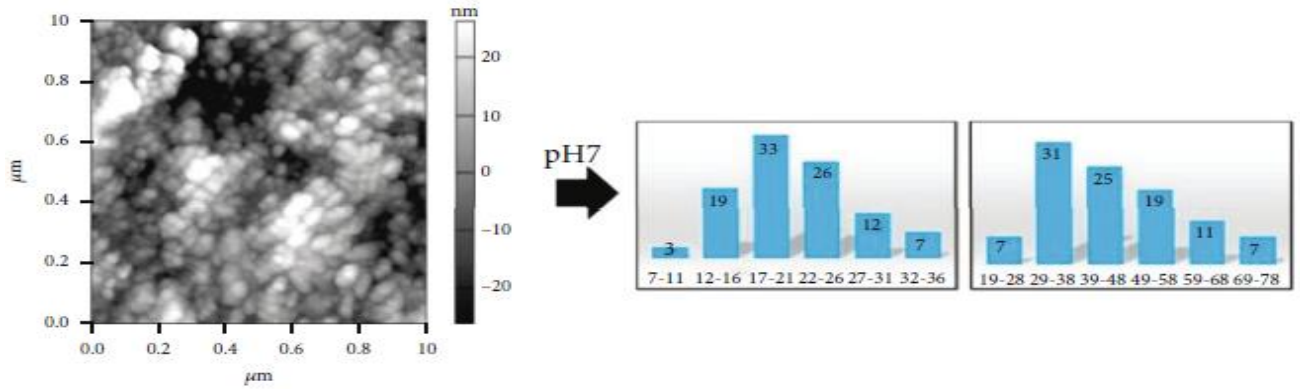


Figura 16 Resultados SEM de los diferentes pH

Tomado de (López Ortiz, y otros, 2020).

Por su parte en FTIR se observan las vibraciones de los grupos funcionales, que en este caso por los grupos fosfatos son principalmente de OH que conforman sus radicales.

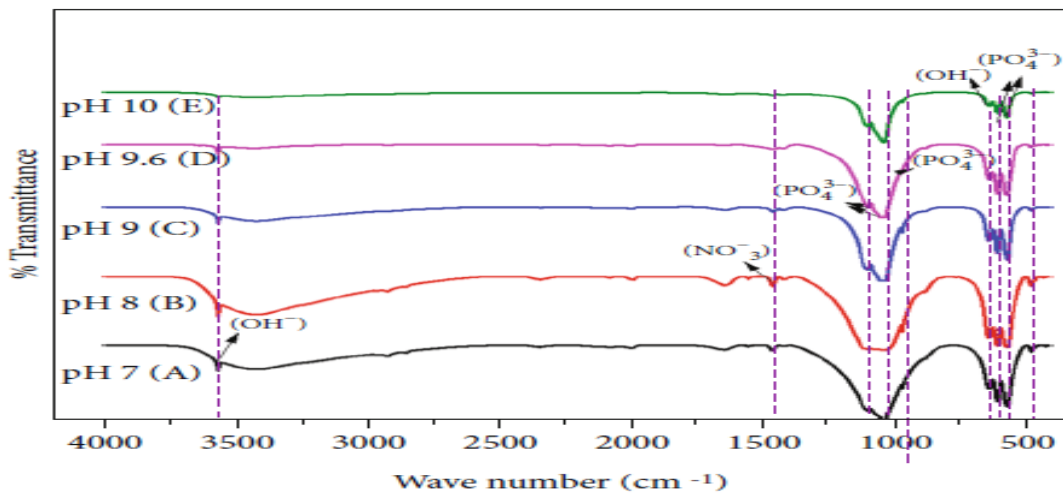


Figura 17 FTIR de nHAp a diferentes pH

Tomado de (López Ortiz, y otros, 2020)

CAPÍTULO II DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 Metodología

Se empleará el método de impresión 3D por deposición fundida basado en la diversidad de aplicación de la técnica, así como su rapidez y viabilidad económica, también el uso del filamento comercial PLA, dadas sus características poliméricas de reconstrucción y biocompatibilidad, mismas que ya han sido corroboradas en diversos estudios precedentes que han obteniendo estructuras estables y porosas que consiguen un panorama positivo en cuanto al crecimiento de fibroblastos.

El proyecto retoma PLA reforzado con nanoestructuras de hidroxiapatita, material derivado del calcio que ya tiene aplicaciones en implantes y sustitutos de cierto tipo de tejido, músculos y piel (Rodríguez Lugo , y otros, 2018).

Con base en ello la parte inicial de la investigación radica en sintetizar las nHAp retomándola técnica húmeda o síntesis hidrotermal, la cual reporta resultados deseables a pH 10 y 900°C, consiguiendo estabilidad y formación cristalográfica en forma de escamas que permiten intercambios aplicables a biomédica (López Ortiz, y otros, 2020)

Una vez conseguida la síntesis de la nHAp se procede a la formación de un filamento compuesto de PLA y nHAp al 0.005% y al 0.05%, en peso para con él llevar a cabo la técnica de impresión 3D a fin de observar y monitorear el comportamiento de las propiedades mecánicas, térmicas y biocompatibles de cada una.

Finalmente se insertarán osteoblastos y se dará seguimiento a la proliferación celular en el medio y a su respuesta térmica, elaborando un avance gráfico que permita concluir la interacción de estos elementos a diferentes concentraciones y condiciones, determinando la viabilidad de los compositos obtenidos.

Como parte inicial del proyecto se tiene la adquisición de nHAp, las cuáles poseen un pH de 7 la cual se obtienen estructuras semejantes a varillas (Rodríguez Lugo , y otros, 2018) (**Figura 18**). Las técnicas de caracterización empleadas para poder registrar la morfología obtenida serán TEM, así como FTIR. Se presenta el desarrollo metodológico en la **Figura 19**.

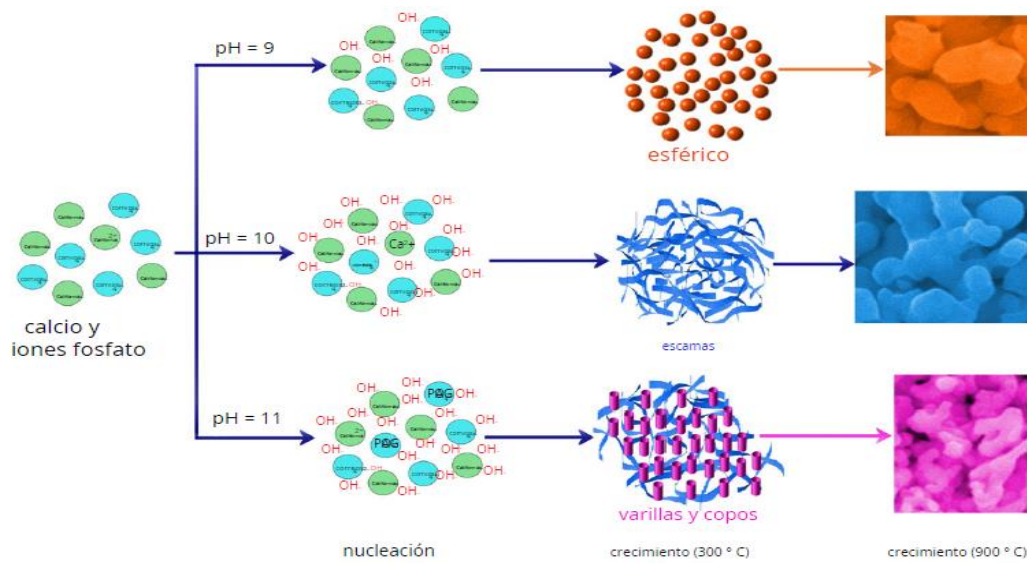


Figura 18 Formaciones cristalinas reportadas a diferentes pH y temperatura

Tomado de (Rodríguez Lugo , y otros, 2018).

Se cuenta con las nHAp y se conocen las concentraciones que se trabajarán, así como las probetas que se requerirán para cumplir con los ensayos destinados a realizarse. El tentativo de material a emplear bajo cada régimen de concentración se muestra a continuación en la

Tabla 5:

Tabla 5 Relación de concentraciones y probetas requeridas de cada una, así como el material teórico a emplear.

Pruebas	Concentraciones			Total
	Blanco (0%)	0.005% de nHAp	0.05% de nHAp	
Biocompatibilidad 10x10x5 mm ³	50 probetas	50 probetas	50 probetas	Total
0.81g*probeta	40.5 g	40.5 g	40.5 g	121.5 g
DMA ASTM D-4065 35x10x3.2 mm ³	5 probetas	5 probetas	5 probetas	Total
2.72 g*probeta	13.6 g	13.6 g	13.6 g	40.8 g
Tensión Probeta tipo 4	5 probetas rellenas y 5 con entramado	5 probetas rellenas y 5 con entramado	5 probetas rellenas y 5 con entramado	Total
9 g*probeta	90 g	90 g	90 g	270 g

Cantidad de filamento a fabricar por concentración	144.1 g	144.1 g	144.1 g	Total de PLA/PHA 432.3 g
--	---------	---------	---------	-----------------------------

Determinando requerir 432.3 g de filamento comercial PLA y por cuestiones de holgura para el trabajo y las pruebas se solicitaron 3 kg entre ambos materiales.

Por otra parte, tras la adquisición del filamento comercial PLA se procede a realizar una molienda del mismo, con la finalidad de posteriormente extruir un nuevo filamento que contendrá a las nanopartículas previamente sintetizadas en diferentes proporciones; 0%, 0.05% y 0.005%, para posteriormente replicar el mejor resultado con filamento compuesto en base a PLA.

De manera análoga se llevará a cabo el diseño de los andamios a emplear mediante el programa de Solidworks, adaptando una morfología gradiente bajo diseño mimético óseo. Concretado el filamento compuesto en sus diferentes concentraciones comenzará la tarea de impresión de los andamios haciendo uso de la técnica FDM.

Los andamios se someterán a pruebas de esfuerzo a fin de documentar las características que poseen y compararlas contra la resistencia de los huesos en el cuerpo humano, así como contraponerlo a los resultados de las investigaciones previas, donde se han variado los refuerzos y las técnicas de formado. Para caracterizar estos elementos se llevará a cabo DMA, SEM corroborando la presencia de porosidad en la superficie del entramado y la acción de está, puesto que es primordial para lograr concretar el proyecto.

Logrados los andamios, se procede a implantar el material celular acompañado de suero y antibiótico a fin de contribuir con los nutrientes necesarios para conseguir la inserción, adhesión y proliferación de las células inmersas en un lapso de tiempo y poder evidenciar el crecimiento celular favoreciendo la regeneración de tejido en lo posterior.

El seguimiento de la proliferación será mediante la técnica MTT para apreciar la coloración de las zonas celulares a través del tiempo, dando seguimiento mediante microscopía confocal.

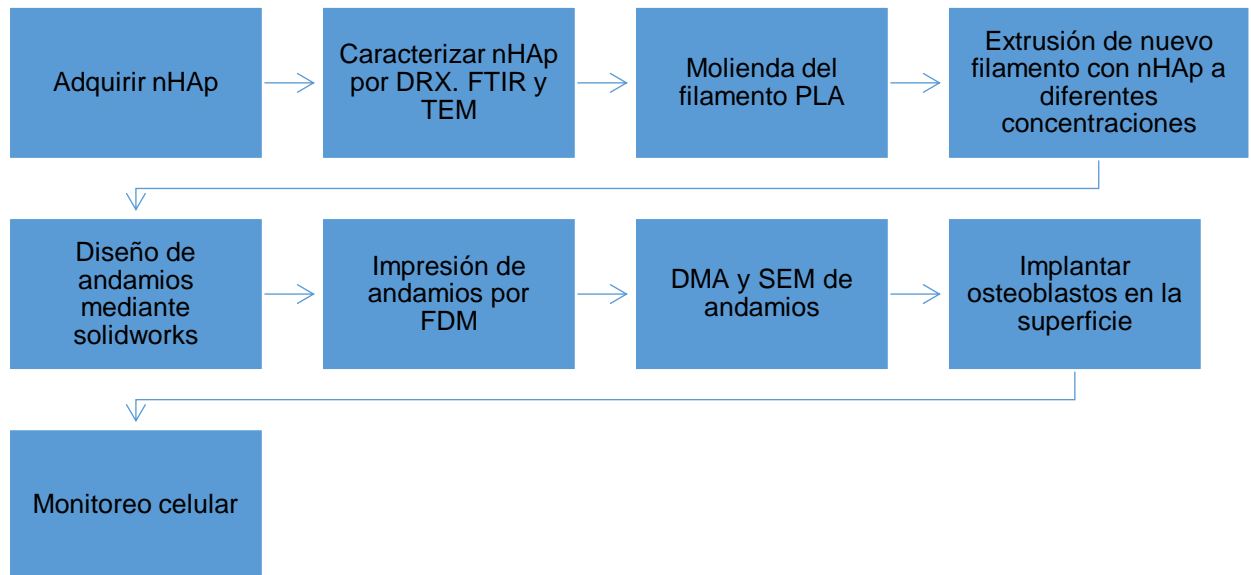


Figura 19 Directrices del proyecto

(Autoría propia)

2.2 Materiales y equipos

2.2.1 Ácido poliláctico (PLA)

El filamento comercial adquirido es PLA premium+ transparente de la marca COLOR PLUS (Figura 20) cuyo diámetro es de 1.75 mm y cuenta con indicaciones de impresión entre 180 y 200°C.



Figura 20 Polímero PLA comercial adquirido

2.2.2 Nanopartículas de hidroxiapatita (nHAp)

Se reciben 2g de nHAp de la Universidad Autónoma de Hidalgo, sintetizadas por el método hidrotermal reportado por el Dr. Ventura Lugo (López Ortiz, y otros, 2020) con un pH de 7 (Figura 21).

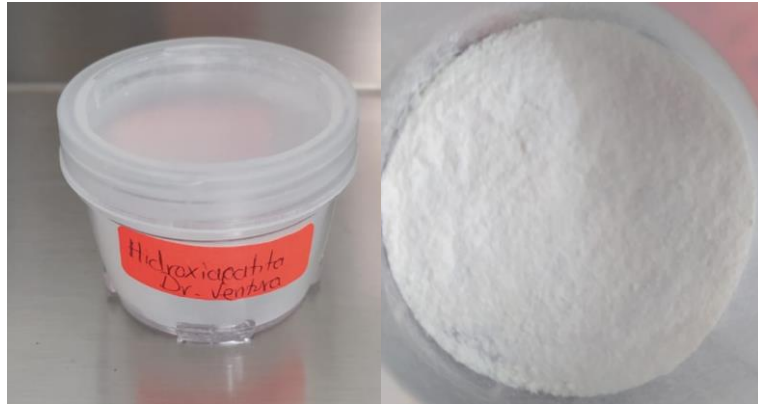


Figura 21 Hidroxiapatita nanoestructural proporcionada, sintetizada previamente por el equipo de trabajo del Dr. Ventura en la UAEH

2.2.3 Difracción de rayos X (DRX)

La técnica de difracción de rayos X permite conocer y estudiar la estructura atómica. Se inciden rayos X mediante un haz a la muestra, dando paso a la interacción con la onda incidente que dispersa en diferentes grados de acuerdo a la morfología emitiendo con ello un espectro de difracción y este a su vez evidencia la distribución espacial de los átomos componentes de la muestra (Rivera Escoto, 2017).

El comportamiento de la dispersión sigue a ley de Bragg, lo que posibilita la determinación de la distancia interplanar y tamaños de cristal (Figura 22).

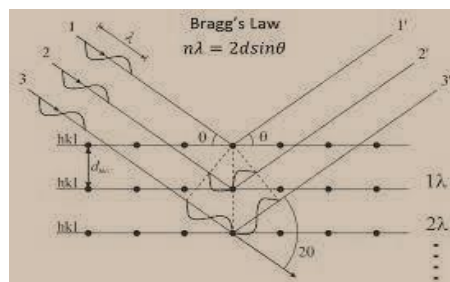


Figura 22 Mecanismo de funcionamiento de la difracción de rayos X

Recuperado de (Rivera Escoto, 2017)

Se retoman los análisis DRX del material original, de acuerdo con el artículo de publicación acerca de la síntesis de nHAp del Dr. Ventura en la UAEH.

2.2.4 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

El microscopio electrónico de transmisión TEM, es la técnica en la que un haz de electrones se incide y hace pasar a través de una muestra, cuya interacción forma una imagen de los electrones que se transmitieron (Silva Pereira & Patrón Soberon, 2017).

Esta técnica a diferencia del SEM muestra una mayor resolución en cuanto a alteraciones precisas no solo en la superficie, con lo que inclusive se puede realizar una caracterización estructural (**Figura 23**).

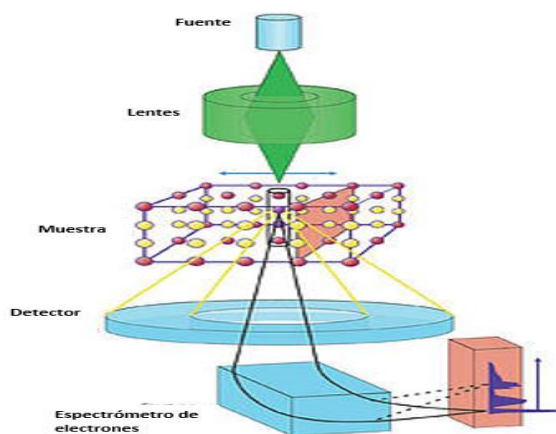


Figura 23 Estructura del TEM

Adaptado de (Silva Pereira & Patrón Soberon, 2017).

Se consiguieron las tomas empleando un microscopio JEOL JEM-1010 a 80 Kv, las muestras de nanomateriales fueron dispersadas en acetona en un baño ultrasónico a 44 Hz por 20 min y después fueron llevadas a una rejilla de malla 200, se hicieron cortes de micrótomo con espesor de 70-90 nm.

2.2.5 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier “es una técnica cualitativa basada en la ubicación de la presencia de enlaces orgánicos, mediante la interpretación de la vibración en sus enlaces” (Gómez & Rogelio, 2006), lo que va a permitir la ubicación de los enlaces formados entre los grupos fosfatos y OH con la finalidad de precisar la presencia de

hidroxiapatita nanométrica. El mecanismo consta de diversas partes (**Figura 24**). El equipo de Espectroscopía infrarroja a emplear se encuentra en las instalaciones del Tecnológico de Querétaro.

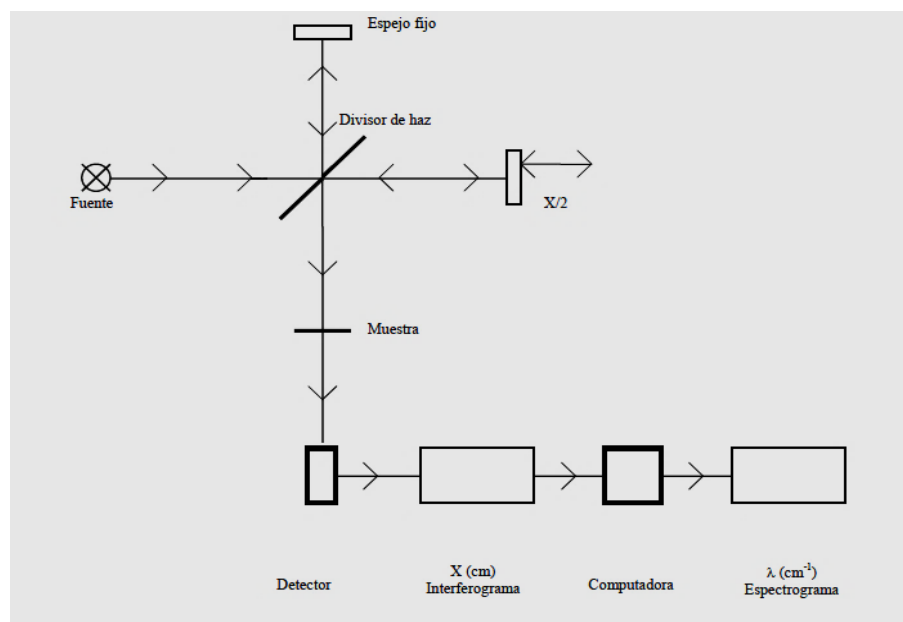


Figura 24 Esquema FTIR

Recuperado de (Gómez & Rogelio, 2006)

La técnica se emplea para evaluar los grupos funcionales presentes en las nHAp, en los compositos, así como en el polímero por sí solo para con ello evidenciar el conjugado.

Se consiguen las lecturas con el equipo FTIR marca bruker, tensor 37 con ATR, 32 escaners, 1 cm⁻¹ resolución y modo transmitancia del Tecnológico Nacional de México campus Querétaro (ver **Figura 25**).

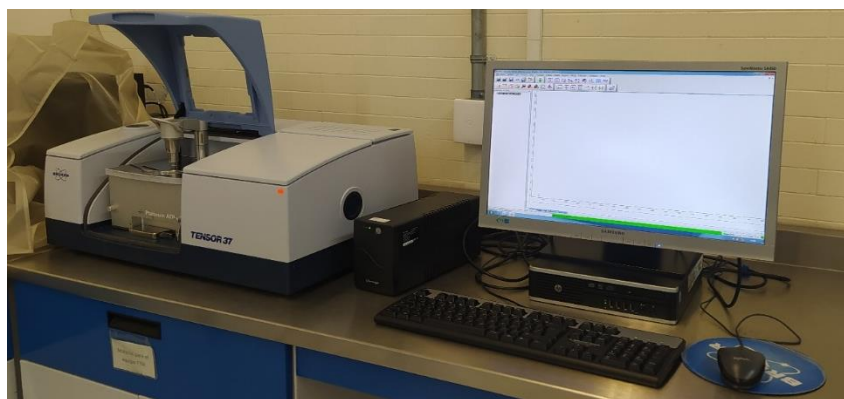


Figura 25 Equipo FTIR del Tecnológico de Querétaro

2.2.6 Calorimetría diferencial de barrido DSC

Se denomina así a la técnica que evalúa la pérdida de calor asociado al desnaturalizar la muestra al ser calentada a un constante ritmo. En estos espectros, a medida que aumenta el punto de transición térmica (T_m), se indica una mayor estabilidad en la muestra (ver **Figura 26**).

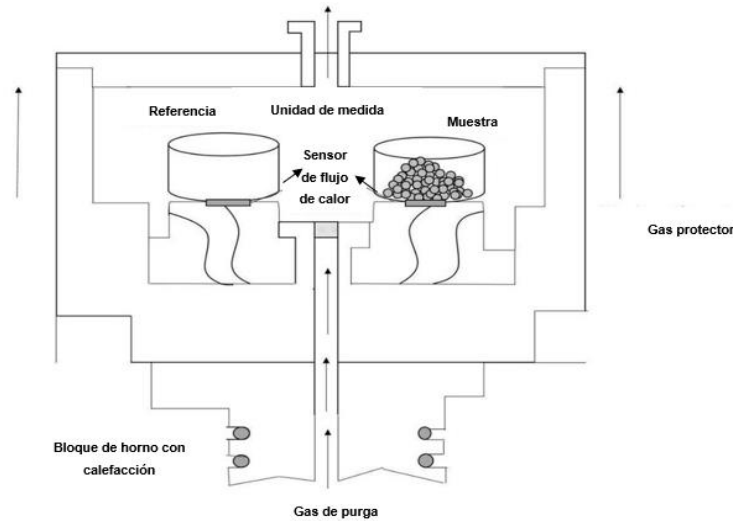


Figura 26 Esquema del equipo de calorimetría diferencial de barrido

Adaptado de (Shivananda, 2017)

Las pruebas DSC1 de Mettler Toledo fueron obtenidas con el equipo de CIQATA con temperaturas de 25 a 200°C en rampas de 10°C. Previo a correr las muestras se calibra con Indio.

A esta técnica se llevan los especímenes obtenidos de filamentos comerciales y los compositos conformados a diferentes concentraciones de nHAp.

2.2.7 Análisis mecánico dinámico (DMA)

Es la técnica que evalúa propiedades mecánicas mediante la aplicación oscilatoria de fuerzas para su posterior análisis permitiendo conocer viscosidad, rigidez, apreciando su capacidad para perder energía mediante liberación de calor y la posterior recuperación (Martínez Aguilar, 2006).

En polímeros DMA proporciona información de las transiciones que sufre el material, influyendo en sus propiedades viscoelásticas. La técnica da a conocer la temperatura de

transición vítrea (T_g), el entrecruzamiento del polímero y su cristalinidad (**Figura 27**). El equipo para DMA empleado se encuentra en el Tecnológico de Celaya.

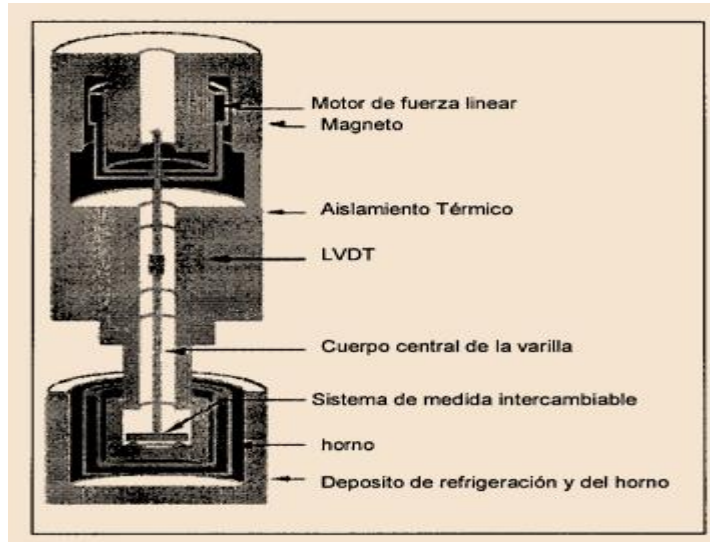


Figura 27 Componentes del equipo para DMA

Recuperado de (Martínez Aguilar, 2006).

Se tienen diferentes modos de análisis, entre ellos; doblando las muestras en tres puntos, tensión, compresión y corte axial aplicando una carga.

Las probetas de DMA fueron examinadas en el equipo del Tecnológico Nacional de México campus Celaya Perkin Elmer Dynamic Mechanical Analyzer DMA 8000, bajo el modo dual Cantilever con temperaturas de 30 a 100°C usando rampas de 10°C (ver **Figura 28**).



Figura 28 Equipo para medición DMA en el Tecnológico de Celaya

2.2.8 Pruebas de Tensión

El ensayo de tensión permite analizar mecánicamente a un material, conocer su esfuerzo máximo antes de la fractura, límite elástico, módulo de Young y comportamiento, características que permitirán considerarlo apto o no para cierto tipo de aplicación.

En este proyecto, se evalúa la viabilidad de concebir andamios que funjan como portadores de material celular y que permitan crecimiento de este material celular. Por ello es de suma importancia comparar los cambios en el comportamiento mecánico del polímero comercial vs. los composites obtenidos en el laboratorio y el entramado propuesto para ellos.

Las pruebas de tensión son llevadas a cabo en colaboración con los laboratorios del Centro de Ingeniería y Desarrollo Industrial (CIDESI) (ver **Figura 29**) donde se realizan los ensayos usando una máquina de ensayos universales de la serie AUTOGRAPH AGX-V de la marca SHIMADZU a una velocidad de 1 mm/min. Consisten en colocar en una máquina universal las probetas de manera vertical, sometidas a esfuerzos de tensión en ambos extremos, hasta que se registre la ruptura de los mismos.



Figura 29 Equipo para pruebas de Tensión en CIDESI

2.2.9 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El estudio mediante microscopía electrónica de barrido “permite el análisis de la superficie presente en el material, proporciona información sobre la topografía y la estructura

crystallográfica de todo tipo de materiales estructurales” (Ipohorski, 2012) como: partículas nanoestructuradas, nanotubos, catalizadores, piezas arqueológicas, pinturas, etc. Para fines prácticos se usa en la determinación de la distribución y localización de osteoblastos en las superficies de los andamios, previamente implantados (Figura 30).



Figura 30 Microscopio electrónico de barrido (SEM)

Recuperado de (Renau Piqueras & Faura, 2012)

Las micrografías SEM se obtuvieron del equipo HITACHI TM-1000 Tabletop Microscope Compact ubicado en el Departamento de geociencias de la UNAM Unidad Juriquilla (ver Figura 31). Se revisaron las muestras de zona de fractura de las probetas destinadas a tensión. Debe considerarse que las muestras pertenecen al grupo orgánico, por lo cual deben ser recubiertas con oro a fin de volverlas conductoras y que puedan visualizarse por esta técnica.



Figura 31 Equipo de para microscopía SEM

2.2.10 Ensayo de viabilidad celular, MTT

El ensayo MTT corresponde a un indicador de viabilidad colorimétrico basado en la reducción de enzimas de sal Tetrazolio amarilla (ver **Figura 32**), donde el resultado de la reducción es un cambio de color a morado en la molécula. La absorbancia medida permitirá llevar un control para determinar el porcentaje de células viables, puesto que el ensayo evalúa la actividad metabólica de las células, es decir, se puede conocer la presencia de células vivas e interactuantes hasta antes de la prueba. Este ensayo es muy común en estudios de citotoxicidad dada su precisión, rapidez y relativa sencillez (Escobar M., Rivera, & Aristizábal G., 2010). Para este ensayo deben primero crecerse las células y esterilizar las probetas como se describirá a continuación.

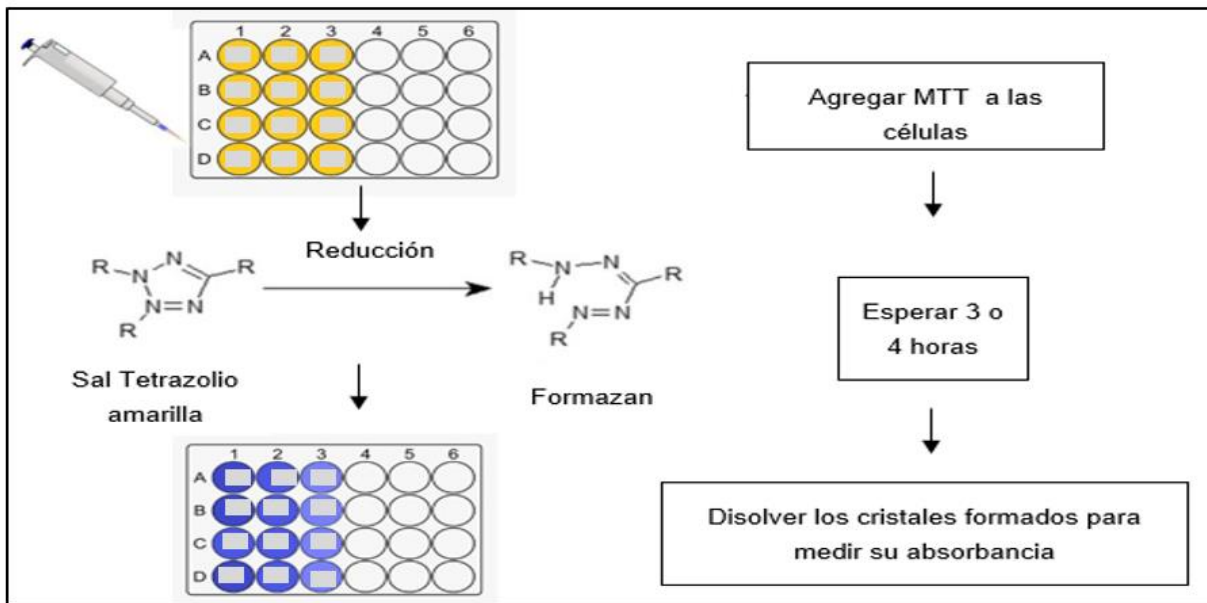


Figura 32 Protocolo para el ensayo MTT

Adaptado de (Altavista, 2022)

Este protocolo de análisis requiere de un cultivo celular previo, para el caso del proyecto, este fue un cultivo celular de fibroblastos de la línea 3T3-L1 correspondientes a tejido conectivo de ratón, del cual se tenían congeladas una serie de líneas congeladas en los laboratorios de CFATA a -73°C (ver **Figura 33**). En lo posterior se extrae uno de estos tubos y es llevado a temperatura ambiente a que se descongele solo con el calor de la mano.



Figura 33 A la izquierda congelador, a la derecha línea celular 3T3-L1 a descongelar

Por otra parte, como se comentó anteriormente, las células requieren de un medio suplementado para proporcionar los nutrientes necesarios para el crecimiento, dicho suero requiere de la siguiente composición porcentual, 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de antibiótico (Penicilina- Estrepmicina 100x) y 89 % medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (ver **Figura 34**). Se conoce que en cada tubo se tienen aproximadamente 1000000 de células, sin embargo estas se estresan por los cambios al congelar y descongelar, por lo que algunas mueren en el proceso, por ello para comenzar el cultivo hay que sembrarlas y monitorearlas en lo posterior hasta conseguir la proliferación de al menos un 80% de la caja Petri de 10 cm de diámetro.

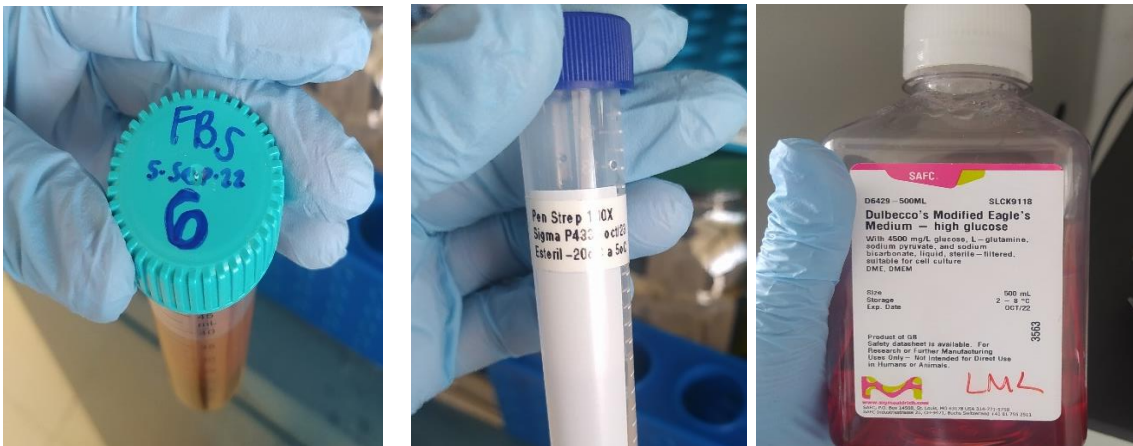


Figura 34 A la izquierda suero fetal bovino, al centro antibiótico y a la derecha DMEM

Para comenzar la siembra se verterán en condiciones de esterilidad 10 ml del medio suplementado (el cuál debe previamente calentarse en un baño a 37°C) en una caja Petri, posteriormente a manera de goteo se agregará y colocará disperso el contenido celular. Conseguido esto se llevara el cultivo a la incubadora a 37°C (ver **Figura 35**) en una atmósfera controlada de 5% de CO₂.



Figura 35 Incubadora y caja con cultivo

Monitorear la proliferación implica revisar microscópicamente la abundancia de las mismas adheridas al fondo de la caja, una vez que se consigue la abundancia de las mismas, se procede a llevar a cabo el despegue de las células con el fin de realizar un conteo (ver **Figura 36**).

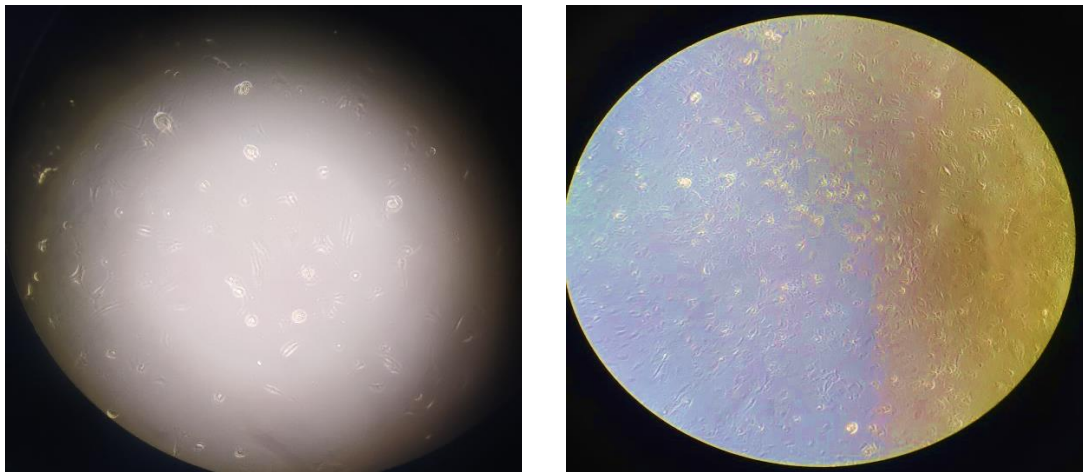


Figura 36 Monitoreo de células al día 1 y 2

Despegar las células implica un procedimiento extra, también en condiciones de esterilidad, que comienza con un lavado de 5 ml de solución salina PBS al 1x, misma que se dejará por 5 min, enseguida se drenara con pipeta Pasteur y se colocaran ahora 3 ml de Tripsina (Enzima TrypLE™ Express 1X), este paso lleva 5 min de monitoreo al microscopio, donde se verificara que las células se han despegado y disgregado (porque generalmente en los primeros minutos van agrupadas), una vez que se han separado, se colocará el doble de la tripsina en un tubo falcón con la finalidad de frenar la acción del paso anterior, es decir 6 ml y se llevará el contenido celular también al tubo (ver **Figura 37**).

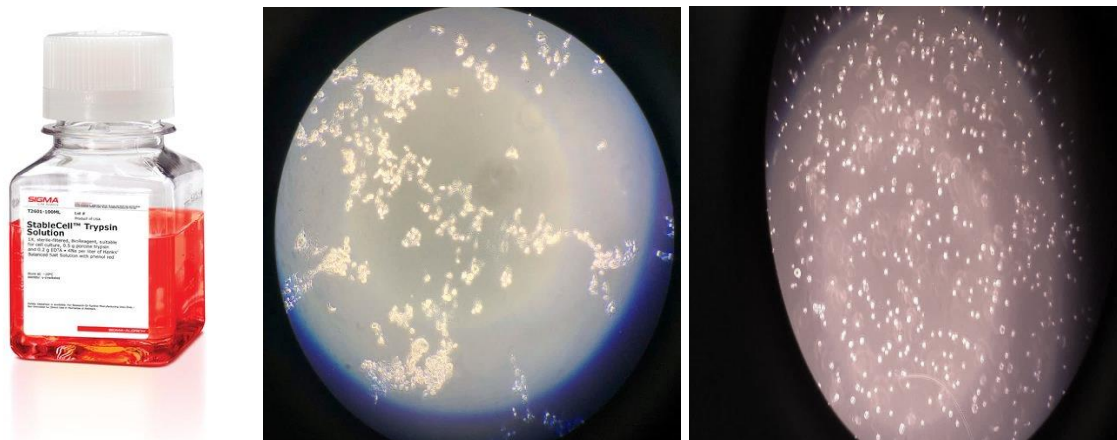


Figura 37 A la izquierda el Tríplex, al centro las células en cúmulos despegándose, a la derecha las células por individual

El tubo falcón será llevado a la centrifuga por 6 min bajo 4500 rpm, esto sedimentará el pellet de células, de manera que podrá decantarse el medio y la tripsina, posterior se suspenderá el material celular en 4 ml para proceder al conteo (ver **Figura 38**).



Figura 38 Centrifuga y pellet obtenido a los 6 minutos

La técnica de conteo se realiza con la cámara de Neubauer, que es un conteo manual, consiste en un portaobjetos con hendiduras y divisiones de cuadrículas y cuadrantes, apoyado de un contador. Se realiza el duplicado del conteo a fin de minimizar el error y promediar los resultados, en cada cuadrícula se colocan 10 μ l, se lleva a cabo el conteo de los 4 cuadrantes exteriores, se promedian y multiplican por 10,000 para conocer el contenido celular en 1 ml, enseguida se multiplican por 4 para conocer la cantidad de células en los 4 ml anteriormente dispersados (ver **Figura 39**).

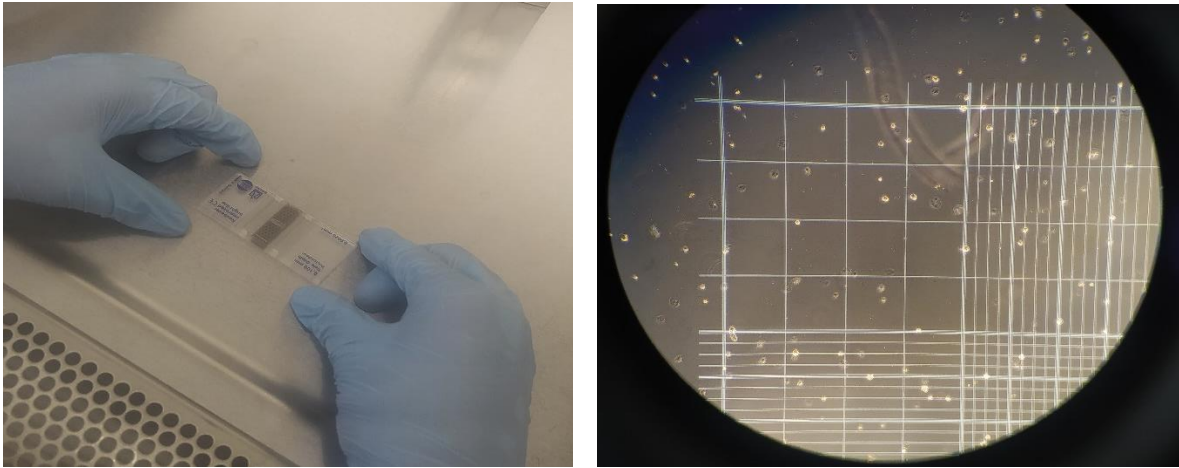


Figura 39 Cámara de Neubauer y vista al microscopio del primer cuadrante para conteo celular

Conocida la cantidad total de células puede calcularse la dilución a emplear a fin de colocar ahora en placas de cultivo de 24 pocillos la cantidad de células requerida para completar 1 ml en cada uno, aforado con medio suplementado y/o en algunos casos con las probetas a emplear dentro y esta a su vez ser controlada en lapsos de tiempo predeterminados (ver **Figura 40**).



Figura 40 Colocación de número de células deseadas en 3 cajas para experimento de seguimiento a 3 días

Para hacer uso de los andamios o probetas de biocompatibilidad, estas deben sumergirse previamente en una solución de 75% etanol y 25% agua destilada con el fin de esterilizarse y secarse por radiación UV (longitud de onda corta) (ver **Figura 41**). NOTA: Colocarse en pocillos con medio para que adquieran nutrientes desde media hora antes de colocar las células.



Figura 41 Proceso de inmersión en etanol para esterilización y lámpara de luz ultravioleta

Tenidas las placas de 24 pozos, con diferentes tiempos y cantidades de células se lleva a cabo entonces el procedimiento MTT una vez completada la espera para cada placa.

El crecimiento celular y los ensayos de viabilidad celular se llevaran a cabo en el Centro de física Aplicada y Tecnología Avanzada CFATA de la UNAM.

Se debe preparar una solución de 5 mg de MTT en cada ml de PBS. Posteriormente se ha de esterilizar con ayuda de un filtro y jeringa, para finalmente emplear estas alícuotas en una nueva solución que llevara 10% de la dilución en PBS y el resto se afora con DMEM, la cantidad a preparar dependerá de los pocillos a requerir reaccionar, trabajando con probetas se sugiere colocar 1 ml para que estas se cubran, una vez completado el tiempo de espera de reacción se formarán cristales que se disolverán con Dimetil Sulfoxido (DMSO), Etanol o Metanol para pasar a la lectura de densidad óptica. El lector de microplatos solo admite placas de 96 pozos, en las cuales solo pueden colocarse 200 μ l de solución, en caso de que la pigmentación sea demasiado intensa (ver **Figura 42**), no podrá ser leída, debido a que las lecturas solo oscilan cercano a 4 en absorbancia media del equipo, en estos casos puede optarse por hacer una dilución de la misma en el mismo solvente usado en el paso anterior con el fin de degradar el tono y poder obtener datos leíbles.



Figura 42 A la izquierda células petrificadas con formación de cristales, al centro la dilución de los cristales y a la derecha pase de caja de 24 pozos a 96 pocillos

A continuación se lleva a lectura, donde se configura el protocolo de acuerdo a la nomenclatura deseada, además de indicar parámetros de lectura a 550 nm, con un mezclado de 5 s (ver **Figura 43**). El equipo generará el reporte que será la base para el análisis de proliferación y viabilidad celular.

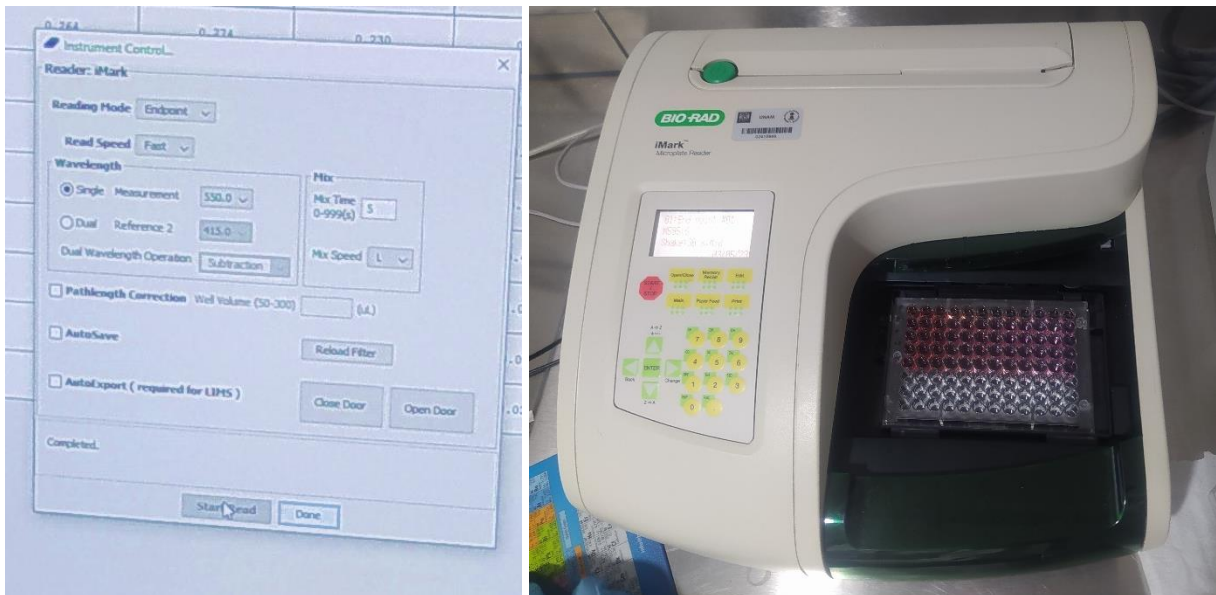


Figura 43 Configuración del software del equipo lector de densidad óptica en microplatos

2.2.11 Microscopía confocal

Esta técnica tiene como objetivo la observación de células que previamente se implantaron y fijaron en la superficie del andamio, requiere de la colocación de muestras en una caja de fluorodish limpia, para ser llevada a observación. Con este estudio se aprecia la estructura y distribución celular, ya que se tiñen las células fluorescentes (López Macay, Fernández Torres, & Zepeda, 2016).

El microscopio posee buena resolución e incluso se pueden seccionar las células, evidenciando su forma y tamaño (**Figura 44**). Cabe señalar que la técnica confocal hace cortes de la muestra en diferentes planos, por lo que se requiere de un software adicional para realizar la visualización e interpretación de las imágenes. Será observada la fluorescencia de las zonas que presentan anclaje y crecimiento celular.

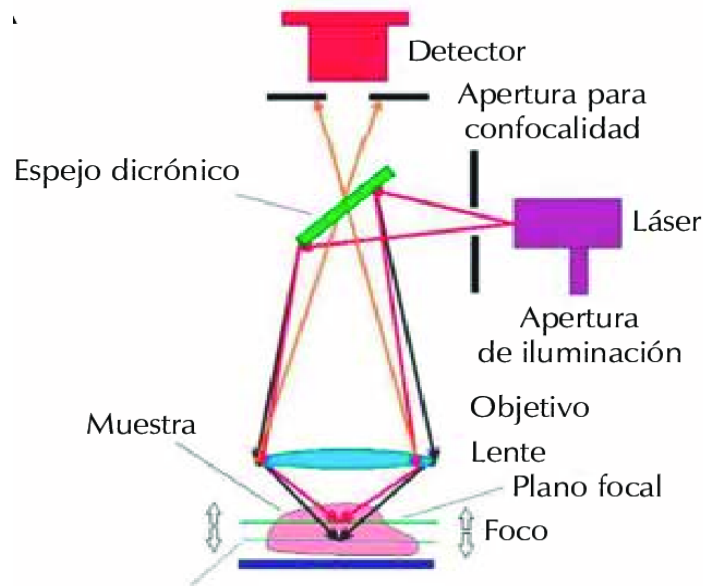


Figura 44 Estructura del Microscopio confocal

Recuperado de (López Macay, Fernández Torres , & Zepeda , 2016).

Debe considerarse un espécimen que contenga las células que se desean observar y al día del cierre del crecimiento se llevará a cabo un proceso de fijado o petrificado de las células y en lo posterior de la tinción de las mismas para que puedan observarse.

En un ambiente estéril se recuperan las probetas a tubos falcon de 15 ml para asegurar que en todo momento sea manejable y puedan cubrirse los andamios. Estas muestras se lavaran en dos ocasiones con una solución salina de PBS al 1X, drenando el sobrante entre cada paso. Para fijar las células se diluye 1 a 1 Paraformaldehído (PFA) con PBS y se agrega esta solución a la probeta, misma debe permanecer ahí por 20 minutos, al drenarse estarán fijadas las células.

Enseguida el proceso de tinción se llevará a cabo con TRITC 50X y DAPI al mismo tiempo, llevando a 1 la concentración de ambos colorantes en PBS, tenida la solución se agrega al tubo falcón con la muestra y se toman 30 minutos a temperatura ambiente y con la menor

cantidad de luz a partir de este paso con la finalidad de no degradar el colorante aplicado, finalizado el tiempo, se harán dos lavados con PBS y por último se colocan las muestras en fluorodish con PBS y se llevan a refrigerar a 4°C , puede envolverse para evitar el contacto directo con la luz hasta la observación en el microscopio (ver **Figura 45**).

Es importante mencionar que el TRITC tiñe mediante la Faloidina y Rodamina mostrando el esqueleto o microtúbulos de las células de color rojo, mientras que el DAPI teñirá de azul los núcleos celulares haciendo evidente la presencia de material celular en complemento de ambos.

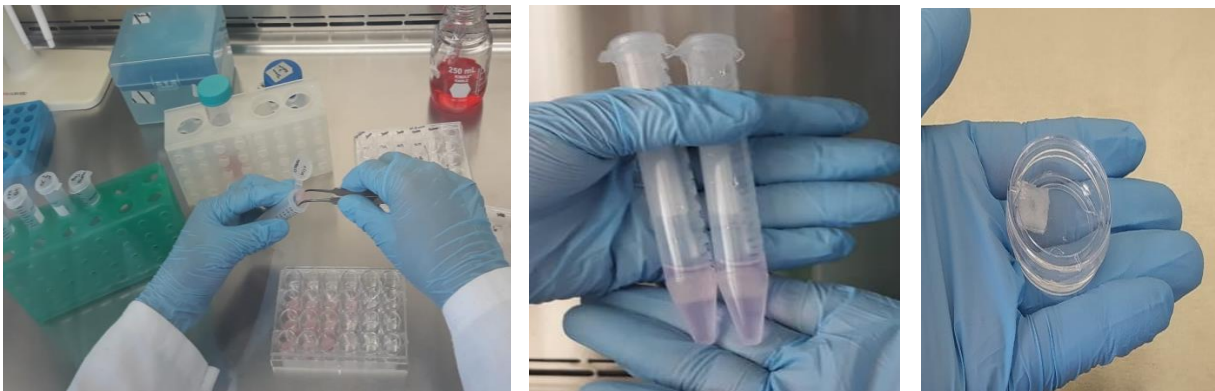


Figura 45 A la izquierda proceso de tinción con TRITC y DAPI, al centro lavados y a la derecha colocación en fluorodish

Las pruebas se llevan a cabo con el equipo de microscopía de CFATA en la Unidad Juriquilla y el equipo Marca Zeiss LSM 880 con temperatura ambiente controlada a 20°C (ver **Figura 46**).



Figura 46 Equipo de Microscopía Confocal CFATA

2.3 Caracterización de nHAp

Se realiza montaje de una muestra para TEM de las nHAp con la finalidad de comprobar la morfología indicada en el artículo del método de elaboración de las mismas. Este procedimiento involucra realizar una disolución de las nanopartículas en acetona, mismas que se depositan en la rejilla para poder ser visualizadas.

Las nHAp también se caracterizan por espectroscopía infrarroja, cuyo proceso implica seccionar el filamento en trozos pequeños para poder ingresarlos al equipo y obtener una lectura. Es importante limpiar entre cada muestra, además de que para polvos debe generarse una pastilla que cubra el objetivo de mira.

2.4 Desarrollo de materiales compuestos

La obtención del composito se lleva a cabo mediante la molienda de reducción del filamento comercial de PLA. Se corta el rollo de filamento comercial en segmentos de aproximadamente 15 cm de longitud (**Figura 47**), esto con la finalidad de facilitar el proceso de molienda llevado a cabo en CIDETEQ usando un molino (**Figura 48**) que es alimentado por el acceso superior o tolva en porciones controladas, de modo que las cuchillas interactúan con el total de este y al tritúralo lo envían al cajón de descarga, este paso permite reducir el tamaño del filamento, dejándolo ahora en una presentación de pellets de 0.5 cm de longitud.

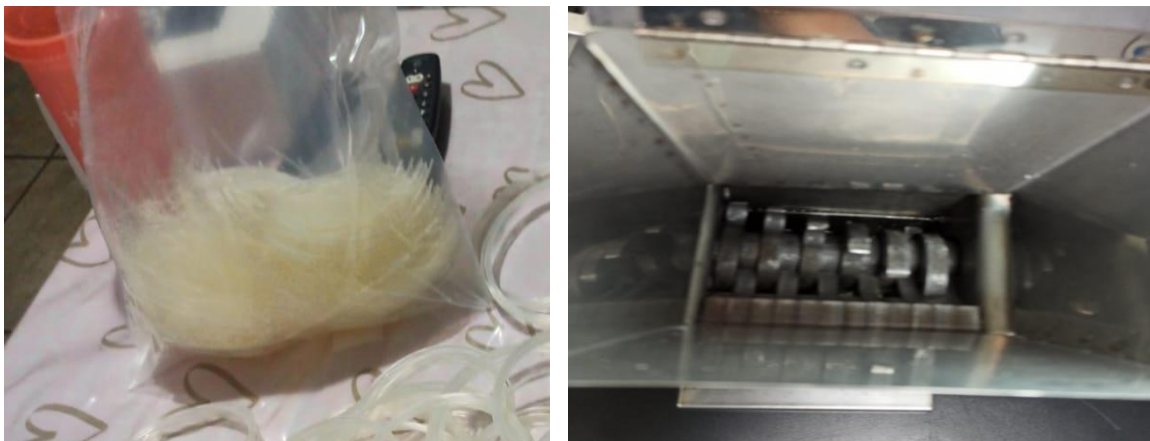


Figura 47 A la izquierda los cortes en segmentos de filamento comercial para posterior ser llevados al molino de la figura de la derecha.

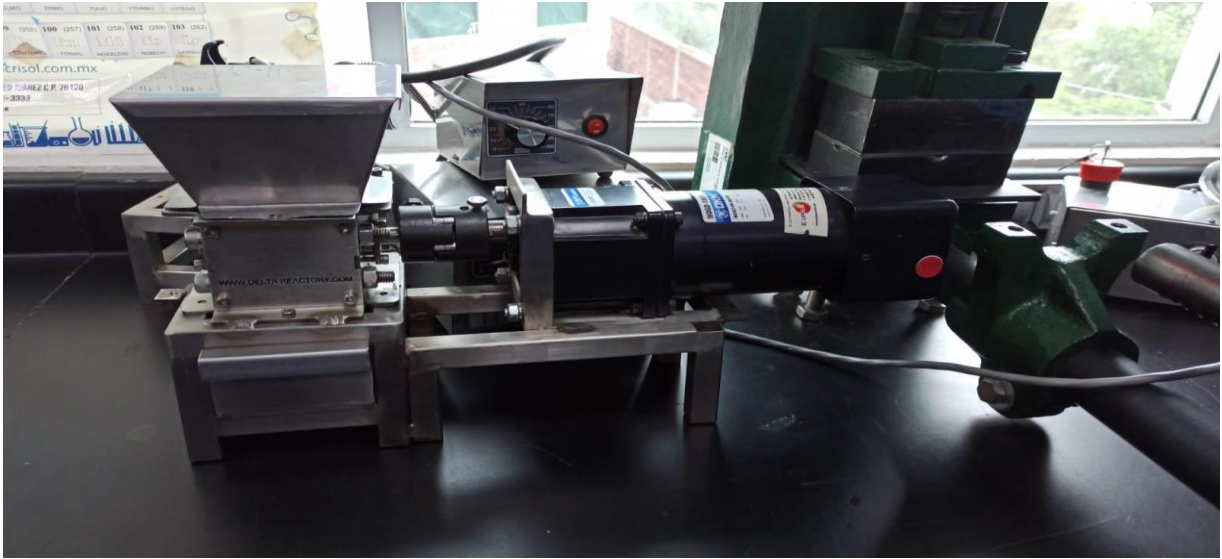


Figura 48 Molino pelletizador de polímero en CIDETEQ

Los pellets son ahora introducidos a un nuevo molino (**Figura 49**) con la finalidad de reducir aún más el tamaño de partícula para emparejarlo lo mayor posible al tamaño de las nHAp, de dónde se obtienen gránulos de 2mm en su mayor tamaño, dado que se obtienen polvos menores también.



Figura 49 Molino pulverizador de polímero del Tecnológico campus Querétaro

2.4.1 Diseño

El diseño de las probetas requeridas para ensayos de tensión bajo la norma ASTM D-638, DMA ASTM D-4065 y biocompatibilidad, se lleva a cabo usando la versión 2021 de SolidWorks, las cuales serán generadas en formatos .STL para su posterior edición y segmentación en el software de impresión Creality Slicer.

2.4.2 Preparación de filamentos

El filamento compuesto se crea partiendo del comercial y la adición de nHAp a diferentes concentraciones, manejando una baja concentración con 0.005% en peso de nHAp y una alta con 0.05% en peso de nHAp, posteriormente se lleva a cabo un nuevo maquinado, mediante el uso de un extrusor Filabot. Estos filamentos se usan para obtener lecturas de FTIR y DSC.

La adición de las nHAp a los gránulos de filamento previamente obtenidos se consigue por un mezclado mecánico llevado a cabo en el siguiente equipo Filabot ver **Figura 50**.

Partiendo de la generación de un filamento BLANCO, teniendo como temperatura de extrusión 180°C y un aireado para su enfriamiento de 49% de velocidad, lo que permite un enrollado de calidad (**Figura 51**).



Figura 50 Equipo Filabot, extrusor y aireador de filamento polimérico para biomateriales empleado en el Tecnológico



Figura 51 Embobinador, complemento final a Filabot del tecnológico

Una vez obtenido el filamento debe rectificarse que el diámetro a lo largo de este sea de $1.75 \text{ mm} \pm 0.1$ asegurando así la aceptación del nuevo filamento a la impresora. El filamento que deba rectificarse se trata mediante un ajuste con pinzas cortadores de cable como las de la **Figura 52**.



Figura 52 Pinza pela cable de STEREN

2.4.3 Impresión de probetas con compositos

Las probetas se imprimen cargando el filamento obtenido, ajustando temperatura ideal en cama y boquilla, considerando cambio en las mismas al adicionar las nHAp.

Se empleo la impresora Creality 6 (CR-10S Pro V2) del laboratorio de materiales compuestos del Tecnológico (Ver **Figura 53**). Para PLA se emplean 220°C en boquilla y 70°C en cama de impresión.

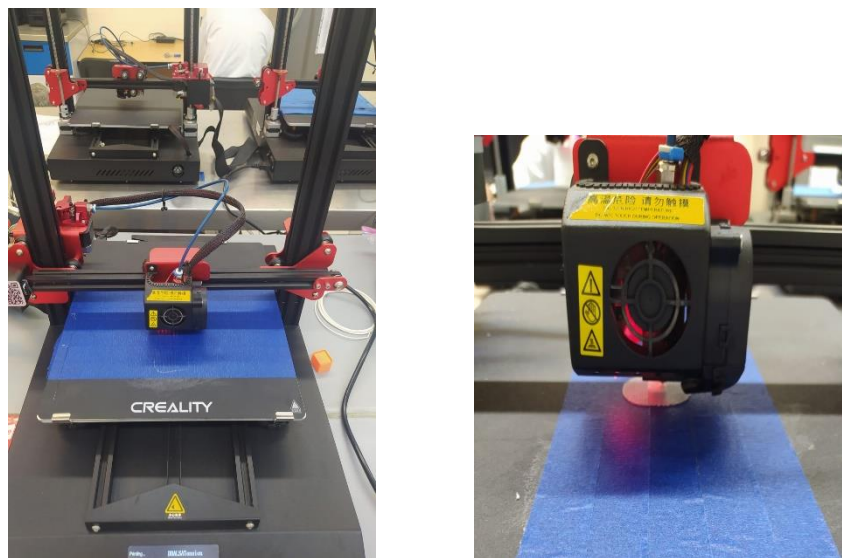


Figura 53 Equipo empleado para impresión 3D de probetas

2.5 Caracterización de los andamios

Las probetas generadas son llevadas a análisis dinámico mecánico, ensayo de tensión y pruebas de biocompatibilidad con la finalidad de documentar el comportamiento de las diferentes concentraciones y generar una comparativa en el desempeño, rendimiento y viabilidad.

CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización de nHAp

Se obtienen micrografías TEM de la nHAp, evidenciando la presencia de varillas que de acuerdo a (Rodríguez Lugo , y otros, 2018) poseen una longitud de 28 a 38 nm y un diámetro de 17 a 21 nm (ver **Figura 54**). Corroborando así la morfología del material nanométrico que se recibió.

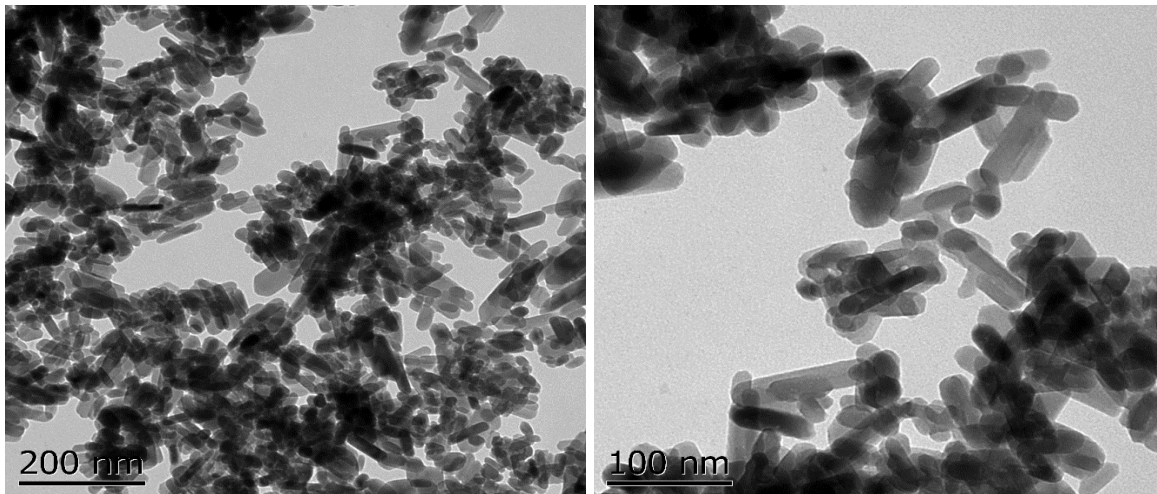


Figura 54 Micrografías TEM de las nHAp que corroboran la presencia de varillas como las que se reportan por la UAEH de cristales con fase monoclinica y hexagonal

Fuente de referencia comparativa: (Rodríguez Lugo , y otros, 2018)

3.2 Desarrollo de materiales compuestos

La incorporación de las nHAp a los filamentos, se consigue con un método físico, un mezclado de los pellets previamente obtenidos de PLA y las nHAp, que rotan en conjunto por 30 min a fin de conseguir homogeneidad (ver **Figura 55**).

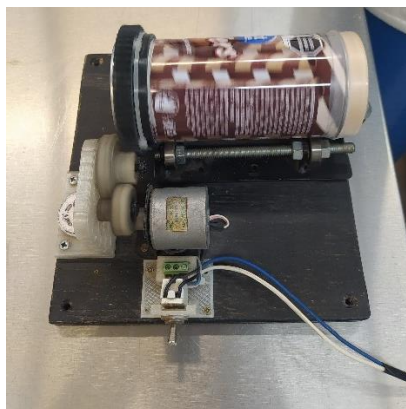


Figura 55 Mecanismo para mezcla integración de componentes del nuevo filamento

3.2.1 Diseño

Se realizó la instalación del programa Solidworks, así como un avance en la formulación de las probetas a diseñar en el bajo las normas adecuadas.

En el caso de la biocompatibilidad se realizarán pruebas bajo las medidas de probetas que reporta la M.I Laura Rojas en su trabajo de tesis (Rojas Martínez, y otros, 2020), donde se considera un andamio de base cuadrada de 10*10 mm y ancho de 5 mm (apta para introducirse a la caja de 24 pocillos para prueba de biocompatibilidad) de la cual se imprimirán 150 probetas (50 de cada variante). La **Figura 56** muestra su geometría.

Se trabajaron diferentes propuestas de porosidad, donde se ha propuesto un primer caso, una cantidad exuberante de poros que quizá la impresora no logró reproducir y posteriormente un número más certero que lleva a los poros de 50.7 a 321 micrómetros, considerando una boquilla de impresora de 400 micrómetros (**Figura 57**).

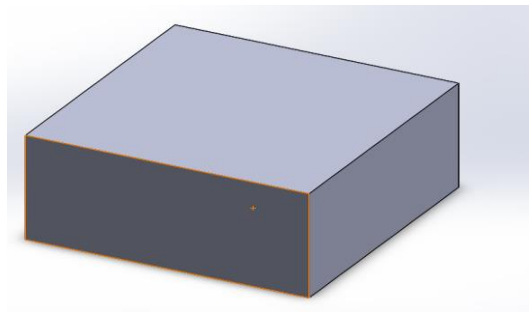


Figura 56 Probeta para prueba de biocompatibilidad de 10mmx10mmx5mm

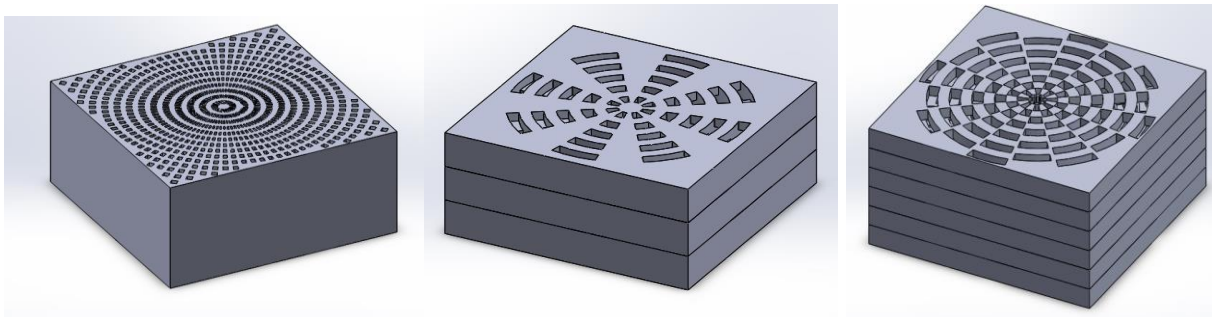


Figura 57 Propuestas una con gran cantidad de poros y la otra adaptada a capacidad de boquilla de impresión considerando el gradiente de porosidad e interconectividad

Para la prueba DMA se hace uso de la norma ASTM D-4065, misma que posee la morfología de la **Figura 58**, de la cual se estarán imprimiendo 15 especímenes, 5 de cada concentración.

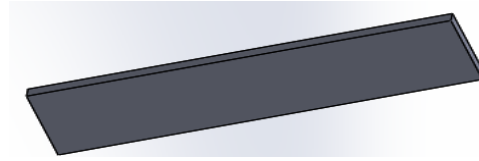


Figura 58 Probeta para DMA de 35mmx10mmx3.2mm

Para prueba de tensión se requiere probeta tipo 4 según la norma de tensión ASTM D-638, como se muestra en la **Figura 59**, el prototipo al que posteriormente se agrega el gradiente de porosidad para monitorear cambios de resistencia a tensión teniendo al entramado. Se realizaron 30 impresiones de las diferentes concentraciones.

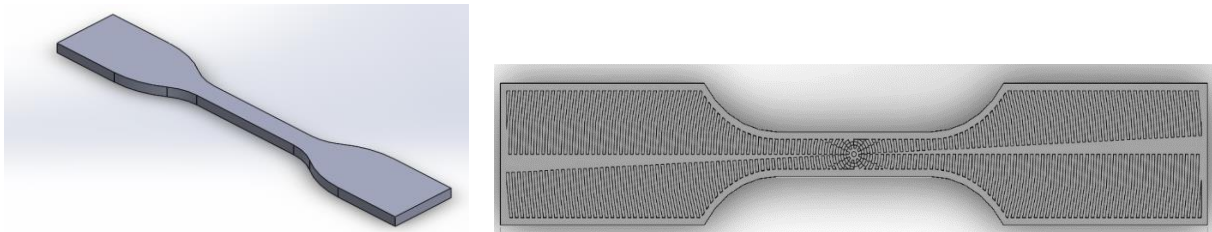


Figura 59 Probeta a emplear para ensayo de tensión

3.2.2 Preparación de filamentos

Los filamentos obtenidos de la extrusión del PLA, presentan ciertas características visibles, el de solo PLA es transparente, conservando la apariencia del PLA comercial, pero a su vez presenta mayor grado de rigidez y dificultad para ser manipulado, mientras que el de baja concentración de nHAp se nota punteado con gránulos blanquizcos distribuidos homogéneamente y presenta una mejora en la maleabilidad del mismo y por su parte el de alta concentración de nHAp presenta una tonalidad blanca y homogénea que a su vez repercute en una mejora en la flexibilidad del filamento, lo que facilito su manejo (ver **Figura 60**).



Figura 60 A la izquierda filamento blando PLA, al centro BAJnHAp y a la derecha ALTnHAp

3.2.3 Impresión de probetas con composites

Se emplea la impresora 3D Creality 6 del laboratorio de Posgrado del Tecnológico Nacional de México Campus Querétaro, aplicando temperatura de inyección de 210°C y temperatura en plancha de depósito de 70°C con una velocidad de 85 mm/s y una primera capa de 2mm, además de adicionar balsa con una velocidad de 60 mm/s (ver **Figura 61**).

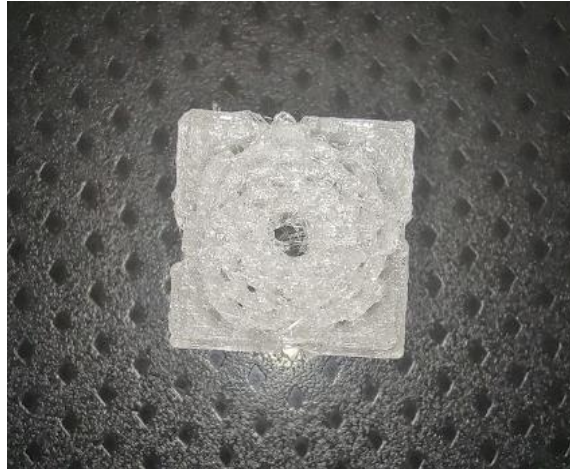


Figura 61 Probeta de biocompatibilidad con entramado de concentración 0% nHAp

La pieza para DMA se genera bajo las mismas condiciones de temperatura y adicionando balsa, estableciendo una velocidad de impresión de 85mm/s (ver **Figura 62**).

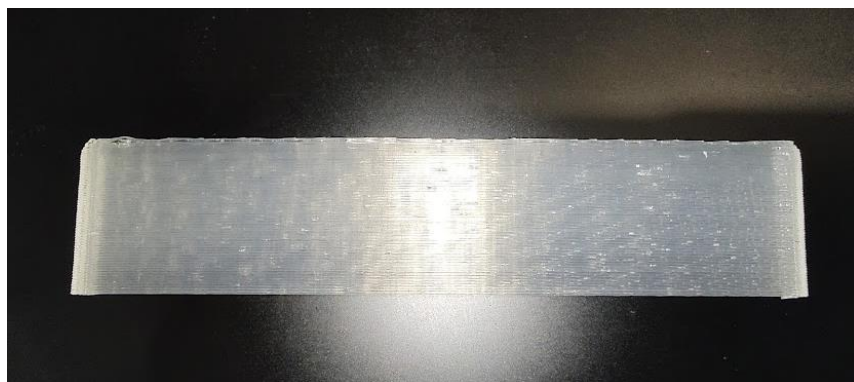


Figura 62 Probeta para pruebas DMA de concentración 0% nHAp

La probeta de tensión se obtiene generando balsa y bajo 220°C en boquilla y 70°C en cama de impresión con una velocidad de 100 mm/s (ver **Figura 63**).



Figura 63 Probeta para prueba de tensión de concentración 0% nHAp

3.2.4 Caracterización de filamentos por FTIR

Las muestras presentan picos que aparecen en el 633 debidos la banda de estiramiento del grupo OH, alrededor de 3500 una ligera protuberancia que indica el agua libre enlazada, estiramientos simétricos y asimétricos de los grupos PO_4 en 1033, 963 y 565 cm^{-1} .

Por su parte el PLA tanto comercial como extruido muestra en 3506 el grupo OH, CH_3 en 2999, CH_2 en 2929, C=O 1759, deformación en CH_3 1458, CH_3-CH en 1386 y 1363, C-O-C en 1186 y C-O en 1089 cm^{-1} , como puede observarse en la **Figura 64**.

Conjugándose así las bandas de fosfatos de la nHAp a las cadenas primarias del PLA y predominando la apariencia de la fase continua del compuesto, que es el polímero y evidenciando la obtención de un compuesto viable, dado que no se exhiben formación de nuevas bandas que impliquen la generación de un nuevo enlace.

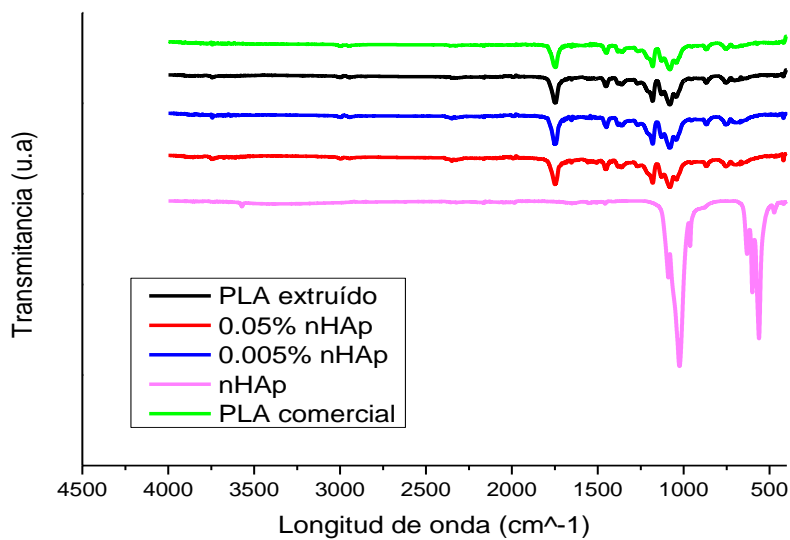


Figura 64 FTIR de las diferentes muestras obtenidas

3.2.5 Caracterización de filamentos por DSC

El espectro obtenido por DSC de 30°C a 210 °C permite conocer la estabilidad del composito en sus diferentes porcentajes de refuerzo, así como su comparativa contra el filamento comercial de PLA (ver **Figura 65**). Tanto el filamento comercial como el blanco y las dos concentraciones extruidas presentan un pico exotérmico en su temperatura de cristalización, mientras poseen uno endotérmico en su temperatura de fusión, evidenciando que se requiere absorber una mayor cantidad de calor para fundir, es decir llegar a la temperatura de fusión, indicando una fase endotérmica. Y por su parte alcanzar la temperatura de cristalización requiere menos calor para ser alcanzada.

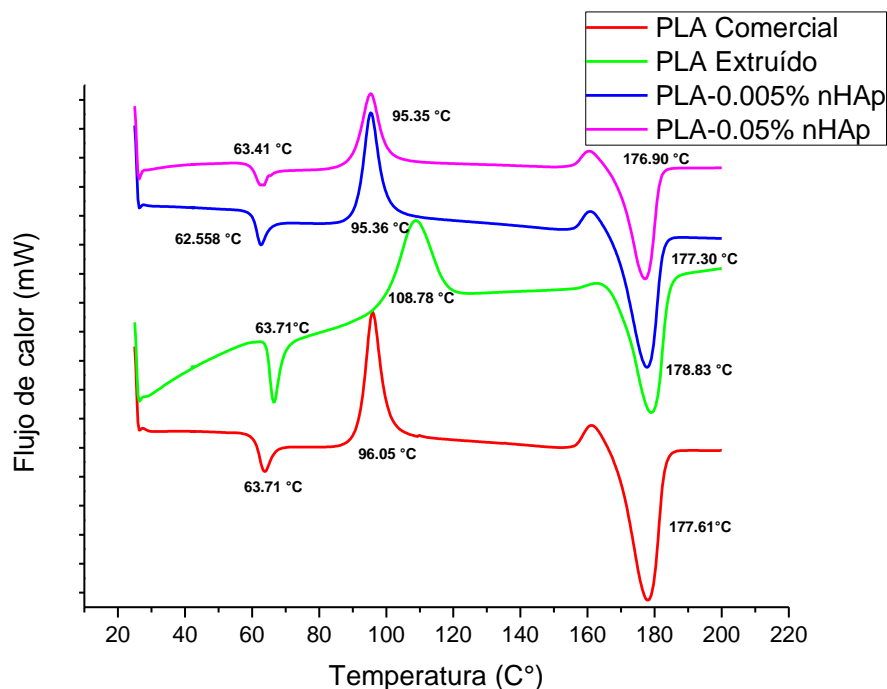


Figura 65 Resultados de DSC diferentes muestras

Donde el PLA comercial reblandece a 63°C, cristaliza a 96°C y funde a 117°C, mientras que el PLA que hemos extruido nuevamente (que puede considerarse a este paso extra como un tratamiento térmico adicional) reblandece cerca de los 66°C, cristaliza a los 108°C y funde a los 178°C. Valor que en efecto, corrobora la necesidad de aumentar la temperatura en la impresora cuando se trabaja este filamento a fin de modelar con FDM. Por su parte la baja concentración de nHAp, reblandece a 92°C, cristaliza a 65°C y funde a 177°C. Que sigue se asemeja más al comercial. Por último el filamento con alta concentración de nHAp, reblandece a 63°C, cristaliza a 95°C y funde a 176°C (ver **Tabla 6**).

Tabla 6 Resultados de lecturas de picos en curvas DSC

	PLA Comercial	PLA extruido	PLA BAJA (0.005%NHAp)	PLA ALTA (0.05%NHAp)
Tg (C°)	63.71	66.4	62.55	63.41
Tc (C°)	96.05	108.78	95.36	95.35
Tm (C°)	177.61	178.83	177.30	176.90

De manera general 200° C estuvo bien para casi todos los filamentos en FDM, a excepción del filamento blanco de PLA solo y extruido dónde se debió aumentar la temperatura entre 215° y hasta 220° C.

En cuanto las integrales de cada sección en Tg, Tc y Tm se muestra el mismo escalafón en la distribución de la mayor área, siendo la que tiene el blanco de PLA solo y extruido, posterior el PLA comercial, luego la baja concentración de nHAp y por último la alta (ver **Figura 66**).

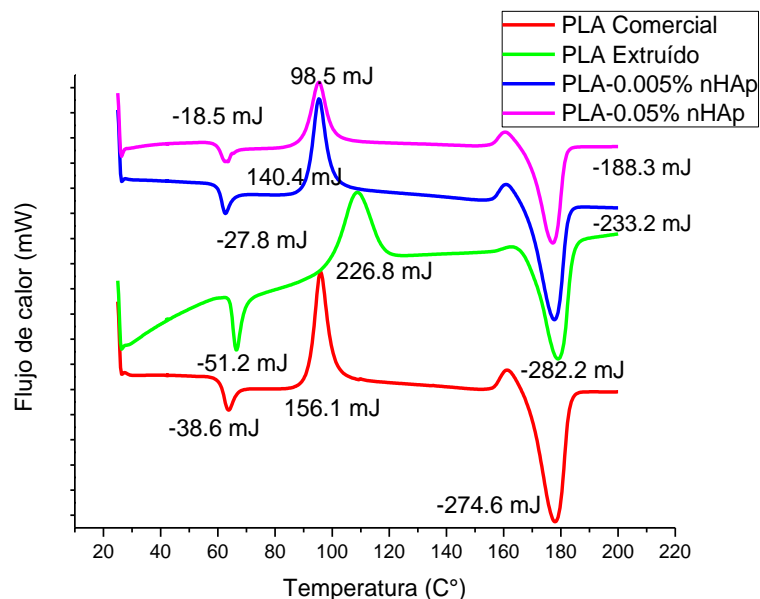


Figura 66 Curvas DSC con valor de integrales de cada pico

3.3 Caracterización de los andamios

Para concluir el desempeño del compuesto para el uso tentativo de los objetivos del proyecto como potencial sustituto óseo es necesario evaluarlo bajo ciertas condiciones por diferentes técnicas, como lo son ensayos de tensión, análisis mecánico dinámico y ensayo MTT para así asegurar la correcta funcionalidad.

3.3.1 Análisis mecánico dinámico

Las pruebas termomecánicas se llevan a cabo mediante DMA Perkin Elmer 8000 con muestras de dimensiones de 56x12x2 mm bajo el modo de tensión, Se corrieron a temperatura ambiente de 30°C a 100°C con rampa de 10°C por minuto a 5 Hz de frecuencia. Obteniendo los siguientes termogramas.

El módulo de almacenamiento está altamente relacionado con la cantidad de energía que se requiere aplicar a un material para conseguir deformarlo, en el siguiente termograma se enlistan los resultados del PLA (blanco extruido) que cerca de los 70° C oscila en los 20000 MPa, mientras que la baja concentración de PLA-nHAp se mantiene cercana a los 10000 MPa, por su parte la alta concentración de PLA-nHAp alcanza casi los 15000 MPa, evidenciando que el composito presenta una disminución en cuanto a propiedades mecánicas comparado con el PLA por sí solo, sin embargo, existen mejores lecturas para la alta concentración de nHAp (ver **Figura 67**).

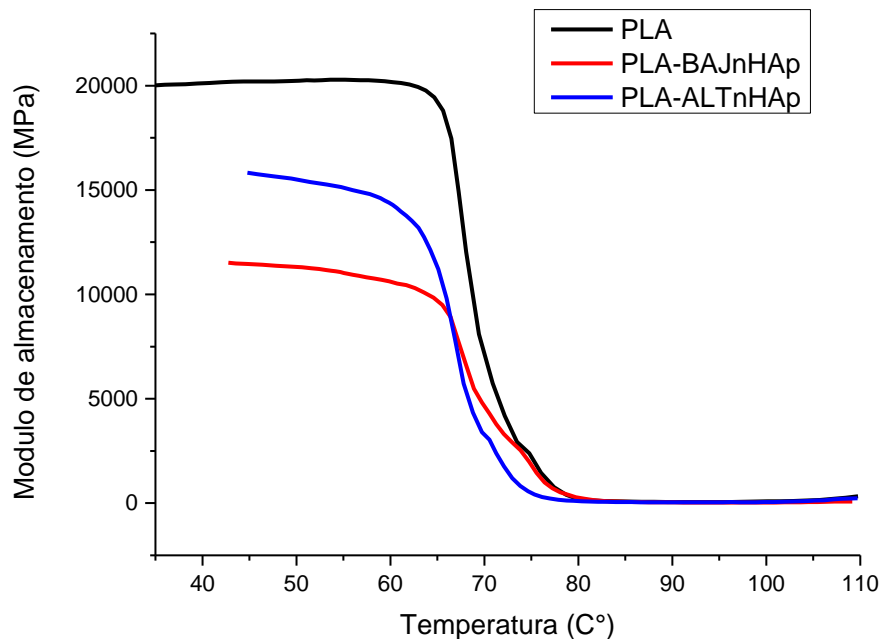


Figura 67 Resultados de Modulo de almacenamiento de los diferentes compositos

Además, en complemento a DSC el análisis DMA ofrece el estudio del cambio de Tg mediante la evaluación del Tangente Delta, mostrando una temperatura de transición vítrea para el PLA en 80°C, la baja concentración de nHAp en 85° C y la de alta concentración de nHAp por debajo de 75° C.

Lo que reitera la temperatura necesaria para reblandecer al material y lograr conformarlo, que fue más fácil maquilar en el caso de PLA-ALTnHAp (ver **Figura 68**).

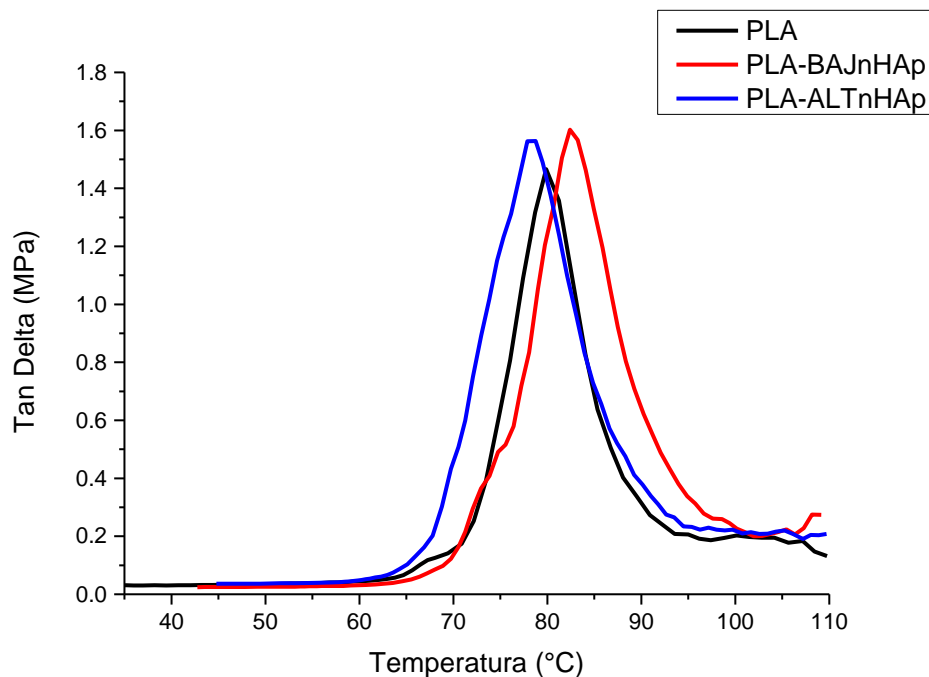


Figura 68 Termograma con resultados del Tan Delta de los diferentes lotes

3.3.2 Pruebas de tensión

Se preparan 3 lotes de 5 muestras para ensayo de tensión totalmente sólidas, un blanco, una con baja concentración de nHAp y uno con alta concentración de nHAp, así como 3 lotes de probetas con las concentraciones antes descritas, pero con el entramado propuesto a fin de evaluar las mejoras mecánicas.

El lote de probetas PLA blanco que se pueden observar en la **Figura 69** después del ensayo de tensión, muestra los resultados de esfuerzo-deformación en la **Figura 70**, con un comportamiento frágil, cuyo promedio es 28.158 MPa y puede apreciarse a detalle en la **Tabla 7** (se descartó una muestra, debido a fallas en la montura y la lectura fuera de rango).



Figura 69 Lote Tensión PLA Blanco sólido

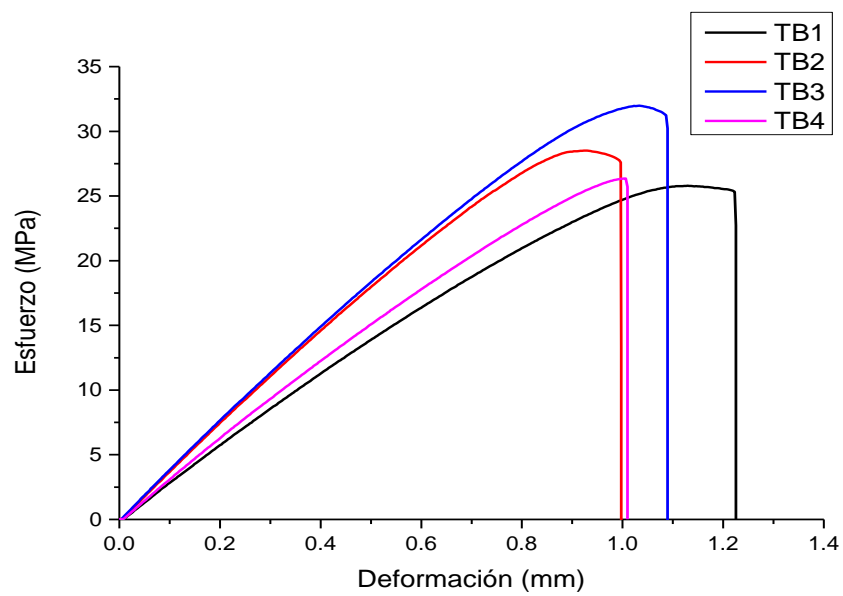


Figura 70 Gráfica esfuerzo deformación de PLA Blanco sólido

Tabla 7 Resultados y promedio de esfuerzo máximo en PLA Blanco sólido en MPa

Muestra	Esfuerzo Máximo (MPa)
TB1	25.786
TB2	28.508
TB3	31.980
TB4	26.356
Promedio	28.158

Las probetas PLA blanco con entramado también fueron sometidas a tensión como se aprecia en la **Figura 71** y se obtuvo el promedio de 22.655 MPa en la gráfica de esfuerzo-deformación como puede notarse en la **Figura 72** además de encontrar los resultados de cada corrida en la **Tabla 8**.



Figura 71 Lote de tensión PLA BLANCO con entramado

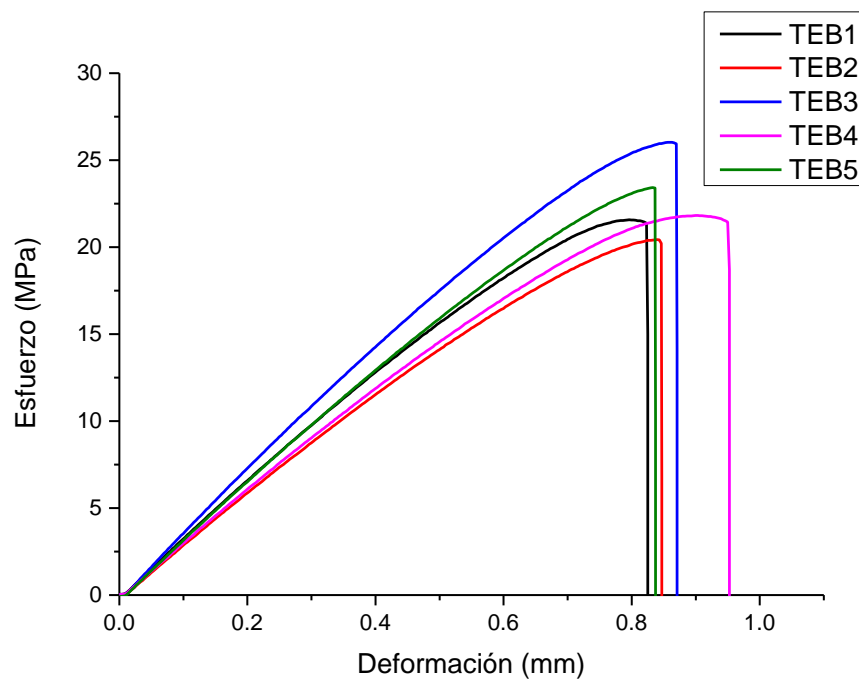


Figura 72 Gráfica esfuerzo deformación de PLA Blanco entramado

Tabla 8 Resultados y promedio de esfuerzo máximo en Blanco entramado en MPa

Muestra	Esfuerzo Máximo (MPa)
TEB1	21.573
TEB2	20.428
TEB3	26.026
TEB4	21.826
TEB5	23.424
Promedio	22.655

De las probetas de PLA con 0.005% de nHAp sólidas después del ensayo de tensión se anexa la **Figura 73** con un promedio de 25.452 MPa en esfuerzo-deformación, además se incluye la **Figura 74** y la **Tabla 9** con los resultados del resto de los especímenes, (se descartó una muestra, debido a fallas en la montura y la lectura fuera de rango).



Figura 73 Lote tensión PLA-BAJnHap sólida

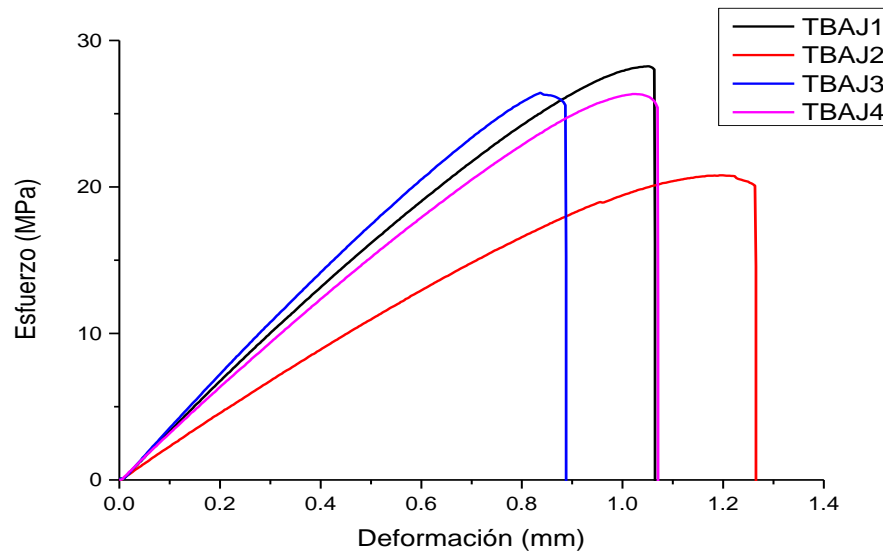


Figura 74 Gráfica esfuerzo deformación de PLA-0.005% nHap sólida

Tabla 9 Resultados y promedio de esfuerzo máximo en PLA-0.005% nHAp sólidas en MPa

Muestra	Esfuerzo Máximo (MPa)
TBAJ1	28.236
TBAJ2	20.792
TBAJ3	26.432
TBAJ4	26.348
PROMEDIO	25.452

Para las probetas de PLA con 0.005% de nHAp con entramado se anexa la **Figura 75**, con la evidencia posterior al ensayo, donde puede apreciarse la zona de ruptura, obteniendo una ruptura frágil como se nota en la (**Figura 76**), el promedio de los ensayos fue de 4.772MPa como se ve en la **Tabla 10** anexando también al resto de corridas, (se descartó una muestra, debido a fallas en la montura y la lectura fuera de rango).



Figura 75 Lote tensión PLA-ALTnHAp con entramado

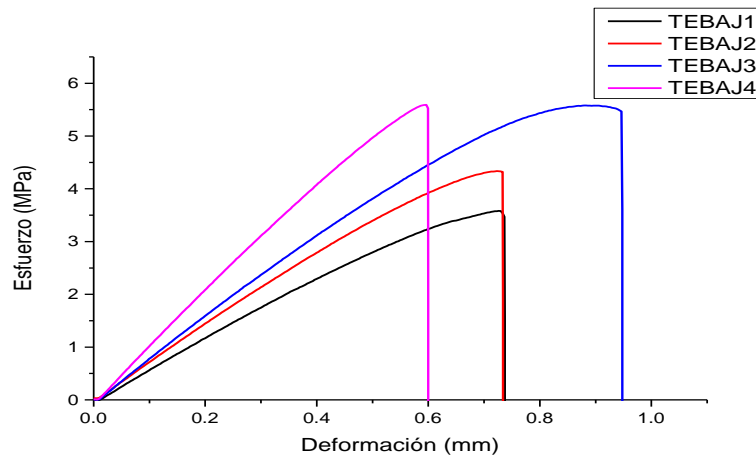


Figura 76 Gráfica esfuerzo deformación de PLA-0.005% nHAp entramado

Tabla 10 Resultados y promedio de esfuerzo máximo en PLA-0.005% nHAp entramado

Muestra	Esfuerzo Máximo (MPa)
TEBAJ1	3.581
TEBAJ2	4.336
TEBAJ3	5.580
TEBAJ4	5.590
PROMEDIO	4.772

Para las probetas de PLA con 0.05% de nHAp sólidas se agrega su evidencia posterior a ensayo de tensión en la **Figura 77**, se obtuvieron rupturas frágiles en esfuerzo-deformación como se nota en la **Figura 78**, cuyo promedio puede apreciarse en la **Tabla 11**, dando 36.278MPa, (se descartó una muestra, debido a fallas en la montura y la lectura fuera de rango).



Figura 77 Lote tensión PLA-ALTnHAp sólida

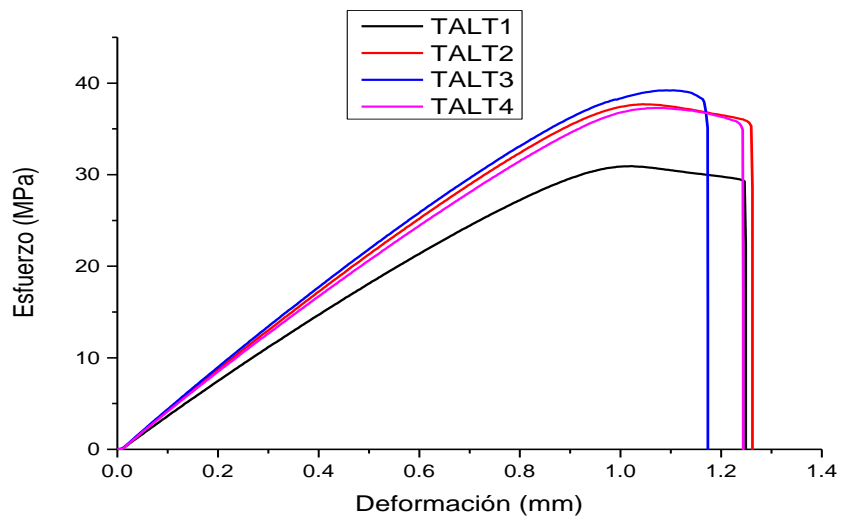


Figura 78 Gráfica esfuerzo deformación de PLA-0.05% nHAp sólida

Tabla 11 Resultados y promedio de esfuerzo máximo en PLA-0.05% nHAp sólido en MPa

Muestra	Esfuerzo Máximo (MPa)
TALT1	30.928
TALT2	37.688
TALT3	39.204
TALT4	37.292
PROMEDIO	36.278

Del último lote de PLA con 0.05% de nHAp con entramado se muestra la **Figura 79**, con el resultado del ensayo de tensión, que muestra rupturas frágiles de esfuerzo-deformación en la **Figura 80**, y un promedio de 23.207MPa que puede apreciarse en la **Tabla 12**(se descartaron dos muestras, debido a fallas en la montura y la lectura fuera de rango).



Figura 79 Lote tensión PLA-ALT nHAp con entramado

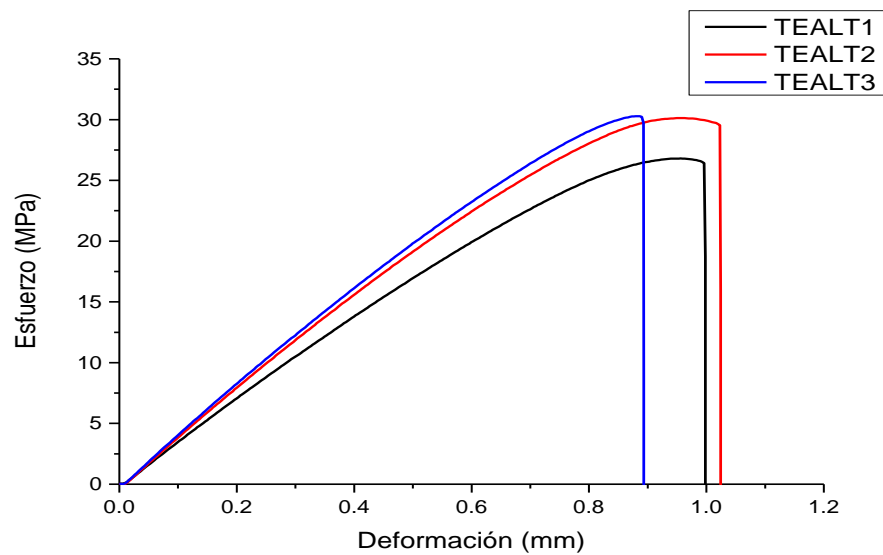


Figura 80 Gráfica esfuerzo deformación de PLA-0.05% nHAp entramado

Tabla 12 Resultados y promedio de esfuerzo máximo en PLA-0.05% nHAp entramado en MPa

Muestra	Esfuerzo Máximo (MPa)
TEALT1	26.802
TEALT2	30.128
TEALT3	30.279
PROMEDIO	23.207

A continuación se enlistan los promedios de cada uno de los lotes evaluados en la **Tabla 13** donde se aprecia que, la mayor presencia de nanopartículas es favorable para la respuesta mecánica, sin embargo al colocar el entramado, esta disminuye considerablemente, conservando aun mejoras a mayor cantidad de nHAp. Por lo que se considera conveniente el incremento de refuerzo en el composito.

Cabe señal que las probetas se fracturan en zonas diferentes debido al entramado que algunos lotes poseen que origina la fractura, adicional a ello tratándose de compositos, la interfase de las partículas también genera una zona de interfase que podría propiciar las fracturas, como pudo notar en los ensayos y como ya se describió, el filamento con baja concentración de nHAp quedó únicamente punteado en distribución del refuerzo y hay una menor resistencia, sin embargo el filamento con alta concentración de nHAp presento un color más homogéneo y hubo mejor respuesta mecánica.

Tabla 13 Comparativa de promedios de tensión

TB	TBAJ	TALT
28.158 MPa	25.452 MPa	36.278 MPa
TEB	TEBAJ	TEALT
22.655 MPa	4.772 MPa	23.207 MPa

3.3.3 Análisis de la zona de fractura por SEM

De acuerdo con los gráficos de esfuerzo-deformación obtenidos, se ha tenido una ruptura del tipo frágil y el análisis de microscopia, aunado a las piezas fracturadas que muestran la zona de fractura en la zona media, estas permitirán observar las características de la superficie y la distribución del composito en esa zona. Anexo el seguimiento con aumentos a 40x,100x, 200x y 500x de los lotes sólidos (ver **Figura 81**), dónde podrán observarse menos espacios vacíos en los sólidos, así como en los lotes blanco de PLA la ausencia de partículas como refuerzo y circuladas en rojo las zonas con las mismas.

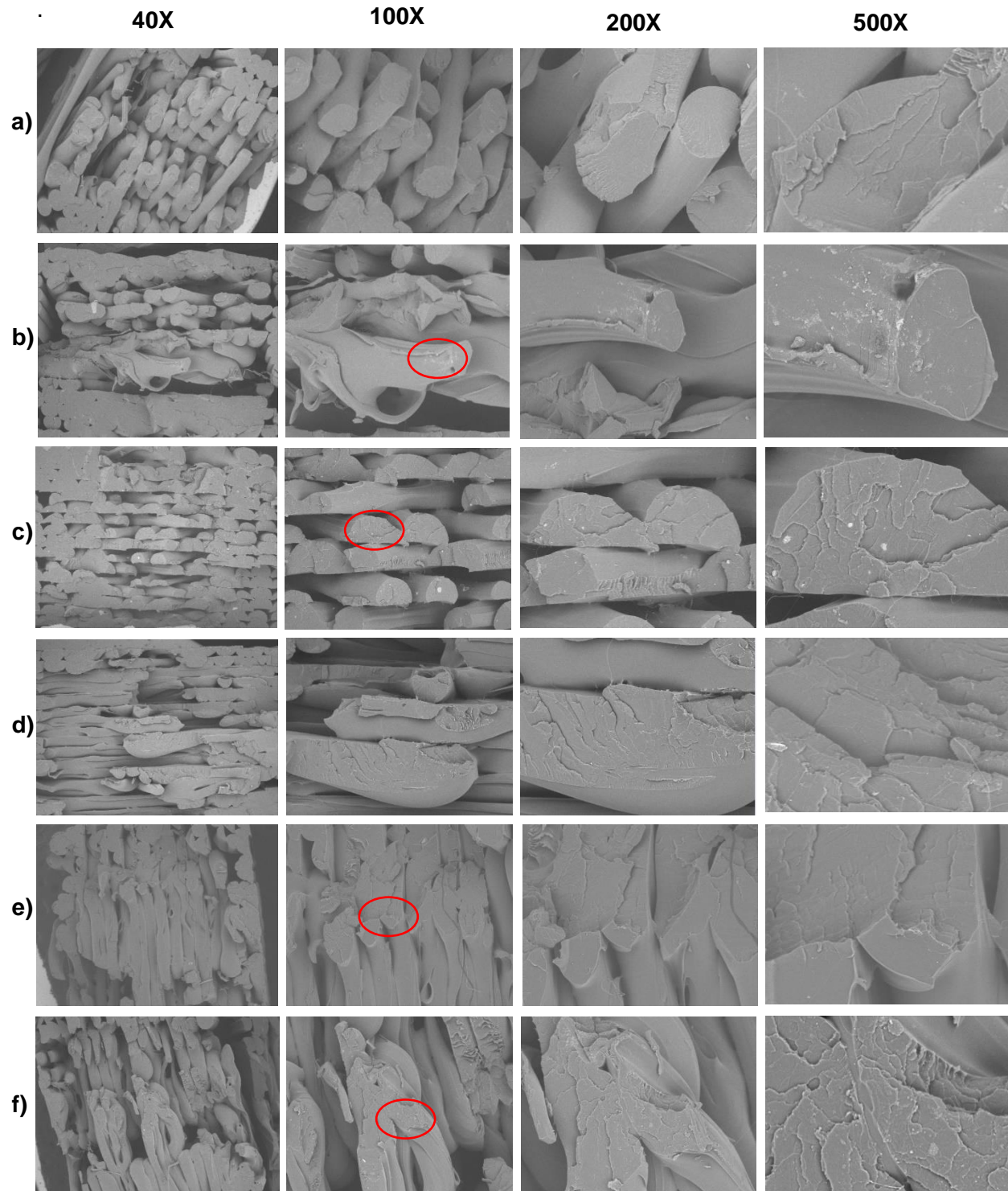


Figura 81 Resultados de SEM a) probeta PLA BLANCO sólido, b) probeta PLA-BAJnHAp sólido, c) probeta PLA-ALTnHAp sólido, d) probeta PLA BLANCO con entramado, e) probeta PLA-BAJnHAp con entramado, f) probeta PLA-ALTnHAp con entramado (todas a 40X, 100X, 200X y 500X en ampliaciones de la misma zona)

En efecto los lotes con nHAp muestran pequeñas incrustaciones que poseen otro tono que el de los filamentos que se notan con claridad, tanto como su orientación y los sesgos del corte. A su vez es importante señalar que los filamentos con alta concentración de nHAp muestran una mayor cantidad de estas incrustaciones en la superficie de las muestras

3.3.4 Pruebas de biocompatibilidad por ensayo MTT

Se llevan a cabo las pruebas de crecimiento celular haciendo uso de la línea 3T3-L1 perteneciente a células fibroblastos consideradas células inmortales (es decir, que no frenan su crecimiento) y dendríticas con comportamientos afines (ver

Figura 82).

Como método de partida del experimento se debía dominar la técnica de siembra y cultivo celular, aprender a realizar lavados y conteos de las células primeramente en cajas Petri. Así como manipular y esterilizar el material indicado para el proceso ver

Figura 82.



Figura 82 Línea celular fibroblastos posterior al cultivo, esterilización de material

Una vez conseguida una cantidad considerable de células fue preciso familiarizarse con el ritmo de crecimiento de la línea, para lo que fue crucial diseñar un experimento de monitoreo para probar viabilidad celular, esto empleando 0, 3000, 6000, 12000 y 18000 células por

triplicado y colocando en cajas de 24 pocillos a 3 diferentes tiempos y así evaluar crecimiento, al día 1, 3 y 7 (ver **Figura 83**).



Figura 83 Diseño de experimento para hallar la cantidad de células con mejor crecimiento

De este primer experimento se determinó cuál era la cantidad óptima de células a emplear, debido a la lectura de platillos de 96 micropozos, donde se diluyeron las muestras. De acuerdo con la gráfica puede señalarse a 3000 células como el punto cúspide de crecimiento (ver **Figura 84**), debido a que con mayor cantidad de células no se evidencia un crecimiento que rebase por mucho la lectura obtenida, esto durante los 3 días de monitoreo, lo que da parteaguas a un segundo experimento.

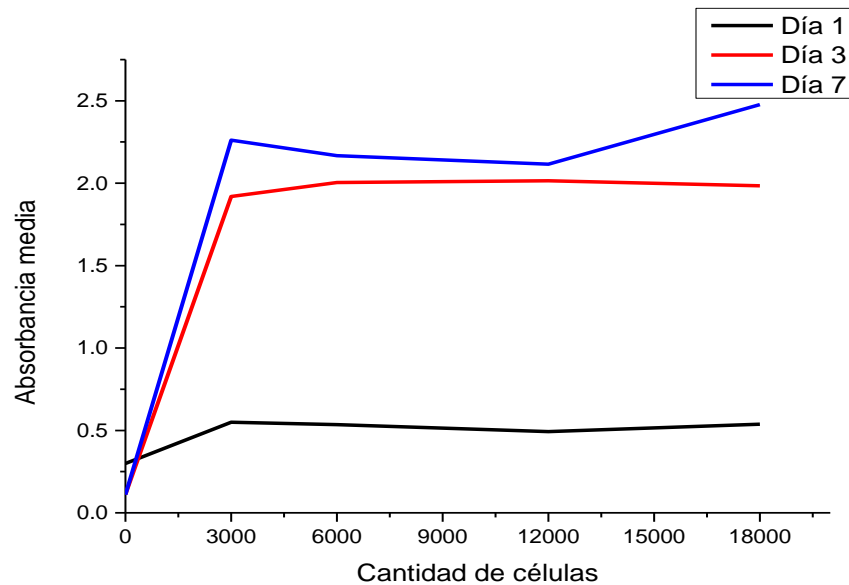


Figura 84 Resultado del primer experimento, determinando usar 3000 células

Conociendo que 3000 es el ideal de células a sembrar se lleva a cabo ahora un experimento con probetas (ver **Figura 85**), estas siendo solo de PLA en su grado comercial, probando con 3000, 6000, 9000 y 12000 células a 3 diferentes tiempos, día 1, 3 y 7.

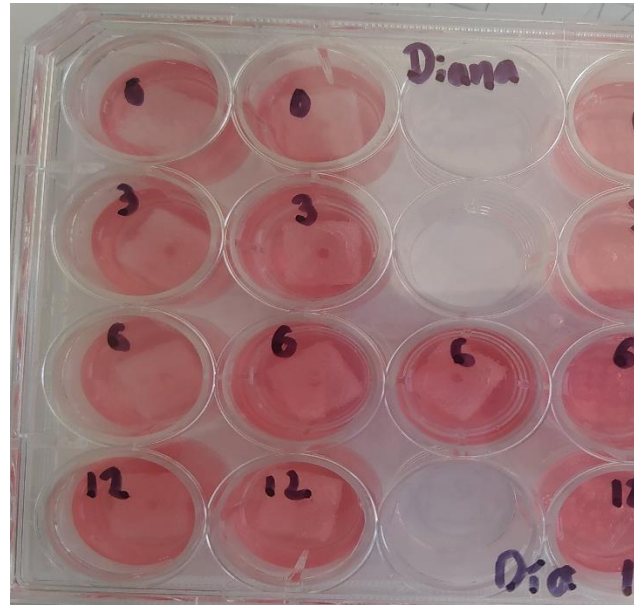


Figura 85 Segundo experimento usando probetas y diferente cantidad de células

Donde ahora puede observarse, que efectivamente 3000, sigue siendo la cantidad de células ideal a sembrar. Aunque debe destacarse que en el día 3 hay un decremento en la cantidad de células viables, lo que se interpreta como un lapso de adaptabilidad de las células al entorno de la probeta, notándose un crecimiento considerable hasta el día 7 (ver **Figura 86**).

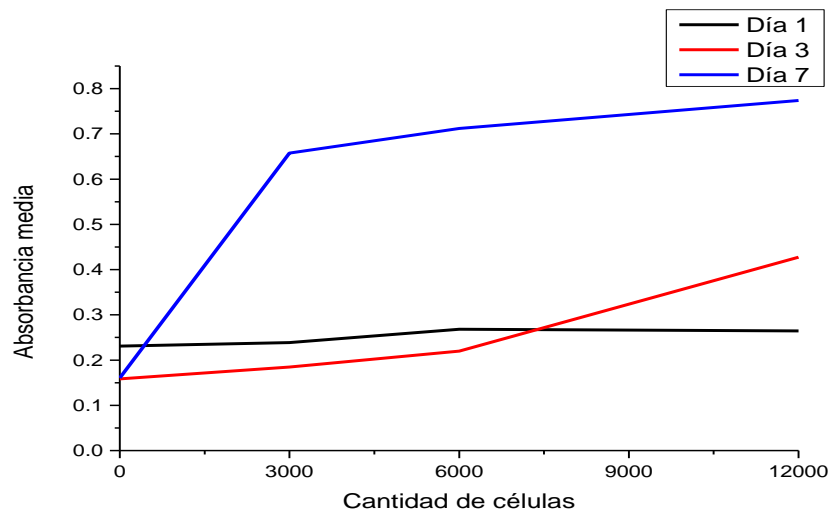


Figura 86 Resultado de segundo experimento, donde destacan 3000 células al día 7

Lo que dio paso a la prueba final, conociendo las condiciones óptimas se probaron probetas del lote blanco, de la baja concentración de nHAp y de la alta concentración para monitorear si el crecimiento celular en estas aumenta, considerando colar en las cajas también por triplicado a células sin probetas y a probetas sin células para corroborar que no hay lectura en ausencia de material biológico.

De dónde se obtiene la siguiente gráfica, en la cuál es evidente la disminución en crecimiento cuando se usa la probeta o andamio, lo que se atribuye nuevamente a la fase adaptativa de las células al material, así como probando una mejoría notable al día 7. También se presenta la lectura mayor de todos los días que involucran probetas, la que se lleva a cabo con el andamio PLA-ALTnHAp, indicando mejoras de biocompatibilidad con el incremento de nHAp (ver **Figura 87**).

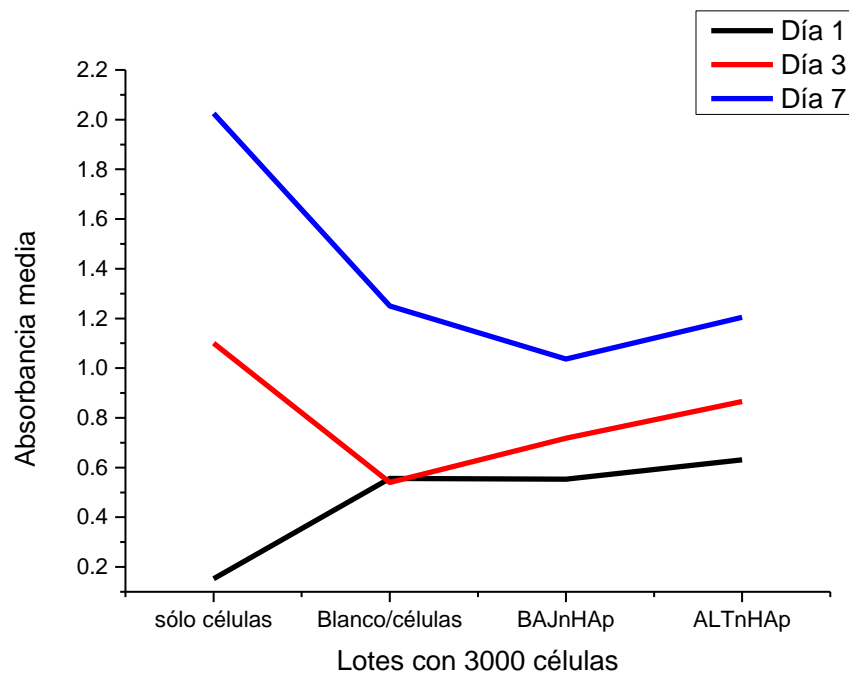


Figura 87 Resultado final, donde PLA-ALTnHAp muestra la mayor proliferación entre los compositos al día 7

Se anexa también el resultado del ensayo MTT con una gráfica de caja y bigote (ver **Figura 88**) donde se agrupan los lotes evaluados con diferente tono para los 3 días, lo que facilita la comparativa y permite notar claramente el incremento en las lecturas del lote PLA-ALTnHAp, mismo que posee la concentración de 0.05% en peso de refuerzo. Además se presenta la tendencia más alta de él espécimen donde solo hay células y que por ende tiene una mayor

lectura, debido a que no hay ningún agente externo (como la probeta) que afecte al crecimiento, también se nota que a pesar de pasar una fase adaptativa al material después retoma un ritmo similar al resto de células, además de evidenciar que la probeta por si sola sin material celular, no registra una lectura como las que si lo poseen.

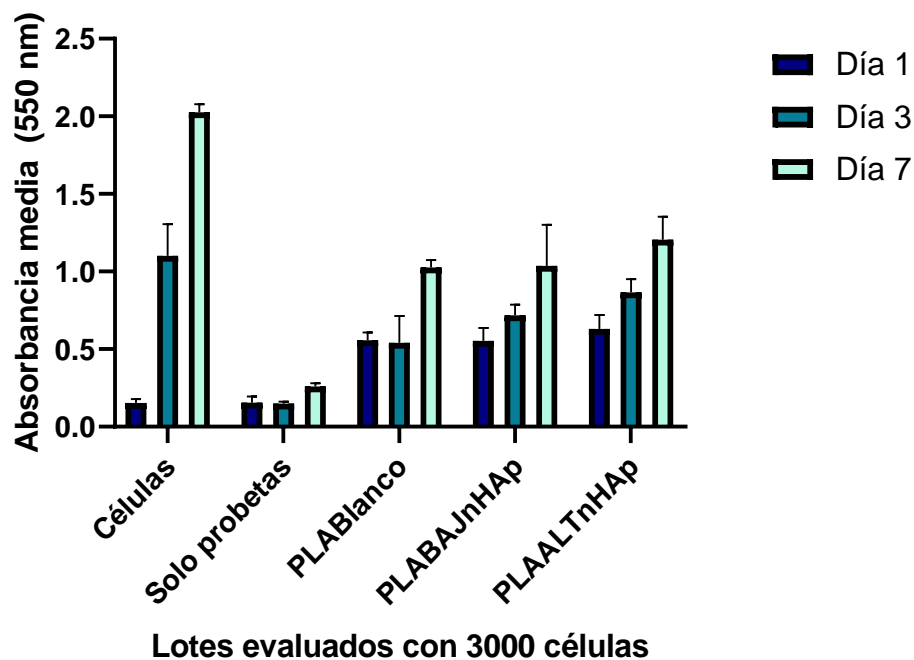


Figura 88 Resultado final en gráfico de caja y bigote, donde PLA-ALnHAp muestra la mayor proliferación entre los compositos al día 7

3.3.5 Microscopia confocal

La técnica de microscopia confocal mediante la tinción de las probetas permite distinguir al material celular que estas portan. Para estudiar las imágenes obtenidas del equipo se trabaja adicional con los softwares de ImageJ y ZEN 3.8 de Zeiss.

Se realizan pruebas preliminares con probeta sin células haciendo uso del agente de tinción PKH26 (marcador de membranas), con el cuál se tiñe la nHAp por lo que se decide discontinuar su uso y se opta por dos que son más ilustrativo.

Para fines prácticos se usaron el DAPI y el TRITC que de acuerdo a trabajos de la línea muestran de manera más precisa la presencia de células, fijando las células a las probetas en el día 7 que muestra una mayor proliferación celular. Para esto el DAPI se mostrará en color

azul y teñirá los núcleos celulares, mientras que el TRITC resaltará los microtúbulos mejor conocidos como esqueletos de las células.

Cabe señalar que las probetas sin nHAp no presentaron coloración (ver **Figura 89**) evidencia del menor crecimiento fue la evaluación crucial fue con PLA-BAJnHAp (ver **Figura 90**) en esta figura el inciso a) muestra un orificio de la probeta, el b) la tinción de los núcleos con DAPI, el c) la tinción de los microtúbulos con TRITC y el d) el match de todos los componentes, sin embargo, bajo ese aumento y en ese corte de z-stack fue difícil enfocar a una célula completa y aunque hay evidencia de células, las hay en menor cantidad y es difícil acceder a ellas. Por su parte el PLA-ALnHAp (ver **Figura 91**), donde puede observarse en a) el filamento de una sección de la probeta, en b) la tinción de los núcleos con DAPI, en c) la tinción de microtúbulos con TRITC y en d) el match de las condiciones anteriores, señalando también que el PLA responde al componente del DAPI presentando algo de fluorescencia.

Es en esta micrografía que puede apreciarse la forma dendrítica de la célula coloreada por cada zona correspondiente, se obtuvo la imagen debido a la mayor presencia de células y fue un tanto más sencillo lograr el enfoque.

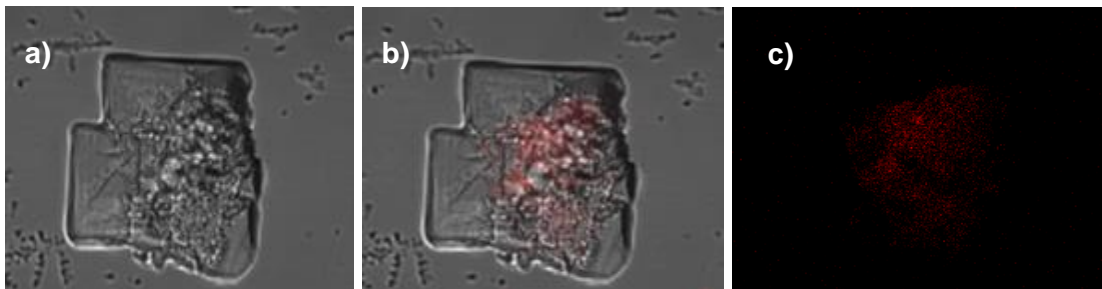


Figura 89 a) Probeta de PLA-nHAp sin células, b) match de probeta con tinción de nHAp con PKH26, c) campo oscuro de la tinción

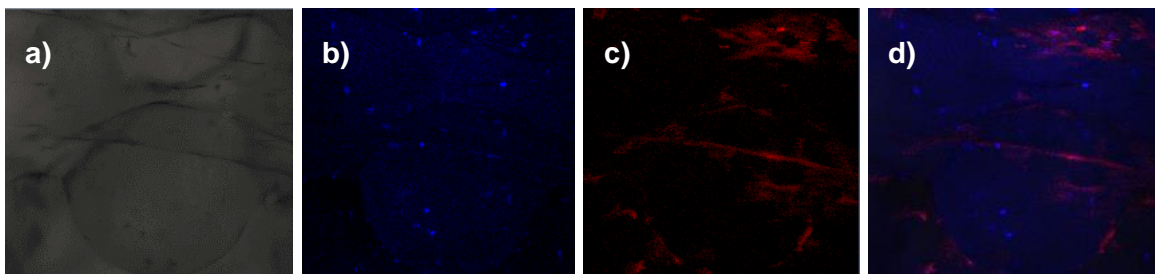


Figura 90 Resultado de tinción de la probeta PLA-BAJnHAp al día 7, a) poro de la probeta, b) tinción con DAPI, c) tinción con TRITC d) por último el match

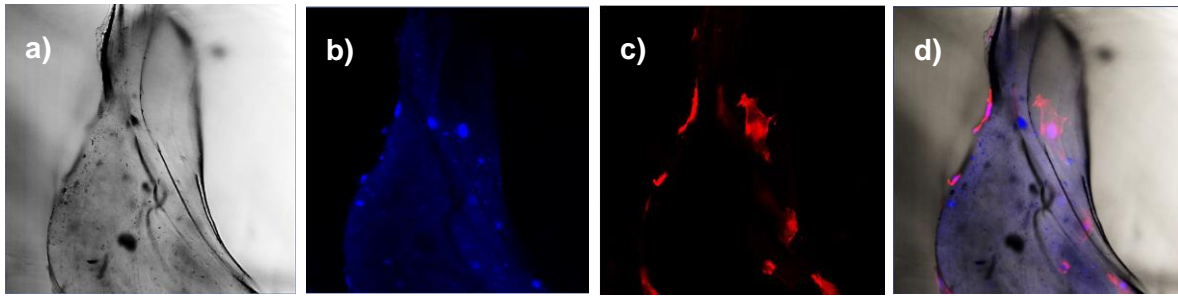


Figura 91 Resultado de tinción de la probeta PLA-ALTnHAp al día 7, a) filamento en probeta, b) tinción con DAPI, c)tinción con TRITC d) por último el match

De los resultados es importante rescatar que evidenciamos la forma de varilla de fase hexagonal predominante de la HA y que adicional se corroboró su tamaño reportado de 28 a 38 nm en longitud y de 17 a 21 nm en diámetro, con lo cual puede ser considerada nHAp.

Esto a su vez permitió una sencilla adición de las nHAp a los compositos por el método físico y la correcta dispersión en la matriz, como se pudo evidenciar por SEM.

El tamaño de los poros en las probetas diseñadas fue el adecuado, debido a la certera propagación de las células en el eje z (resultado del z-stack) de la misma asegurando un flujo de nutrientes gracias a la interconectividad y gradiente de poro que había como entramado.

La preparación de filamentos permitió obtener los insumos adecuados para el logro de la impresión, conocer las temperatura de fusión de la matriz facilito la labor de extrusión. Así como fueron de apoyo los resultados de DSC y DMA para considerarse en la impresión de los diferentes especímenes de probetas y aumentar o disminuir la temperatura de la boquilla de extrusión debido a los cambios en el filamento después del tratamiento extra (adquirido en el paso de la extrusión del composito), requiriendo una menor temperatura a medida que aumentaba la concentración de nHAp y evidenciando una mayor maleabilidad en el filamento conseguido, además de una mayor integración y homogeneidad.

Mediante FTIR se hallan los grupos funcionales tanto del polímero como del refuerzo, pero una vez tenido en composito, se nota la predominancia de la fase continúa y el conjugado a esta línea matriz de los grupos fosfatos del refuerzo, indicando la formación de un híbrido.

En la caracterización de los andamios, DSC y DMA muestran la reducción en la TG del material en función del aumento del refuerzo, lo que de manera real se comprobó con el uso y manejo del mismo en impresión. Así como una mayor resistencia a la deformación cuando se tiene la alta concentración de nHAp.

Del ensayo de tensión se obtienen rupturas frágiles y con menores lecturas en las probetas con entramado, como era de esperarse, debido a las zonas no continuas de impresión. Adicional a ello, el uso de los compositos indica que hay dos fases, en el caso de la alta concentración de nHAp hay una integración más homogénea, lo que también se interpreta de los resultados de tensión cuyas lecturas son las más altas de 36 MPa (sólida) y 23 MPa (con entramado), puesto que la integración del material evita crear puntos que puedan ser propagadores de grietas y de llevar más rápido a la ruptura. Situación que no ocurre con las probetas de baja concentración de nHAp, dado que aun logrando la obtención del composito, este solo quedó punteado por las partículas y estas resistieron menos (solo 4.7 MPa con entramado) debido a que los gránulos crearon una interfase de propagación de fallas mecánicas en la superficie. A continuación se comparan resultados con algunos artículos en los que se basó la investigación (ver **Tabla 14**):

Tabla 14 Comparativa de resultados de tensión con artículos base

<p>En el artículo Synthetic Biodegradable Aliphatic Polyester Nanocomposites Reinforced with Nanohydroxyapatite and/or Graphene Oxide for Bone Tissue Engineering Applications exponen el uso de PLA-NHA-GO con el refuerzo de nHAp al 10%, 20% y 30% en peso, reportando una disminución de esfuerzo a medida que se aumenta el refuerzo obteniendo 45 MPa (10%), 40MPa (20%) y 30MPa (30%). (Li, Liao, & Tjong, 2019)</p>	<p>En este proyecto se alcanzan 36 y 23 MPa con solo el uso de 0.05% de nHAp, corroborando que la cantidad de HA no debe aumentarse en demasía, como se preveía debido a que al ser nivel nano cubre mayor área superficial.</p>
<p>Por otra parte Yan y colaboradores, indican que a medida que se aumenta el porcentaje en peso de nHAp se tiene la tendencia a formar conglomerados y estos a su vez disminuyen la resistencia mecánica, mostrando que con 2% se alcanzan 55 MPa y con 10% de refuerzo solo 45 MPa. Además de aseverar que para que un composito pueda ser llevado a ingeniería de tejidos se deberían tener al menos 40 MPa de resistencia mecánica. (Yan, y otros, 2020)</p>	<p>Este artículo reitera que la condición de mejoría en pruebas mecánicas no requiere superar el 2% de refuerzo.</p>

Zhang y colaboradores, extruyen un composito de PLA y nHAp por FDM al 30% y 50% de refuerzo y señalan mejoras mecánicas con 30% donde oscilan los 29 MPa a diferencia de la concentración 50% donde solo obtienen 14 MPa. (Wang, y otros, 2021)	Reiterando que en efecto al subir el porcentaje de refuerzo en exceso no se tiene una considerable mejoría en la respuesta mecánica.
---	--

Como puede notarse, se requiere aun mejorar el resultado de esfuerzo deformación a tensión para obtener lecturas por encima de los 40 MPa, sin embargo, los resultados son prometedores, dado que con poca concentración de nHAp casi se llega a los resultados que los artículos referencia consiguieron con una cantidad totalmente exagerada. Se sugeriría probar al 1% y 2% de refuerzo en peso.

La mayoría de las probetas muestra una predominancia de la región elástica en la curvatura de ruptura y un corte limpio.

Las pruebas de crecimiento celular o biocompatibilidad son llevadas a cabo al día 1, 3 y 7 con un montaje de 3000 células 3T3-L1 luego de probar que es la óptima condición.

Las lecturas registradas de absorbancia media del crecimiento de sólo células indican que se tiene un lote efectivo de fibroblastos con buenas características, sin embargo, los resultados con probetas muestran una disminución de absorbancia media, indicativo de que las células pasan por un período de adaptación al agente externo y esto reduce el ritmo de crecimiento comparándolo con la ausencia del andamio, pero posteriormente se recupera el ritmo de crecimiento. Mediante microscopía confocal se tienen resultados de células ancladas y adheridas a los poros en diferentes zonas de la probeta, con un buen aspecto y tamaño.

A continuación la comparativa de proliferación con artículos de referencia inicial (ver **Tabla 15**):

Tabla 15 Comparativa de biocompatibilidad con artículos iniciales

En el artículo de Li y colaboradores, que exponen el uso de PLA-NHA-GO con el refuerzo de nHAp al 10%, 20% y 30% en peso, reportan una disminución de absorbancia media, medida en ensayo MTT conforme se aumenta el refuerzo obteniendo lecturas cercanas a 0.1 en 10% y un comportamiento decreciente a 20% y 30%, considerando que la lectura se realizó a 490 nm	En este proyecto se alcanzan lecturas de absorbancia media por arriba de 1 al día 7, con un parámetro de longitud de onda de 550 nm , con solo el uso de 0.05% de nHAp y cultivando fibroblastos, mostrando
--	---

cultivando osteoblastos al día 10 (Li, Liao, & Tjong, 2019)	mejorías en el uso de cantidades menores de HA.
Degradable 3D printed PLA scaffold with long-term antibacterial activity, usando preostoblasto (antecesor de osteoblasto y fibroblasto) presenta un crecimiento detectando en absorbancia media al día 14 una lectura 0.15 con 562 nm de longitud de onda. (Los andamios fueron solo recubiertos por nHAp y modificados con antibiótico en superficie). (Li, y otros, 2018)	En uso de fibroblastos y solo al día 7 se aumentan a 1.2 las lecturas de absorbancia media, haciendo énfasis en el uso de integración del composito de manera física.
Zhang también obtiene mejorías considerables en respuesta a citotoxicidad usando el menor porcentaje de nHAp (30%) que llega cerca de 0.8 de absorbancia media a los 5 días. (Wang, y otros, 2021)	Por nuestra parte superamos el valor de absorbancia media con solo 0.05% de refuerzo.
Mercedes Paulina Chávez Díaz expositora del 31° IMRC con el folio de participación SF3-P049 indica en su investigación Ti6Al4V Alloy microstructures for medical applications las similitudes de crecimiento y propagación de osteoblastos y fibroblastos en superficies que se suplementaron con DMEM y FBS al 10% con 7 días.	Basados en la experiencia y relato de la participante se corrobora el parecido en el tratamiento de ambas líneas celulares y de la efectiva respuesta de crecimiento bajo las mismas condiciones.

Los resultados y comparativas nos llevan a considerar que se logró el cometido de obtener un andamio de composito biocompatible, que permite el crecimiento y proliferación de células fibroblastos.

Conclusiones

Se consiguieron impresiones adecuadas con la estructura mimética pensada, logrando una distribución homogénea de las nHAp en la matriz polimérica.

La hidroxiapatita adquirida presentó evidencia microscópica de los tamaños reportados por el equipo del Dr. Ventura de la UAEH, así como su corroboración en FTIR de los filamentos con su adición.

El DSC evidencia el cambio en la temperatura Tg, Tc y Tm, mismas que fueron útiles para obtener las diferentes piezas por FDM. A su vez DMA precisa que el composito PLA-ALTnHAp resiste una mayor cantidad de aplicación de energía antes de deformarse en presencia de un aumento de temperatura, además de indicar que este composito disminuye su Tg en comparación con el PLA comercial.

Se comprueba mayor resistencia mecánica a medida que se aumenta la cantidad de nHAp al filamento, tal y como se reportaba en la literatura, inclusive al colocar el entramado sigue destacando la mejoría, aunque aún no se consigue equipararse con la resistencia requerida para poder ser empleado en ingeniería de tejido.

La medición de proliferación celular por el ensayo MTT permite corroborar la persistencia de las células mediante el registro de su actividad metabólica, lo cual indica viabilidad, una aceptabilidad del material y evidencia el crecimiento, respuesta que se espera sea igual o inclusive mejor al usar osteoblastos debido a la tendencia fosfato cálcico y a las referencias de trabajos previos en el laboratorio de nanobiótica de CFATA. Adicional la microscopia confocal muestra la adherencia de las células a las paredes del andamio a diferentes zonas a lo largo del eje z de la probeta, es decir, el propósito del andamio de proveer de interconectividad fue el certero, así como el tamaño de poro que preciso el albergar a las células, proveer de nutrientes y permitir que estas se adhieran a las probetas.

Probando así que el PLA genera una unión compatible en refuerzo con las nHAp. Se ha generado conocimiento en el área de bioingeniería. Mostrando como parteaguas que el composito si genera crecimiento celular y mejora de las propiedades termomecánicas con una mayor concentración de nHAp, misma que se queda cercana a equiparar resultados obtenidos con 10% de refuerzo de nHAp, con una menor cantidad.

Quedando pendiente la revisión de la comparativa empleando osteoblastos, así como el estudio de un incremento al 1% y 2% en la cantidad de nHAp empleadas como refuerzo para alcanzar condiciones óptimas.

Referencias Bibliográficas

- Altervista. (6 de Octubre de 2022). *Altervista.org*. Obtenido de Cell culture: <https://cellculture.altervista.org/cell-viability-assay-mtt/?lang=es>
- AMFAB. (2015). *Fabricación avanzada de productos manufactureros tradicionales mediante tecnologías de additive manufacturing*. Instituto Valenciano De Competitividad Empresarial. Valencia: Generalitat Valenciana.
- Arroyave Muñoz, L. M. (2020). *Desarrollo de scaffolds de Polihidroxialcanoato mediante liofilización, biofuncionalizados*. Medellín Colombia: Universidad de Antioquia. Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería de Materiales. Recuperado el 06 de Mayo de 2022, de http://tesis.udea.edu.co/bitstream/10495/18500/6/ArroyaveLiliana_2020_IngenieriaTejidoCartilaginoso.pdf
- Cerda Meneses, H. S. (09 de Septiembre de 2019). *Centro de Investigación en Química Aplicada*. Obtenido de <http://www.ciqa.mx/Biomateriales.aspx>
- Chen, W., Nichols, L., Brinkley, F., Bohna, K., Tian, W., Priddy, M. W., & Priddy, L. B. (2020). Alkali treatment facilitates functional nano-hydroxyapatite coating of 3D printed polylactic acid scaffolds. *Materials Science and Engineering C*, 120, 1186-1196. doi:<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111686>
- Coba Salcedo, M., & Serres Moliner, E. (2006). A comparative study of two rapid tooling technologies; Coproinmold – Selective Laser Sintering. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, 38, 64-72. doi:ISSN 2422-2844
- Daskalakis, E., Huang, B., Vyas, C., Acar, A. A., Liu, F., Fallah, A., . . . Bartolo, P. (2021). Bone Bricks: The Effect of Architecture and Material Composition on the Mechanical and Biological Performance of Bone Scaffolds. *ACS Omega*, 7, 7515-7530. doi:10.1021/acsomega.1c05437
- Dubinenko, G. E., Zinoviev, A. L., Bolbasov, E. N., Novikov, V. T., & Tverdokhlebov, S. I. (2018). Preparation of Poly(L-lactic acid)/Hydroxyapatite composite scaffolds by fused deposit modeling 3D printing. *Materials Today: Proceedings*, 22, 228-234. doi:<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.08.092>
- Echevarría Zuno, S. (2013). *Traumatología*. México: Alfil, S. A. de C. V. doi:ISBN 978-607-8283-33-0

- Elorriaga, M., Martínez, J. A., Lecanda, F., & Larralde, J. (1996). Factores de crecimiento I. *Revista de medicina de la Universidad de Navarra*, 9, 83-87. Obtenido de 2011-7965
- Escobar M., L., Rivera, A., & Aristizábal G., F. A. (2010). Comparison of resazurin and MTT methods on studies of cytotoxicity in human tumors cell lines. *Vitae*, 17, 67-74. Obtenido de 01214004
- Esposito Corcione, C., Gervaso, F., Scalera, F., Montagna, F., Sannino, A., & Maffezzoli, A. (2017). The feasibility of printing polylactic acid–nanohydroxyapatite composites using a low-cost fused deposition modeling 3D printer. *Journal of Applied Polymer Science*, 134, 1-10. doi:10.1002/app.44656
- Fernández Tresguerras, I., Hernández , G., Alobera Gracia, M. Á., Del Canto Pingarrón , M., & Blanco Jérez, L. (2004). Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo. *Medicina Oral*, 47-51. doi:2006;11:E47-51
- Fernández W. , E. (2021). *Sinterización láser en prótesis removible, concepto, ventajas y desventajas*. Madrid. Recuperado el 23 de Abril de 2022, de <http://hdl.handle.net/20.500.12880/603>
- Flores Hernández, C. G., Velasco Santos, C., Hernández Zea, A. L., Gómez Guzmán , O., Yáñez Limón, J. M., Rivera Armenta, J. L., & Martínez Hernández , A. L. (2020). Low Concentrations for Significant Improvements in Thermal and Thermomechanical Properties of Poly(Lactic Acid)–Keratin Biocomposites Obtained by Extrusion and 3D Printing. *Journal of Natural Fibers*, 1-14. Obtenido de <https://doi.org/10.1080/15440478.2020.1788483>
- García Barea, E. (2015). *Análisis de la influencia de la porosidad en las propiedades mecánicas del hueso trabecular* (Departamento de ingeniería mecánica ed.). Madrid: Universidad Carlos III de Madrid. Recuperado el 21 de Abril de 2022
- García Montoro, M. Á. (2017). *Valoración de metodologías de diseño optimizado de piezas para fabricación por sinterizado por haz de electrones (EBM)*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia. Recuperado el 05 de Mayo de 2022, de <http://hdl.handle.net/10251/89613>
- Gómez Ortega , J. L., Elizondo Villareal , N., & Guerrero Villa, H. M. (2004). Visualización cristalográfica de la hidroxiapatita. 7, 5.
- Gómez, R., & R. M. (8 de mayo de 2006). *Espctroscopía infrarroja*.

- Ipohorski, M. (29 de octubre de 2012). *Comisión nacional de energía atómica*. Obtenido de www.cnea.gov.ar/ies
- Jaidev, L. R., & Kaushik Chatterjee. (7 de Noviembre de 2018). Surface functionalization of 3D printed polymer scaffolds to augment. *Materials and Design*, 161, 44-54. doi:<https://doi.org/10.1016/j.matdes.2018.11.018>
- Jarrouj Zoudi, Y. (2017). *Diseño y Fabricación de Dispositivos por Litografía de Nanoimpresión*. San Luis Potosí: Universidad Autónoma de San Luis Potos. Recuperado el 05 de Mayo de 2022, de <http://www.fc.uaslp.mx/pca/tesis/2017Maestria/JarroujZoudiYoliano-Maestr%C3%ADa62.pdf>
- Karageorgiou, V., & Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26, 5474-5491. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.02.002
- Karakaya, E., Bider, F., Frank, A., Teßmar, J., Schöbel, L., Forster, L., . . . Detsch, R. (2022). Targeted Printing of Cells: Evaluation of ADA-PEG Bioinks for Drop on Demand Approaches. *Gels*, 8, 206-230. doi:<https://doi.org/10.3390/gels8040206>
- Li, X., Wang, Y., Guo, M., Wang, Z., Shao, N., Zhang, P., . . . Huang, Y. (2018). Degradable 3D printed PLA scaffold with long-term antibacterial activity. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 6, 2047-2054. doi:10.1021/acssuschemeng.7b03464
- Li, Y., Liao, C., & Tjong, S. C. (2019). Synthetic Biodegradable Aliphatic Polyester Nanocomposites Reinforced with Nanohydroxyapatite and/or Graphene Oxide for Bone Tissue Engineering Applications. *MDPI. Nanomaterials*, 9, 56. doi:10.3390/nano9040590
- López Macay, Á., Fernández Torres, J., & Zepeda, A. (2016). Principios y aplicaciones de la microscopia láser confocal en la investigación biomédica. *Medigraphic*, 5(3), 156-164.
- López Ortiz, S., Mendoza Amaya, D., Sánchez Campos, D., Fernández García, M. E., Salinas Rodríguez, E., Reyes Valderrama, M. I., & Rodríguez Lugo, V. (2020). The pH Effect on the Growth of Hexagonal and Monoclinic Hydroxyapatite Synthesized by the Hydrothermal Method. *Journal of Nanomaterials*, 10. doi:10.1155/2020/5912592
- Maldonado, O., Domínguez, C. J., Rubío, E., & Padilla, J. M. (2016). Síntesis y caracterización de perlas compuestas de nano-hidroxiapatita/quitosano por precipitación in-situ. *Revista de Ciencias de la Salud Marzo*, 3, 50-57. Obtenido de www.ecorfan.org/bolivia

- Manavitehrani, I., Fathi, A., Badr, H., Daly, S., Shirazi, A. N., & Dehghani, F. (2016). Biomedical Applications of Biodegradable Polyesters. *Polymers*, 8, 32. doi:10.3390/polym8010020
- Martín, V., Ribeiro, I. A., Alves, M. M., Gonçalves, L., Claudio, R. A., Grenho, L., . . . Bettencourt, A. F. (2019). Engineering a multifunctional 3D-printed PLA-collagen-minocycline- nanoHydroxyapatite scaffold with combined antimicrobial and osteogenic effects for bone regeneration. *Materials Science and Engineering C*(February), 15-26. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.056>
- Martínez Aguilar, L. G. (2006). *Estudio de Caso Técnicas de Análisis Dinámico Mecánico*. Saltillo, Coahuila: Centro de Investigación en Química Aplicada. Recuperado el 29 de Noviembre de 2022, de <https://ciqa.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1025/464/1/Lizeth%20Georgina%20Martinez%20Aguilar.pdf>
- Ministerio de Educación. Instituto Nacional de Educación Tecnológica. (2011). Materiales compuestos. En F. Stupenengo, *Materiales y materias primas* (pág. 27). Buenos Aires, Argentina. Obtenido de <http://www.inet.edu.ar/wp-content/uploads/2012/11/materiales-compuestos.pdf>
- Mondal, S., Nguyenb, T. P., Phamb, V. H., Hoanga, G., Manivasagan, P., Kim, M. H., . . . Oh, J. (2019). Hydroxyapatite nano bioceramics optimized 3D printed poly lactic acid scaffold for bone tissue engineering application. *Ceramics International*, 46, 3443-3455. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.10.057>
- Olivares Santiago, M., Galán Marín , C., & Roa Fernández, J. (2003). Los composites. Características y aplicaciones en la edificación. *Informes de la Construcción*, 54, 45-62. doi:10.3989/ic.2003.v54.i484.568
- Pareja, N. M., Escobar, D. M., Ossa, C. P., & Echevarría , A. (2008). Synthesis and characterization of microporous hydroxyapatite, comparison with a commercial product. *Revista Facultad de Ingeniería*, 67-76. Obtenido de 01206230
- Pérez Martínez , R. (2016). *Caracterización microestructural y tribo-mecánica de muestras de Ti6Al4V fabricadas combinando la fusión selectiva por láser y tratamientos termo-químicos de modificación superficial*. Sevilla: Dep. Ingeniería y Ciencia de los Materiales y del Transporte. Recuperado el 26 de Abril de 2022, de <http://hdl.handle.net/11441/47954>

- Piña Barba, M. C. (2007). Los biomateriales y sus aplicaciones. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 55-58. Obtenido de http://www.uam.mx/difusion/casadeltiempo/28_iv_feb_2010/casa_del_tiempo_eIV_nu m28_55_58.pdf
- Plikus, M. V., Wang, X., Sinha, S., Forte, E., Thompson, S. M., Herzog, E. L., . . . Horsley, V. (2021). Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. *CellPress Leanding Edge*, 21.
- Radwan Praglowska, J., Janus, L., Piatkowski, M., Bogdal, D., & Matysek, D. (2020). 3D Hierarchical, Nanostructured Chitosan/PLA/HA Scaffolds Doped with TiO₂/Au/Pt NPs with Tunable Properties for Guided Bone Tissue Engineering. *Polymers*, 12, 792-808. doi:10.3390/POLYM12040792
- Renau Piqueras, J., & Faura, J. (30 de agosto de 2012). *Fundamentos del microscopio electronico de barrido*.
- Rivera Escoto, B. A. (2017). *Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología*. Obtenido de IPICYT: http://www.linan- ipicyt.mx/XRD_Bruker_D8_Advance.html
- Rodríguez, B. V., Razzino, C. A., Olivera, F., Marciano, F. R., & Lobo, A. O. (2017). On the design and properties of scaffolds based on vertically aligned carbon nanotubes transferred onto electrospun poly (lactic acid) fibers. *Materials and Design*, 127, 183-192. doi:10.1016/j.matdes.2017.04.074
- Rodríguez Lugo, V., Karthik, T. V., Mendoza Anaya, D., Rubio Rosas, E., Villaseñor Cerón, L. S., Reyes Vaderrama, M. I., & Salinas Rodríguez, E. (2018). Wet chemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite flakes: effect of pH and sintering temperature on structural and morphological properties. *Royal Society Open Science*, 5, 14. doi:10.1098/rsos.180962
- Rojas Martínez, L. E., Flores Hernández, C. G., López Marín, L. M., Martínez Hernández, A. L., Thorat, S. B., Reyes Vásquez, C. D., . . . Velasco Santos, C. (2020). 3D printing of PLA composites scaffolds reinforced with keratin and chitosan: Effect of geometry and structure. *European Polymer Journal*, 141, 88-110. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110088>
- Serna C., L., Rodríguez de S., A., & Albán A., F. (2011). Ácido Poliláctico (PLA): Propiedades y Aplicaciones. *Ingeniería y competitividad*, 5, 16. doi:10.25100/iyc.v5i1.2301

- Shivananda, C. S. (Enero de 2017). Synthesis of silver nanoparticles using silk fibroin: characterization and potential antibacterial properties. *Mangalore University*, 192. doi:10.13140/RG.2.2.20649.62566
- Silva Pereira , H., & Patrón Soberon, O. A. (2017). *Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología*. Recuperado el 29 de Noviembre de 2022, de IPICYT: http://www.linan-ipicyt.mx/Microscopio_HR-TEM.html
- Trejejo Bocanegra, A., Fernández , D., & Calderón Ubaqui, V. (2013). Estereolitografía: Conceptos básicos. *Estomatol Herediana*, 23, 96-100. doi:ISSN: 1019-4355
- Wang, L., Song, P., Pei, X., Sun , H., Wu, L., Zhou, C., . . . Zhang, B. (2021). 3D printed bone tissue regenerative PLA/HA scaffolds with comprehensive performance optimizations. *Materials and Design*, 201, 109-121. doi:<https://doi.org/10.1016/j.matdes.2021.109490>
- Whardani, I. F., Samudra, R. M., Katherine, Hikmawati, D., & Aminatum. (2019). Physical Characterization of Injectable Bone Substitute Associated-3D Printed Bone Scaffold for Spinal Tuberculosis. *1417*, 8. doi:10.1088/1742-6596/1417/1/012034
- Yan, D., Wang, Z., Guo, Z., Ma, Y., Wang, C., Tan, H., & Zhang, Y. (2020). Study on the properties of PLA/PBAT composite modified by nanohydroxyapatite. *ELSEVIER*, 11895–11904.
- Zadpoor, A. A. (2015). Bone tissue regeneration: the role of scaffold geometry. *Biomaterials Science*, 3, 231-245. doi:10.1039/c4bm00291a
- Zárate-Kalfópulos, B., & Reyes-Sánchez, A. (2006). Injertos óseos en cirugía ortopédica. *Medigraphic*, 74, 217-222. doi:74:217-222
- Zare , R. N., Doustkhah, E., & Husse, M. (2019). Three-dimensional bone printing using hydroxyapatite-PLA composite. *Materials Today: Proceedings*, 42, 1531-1533. doi:<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.12.046>