



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIA DE INGENIERÍA DE MATERIALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES
FACULTAD DE QUÍMICA

*ANDAMIOS POR IMPRESIÓN 3D, CON BASE ENNANO-
HIDROXIAPATITA Y ÁCIDO POLILÁCTICO, EN LA
REGENERACIÓN ÓSEA: SÍNTESIS Y PROPIEDADES MECÁNICAS*

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIA DE INGENIERÍA DE MATERIALES

P R E S E N T A

DIANA ELIZABETH JUÁREZ ROBLES

TUTORA PRINCIPAL:
DRA. MARÍA DE LOURDES CHÁVEZ GARCÍA
FACULTAD DE QUÍMICA
DRA. ELIZABETH CHAVIRA MARTÍNEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES
DR. JESÚS ÁNGEL ARENAS ALATORRE
INSTITUTO DE FÍSICA
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., MAYO DE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales

Instituto de Investigaciones en Materiales
Facultad de Química

*Andamios por impresión 3D, con base en
nano-hidroxiapatita y ácido poliláctico,
en la regeneración ósea: Síntesis y Propiedades Mecánicas*

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

P r e s e n t a

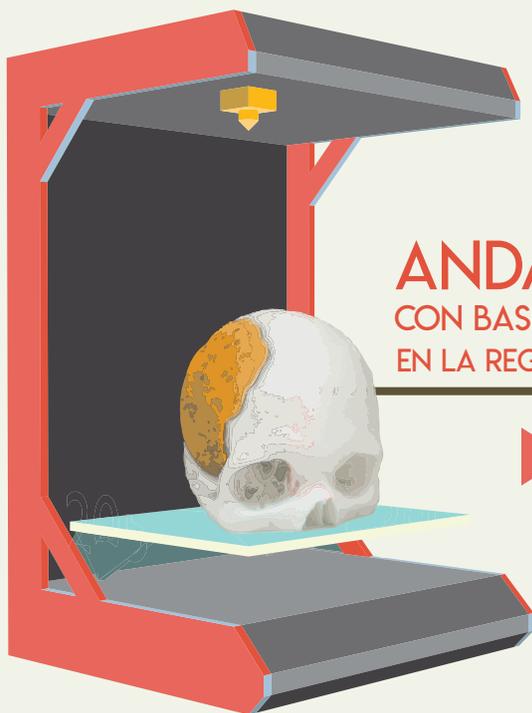
Diana Elizabeth Juárez Robles

Dra. María de Lourdes Chávez García
Facultad de Química

Dra. Elizabeth Chavira Martínez
Instituto de Investigaciones en Materiales

Dr. Jesús Ángel Arenas Alatorre
Instituto de Física

Ciudad de México, Mayo de 2018.



ANDAMIOS POR IMPRESIÓN 3D, CON BASE EN NANO-HIDROXIAPATITA Y ÁCIDO POLILÁCTICO, EN LA REGENERACIÓN ÓSEA: SÍNTESIS Y PROPIEDADES MECÁNICAS.

▶ Diana Elizabeth Juárez Robles
Tutor: María de Lourdes Chávez García - FQ

2018



JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Filiberto Rivera Torres	<i>Facultad de Química</i>
Primer Vocal	Dra. María de Lourdes Chávez García	<i>Facultad de Química</i>
Segundo Vocal	Dr. Joaquín Palacios Alquisira	<i>Facultad de Química</i>
Tercer Vocal	Dr. Ricardo Vera Graziano	<i>IIM</i>
Secretario	Dra. Norma Angélica Sánchez Flores	<i>CCADET</i>

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ LA TESIS:

Laboratorio de Cerámica, 4to. Piso del Edificio B, Facultad de Química, UNAM.

EL PRESENTE TRABAJO SE EXPUSO EN:

La Feria de la Química 2016, en la modalidad de cartel con el título “Los cerámicos en celdas de combustible y prótesis”, septiembre del 2016, CDMX.

El 3rd Congreso internacional de RED MexBIOT, en la modalidad de cartel con el título “Síntesis de nanocompuestos de hidroxiapatita y ácido poliláctico para su aplicación en prótesis y defectos óseos”, del 30 de noviembre al 2 de diciembre de 2016, Michoacán.

El XXVI International Materials Research Congress 2017, en la modalidad de cartel con el título “Synthesis of nano compounds based on hydroxyapatite and polylactide acid for its application as a prosthesis in bone tissue defects”, del 20 al 25 de agosto de 2017, Quintana Roo.

El Congreso Internacional de Docencia e Investigación en Química, en la modalidad de presentación oral con el título “Síntesis de nano-hidroxiapatita por los métodos de sol-gel y coprecipitación”, del 6 al 8 de noviembre de 2017, CDMX.

El IV Congreso Internacional de RED MexBIOT, en la modalidad de cartel con el título “Nanocompuestos de hidroxiapatita y ácido poliláctico en la regeneración ósea”, del 28 al 30 de noviembre de 2017, CDMX.

Adicionalmente se encuentra en proceso la publicación de un artículo para revistas científicas internacionales.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su apoyo incondicional durante toda mi vida.

A mi directora de tesis la Dra. María de Lourdes Chávez García por recibirme en el mundo de la investigación. Y a mi comité tutor por su apoyo y disposición.

A la participación de las estudiantes del laboratorio de cerámica de la Facultad de Química, Selene Salas, Belen Reyes, Stefanía Segura y Gisel Hernández.

A mis amigos Priscila Román, Adrián Grepe, Melissa Méndez, Eduardo Romero y Sergio Elizalde.

A mis profesores de la maestría.

Al H. Jurado por su tiempo e interés en mejorar el presente proyecto.

Al Laboratorio del Dr. David Díaz y Laboratorio de Química Inorgánica 1C (Fac. Química, UNAM) por las facilidades otorgadas.

Al trabajo analítico de la M. en C. Ma. Cecilia Salcedo, M. en C. Adriana Tejeda Cruz. A., Q. Rafael Iván Puente Lee, J. Romero y E. Hernández.

Al apoyo de la Dra. Tania Ariadna García Mejía.

Al financiamiento de la Facultad de Química, UNAM (PAIP, Proyecto No. 5000-9038).

Al CONACYT por la beca de maestría otorgada.

Biocompatibilidad. Capacidad de provocar una respuesta satisfactoria del tejido para una aplicación específica dentro del cuerpo humano [Williams, 1987]. Aplicado a un material protésico: que no tiene efectos nocivos ni genera reacciones inadecuadas de carácter inmunitario, infeccioso o inflamatorio cuando se implanta en los tejidos u órganos del receptor [Biocompatible, 2012].

Biodegradabilidad. Aplicado a una sustancia: que puede ser degradada por organismos vivos. [Biodegradable, 2012].

Biofuncionalidad. Capacidad de reunir ciertas características físicas y mecánicas, que lo hagan útil para la función requerida en el sitio implantado [Giannoudis, 2005].

Bioinerte. No induce respuesta local del sistema inmunológico, no tiene la capacidad de interactuar con el tejido huésped química o biológicamente. adj. Aplicado a una sustancia química: que no reacciona [Inerte, 2012].

Bioactivo. Induce una respuesta biológica específica en la interface con el tejido vivo, permitiendo la formación de una ligación entre el tejido y el material [Hulbert et al. 1987]. Que actúa sobre una célula o tejido vivos para producir un efecto determinado o desencadenar una respuesta [Bioactivo, 2012].

Fractura frágil. La fractura frágil ocurre sin apreciable deformación plástica, y por propagación rápida de una grieta. La dirección del movimiento de la grieta es casi perpendicular a la dirección de la tensión aplicada y produce una superficie de fractura relativamente plana. En materiales amorfos, tales como vidrios cerámicos, produce una superficie lisa y brillante [Callister, 2002].

Histocompatibilidad. Semejanza o identidad inmunológica entre los tejidos de un donante y el receptor del injerto o el trasplante [Histocompatibilidad, 2012].

Vascularización/angiogénesis. Formación de los vasos sanguíneos o linfáticos, tanto en el desarrollo embrionario como en la reparación y la regeneración de los tejidos. Sin.: vasculari-

zación, vasculogénesis [Angiogénesis, 2012].

Osteointegración. Contacto directo, a nivel microscópico, entre el hueso vivo y la superficie de un implante sin la formación de tejido fibroso en la interface [Per-Ingvar Branemark, 1952; Albrektsson y Johansson, 2001].

Osteoinducción. Término que se refiere a la transformación de células mesenquimales indiferenciadas perivasculares en células osteoformadoras, en presencia de ciertas sustancias polipeptídicas, como la BMP (bone morphogenic protein), y de un ambiente tisular favorable. Una de las formas de regeneración ósea y de incorporación de los injertos óseos [Osteoinducción, 2015].

Osteoconducción. Crecimiento del hueso en la superficie. Una superficie osteoconductiva permite el crecimiento del hueso en el área externa o en sus poros, canales o tuberías [Albrektsson y Johansson, 2001].

Osteogénesis. Formación y desarrollo de los huesos y del tejido óseo [Osteogénesis, 2012].

Partícula. Composición de la mayoría de los sólidos cristalinos. La orientación cristalográfica diferencia cada grano. Cada partícula de polvo o grano es un cristal [Callister, 2002].

Resorción/reabsorción. s.f. Proceso fisiológico que conduce a la destrucción y eliminación de un tejido mineralizado y que presenta dos fases: la eliminación del componente mineral y la eliminación del componente orgánico. Las células que intervienen en la reabsorción son, respectivamente, los osteoclastos en el tejido óseo, los cementoclastos en el cemento dentario y los odontoclastos en la raíz de los dientes deciduos o caducos. Obs.: Se usa con frecuencia en un sentido más restringido, referido tan solo a la → reabsorción ósea [Reabsorción, 2012].

Tamaño de partícula. Característica microestructural especificada en términos de volumen, diámetro o área [Callister, 2002].

ABREVIATURAS

% m/m. Concentración porcentual en masa.

3D. Tercera dimensión.

ACP. Fosfato de calcio amorfo I y II.

AL. Ácido láctico.

BCP. Fosfato de calcio bifásico.

CDHA. Hidroxiapatita deficiente en calcio.

CT. [Computed tomography] Tomografía computarizada.

DIW. [Direct Ink Writing] Escritura directa en tinta/Robocasting.

DRX. Difracción de Rayos X [XRD, X-Ray Diffraction].

EDX/EDS. [Energy Dispersive X-Ray] Dispersión de Energía de Rayos X.

FDM. [Fused Deposition Modeling] Modelado por deposición fundida.

HAP. Hidroxiapatita.

HDPU. Poliuretano de alta densidad [High density polyurethane].

HSA. Ácido 12 hidroxisteárico.

IR-TF. Espectrometría Infrarroja por Transformada de Fourier [FTIR, Fourier Transform Infrared Spectroscopy].

MA. Manufactura Aditiva.

MEB. Microscopía Electrónica de Barrido [SEM, Scattering Electron Microscopy].

MO. Microscopía óptica.

n. nano.

Mw. Peso molecular.

PCL. Policaprolactona.

PE. Polietileno.

PET. Polietilentereftalato/ tereftalato de polietileno.

PLA. Ácido poliláctico.

PMMA. Polimetil metacrilato.

PPF. Polipropileno fumarato.

PVA. Alcohol polivinílico.

SBF. Fluido Corporal Simulado [Simulated Body Fluid].

SFF. Sólidos de Forma Libre [Solid Free Form].

SLA. Estereolitografía [Stereolithography].

s-o-w. Sólido-aceite-agua [solid-oil-water].

TCP. Fosfato Tricálcico [Tricalcium Phosphate].

Tg. Temperatura de transición vítrea.

Tm. Temperatura de fusión.

TPU. Poliuretano termoplástico [Thermoplastic Polyurethane].

WH. Whitlockita.

w-o-w. water-oil-water.

wt%. % m/m [percentage by weight].

ABSTRACT

The design of bioactive scaffolds that resembles the mechanical, chemical, physic and biological properties of the bone is a research topic in trend for its importance. The purpose of this project is to produce a scaffold fabrication method for bone tissue regeneration, using biocompatible composite materials from hydroxyapatite (HAP) and polylactic acid (PLA) through 3D printing. For this objective the settings were found for: the HAP synthesis, the HAP integration into the PLA for the composite formation, the filament configuration, and the scaffold 3D printing. The reagent characterization was done by X-Ray powder diffraction and infrared spectroscopy. The products characterization was done by XRD, FTIR, mechanical test of tension and compression, Vickers microhardness, optical microscopy and SEM.

In the present research, it was found that the nano HAP was synthesized by the co-precipitation method from calcium nitrate and ammonium phosphate maintaining the molar ratio between Ca/P of 1.67. The synthesis parameters were set at: 75 °C, a pH above 10, continue stirring, and crystallization temperature of 700 °C for 12 h. From XRD, the HAP phase was identified without additional signals and a particle size of (23 × 44) nm. From FTIR the HAP signals was corroborated and with EDS the Ca/P ratio for HAP was determined at 1.65. The HAP-PLA composite was incorporate by the solid-oil-water (s-o-w) emulsion solvent evaporation method, through encapsulation of n-HAP into PLA microspheres in methylene chloride solution into the polyvinyl alcohol (PVA) in water solution, 50 wt% and 70 wt% of HAP into PLA were tasted. The EDS analysis showed a homogeneous distribution of Ca, P and O into the polymeric matrix with signals of neither methylene chloride nor PVA; corroborated by the FTIR analysis, that showed HAP and PLA without reactions between them.

The architecture of the scaffold was achieved with the 50 wt% of HAP in PLA through fused deposition modeling (FDM) 3D printing. The HAP-PLA material was extruded into a 1.7 mm filament at (150 ±10) °C. The filament was 3D printed at 230 °C with a 40 mm/s speed for a constant flow. Those conditions achieved the manufacture of a scaffold with adhesion between layers and continuous construction lines, verified by optical and electrical microscopy as well as EDS analysis.

The mechanical test for the HAP-PLA composite in compression were of 11.4 MPa and in tension of 38.5 MPa, both properties were below the average values of human bone of (131-205) MPa and (53-135) MPa for each of them. The failure analysis by MEB micrographs showed brittle fracture as a ceramic material for the composite. The hardness values of the HAP-PLA were of 170 MPa, below the human bone of 548 MPa and above similar scaffolds of 40 MPa.

In the present research a biphasic calcium phosphate (BCP) was obtained at a pH lower than 7 and a crystallization temperature of 1000°C, the phases known as HAP and β -TCP were identified from XRD pattern. The existence of those phases was corroborated by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and by scanning electron microscopy (SEM). The β -TCP addition to the HAP gives enhanced properties for new bone develop and for mechanical properties at tension. It is proposed the investigation of biphasic calcium phosphate for bone tissue regeneration.

The scaffold fabrication method presented confirms the development of biocompatible material without geometry restrain and with porosity control properties for custom bone tissue prosthetics.

El diseño de andamios bioactivos con propiedades físicas, químicas, mecánicas y biológicas perfeccionadas, semejantes a las del hueso humano es un tópico de investigación relevante. El propósito de este proyecto es el de producir un método de fabricación de andamios para la regeneración ósea usando materiales compuestos biocompatibles a partir de hidroxipatita (HAP) y ácido poliláctico (PLA) que serán usados en el proceso de impresión 3D. Para lo cual se encontrarán las condiciones para: la síntesis de la HAP, la integración de la HAP con el PLA en la formación del material compuesto, la conformación del filamento y del andamio para su impresión 3D. La caracterización de los precursores se hizo por difracción de rayos X de polvos y espectroscopía de absorción infrarroja; en el caso de los productos, por: DRX, IR-TF, las pruebas mecánicas de compresión, tensión y dureza; y las microscopías: óptica y electrónica de barrido.

En este trabajo, se encontró que la nano HAP, con relación molar entre Ca/P de 1.67, se sintetizó, con el método de coprecipitación a partir del nitrato de calcio y fosfato de amonio, a 75 °C, con un pH arriba de 10 y, agitación continua; a una temperatura de cristalización de 700 °C, durante 12 h. La fase de la HAP, con un tamaño de partícula de aproximadamente de (23 × 44) nm, se identificó por DRX, sin señales adicionales; corroborada por su análisis de IR-TF, con un valor para la relación Ca/P de 1.65, por EDS. La integración del material compuesto de HAP-PLA se realizó en las proporciones de 50 % m/m y 70 % m/m, con el método de emulsión solido-aceite-agua, por medio de la encapsulación de la n-HAP en las microesferas de PLA disuelto en diclorometano, a través de una disolución de un surfactante de alcohol polivinílico (PVA) en agua. Su análisis por EDS mostró una distribución uniforme de Ca, P y O, así como su análisis por IR-TF reveló una HAP sin alteraciones, embebida en la matriz polimérica del PLA, sin diclorometano, ni PVA.

La arquitectura del andamio se realizó para una relación del HAP-PLA del 50 % m/m, con el método de impresión 3D de deposición por material fundido (FDM). Para lo cual, el material se extruyó en un filamento de 1.7 mm, a (150 ±10) °C. Su análisis por MEB mostro una HAP distribuida de forma uniforme en la matriz de PLA. El filamento se sometió al proceso de im-

presión 3D, a 230 °C, con una velocidad de 40 mm/s para obtener un flujo constante. Estas condiciones mostraron por microscopía óptica un andamio con unión entre capas y líneas de construcción continuas; así mismo se confirmó, por su análisis por MEB y EDS.

Las pruebas mecánicas del andamio del material compuesto de HAP-PLA dio resistencias de, compresión de 11.4 MPa y de tensión de 38.5 MPa, valores menores a los, del hueso humano de (131 a 205) MPa y de (53 a 135) MPa, respectivamente. Las micrografías, por MEB, mostraron un comportamiento de fractura frágil de tipo cerámico. Su valor de dureza fue de 170 MPa, mayor a 40 MPa encontrada para un andamio de características similares; aunque, menor al que presenta el tejido óseo humano, de 548 MPa.

En este trabajo, de forma adicional, durante la síntesis de HAP, se encontró, a un pH menor a 7 y una temperatura de 1000 °C, la cristalización del fosfato de calcio bifásico (BCP), constituido, por la HAP y el fosfato tricálcico (β -TCP), identificado por el análisis de DRX; lo cual se corroboró por medio de sus señales del espectro de absorción infrarroja (IR-TF) y microscopía electrónica de barrido (MEB). La adición de β -TCP a HAP favorece el crecimiento del hueso, ya que se encuentra asociado con el hueso humano joven y, favorece las propiedades mecánicas en tensión. De aquí, se propuso la investigación del fosfato de calcio bifásico para la regeneración de tejido óseo.

El método de fabricación de andamios para regeneración ósea presentado confirma el desarrollo de un material biocompatible sin restricciones en la geometría y control en sus propiedades de porosidad para prótesis de hueso hechas a la medida del paciente.

ÍNDICE

Pág.	
I	Glosario
III	Abreviaturas
IV	Abstract
VI	Resumen
15	1. Introducción
	2. Marco Teórico
21	2.1 <i>Implantes óseos</i>
23	2.1.1 <i>Biomateriales</i>
27	2.2 <i>Fosfatos de calcio</i>
28	2.2.1 <i>Métodos de síntesis hidroxiapatita (HAP)</i>
28	2.3 <i>Ácido poliláctico (PLA)</i>
29	2.4 <i>Incorporación de la HAP en PLA</i>
29	2.5 <i>Conformado del material compuesto</i>
30	2.5.1 <i>Manufactura aditiva (MA)</i>
33	3. Objetivos
	3.1 <i>General</i>
	3.2 <i>Específicos</i>
34	4. Desarrollo experimental
35	4.1 <i>Reactivos</i>
35	4.2 <i>Técnicas de caracterización</i>
37	4.3 <i>Síntesis de la HAP</i>
37	4.3.1 <i>Síntesis de HAP por coprecipitación</i>
38	4.4 <i>Obtención del material compuesto HAP-PLA</i>
38	4.4.1 <i>Compuesto con dispersión por medio de PVA</i>
39	4.5 <i>Conformado del filamento de HAP-PLA</i>
39	4.5.2 <i>Conformado por extrusión</i>
40	4.6 <i>Modelado tridimensional del material HAP-PLA</i>

Pág.

5. Resultados

43	<i>5.1 Síntesis hidroxiapatita (HAP)</i>
43	<i>5.1.1 Síntesis a pH 7</i>
46	<i>5.1.2 Síntesis a pH 10-11</i>
48	<i>5.2 Material compuesto HAP-PLA</i>
48	<i>5.2.1 Dispersión por medio de PVA</i>
50	<i>5.3 Conformado por extrusión del material HAP-PLA</i>
52	<i>5.4 Impresión 3D del material compuesto HAP-PLA</i>
52	<i>5.4.1 Determinación de propiedades para impresión</i>
53	<i>5.4.2 Morfología del andamio HAP-PLA por MO</i>
53	<i>5.4.3 Morfología y composición del andamio HAP-PLA por MEB</i>
55	<i>5.4.4 Pruebas mecánicas</i>
59	<i>5.4.5 Medición de dureza</i>
60	<i>5.4.6 Pruebas in vitro</i>

6. Discusión

62	<i>6.1 Síntesis hidroxiapatita (HAP)</i>
62	<i>6.1.1 Síntesis a pH 7</i>
62	<i>6.1.2 Síntesis a pH 10-11</i>
63	<i>6.2 Material compuesto HAP-PLA</i>
63	<i>6.2.1 Dispersión por medio de PVA</i>
64	<i>6.3 Conformado por extrusión del material HAP-PLA</i>
64	<i>6.4 Impresión 3D del material compuesto HAP-PLA</i>
65	<i>6.4.1 Pruebas mecánicas</i>
66	<i>6.4.2 Medición de dureza</i>
66	<i>6.4.3 Pruebas in vitro</i>

67 6. Conclusiones

69 Referencias

ANEXOS

80	1. Tablas
84	2. Desarrollo experimental
87	3. Resultados

1. INTRODUCCIÓN

La necesidad de restaurar o sustituir tejido óseo ha estado presente en la humanidad. Cuando una cantidad de hueso se encuentra comprometida, ya sea por la deformidad congénita o no, el traumatismo, las enfermedades degenerativas, la vejez, o la tumoración, es preciso recurrir a los implantes óseos, ya sean naturales o sintéticos [Park *et al.*, 2016; Dandy y Edwards, 2011; Silberman y Varaona, 2011].

Las prótesis implantadas o reparadas deben cumplir con la funcionalidad mecánica y de la biocompatibilidad, durante su vida de servicio, sin que sea necesario su reemplazo. Las características generales, que los implantes necesitan cumplir, son de interacción y degradación en el ambiente, porosidad, propiedades de la superficie y mecánicas, y procesos de elaboración sencilla. En cuanto a la interacción con el ambiente debe contar con biocompatibilidad, biodegradabilidad controlada y absorción para que el implante sea sustituido eventualmente por tejido óseo. La interconectividad de los poros en el implante favorece la integración y la vascularización, para permitir su reemplazo. Las propiedades que la superficie del implante requiere expresar son la diferenciación superficial y la proliferación de células. Las propiedades mecánicas del implante deben ser semejantes al tejido que se desea reemplazar, ya sea que se trate de hueso cortical, esponjoso o cartílago. Para la elaboración del implante se busca la manufactura más sencilla y precisa posible, además debe soportar el proceso de esterilización [Sachlos y Czernuszka, 2003; Tang, 2016; Narayanan *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016].

La fijación del material implantado al hueso es uno de los problemas comunes. Los huesos cambian con el tiempo, el lugar en donde la pieza estaba fija se mueve en menos de un año, en consecuencia, la prótesis se afloja; como resultado se desprenden partículas de desgaste, y éstas reaccionan como un cuerpo extraño [Dandy y Edwards, 2011; Silberman y Varaona, 2011; Ding *et al.*, 2015; Sumner, 2015]. Por lo que, se requieren dispositivos médicos, con propiedades mecánicas, físicas y químicas similares a los tejidos que se necesitan sustituir o reparar [Tang *et al.*, 2016; Hubbell, 1995].

Los metales, los polímeros y los cerámicos conforman la familia de los biomateriales [Inzana *et al.*, 2016; Teoh, 2000]. Los biomateriales metálicos ofrecen resistencia a la corrosión, en el

ambiente del cuerpo, y a la fatiga, al igual que ductilidad alta. Pero éstos son de costo elevado, liberan iones metálicos, y son incapaces de formar tejido que permita su unión con el hueso; además, la diferencia de su resistencia al esfuerzo, con respecto al hueso, lo daña por fisuras o impide su crecimiento normal, dejando una vida útil de alrededor de 20 años [Dandy y Edwards, 2011; Silberman y Varaona, 2011; Wang *et al.*, 2016].

Los biomateriales poliméricos ofrecen las ventajas de contar con resistencia a la fricción, la tracción, y la abrasión; además son usados en unión con metales y cerámicos por sus capacidades de biodegradación y biocompatibilidad [Lin *et al.*, 2008; Narayanan *et al.*, 2016]. El ácido poliláctico (PLA) es representativo de materiales bio-reabsorbibles [Ramot *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2011]. Las desventajas en el uso de la mayoría de los polímeros, como el poliuretano de densidad alta (HDPU) y el polietileno (PE), son el desprendimiento de partículas que inflaman o erosionan el hueso [Dandy y Edwards, 2011; Silberman y Varaona, 2011; Roach *et al.*, 2007; Gentile, 2014].

Los biomateriales cerámicos del tipo de los fosfatos de calcio forman los constituyentes principales de los huesos, estos minerales óseos destacan por sus propiedades fisicoquímicas semejantes al hueso y su porosidad, lo que brinda la fijación por relleno de las cavidades [Cox *et al.*, 2015; Wang, 2003; Kruse *et al.*, 2011; Dorozhkin, 2007]. Los biocerámicos son duros y frágiles; con puntos de fusión alto; conductividad térmica y eléctrica bajas; resistencia al desgaste alto, y con resistencia a las fuerzas de torsión y flexión bajas [Wang, 2003; Kruse *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2015]. La hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HAP, es un cerámico osteoinductor usado en la formación de hueso nuevo, debido a sus propiedades de biocompatibilidad. La HAP, forma el 70% de la composición del hueso en peso seco; demuestra biocompatibilidad, con huesos y dientes, por su bioactividad y osteoconductividad [Sachlos y Czernuszka, 2003; Kim *et al.*, 2006; Zhou, 2011; Ebrahimi *et al.*, 2016].

La HAP se eligió para el desarrollo del biomaterial, en este estudio, con base en la limitante de la fijación de la prótesis al hueso; y, al conocimiento de que los fosfatos de calcio permiten la osteoconducción. Lo que significa la vascularización del andamio, el crecimiento celular y, con el tiempo, su sustitución por hueso [Sachlos y Czernuszka, 2003; Nayak, 2010; Rogel *et al.*, 2008; Gopi *et al.*, 2016]. La necesidad de reparar el hueso fracturado; substituir al faltante, y en su caso al osteoporótico, genera el mejoramiento de su composición y su estructura en las cerámicas biocompatibles [Sadat-Shojai *et al.*, 2013]. Por lo que, el interés de este trabajo

es la obtención de un nano compuesto de hidroxiapatita adecuado para la conformación y reparación del hueso.

Los biomateriales compuestos ofrecen propiedades semejantes al hueso. En este sentido, la composición del hueso cuenta con una parte polimérica, que es la proteína del colágeno, y una cerámica, representada por la hidroxiapatita [Sachlos y Czernuszka, 2003; Wang *et al.*, 2016]. Las cuales trabajan en conjunto, la parte inorgánica en combinación, con el componente polimérico, disminuye su fragilidad y fractura. Mientras que, la parte orgánica, con el cerámico, regula el pH, evita la reacción inflamatoria; la degradación del material con la consecuencia de acidificar su ambiente; y, mejora la respuesta al crecimiento de las células óseas [Kim *et al.*, 2006; Cross *et al.*, 2016; Ding *et al.*, 2015].

La HAP y el PLA han sido sintetizados y probados, ya que, ambos materiales ofrecen la posibilidad de ser sustituidos y generar osteoconducción [Naderi *et al.*, 2011; Cross *et al.*, 2016]. Por consiguiente, se continúa con el mejoramiento de los procesos de manufactura que influyen, en el costo de las piezas, y en el desarrollo del conformado reproducible en los andamios [Serra *et al.*, 2013 A; Serra *et al.*, 2013 B].

En el formado de cerámicos la tecnología de manufactura aditiva (MA), cuenta con métodos de elaboración, como son, las resinas fotosensibles cargadas con las partículas de los cerámicos; la deposición de un aglutinante para los cerámicos; la fusión del polvo cerámico con un láser; la impresión directa de tinta (por su nombre en inglés: robocasting o DIW); las cerámicas derivadas de polímeros por medio de la pirólisis. Los tiempos de obtención son, de días a semanas, en función del tamaño de la pieza, y su forma [Sachlos y Czernuszka, 2003; Eckel *et al.*, 2016].

A diferencia de los medios de conformado tradicionales y comunes, la MA no requiere de mano de obra en la producción, ni el uso de moldes; ofrece un costo de producción en tiempo e insumos tres veces menores, en comparación, con otras opciones como son, la fusión del polvo con un láser y, las cerámicas sintetizadas por medio de polímeros; con la ventaja de no requerir procesamiento posterior o, un cambio en las dimensiones por encogimiento del material [Dudek, 2013; Almeida *et al.*, 2014]. En este trabajo, la MA se aplicará para el conformado de los andamios de material compuesto HAP-PLA, por el método de deposición del material fundido (FDM, por sus siglas en inglés). Se propone la obtención de un material compuesto preparado con HAP y PLA para mejorar la resistencia, y la plasticidad del implante en coin-

cidencia con las propiedades del hueso humano [Li *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2016]. Para lo cual se encontrarán las condiciones para: la síntesis de la HAP, la integración de la HAP con el PLA en la formación del material compuesto, la conformación del filamento y la del andamio para su impresión 3D. La caracterización de los precursores se hará por difracción de rayos X de polvos y espectroscopía de absorción infrarroja; en el caso de los productos, por: DRX, IR-TF, las pruebas mecánicas de compresión, tensión y dureza; y las microscopías: óptica y electrónicas de barrido.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 IMPLANTES ÓSEOS

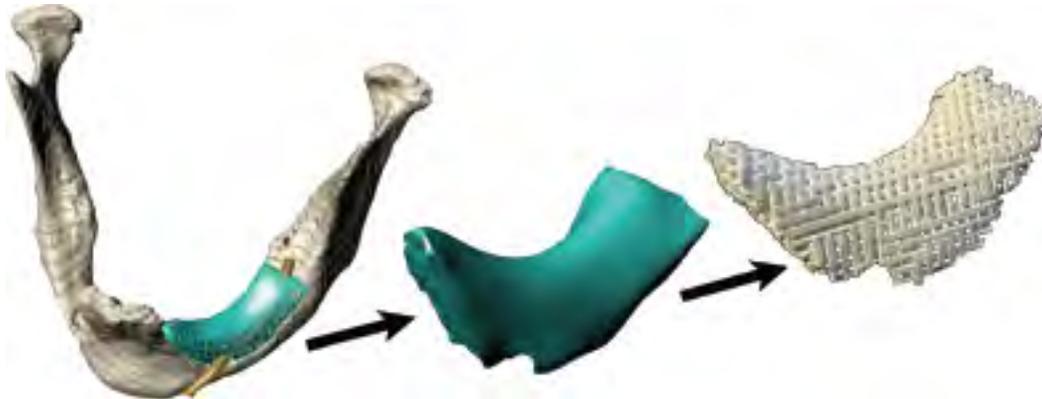


Figura 1. Implante óseo para hueso de la mandíbula de HAP que encaja en el sitio dañado del paciente [Bose, et al., 2013].

Los implantes óseos (Figura 1) han sido una necesidad a lo largo de la historia de la humanidad, para reparar, restaurar o regenerar el tejido dañado. La necesidad de restauración ósea incrementará, por el aumento en la expectativa de vida y la tendencia a ser usados en personas jóvenes, con uno de sus mayores retos en la interacción dentro del cuerpo durante periodos prolongados de tiempo [Cox *et al.*, 2015; Russias *et al.*, 2006]. Dentro de los sustitutos óseos existentes, los autoinjertos pudieran ser los adecuados en la reparación del hueso, debido a su histocompatibilidad y el riesgo bajo de transmisión de enfermedades; el hueso dañado es implantado por uno, de una zona sana, lo que conduce a riesgo de infección y hematoma, por lo que su disponibilidad es limitada, ya que requiere de dos procedimientos quirúrgicos. Los aloinjertos están disponibles, ya que se obtienen de otros donantes, presentan riesgo transmisión de enfermedades, y de infección y, rechazo. En este mismo tono están los xenoinjertos, que se recolecta de un individuo para su trasplante a otro de una especie diferente. Los tejidos sintéticos diseñados, a través de las tecnologías de formado libre (SFF por sus siglas en inglés) de materiales disponibles, biocompatibles y biodegradables, con las características biomecánicas necesarias, intentan trascender estas limitaciones en la regeneración ósea [Kim, 2006; Wang *et al.*, 2016; Qi *et al.*, 2018].

Los implantes óseos y sus características han evolucionado con su estudio a través del tiempo, en las primeras generaciones, desarrolladas en el siglo pasado, se requería que fueran inertes sin interacción con el ambiente. Lo que se consiguió, mediante el uso de metales, usados durante los últimos sesenta años, aunque con el paso del tiempo las propiedades mecánicas generaron daño en el hueso al que se fijó, provocando su descomposición, debido a la liberación de partículas metálicas tóxicas al medio. En los 1950s, la segunda generación de biomateriales desarrolló la biodegradabilidad y la bioactividad en la búsqueda de restaurar la estructura y su función en el tejido. Hace treinta años, los avances correspondientes a la tercera generación incluyen la necesidad de emular las características del tejido óseo por medio de sus propiedades físicas, químicas y biológicas, sin ser remplazado durante su vida útil [Sharma y Varghese, 2016; Dandy y Denno, 2011; Silberman y Varaona, 2011; Hubbell, 1995].

Las propiedades físicas incluyen las mecánicas estructurales, las cuales usan construcciones en tercera dimensión, los andamios, con funciones de morfología y porosidad similares al tejido a reemplazar. La estructura tridimensional permitirá la vascularización, lo que ayudará a que las células óseas comiencen a crecer para su sustitución futura. Las propiedades mecánicas para el hueso cortical humano que se buscan emular son (Tabla 1), módulo de Young de (10-20) GPa; una resistencia a la tensión de 135 MPa y una dureza alrededor de 150 MPa [Wang *et al.*, 2016; Russias *et al.*, 2007].

Tabla 1. Propiedades mecánicas del hueso [Russias, 2007; Wang et al., 2016; Mirzaali et al., 2015; Nejati et al., 2008; Pal S., 2014; Zhou et al., 2015].

Tipo	Módulo de Young (GPa)	Resistencia a la tensión (MPa)	Resistencia a la compresión (MPa)	Dureza (MPa)	Porosidad	
<i>Hueso cortical</i>	<i>Longitudinal</i>	3-30	135 ±15.6	89 - 140	358 - 548	3-5%
	<i>Transverso</i>	17.9 ±3.9	(v=0.4±0.16)	205 ±17.3		
		10.1 ±2.4	53 ±10.7	131 ±20.7		
			(v=0.62±0.26)			
<i>Hueso esponjoso</i>	3.3 ±0.4 - 19.08±1.78	92.5 ± 10.07 - 174 ± 1.2	2 - 21.63	153.59 ± 395 ±89 - 455 ±78	Mayor a 90%	

Las propiedades químicas buscan semejanza en estructura y composición, de tal forma que la interacción de degradación no sea dañina. En el caso del hueso cortical, que representa el

80 por ciento de los huesos, su composición requiere, en peso en seco, de un 70 % m/m de la parte inorgánica del hueso, formada por fosfatos de calcio, su relación Ca/P estará en función a la zona del cuerpo a reparar, con un 30 % m/m para la orgánica constituida por el colágeno [Vanketesan y Kim, 2014; Russias *et al.*, 2006].

La importancia de las propiedades biológicas radica en que, las velocidades de degradación y formación de las células del hueso sean semejantes para que, las propiedades del tejido permanezcan estables durante su uso [Sharma y Varghese, 2016].

2.1.1 Biomateriales

Los biomateriales son sustancias en condiciones de ser aceptados por el cuerpo para substituir una parte o función del mismo, de origen natural o sintético [Park *et al.*, 2007]. Éstos deben permanecer en contacto con el organismo sin deteriorarse o degradarse, funcionar como elementos para el reemplazo de una parte o función del cuerpo. Las características de su uso comprenden: la biocompatibilidad, como la propiedad de ser tolerado, y la biofuncionalidad, como la, de compensar la falta de un órgano [Biocompatible, 2012; Giannoudis, 2005].

El desarrollo de los biomateriales sintéticos inertes sin interacción con el ambiente, se inició con los metales como el acero inoxidable, titanio o aleaciones cobalto-cromo, y algunos cerámicos como la alúmina o zirconia. Con el paso del tiempo y, en el caso específico de los implantes óseos, los metales reaccionaron dentro del cuerpo degradándose e intoxicando al organismo. Debido a que son inertes, aunque más fuertes y rígidos que el hueso, se limitó su osteointegración, con la consecuencia de una fijación débil que, en conjunto con la incompatibilidad mecánica entre el metal y el hueso, resultó en el daño al tejido sano, la reabsorción del hueso y el desprendimiento del implante [Vanketesan y Kim, 2014; Russias *et al.*, 2006].

Derivado de los resultados de los biometales se cambió la perspectiva hacia materiales bioactivos, es decir, que reaccionaran químicamente dentro del cuerpo, sin causar daño. Por lo que se buscó la degradación y substitución controlada, con el consiguiente uso de materiales biodegradables o bioresorbibles. Para estos nuevos biomateriales, se requirió de materiales

poliméricos, cerámicos o compuestos.



Figura 2. Andamio reabsorbible para ingeniería de tejidos de polipropileno fumarato (PPF) [Childers et al., 2015].

Polímeros

Los materiales poliméricos cuentan con propiedades mecánicas y de degradación que les permiten ser usados tanto en el suministro de medicamentos como en la sustitución o reparación de tejidos (Figura 2). Dentro de sus propiedades mecánicas (Tabla 2) destaca su resistencia a la flexión y tensión, y su capacidad de adaptarse a diferentes tejidos blandos y duros. Las propiedades de degradación favorecen su uso extendido en el reemplazo de tejidos, administración de fármacos y en la combinación de ambos [Park et al., 2016]. En la administración de fármacos se introducen no sólo antibióticos sino agentes que favorecen el crecimiento de las células [Qazi, 2015].

Tabla 2. Propiedades mecánicas, de temperatura y peso molecular de biopolímeros [Bronzino, 1995; MatWep; Selvakumar et al., 2015].

Biopolímero	Módulo de Young (GPa)	Resistencia a la tensión (MPa)	Tg (°C)	Tm (°C)	Temperatura máxima de servicio (°C)	Mw (g/mol)
PLA	0.085 – 13.8	14 - 114	45 -120	90 - 175	60 – 240	
TPU	0.0002	13		146 - 154		41,000
Colágeno	1.00	50 – 100				

Los biopolímeros biodegradables son el colágeno, gelatina y, el ácido poliláctico (PLA), entre otros; dentro de los no biodegradables como el polietileno (PE), polietileno tereftalato (PET) y polimetil metacrilato (PMMA), por mencionar algunos. A pesar de que éstos son materiales biocompatibles, no desarrollan propiedades similares al hueso para su auto reparación, adaptación a los cambios fisiológicos, reabsorción con el tiempo o, uso en aplicaciones de soporte

de carga [Shiraishi et al., 2010; Russias et al., 2006].

Cerámicos

Los biocerámicos en comparación con los metales y polímeros son difíciles de procesar, porque no es fácil verterlos o maquinarlos, son consolidados desde polvos por sinterización o depositados en películas delgadas. La porosidad y la falta de homogeneidad en el procesamiento de piezas son defectos que se introducen, inician las grietas y no resisten la fractura, por lo que son quebradizos. Lo que ha limitado el aprovechamiento de sus propiedades de biocompatibilidad (Figura 3),



Figura 3. Marco para dientes sintéticos formados por Zirconia [Almeraikhi et al., 2017].

resistencia térmica, química, ambiental y mecánica (Tabla 3). Los biocerámicos dentro del cuerpo son bioinertes, no reaccionan con el medio; bioactivos, se enlazan con el tejido vivo y, reabsorbibles, al metabolizar hasta su desaparición. Gracias a su biocompatibilidad proporcionan la promoción de funciones celulares y osteoconducción [Eckel et al., 2016; Wang, 2003; Kruse et al., 2011; Teoh, 2000].

Tabla 3. Propiedades mecánicas y tamaño de partícula para la HAP y el β -TCP [Mohandes y Salvati-Niasari, 2014; Zhou et al., 2015; Šupová, 2015; Prakasam et al., 2015; Ramay et al., 2004; Johnson y Herschler, 2011].

Biocerámicos	Módulo de Young (GPa)	Resistencia a la tensión (MPa)	Resistencia a la compresión (MPa)	Dureza (MPa)	Tamaño de partícula (nm)
HAP	14.2 ± 3.4	38-250	172 ± 28	5,200 – 7,000	11-1540
			120-900	3,000-7,000	
β -TCP	8.9 – 13.5		20 – 140		1.04-3.7
			9.8 ± 0.3		

Los cerámicos conforman el componente principal inorgánico del hueso y los dientes. La hi-

droxiapatita (HAP) y el fosfato tricálcico (TCP) son los fosfatos de calcio de uso más extendido para aplicaciones de regeneración ósea por sus propiedades de osteoconducción para el crecimiento del hueso [Kim *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007].

Materiales compuestos

Los materiales compuestos se forman, por la combinación entre dos o más materiales, con el fin de mejorar sus propiedades, ya sean, tanto mecánicas como estructurales otorgadas por cada parte del material compuesto (Tabla 4). El hueso, al ser un compuesto orgánico-inorgánico, requiere de materiales híbridos que logren combinar la fuerza y rigidez que proporciona el componente inorgánico con la flexibilidad y tenacidad del componente orgánico [Sharma y Varghese, 2016].

Tabla 4. Propiedades mecánicas y porosidad de biomateriales compuestos [Wei et al., 2015; Guo et al., 2015; Selvakumar et al., 2015]

Biomaterial compuesto	Módulo de Young (GPa)	Resistencia a la tensión (MPa)	Resistencia a la compresión (MPa)	Dureza (MPa)	Tamaño de poro (µm)
SS/n-HAP por SLM	151.1 ±4.48 – 225.7 ±3.73	130.9 ±6.36 – 606.4 ±6.27		2,110±90 – 2,520 ±80	300-400
HAP/chitosan	0.17 ±0.02	3.12 ±0.12	9.41 ±1.63		30-80
TPU/n-HAP	0.0002-0.0009	15.7 – 23.4			
HAP/PLA		17.4 – 38.3	0.44 – 8.67	40	

En el reemplazo óseo el material compuesto se diseña, a partir de la combinación adecuada, por su semejanza mecánica, de composición y estructura al tejido a sustituir. Los componentes cerámicos más utilizados han sido la HAP y los biovidrios, a partir de un refuerzo cerámico; mientras que dentro de los poliméricos se han usado el colágeno entrecruzado, polimetilmetacrilato (PMMA), ácido poliláctico (PLA), policaprolactona (PCL), entre otros [Venkatesan y Kim, 2014; Mathieu, 2006].

2.2 LOS FOSFATOS DE CALCIO

Los biocerámicos del tipo de los fosfatos destacan por sus propiedades fisicoquímicas semejantes al hueso, así como por su porosidad que, sirve para la fijación por relleno de las cavidades [Wang, 2003; Kruse et al., 2011; Dorozhkin, 2007]. La relación molar que, guardan sus iones Ca/P, permite una variedad de compuestos en aplicaciones biomédicas, tanto en la sustitución, reparación y aglutinante en la unión de las piezas óseas (Anexo 1, Tabla 1 [León et al., 2009]). La HAP y el beta fosfato tricálcico (β -TCP), por su semejanza a la whitlockita, son los más utilizados en el diseño de tejido óseo, debido a su similitud química y estructural [Surmenev et al., 2014].

La hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HAP, forma el 70 % m/m de la composición del hueso en peso seco, es el cerámico más bioactivo aplicado en el campo biomédico, debido a sus propiedades de: osteoinducción, en la generación de hueso nuevo; biocompatibilidad, por su similitud con los tejidos; estabilidad química; actividad biológica y superficial; sin efectos nocivos ni secundarios con el cuerpo humano [Zhao et al., 2016; Sachlos y Czernuszka, 2003; Kim et al., 2006; Zhou, 2011]. Estas propiedades relacionadas con su tamaño de partícula, ha trasladado a la HAP al campo de la nanotecnología, con el mejoramiento de su energía superficial, solubilidad y actividad biológica. De tal forma, que las nanopartículas de HAP muestran actividad antitumoral inhibiendo el crecimiento de células cancerosas, al combinarse con fármacos anticancerígenos, ácidos nucleicos y proteínas. Estas partículas se consideran vectores genéticos, en donde se cargan, concentran y protegen genes; por su estabilidad biológica y su facilidad de preparación y modificación, aunque son requeridos más estudios [Venkatesan y Kim, 2014; Zhao et al., 2016]. En las aplicaciones tradicionales, las nanopartículas de HAP contribuyen con el mejoramiento para los implantes en hueso y dientes, el sistema de transporte de fármacos y en la química bioanalítica. Aunado con su consumo creciente en la reparación del hueso fracturado o sustitución del faltante [Sadat-Shojai et al., 2013; Sachlos y Czernuszka, 2003; Nayak, 2010; Rogel et al., 2008; Gopi et al., 2016].

La whitlockita (WH), $\text{Ca}_3\text{Mg}(\text{PO}_3\text{OH})(\text{PO}_4)_6$, es la fase menor en el hueso humano con un 20 % m/m, se encuentra en cantidad mayor en el hueso joven, relacionado con la influencia en el desarrollo óseo. El fosfato tricálcico, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, TCP, es un fosfato de calcio que funciona como el análogo sintético de la WH por ofrecer propiedades semejantes a ésta como su estructura, ser reabsorbible y estar asociado al hueso joven, este compuesto también favorece la osteoinducción [Snu R&DB Foundation, 2015].

2.2.1 Métodos de síntesis de la hidroxiapatita (HAP)

La síntesis de HAP ha sido investigada para su uso como implante óseo, se ha obtenido a partir de tejido animal y síntesis química. Del tejido animal se ha usado el hueso del bovino o porcino, la estructura mineral del coral y la cáscara del huevo; con la ventaja principal en la manutención de los iones encontrados en el hueso como son el magnesio y sodio [Welsch y Sobatta, 2008]. La síntesis química de la HAP se ha realizado por los métodos de estado sólido, coprecipitación, sol-gel y mecanoquímica, entre otros, lo que permite el control de su tamaño de partícula, porosidad y pureza. Dentro de estos métodos, los de química húmeda de sol-gel y coprecipitación son los más empleados, por su sencillez en la preparación y por el desarrollo de partículas de tamaño nanométrico (Anexo 1, tabla 2). En ambos métodos, es necesario controlar la relación molar Ca/P, el pH, la temperatura y el tiempo [Bezzi *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2005]. En el proceso sol-gel se requiere además, el control del gel polimérico, con la observación de la relación molar agua/alcóxido; la velocidad relativa de la hidrólisis y, su condensación final [Venkatesan y Kim, 2014; Sadat-Shojai *et al.*, 2013; Tahriri, 2008; Mobasherpour, 2007; Pramanik, 2007; Fathi, 2007; Wang, 2010; Nayak, 2010; Sequeda *et al.*, 2012].

2.3 ÁCIDO POLILÁCTICO (PLA)

El PLA es un poliéster biodegradable derivado de fuentes renovables, ha sido usado en implantes y diseños médicos, dado que se degrada con el tiempo, por lo que la etapa de remoción no es requerida. No tiene efectos tóxicos en el cuerpo humano, ya que se produce ácido láctico, de forma natural. El PLA se usa en aplicaciones biomédicas como suturas, tornillos y en la fijación de fracturas y andamios para reconstrucción de tejidos [Castro-Aguirre *et al.*, 2016].

Su uso extendido se debe al control en sus propiedades mecánicas (Tabla 5), de degradación y de bioactividad. Dentro de las propiedades mecánicas, su fuerza de flexión les permiten funcionar en aplicaciones óseas; la compresión y su módulo elástico se mejoran al incrementar su grado de polimerización. En las de degradación permiten su descomposición en metabolitos no tóxicos, aunque la acumulación del ácido láctico (AL) llega a producir inflamación; no obstante, es difícil controlar la velocidad de hidrólisis, por su hidrofiliidad baja. El ajuste de estas propiedades se realiza, cuando el PLA se usa en combinación con otras sustancias como

otros polímeros, proteínas, fibras de carbón y la hidroxiapatita, lo que mejora sus funciones en la estabilización de fracturas, fijación de tendones y ligamentos, y sus propiedades mecánicas [Castro-Aguirre, 2016; Po-Liang *et al.*, 2007].

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas del ácido poliláctico [Bronzino, 1995; Wypych, 2012].

PLA		
Propiedad		Unidades
Peso molecular número promedio (M_n)	74,000- 660,000	mol
Peso molecular masa promedio (M_w)	80,000-380,000	mol
Módulo de Young	0.085 – 13.8	GPa
Resistencia a la tensión	14 - 114	MPa
Alargamiento a la rotura	4	%
Dureza	95	D
Densidad a 20 °C	1.21-1.29	g/cm ³
Temperatura transición vítrea (T_g)	55-75	°C
Temperatura de fundición (T_m)	164-178; 180-184 (L-PLA)	°C
Temperatura de descomposición	>200	°C
Coefficiente de expansión termal	41×10^{-6}	m/mK
Biodegradación	Degradación completa en 4.8 años a 25 °C	

2.4 INCORPORACIÓN DE LA HAP EN PLA

En la unión entre la HAP, la cual es hidrofílica y el PLA, hidrofóbico, en la conformación del material compuesto, es necesaria una interfase. Para esto se ha propuesto la adición de un surfactante, un copolímero o la encapsulación de la HAP en la matriz polimérica de PLA por el método de emulsión agua-aceite-agua (w-o-w), los métodos se describen a continuación.

- En el método del surfactante para la incorporación de HAP en PLA, ambas fases se dispersan, por medio de ácido 12 hidroxistearico (HSA) disuelta en cloroformo o diclorometano a temperatura ambiente, con agitación vigorosa y constante para obtener una suspensión homogénea de partículas de HAP, suspendidas en la matriz de PLA. Finalmente el disolvente se elimina por evaporación [Kim, 2006].

- El método de la encapsulación de HAP en microesferas de PLA, por medio de PVA se realiza disolviendo PVA en agua a 70 °C, y el PLA en diclorometano. Para la formación de las microesferas, el polvo de HAP se dispersa en la disolución de PLA, con agitación constante; la cual se vierte, por goteo, en la disolución de PVA. En el proceso final, la agitación se aumenta y prolonga hasta la eliminación del diclorometano y el endurecimiento del conformado [Mathieu, 2006; Po-Liang *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2006; Russias *et al.* 2006; Qi *et al.*, 2000; Ushida *et al.*, 1997; Ravosky *et al.*, 2013].

2.5 CONFORMADO DEL MATERIAL COMPUESTO

El remodelado óseo es un proceso de reestructuración del hueso existente, en formación y reabsorción constantes. Requiere estructuras tridimensionales para permitir el crecimiento de las células óseas. Es por eso, que en su sustitución son necesarias estructuras, con la forma del tejido a remplazar. De tal forma que, los andamios son estructuras en donde las células se sostienen, proliferan y crecen [Wang *et al.*, 2016].

La arquitectura del poro del andamio provee la geometría, tamaño, interconectividad, orientación y ramificaciones, en el desarrollo del crecimiento y funcionamiento de las células, porque maximiza la difusión de los nutrientes y el flujo de líquido tisular y de la sangre, en la regeneración del tejido [Yoshikawa, 2009].

Las características de la forma del andamio no son triviales en su obtención por los métodos de conformado, dentro de los que se encuentran los de esponja, el micro-fresado o el electrohilado. Éstos permiten el control del tamaño de poro, aunque dejan de lado su arquitectura [Taboas, 2002]. El control sobre la arquitectura del andamio, su porosidad y geometría se está desarrollando, con los métodos de sólidos de forma libre (SFF), con base en la manufactura aditiva (MA). Cabe mencionar que, los métodos de conformado se usan en conjunto, esto es, por medio de la MA se forma la geometría rectora y, la estructura de sostén, para su posterior recubrimiento con el electrohilado [Fierz *et al.*, 2008; Seitz *et al.*, 2005; Gbureck *et al.*, 2007].

2.5.1 manufactura aditiva (MA)

El prototipado rápido por medio de MA es una técnica versátil de construcción de adición de material que permite la fabricación de estructuras 3D capa por capa (Figura 4), con geome-

trías y arquitectura definidas y complicadas, permite su reproducibilidad, con el uso de una gran variedad de materiales (Figura 5). En el control detallado de la morfología del andamio, la MA aplica las tecnologías computacionales, junto con la tomografía computarizada (CT) se diseña la forma del andamio que el paciente precisa. Por lo que se considera un proceso de construcción directo que elimina la necesidad de realizar moldes y pasos posteriores del procesamiento ahorrando tiempo [Lee *et al.*, 2004].

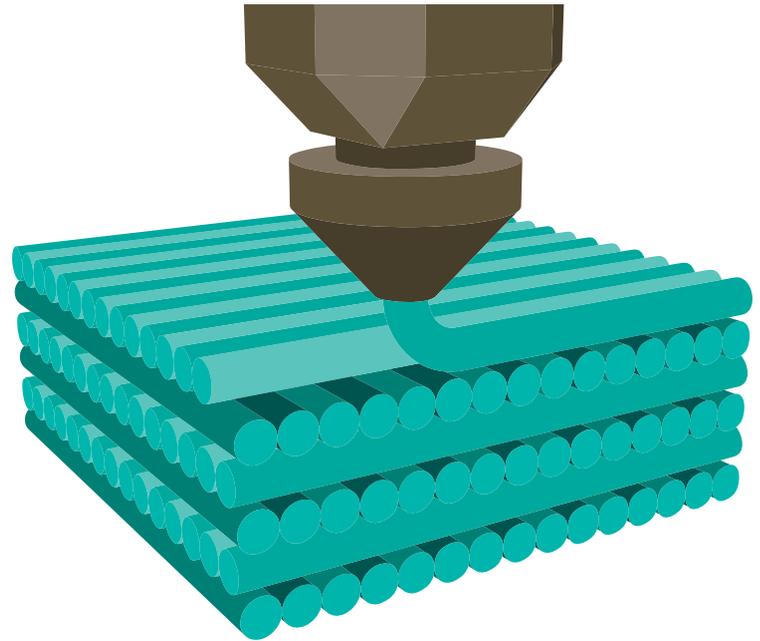


Figura 4. Principio de funcionamiento de la manufactura aditiva (AM) [Andreas, 2016].

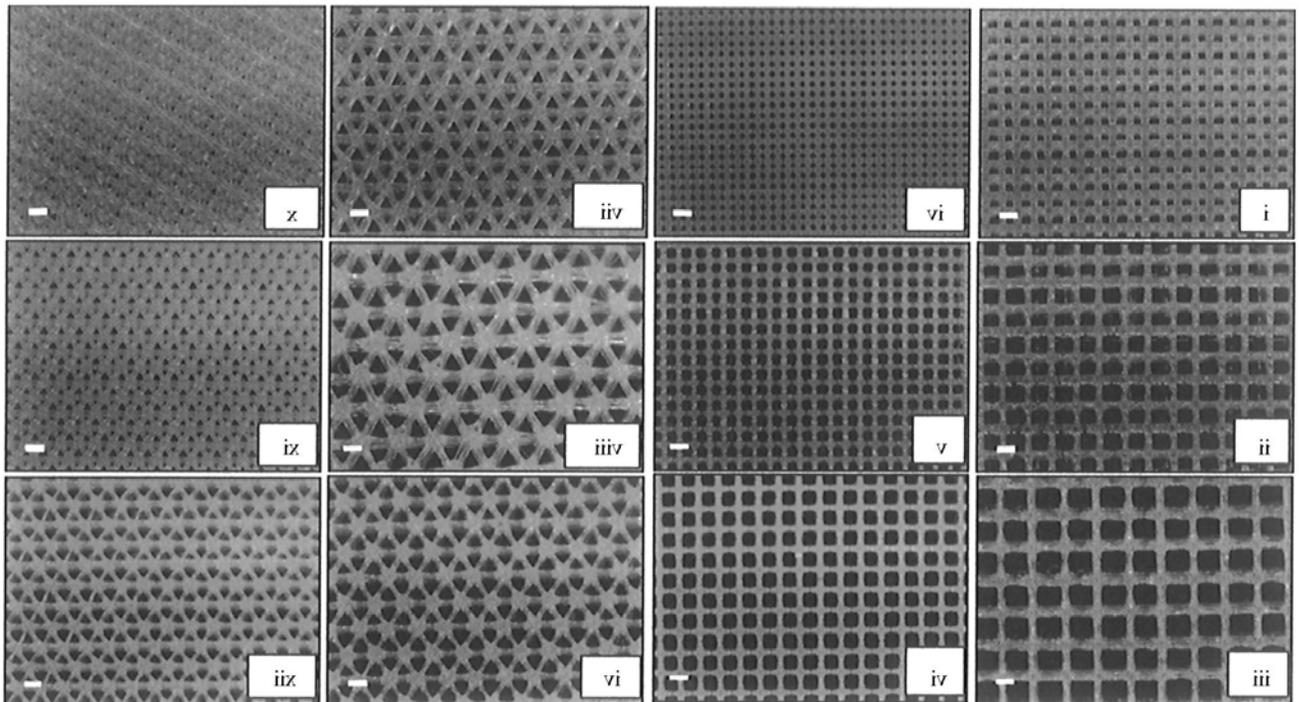


Figura 5. Geometrías complejas y precisas posibles por AM para varios sistemas de porosidad [Hutmacher, 2006]

Algunas de las desventajas de la MA es su forma de construcción (Figura 6), en una dirección, con el consecuente comportamiento anisotrópico y, durante la impresión por capas, si el espacio entre las líneas o la orientación de la pieza no son las correctas, se afectarán sus propiedades mecánicas.

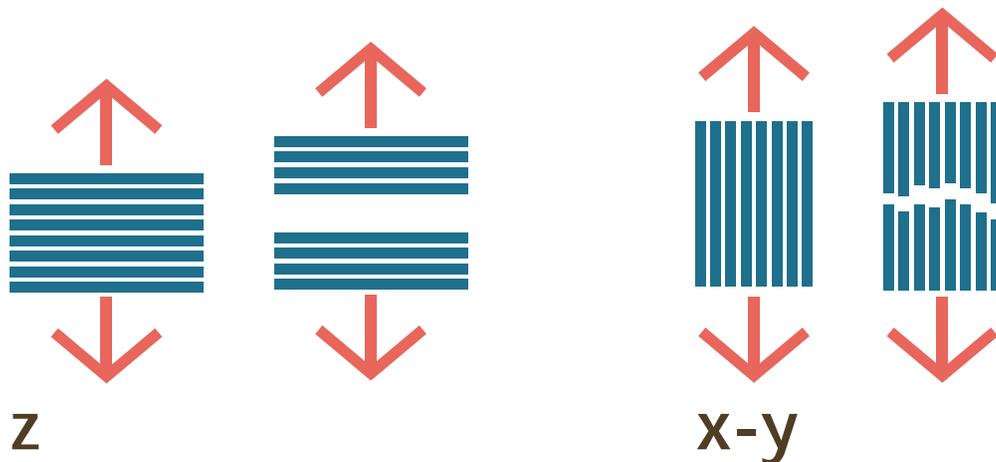


Figura 6. Orientación de la construcción como generador del comportamiento anisotrópico [Adaptación: Lasprilla, 2014].

Las técnicas de la MA para la construcción de andamios óseos (detallados en el Anexo 1, tabla 3), no son únicos o superiores al resto, ayudan a producir materiales con las propiedades requeridas del usuario. En el proceso de fabricación de andamios para el tejido óseo, a partir del material compuesto de HAP-PLA, destacan la técnica de robocasting (DIW, por sus siglas en inglés), con la aplicación de biotintas y, la de deposición de material fundido (FDM, por sus siglas en inglés), por ser la más accesible.

La combinación del material compuesto HAP-PLA y la técnica de conformado de MA posibilitan la construcción de andamios tridimensionales para el remplazo óseo, con características geométricas y fisicoquímicas diferenciadas; con morfología similar al tejido, una porosidad al 75% y tamaño de poro de 200-400 μm [Almeida, 2014; Mathieu, 2006].

3. OBJETIVOS

3.1 GENERAL

Sintetizar, conformar y caracterizar un biomaterial de HAP y PLA para el diseño de andamios por impresión 3D, en aplicación de la reparación ósea.

3.2 ESPECÍFICOS

- o Sintetizar un biocerámico de hidroxiapatita, por el método de coprecipitación.
- o Conformar un biomaterial de HAP, por medio de su incorporación en PLA para su impresión 3D.
- o Diseño del material compuesto de HAP-PLA por impresión 3D, por el método de deposición de material fundido para su uso en la reparación ósea.
- o Caracterización de la HAP, del biomaterial HAP-PLA y, del andamio 3D, por medio de difracción de rayos X, espectroscopía de absorción infrarroja y, microscopías: óptica y electrónica de barrido.

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

La obtención de andamios por MA (Figura 7) se dividió en seis etapas: la síntesis de la hidroxiapatita (HAP), la obtención del material compuesto (HAP-PLA), el conformado del material compuesto (HAP-PLA), el modelado tridimensional del andamio por impresión 3D y; las pruebas mecánicas y de degradación in vitro.

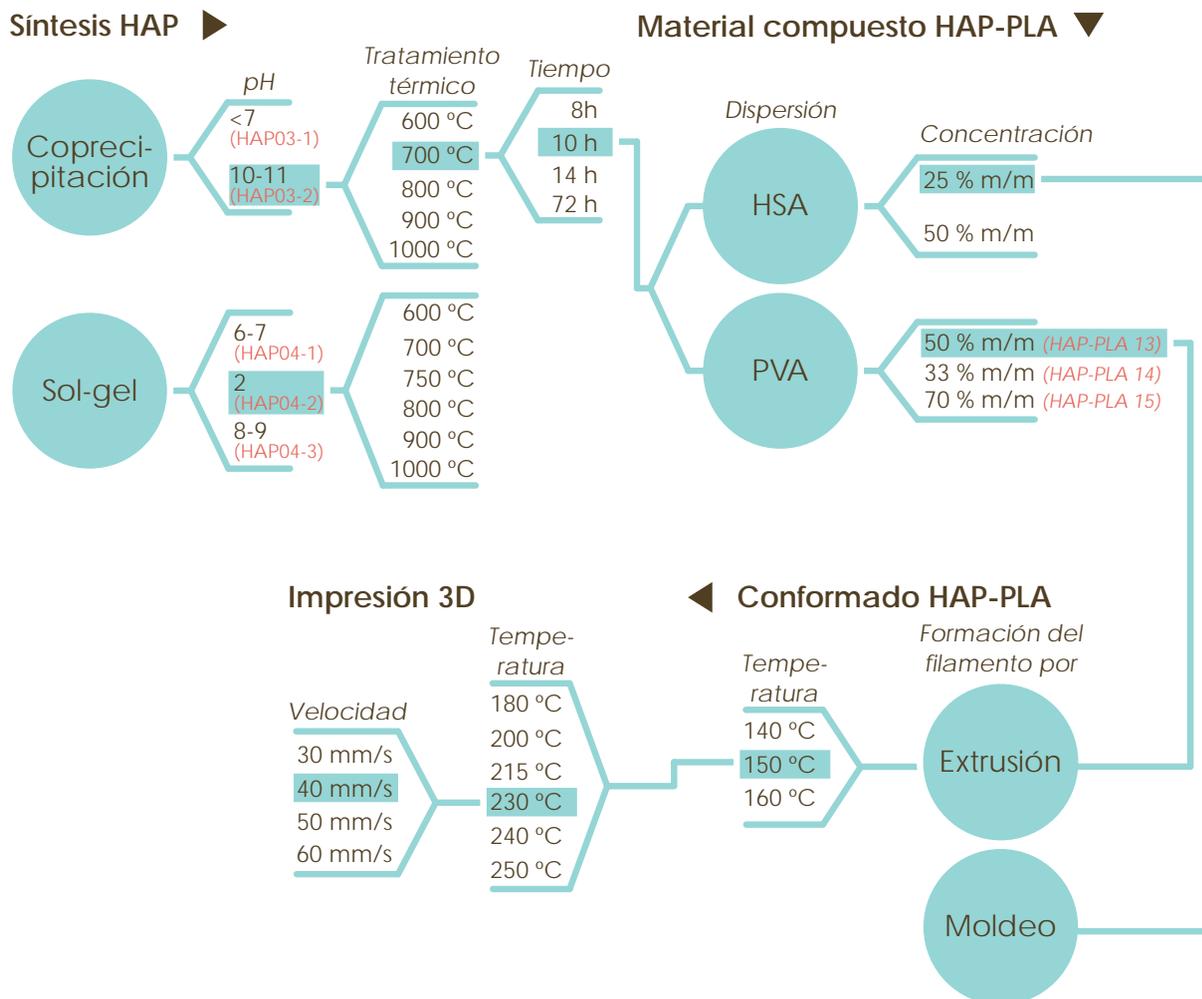


Figura 7. Diagrama del desarrollo experimental hasta la impresión del andamio con nombre (clave) de los materiales.

4.1 REACTIVOS

Nitrato de calcio tetrahidratado [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$], pentóxido de fósforo (P_2O_5), fosfato diamónico ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), hidróxido de amonio (NH_4OH), (J.T. Baker, 99% pureza, Q.P.). Ácido 12 hidroxisteárico (HSA) (Charlotte Chemical Internacional, 88% pureza). Ácido poliláctico (PLA) [$\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$]_n (Biomaterial Aldrich); alcohol polivinílico (PVA) [$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$]_n (Aldrich, M=89,000-98,000, 99+% hidrolizado R.A.); cloroformo (CHCl_3) (ALVI, 99% pureza, Q.P.); diclorometano (CH_2Cl_2) (ALVI, 99% pureza, Q.P.); alcohol etílico absoluto, etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) (Merck, 99.8% pureza); agua destilada.

4.2 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

Los precursores y los productos se caracterizaron de la manera siguiente:

4.2.1 Difracción de rayos X (DRX). La identificación de las fases se realizó, por difracción de rayos X de polvos, en un difractómetro Siemens D500 (Laboratorio del Dr. David Díaz, Fac. Química, UNAM) y Advance Davinvi D8 (USAII-UNAM) con radiación de Cu K α 1 filtrada con Ni de 1.5406 Å y 1.54184 Å, respectivamente; constante de tiempo de 0.5 s, velocidad de paso angular de 0.02°/ min desde 10° a 65° de 2 θ .

La ecuación de Scherrer se usó para determinar el tamaño de partícula, por medio de la relación siguiente.

$$\tau = K\lambda/\beta\cos\theta$$

Dónde τ es el tamaño de partícula, K es la constante 0.89, λ corresponde a la longitud de onda de los rayos X usados, β es el ancho medio del pico 2 θ de la señal más alta en radianes, y θ es el ángulo de la señal más alta en grados. En el caso de la HAP, la medición se realizó para las reflexiones (002) y (300).

4.2.2 Espectroscopía de absorción infrarroja (IR). Los modos de vibración, de los grupos funcionales, de los precursores, los productos y el seguimiento de la degradación del material compuesto, se analizaron por espectroscopia de absorción infrarroja atenuada, en un equipo Perkin-Elmer FIR Spectrum 400 (USAII-UNAM) y UATR Two (Laboratorio de Química Inorgánica 1C, Fac. Química, UNAM), en el intervalo del infrarrojo medio de (4000-500) cm^{-1} .

4.2.3 Microscopía electrónica de barrido (MEB). La morfología microestructural y la composición química se obtuvo por microscopía electrónica de barrido en un JEOL JSM-5900-LV ESEM (USAI-UNAM), con microanálisis (EDS) Oxford ISIS. Las muestras se mantuvieron sin humedad.

4.2.4 Microscopía óptica (MO). La visualización de la microestructura del material compuesto y de los andamios de la HAP-PLA se realizó en el microscopio óptico OLYMPUS sz-CTV ocular 10x (Laboratorio de Química Inorgánica 1C, Fac. Química, UNAM) y un Carl Zeiss 2x (Laboratorio de Cerámicos, Fac. Química, UNAM).

4.2.5 Pruebas mecánicas. La evaluación del rendimiento mecánico, de compresión y tensión, se realizó por triplicado en las probetas impresas en 3D por el método FDM. (Las fórmulas utilizadas se detallan en el Anexo 1.2).

Para la resistencia a la compresión se usó una máquina de pruebas mecánicas Humboldt HM-280 (Laboratorio de Cerámicos, Fac. Química, UNAM), con una velocidad de cruceta de 0.2 mm/min y velocidad de deformación de $1.66 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Las mediciones se realizaron en probetas cilíndricas de 10 mm de diámetro por 20 mm de altura, de acuerdo a la norma ASTM D5024-95, con un arreglo interior en forma de rejilla para simular la porosidad del andamio. Los especímenes se fallaron, para muestras isotrópicas, de forma uniaxial, paralela a la dirección impresión.

La prueba de tensión usó una máquina de pruebas Instron 5500R (Laboratorio de Pruebas Mecánicas, IIM, UNAM), con una velocidad de cruceta de 10 mm/min (velocidad de deformación de $5.55 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) se realizó en probetas de [$\sim 1 \times 7 \times 30$] mm, de acuerdo con la norma ASTM D638.

4.2.6 Dureza. El material compuesto de HAP-PLA impreso por FDM se sometió al ensayo de microdureza para medir su resistencia al ser penetrado, por medio de la prueba Vickers en un Shimadzu HMV-G (Laboratorio de Pruebas Mecánicas, IIM, UNAM), 25 g/ 20 s (245.2 mN), en un disco pulido de 20 mm de diámetro y 1 mm de altura, con 6 indentaciones. (Las fórmulas utilizadas se detallan en el Anexo 1.2).

4.2.7 Pruebas *in vitro*. La capacidad de degradación, del andamio del material compuesto de HAP-PLA, se probaron *in vitro*; por medio de su inmersión en 30 mL de fluido humano simulado (SBF) a 37 °C por 2, 4 y 6 semanas, cantidad de las sales en Anexo 1 tabla 4.

4.3 SÍNTESIS DE LA HIDROXIAPATITA (HAP)

La síntesis de HAP se realizó por sol-gel y coprecipitación para obtener un tamaño de partícula <math><50\text{ nm}</math>, sin fases secundarias. En este trabajo, se obtuvieron estas características, por el método de coprecipitación. En la determinación de las condiciones de síntesis se cambiaron las concentraciones, por medio de distintos reactivos, tiempos y temperaturas de reacción, reposo, secado, cristalización. El seguimiento de las reacciones se hizo por el análisis de DRX y FTIR (Síntesis de HAP por método sol-gel en el Anexo 2.1).

4.3.1 Síntesis de HAP por coprecipitación.

La síntesis de 5 g HAP se realizó, a partir de una disolución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a 0.33 M (23.5 g en 900 mL de agua), que se vertió por goteo en la de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ a 0.12 M (7.9 g en 1500 mL de agua), con agitación vigorosa a temperatura ambiente, y control del pH (desde 7 a 11)

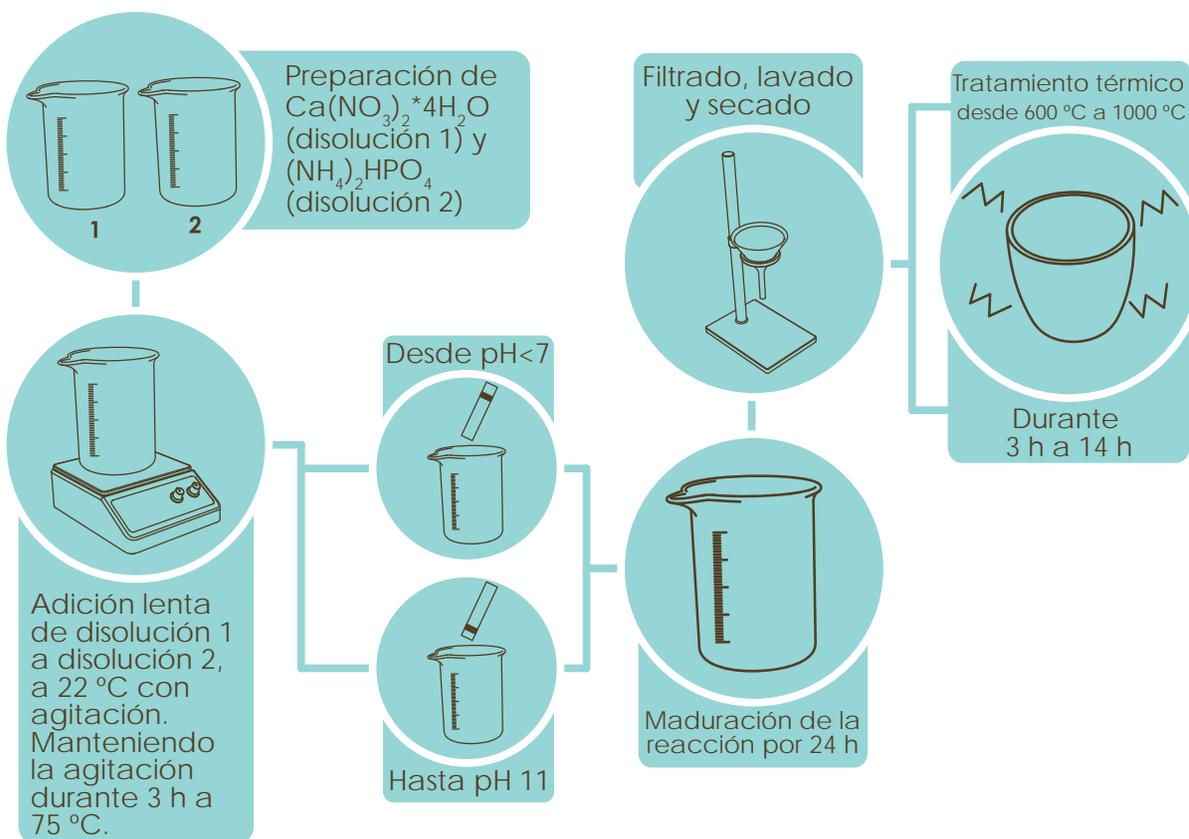


Figura 8. Síntesis de nano-hidroxiapatita, n-HAP.

por medio del NH_4OH ; la agitación se mantuvo durante 40 min a $75\text{ }^\circ\text{C}$, hasta su precipitación, con un tiempo de reposo desde 24 h a 72 h. El sólido se separó por filtración, se lavó con agua destilada hasta la eliminación de los residuos de amonio y se secó a $80\text{ }^\circ\text{C}$, desde 24 h a 72 h. Para la cristalización se probaron las temperaturas de (600, 700, 800, 900 y 1000) $^\circ\text{C}$, y tiempos de cristalización desde 2 h hasta 72 h (Figura 8).

La reacción química se planteó por medio de la ecuación siguiente:



4.4 OBTENCIÓN DEL MATERIAL COMPUESTO HIDROXIAPATITA - ÁCIDO POLILÁCTICO (HAP-PLA)

La incorporación del material compuesto HAP-PLA requirió la promoción de la unión inorgánica con la orgánica, las condiciones y los reactivos se obtuvieron por medio de la dispersión de la HAP y la disolución del PLA en cloroformo, diclorometano y la mezcla de ambos. Para tener una suspensión de ambos materiales se probaron los surfactantes de HSA y PVA. En este trabajo se realizó, con diclorometano y PVA (En el Anexo 2.2 se detalla el conformado del material compuesto HAP-PLA por el método de dispersión con HSA).

4.4.1 Material compuesto HAP-PLA, por el método de dispersión con PVA

La HAP se encapsuló en microesferas de PLA, por medio del PVA, a partir de dos disoluciones, la del PVA en agua (0.5 p/V) a $(70 \pm 5)\text{ }^\circ\text{C}$ en agua y, la de PLA en diclorometano (1 p/V). La HAP, en un contenido desde 33 % m/m hasta 70 % m/m, se agregó a la disolución de PLA con agitación continua. Esta dispersión se agregó por goteo a la disolución de PVA, con agitación constante a $(70 \pm 5)\text{ }^\circ\text{C}$, en un lapso de 30 min; terminada la adición, las condiciones se conservaron, la agitación se aumentó hasta la evaporación del diclorometano, alrededor de 2 h, con un reposo posterior hasta de 14 h. Finalmente, el conformado se separó por filtración al vacío, se lavó con agua hasta la eliminación del PVA y, se secó a temperatura ambiente, durante 24 h (Figura 9).

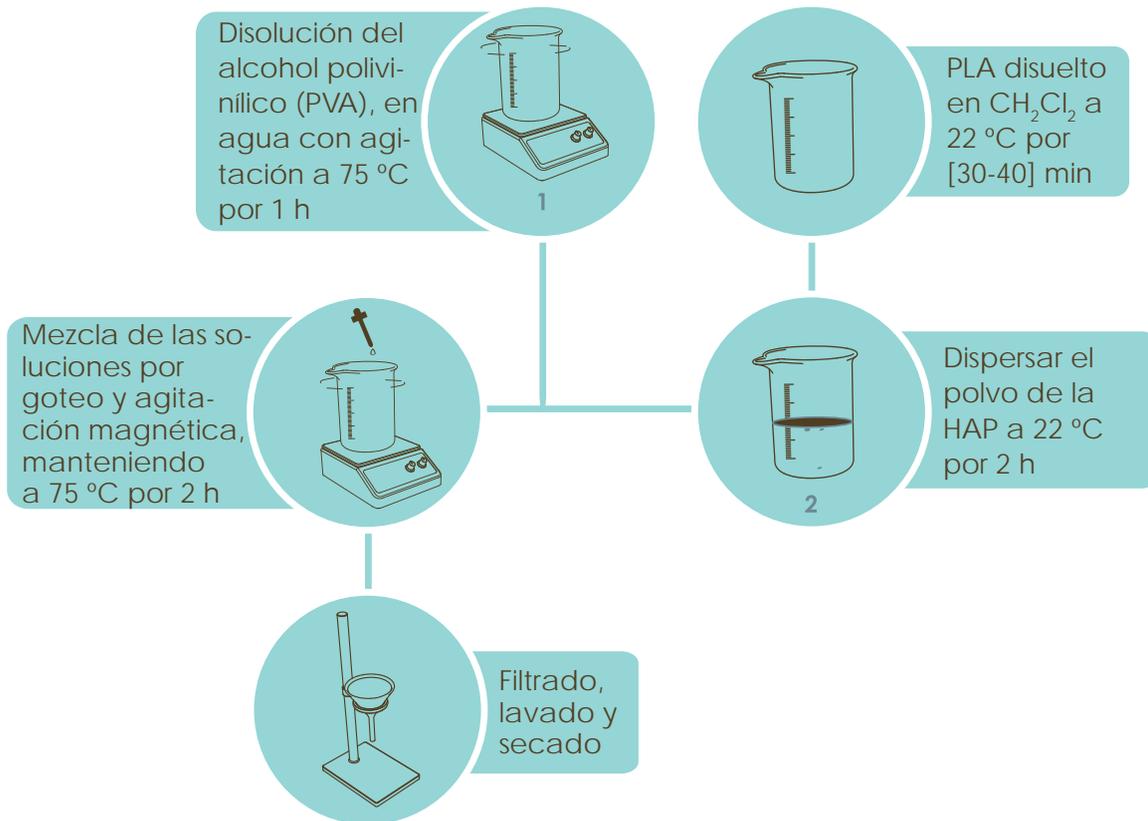


Figura 9. Representación esquemática del método para la dispersión de la HAP en el PLA por medio de PVA.

4.5 CONFORMADO DEL FILAMENTO DEL MATERIAL COMPUESTO HAP-PLA

El material compuesto HAP-PLA fue conformado para su uso, en forma de filamento, por el método en molde (Anexo 2.3) y el de extrusión.

4.5.1 Conformado por extrusión

El material compuesto HAP-PLA fue moldeado por extrusión para su uso en la máquina de FDM. El material compuesto se recortó en fragmentos de 5 mm para su formado mediante presión y temperatura, con salida a un dado circular de 1.75 mm de diámetro. La temperatura usada fue por encima de la transición vítrea del compuesto, probando entre (140 a 160) °C (Figura 10).

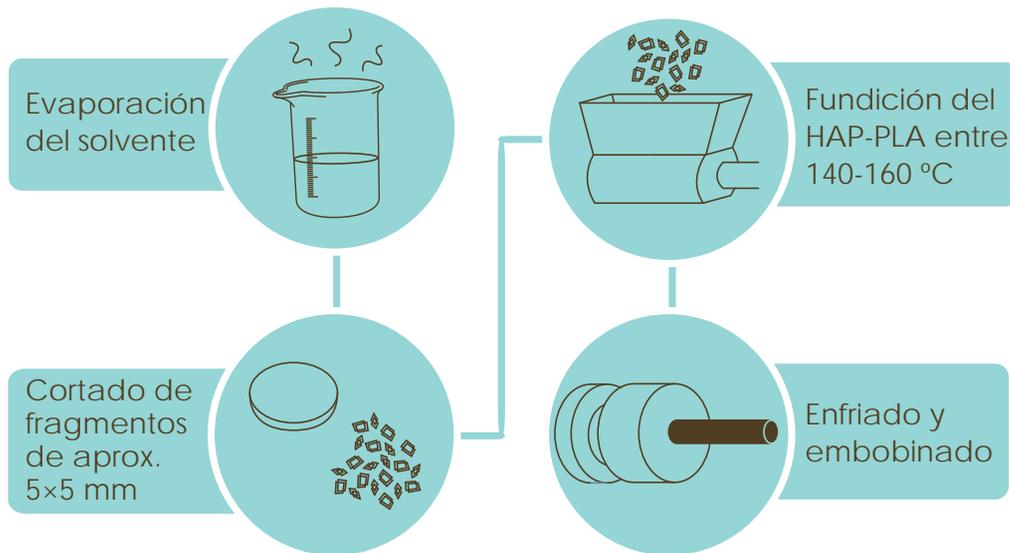


Figura 10. Esquema del conformado para el material compuesto HAP-PLA, por medio del método de extrusión del HAP-PLA con PVA.

4.6 MODELADO TRIDIMENSIONAL DEL MATERIAL COMPUESTO HAP-PLA

El modelado para la impresión 3D, de pruebas mecánicas y para el implante óseo, se realizó, con el programa tridimensional Rhinoceros 5.

La construcción del andamio de arquitectura controlada por MA, impresión 3D, para las pruebas mecánicas de compresión, tensión y microdureza; se realizó, con el filamento del material compuesto de HAP-PLA, por medio de la deposición en capas (FDM). Se usó la impresora 3D Flashforge Creator-Pro (Laboratorio de Cerámicos, Fac. Química, UNAM), con capacidad de construcción de (227 × 148 × 150) mm, resolución de capa de (100 ~500) μm , precisión en XY: 11 μm y en Z: 2.5 μm , diámetro del filamento de 1.75 mm, y diámetro del cabezal de 0.4 mm. La construcción del andamio 3D se realizó con los filamentos, del material compuesto HAP-PLA obtenido con el HSA ((25-50) % m/m HAP) (Anexo 3.4), y con el PVA ((50-70) % m/m HAP). La variación en la temperatura fue desde los 160 °C a los 230 °C, a una velocidad de (30-50) mm/s, grosor de capa de 0.1 mm, y temperatura de la cama de 50 °C.

Probeta para compresión

Las pruebas mecánicas del material compuesto HAP-PLA se realizaron, con una relación 50 % m/m de HAP, con medidas de 10 mm de diámetro por 20 mm de altura (Figura 11 a). Con

un entramado interior de tipo rejilla (Figura 11 b), lo que proporcionará la interconexión a lo largo del andamio, con el propósito de lograr su vascularización posterior. La construcción de la probeta por impresión 3D fue de relleno sólido, altura de capa de 0.1 mm, rapidez de impresión de 40 mm/s y a una temperatura de 230 °C.

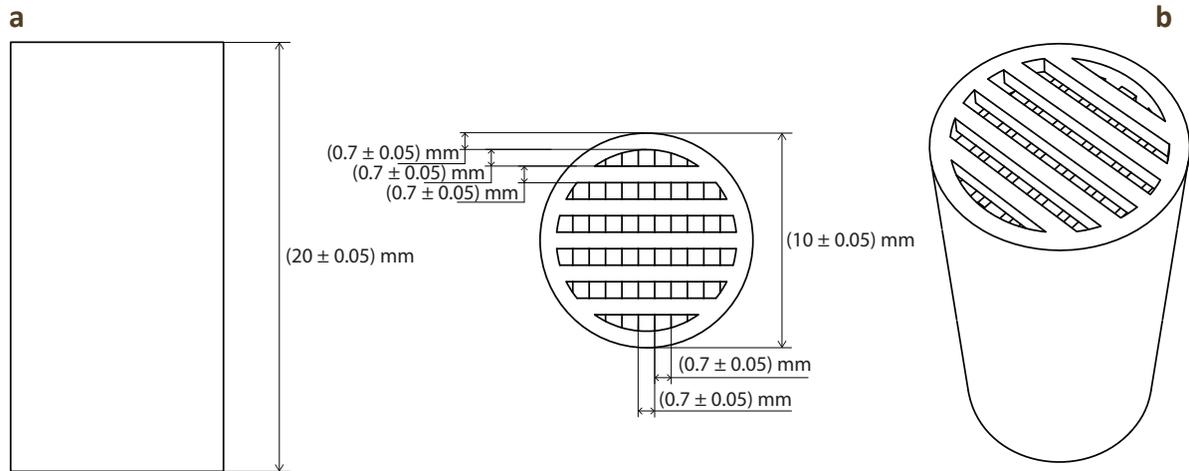


Figura 11. Planos del modelo tridimensional de la probeta de material compuesto HAP-PLA para las pruebas mecánicas: a) medidas generales, b) vista en perspectiva.

Probeta para tensión

La probeta para tensión se realizó siguiendo las normas (véase 4.2.5). La construcción de la probeta de HAP-PLA se realizó en impresión 3D por FDM con relleno sólido, altura de capa de 0.1 mm, rapidez de impresión de 40 mm/s y temperatura de 230 °C (Figura 12 a y b).

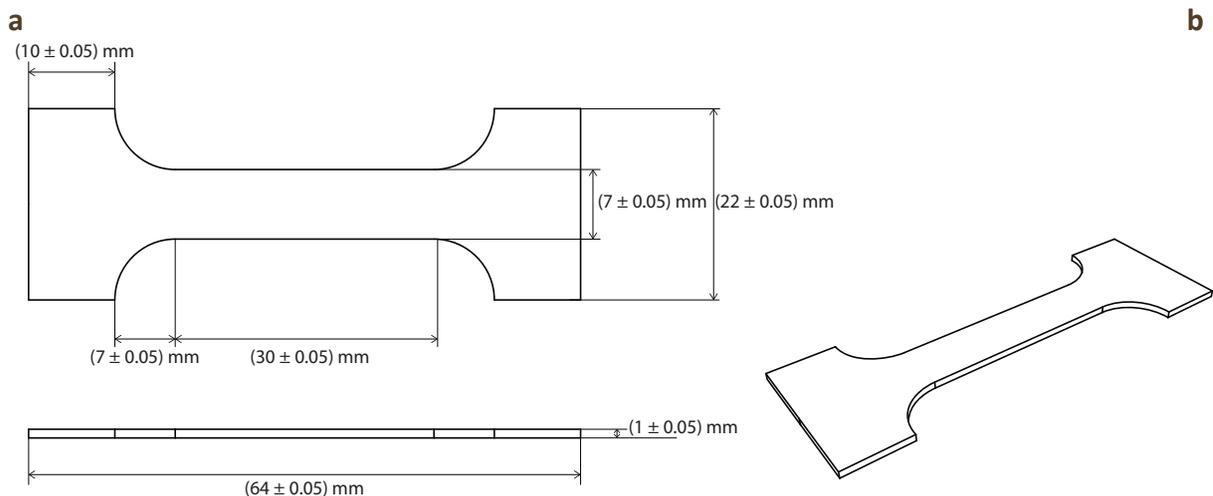


Figura 12. Planos del modelo tridimensional de la probeta de tensión de material compuesto HAP-PLA: a) medidas generales, b) vista en perspectiva.

Pastilla para prueba Vickers

La pastilla para la prueba Vickers (Figura 13 a y b) fue impresa en 3D por el método FDM, se usó el material compuesto HAP-PLA (50 % m/m HAP). La construcción de la pastilla se realizó a una altura de capa de 0.1 mm, rapidez de impresión de 40 mm/s, temperatura de 230 °C y con relleno sólido.

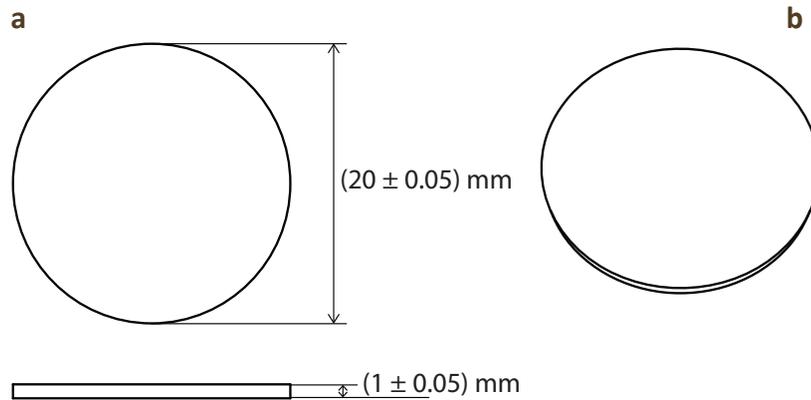


Figura 13. Planos del modelo tridimensional de la pastilla para prueba Vickers de material compuesto HAP-PLA: a) medidas generales, b) vista en perspectiva.

5. RESULTADOS

El método sol-gel se encuentra detallado en el Anexo 3.1.

5.1 SÍNTESIS DE HIDROXIAPATITA (HAP)

5.1.1 Síntesis a pH 7

Estructura cristalina por DRX

La evolución de la cristalización de la HAP03-1 (Figura 14), con respecto a la temperatura de cristalización, mostró a los 600 °C, una fase en formación de HAP, con un tamaño de partícula de 20 nm. A 700 °C, la HAP aparece acompañada, con las señales relacionadas a la formación de los fosfatos de calcio de tipo, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (JCPDS 00-009-0348); las cuales se mantienen hasta los 800 °C. En 900 °C, se identifica el fosfato de calcio bifásico (BCP) formado por la fase de HAP y de $\beta\text{-TCP}$. A 1000 °C, las señales identificadas como una mezcla de fases, mostraron a la HAP en una proporción mayor (d_{hkl} (Å): 2.81_x, 2.77₅ y 2.72₆; JCPDS 01-074-0565), y en menor del fosfato tricálcico beta, tipo whitlockita, $\beta\text{-TCP}$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, (d_{hkl} (Å): 3.20₅, 2.87_x y 2.60₆; JCPDS 00-055-0898) (Figura 15).

Por medio de la ecuación de Scherrer se determinó el tamaño de partícula para cada uno de los tratamientos térmicos. El espécimen mostró crecimiento, casi lineal en relación con el aumento de temperatura, en la partícula que empezó en 18.8 nm a 600 °C, 27.9 nm a 700 °C, 61.7 nm a 800 °C, 92.3 nm a 900 °C y 102.6 nm a 1000 °C, figura 16 a. El cambio en el tiempo de cristalización a 700°C mostró la formación de HAP, así como crecimiento en la partícula; los tamaños fueron de: 20.3 nm a 8 h de tratamiento, de 22.7 nm a 10 h, de 39.0 nm a 14h y 40.1 nm a 72 h, figura 16 b.

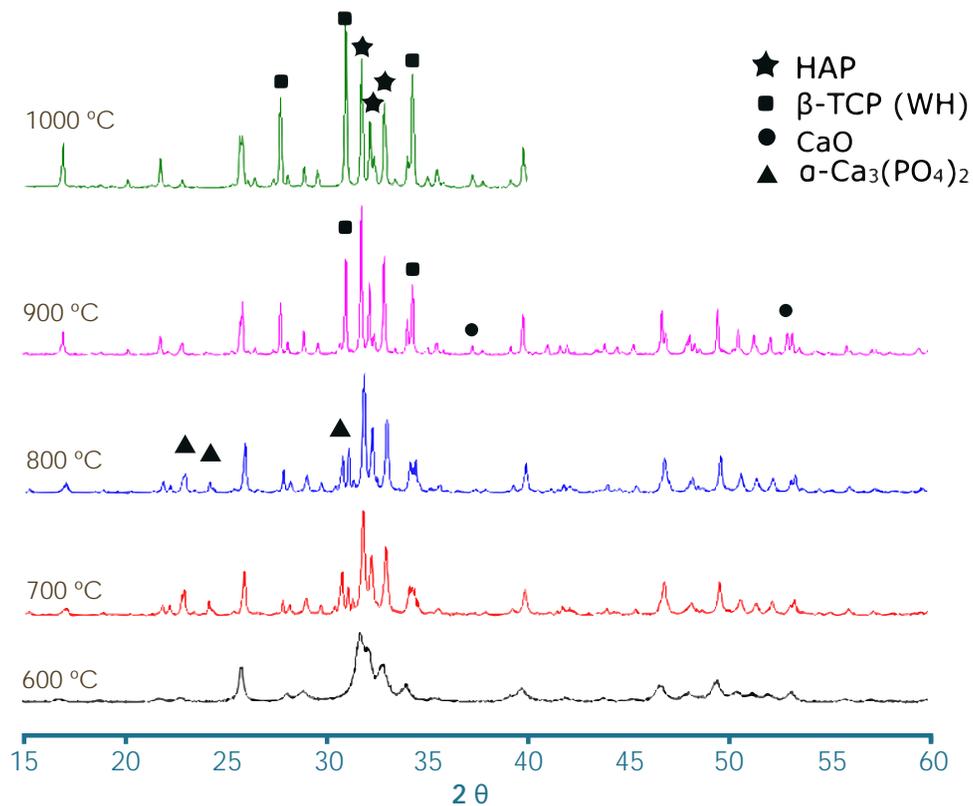


Figura 14. Trayectoria de cristalización para HAP03-1 a diferentes temperaturas.

HAP03-1 pH < 7

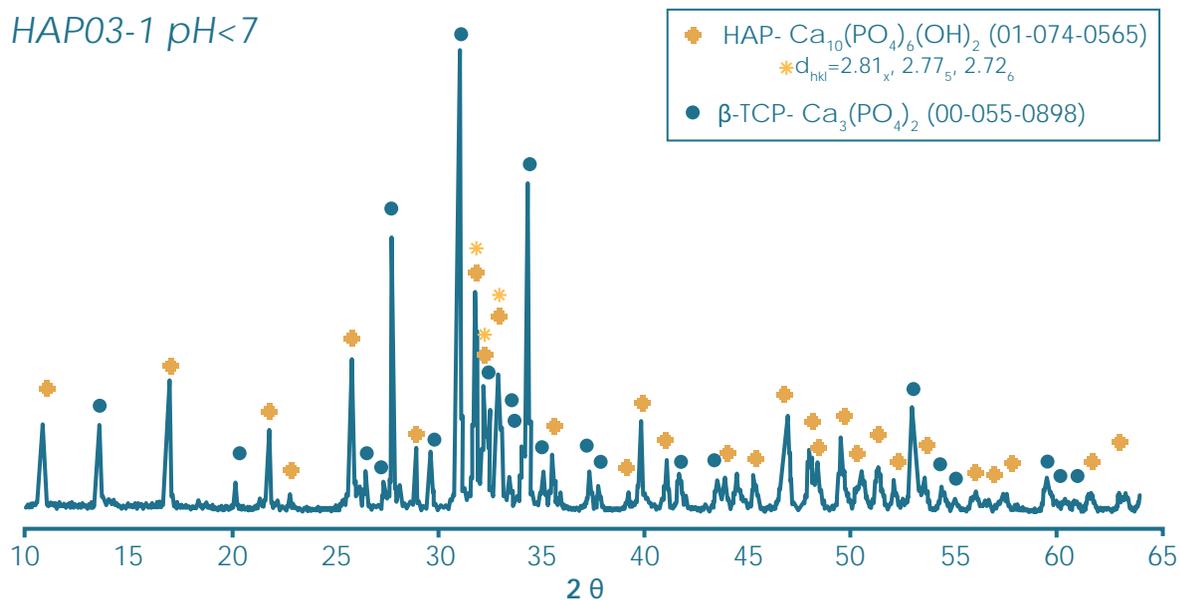


Figura 15. Difracción de rayos X para HAP03-1 mostrando la combinación de fases HAP y β-TCP.

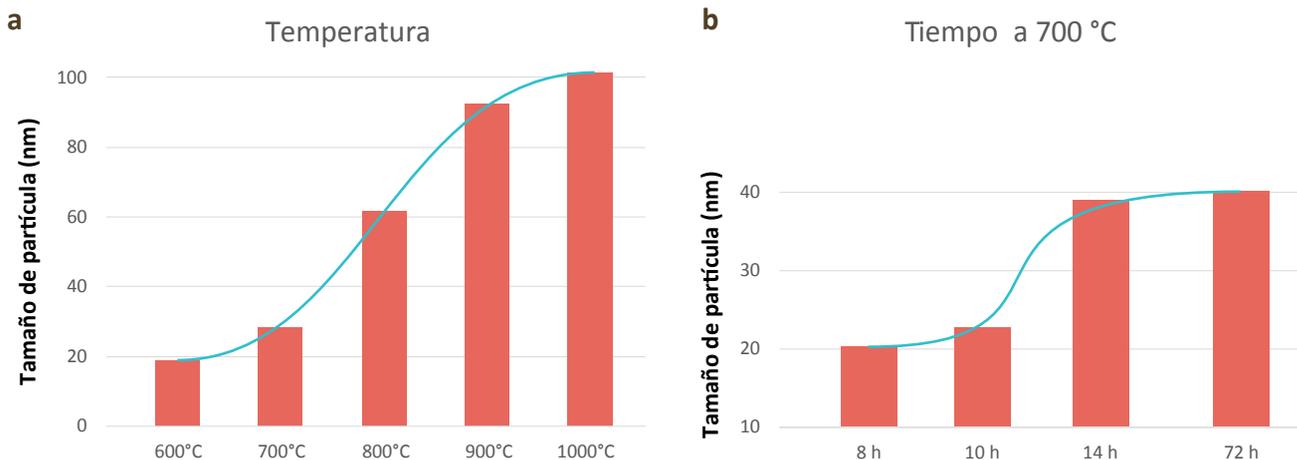


Figura 16. Crecimiento del tamaño de partícula para HAP03-1 con el incremento en a) temperatura y b) tiempo a 700°C.

Determinación de los grupos funcionales por FTIR

La espectroscopía de absorción infrarroja de la HAP03-1, en la Figura 17, mostró las señales siguientes: a 3573 cm^{-1} , se atribuyó a la vibración de estiramiento de los iones OH^- estructurales y, a 632 cm^{-1} a la deformación del enlace O-H^- , pertenecientes a la HAP. Las bandas en 1086 cm^{-1} y en 1030 cm^{-1} se correlacionan a los componentes de la vibración no simétrica, triplemente degenerada del P-O. La señal en 972 cm^{-1} se asignó a la vibración de estiramiento no degenerada del P-O. Las bandas en 1205, 944 y 548 cm^{-1} , se atribuyeron a los modos P-O del β -TCP. Y, las señales entre 600 y 565 cm^{-1} al componente de la vibración de deformación, triplemente degenerada, del O-P-O [Markovic *et al.*, 2004; Arsad *et al.* 2011; Gang, 2007].

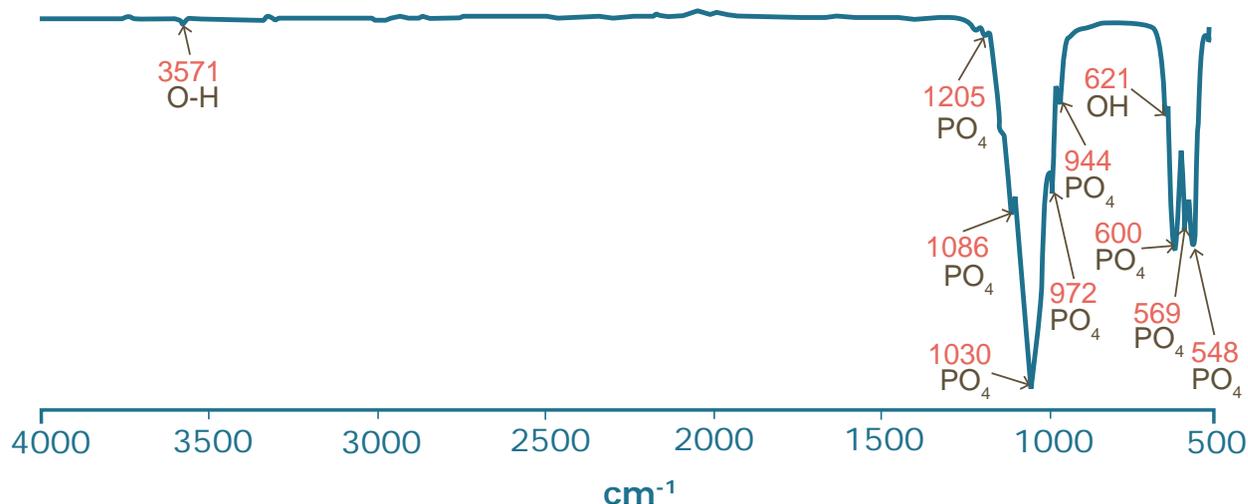


Figura 17. Espectro de absorción FTIR para la HAP03-1.

5.1.2 Síntesis a pH 10-11

Estructura cristalina por DRX

La muestra HAP03-2 sintetizada, a un pH entre 10 y 11, y cristalizada a 700°C, muestra en su difractograma de rayos X una fase identificada con la HAP (JCPDS 070-2065), (Figura 18), sin señales adicionales. Lo que sugiere la obtención de una fase pura. El cálculo de diámetro de partícula, obtenido por medio de la ecuación de Scherrer, con las señales de difracción de los planos (002) y (300), indicó 23 nm para el parámetro a_0 y 44 nm para el c_0 , lo que se podría asignar a una celda hexagonal.

HAP03-2 pH 10-11.

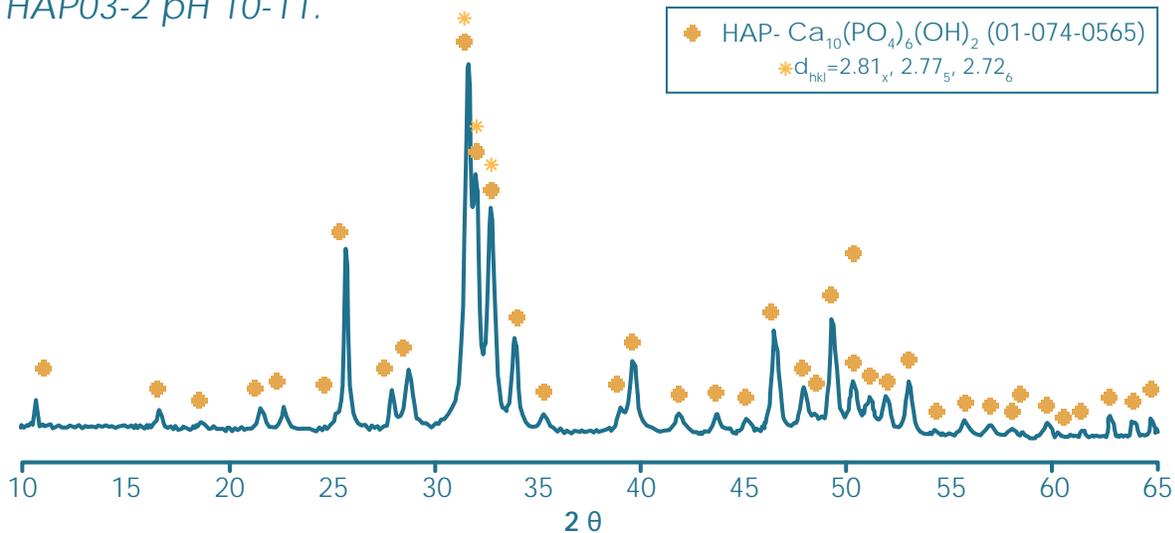


Figura 18. Difractograma de rayos X para HAP03-2.

Determinación de grupos funcionales por FTIR

El análisis de la HAP03-2 por espectroscopía infrarroja (Figura 19) mostró en 3573 cm^{-1} una señal aguda y pequeña atribuida a la vibración de estiramiento de los iones OH^- estructurales, con la señal en 632 cm^{-1} correspondiente a la deformación del O-H. La banda en 1088 cm^{-1} y en 1029 cm^{-1} correspondió a los componentes de la vibración no simétrica, triplemente degenerada, del P-O. En 962 cm^{-1} se asignó a la vibración de estiramiento no degenerada del P-O. Las señales en (632, 600 y 565) cm^{-1} correspondieron a la vibración de deformación, triplemente degenerada, del componente O-P-O en el PO_4^{3-} tetraedral de la HAP [Sobczak *et al.*, Markoic *et al.*, 2004; Arsad *et al.*, 2011; Tahiri, 2008].

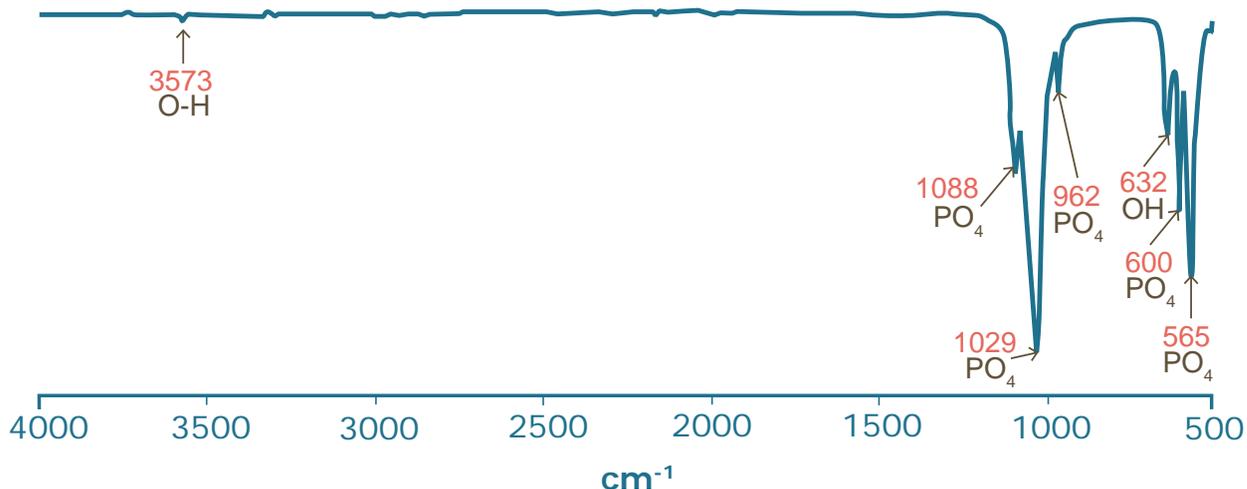


Figura 19. Espectroscopía de absorción infrarroja de la HAP03-2.

Morfología por MEB

En la micrografía por MEB, con electrones secundarios de la HAP03-2, se observaron partículas de tamaño nanométrico que se asociaron a aglomerados microporosos heterogéneos, con un contorno de forma esferoide, aproximadamente de (55.5 - 89.8) nm de diámetro (Figura 20). El microanálisis elemental químico por EDS (Figura 21 a y b), por electrones retrodispersados, permitió asociar la composición de la HAP, con calcio, fósforo y oxígeno, lo cual corroboró la caracterización, por DRX y espectroscopia FTIR, la HAP pura obtenida.

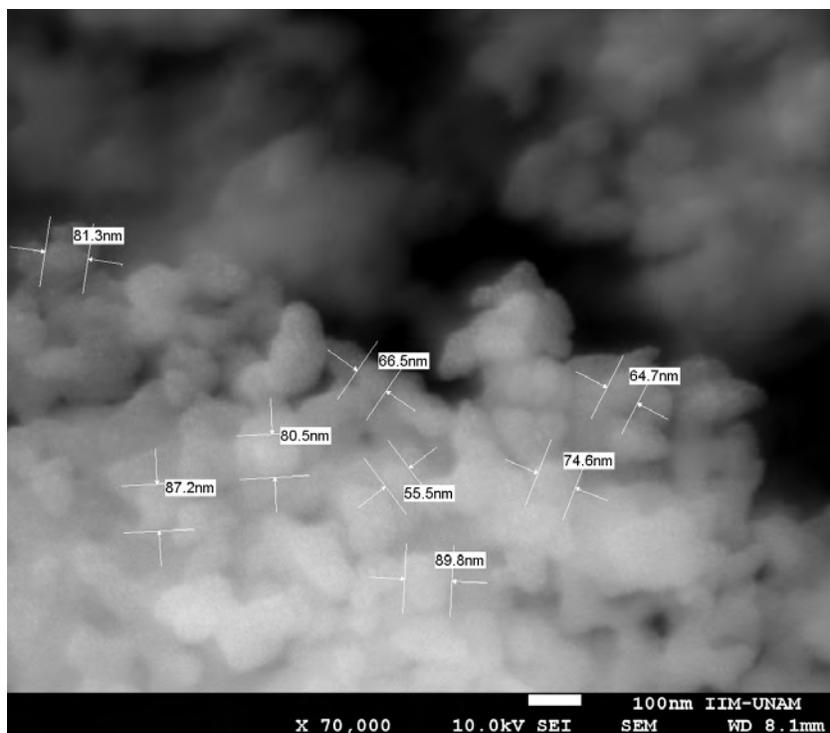


Figura 20. Micrografía MEB de la superficie del polvo de HAP03-2 mostrando el diámetro aproximado de los aglomerados esferoides.

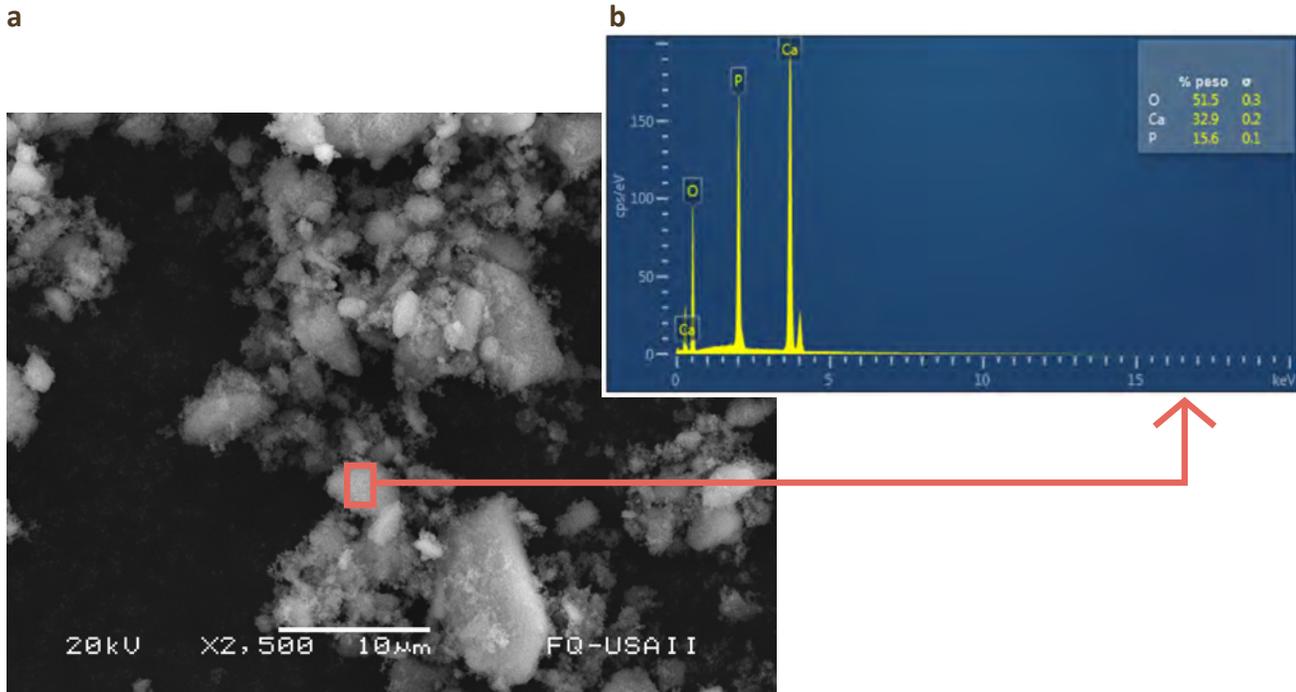


Figura 21. Micrografía MEB de a) la superficie del polvo de HAP03-2 con b) espectro de RX.

5.2 MATERIAL COMPUESTO HAP-PLA

Los resultados del método por dispersión de HSA se detallan en el Anexo 3.2.

5.2.1 Dispersión por medio de PVA

La integración del material compuesto HAP-PLA, en una proporción del 50 % m/m de HAP por medio del PVA, se analizó con las técnicas siguientes:

Determinación de los grupos funcionales por FTIR

El análisis del espectro de IR del material HAP-PLA integrado por PVA (Figura 22), presentó las señales características para la HAP y el PLA, lo que indicó la eliminación del PVA durante el lavado y del diclorometano por evaporación durante la agitación. Para la HAP, la señal en 1041 cm^{-1} se atribuyó a el PO_4^{3-} y 568 cm^{-1} para el PO_4^{3-} para la vibración de deformación, triplemente degenerada. El PLA se identificó con las bandas en 1727 y 1757 cm^{-1} , correlacionadas con el estiramiento del $\text{C}=\text{O}$, y la señal en aproximadamente 3200 cm^{-1} relacionada a los grupos OH^- estuvo ausente [Gang, 2006; Lasprilla, 2011; Xu, 2009; Wang, 2013].

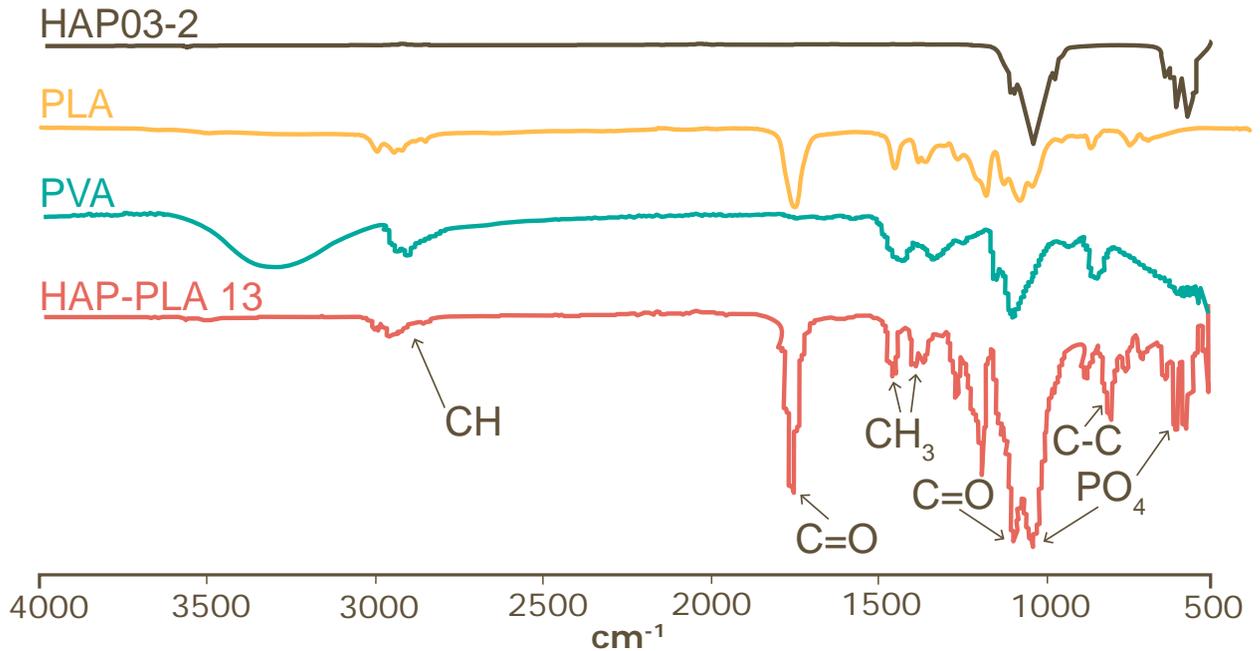


Figura 22. Espectroscopía de FTIR del material compuesto HAP-PLA 13 relación 50 % m/m HAP dispersado con PVA.

Distribución de la HAP en el PLA por microscopía óptica

El material compuesto HAP-PLA analizado por microscopía óptica, mostró un material homogéneo, con distribución uniforme y sin aglomerados de las partículas de HAP embebidas en el PLA, tanto para el material HAP-PLA 13 (50 % m/m HAP) (Figura 23 a), como para el HAP-PLA 15 (70 % m/m HAP) (Figura 23 b). El material HAP-PLA 13 fue ideal para la extrusión y el proceso de impresión 3D.

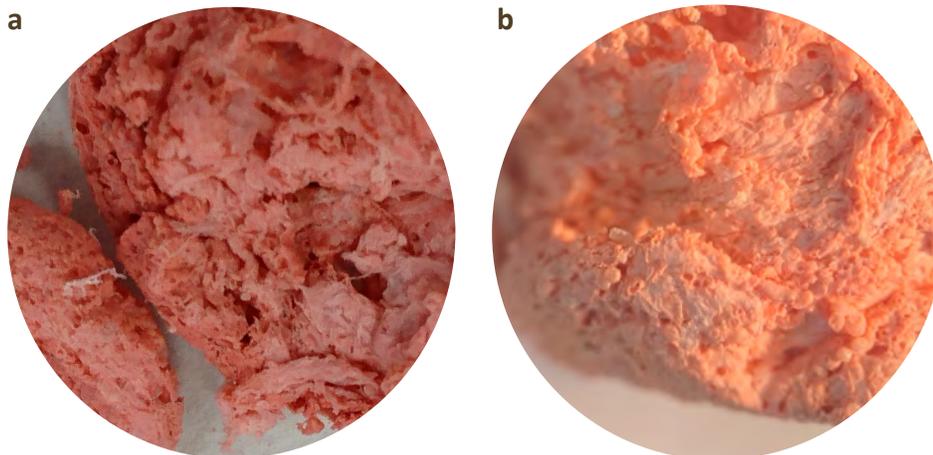


Figura 23. Imagen de microscopía óptica (aumento de 2x) de la dispersión de la HAP en el PLA con PVA en a) 50 % m/m y b) 70 % m/m.

Distribución de la HAP en el PLA en el material compuesto por MEB

El material compuesto HAP-PLA (50 % m/m HAP) analizado con electrones secundarios mostró una distribución uniforme de la HAP (claro) sobre la matriz polimérica (oscuro), con la formación de algunos aglomerados de HAP (Figura 24). El análisis EDS en % peso determinó que la relación para el material compuesto HAP-PLA era en promedio de 52 % m/m de HAP, y el porcentaje atómico de la HAP mantuvo una relación molar de Ca/P de 1.67 ± 0.02 .

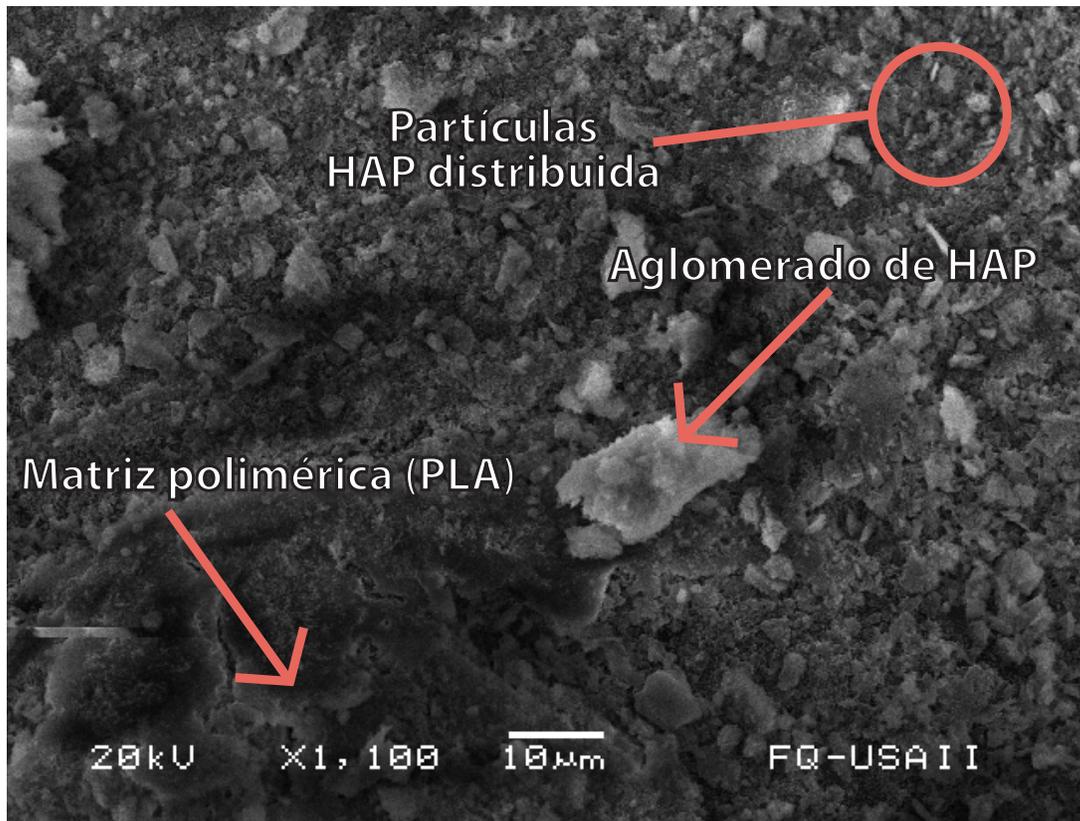


Figura 24. Imagen MEB de la dispersión de la HAP en el PLA por medio de PVA en 50 % m/m.

5.3 CONFORMADO POR EXTRUSIÓN DEL MATERIAL COMPUESTO (HAP-PLA)

Distribución de la HAP en el PLA por microscopía óptica

El compuesto HAP-PLA conformado en microesferas se extruyó a temperatura de 150°C , se obtuvo un filamento continuo de (1.75 ± 0.05) mm de diámetro, sin perder la flexibilidad; por microscopía óptica (MO) se visualizó una distribución uniforme de HAP impregnadas en el filamento formado (Figura 25).



Figura 25. Imagen de microscopía óptica (2x) del filamento de la HAP (50 % m/m) en el PLA por extrusión con un diámetro de (1.75 ± 0.05) mm.

Distribución y morfología del filamento HAP-PLA por MEB

La micrografía MEB, del filamento del material compuesto HAP-PLA (50 % m/m) de aproximadamente (0.4 ± 0.05) mm, mostró a la HAP aglomerada (claro) en la superficie de algunas zonas, y la aparición de huecos en la superficie (Figura 26).

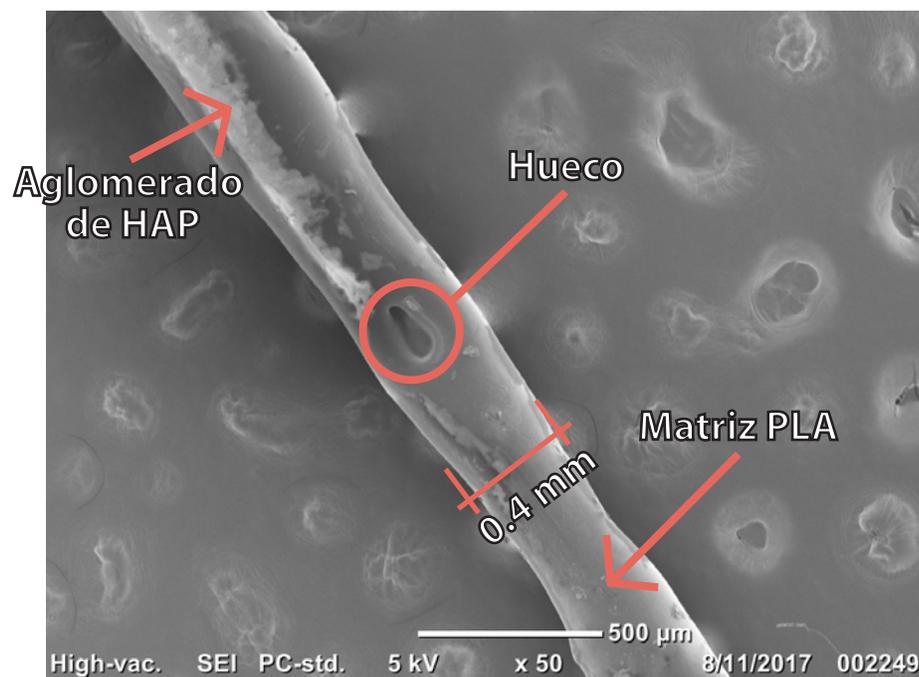


Figura 26. Imagen MEB del filamento de la HAP (50 % m/m) en el PLA por extrusión.

5.4 IMPRESIÓN 3D DEL MATERIAL COMPUESTO HAP-PLA DEL FILAMENTO

5.4.1 Determinación de propiedades para impresión

El filamento apto para el proceso de impresión 3D por FDM mantuvo la HAP con un 50 % m/m en el PLA. Los filamentos con proporciones de 33 % m/m y 70 % m/m de HAP perdieron la flexibilidad requerida (Tabla 6).

Tabla 6. Conformación del material compuesto de HAP-PLA para su impresión 3D.

Dispersor	PVA		
Muestra	HAP-PLA 13	HAP-PLA 14	HAP-PLA 15
% m/m de HAP	50	33	70
Apto para impresión	Sí	Filamento frágil	Filamento frágil

Las condiciones para la impresión 3D de los andamios de HAP-PLA, se obtuvieron de las pruebas diferentes de temperaturas y velocidades de flujo, de tal forma que el andamio mostrara adición entre las capas sin huecos, ni discontinuidades. El filamento se sometió a 230 °C durante la impresión 3D para mantener un flujo constante del material en la boquilla de la impresora, se observó que debajo de esta temperatura el material no fluyó y por arriba de ella el PLA sufrió un proceso de degradación (Figura 27). La velocidad de impresión se estableció a 40 mm/s para empatar con el flujo del material, ya que, a una velocidad menor el material salió en exceso de la boquilla, y a una velocidad mayor el material no se imprimió.



Figura 27. Imagen de microscopía óptica (2x) del material HAP-PLA sometido a temperaturas superiores a los 230 °C.

5.4.2 Morfología del andamio HAP-PLA por MO

El andamio de HAP-PLA impreso en 3D bajo las condiciones óptimas de impresión, observado por MO, mostró adhesión entre las capas sin huecos y la formación de una arquitectura controlada (Figura 28). No es posible observar partículas blancas asociadas a la aglomeración de HAP en la superficie del andamio.



Figura 28. Imagen de microscopía óptica (2x) del andamio construido por impresión 3D de la HAP (50 % m/m) en el PLA con PVA.

5.4.3 Morfología y composición del andamio HAP-PLA por MEB

El andamio de HAP-PLA impreso en 3D mostró en su micrografía, por MEB (Fig. 29 a), una distribución homogénea de las partículas de HAP (blanco), embebidas en la matriz de PLA (fondo gris). El mapeo de la composición (Fig. 29 b) corroboró la distribución de la HAP, con la presencia de calcio, fósforo y oxígeno; y, para el PLA carbono y oxígeno. El microanálisis químico por EDS (Fig. 29 c) reveló que la HAP se tiene en un 40 % m/m y el PLA en un 60 % m/m. La superficie de las líneas de construcción, superpuestas en una rejilla regular, se observó sin poros, porosidad, ni fracturas (Figura 30). El ancho de la línea de construcción fue de (0.7 ± 0.05) mm.

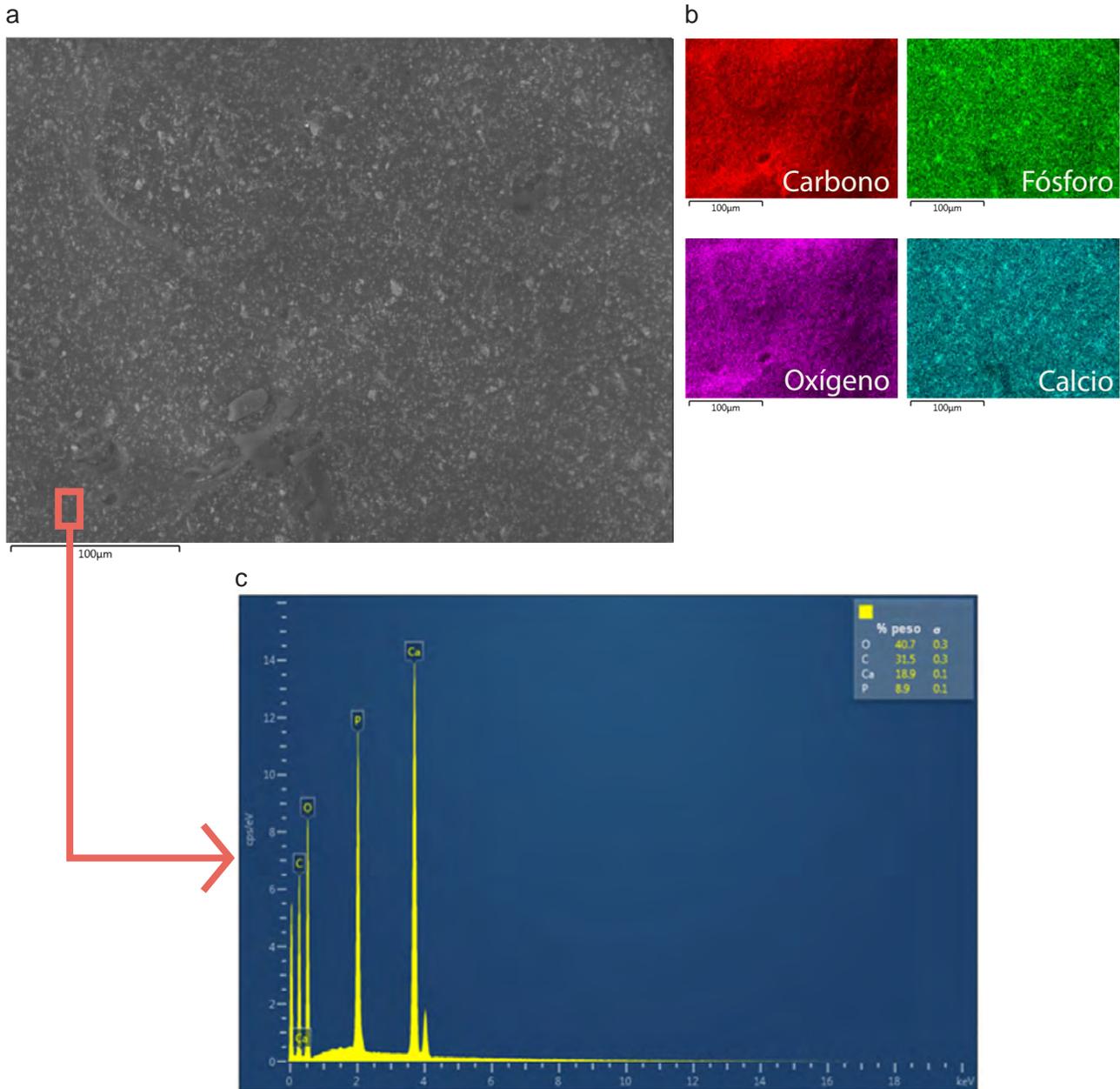


Figura 29. Micrografía MEB de la línea impresa en 3D del material compuesto HAP-PLA mostrando: a) la dispersión de la HAP en la matriz de PLA, b) análisis químico por mapeo y c) microanálisis químico por EDS.

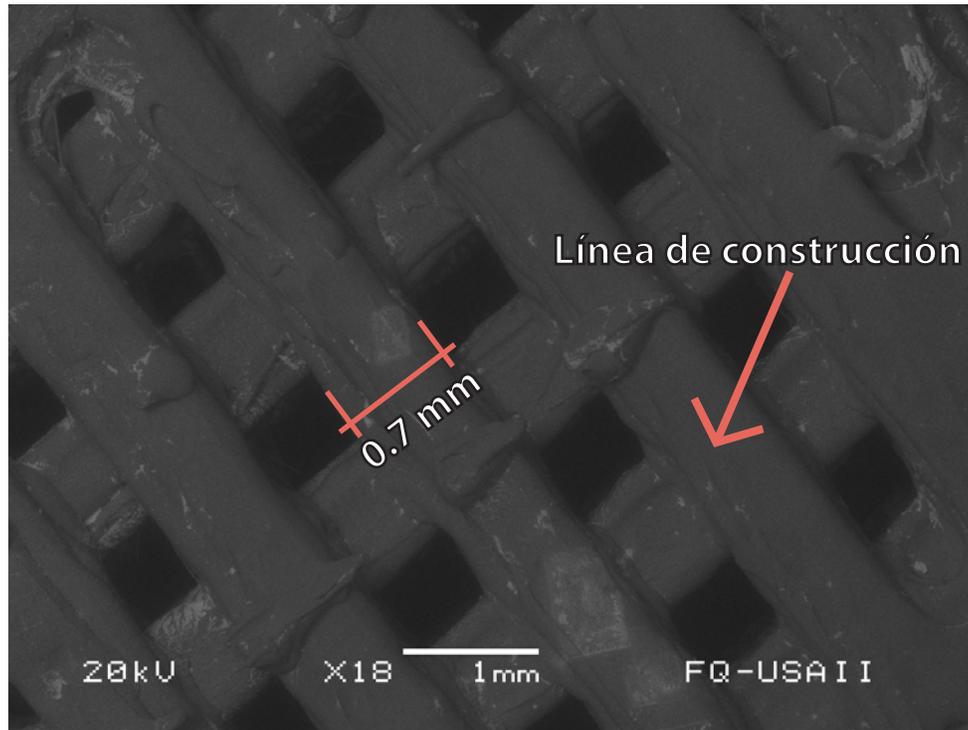


Figura 30. Micrografía MEB del andamio impreso en 3D con el material compuesto HAP-PLA (50 % m/m HAP) mostrando las líneas de construcción sobrepuestas que forman una rejilla regular.

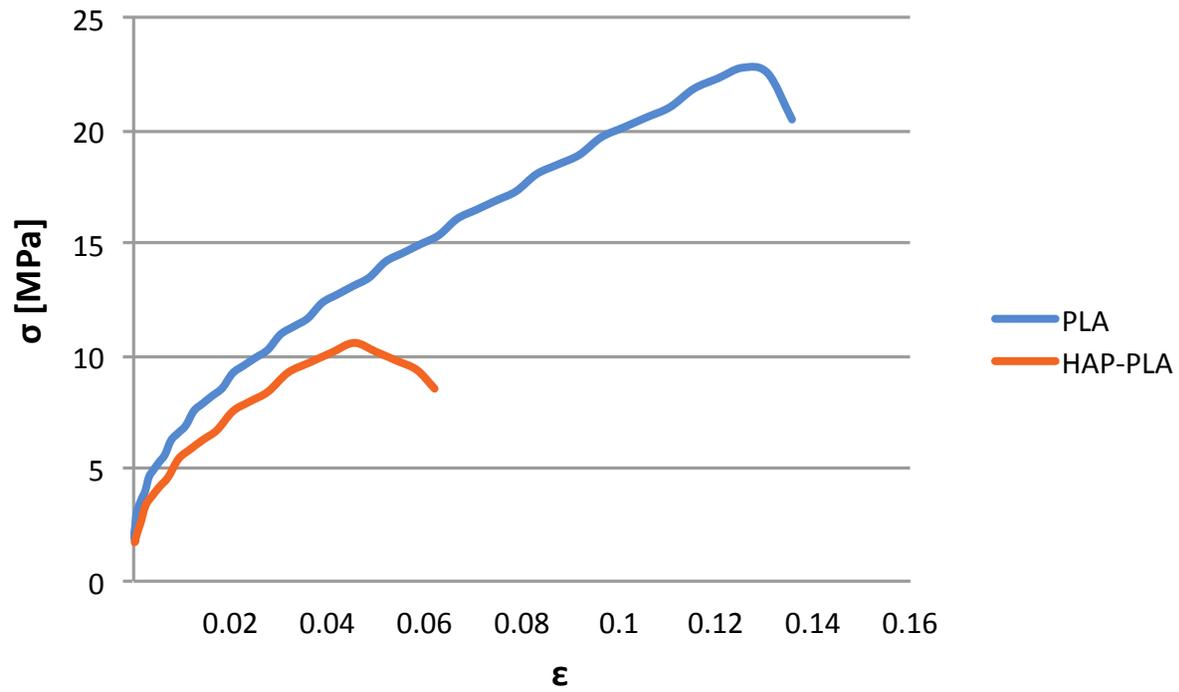
5.4.4 Pruebas mecánicas

Resistencia a la compresión

El andamio impreso en 3D de HAP-PLA (50 % m/m HAP) se sometió a las pruebas de resistencia a la compresión, se obtuvo una resistencia máxima, de 11.4 MPa, con un comportamiento típico de fractura frágil. Mientras que el andamio de PLA alcanzó los 23 MPa, con comportamiento elástico y plástico (Gráfica 1). El módulo elástico máximo para el andamio HAP-PLA fue de 585.6 MPa.

La visualización del comportamiento frágil del andamio, mostró la formación de grietas en la imagen digital de la figura 31, y expuso los cortes rectos sin alargamiento del material en la micrografía por MEB (Figura 32 a).

La micrografía, por MEB, de la fractura resultante de la prueba de compresión del andamio HAP-PLA, comprobó una distribución uniforme sin aglomerados o zonas sin la HAP (claro), dentro de la matriz polimérica (oscuro), figura 32 b, la cual no es superficial, sino que se encuentra en el interior de la línea de impresión.



Gráfica 1. Gráfica esfuerzo-deformación para la prueba de compresión del andamio de PLA y de HAP-PLA.

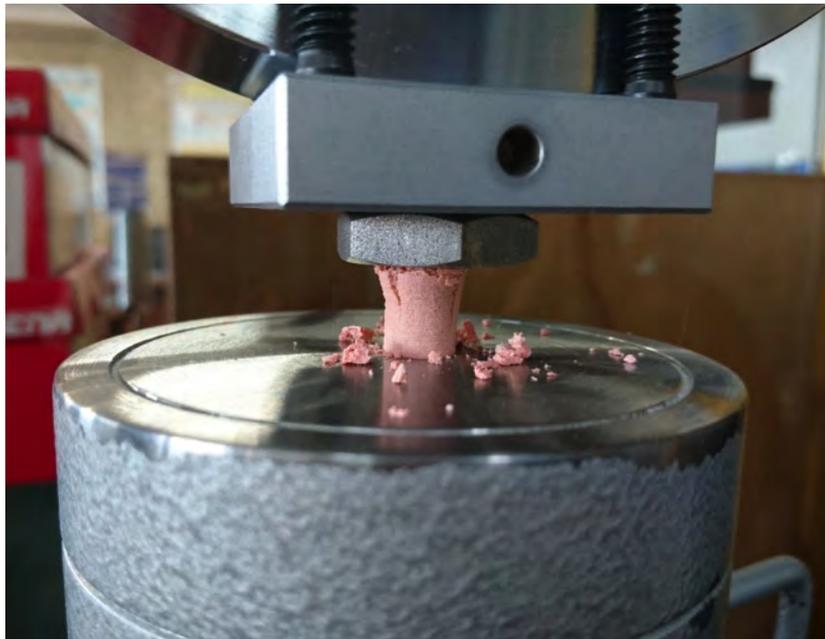


Figura 31. Prueba mecánica de compresión para el andamio de HAP-PLA.

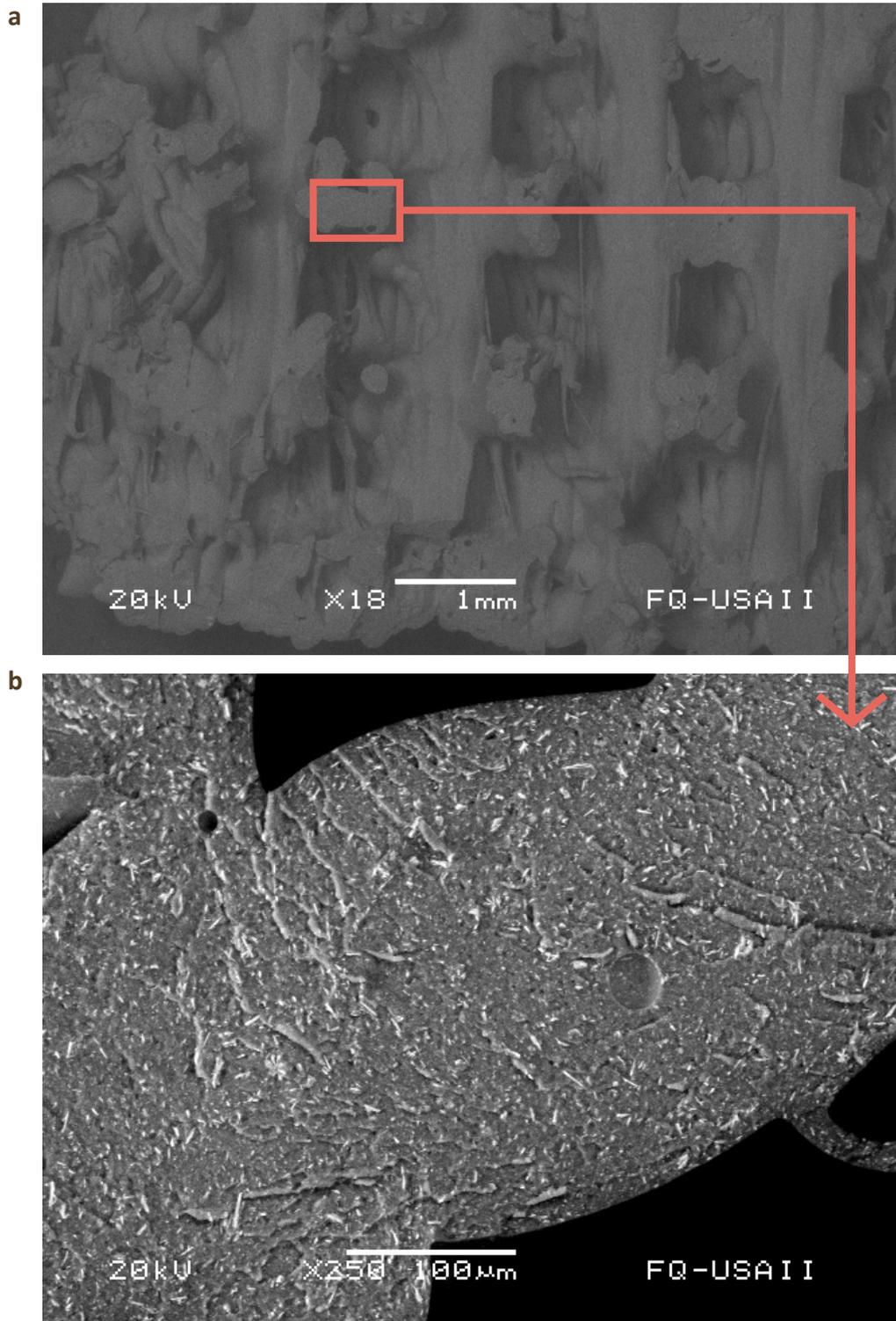


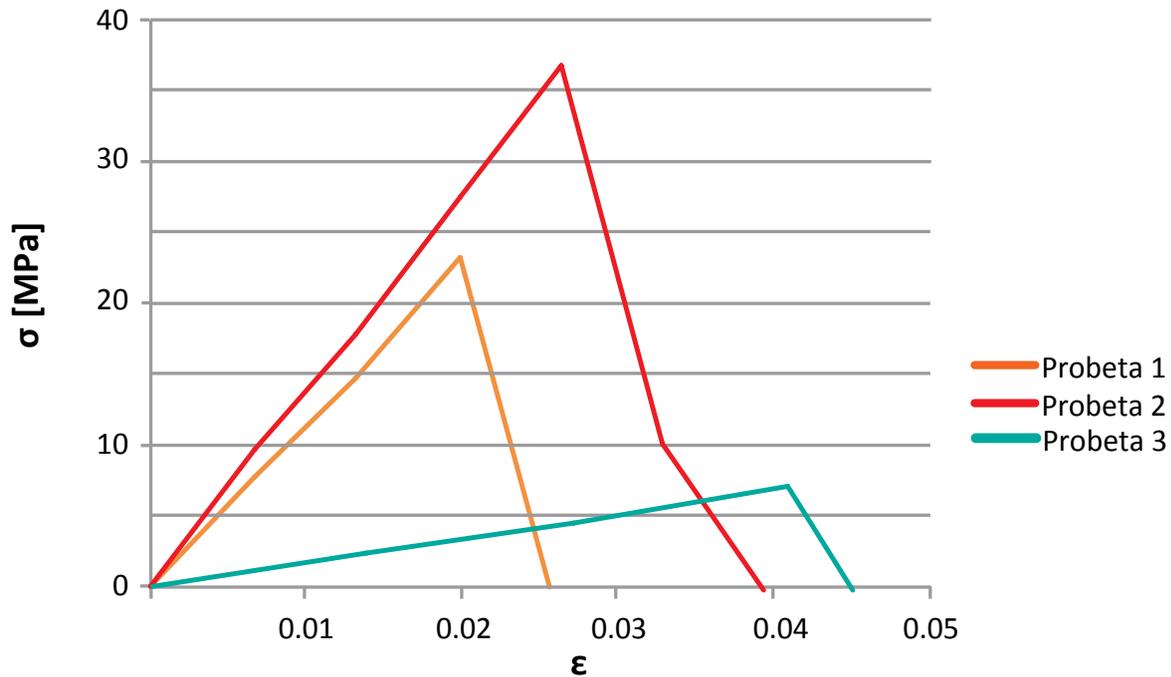
Figura 32. MEB de la zona fracturada de la prueba mecánica de compresión para a) el andamio de HAP-PLA (50 % m/m HAP), b) mostrando la distribución de la HAP.

Resistencia a la tensión

Las probetas impresas de 3D de HAP-PLA (50 % m/m) para análisis de resistencia a la tensión se muestran en la figura 33. En la prueba de resistencia a la tensión se obtuvo una resistencia máxima de 38.5 MPa, gráfica 2, el porcentaje de deformación máxima al quiebre fue de 2.6 %.



Figura 33. Probeta del material compuesto HAP-PLA para la prueba de la resistencia a la tensión.



Gráfica 2. Gráfica esfuerzo-deformación para la prueba de tensión de HAP-PLA (50 % m/m HAP).

La micrografía MEB del área de la falla (Figura 34 a) mostró un comportamiento de fractura frágil transgranular asociada al componente cerámico, la HAP (Figura 34 b).

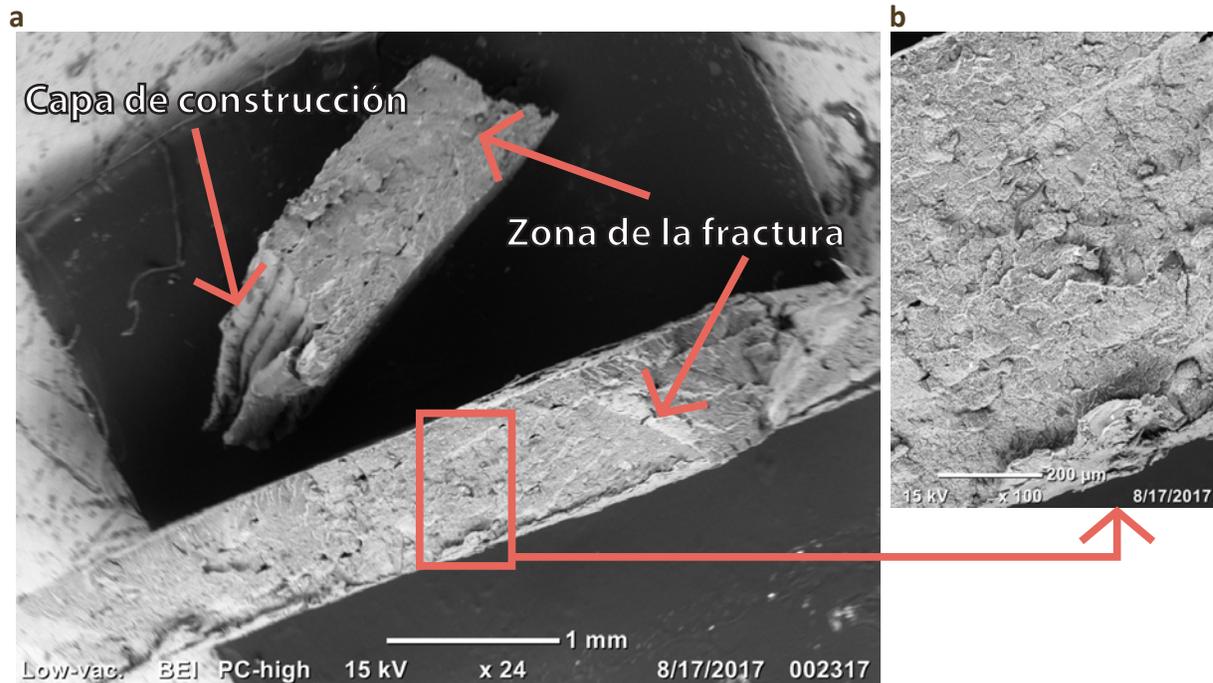


Figura 34. Micrografía electrónica, por MEB, de la HAP-PLA (50 % m/m), de a) la fractura en la prueba de tensión y b) acercamiento para observar la fractura transgranular.

5.4.5 Medición de dureza

El estudio de microdureza Vickers del material compuesto HAP-PLA (50 % m/m HAP) en la probeta construida por impresión 3D (Figura 35), obtuvo un valor promedio de la dureza de 170.2 MPa. El largo de la indentación fue de 53.15 µm en el lado horizontal y de 50.21 µm para una fuerza aplicada de 254.2 mN (Figura 36).



Figura 35. Probeta de HAP-PLA para la prueba de microdureza Vickers.

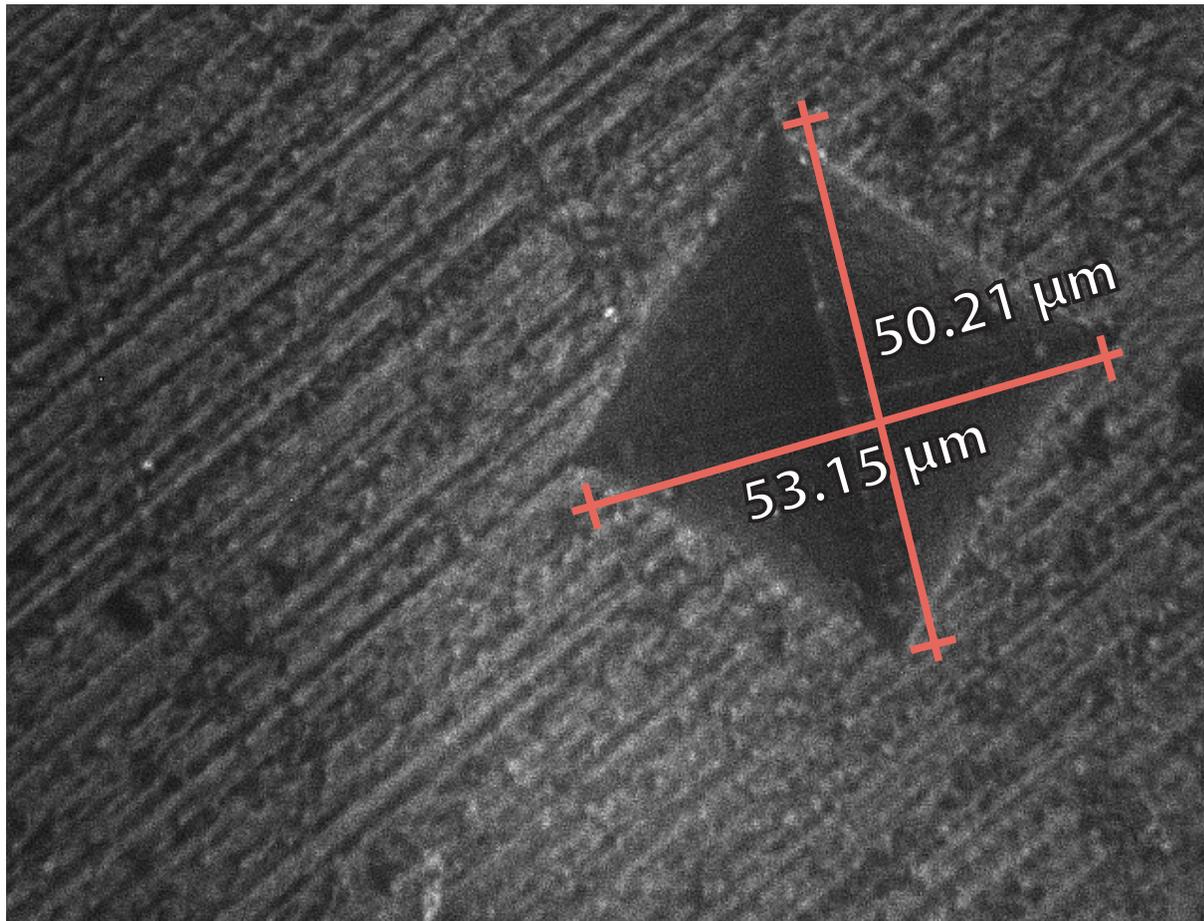


Figura 36. Prueba Vickers en la superficie pulida de HAP-PLA (50 % m/m HAP) con dimensiones de la indentación.

5.4.6 Pruebas *in vitro*

Las pruebas *in vitro* del material compuesto de HAP-PLA, después de tres semanas en el SBF (fluido corporal simulado), mostró por MEB la degradación del PLA, junto con la formación de microporosidad de (2-4) μm de diámetro (figura 37 a) con rugosidad visible en la superficie del andamio (figura 37 b).

El andamio de HAP-PLA, por EDS, determinó un análisis químico con un promedio de 27 % m/m de HAP, después de las 3 semanas en el SBF; y el porcentaje atómico mantuvo una relación molar para HAP, de Ca/P de 1.59.

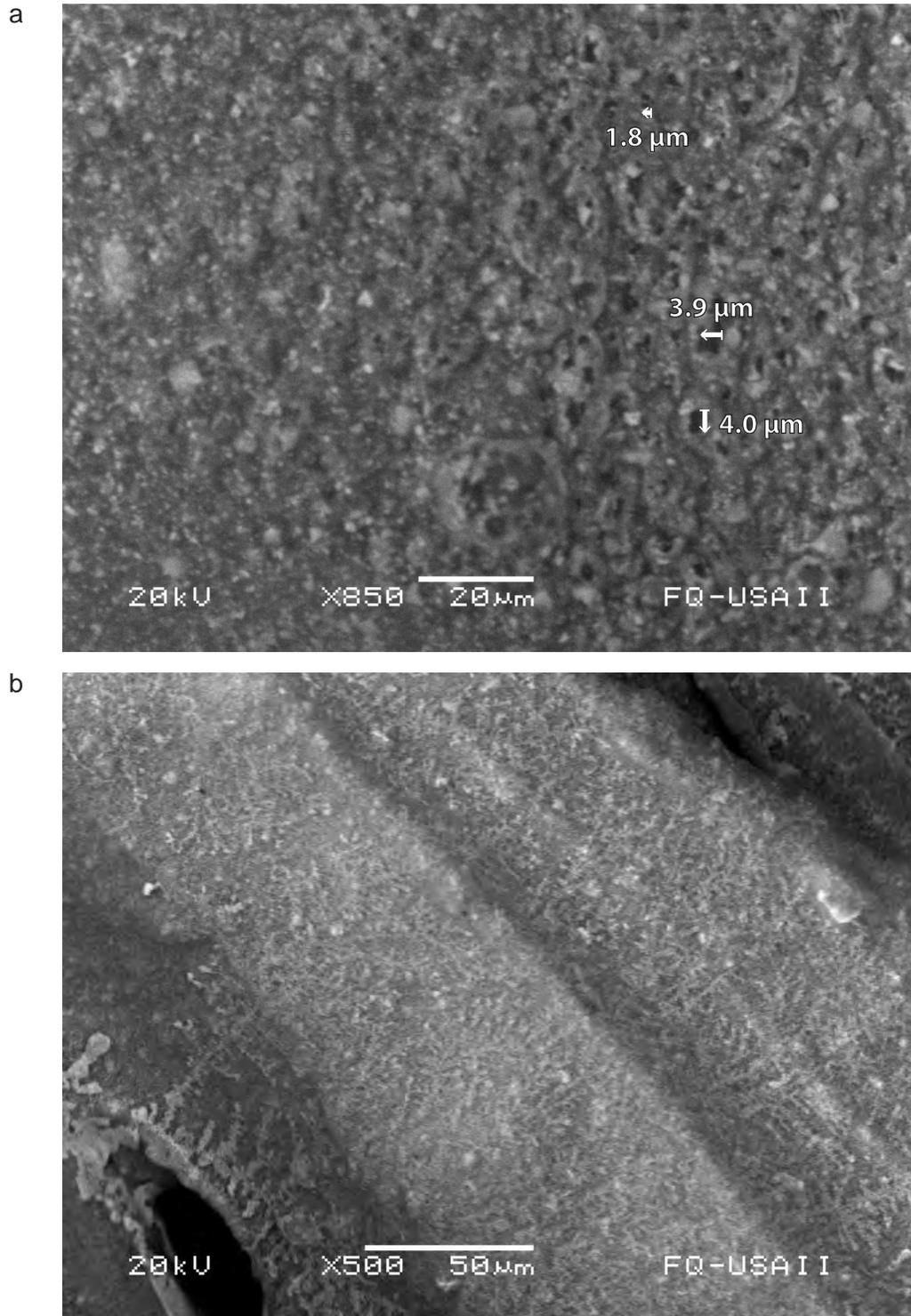


Figura 37. Micrografía electrónica, por MEB, de la superficie de HAP-PLA después de la prueba in vitro a) formación de microporosidad y b) degradación de la superficie.

6. DISCUSIÓN

En este trabajo se estudiaron las condiciones para obtener un andamio de material compuesto de HAP-PLA, con propiedades de resistencia y plasticidad similares a las del hueso humano, por medio de la manufactura aditiva, con el método de deposición de material fundido.

6.1 SÍNTESIS DE HIDROXIAPATITA (HAP)

Los resultados del estudio para encontrar las condiciones necesarias para la síntesis de HAP, son determinantes para la obtención de la fase pura. Para lo cual se probaron las rutas de síntesis de, sol-gel y coprecipitación, con la variación de la temperatura, el tiempo, los reactivos y las composiciones (los resultados por el método de sol-gel se detallan en el Anexo 3.1).

6.1.1 Síntesis a pH 7

En la búsqueda de las condiciones adecuadas para la síntesis de la HAP, a un pH menor de 7 se identificó por DRX la formación de la fase β -TCP, debido a que la probabilidad de hidroxilización del fosfato de calcio disminuye por la insuficiencia de iones OH durante la síntesis [García *et al.*, 2005]; para eliminar esta última fase la muestra se sometió a temperaturas altas, lo cual no se logró. Conforme la temperatura se incrementó, por DRX se observó que, el ancho de las señales se estrecharon, relacionado con el crecimiento del tamaño de partícula, en coincidencia con otros autores [Fathi y Hanifi, 2007; Trinkunaite *et al.*, 2014]. A 1000 °C, no se eliminó el β -TCP de la HAP, ambas fases son identificadas como, el fosfato de calcio bifásico, con un valor de tamaño de partícula promedio de 102 nm, mayor al encontrado en el hueso humano de (5 a 60) nm. Se sabe que, la adición de β -TCP a HAP favorece el crecimiento del hueso, ya que se encuentra asociado con el hueso humano joven [Snu R&DB Foundation, 2014; Sterling Drug Inc., 1977]; y, favorece las propiedades mecánicas en tensión. De este trabajo se propuso la investigación del compuesto bifásico para la regeneración de tejido óseo.

6.1.2 Síntesis a pH (10-11)

La HAP para una relación molar de Ca/P igual a 1.67, funcional para ser usada como bioceámico, se sintetizó, por el método de coprecipitación, a un pH alcalino, por arriba de 10, con

una temperatura de cristalización a 700 °C por 14 h. Su análisis de DRX mostró una fase sin formación de adicionales, identificada como hidroxiapatita, y fue corroborada por su espectro de FTIR; lo que coincide con los datos de la literatura [Jang *et al.*, 2016; Trinkunaite-Felsen *et al.*, 2014]. El análisis químico, por medio de EDS confirmó los resultados, con la obtención de un valor para la relación atómica de Ca/P de 1.65, relacionada al, 1.67 de la HAP estequiométrica. El tamaño de partícula, de 23 nm para a_0 y 44 nm para c_0 , semejante al del hueso, de aproximadamente ($50 \times 25 \times 2$) nm en forma cilíndrica [Jang *et al.*, 2015; Trinkunaite *et al.*, 2014; Ou *et al.*, 2013; Martínez, 2008; Dorozhkin, 2007; Fathi y Hanifi, 2007; Sadat *et al.*, 2013].

6.2 MATERIAL COMPUESTO HAP-PLA

6.2.1 Dispersión por medio de PVA

La integración de la HAP, hidrofóbica con el PLA, hidrofílico, representó un reto en su unión para integrar el material compuesto. La experimentación con varios métodos ayudó en la dispersión a través del proceso de emulsión sólido-aceite-agua, s-o-w (por sus siglas en ingles), por medio del PVA utilizado, como surfactante. El PVA generó la formación de microesferas de PLA, encapsulando a la HAP, por medio de la formación de una interfase entre ambos compuestos, lo que no se obtuvo de forma individual, lo que se corroboró varias publicaciones [Lin *et al.*, 2008; Russias *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2012; Laurencin *et al.*; 1997; O'Donnell y McGinity, 1997; Murakami *et al.*, 2000]. (En el Anexo 3.2 se describen las pruebas de integración del compuesto HAP-PLA por medio de HSA).

La eliminación de las sustancias que, permitieron la integración del material compuesto HAP-PLA, fue otro reto del trabajo presente, debido al riesgo de toxicidad que provocan en el cuerpo, tanto del surfactante como el solvente, en este caso se usó el diclorometano [Nagata y Miyajima, 2008; O'Donnell y McGinity, 1997; Zhou *et al.*, 2012]. Por medio del registro de FTIR se comprobó, la remoción de ambos.

6.3 CONFORMADO POR EXTRUSIÓN DEL MATERIAL COMPUESTO (HAP-PLA)

En el proceso posterior de conformado por extrusión, la formación de huecos o discontinuidades son indeseables en la línea de construcción; por lo que, el material compuesto de HAP-PLA (50 % m/m HAP) requirió una distribución uniforme, logrado por el método de emulsión sólido-aceite-agua, observado por microscopía óptica. El análisis por MEB mostró, durante la incorporación de los compuestos, la formación de aglomerados pequeños, lo que atribuyó a la dispersión de la HAP al final del proceso de goteo, observando que, el área de contacto con la disolución de PVA disminuyó conforme aumentó la formación del material compuesto en la emulsión. El análisis EDS en % peso mostró que la cantidad promedio de Ca, asociado a la HAP, fue de 52 % m/m y la de C, relacionado con el PLA, del 48 % m/m; esta proporción es cercana a la esperada de 50 % m/m de HAP, lo que indica la integración eficaz entre los componentes por el método sólido-aceite-agua. Con el análisis por FTIR se corroboró que, la HAP embebida en la matriz polimérica no sufrió alteraciones después del proceso de su integración.

El conformado por extrusión del material compuesto HAP-PLA se realizó en las proporciones de (50 y 70) % m/m. Con la primera, se realizó la impresión en 3D, y los resultados expuestos a continuación corresponden a la ella.

El material HAP-PLA se extruyó para obtener, un filamento con un diámetro constante de (1.7 ± 0.05) mm, a 150 °C. El cual mostró uniformidad de la HAP distribuida en el PLA, en algunas micrografías, por MEB se observó acumulación de HAP en la superficie del filamento. A temperaturas, por arriba de los 150 °C se logró un flujo rápido, lo que provocó la disminución en su diámetro, con una velocidad de solidificación de (30-60) s. Por debajo de los 150 °C, el flujo fue errático, se produjo un filamento irregular, solidificado inmediatamente por tramos.

6.4 IMPRESIÓN 3D DEL MATERIAL COMPUESTO HAP-PLA

El filamento de material compuesto HAP-PLA, con un diámetro de 1.7 mm, soportó el proceso de impresión 3D, a un flujo constante y, a una velocidad de 40 mm/s. Las condiciones adecuadas para la impresión 3D se determinaron a una temperatura de 230 °C, debido al proceso de degradación del PLA (ver tabla 2) porque su temperatura de descomposición es por arriba de

los 240 °C, según la literatura, lo que provoca la pérdida del polímero y la concentración del cerámico, dando como consecuencia un material frágil, en ocasiones incapaz de fluir [Li *et al.*, 2009; Zhou y Xanthos, 2009; Signori *et al.*, 2009; Bishai *et al.*, 2013]. Las probetas impresas por 3D, observadas, por MO corroboró estas condiciones de impresión, ya que, se observó un andamio con unión entre capas y líneas de construcción continuas, como una consecuencia del empate entre la temperatura y la velocidad de construcción.

6.4.1 Pruebas mecánicas

Resistencia a la compresión

El andamio de HAP-PLA en el ensayo de compresión obtuvo una resistencia de 11.4 MPa, en contraste con el hueso cortical humano de 131 a 205 MPa y con el esponjoso de 2 a 153 MPa (Ver tabla 1) [Wang *et al.*, 2016; Mirzaali *et al.*, 2015; Pal S., 2014; Nejati *et al.*, 2008]. La diferencia en los valores de resistencia se atribuye a la forma de la probeta con rejilla interior y a las discontinuidades presentes durante el proceso de construcción que provocan la fractura a un esfuerzo menor. En contraste, los andamios 3D porosos, de otros autores, presentaron un rendimiento igual o mayor, con una resistencia de (0.44 a 8.67) MPa [Chandrasekhar *et al.*, 2005; Nejati *et al.*, 2008; (B) Wang *et al.*, 2010]. La falla por fractura frágil, observada por MEB, reflejó un comportamiento mecánico similar al componente cerámico.

Resistencia a la tensión

Las probetas del material compuesto HAP-PLA, por impresión 3D, sometidas a las pruebas de tensión, dieron una resistencia máxima a la tensión de 38.5 MPa. El hueso cortical humano presenta una resistencia a la tensión transversa de (53 ± 10.7) MPa y longitudinal de (135 ± 15.6) MPa, mientras el esponjoso, de (92.95 ± 10.07) MPa [Wang *et al.*, 2016; Mirzaali *et al.*, 2015; Pal S., 2014]. La resistencia a la tensión publicada, por otros autores, fue de (17.4 a 38.3) MPa; cifra igual o menor a la obtenida en este trabajo [Wang *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2008; Jeong *et al.*, 2008]. El valor de la resistencia del trabajo presente se pretende mejorar al corregir los errores introducidos, durante la construcción de la probeta; así como a la deposición del material de relleno a 45°, por lo que, se probará el cambio de la orientación del relleno, de tal forma que sea paralela a la aplicación de la fuerza durante la prueba. La micrografía de MEB mostró una falla frágil, en correspondencia, con el tipo de falla obtenida en la prueba de compresión. Esto indica que el comportamiento del material compuesto es similar al de un cerámico.

6.4.2 Medición de dureza

Las pruebas de dureza, del material compuesto HAP-PLA impresos por 3D, proporcionaron valores de 170.2 MPa; valores superiores en comparación a los 40 MPa, de los andamios de composición similar, conformados por robocasting, [Russias *et al.*, 2007]. Aunque, inferiores al hueso cortical humano de 548 MPa, superior en un 320 %, y al esponjoso de (395 a 455) MPa, superior en un 230 % [Wang *et al.*, 2016; Mirzaali *et al.*, 2015; Pal S., 2014]. Por lo cual, se propone mejorar el método de construcción, para alcanzar la estructura presente en el hueso.

6.4.3 Pruebas *in vitro*

El comportamiento del andamio de HAP-PLA en las pruebas *in vitro*, después de tres semanas en el líquido SBF, por MEB, mostró degradación en la superficie con la disolución del PLA, junto con la formación de porosidad sobre las líneas de impresión, como se puede contrastar entre las figuras 28 a y 37 b. El microanálisis elemental determinó que la proporción en la probeta de HAP disminuyó a un 27 % m/m, en promedio; con una relación Ca/P de 1.5 (ver tabla 1, Anexo 1).

7. CONCLUSIONES

En este trabajo se logró producir de forma satisfactoria un método de fabricación de andamios para la regeneración ósea, con base en compuestos biocompatibles de HAP y PLA, por el proceso de impresión 3D, de acuerdo con las conclusiones siguientes:

La síntesis de la HAP, por el método de coprecipitación, con el control de las condiciones de síntesis a un pH alcalino y una temperatura de cristalización mínima de 700 °C, produjo una n-HAP pura con un tamaño de partícula de 22 nm, semejante al tamaño del hueso. Característica necesaria para su integración con el PLA y así formar un biomaterial compuesto para la conformación de andamios, por impresión 3D, adecuados para la sustitución ósea.

Las condiciones de síntesis para la n-HAP a un pH menor a 7 y cristalizada a 1000 °C, resultaron en la formación de un compuesto bifásico, constituido por n-HAP y b-TCP, con un tamaño de partícula de 102 nm, aproximadamente 50% mayor al del hueso humano; independiente del tamaño obtenido, el fosfato de calcio bifásico se ha reportado como un biomaterial apto para su uso en aplicaciones óseas.

El material compuesto HAP-PLA se integró por método de emulsión agua-aceite-agua, a través del PVA, para su adaptación con el proceso de extrusión. La distribución uniforme de la HAP en la matriz polimérica, corroborado por MEB, mejora las propiedades mecánicas del biomaterial HAP-PLA, necesarias para producir un filamento apto para ser usado en el proceso de impresión 3D. Este es un método capaz de eliminar el surfactante, disminuyendo la posibilidad de causar una respuesta dañina dentro del cuerpo, lo que hace al compuesto HAP-PLA factible como biomaterial.

La impresión 3D del andamio HAP-PLA, con un 50 % m/m de HAP, resultó funcional para la elaboración de andamios para reemplazo óseo, con porosidad y arquitectura controlada, generando una técnica de construcción adaptable y replicable.

La caracterización, desde la síntesis de la n-HAP hasta el conformado, del andamio por impresión 3D fue satisfactoria y necesaria para corroborar la obtención de las características requeridas durante cada paso del procesamiento.

En la continuación del proyecto ayudarían las propuestas siguientes:

- El análisis calorimétrico de los materiales antes y después de ser transformados para determinar los procesos de degradación y, las transiciones en función de la temperatura. Mejorando de esta manera el proceso de extrusión del filamento, punto determinante para la obtención de un buen andamio.
- Optimizar el proceso de impresión 3D, comprobando la relación entre rapidez y temperatura, por medio de un diseño experimental estadístico.
- Realizar las mediciones de rugosidad de la superficie del andamio para corroborar su viabilidad en la adhesión de las células, así como realizar las pruebas de comportamiento in vivo.

REFERENCIAS

- (1) Albrektsson, T., & Johansson, C. (2001). *Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration*. *European Spine Journal*, 10(2), S96-S101.
- (2) Almeida, C. R., Serra, T., Oliveira, M. I., Planell, J. A., Barbosa, M. A., & Navarro, M. (2014). *Impact of 3-D printed PLA-and chitosan-based scaffolds on human monocyte/macrophage responses: unraveling the effect of 3-D structures on inflammation*. *Acta Biomaterialia*, 10(2), 613-622.
- (3) Andreas Saar. (2016). *New end-to-end additive manufacturing solutions to revolutionize product development*. Siemens PLM Community. Recuperado de <https://community.plm.automation.siemens.com/t5/News-NX-Manufacturing/New-end-to-end-additive-manufacturing-solutions-to-revolutionize/ba-p/370615> [Consultado: 09/02/2018]
- (4) *Angiogénesis*. (2012). En *Diccionario de Términos Médicos*. Recuperado de <http://dtme.ranm.es/dtm/ver.php?id=18046&cual=1> [Consultado: 16/01/18]
- (5) Arsad M. S., Lee P. M., Hung L. K. (2011). *Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanoparticles and β -TCP particles*. Proc. In 2nd International Conference on Biotechnology and Food Science, 7:184-188).
- (6) Balamurugan A., S. Kannan, S. Rajeswari. (2002). *Bioactive sol-gel hydroxyapatite surface for biomedical application - in vitro study*. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, 16, 18.
- (7) Batchelder, J. S., & Crump, S. S. (1999). *U.S. Patent No. 5,866,058*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- (8) Benahmed, M., Bouler, J. M., Heymann, D., Gan, O., & Daculsi, G. (1996). *Biodegradation of synthetic biphasic calcium phosphate by human monocytes in vitro: a morphological study*. *Biomaterials*, 17(22), 2173-2178.
- (9) Bezzi, G., Celotti, G., Landi, E., La Torretta, T. M. G., Sopyan, I., & Tampieri, A. (2003). *A novel sol-gel technique for hydroxyapatite preparation*. *Materials Chemistry and Physics*, 78(3), 816-824.
- (10) *Bioactivo*. (2012). En *Diccionario de Términos Médicos*. Recuperado de http://dtme.ranm.es/buscador.aspx?NIVEL_BUS=3&LEMA_BUS=bioactivo [Consultado: 16/01/18]

- (11) *Biocompatible*. (2012). En Diccionario de Términos Médicos. Recuperado de http://dtme.ranm.es/buscador.aspx?NIVEL_BUS=3&LEMA_BUS=biocompatible [Consultado: 16/01/18]
- (12) *Biodegradable*. (2012). En Diccionario de Términos Médicos. Recuperado de <http://dtme.ranm.es/dtm/ver.php?id=38459> [Consultado: 16/01/18].
- (13) Bishai, M., De, S., Adhikari, B., & Banerjee, R. (2013). *Copolymerization of lactic acid for cost-effective PLA synthesis and studies on its improved characteristics*. Food Science and Biotechnology, 22(1), 73-77.
- (14) Black, J. T., & Kohser, R. A. (2017). *DeGarmo's materials and processes in manufacturing*. John Wiley & Sons, 345.
- (15) Bose, S., Vahabzadeh, S., & Bandyopadhyay, A. (2013). *Bone tissue engineering using 3D printing*. Materials Today, 16(12), 496-504.
- (16) Bronzino, Joseph D. (1995). *The Biomedical Engineering Handbook*. Ed. CRC Press in Cooperation with IEEE Press, Boca Raton, FL.
- (17) Callister, W. D. (2002). *Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales* (Vol. 1). Reverté. Pg. 69, 102, 198.
- (18) Castro-Aguirre, E., Iñiguez-Franco, F., Samsudin, H., Fang, X., & Auras, R. (2016). *Poly (lactic acid)—Mass production, processing, industrial applications, and end of life*. Advanced Drug Delivery Reviews, 107, 333-366.
- (19) Childers, E. P., Wang, M. O., Becker, M. L., Fisher, J. P., & Dean, D. (2015). *3D printing of resorbable poly (propylene fumarate) tissue engineering scaffolds*. Mrs Bulletin, 40(2), 119-126.
- (20) Cox, S. C., Thornby, J. A., Gibbons, G. J., Williams, M. A., & Mallick, K. K. (2015). *3D printing of porous hydroxyapatite scaffolds intended for use in bone tissue engineering applications*. Materials Science and Engineering: C, 47, 237-247.
- (21) Cross, L. M., Thakur, A., Jalili, N. A., Detamore, M., & Gaharwar, A. K. (2016). *Nanoengineered biomaterials for repair and regeneration of orthopedic tissue interfaces*. Acta Biomaterialia, 42, 2-17.
- (22) Crump, S. S. (1992). *U.S. Patent No. 5,121,329*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- (23) David J. Dandy, Edwards Dennis J. (2011). *Ortopedia y traumatología*. Editorial El Manual Moderno, cap. 9.
- (24) Ding, M., Andreasen, C. M., Dencker, M. L., Jensen, A. E., Theilgaard, N., & Overgaard, S.

- (2015). *Efficacy of a small cell-binding peptide coated hydroxyapatite substitute on bone formation and implant fixation in sheep*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 103(4), 1357-1365.
- (25) Dorozhkin Sergey V. (2007). *Calcium orthophosphates*. Journal of Materials Science, 42.4: 1061-1095.
- (26) Dudek, P. (2013). *FDM 3D printing technology in manufacturing composite elements*. Archives of Metallurgy and Materials, 58(4), 1415-1418.
- (27) Ebrahimi, M., Botelho, M. G., & Dorozhkin, S. V. (2016). *Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP): concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research*. Materials Science and Engineering: C.
- (28) Eckel, Z. C., Zhou, C., Martin, J. H., Jacobsen, A. J., Carter, W. B., & Schaedler, T. A. (2016). *Additive manufacturing of polymer-derived ceramics*. Science, 351(6268), 58-62.
- (29) Fathi M. H., Hanifi A. (2007). *Evaluation and characterization of nanostructure hydroxyapatite powder prepared by simple sol-gel method*. Materials Letters, 61.18: 3978-3983.
- (30) Fierz, F. C., Beckmann, F., Huser, M., Irsen, S. H., Leukers, B., Witte, F., ... & Müller, B. (2008). *The morphology of anisotropic 3D-printed hydroxyapatite scaffolds*. Biomaterials, 29(28), 3799-3806.
- (31) García, C. P., Paucar, C., Gaviria, J., & Durán, A. (2005). *Effect of some physical-chemical variables in the synthesis of hydroxyapatite by the precipitation route*. In Key Engineering Materials (Vol. 284, pp. 47-50). Trans Tech Publications
- (32) Gbureck, U., Hölzel, T., Doillon, C. J., Mueller, F. A., & Barralet, J. E. (2007). *Direct printing of bioceramic implants with spatially localized angiogenic factors*. Advanced Materials, 19(6), 795-800.
- (33) Geetha, M., Singh, A. K., Asokamani, R., & Gogia, A. K. (2009). *Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants—a review*. Progress in Materials Science, 54(3), 397-425.
- (34) Gentile, P., Chiono, V., Carmagnola, I., & Hatton, P. V. (2014). *An overview of poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering*. International Journal of Molecular Sciences, 15(3), 3640-3659.
- (35) Gopi D., L. Kavitha, D. Rajeswari. (2016). *Synthesis of Pure and Substituted Hydroxyapatite Nanoparticles by Cost Effective Facile Methods*. Handbook of Nanoparticles, p. 167-190.
- (36) Guo, Y. P., Guan, J. J., Yang, J., Wang, Y., Zhang, C. Q., & Ke, Q. F. (2015). *Hybrid nanostructured hydroxyapatite-chitosan composite scaffold: bioinspired fabrication, mechanical properties and biological properties*. Journal of Materials Chemistry B, 3(23), 4679-4689.

- (37) Hadi, A. M., Yilmaz, B., McGlumphy, E., Brantley, W. A., & Johnston, W. M. (2018). *Distortion of CAD-CAM-fabricated implant-fixed titanium and zirconia complete dental prosthesis frameworks*. Journal of Prosthetic Dentistry, 119(1), 116-123.
- (38) *Histocompatibilidad*. (2018). En Spanish Oxford Living Dictionaries. Recuperado de <https://es.oxforddictionaries.com/definicion/histocompatibilidad> [Consultado: 16/01/18]
- (39) Hubbell Jeffrey A. (1995). *Biomaterials in tissue engineering*. Nature Biotechnology, 13.6: 565-576.
- (40) Hutmacher, D. W. (2006). *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*. In The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium (pp. 175-189).
- (41) *Inerte*. (2012). En Diccionario de Términos Médicos. Recuperado de <http://dtme.ranm.es/dtm/ver.php?id=118900> [Consultado: 16/01/18]
- (42) Inzana, J. A., Schwarz, E. M., Kates, S. L., & Awad, H. A. (2016). *Biomaterials approaches to treating implant-associated osteomyelitis*. Biomaterials, 81, 58-71.
- (43) Jang, H. L., Lee, H. K., Jin, K., Ahn, H. Y., Lee, H. E., & Nam, K. T. (2015). *Phase transformation from hydroxyapatite to the secondary bone mineral, whitlockite*. Journal of Materials Chemistry B, 3(7), 1342-1349.
- (44) Jeong, S. I., Ko, E. K., Yum, J., Jung, C. H., Lee, Y. M., & Shin, H. (2008). *Nanofibrous poly (lactic acid)/hydroxyapatite composite scaffolds for guided tissue regeneration*. Macromolecular Bioscience, 8(4), 328-338.
- (45) Johnson, A. J. W., & Herschler, B. A. (2011). *A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair*. Acta Biomaterialia, 7(1), 16-30.
- (46) Kim Hae-Won, Hae-Hyoung Lee, J. C. Knowles. (2006). *Electrospinning biomedical nanocomposite fibers of hydroxyapatite/poly (lactic acid) for bone regeneration*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 79.3: 643-649.
- (47) Kivrak, N., & Taş, A. C. (1998). *Synthesis of calcium hydroxyapatite-tricalcium phosphate (HA-TCP) composite bioceramic powders and their sintering behavior*. Journal of the American Ceramic Society, 81(9), 2245-2252.
- (48) Kokubo, T., & Takadama, H. (2006). *How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?*. Biomaterials, 27(15), 2907-2915.

- (49) Kruse A., Jung R. E., Nicholls F., Zwahlen R. A., Hämmerle C. H. F., Weber F. E. (2011). *Bone regeneration in the presence of a synthetic hydroxyapatite/silica oxide-based and a xenogenic hydroxyapatite-based bone substitute material*. *Clinical Oral Implants Research*, 22.5: 506-511.
- (50) Knyazev A. V., Chernorukov N. G., Bulanov E. N. (2012). *Apatite-structured compounds: Synthesis and high-temperature investigation*. *Materials Chemistry and Physics*, 132.2: 773-781.
- (51) Kothapalli, C. R., Shaw, M. T., & Wei, M. (2005). *Biodegradable HA-PLA 3-D porous scaffolds: effect of nano-sized filler content on scaffold properties*. *Acta Biomaterialia*, 1(6), 653-662.
- (52) Lambert, Phil. (2014). *Tensile properties of materials: FDM printer & SLS printer*. *Sculpteo*. Recuperado de <https://www.sculpteo.com/blog/2014/05/14/material-considerations-choose-right-plastic-production-method-part-2/> [Consultado: 09/02/2018]
- (53) Lasprilla, A. J. R., Martinez, G. A. R., & Hoss, B. (2011). *Synthesis and Characterization of Poly (lactic acid) for Use in Biomedical Field*. *Chemical Engineering*, 24, 985-990.
- (54) Laurencin, C. T., Devin, J., & Attawia, M. (1997). *U.S. Patent No. 5,626,861*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- (54) Layrolle, P., Ito, A., & Tateishi, T. (1998). *Sol-Gel Synthesis of Amorphous Calcium Phosphate and Sintering into Microporous Hydroxyapatite Bioceramics*. *Journal of the American Ceramic Society*, 81(6), 1421-1428.
- (55) Lee, M., Dunn, J. C., & Wu, B. M. (2005). *Scaffold fabrication by indirect three-dimensional printing*. *Biomaterials*, 26(20), 4281-4289.
- (56) León B., J.A. Jansen. (2009). *In: Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants*. Springer Science + Business Media, LLC, 26.
- (57) Li, J., Lu, X. L., & Zheng, Y. F. (2008). *Effect of surface modified hydroxyapatite on the tensile property improvement of HA/PLA composite*. *Applied Surface Science*, 255(2), 494-497.
- (58) Li, J., Zheng, W., Li, L., Zheng, Y., & Lou, X. (2009). *Thermal degradation kinetics of g-HA/PLA composite*. *Thermochimica Acta*, 493(1-2), 90-95.
- (59) Lin, L. C., Chang, S. J., Kuo, S. M., Niu, G. C. C., Keng, H. K., & Tsai, P. H. (2008). *Preparation and evaluation of β -TCP/poly(lactide) microspheres as osteogenesis materials*. *Journal of Applied Polymer Science*, 108(5), 3210-3217.
- (60) Markovic M., Fowler B. O., Tung M. S. (2004). *Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite reference material*. *Journal of research of the National Institute of Standards*

and Technology, 109.6, 553.

- (61) Mathieu, L. M., Mueller, T. L., Bourban, P. E., Pioletti, D. P., Müller, R., & Manson, J. A. E. (2006). *Architecture and properties of anisotropic polymer composite scaffolds for bone tissue engineering*. *Biomaterials*, 27(6), 905-916.
- (62) Mirzaali, M. J., Schwiedrzik, J. J., Thaiwichai, S., Best, J. P., Michler, J., Zysset, P. K., & Wolfram, U. (2016). *Mechanical properties of cortical bone and their relationships with age, gender, composition and microindentation properties in the elderly*. *Bone*, 93, 196-211.
- (63) Mobasherpour, I., Heshajin, M. S., Kazemzadeh, A., & Zakeri, M. (2007). *Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by using precipitation method*. *Journal of Alloys and Compounds*, 430(1), 330-333.
- (64) Mohandes, F., y Salavati-Niasari, M. (2014). *Particle size and shape modification of hydroxyapatite nanostructures synthesized via a complexing agent-assisted route*. *Materials Science and Engineering: C*, 40, 288-298.
- (65) Murakami, H., Kobayashi, M., Takeuchi, H., & Kawashima, Y. (2000). *Further application of a modified spontaneous emulsification solvent diffusion method to various types of PLGA and PLA polymers for preparation of nanoparticles*. *Powder Technology*, 107(1-2), 137-143.
- (66) Naderi, H., Matin, M. M., & Bahrami, A. R. (2011). *Critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems*. *Journal of biomaterials applications*, 26(4), 383-417.
- (67) Nagata, F., & Miyajima, T. (2008). *Fabrication of poly (D, L-lactide)/apatite nanocomposites through a modified surfactant-free process*. In *Key Engineering Materials* (Vol. 361, pp. 523-526). Trans Tech Publications.
- (68) Narayanan, G., Vernekar, V. N., Kuyinu, E. L., & Laurencin, C. T. (2016). *Poly (lactic acid)-based biomaterials for orthopaedic regenerative engineering*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107, 247-276.
- (69) Nayak A. K. (2010). *Hydroxyapatite synthesis methodologies: an overview*. *International Journal of ChemTech Research*, 2.2: 903-907.
- (70) O'Donnell, P. B., & McGinity, J. W. (1997). *Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 28(1), 25-42.
- (71) Olsen Eugene, D. (1990). *Métodos ópticos de análisis*. Reverte Editorial, Barcelona, España, Capítulo, 1, 21-24.

- (72) *Osteoinducción* (2015). En Diccionario Médico Clínica Universidad de Navarra. Recuperado de <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/osteinducción> [Consultado: 16/01/18]
- (73) Ou S. F., Chiou S. Y., Ou K. L. (2013). *Phase transformation on hydroxyapatite decomposition*. *Ceramics International*, 39.4, 3809-3816.
- (74) Pal, S. (2016). *Design of artificial human joints & organs*. Springer, 30.
- (75) Park, J. Y., Gao, G., Jang, J., & Cho, D. W. (2016). *3D printed structures for delivery of biomolecules and cells: tissue repair and regeneration*. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(47), 7521-7539.
- (76) Pereira, V. A., de Arruda, I. N. Q., & Stefani, R. (2015). *Active chitosan/PVA films with anthocyanins from Brassica oleraceae (Red Cabbage) as time-temperature indicators for application in intelligent food packaging*. *Food Hydrocolloids*, 43, 180-188.
- (77) Prakasam, M., Locs, J., Salma-Ancane, K., Loca, D., Largeteau, A., & Berzina-Cimdina, L. (2015). *Fabrication, properties and applications of dense hydroxyapatite: a review*. *Journal of Functional Biomaterials*, 6(4), 1099-1140.
- (78) Pramanik, S., Agarwal, A. K., Rai, K. N., & Garg, A. (2007). *Development of high strength hydroxyapatite by solid-state-sintering process*. *Ceramics International*, 33(3), 419-426.
- (79) Qazi, T. H., Mooney, D. J., Pumberger, M., Geissler, S., & Duda, G. N. (2015). *Biomaterials based strategies for skeletal muscle tissue engineering: existing technologies and future trends*. *Biomaterials*, 53, 502-521.
- (80) Qi, C., Lin, J., Fu, L. H., & Huang, P. (2018). *Calcium-based biomaterials for diagnosis, treatment, and theranostics*. *Chemical Society Reviews*.
- (81) Rahimizadeh, A., Nourmohammadi, Z., Arabnejad, S., Tanzer, M., & Pasini, D. (2018). *Porous architected biomaterial for a tibial-knee implant with minimum bone resorption and bone-implant interface micromotion*. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 78, 465-479.
- (82) Ramay, H. R., & Zhang, M. (2004). *Biphasic calcium phosphate nanocomposite porous scaffolds for load-bearing bone tissue engineering*. *Biomaterials*, 25(21), 5171-5180.
- (83) Ramot, Y., Haim-Zada, M., Domb, A. J., & Nyska, A. (2016). *Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107, 153-162.
- (84) *Reabsorción*. (2012). En Diccionario de Términos Médicos. Recuperado de http://dtme.ranm.es/buscar.aspx?NIVEL_BUS=3&LEMA_BUS=bioreabsorci%C3%B3n [Consultado: 16/01/18]
- (85) Roach, P., Eglin, D., Rohde, K., & Perry, C. C. (2007). *Modern biomaterials: a review—bulk*

- properties and implications of surface modifications*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 18(7), 1263-1277.
- (86) Rogel M. R., Qiu H., Ameer G. A. (2008). *The role of nanocomposites in bone regeneration*. Journal of Materials Chemistry, 18.36: 4233-4241.
- (87) Russias, J., et al. (2007). *Fabrication and in vitro characterization of three-dimensional organic/inorganic scaffolds by robocasting*. Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 83(2), 434-445.
- (88) Sadat-Shojai M., K. Mohammad-Taghi, E. Dinpanah-Khoshodargi, A. Jaishidi. (2013). *Synthesis methods for nanosized hydroxiapatite with diverse structures*. Acta Biomaterialia, 9: 7591-7621.
- (89) Sachlos, E., and J. T. Czernuszka. (2003). *Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds*. European Cells & Materials Journal, 5.29: 39-40.
- (90) Sadat-Shojai, M., Khorasani, M. T., & Jamshidi, A. (2012). *Hydrothermal processing of hydroxyapatite nanoparticles—A Taguchi experimental design approach*. Journal of Crystal Growth, 361, 73-84.
- (91) Santos, M. L., Florentino, A. O., Saeki, M. J., Aparecida, A. H., Fook, M. V., & Guastaldi, A. C. (2005). *Síntese de hidroxapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico*. Eclética Química, 29-35.
- (92) Seitz, H., Rieder, W., Irsen, S., Leukers, B., & Tille, C. (2005). *Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 74(2), 782-788.
- (93) Selvakumar, M., Jaganathan, S. K., Nando, G. B., & Chattopadhyay, S. (2015). *Synthesis and characterization of novel polycarbonate based polyurethane/polymer wrapped hydroxyapatite nanocomposites: mechanical properties, osteoconductivity and biocompatibility*. Journal of biomedical nanotechnology, 11(2), 291-305.
- (94) (A) Serra, T., Mateos-Timoneda, M. A., Planell, J. A., & Navarro, M. (2013). *3D printed PLA-based scaffolds: a versatile tool in regenerative medicine*. Organogenesis, 9(4), 239-244.
- (95) (B) Serra, T., Planell, J. A., & Navarro, M. (2013). *High-resolution PLA-based composite scaffolds via 3-D printing technology*. Acta Biomaterialia, 9(3), 5521-5530.
- (96) Sequeda, L. G., Díaz, J. M., Gutiérrez, S. J., Perdomo, S. J., & Gómez, O. L. (2012). *Obtención*

- de hidroxiapatita sintética por tres métodos diferentes y su caracterización para ser utilizada como sustituto óseo*. Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas, 41(1), 50.
- (97) Sharma B. and S. Varghese. (2016). *Progress in orthopedic biomaterials and drug delivery*. Drug Delivery and Translational Research, 6 (2), 75–76.
- (98) Shen, Y., Peng, B., Yang, Y., Ma, J., & Haapasalo, M. (2015). *What do different tests tell about the mechanical and biological properties of bioceramic materials?*. Endodontic Topics, 32(1), 47-85.
- (99) Shiraishi, I., Yamagishi, M., Hamaoka, K., Fukuzawa, M., & Yagihara, T. (2010). *Simulative operation on congenital heart disease using rubber-like urethane stereolithographic biomodels based on 3D datasets of multislice computed tomography*. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, 37(2), 302-306.
- (100) Signori, F., Coltelli, M. B., & Bronco, S. (2009). *Thermal degradation of poly (lactic acid)(PLA) and poly (butylene adipate-co-terephthalate)(PBAT) and their blends upon melt processing*. Polymer Degradation and Stability, 94(1), 74-82.
- (101) Silberman Fernando S., Oscar Varaona. (2011). *Ortopedia y Traumatología*. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, p. 425-230.
- (102) Sivakumar M., T.S.S. Kumar, K.L. Shantha, K.P. Rao. (1996). *Development of hydroxyapatite derived from Indian coral*. Biomaterials, 17, 1709.
- (103) Snu R&DB Foundation (2015). *Whitlockite and method for manufacturing the same, US 20140044966A1*. Estados Unidos: Patent Application Publication.
- (104) Sterling Drug Inc. (1977). *Un procedimiento para la obtención de un producto de whitlockita, 863.721*. Estados Unidos: Ministerio de Industria y Energía.
- (105) Sui, G., Yang, X., Mei, F., Hu, X., Chen, G., Deng, X., & Ryu, S. (2007). *Poly-L-lactic acid/hydroxyapatite hybrid membrane for bone tissue regeneration*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 82(2), 445-454.
- (106) Sumner, D. R. (2015). *Long-term implant fixation and stress-shielding in total hip replacement*. Journal of Biomechanics, 48(5), 797-800.
- (107) Šupová, M. (2015). *Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: a review*. Ceramics International, 41(8), 9203-9231.
- (108) Surmenev, R. A., Surmeneva, M. A., & Ivanova, A. A. (2014). *Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis—A review*. Acta Biomaterialia, 10(2), 557-579.

- (109) Taboas, J. M., Maddox, R. D., Krebsbach, P. H., & Hollister, S. J. (2003). *Indirect solid free form fabrication of local and global porous, biomimetic and composite 3D polymer-ceramic scaffolds*. *Biomaterials*, 24(1), 181-194.
- (110) Tadic, D., & Epple, M. (2003). *Mechanically stable implants of synthetic bone mineral by cold isostatic pressing*. *Biomaterials*, 24(25), 4565-4571.
- (111) Tahri, M., Solati-Hashjin, M., & Eslami, H. (2008). *Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanocrystals via chemical precipitation technique*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(2), 127-134.
- (112) Tang, D., Tare, R. S., Yang, L. Y., Williams, D. F., Ou, K. L., & Oreffo, R. O. (2016). *Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration*. *Biomaterials*, 83, 363-382.
- (113) Teoh, S. H. (2000). *Fatigue of biomaterials: a review*. *International Journal Fatigue*, 22.10: 825-837.
- (114) Trinkunaite-Felsen J., Stankeviciut, Z., Yang J. C., Yang T. C., Beganskiene A., Kareiva A. (2014). *Calcium hydroxyapatite/whitlockite obtained from dairy products: Simple, environmentally benign and green preparation technology*. *Ceramics International*, 40.8, 12717-12722.
- (115) Ulrich Welsch y Johannes Sobatta. (2008). *Histología*. Ed. Médica Panamericana, 131.
- (116) Vélez, J., Cardona, N., Gómez, J., & López, E. (2014). *Sintesis de hidroxiapatita por combustión a partir del carbonato de calcio obtenido de cascara de huevo de gallina*. *Revista Colombiana de Materiales*, (5), 97-102.
- (117) Venkatesan, J., & Kim, S. K. (2014). *Nano-hydroxyapatite composite biomaterials for bone tissue engineering—a review*. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10(10), 3124-3140.
- (118) Wang D. K., Varanasi, S., Fredericks, P. M., Hill, D. J., Symons, A. L., Whittaker, A. K., & Rasoul, F. (2013). *FT-IR characterization and hydrolysis of PLA-PEG-PLA based copolyester hydrogels with short PLA segments and a cytocompatibility study*. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 51(24), 5163-5176.
- (119) Wang M. (2003) *Developing bioactive composite materials for tissue replacement*. *Biomaterials*, 24.13: 2133-2151.
- (120) (A) Wang P., Li C., Gong H., Jiang X., Wang H., & Li K. (2010). *Effects of synthesis conditions on the morphology of hydroxyapatite nanoparticles produced by wet chemical process*. *Powder Technology*, 203(2), 315-321.

- (121) (B) Wang, Y., Dai, J., Zhang, Q., Xiao, Y., & Lang, M. (2010). *Improved mechanical properties of hydroxyapatite/poly (ϵ -caprolactone) scaffolds by surface modification of hydroxyapatite*. Applied Surface Science, 256(20), 6107-6112.
- (122) Wang, T., Chow, L. C., Frukhtbeyn, S. A., Ting, A. H., Dong, Q., Yang, M., & Mitchell, J. W. (2011). *Improve the strength of PLA/HA composite through the use of surface initiated polymerization and phosphonic acid coupling agent*. Journal of research of the National Institute of Standards and Technology, 116(5), 785.
- (123) Wang, X., Xu, S., Zhou, S., Xu, W., Leary, M., Choong, P., ... & Xie, Y. M. (2016). *Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: a review*. Biomaterials, 83, 127-141.
- (124) Wei, Q., Li, S., Han, C., Li, W., Cheng, L., Hao, L., & Shi, Y. (2015). *Selective laser melting of stainless-steel/nano-hydroxyapatite composites for medical applications: Microstructure, element distribution, crack and mechanical properties*. Journal of Materials Processing Technology, 222, 444-453.
- (125) Wypych, George. (2012). *Handbook of polymers*. ChemTec Publishing, 436-440.
- (126) Xu, J., Zhang, J., Gao, W., Liang, H., Wang, H., & Li, J. (2009). *Preparation of chitosan/PLA blend micro/nanofibers by electrospinning*. Materials Letters, 63(8), 658-660.
- (127) Yoshikawa, H., Tamai, N., Murase, T., & Myoui, A. (2009). *Interconnected porous hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering*. Journal of the Royal Society Interface, rsif-2008.
- (128) Zhou, Q., & Xanthos, M. (2009). *Nanosize and microsize clay effects on the kinetics of the thermal degradation of polylactides*. Polymer Degradation and Stability, 94(3), 327-338.
- (129) Zhou H. y L. Jaebeom. (2011). *Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering*. Acta Biomaterialia, 7: 2769- 2781.
- (130) Zhou, H., Lawrence, J. G., & Bhaduri, S. B. (2012). *Fabrication aspects of PLA-CaP/PLGA-CaP composites for orthopedic applications: a review*. Acta Biomaterialia, 8(6), 1999-2016.
- (131) Zhou, C., Deng, C., Chen, X., Zhao, X., Chen, Y., Fan, Y., & Zhang, X. (2015). *Mechanical and biological properties of the micro-/nano-grain functionally graded hydroxyapatite bioceramics for bone tissue engineering*. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 48, 1-11.

ANEXOS

ANEXO 1

Tabla 1. Relación molar Ca/P y composición química para los fosfatos de calcio.

Ca/P	Siglas	Nombre	Fórmula	Solubilidad
				-log(K5)a
0.5	MCPM	Fosfato monocálcico monohidratado	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ *H ₂ O	1.14
1.0	DCPA	Monetita- Fosfato dicálcico anhídrido	CaHPO ₄	6.9
1.0	DCPD	Brushita- Fosfato dicálcico dihidratado	CaHPO ₄ *2H ₂ O	6.59
1.33	OCP	Fosfato octacálcico	Ca ₈ H ₂ (PO ₄) ₆ *5H ₂ O	96.6
1.5	ACP	Fosfato de calcio amorfo I y II	Ca ₉ (PO ₄) ₆	25.7-32.7
1.5	CDHA	Hidroxiapatita deficiente en calcio	Ca ₃ (PO ₄) ₂	
1.5	β-TCP	β-Fosfato tricálcico	β-Ca ₃ (PO ₄) ₂	28.9
1.5	α-TCP	α-Fosfato tricálcico	α-Ca ₃ (PO ₄) ₂	25.5
1.67	HAP	Hidroxiapatita	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	116.8
1.67	FA	Flourapatita	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ F ₂	120
2.0	TTCP	Fosfato tetracálcico	Ca ₄ (PO ₄) ₂ O	38-44

Tabla 2. Lista de métodos de síntesis para la HAP.

Método	Tamaño de partícula	Fases	Cristalización	Tiempo de síntesis	Característica	Referencias
<i>Estado sólido</i>	Micro	Monetita, HAP, β-TCP	380-1063°C 46-135 MPa	2 días	Diferentes fases.	(Pramanik, 2007)

<i>Hidrotermal</i>	Nano	HAP	600-1000°C 1 atm	2-14 días	Homogeneo. Simple.	(Rival, 2011; Rivera, 2011; Sivakumar, 1996)
<i>Coprecipitación</i>	Nano	HAP, β-TCP, BCP	600-1400°C	2-10 días	Diferentes morfologías. Reproductibilidad. Control condiciones de reacción.	(Wang, 2010; Kivrak, 1998; Benahmed, 1996)
<i>Sol-gel</i>	Nano	HAP, CaO	600°C	2 días	Combinación de fases.	(Gopi, 2008; Fathi, 2007; Balamurugan, 2002)
<i>Calcinación</i>	Micro	HAP, CaO, Ca(OH) ₂	1050°C	2-3 días	Combinación de fases. A partir de cáscara de huevo.	(Velez, 2014)

Tabla 3. Técnicas de AM para el conformado de andamios para tejido óseo.

Técnica	Descripción	Ventajas	Desventajas	Referencias
<i>Robocasting/ Direct ink writing (DIW)</i>	Inyección del material por presión.	Precisión de micrones (distancia entre ejes 500 Micrometros). Polímeros, cerámicos, metales, compuestos. Uso de biotintas, por ser a temperatura ambiente.	Evaporación del solvente para imprimir. Encogimiento por pérdida del solvente.	(B) Serra, 2013. Batchelder y Crump, 1999.
<i>Deposición de material fundido (FDM)</i>	Extrusión del material fundido por temperatura.	Polímeros termoplásticos. Mínima contracción. La técnica más difundida, económica y rápida.	Requiere polímeros termoplásticos. Temperaturas de fundición 190-230°C.	Taboas, 2002. Crump, 1992.

<i>Selective laser sintering (SLS)</i>	Funde polvo termoplástico utilizando un láser CO2.	Polímeros, cerámicos, metales, compuestos. Elevada elongación al quiebre. Resistente al calor y químicos. No requiere soportes.	Temperaturas de sinterizado altas. Mano de obra para posproducción.	Taboas, 2002. Wang, 2016
<i>Estereolitografía (SLA)</i>	Construye capa por capa mediante láser UV que solidifica las resinas o un aglutinante para polvos.	Deposición de aglutinante para cerámica. Cerámicas derivadas de polímeros. Resinas fotosensibles con partículas de cerámicos. No requiere soportes.	Mano de obra para posproducción.	Seitz et al., 2005.

Tabla 4. Cantidad y pureza de las sales utilizadas para preparar 1000 mL de fluido corporal humano (SBF) [Kokubo y Takadama, 2006].

Orden	Reactivo	Cantidad	Pureza (%)
1	NaCl	8.035 g	99.5
2	NaHCO ₃	0.355 g	99.5
3	KCl	0.225 g	99.5
4	K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	0.231 g	99.0
5	MgCl ₂ 6H ₂ O	0.311 g	98.0
6	HCl 1M	39 mL	-----
7	CaCl ₂	0.292 g	95.0
8	Na ₂ SO ₄	0.072 g	99.0
9	Tris	6.118 g	99.0
10	HCl 1M	0-5 mL	-----

1.2 Pruebas mecánicas: ecuaciones.

Se usaron las siguientes ecuaciones para determinar su resistencia máxima a la **tensión** y **compresión**, así como su módulo de Young.

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon}$$

El **módulo de elasticidad E** se definió como la pendiente del segmento lineal del diagrama esfuerzo-deformación correspondiente a la deformación elástica. Donde σ es el esfuerzo a la deformación y ε la deformación.

Se calculó la deformación verdadera con la siguiente ecuación:

$$\varepsilon = \ln(e + 1)$$

Y para el esfuerzo:

$$\sigma = S(1 + e)$$

Dónde:

$$S = \frac{F (kN)}{A (m^2)}$$
$$e = \frac{\Delta l}{l_0}$$

Para la prueba de **dureza Vickers** se uso la relación del largo promedio (d) en la siguiente ecuación:

$$HV = \frac{1.8544 * F(kgf)}{d^2(mm^2)}$$

El resultado se multiplicó por 9.80665 N para transformarlo a unidades de MPa.

ANEXO 2

Desarrollo experimental

2.1 Síntesis de HAP por método sol-gel.

La síntesis de 5 g de HAP por el método de sol-gel (Fathi y Hanifi, 2007) se realizó a partir de una disolución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.67 mol/L (9.85 g en 25 mL de etanol), con una, de pentóxido de fósforo P_2O_5 0.5 mol/L (1.77 g en 25 mL de etanol absoluto), para una relación molar Ca/P=1.67. La cual se mantuvo a temperatura ambiente, por 24 h. El pH de 2, 7 o 9 se controló por medio del NH_4OH , hasta la formación de un gel. Para su posterior reposó a temperatura ambiente, desde 24 a 40 h; se secó a 80°C , por 24 a 72 h. Se estudió el proceso de cristalización en las temperaturas de 600, 700, 800, 900 y 1000°C , y con tiempos de cristalización de 2-16 h (Figura 38).

Se propone la reacción siguiente:

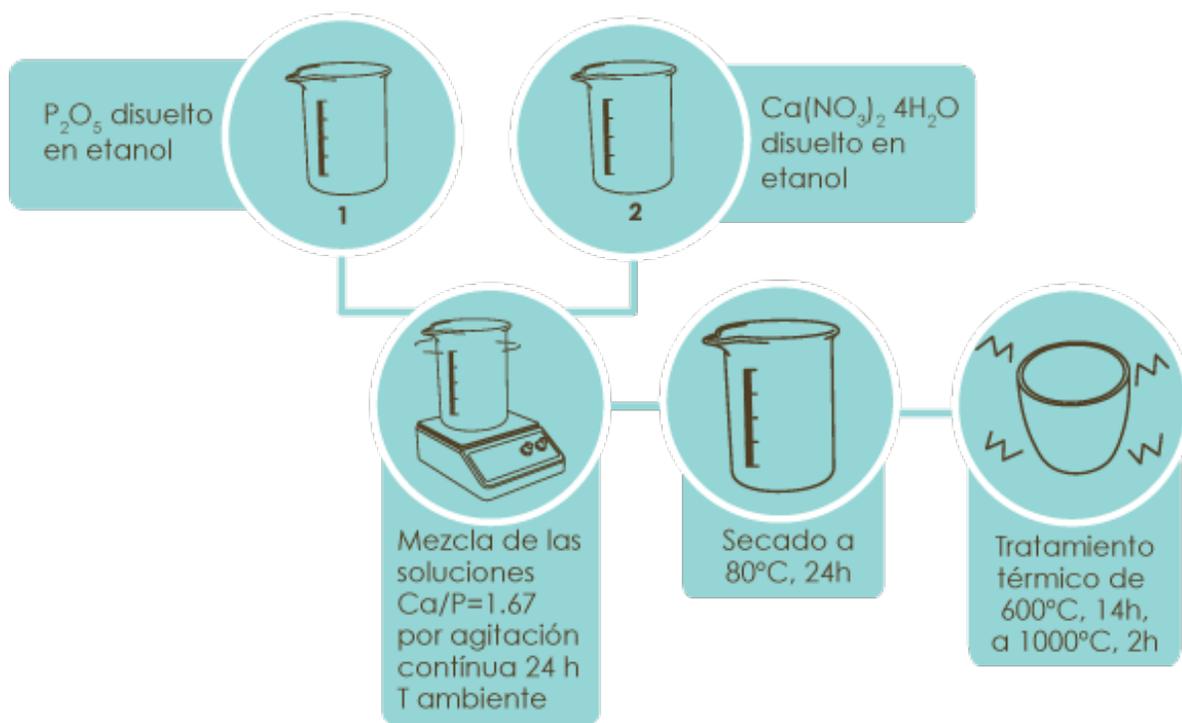
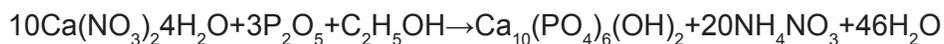


Figura 38. Método sol-gel para la síntesis de nano-hidroxiapatita, n-HAP.

2.2 Conformado del material compuesto HAP-PLA obtenido, por el método de dispersión, con HSA

La formación del material compuesto HAP-PLA, por el método de dispersión usando interface de HSA (Kim, 2006), se realizó disolviendo el surfactante anfifílico HSA en cloroformo o diclorometano a concentraciones desde 0.01 a 0.5% p/v (0.01 g de HSA en 10 mL de cloroformo), la HAP en polvo se dispersó, en la disolución de HSA, en concentraciones desde 5 a 10% p/v (0.5 g de HAP en 10 mL de cloroformo). La solución de PLA se realizó en cloroformo o diclorometano a temperatura ambiente, en concentración de 20% p/v (2 g de PLA en 10 mL de cloroformo), hasta lograr una mezcla homogénea. La HAP dispersa se vertió a la disolución de PLA, manteniendo la agitación hasta la evaporación del solvente. El porcentaje en peso de la HAP en el PLA se realizó de 25-50 p/p (Figura 39).

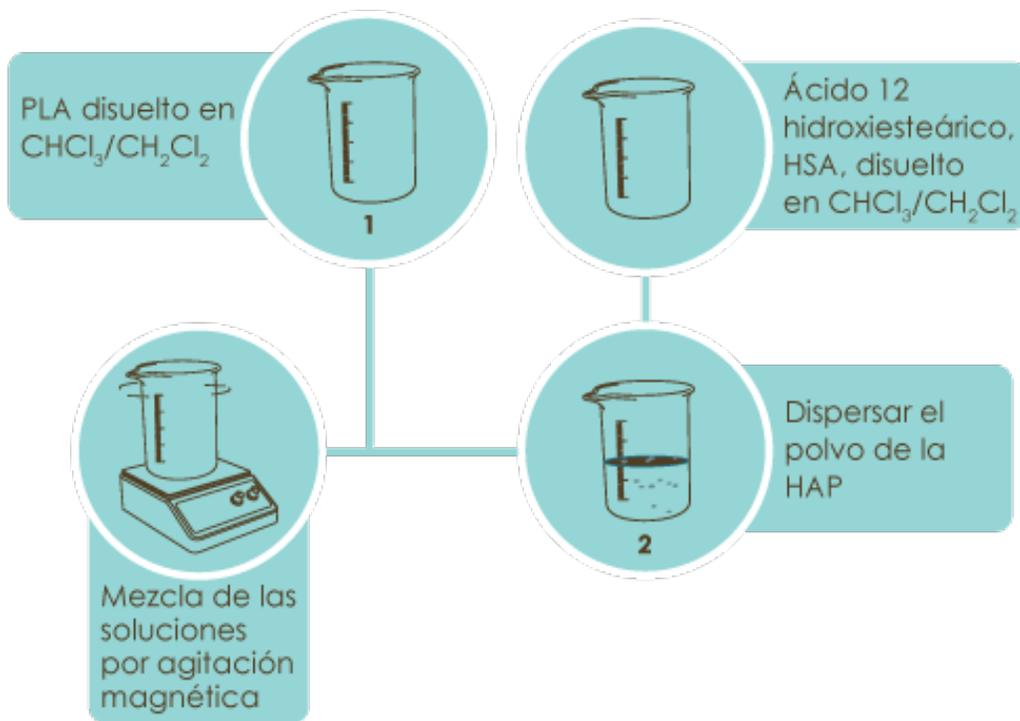


Figura 39. Esquema para la dispersión, de la HAP en el PLA, por el método de HSA.

2.3 Conformado, del material compuesto HAP-PLA, por el método en molde

El compuesto HAP-PLA obtenido, por dispersión con HSA y disuelto en CH_2Cl_2 , fue inyectado en un molde de silicón con medidas de 1.75 mm de diámetro y 200 mm de largo, a temperatura ambiente. Se realizaron inyecciones múltiples para permitir la evaporación del solvente, hasta formar un filamento sólido, durante 48 h. (Figura 40)

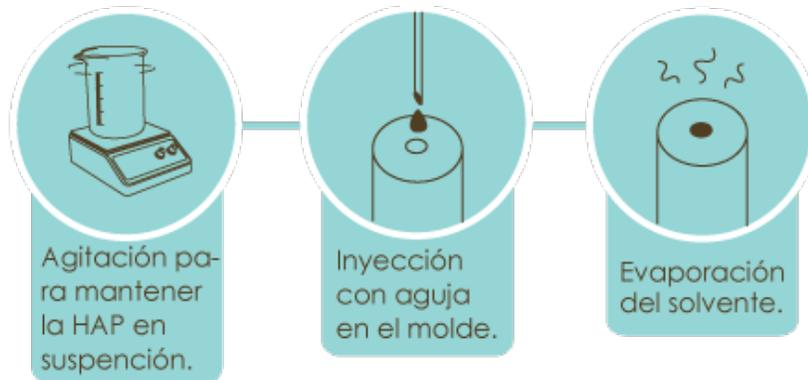


Figura 40. Esquema del conformado del material compuesto HAP-PLA obtenido con HSA, por el método de molde.

ANEXO 3

Resultados

3.1 HAP04-1 sintetizada por el método de sol-gel

DRX

El producto de reacción HAP04-1, por el método sol-gel, se analizó por DRX; las señales observadas indicaron una mezcla de fases, de HAP (JCPDS 01-074-0565), en una proporción mayor, y en, menor las, del óxido de calcio (d_{hkl} (Å): 2.77₃, 2.40_x y 1.70₅, (JCPDS 00-037-1497)) (Figura 41).

El espécimen HAP04 se sometió a una serie de tratamientos térmicos, desde los 600 hasta 1000 °C, con el fin de estudiar su evolución, tanto de la cristalización, como del tamaño de partícula. El análisis por DRX tras el tratamiento térmico, mostró la definición de las señales de la HAP, sin la eliminación del CaO (Figura 42). En cuanto, al tamaño de partícula aumentó en función de la temperatura de 19 nm hasta 115 nm, desde los 600 °C hasta 1000 °C, respectivamente. A pesar del tamaño nanométrico menor, con respecto al, método de coprecipitación.

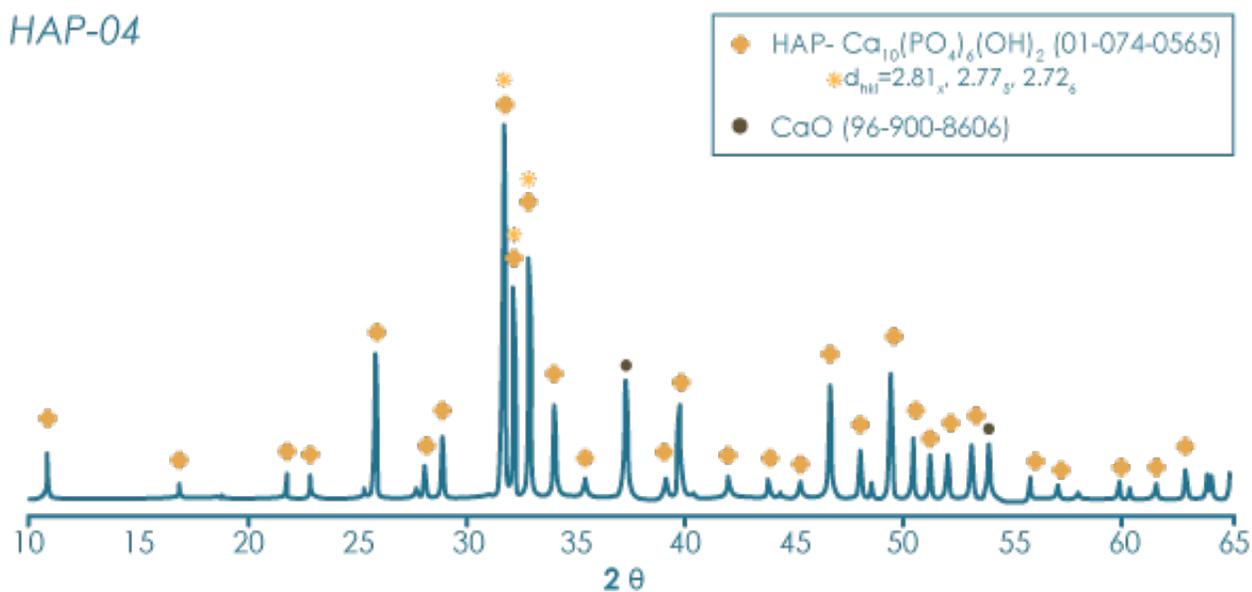


Figura 41. Difracción de rayos X para la HAP04.

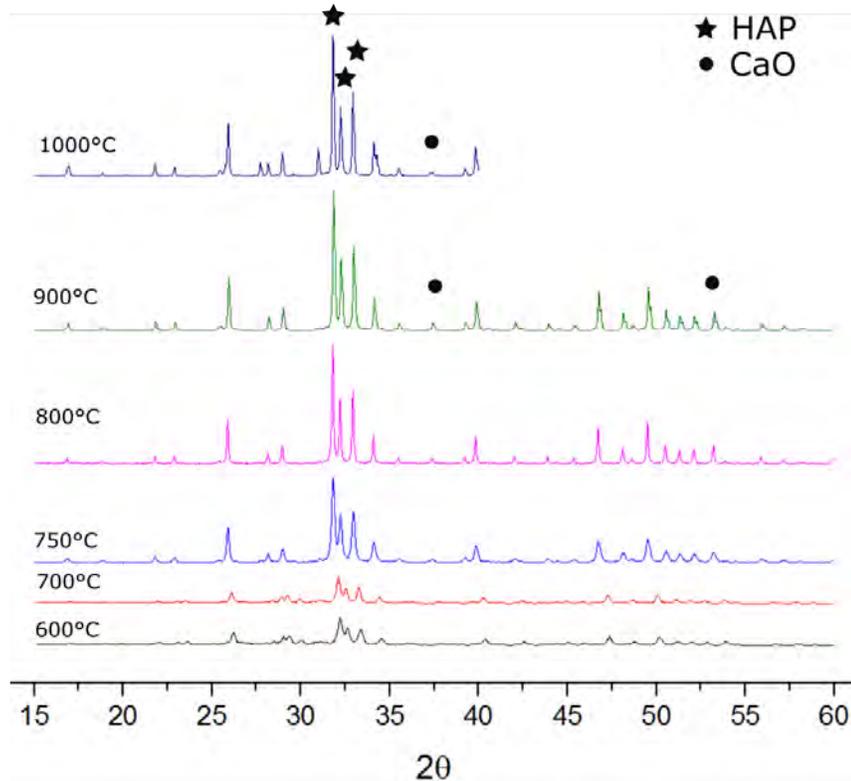


Figura 42. Difractogramas del proceso de cristalización de la HAP02-1, con la temperatura.

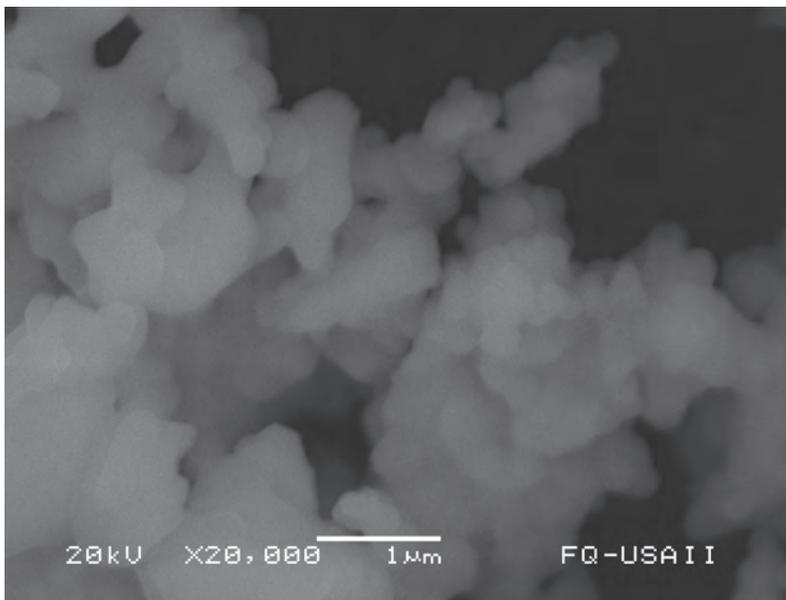


Figura 43. Micrografía electrónica de barrido de la HAP04-1 en polvo de la superficie.

La micrografía electrónica de barrido, para la HAP04-1 (Figura 43), mostró una morfología de partículas definidas y con porosidad. La distribución del polvo se muestra en aglomerados. Su microanálisis químico elemental (Figura 44), permitió asociar las partículas con la HAP, debido a la presencia de calcio, fósforo y oxígeno; lo que corrobora los análisis de su difractograma de RX y su espectro de FTIR; con azufre asociado a una impureza proveniente de los reactivos.

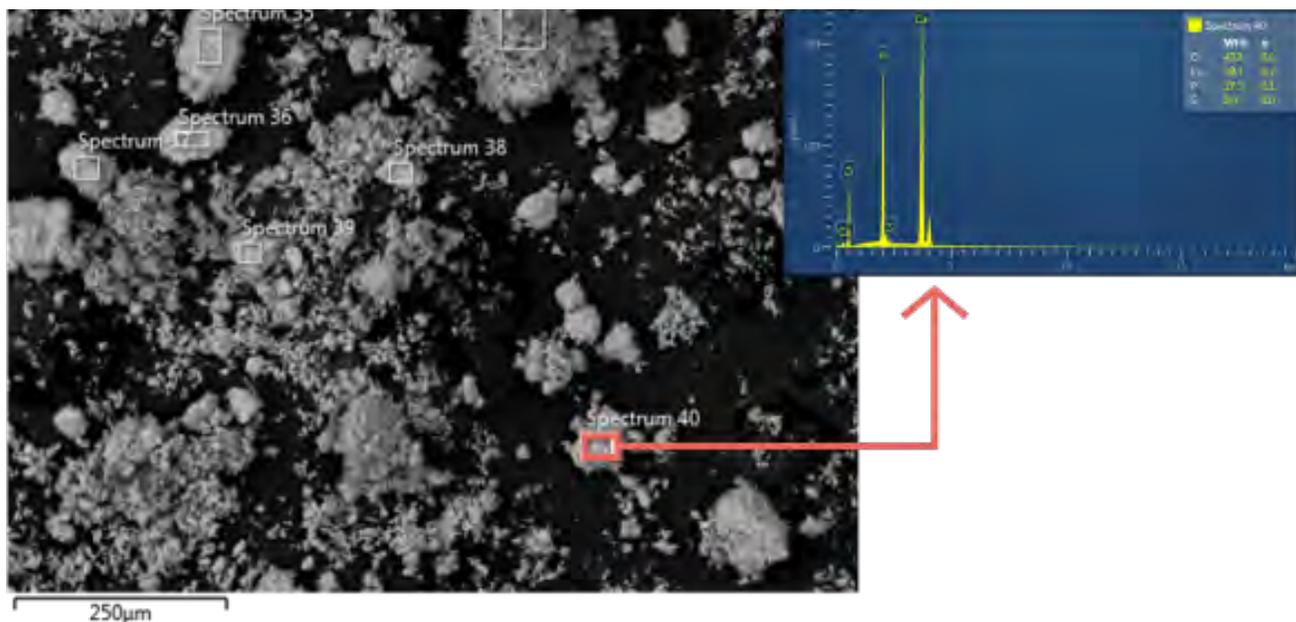


Figura 44. Micrografía electrónica de barrido de la HAP04-1 en polvo, microanálisis elemental por EDS.

La síntesis de HAP, con el método de sol-gel, permitió un tamaño de partícula mínimo de 19 nm. En este trabajo se investigaron la temperatura y el tiempo mínimos para mejorar la cristalización de la HAP e inhibir el crecimiento de su partícula, dado que la dimensión semejante al del hueso es, aproximadamente, de 25 nm [Dorozhkin, 2007]. A pesar de que, el tamaño de partícula fue menor y con menos aglomeración que la HAP obtenida por el método de coprecipitación, no se logró la eliminación con la temperatura del CaO, como lo indica la literatura [Fathi y Hanifi, 2007]; lo que hace que, esta HAP no sea funcional para la sustitución del tejido óseo. Por lo que, el proceso sol-gel para la síntesis de la HAP se descartó.

Tabla 5. Condiciones y resultado de las fases, de la síntesis de HAP por el método de sol-gel.

Sol-Gel			
Muestra	HAP04-1	HAP04-2	HAP04-3
pH	6-7	2	8-9
Temperatura (°C)	600, 700, 800, 900, 1000	600, 700, 800, 900, 1000	600, 800, 900, 1000
Fases	HAP+CaO	HAP+CaO	HAP+CaO

3.2 Compuesto con dispersión por medio de HSA

Incorporación de la HAP a el PLA, por medio del surfactante HSA, en una relación de (25 y 50) % m/m de HAP.

Espectroscopía de absorción infrarroja

El conformado HAP-PLA por análisis de su espectro de FTIR mostró las bandas propias de cada uno de los componentes, sin señales nuevas de posible reacción química entre ellos [Gang, 2006]. Dentro de las cuales para la HAP se identificaron en 1041 cm^{-1} del PO_4^{3-} y 568 cm^{-1} para el PO_4^{3-} del enlace triple; las intensidades sufrieron un aumento con relación al cambio en la proporción de HAP en PLA de 25 % m/m (Figura 45 a) a 50 % m/m (Figura 45 b), lo cual se asoció a la ley de Beer-Lambert-Bouguer de la relación lineal que se desarrolla entre la absorbancia y la concentración [Olsen, 1990]. Para el PLA las bandas en 1727 cm^{-1} y 1757 cm^{-1} se relacionan con el estiramiento de C=O; en 1433 cm^{-1} y 1511 cm^{-1} las señales se asignaron a las vibraciones dobles del CH_3 , simétrico y asimétrico; en 1250 cm^{-1} y 1200 cm^{-1} , las vibraciones de balanceo del C-O-C asimétrica, y simétrica, respectivamente; en 1333 cm^{-1} , la vibración de estiramiento para C-O-C y, la banda en 3200 cm^{-1} se relacionó a los grupos OH. En cuanto a las señales asociadas al surfactante HSA y las del CH_2Cl_2 no hubo evidencia de su presencia, lo que corroboró su eliminación del conformado, de acuerdo con otras publicaciones [Gang, 2006; Xu, 2009; Lasprilla, 2011; Wang, 2013].

Microscopía óptica

La conformación del material compuesto requirió de una dispersión uniforme de la HAP en la matriz de PLA, para evitar aglomerados de la fase inorgánica, que contribuyera con un flujo constante durante la impresión 3D. La observación, del material compuesto de HAP-PLA, por MO indicó una distribución heterogénea de las partículas blancas de la HAP aglomeradas, en la matriz roja del PLA, lograda por medio de la dispersión del HSA, figura 46.

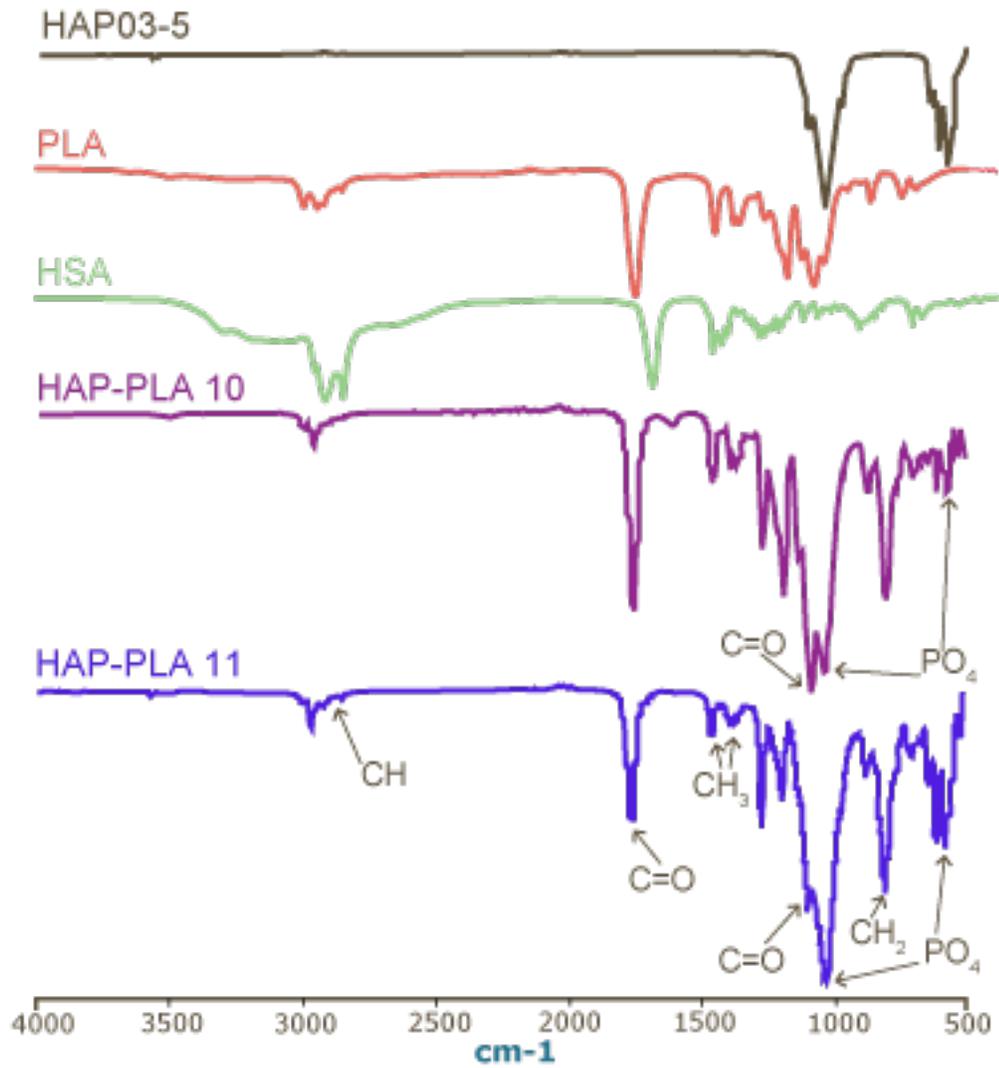


Figura 45. Espectroscopía de absorción infrarroja del material compuesto dispersado con HSA, HAP-PLA 10 relación 25 p/p HAP y HAP-PLA 11 con relación 50 p/p HAP

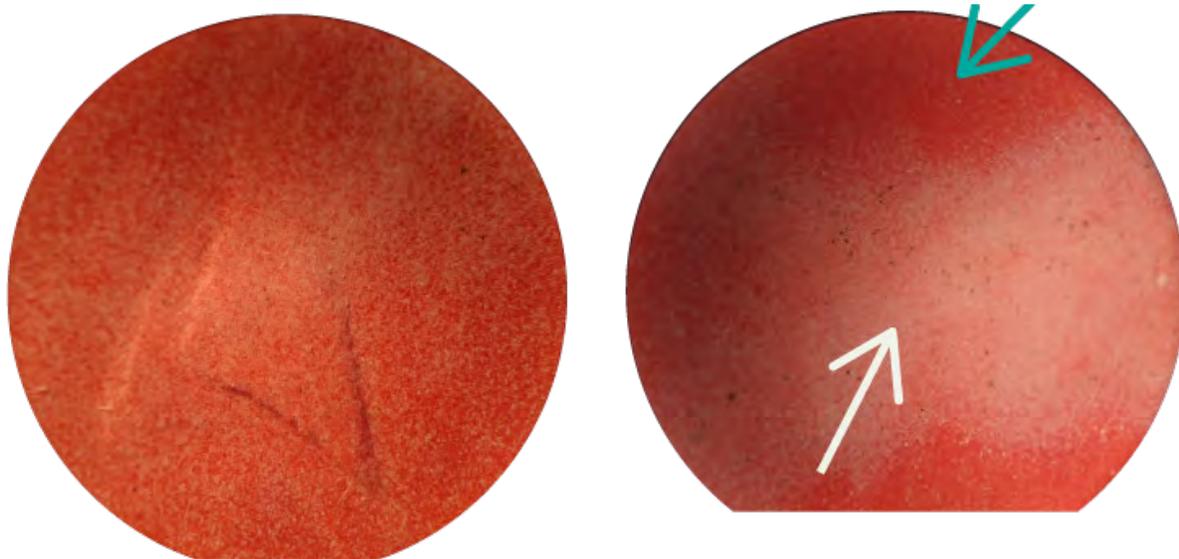


Figura 46. Imagen de microscopía óptica de la dispersión de la HAP (25 % m/m) en el PLA con HSA. Las flechas indican la aglomeración de HAP.

3.3 Conformado del material compuesto (HAP-PLA) por moldeo

Conformado por moldeo

El conformado HAP-PLA por medio del HSA para su uso por moldeo, visualizadas por microscopía óptica, mostraron una distribución uniforme de la HAP en un filamento de PLA, flexible, de diámetro uniforme adecuado para su uso en la impresora; aunque con cavidades huecas exentas de material generadas durante su proceso, lo que impidió la salida homogénea del material a través del cabezal de la impresora. Aún así, se imprimieron dos andamios hasta que el material dejó de fluir. El primer andamio, con una relación 25 % m/m de HAP, permitió el flujo del material de forma constantemente en comparación, con el segundo andamio, con una relación de 50 % m/m de HAP (Figura 47).

Conformado por extrusión

La muestra de conformado por extrusión vista a través del microscopio óptico mostró una distribución uniforme de la HAP sin aglomerados visibles (Figura 48); no obstante, el filamento mostró fragilidad; debido a que se perdió la interface que generaba el HSA entre las partículas hidrofílicas de HAP y la matriz hidrofóbica de PLA, por lo que, no soportó la presión ejercida por el alimentador de la impresora 3D.

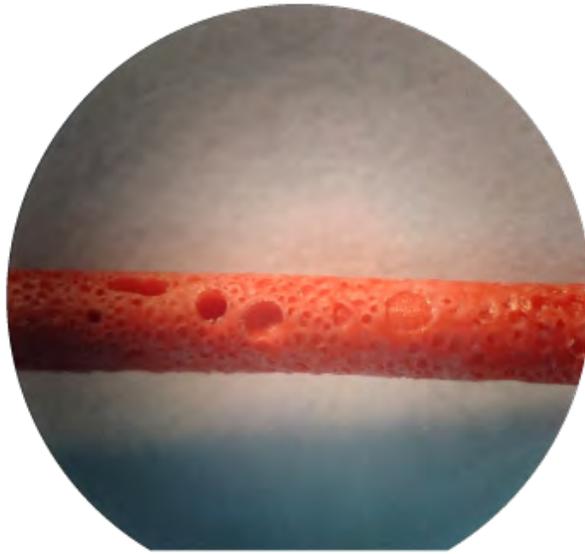


Figura 47. Imagen de microscopía óptica del filamento de la HAP (25 % m/m) en el PLA con HSA por moldeo.

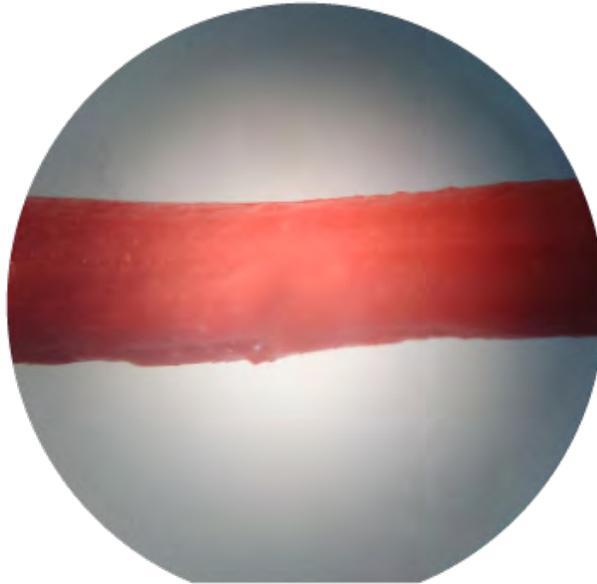


Figura 48. Imagen de microscopía óptica del filamento de la HAP en el PLA (50 % m/m HAP) con HSA por extrusión.

Tabla 6. Conformación del material compuesto de HAP-PLA para su impresión 3D

Dispersor	HSA										
Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
HAP	03-2	03-2	03-2	03-2	03-2	03-4	03-3	03-5	04-3	03-5	03-5
(clave)											
% m/m	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	50
HAP											
% m/m	33	33	25	2	2	10	10	2.5	3.3	10	10
HSA											
Conforma- do	E	E	E	E	-	E	E	O	O	O	O
Impresión	F	F	F	F	-	F	F	I	I	S	S

E=extrusión, O=moldeo, F=filamento frágil, I=insuficiente, Dispr=dispersor, S=Fue posible imprimir.

3.4 Impresión 3D del material compuesto HAP-PLA con dispersión por medio de HSA y moldeo por inyección

Microscopía óptica y propiedades físicas

El análisis del filamento impreso en 3D de HAP-PLA relación 25 % m/m de HAP con HSA, por MO en la figura 49 a, mostró un material sin aglomerados, donde el HAP-PLA fluyó, a 230 °C, hasta finalizar la construcción del andamio. Mientras que el filamento de HAP-PLA con relación 50 % m/m HAP, por MO en la figura 49 b, mostró una superficie sin aglomerados, donde el material no logró un flujo constante a 240 °C, la velocidad de impresión fue disminuida y el tamaño del andamio se aumentó a 15 mm de diámetro. Para ambas proporciones de HAP/PLA, la superficie construida muestra por MO poca adhesión entre las capas, con poros y cavidades. La relación de HAP en PLA y el proceso de conformado determina la capacidad de flujo durante la extrusión en la impresora.

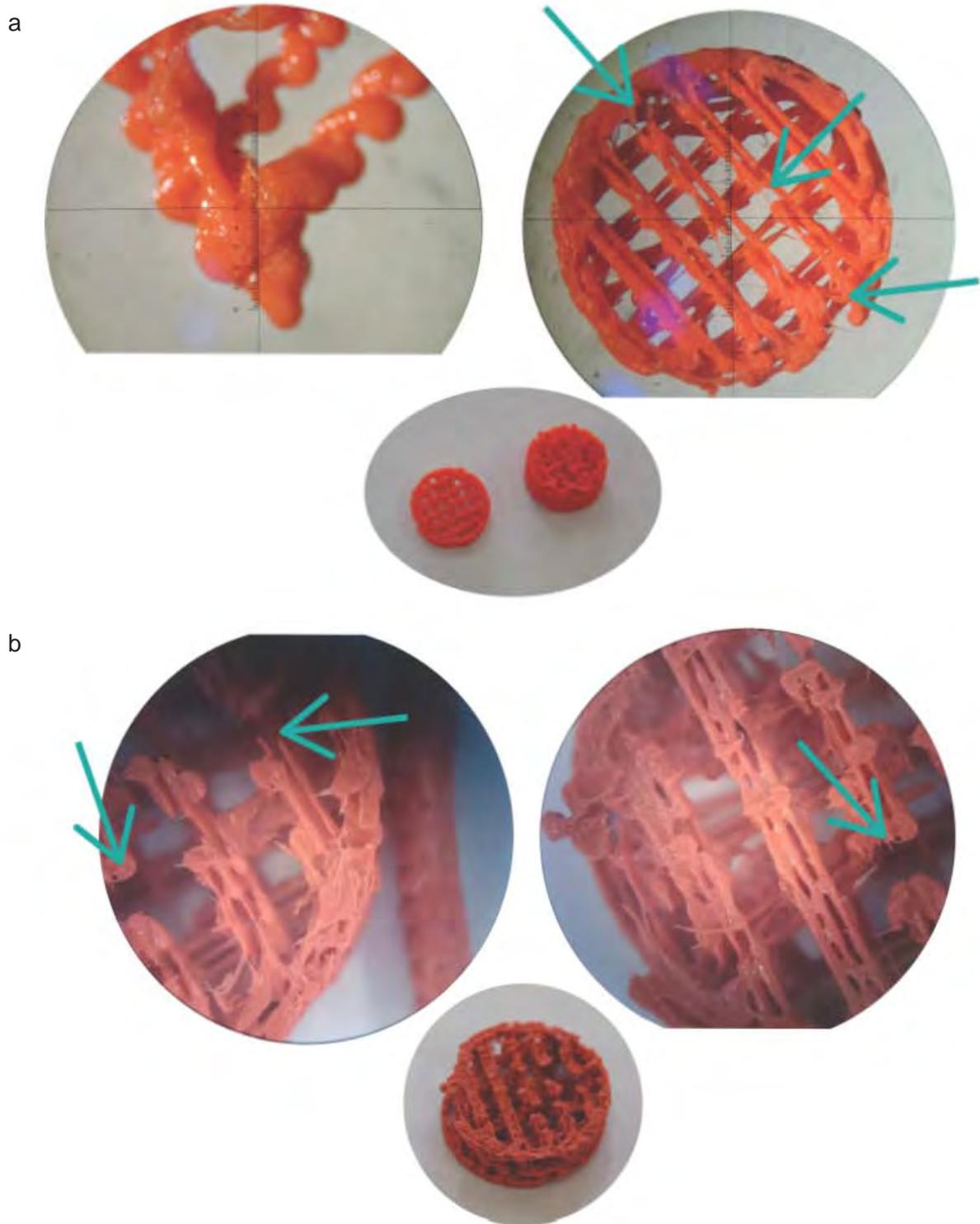


Figura 49. Imagen de microscopía óptica del andamio de la HAP en el PLA con HSA, a) con una relación 25 % m/m de HAP, y b) con una relación 50 % m/m de HAP.