



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros

TESIS

Materiales Porosos por Impresión 3D a base de Mezclas de PLA/PHB e Híbridos de Hidroxiapatita-Ag-ZnO, Dirigidos hacia su Aplicación en Andamios Óseos

Presentada

Q. KATIA DAFNE DANIELA MARTÍNEZ LÓPEZ

Para obtener el grado de:

Maestro en Tecnología de Polímeros

Asesorada por:

Dra. Graciela Morales

Dr. José de Jesús Kú Herrera

Saltillo, Coahuila a 28 de febrero de 2022

Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros

Coordinación de Posgrado
Presente

Por este conducto nos permitimos informar a esta coordinación que, el documento de tesis preparado por **KATIA DAFNE DANIELA MARTÍNEZ LÓPEZ** titulado Materiales Porosos por Impresión 3D a base de Mezclas de PLA/PHB e Híbridos de Hidroxiapatita-Ag-ZnO, Dirigidos hacia su Aplicación en Andamios Óseos el cual fue presentado el día 18 de febrero de 2022, ha sido modificado de acuerdo a las observaciones, comentarios y sugerencias, realizadas por el Comité Evaluador asignado. Por tal motivo, avalamos que el documento adjunto corresponde a la versión final del documento de tesis.

Atentamente,

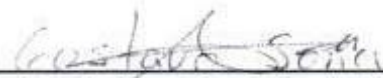
SINODALES



Dr. Florentino Soriano Corral
Presidente



Dra. Esmeralda M. Saucedo Salazar
Secretario



Dr. Gustavo Soria Arguello
Vocal

ASESORES



Dra. Graciela Morales



Dr. José de Jesús Kú Herrera

TESIS CON CARACTER ABIERTO

PROGRAMA: MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS

AUTOR: KATIA DAFNE DANIELA MARTÍNEZ LÓPEZ FIRMA 

TITULO: Materiales Porosos por Impresión 3D a base de Mezclas de PLA/PHB e Híbridos de Hidroxiapatita-Ag-ZnO, Dirigidos hacia su Aplicación en Andamios Óseos

ASESORES: Dra. Graciela Morales

FIRMA 

Dr. José de Jesús Kú Herrera

FIRMA 

El Centro de Investigación en Química Aplicada clasifica el presente documento de tesis como ABIERTO.

Un documento clasificado como Abierto se expone en los estantes del Centro de Información para su consulta. Dicho documento no puede ser copiado en ninguna modalidad sin autorización por escrito del Titular del Centro de Información o del Director General del CIQA.

Saltillo, Coahuila, a 18 de Febrero de 2022

Sello de la Institución





Dr. Oliverio Santiago Rodríguez Fernández
Director General del CIQA



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros

TESIS

Materiales Porosos por Impresión 3D a base de Mezclas de PLA/PHB e Híbridos de Hidroxiapatita-Ag-ZnO, Dirigidos hacia su Aplicación en Andamios Óseos

Presentada por:

KATIA DAFNE DANIELA MARTÍNEZ LÓPEZ

Para obtener el grado de:

Maestro en Tecnología de Polímeros

Asesorada por:

Dra. Graciela Morales Dr.
José de Jesús Kú Herrera

Saltillo, Coahuila. México.

Febrero, 2022

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros

TESIS

Materiales Porosos por Impresión 3D a base de Mezclas de PLA/PHB e Híbridos de Hidroxiapatita-Ag-ZnO, Dirigidos hacia su Aplicación en Andamios Óseos

Presentada por:

KATIA DAFNE DANIELA MARTÍNEZ LÓPEZ

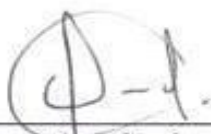
Para obtener el grado de:

Maestro en Tecnología de Polímeros

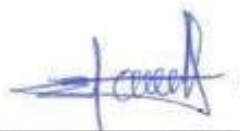
Asesorada por:

Dra. Graciela Morales
Dr. José de Jesús Kú Herrera

SINODALES



Dr. Florentino Soriano Corral
Presidente



Dra. Esmeralda M. Saucedo Salazar
Secretario



Dr. Gustavo Soria Arguello
Vocal

DECLARACIÓN

Declaro que la información contenida en la Parte Experimental, así como en la Parte de Resultados y Discusiones de este documento y que forman parte de las actividades de investigación y desarrollo realizadas durante el período que se me asignó para llevar a cabo mi trabajo de tesis, será propiedad del Centro de Investigación en Química Aplicada.

Saltillo, Coahuila a 18 de febrero de 2022



KATIA DAFNE DANIELA MARTÍNEZ LÓPEZ

Nombre y Firma

DEDICATORIA

A Dios por permitirme llegar a este momento, donde culmino mis estudios de maestría, además de brindarme la fortaleza en el transcurso de estos años y por poner a las personas correctas en mi camino de realización profesional.

A mis padres, por su apoyo incondicional, por creer en mí y alentarme a lo largo de mi vida. Infinitas gracias por incitarme a soñar y perseguir los nuevos retos, por su apoyo, amor y consejos.

A las personas que anhelan hacer ciencia de calidad por el bien de la humanidad.

AGRADECIMIENTOS

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado a través de la beca nacional y el financiamiento a través del Proyecto de Ciencia Básica No. 288682.
- Al Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) por permitirme formar parte de la institución y realizar mis estudios de posgrado.
- A mis asesores, Dr. José de Jesús Kú Herrera y Dra. Graciela Morales, por su confianza, paciencia y orientación en el desarrollo del proyecto.
- A los sinodales Dra. Esmeralda Saucedo, Dra. Abril Fonseca y Dr. Florentino Soriano Corral, por sus comentarios y observaciones realizados en este trabajo.
- Al Laboratorio Nacional de Materiales Grafénicos (LNMG), en especial al Lic. Jesús Alfonso Mercado Silva y Dr. Uriel Alejandro Sierra Gómez por su apoyo técnico.
- Al Dr. Antonio Ledezma, Dr. Enrique Díaz Barriga y L.C.Q. Guadalupe Méndez por su apoyo en las caracterizaciones correspondientes en el CIQA.
- A la Dra. Victoria Padilla de la *University of Texas Rio Grande* por el análisis por XPS y al Dr. Alejandro May Pat del Centro de Investigación Científica de Yucatán por los ensayos mecánicos.
- Al Departamento de Química Macromolecular y Nanomateriales; Dr. Gustavo Soria Arguello por su orientación y apoyo en las modificaciones superficiales de los materiales.
- Al ingeniero Rodrigo Cedillo por su orientación y apoyo en el uso de la cámara de mezclado.
- A Coordinación posgrado y a la Lic. Nancy Espinosa por su trabajo administrativo.
- A mis compañeros Juan Ortiz y Lyndon Sánchez por su apoyo durante mi estancia en CIQA.
- A Antonio Monroy, Ilse Magaña, Leonel Robles, Marco Dircio, Gabriela Ramos, Luis Rivera, Daniel Orduña, Sergio González y Roberto López por su sincera amistad y compañerismo.

Índice de Contenido

1. RESUMEN.....	16
2. INTRODUCCIÓN.....	17
3. ANTECEDENTES.....	19
3.1. Generalidades del Tejido Óseo	19
3.1.1. Jerarquía Estructural del Tejido Óseo	19
3.1.2. Fundamentos de la Regeneración Ósea.....	21
3.2. Transición de Implantes Tradicionales a Andamios Multifuncionales.....	23
3.2.1. Evolución de los Tipos de Implantes/Andamios	23
3.2.2. Papel de la Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa en el Desarrollo de Andamios	26
3.3. Nanopartículas Bioactivas y sus Métodos de Obtención.....	28
3.3.1. Nanopartículas Osteoinductoras	28
3.3.2. Nanopartículas Antimicrobianas	30
3.3.3. Nanomateriales Híbridos	33
3.4. Biopolímeros con Potencial Aplicación en Andamios/Implantes Temporales	36
3.4.1. Andamios/Implantes a Base de Bio-poliésteres y sus Mezclas.....	36
3.5. Tecnologías de Vanguardia para el Desarrollo de Andamios Sintéticos.....	39
3.5.1. Métodos Generales para la Manufactura de Andamios Óseos.....	39
3.5.2. Manufactura de Andamios Multifuncionales por Impresión 3D.....	41
3.5.3. Obtención de Piezas Personalizadas a Partir del Diseño de Modelos 3D	42
3.6. Consideraciones en el Diseño de Andamios.....	43
3.6.1. Condiciones Biológico – Mecánicas	43
4. OBJETIVOS.....	46

4.1. General.....	46
4.2. Específicos	46
5. HIPOTESIS	46
6. CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA	46
7. METODOLOGÍA	47
7.1. Síntesis de Nanohíbridos	49
7.1.1. Caracterización de los Nanohíbridos Sintetizados	51
7.2. Obtención de Mezclas y Filamentos a Base de PLA/PHB	52
7.2.1. Caracterización Térmica de los Filamentos Obtenidos a Partir de las Mezclas ..	53
7.3.1. Caracterización Mecánica de los Materiales Manufacturados	55
7.4. Pruebas de Inhibición Bacteriana sobre los Materiales Manufacturados	56
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
8.1. Análisis Cristalográfico de los Nanohíbridos de HAp-Ag-ZnO.....	58
8.2. Espectroscopía Fotelectrónica de Rayos X.....	64
8.3. Microscopia Electrónica de Transmisión.....	73
8.5. Calorimetría Diferencial de Barrido	77
8.6. Análisis Termogravimétrico	79
8.7. Ensayos de Compresión.....	81
8.8. Pruebas Antibacterianas.....	84
9. CONCLUSIONES.....	88
10. BIBLIOGRAFÍA.....	89
11. ANEXOS.....	103

Índice de Figuras

Figura 1. A) Anatomía general del hueso, B) Organización del hueso cortical y trabecular ²² .	19
Figura 2. Esquema del remodelado óseo natural ²⁷ .	21
Figura 3. Modelo idealizado del funcionamiento de un andamio biomimético multicomponente. Imagen adaptada del trabajo de Porter J. et al ² .	26
Figura 4. Generaciones de biomateriales utilizados para implantes óseos.	28
Figura 5. Posibles mecanismos de acción bactericida de nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos. Imagen diseñada con base a Vázquez A. et al ⁷⁸ . y Zazo H. et al ⁶⁴ .	32
Figura 6. Conformaciones que adquiere el PLA a partir de las dos formas isoméricas de la lactida.	38
Figura 7. A) <i>Azotobacter vinelandii</i> con inclusiones de PHB en su citoplasma ⁹⁵ . B) Estructura del poli(3-hidroxiбутирато) ⁹⁴ .	38
Figura 8. Esquema de impresión 3D mediante FDM ¹⁰² .	42
Figura 9. Patrones de relleno de impresión 3D. A) Schwarz P, B) Schwarz D, C) giroidal y D) hexagonal ¹⁰⁴ .	43
Figura 10. Esquema general del plan de trabajo.	48
Figura 11. A) Diagrama del proceso de obtención de HAp-Ag-ZnO. B) Esquema idealizado de la síntesis de nanohíbridos.	50
Figura 12. Fotografía de las mezclas antes de la molienda y cribado. A) PLA/PHB. B) PLA/PHB/HAp_1%. C) PLA/PHB/NHS-1_1%.	52
Figura 13. Extrusor empleado para la obtención de filamentos Filabot EX6 Extruder.	52

Figura 14. A) Impresora FlashForge Inventor II. B) Modelo CAD de los especímenes para ensayos de compresión. C) Modelo CAD de los especímenes para ensayos de inhibición bacteriana. D) Patrones de relleno evaluados con el filamento de PLA comercial.....	54
Figura 15. Fotografía de los especímenes impresos para las pruebas de inhibición bacteriana bajo el tratamiento superficial con plasma de argón.	56
Figura 16. Difractogramas de la HAp prístina y los nanohíbridos sintetizados.....	59
Figura 17. Ampliación y ajuste de picos para los difractogramas de A) HAp prístina. B) NHS-1. C) NHS-2 y D) NHS-3.	60
Figura 18. Espectros de barrido amplio de XPS. A) HAp prístina. B) NHS-1. C) NHS-2 y D) NHS-3.....	65
Figura 19. Espectros de alta resolución para O1s A) HAp prístina. B) NHS-1. C) NHS-2. D) NHS-3.....	67
Figura 20. Espectros de alta resolución para P2p A) HAp prístina. B) NHS-1. C) NHS-2. D) NHS-3.....	68
Figura 21. Espectros de alta resolución para Ca2p A) HAp prístina. B) NHS-1. C) NHS-2. D) NHS-3.....	69
Figura 22. Espectros de alta resolución para Ag 3d A) NHS-1. B) NHS-2. C) NHS-3.....	70
Figura 23. Espectros de alta resolución para Zn 2p A) NHS-1. B) NHS-2. C) NHS-3.	71
Figura 24. A) Proyección del plano (001) de HAp prístina Lu ¹³⁶ et al. B) Proyección aproximada del plano (001) de HAp:Zn:Ag determinada a partir de los estados de oxidación del zinc y la plata observados en XPS.....	72
Figura 25. A) Proyección del plano (001) del ZnO. B) Proyección aproximada del plano (001) de ZnO:Ag determinada a partir de los estados de oxidación del zinc y la plata observados en XPS.....	72

Figura 26. A) Micrografía. B) Patrón de difracción de electrones. C) Análisis EDS y D) Histograma de distribución de tamaño de partícula de HAp prístina.....	73
Figura 27. A) Micrografía. B) Patrón de difracción de electrones. C) Análisis EDS de NHS-1.	74
Figura 28. A) Micrografía. B) Patrón de difracción de electrones. C) Análisis EDS de NHS-2.	75
Figura 29. A) Micrografía. B) Patrón de difracción de electrones. C) Análisis EDS de NHS-3.	75
Figura 30. Patrones de difracción del PLA, PHB, PLA/PHB, PLA/PHB/HAp_1% y PLA/PHB/NHS-1%.....	76
Figura 31. DSC del PLA y PHB prístinos, así como de sus mezclas PLA/PHB, PLA/PHB/HAp_1% y PLA/PHB/NHS-1_1%. A) 1er ciclo de calentamiento. B) ciclo de enfriamiento C) 2do ciclo de calentamiento.....	78
Figura 32. A) TGA del PLA prístino. B) TGA del PHB prístino.	79
Figura 33. A) TGA PLA/PHB. B) TGA PLA/PHB/HAp_1%. C) TGA PLA/PHB/NHS-1_1%.	80
Figura 34. Curvas de σ - ϵ de los especímenes impresos en 3D. A) especímenes con densidad de relleno al 50%. B) especímenes con densidad de relleno de 70%. C) especímenes con densidad de relleno de 90%.	81
Figura 35. Ensayos de compresión de los especímenes impresos en 3D. A) Esfuerzo de fluencia. B) Módulo de compresión.	82
Figura 36. Curvas de σ - ϵ de los especímenes impresos en 3D con patrón triangular al 90% de relleno, con las mezclas de PLA/PHB, PLA/PLA/HAp_1% y PLA/PHB/NHS-1_1%.....	83

Figura 37. Ensayos de compresión de los especímenes impresos en 3D de las mezclas de PLA/PHB, PLA/PHB/Hap_1% y PLA/PHB/NHS-1_1%. A) Esfuerzo de fluencia. B) Módulo de compresión.....84

Figura 38. Gráfica de la inhibición de E. coli y S. aureus en prototipos impresos con PLA/PHB/NHS-1_1% tratados con plasma de argón y sin tratar.87

Índice de Tablas

Tabla 1. Propiedades mecánicas del hueso compacto y hueso esponjoso ^{24,25}	20
Tabla 2. Tipos de hueso humano y su periodo de curación.....	22
Tabla 3. Fases que puede adquirir el fosfato de calcio dependiendo la relación molar Ca/P ^{12,52,53}	29
Tabla 4. Requerimientos para la obtención de andamios óseos.	45
Tabla 5. Reactivos utilizados para la síntesis de nanohíbridos de HAp-Ag-ZnO.	48
Tabla 6. Relación de volúmenes para la síntesis de HAp-Ag-ZnO.....	51
Tabla 7. Parámetros de impresión A) PLA comercial. B) PLA/PHB. C) PLA/PHB/HAp_1% y D) PLA/PHB/NHS-1_1%.....	55
Tabla 8. Datos cristalográficos de los componentes involucrados en la síntesis de nanohíbridos ^{108,109}	58
Tabla 9. Parámetros de celda y tamaños de cristalito de HAp prístina y los nanohíbridos.....	63
Tabla 10. Energías de enlace características para el oxígeno, calcio, fósforo, zinc y plata. Extraído y adaptado del Lee ¹²⁴ et al.	64
Tabla 11. Contenido en porcentaje de calcio y fósforo, así como su relación molar de HAp prístina y los nanohíbridos sintetizados.....	66
Tabla 12. Comportamiento de la actividad antimicrobiana de los prototipos impresos en 3D frente a Escherichia coli.	85
Tabla 13. Comportamiento de la actividad antimicrobiana de prototipos impresos en 3D frente a Staphylococcus aureus.....	86

1. RESUMEN

Se reporta el desarrollo de materiales porosos por 3D a base de mezclas de PLA/PHB e híbridos de hidroxiapatita-Ag-ZnO (HAp-Ag-ZnO), dirigidos hacia su aplicación como andamios óseos. Primero, se desarrolló un procedimiento novedoso para síntesis *in situ* de nanopartículas de Ag (Ag-NPs) y ZnO (ZnO-NPs) sobre HAp; En esta etapa del proyecto se evaluaron diferentes proporciones de los precursores Ag-ZnO/HAp a fin de controlar la morfología, distribución y relación entre las Ag-NPs, ZnO-NPs y la HAp. Las propiedades cristalográficas y morfológicas se caracterizaron por difracción de rayos X (DRX) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las interacciones químicas entre los componentes de los nanohíbridos de HAp-Ag-ZnO se estudiaron mediante espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS). Se formularon en fundido mezclas de PLA/PHB (75:25 m/m) y nanohíbridos de HAp-Ag-ZnO (1% m/m con respecto a la mezcla PLA/PHB), y se manufacturaron filamentos de 1.75 mm de diámetro, aptos para su uso en impresión 3D. Adicionalmente se obtuvieron filamentos de PLA/PHB y de PLA/PHB e HAp (1 % m/m), para fines comparativos. Se evaluaron las propiedades mecánicas de especímenes obtenidos por impresión 3D, ante cargas de compresión a fin de determinar el efecto de la incorporación de los nanohíbridos de HAp-Ag-ZnO. Finalmente, se manufacturaron prototipos por impresión 3D y se evaluó su capacidad de inhibición bacteriana contra *E. coli* y *S. aureus*. Estos prototipos se sometieron a un tratamiento superficial con plasma de argón, a fin de exponer las nanopartículas híbridas. La síntesis *in situ* desarrollada en marco de esta tesis dio lugar a material híbrido constituido por HAp (tamaño promedio de ~40 nm) con Ag-NPs y ZnO-NPs depositadas aleatoriamente. Las Ag-NPs exhibieron una estructura cúbica centrada en las caras mientras que las ZnO-NPs estuvo presente en su fase Wurtzita. El análisis cristalográfico y por XPS sugiere que existe un dopado con átomos de Zn y Ag en la estructura de la HAp. Las propiedades mecánicas a compresión de la mezcla PLA/PHB no sufrieron disminución con la incorporación de los nanohíbridos de HAp-Ag-ZnO. El módulo elástico alcanzado en los materiales porosos coincide con el del hueso trabecular/esponjoso, lo cual es deseable para su uso en andamios óseos. Se obtuvo una inhibición antibacteriana del 90% para *E. Coli* y 30% para *S. aureus*, la cual incrementó en ambos casos hasta un 100 % después del tratamiento con plasma de argón. Los resultados indican que los materiales desarrollados en este trabajo tienen un gran potencial para la ingeniería de tejidos óseos.

2. INTRODUCCIÓN

El impacto clínico y económico de los tratamientos óseos realizados mundialmente, se ha ido incrementando exponencialmente durante los últimos años^{1,2}. Algunas de las estrategias que se han implementado para satisfacer la creciente demanda para la sustitución ósea, involucra el uso de autoinjertos, aloinjertos y/o xenoinjertos provenientes de un ser vivo o derivados cadavéricos³. Sin embargo, el uso de este tipo de implantes conlleva una serie de desventajas biológicas como la posibilidad de contraer infecciones bacterianas, rechazo biológico, además conllevan procesos dolorosos y suelen ser poco asequibles³. En este contexto, se ha incluido el uso de materiales poliméricos en aplicaciones biomédicas, como en sustitutos óseos, debido a que son capaces de proporcionar buena resistencia mecánica^{3,4}.

En la actualidad, se han realizado avances significativos en el desarrollo de andamios de tejido óseo, con polímeros bioabsorbibles. Entre los polímeros bioabsorbibles, el poli (ácido láctico) (PLA), poli (hidroxibutirato) (PHB) y sus mezclas son los materiales más explorados para andamios de tejido óseo debido a su biocompatibilidad y no toxicidad, estos polímeros son los candidatos preferidos para el desarrollo de dispositivos terapéuticos como las prótesis temporales. Por otra parte, diversos estudios demuestran que matrices de poli(hidroxibutirato) (PHB) muestran biocompatibilidad con diferentes líneas celulares como las células endoteliales, hepatocitos, fibroblastos, entre otros⁵⁻⁷. Por su parte, Zhang et al. demostraron en particular que la mezcla de PLA/PHB 75/25 m/m exhibió propiedades de tracción mejoradas en comparación con PLA prístino, debido a los cristales de PHB finamente dispersos, que actúan como relleno y agente nucleante en el PLA⁷.

Por otro lado, en los últimos años la manufactura aditiva/impresión 3D, ha cobrado gran potencial en el área biomédica, debido a la obtención de piezas personalizadas, con geometría y porosidad específicas a través del diseño asistido por computadora de modelos tridimensionales, que permiten mimetizar la estructura ósea^{8,9}. En este sentido, es posible modelar una pieza de dimensiones bastante precisas con ayuda de equipos de diagnóstico médico, como la tomografía axial computarizada o radiografías de la zona afectada.

Sin embargo, la aplicación final requiere funciones adicionales en el implante, como bioactividad que propicie la regeneración ósea y acción antibacteriana. En este sentido, este trabajo de investigación propone una serie de prototipos impresos en 3D basados en mezclas de PLA/PHB, PLA/PHB/HAp y PLA/PHB/HAp-Ag-ZnO para su uso en andamios óseos. Por su parte, la hidroxiapatita proporcionará bioactividad, mientras que las nanopartículas de ZnO y Ag mejorarán la acción antibacteriana del material. Por otro lado, la tecnología de impresión 3D se utilizó para crear modelos tridimensionales, con la finalidad de que las estructuras porosas mimeticen la estructura morfológica natural del hueso para aplicaciones potenciales como andamios óseos.

3. ANTECEDENTES

3.1. Generalidades del Tejido Óseo

3.1.1. Jerarquía Estructural del Tejido Óseo

El tejido óseo, es un tipo de tejido conjuntivo especializado, que está compuesto por osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, células del revestimiento óseo, y componentes extracelulares (orgánicos e inorgánicos) encargados de la mineralización/ remodelación ósea¹⁰. Además, el tejido óseo presenta una organización estructural que se divide principalmente en tres niveles jerárquicos; (1) macroestructura, que a su vez está compuesta por *hueso esponjoso* y *cortical*; (2) microestructura, organizada por el sistema de Havers, osteones, trabéculas simples y laminillas; (3) nanoestructura, integrada por colágeno fibrilar y elementos constituyentes como minerales y proteínas^{11,12}. En la Figura 1 se observa un diagrama de la anatomía general del hueso y su organización jerárquica.

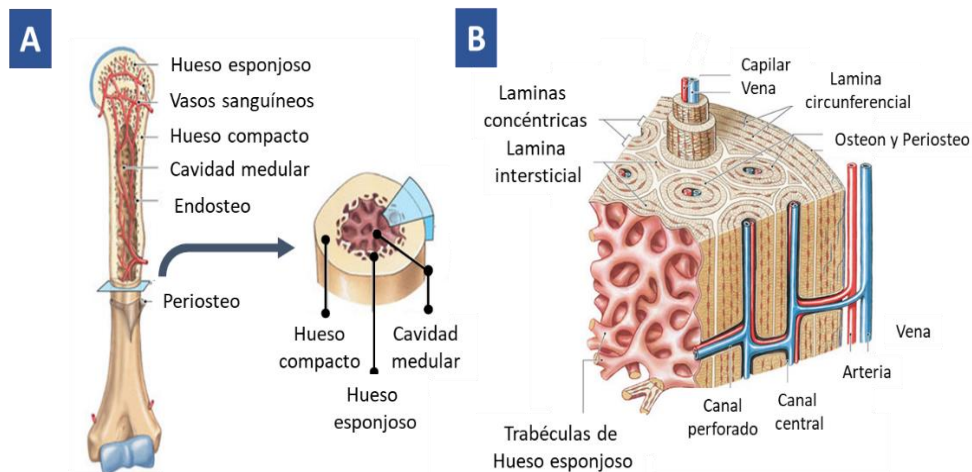


Figura 1. A) Anatomía general del hueso, B) Organización del hueso cortical y trabecular¹².

En cuanto a la macroestructura del tejido óseo, diversos autores señalan que el *hueso cortical* suele ser más denso y compacto en comparación con el *hueso trabecular*. El *hueso cortical* consiste de un arreglo de láminas apiladas alrededor de un canal central, cuya función principal es proporcionar soporte mecánico y protección; este tipo de hueso representa alrededor del 80%

del esqueleto humano^{12,13}. Por su parte, el *hueso trabecular*, constituye la parte interna de los huesos (20% del esqueleto adulto), es menos denso y más poroso que el *hueso compacto*, sin embargo, dado que presenta una disposición tridimensional de trabéculas, es capaz de responder ante estímulos mecánicos y proporcionar soporte estructural^{12,13}.

Ahora bien, es importante aclarar que las propiedades mecánicas tanto del *hueso compacto* y *hueso esponjoso*, varían entre sí en función de la porosidad. En consecuencia, el desempeño mecánico del *hueso esponjoso* es significativamente inferior al del *hueso cortical*, debido a su alta porosidad¹³. En la Tabla 1 se resumen algunas propiedades mecánicas del *hueso cortical* y *hueso esponjoso*^{14,15}.

Tabla 1. Propiedades mecánicas del *hueso compacto* y *hueso esponjoso*^{14,15}.

Parámetro	Hueso	
	Cortical	Trabecular
Módulo Elástico (MPa)	16,000 – 23,000	100 – 3,000
Resistencia a la Compresión (MPa)	130 – 200	1 – 16
Resistencia a la Flexión (MPa)	90 – 280	-
Resistencia a la Tensión (MPa)	80 – 150	5 – 10
Resistencia a la Tracción (MPa)	50 – 151	7.4
Porosidad (%)	5 – 10 %	75 – 95 %

En general, el tejido óseo es una variedad de tejido conectivo especializado que desempeña funciones críticas en la fisiología del ser humano, entre sus principales funciones destaca proporcionar movimiento, la protección de órganos sensibles, reproducción celular, mantenimiento de la homeostasis mineral, y soporte estructural¹⁰.

Los huesos, pueden ser clasificados en general de acuerdo a su desempeño en tres categorías principales; *huesos largos* (fémur, clavículas, falanges, tibia, etc.) destinados a soportar el peso del cuerpo, *huesos cortos* (carpales y tarsales) que brindan movimiento y estabilidad, *huesos planos* (esternón y cráneo) dirigidos a la protección de órganos internos¹⁶.

3.1.2. Fundamentos de la Regeneración Ósea

Si bien en la sección anterior se hizo énfasis sobre la macroestructura ósea, también es de relevancia conocer los elementos que constituyen al tejido óseo a nivel nanométrico, debido a que en esta escala dimensional se llevan a cabo procesos de regeneración ósea. Tales elementos incluyen principalmente a fibras de colágeno de tipo I, al cual está unida la fracción mineral que en su mayoría consiste de cristales de hidroxapatita (HAp) (~65 - 70% en masa), que confiere al hueso su tenacidad y resistencia mecánica, asimismo, se incluyen células del revestimiento óseo que sintetizan la matriz ósea^{11,13}.

En la Figura 2 se esquematiza el proceso de regeneración ósea, que ocurre en tres etapas; (1) inicio de la resorción ósea por los osteoclastos, permitiendo la regulación del equilibrio mineral (homeostasis del calcio y del fosfato); (2) formación de la matriz osteoide, efectuando un mecanismo de adaptación del tejido óseo al entorno mecánico, disminuyendo de esta manera, el riesgo de fractura y (3) la consolidación de hueso (mineralización) por osteoblastos, donde se renuevan y reparan los defectos óseos^{10,13}.

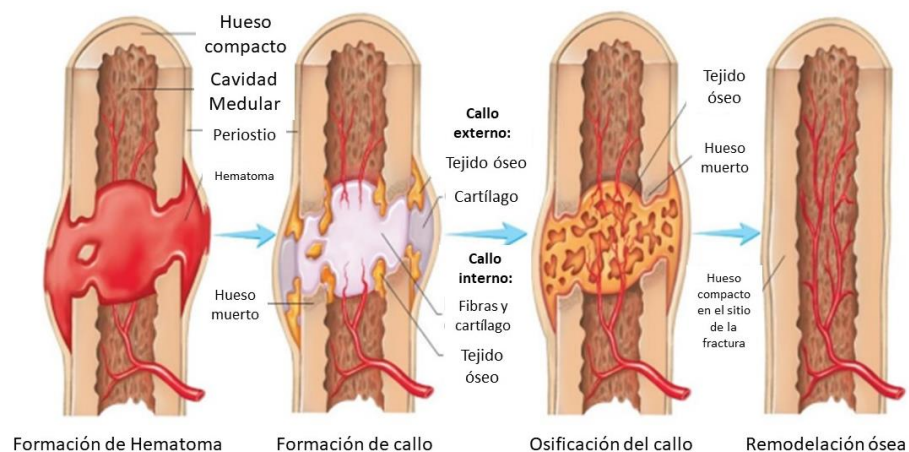


Figura 2. Esquema del remodelado óseo natural¹⁷.

Además, el suministro de calcio también actúa en cooperación con los osteoclastos y osteoblastos en los sitios de remodelación. Las fases iniciales del proceso de remodelación ósea se llevan a cabo en semanas y el proceso de remodelación completo llega a tardar meses. Dependiendo el tipo de hueso lesionado, la edad y el género del paciente su tasa de curación será diferente, como se observa en la Tabla 2.

Tabla 2. Tipos de hueso humano y su periodo de curación.

Tipo de Hueso	Periodo de Curación (semanas)
Dedos	4 – 8
Clavícula	5 – 7
Escafoides	≥ 10
Humero	5 – 8
Radio distal	3 – 4
Radio y cúbito	8 – 12
Pelvis	6 – 10
Fémur	8 – 14
Cuello de Fémur	12 – 24
Tibia	8 – 12
Calcáneo	6
Dedos de los pies	6 – 8

Desafortunadamente, si ocurre un desequilibrio en la reabsorción y formación de hueso, puede dar lugar a diferentes afecciones genético-degenerativas, tales como; la osteogénesis imperfecta, osteoartritis, osteomielitis, osteoporosis, etcétera, comprometiendo el desempeño bio-mecánico del tejido óseo. Estas enfermedades, junto a lesiones traumáticas conducen a defectos óseos, que pueden dar lugar a fracturas, razón por la cual se ha incrementado el número de intervenciones quirúrgicas debido a la pérdida o lesión de algún hueso¹⁰.

Ahora bien, teniendo en cuenta que el hueso es un tejido dinámico en constante movimiento, es importante resaltar el efecto de la estimulación mecánica y transducción celular, como posibles factores que influyen en el remodelado óseo. En primer lugar, es crucial comprender que las células óseas se encuentran sumamente afectadas por las cargas que experimentan *in vivo*, puesto que, durante el movimiento del esqueleto se transmiten esfuerzos a las células mediante tensión, presión hidrostática y esfuerzos cortantes¹⁸⁻²¹. En consecuencia, las células óseas generan una respuesta a los estímulos mecánicos inducidos.

Ciertos autores, han especulado acerca de dos posibles modelos de regeneración ósea, en los que las células óseas pueden responder a los estímulos mecánicos; el primer modelo sugiere que la respuesta se da a nivel celular, debido a que cada célula ósea experimenta esfuerzos mecánicos directos; el segundo modelo apunta a que la respuesta se lleva a cabo en un nivel tisular, dado que algunas células óseas de tipo sensoriales (osteocitos) detectan los esfuerzos mecánicos y en consecuencia, envían señales bioquímicas a otras células¹⁸.

Sin embargo, cabe mencionar que ya sea por el tamaño del defecto óseo o por alguna infección, el hueso lesionado no siempre es capaz de repararse por sí solo mediante la fijación mecánica, lo que da como resultado a otras complicaciones como la pseudoartrosis. Para el caso de defectos de tamaño crítico o sin unión, es necesario utilizar un material sustituto para rellenar el defecto óseo¹.

3.2. Transición de Implantes Tradicionales a Andamios Multifuncionales

3.2.1. Evolución de los Tipos de Implantes/Andamios

Durante la prehistoria, tuvo lugar el primer sustituto óseo del que se tiene constancia, siendo una implantación necrósica colocada *in vivo*, es decir que se utilizaron huesos de cadáveres para reemplazar piezas óseas de otro individuo, con este hallazgo se descubrió que el hueso donado se fusionaba con el tejido óseo vivo. Sin embargo, no demoró mucho tiempo para que el uso de tejido muerto derivara en enfermedades mortales²².

Posteriormente, basándose en el conocimiento adquirido de la implantación necrópsica, se implementó otro tipo de sustituto óseo, conocido actualmente como aloinjerto, donde se utilizan huesos provenientes de otro individuo (vivo). Otra opción sería el uso de xenoinjertos, que básicamente son un tipo de aloinjerto cuya diferencia radica en que el tejido donante proviene de tejido animal. En general, los aloinjertos se pueden encontrar de tres formas; como hueso congelado, fresco o liofilizado. Lamentablemente este tipo de injertos resulta poco viable, puesto que se ha demostrado el riesgo de transmisión de enfermedades, rechazo biológico y nula capacidad osteoinductiva, de modo que su desempeño mecánico puede resultar comprometido²².

Después, surgió el llamado “tratamiento estándar de oro”, en el que se utilizan injertos autógenos/autoinjertos, y en donde tanto el receptor como el donante son el mismo individuo; este tipo de implantes evita problemas de rechazo biológico, debido a que poseen una fuente rica de células óseas vivas que tienen propiedades osteogénicas. Pese a lo atractivo que pueda resultar el uso de autoinjertos, es necesario mencionar que dicho procedimiento trae consigo múltiples desventajas, que pueden incluir morbilidad en el sitio donante, dolor, parestesia, hospitalización y rehabilitación prolongada, mayor riesgo de infección profunda, hematoma, inflamación y disponibilidad restringida, así como la necesidad de intervenciones quirúrgicas subsecuentes. Además, la fuente de sitios donantes no es ilimitada, resultando en una práctica compleja para la sustitución ósea^{1,2,22}.

Una ventaja de los procedimientos anteriormente expuestos, se atribuye a la similitud física y biológica del tejido donante (sitio o paciente) con el tejido receptor. Sin embargo, es difícil lograr un tratamiento exitoso, debido al riesgo de transmisión de enfermedades o virus, infección, toxicidad asociada con la esterilización, inmunogenicidad y finalmente el rechazo biológico^{1,22}.

Con el tiempo, se fueron desarrollando otro tipo de sustitutos óseos basados en materiales bioinertes como los metales, lo cual fue incentivado por su alta resistencia mecánica²². No obstante, surgieron nuevos inconvenientes en la implementación de esta estrategia; uno de ellos, es que estos implantes tienen un módulo más alto que el hueso, lo que puede inducir osteopenia (pérdida de masa/densidad ósea). Adicionalmente, los implantes metálicos tienen nula biodegradabilidad, en muchos casos son necesarias cirugías adicionales para corregir/remover

el implante, interfiriendo/limitando el crecimiento interno del tejido óseo nativo^{2,22}. Otro problema asociado a los implantes metálicos, es la citotoxicidad generada a partir de la liberación excesiva de iones o el desprendimiento de partículas que puedan filtrarse en el cuerpo, de tal forma que estos desechos pueden provocar inflamación, y destruir el tejido muscular y óseo²².

Posteriormente, se implementó el uso de materiales bioactivos como los cerámicos. Los cerámicos se denominaron como bioactivos debido a que provoca una respuesta biológica específica en la superficie del material dando como resultado la regeneración ósea²³. El factor anterior fue clave para su uso como sistemas de andamiaje óseo. Sin embargo, los materiales cerámicos exhiben una tenacidad menor a la del hueso y no proporcionan buena resistencia mecánica, en consecuencia, su aplicación como implantes óseos se ve limitada²⁴. De hecho, actualmente los cerámicos se utilizan en combinación con materiales más resistentes en aplicaciones de implantes óseos, para que puedan soportar el esfuerzo mecánico requerido y que al mismo tiempo pueda proporcionar una respuesta biológica²⁵.

Un último recurso para los pacientes que requieren un sustituto óseo, es el uso de implantes poliméricos. Debido a que son ligeros, presentan buena resistencia mecánica y muchos de los polímeros utilizados en aplicaciones biomédicas (*e.g.* poli-(ácido láctico), poli-(hidroxialcanoatos), poli-(caprolactona) y poli-(ácido glicólico), entre otros) son altamente biocompatibles^{26,27}. Sin embargo, los polímeros no poseen la capacidad de reconocimiento celular, es decir; no existe interacción biológica para restaurar al tejido óseo. En consecuencia, y a fin de subsanar las carencias en los implantes poliméricos, es necesario incorporar agentes bioactivos, como en el modelo que se presenta en la Figura 3, de tal manera que mimetice el medio circundante para promover la regeneración ósea².

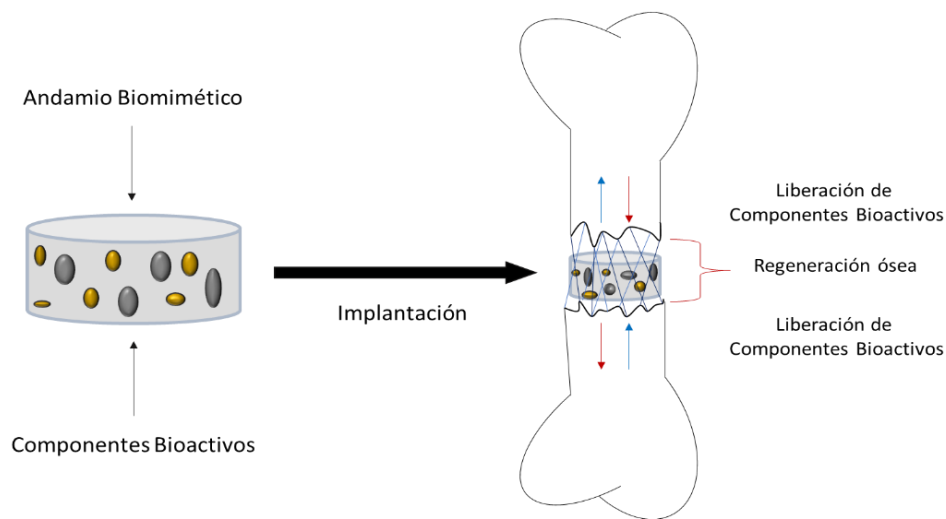


Figura 3. Modelo idealizado del funcionamiento de un andamio biomimético multicomponente. Imagen adaptada del trabajo de Porter J. et al².

3.2.2. Papel de la Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa en el Desarrollo de Andamios

La ingeniería de tejidos, es un campo multidisciplinario que involucra áreas como la bioingeniería, ingeniería de materiales y ciencias biológicas, con el propósito de fabricar dispositivos biomiméticos capaces de reemplazar tejidos vivos (andamios). Por su parte, la medicina regenerativa involucra la investigación sobre auto regeneración, donde el cuerpo utiliza sus propios sistemas con ayuda de material biológico externo, para reconstruir el tejido dañado²⁸.

Hoy en día, la reparación de defectos óseos sigue siendo un desafío importante a pesar de los avances en los diversos tratamientos existentes. En este contexto, los compuestos bioactivos muestran un potencial considerable para el tratamiento de lesiones óseas, ya que pueden promover la regeneración del tejido óseo. Un componente bioactivo, influye en las actividades celulares y fisiológicas del cuerpo. La bioactividad, hablando específicamente de la regeneración ósea, se refiere a la capacidad de los materiales para unirse directamente al hueso y promover su formación²⁹.

En este sentido, se hace presente el concepto de regeneración ósea guiada, que consiste en una serie de técnicas/estrategias con el propósito de mantener la integridad esquelética, mediante el uso de factores osteoinductivos. Así pues, cuando se produce una fractura se coloca un implante con componentes bioactivos para aumentar el sustrato óseo, que a su vez es regulado por procesos fisiológicos de remodelación o cicatrización¹⁰.

El fundamento para desarrollar andamios de vanguardia, es utilizar la respuesta biológica natural del cuerpo ante el daño tisular. De modo que al incluir componentes bioactivos la cantidad de procedimientos invasivos sea menor, que la aceptación por parte del paciente incremente y evitar el riesgo de contraer enfermedades².

Dos de las vertientes existentes en la ingeniería de tejidos para el diseño de andamios incluyen: a) el sembrado de células que promuevan la regeneración ósea y b) la implantación de andamios acelulares biomiméticos con factores osteoinductivos inmediatamente después de la lesión/extracción del hueso³⁰⁻³². Sin embargo, dependiendo de los límites de recuperación de los diferentes tejidos, no siempre es necesaria la inclusión de células sino simplemente el uso de biomateriales y moléculas bioactivas, para que se produzca la recuperación. Actualmente, existe una amplia variedad de andamios tridimensionales producidos a partir de biomateriales con propiedades bioactivas para regeneración ósea^{28,33,34}.

En general, se conocen como biomateriales a todos aquellos materiales destinados a entrar en contacto con los tejidos vivos y/o los fluidos biológicos cuya finalidad es evaluar, tratar y modificar defectos o bien sustituir cualquier tejido u órgano³⁵⁻³⁷. En la Figura 4 se esquematizan las diferentes generaciones de biomateriales utilizados en biomedicina. De acuerdo con su reactividad química los biomateriales se pueden clasificar en bioinertes, que son poco reactivos debido a su baja solubilidad en el cuerpo; bioactivos, que interactúan con el medio que los rodean; y reabsorbibles, que se degradan después de cierto periodo posterior a la implantación, en componentes no tóxicos y que pueden ser excretados por el organismo.

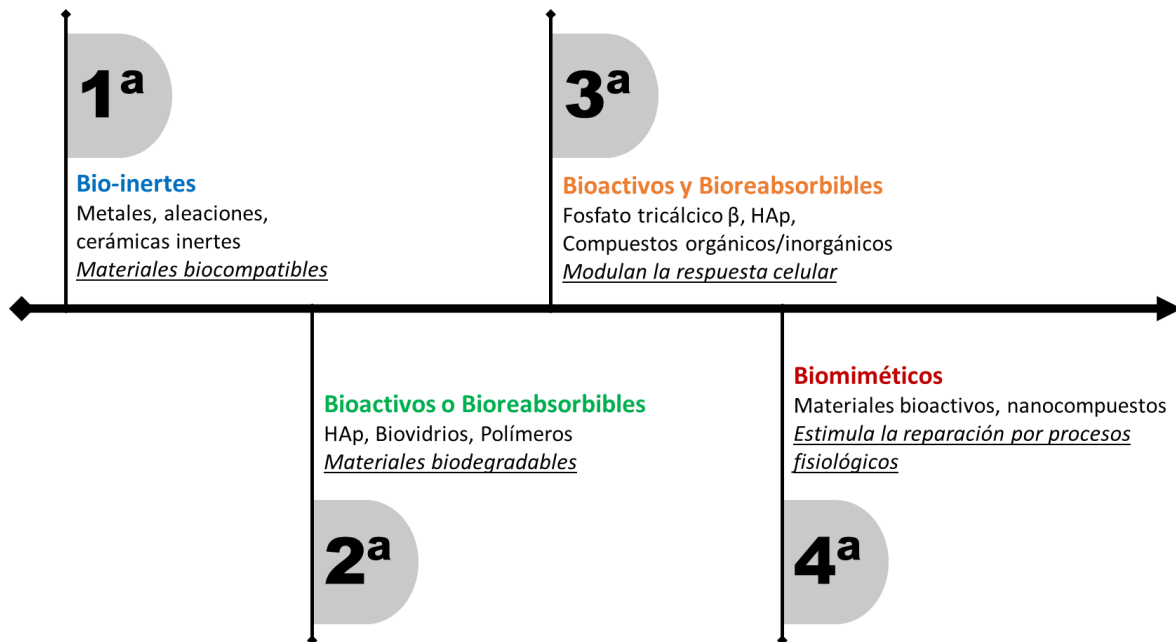


Figura 4. Generaciones de biomateriales utilizados para implantes óseos.

3.3. Nanopartículas Bioactivas y sus Métodos de Obtención

3.3.1. Nanopartículas Osteoinductoras

En secciones precedentes, se hizo especial énfasis sobre la importancia de fabricar andamios biomiméticos multifuncionales, utilizando componentes bioactivos que sirvan de guía en la regeneración ósea. De manera puntual, los materiales cerámicos bioactivos (biocerámico) resultan especialmente atractivos en aplicaciones biomédicas, debido a su capacidad de inducir una respuesta biológica específica en la interfaz del tejido óseo, uniéndose químicamente (a nivel iónico o molecular) al tejido óseo. Esta propiedad da como resultado la formación de un vínculo estrecho entre el andamio y el tejido vivo, de tal forma que se promuevan los procesos de curación^{24,38,39}.

El grado de bioactividad dependerá de la capacidad del material para proporcionar un suministro continuo y controlado de señales químicas para estimular la función celular y la formación de tejido. En este sentido, la composición química, la estructura cristalina y los parámetros de procesamiento de los materiales bioactivos controlarán la tasa de formación de tejido óseo nuevo y la reabsorción del material de injerto⁴⁰.

Dentro de las materiales biocerámicos más utilizados como agentes osteoinductivos, se encuentran la HAp, el fosfato tricálcico y bio-vidrios multifásicos^{24,38}. Algunos estudios *in vitro* e *in vivo* de andamios con duración a corto y largo plazo han confirmado que los materiales biocerámicos inducen osteoinducción, además promueven la migración de las células madres mesenquimales (osteoconducción) y permite el crecimiento e integración del tejido óseo (osteointegración)^{40,41}. Aunado a lo anterior, una de las grandes ventajas que ofrecen los biocerámicos es que poseen mayor estabilidad y propiedades osteogénicas superiores *in vivo* en comparación con autoinjertos de tamaño crítico⁴⁰.

Por su parte, la HAp sintética es un fosfato de calcio perteneciente a la familia de las apatitas, presenta una estructura hexagonal, con el grupo espacial P6₃/m, con fórmula química Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂, normalmente presenta una relación molar Ca/P de 1.67⁴²⁻⁴⁴. La HAp es la apatita más común que se encuentra en el cuerpo, sin embargo, es posible encontrarla junto a diversas configuraciones elementales con la fórmula básica M₁₀(ZO₄)₆X₂, donde; M representa una variedad de minerales como Ca, Mg, Fe, Cd, etcétera; Z representa P, As, V, C, S, etcétera y X representa F, Cl, Br, OH, entre otros. Como se observa en la Tabla 3 dependiendo de la relación Ca/P, el fosfato de calcio puede abarcar diversas fases^{44,45}.

Tabla 3. Fases que puede adquirir el fosfato de calcio dependiendo la relación molar Ca/P⁴⁴⁻⁴⁶.

Relación Ca/P	Nombre General	Fórmula	*PK _s a 25°C
0.5	Fosfato monocálcico	Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1.14
1.0	Fosfato dicálcico anhidro (brushita)	CaHPO ₄	6.59
1.5	(α/β) Fosfato tricálcico	Ca ₃ (PO ₄) ₂	25.5/28.9
1.68	Hidroxiapatita	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	116.8
1.2 – 2.2	Fosfato de calcio amorfo	Ca _x (PO ₄) _y ·nH ₂ O	-
1.69	Hueso esponjoso	-	-
1.65	Hueso compacto	-	-

*PK_s = constante de solubilidad en agua

La HAp es la biocerámica más utilizada en la regeneración de tejidos óseos debido a su similitud química, mecánica, biológica y cristalográfica con el tejido óseo, de tal manera que la HAp se adhiere al hueso circundante de una forma estrecha y estable^{44,47,48}. Además, es posible incorporar la HAp a un sistema de andamiaje para agilizar la regeneración ósea, desde el tejido perivascular hasta el interior del implante, generando una reacción *in vivo* con el hueso (osteointegración)⁴⁸. Se ha estimado que los cristales de HAp que componen al hueso humano miden en promedio ~50 nm de largo, ~25 nm de ancho y 2 – 5 nm de espesor y se encuentran aleatoriamente dispersos en la matriz orgánica⁴⁸.

Actualmente se comercializan implantes que contienen HAp, lo cual permite que el organismo asocie a las piezas externas como propias, permitiendo que el hueso crezca en contacto con el implante^{14,48-50}. La HAp se ha utilizado como reemplazo de lesiones menores, relleno de cavidades, como recubrimiento de superficies metálicas para implantes refuerzo a base de materiales compuestos y como liberador de fármacos^{48,51,52}.

Otra característica importante, es la versatilidad de los materiales biocerámicos para conferirlos de propiedades multifuncionales. En este contexto, ya sea dopando la estructura de la HAp o decorando su superficie con otros elementos/compuestos (*e.g.* ZnO-NPs, Ag-Nps, entre otros), es posible obtener materiales biocerámicos con actividad antibacteriana. Cabe resaltar, que una de las complicaciones más frecuentes son los fallos mecánicos ocasionados por colonización bacteriana^{39,53}.

3.3.2. Nanopartículas Antimicrobianas

Anteriormente, se planteó la importancia de diseñar materiales capaces de curar las lesiones del tejido óseo, mediante la regeneración ósea guiada. Sin embargo, existe un nuevo desafío en el diseño de andamios biomiméticos, que implica la dificultad/retraso en el proceso de curación, debido a posibles infecciones en el sitio de implantación, las cuales son ocasionadas por microorganismos patógenos⁵³⁻⁵⁶. Como consecuencia, en los últimos años se ha explorado la alternativa de optimizar los materiales utilizados como sistemas de andamiaje confiriéndoles propiedades antimicrobianas, de tal manera que posean una dualidad sinérgica tanto en la promoción de regeneración ósea, como en la prevención de infecciones^{53,55}. En este contexto,

la incorporación de nanopartículas metálicas (e.g. oro y/o plata) u óxidos metálicos (e.g. óxido de zinc, óxido de cobre, dióxido de titanio, u otro) a un sustrato (cerámico o polimérico) ha resultado exitoso en la inhibición de microorganismos^{53,55,57}.

Por su parte, las nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NPs) han sido ampliamente utilizadas en la cicatrización de heridas y/o como agente antimicrobiano, debido a que presentan toxicidad selectiva para microorganismos patógenos y nula toxicidad en células humanas⁵⁷⁻⁶¹.

Diversas investigaciones han demostrado mayor inhibición antibacteriana de ZnO-NPs en comparación con otros óxidos metálicos, contra bacterias patógenas, sobre todo en las de tipo Grampositivas (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*) y en menor medida sobre bacterias Gramnegativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*). Asimismo, se ha documentado que las ZnO-NPs pueden combatir esporas de hongos que son resistentes a altas temperaturas y altas presiones^{62,63}. Sin embargo, las ZnO-NPs tienden a formar aglomerados, lo cual implica una disminución en la interacción con las membranas bacterianas y la liberación de iones Zn^{2+} por consiguiente; la actividad antibacteriana se ve disminuida con el paso del tiempo⁶⁴.

En cuanto a las nanopartículas de plata (Ag-NPs), se ha demostrado que presentan fuertes efectos biocidas sobre bacterias (Gramnegativas y Grampositivas), hongos y virus^{65,66}. De hecho, la popularidad que han ganado las Ag-NPs en los últimos años, probablemente se deba a su alta actividad antimicrobiana de amplio espectro, por lo que actualmente son utilizadas para diferentes propósitos, como apósitos para heridas, bioadhesivos, biopelículas y recubrimiento de materiales biomédicos⁶⁵⁻⁶⁹. Desafortunadamente, el efecto citotóxico que presentan las Ag-NPs también puede provocar daños a diversos órganos, por lo que es imperativo encontrar un equilibrio entre la relación riesgo-beneficio, y establecer las proporciones de una dosis segura para su uso en aplicaciones biomédicas⁷⁰.

La actividad antimicrobiana tanto de las nanopartículas metálicas como de óxidos metálicos, se ha atribuido a diversos mecanismos de acción. En la Figura 5 se esquematizan los posibles mecanismos de acción antibacteriana para Ag-NPs y ZnO-NPs de acuerdo con Vázquez A. et al⁷¹. y Zazo H. et al⁵⁷. El primer mecanismo se atribuye a la liberación gradual de iones (Zn^{2+} , Ag^+ , etc.) en medio acuoso, que conducen a la interrupción en la replicación del adenosín

trifosfato (ATP) y del ácido desoxirribonucleico (ADN) de la bacteria, cuyos factores son fundamentales para la supervivencia celular. El segundo mecanismo reportado implica la adhesión y acumulación de nanopartículas en la superficie bacteriana, mediante la atracción de los grupos electronegativos de los polisacáridos con los cationes metálicos, lo cual genera daño directo al penetrar la membrana celular, dependiendo de la morfología de las nanopartículas. Finalmente, el tercer mecanismo sugerido, se debe a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y/o radicales hidroxilo ($\cdot OH$), que inducen daños a la membrana celular a través de la formación de radicales libres (estrés oxidativo) concluyendo en la apoptosis bacteriana^{63,68,71,72}.

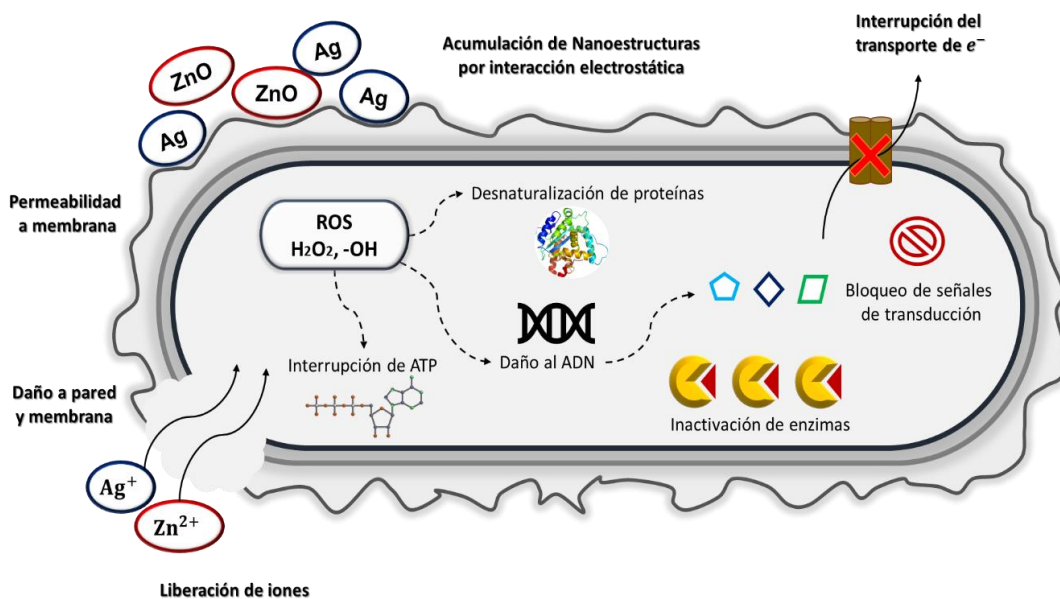


Figura 5. Posibles mecanismos de acción bactericida de nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos. Imagen diseñada con base a Vázquez A. et al⁷¹. y Zazo H. et al⁵⁷.

No obstante, es importante resaltar que de acuerdo a diversas investigaciones la actividad antimicrobiana se encuentra en función del tamaño de partícula y es inversamente proporcional a ella, es decir que, si se reduce el tamaño de partícula, se incrementará la actividad antibacteriana, dado que incrementa el área superficial en un volumen determinado debido a la presencia de mayor cantidad de nanopartículas^{62,65,66}. Por su parte, Bruna Lallao et. al⁷³ investigo la influencia del tamaño de nanopartículas de ZnO en la actividad antibacteriana contra

S. aureus, donde los autores concluyen que las nanopartículas de ZnO con tamaños ~ 5 nm presentan mayor actividad antibacteriana con respecto a las nanopartículas con tamaños ~70 nm. Adicionalmente, Shaoheng Tang et. al⁷⁴ realizaron una compilación de información donde reportan que el tamaño de las nanopartículas de Ag tiene influencia sobre la actividad antibacteriana contra diversas bacterias (entre ellas *E. coli*), siendo las de menor tamaño las que mayor actividad antibacteriana proporcionan. Así mismo, los métodos y condiciones de síntesis empleados juegan un papel fundamental, ya que de ellos dependen las morfologías, fases cristalinas, tamaño de cristalito y tamaños de las partículas a obtener^{58,75}. En este sentido, se han reportado una amplia variedad de métodos físicos y químicos para la obtención de nanopartículas metálicas y óxidos metálicos, entre las que destacan la síntesis solvotérmica, sol-gel, por microondas, precipitación en solución acuosa, precipitación por micro-emulsión y procesos mecánico-químicos, por citar algunos⁷⁵.

3.3.3. *Nanomateriales Híbridos*

Durante la última década, los materiales híbridos han surgido como una clase de materiales con propiedades prometedoras para diversas aplicaciones, incluida el área biomédica. Por definición un material híbrido se refiere a la combinación/integración de diferentes componentes en una sola entidad/estructura mediante interacciones a nivel atómico y/o molecular^{76,77}. En este sentido, el conjunto de componentes que conforman al material híbrido, son capaces de proporcionar un efecto sinérgico al producto final y no solo de las propiedades de sus componentes por separado, de tal manera que se pueden obtener propiedades multifuncionales^{76,77}.

Por lo tanto, los materiales híbridos ofrecen amplias posibilidades en términos de propiedades, debido a que pueden obtenerse diversos materiales con solo alterar el conjunto de componentes, la proporción, la composición, el tamaño, la forma y la estructura (química y/o cristalográfica)^{76,77}.

Algunos investigadores han sintetizado materiales híbridos de óxido de zinc y plata (ZnO-Ag) mediante diversas técnicas (vía solvotérmica, sol-gel, microondas, entre otros) con la finalidad

de demostrar el incremento de las propiedades antibacterianas, principalmente contra bacterias como *E. coli* y *S. aureus*. Tal es el caso de Talari et al⁷⁸, quienes sintetizaron ZnO-Ag mediante un método mecano-químico, los autores encontraron una mejora en la inhibición bacteriana de ZnO-Ag contra *E. coli* y *S. aureus*, en comparación con el ZnO prístino⁷⁸.

Por su parte, Radenka et al⁷⁹, en 2014, reportaron la síntesis vía microondas de nanocubos de alginato-ZnO decorado con nanopartículas esféricas de Ag, y observaron una mayor disminución en las unidades formadoras de colonia para *E. coli* y *S. aureus* en el híbrido de alginato-ZnO-Ag que con los nanocubos de alginato-ZnO y alginato prístino⁷⁹.

En la investigación de Zhang et al⁸⁰ se evaluó la actividad antibacteriana de ZnO-Ag contra *E. coli* y *S. aureus*, en híbridos de ZnO-Ag. En este trabajo se concluyó, que el híbrido de ZnO-Ag posee mayor actividad antibacteriana que sus contrapartes individuales⁸⁰.

De manera análoga, otros investigadores han reportado la síntesis de híbridos de HAp con nanopartículas metálicas u óxidos metálicos para aplicaciones biomédicas. En un trabajo realizado por Zamperini et al⁸¹, se sintetizaron nanohíbridos de HAp-Ag por co-precipitación asistida por microondas y evaluaron su actividad antifúngica contra *Candida albicans*. Estos autores encontraron que los nanohíbridos de HAp-Ag tienen gran potencial para el control de este tipo de hongo⁸¹.

En otra investigación, Cai et al²⁵ manufacturaron nanofibras de PVA/HAp-ZnO por electrohilado. Los autores concluyeron que la actividad antibacteriana de las nanofibras fue mayor contra *S. aureus*, sin embargo, para lograr la inhibición contra *E. coli* tuvieron que incrementar el contenido de ZnO en el híbrido. De acuerdo a los resultados que obtuvieron los autores, mencionan que las nanofibras de PVA/HAp-ZnO podrían tener gran potencial en aplicaciones biomédicas, debido a la presencia de HAp como factor osteoconductor²⁵.

Por otro lado, Begam et al⁸², estudiaron la respuesta de las líneas celulares de osteoblastos (MG63) con HAp:Zn mediante un proceso de sinterización. Los resultados demostraron que la actividad metabólica, la adhesión y la tasa de proliferación de las células osteoblásticas en HAp:Zn incrementó respecto a HAp pura⁸².

De igual forma, Predoi et al⁸³ estudiaron el efecto HAp:Zn a diferentes concentraciones de iones Zn^{2+} , sobre la viabilidad de líneas celulares hepáticas (HepG2), donde se observó que existe baja citotoxicidad con altas concentraciones de Zn debido a que la liberación de iones Zn^{2+} presenta una solubilidad más lenta. Además, los autores investigaron las propiedades antibacterianas contra cepas de *S. aureus* y *E. coli* en nanopartículas de HAp:Zn. Los autores reportaron que el material dopado inhibe significativamente el crecimiento de *S. aureus*, mientras que para *E. coli* se observó menor actividad antibacteriana. Finalmente los investigadores concluyen que las nanopartículas de Zn:HAp tienen el potencial para ser utilizados en el campo biomédico⁸³.

Por su parte, Riaz et al⁸⁴ sintetizaron HAp-Ag mediante un método de precipitación y sinterizado a 900°C manteniendo condiciones alcalinas, utilizando $AgNO_3$, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ y $(NH_4)_2HPO_4$ como precursores de HAp-Ag. Los resultados reportados de la bioactividad *in vitro* revelaron la capacidad de unión ósea de las muestras de hidroxiapatita dopadas con plata y un aumento significativo ($P < 0,005$) en la actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*⁸⁴.

Recientemente, Edwin Ofudje et al⁸⁵ investigaron el efecto antimicrobiano contra *E. coli* y *S. aureus*, así como la bioactividad de HAp prístina e HAp:Zn. La HAp prístina, al igual que el compuesto de HAp:Zn (5, 10, 15 y 20% molar de Zn) fueron sintetizados mediante la técnica de coprecipitación química. Los autores observaron una deposición esférica alrededor de la HAp, sugiriendo el crecimiento de apatita en el medio fisiológico después de siete días de incubación. Mientras que los estudios de actividad antibacteriana mostraron zonas de inhibición mayor conforme se aumentaron las concentraciones de iones zinc⁸⁵.

De acuerdo a lo anteriormente descrito, se tiene la certeza de que un sistema híbrido resulta incluso más atractivo que sus componentes por separado, debido a su efecto sinérgico. Sin embargo, pocos autores mencionan en el efecto sinérgico que proporciona un sistema híbrido. Pues bien, una posible respuesta a la incógnita anterior es que las Ag-NPs se adhieren preferentemente en la pared celular de bacterias Gramnegativas, debido a que son ligeramente electropositivas⁸⁶. Por su parte, las bacterias Grampositivas se encuentran menos cargada negativamente, por lo que son menos susceptibles a ataques directos de las Ag-NPS. No

obstante, también es posible el daño físico a la membrana celular de la bacteria, efecto atribuido al ZnO⁸⁶.

Por otro lado, se ha informado que el Zn es un oligoelemento esencial que actúa como estimulante en la formación ósea. Por lo tanto, se ha demostrado que la incorporación de HAp dopada con iones Zn²⁺ en sistemas de andamiaje, favorece la formación de hueso alrededor del implante^{87,88}.

Siguiendo el razonamiento hasta ahora descrito, uno de los propósitos de este proyecto fue sintetizar un material híbrido de hidroxiapatita-óxido de zinc-plata (HAp-Ag-ZnO) que presente propiedades osteoconductoras y antibacterianas, para posibles aplicaciones biomédicas. La síntesis de HAp-Ag-ZnO se efectuará mediante un método solvotérmico asistido por ultrasonido. Cabe resaltar que hasta el momento no se ha reportado la síntesis de un híbrido de esta naturaleza.

3.4. Biopolímeros con Potencial Aplicación en Andamios/Implantes Temporales

3.4.1. Andamios/Implantes a Base de Bio-poliésteres y sus Mezclas

Recientemente, ha cambiado la perspectiva del uso de materiales bioinertes y en su lugar se está optando por utilizar materiales bioactivos. En este sentido, y retomando que hasta el momento se ha resaltado el uso de HAp y otros biocerámicos como sistemas de andamiaje óseo, es importante reiterar que estos materiales suelen ser frágiles y se fracturan debido a que soportan muy baja deformación, además la dificultad de procesamiento limita su uso posterior. En consecuencia, se han utilizado diversas matrices a base de biopolímeros (naturales y/o sintéticos), debido a su capacidad inherente para interactuar con las células en crecimiento y su facilidad de modificación química.

En cuanto a las aplicaciones de implantes óseos, generalmente se ha preferido el uso de polímeros sintéticos (biodegradables) sobre los polímeros de base natural, debido a las limitadas propiedades mecánicas que estos últimos ofrecen. Además, mediante un diseño cuidadoso y un control preciso, se pueden obtener materiales poliméricos con mejores propiedades, para que cumplan con los requisitos indispensables de un andamio biomimético. Algunos ejemplos de

polímeros utilizados en aplicaciones biomédicas incluyen; poli(ácido láctico) (PLA), poli(hidroxibutirato) (PHB), poli(caprolactona), poli(ácido glicólico), entre otros, así como de copolímeros o mezclas de los polímeros anteriormente mencionados⁸⁹.

Dentro de la familia de poliésteres alifáticos lineales, el PLA es uno de los polímeros que se utiliza con mayor frecuencia en la ingeniería de tejidos y en implantes de reparación ósea. Recientemente, también se ha informado sobre el uso de PHB (que también es una especie de poliéster biodegradable) en aplicaciones biomédicas⁸⁹. Se ha demostrado que tanto el PLA como el PHB son biocompatibles y se degradan *in vivo* en componentes no tóxicos con tasas de degradación controlables. Además, se ha reportado el uso de estos biopoliésteres en aplicaciones (aprobadas por la FDA) que no involucren una carga excesiva, como, por ejemplo; tornillos óseos para cirugía maxilofacial, placas óseas, grapas, suturas quirúrgicas degradables, vehículos de suministro de fármacos, membranas planas para la regeneración tisular guiada y mallas multifilamento para la ingeniería de tejidos⁸⁹.

En particular, la polimerización por apertura de anillo de la molécula quiral de ácido láctico (L-lactida y D-lactida), conduce a la formación de los polímeros semi-cristalinos (~37%) poli(L-láctico) (PLLA) y el poli(D-láctico) (PDLA), como resultado de una estructura organizada, mayormente isotácticos. Su temperatura de transición vítrea se encuentra entre 60-65°C y su temperatura de fusión es de 175°C aproximadamente⁹⁰. Por otro lado, la polimerización de lactida racémica (D, L) da como resultado la formación de polímeros amorfos (PDLLA) debido a la distribución aleatoria de las unidades L y D-lactida (Figura 6), la cual presenta una temperatura de transición vítrea entre 55-60°C⁹⁰.

Debido a la naturaleza cristalina del PLLA y PDLA, se ha informado que su capacidad de degradación es lenta para la absorción total *in vivo* (~2 y 5 años). Caso contrario para el PDLLA, que debido a su naturaleza amorfa se degrada mucho más rápido perdiendo su resistencia aproximadamente en 1-2 meses. Lo anterior, hace del PDLLA el candidato ideal como material de andamiaje de baja resistencia para la regeneración de tejidos, al ser un polímero con una tasa de degradación más rápida en comparación con el PLLA⁹⁰. Sin embargo, las propiedades mecánicas dependen del grado de cristalinidad del polímero. No obstante, se ha informado que

la alta fragilidad, la velocidad de cristalización lenta y las propiedades de baja barrera del PLA limitan fuertemente sus aplicaciones.

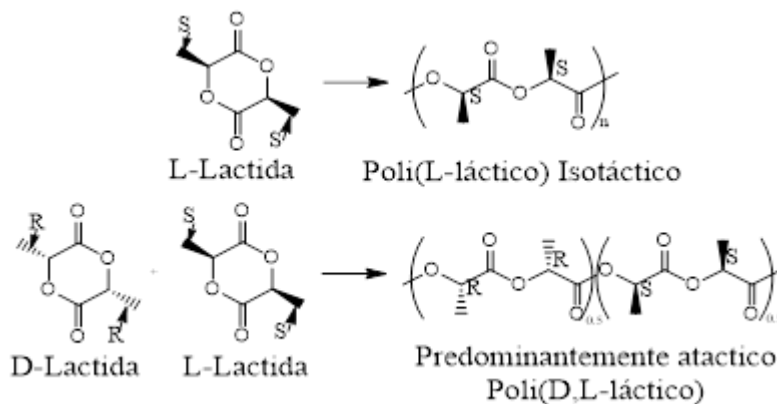


Figura 6. Conformaciones que adquiere el PLA a partir de las dos formas isoméricas de la lactida.

Por su parte, el PHB es un poliéster perteneciente a la familia de los poli(hidroxicanoatos) (PHAs), se produce como gránulos insolubles mediante la acumulación intracelular en el citoplasma de diversas bacterias (*Bacillus magmeterium*, *Azotobacter vinelandii*, *Cupriavidus necátor*, etc.) (Figura 7)⁹¹. El PHB es un polímero isotáctico semi-cristalino, con una temperatura de fusión en un intervalo de 160-180°C, muestra alta biocompatibilidad a varias líneas celulares, incluyendo osteoblastos y células epiteliales, razón por la cual el PHB tiene potencial aplicación en el área biomédica para el desarrollo de clavos y placas óseas^{90,91}. Sin embargo, el PHB también presenta algunas desventajas relacionadas con su fragilidad, baja viscosidad en fundido y baja estabilidad térmica^{7,92}.

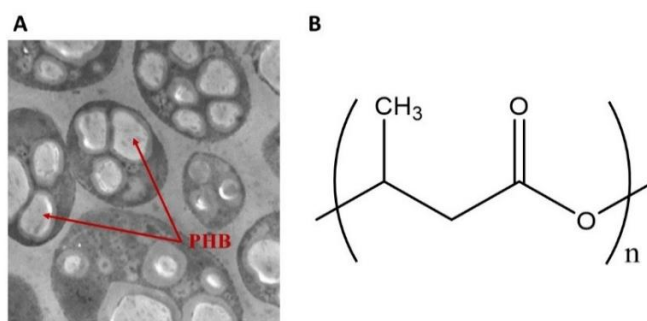


Figura 7. A) *Azotobacter vinelandii* con inclusiones de PHB en su citoplasma⁹¹. B) Estructura del poli(3-hidroxi-butirato)⁹⁰.

Actualmente se están realizando intentos para aumentar la biodegradabilidad de estos polímeros mezclándolos con polímeros hidrófilos u otros aditivos de bajo peso molecular para aumentar la penetración del agua⁹⁰.

Asimismo, se ha reportado que la combinación de PLA con otros biopolímeros es uno de los métodos más efectivos para obtener nuevas propiedades requeridas para aplicaciones específicas⁹². Por su parte, Zhang y Thomas⁷ informaron que la mezcla de PLA/PHB en proporción 75/25 m/m, mostró una fuerte unión interfacial y una mejora en las propiedades de tracción en comparación con el PLA puro. Los autores descubrieron que la mejora en las propiedades mecánicas de PLA/PHB se debe al efecto de las esferulitas de PHB, finamente dispersas en la fase continua del PLA amorfo. Además, la adición del 75% en peso de PLA mejoró la procesabilidad de PHB y se mejoraron las propiedades mecánicas de tracción y elongación, en comparación con el PLA puro.

Asimismo, Noda et al.⁹³ encontraron una mejora en la tenacidad de las mezclas de PLA/PHA con un contenido inferior al 20% de PHA, los autores explican que este comportamiento se debe a la cinética de cristalización lenta de los PHA, cuando las partículas de PHA se dispersan en dominios de alrededor de 1µm, conduciendo a partículas de PHA amorfas dispersas sobre la matriz de PLA rígida y quebradiza.

3.5. Tecnologías de Vanguardia para el Desarrollo de Andamios Sintéticos

3.5.1. *Métodos Generales para la Manufactura de Andamios Óseos*

Ahora bien, otra de las necesidades para el desarrollo de andamios, es imitar en la medida de lo posible la macroestructura del tejido óseo nativo, en este sentido, el control de la forma, tamaño, orientación e interconectividad de la estructura porosa juega un papel importante en el diseño de andamios, puesto que influye directamente sobre la respuesta mecánica del tejido óseo y la correcta vascularización de las células. Por lo tanto, es crucial evaluar los métodos de fabricación, debido a que el tiempo de procesamiento, los mecanismos de reticulación o la

degradación térmica limitan el control de los aspectos clave para la obtención de andamios biomiméticos.

Hasta la fecha, se han reportado una serie de métodos para la fabricación de andamios porosos, utilizando matrices poliméricas. De manera general los métodos de procesamiento se clasifican en dos categorías; convencionales y de vanguardia. Dentro del primer grupo se encuentran; (1) fundición de disolventes /lixiviación de partículas, (2) moldeo por fusión, (3) espuma de gas, (4) separación de fases inducida térmicamente y (5) liofilización^{1,4,94}.

No obstante, las estrategias convencionales enfrentan algunas desventajas que incluyen; el uso de solventes orgánicos que provocan efectos letales en las células del ser humano, además, la dificultad para ajustar la microestructura, morfología, conectividad y diámetros de los poros⁹⁴.

En consecuencia, se han desarrollado una serie de métodos de vanguardia para el procesamiento de andamios biomiméticos, como; (1) electrohilado e (2) impresión 3D o manufactura aditiva (MA)^{1,94}.

Sin embargo, resulta difícil establecer cual método de fabricación supone la mejor opción para el procesamiento de andamios, pero podría considerarse dentro de cierto contexto la aplicación objetivo que se puede alcanzar con cada una de las técnicas anteriormente expuestas. Por ejemplo, si los parámetros objetivo para el diseño de tejido son mayor flexibilidad, una elevada área de superficie y porosidad interconectada del andamio, la técnica de electrohilado sería la técnica más adecuada para esta aplicación. Por el contrario, si el tejido requiere de un material con menor porosidad y altas propiedades mecánicas, así como una bioactividad adecuada, la MA ofrecerá andamios con las características requeridas⁹⁴. Otro ejemplo es que el hueso cortical típicamente tiene una porosidad de sólo 5 - 10%, mientras que el hueso esponjoso contiene una porosidad de 75 - 95%, por lo que las técnicas aplicables deben facilitar la creación de porosidades en estos intervalos¹. Además, se debe considerar la viabilidad del material a procesar por alguno de los métodos previamente citados.

3.5.2. Manufactura de Andamios Multifuncionales por Impresión 3D

La tecnología de impresión 3D, es un método emergente para la fabricación de andamios biológicos. De manera general, esta tecnología involucra el diseño de un modelo tridimensional asistido por computadora (CAD), el cual posteriormente es transformado en código G para su interpretación por la impresora. Con esta tecnología emergente es posible crear piezas funcionales con geometrías de relleno y porosidades controladas, lo cual permite a su vez obtener dispositivos biomédicos con propiedades mecánicas/estructurales modelables. Otras ventajas de este enfoque es que son altamente reproducibles, el diseño iterativo es más ágil, de menor costo y más versátil.

Existen diferentes tecnologías de impresión 3D, dentro de las que destacan modelado de deposición fundida (FDM), escritura con tinta directa (DIW), estereolitografía (SLA), procesamiento de luz digital (DLP) y sinterización selectiva por láser (SLS).

Dentro de los enfoques utilizados en MA, la impresión por FDM se considera una de las técnicas más eficientes para manufacturar andamios óseos, debido a que la resolución espacial que se alcanza mediante FDM puede generar tipologías a microescala convenientes⁹⁵.

En la Figura 8 se muestran las partes de una impresora 3D para llevar a cabo la impresión por FDM. En primer lugar, se requiere de un filamento de material termoplástico, que posteriormente será alimentado desde una bobina hacia un cabezal de extrusión que puede moverse en los ejes “X”, “Y” y “Z” para definir la forma de impresión de la pieza. Una vez dentro del cabezal, el filamento será calentado hasta su temperatura de fusión, permitiendo que se depositen capas finas del polímero semi-fundido creando una capa bidimensional (2D) de forma secuencial, la deposición repetida de esta capa 2D, una encima de otra. Después, el filamento fundido se enfriará en el aire del entorno de impresión, permitiendo que los hilos extruidos se fusionen rápidamente para crear una estructura 3D⁹⁵⁻⁹⁸.

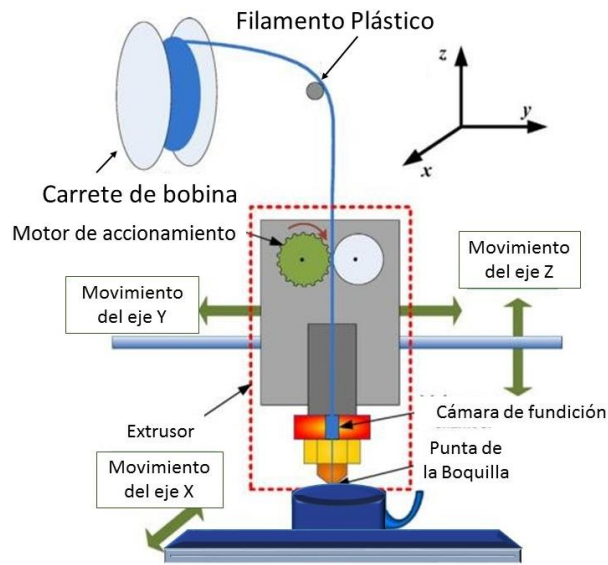


Figura 8. Esquema de impresión 3D mediante FDM⁹⁸.

Otra de las ventajas de la impresión por FDM, es el uso de gran variedad filamentos que admitan la incorporación de moléculas bioactivas que puedan lograr una mejor respuesta celular^{95,96}.

Para efectuar la impresión 3D de andamios se debe tomar en cuenta algunos parámetros como son: la velocidad de impresión, el espesor de la capa, la temperatura y la presión del cabezal de impresión, el patrón de relleno, la orientación de la impresión, etc⁹⁶. Asimismo, tales parámetros dependen de la selección de los materiales imprimibles, lo cual está ligado a su comportamiento reológico, de tal forma que permita la estabilidad estructural durante el proceso de impresión⁹⁹.

3.5.3. *Obtención de Piezas Personalizadas a Partir del Diseño de Modelos 3D*

A diferencia de las técnicas convencionales utilizadas en el campo biomédico, la MA permite la creación de piezas complejas, mediante la optimización de los parámetros de impresión mediados por un modelo de elementos finitos, el cual consiste de un método numérico, que involucra la recopilación de información precisa de tejidos y órganos para diseñar el modelo, transfiriendo la información en señales eléctricas para el control de la impresora durante el proceso de fabricación^{99,100}. En este sentido, los modelos CAD serian específicos de cada

paciente y se podrían obtener mediante la conversión de tomografía computarizada o resonancia magnética⁹⁶.

En la impresión 3D no es común utilizar rellenos completos, sino que se forman rellenos porosos con cierta curvatura, puesto que la configuración de llenado de un objeto 3D, no solo influye en la jerarquía requerida para la vascularización celular de un andamio, sino también sobre sus propiedades mecánicas, cuando se consideran geometrías 3D complejas que puedan ser sometidas a esfuerzos de tensión/compresión¹⁰⁰. El relleno de un objeto 3D, es originado por un patrón, el cual se rige por el grosor y cantidad de capas apiladas. En la Figura 9 se observan algunos de los patrones de relleno utilizados en MA incluyen; rectilíneo, cuadrícula, triangular, ondulación y hexagonal (panal de abeja), Schwarz P y D¹⁰⁰. La configuración del patrón de relleno influye sobre la masa, la resistencia y el tiempo de impresión del objeto 3D. Normalmente los patrones de relleno son manipulados por un software de mando, que adicionalmente permite manipular la densidad de relleno local (porcentaje de relleno) y el grosor de la pared de relleno para lograr una tensión distribuida uniformemente¹⁰⁰.

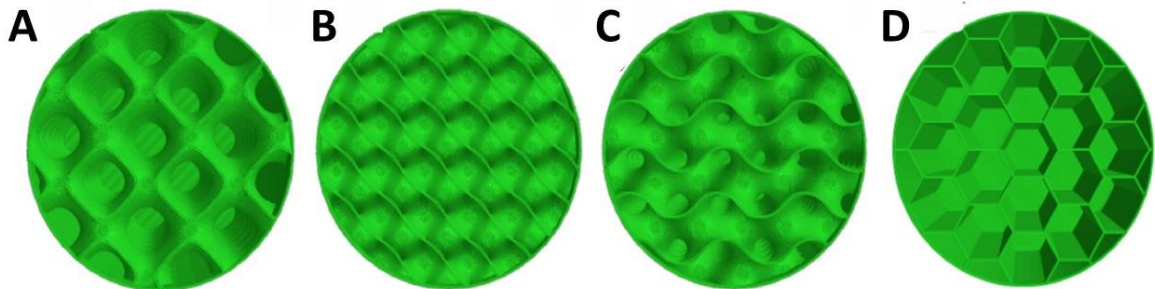


Figura 9. Patrones de relleno de impresión 3D. A) Schwarz P, B) Schwarz D, C) giroidal y D) hexagonal¹⁰⁰.

3.6. Consideraciones en el Diseño de Andamios

3.6.1. Condiciones Biológico – Mecánicas

A grandes rasgos, los factores más importantes a tomar en cuenta son: (1) el diseño de una jerarquía dimensional a micro y nanoescala representativa del hueso, (2) la incorporación y

liberación viable controlada de moléculas bioactivas y (3) control de la bioerosión para igualar la tasa de síntesis de tejido nativo^{101,102}.

El primer punto para la obtención de un andamio sintético ideal, es que debe ser capaz de mimetizar a la matriz ósea natural, en este sentido, las propiedades de un andamio pueden ser manipuladas mediante la selección del método de obtención, para que el andamio adquiera la arquitectura adecuada para la vascularización celular, controlando sus propiedades microestructurales como el tamaño y la interconectividad de los poros^{101,102}. Ciertos autores, indican que los andamios con porosidad superior al 90% y con tamaño de poro generalmente en el orden de 300 – 500 μm , pueden dirigir a una mejora en la vascularización y crecimiento de tejido¹⁰².

Por otro lado, se sabe que el entorno biomimético de un andamio acelular puede mejorarse sustancialmente mediante la incorporación de moléculas bioactivas que se liberen de manera controlada a medida que el andamio se degrada y el tejido nativo lo reemplaza. De acuerdo con el hecho anterior, se debe tener en cuenta que los materiales que compondrán al andamio deberán ser materiales biocompatibles y que sus productos de degradación no sean citotóxicos¹⁰¹.

También se deberá considerar la duración del implante, que se encuentra en función de la tasa de biodegradación, la cual debe ser cercana a la tasa de formación ósea natural, en este sentido la velocidad de degradación juega un papel fundamental^{101,102}. Los biomateriales implantados tendrán que alcanzar las propiedades mecánicas requeridas del hueso natural y deberán proporcionar suficiente estabilidad mecánica en el momento de la implantación.

Además, se deben considerar los mecanismos de estimulación mecánica en células y tejidos óseos, puesto que para simular el entorno fisiológico mecánico-dinámico del hueso nativo, un andamio sintético debe tener propiedades mecánicas similares, específicamente el módulo elástico. Típicamente, los andamios están diseñados para coincidir con las propiedades mecánicas del hueso esponjoso humano¹⁰³.

Definitivamente, el éxito clínico de un andamio se rige por la relación de estructura, propiedades y procesamiento. En la Tabla 4 se resumen las necesidades esenciales para la obtención de

andamios con propiedades multifuncionales, relacionando su interacción con el tejido vivo, capacidad de brindar soporte mecánico y sus métodos de procesamiento.

Tabla 4. Requerimientos para la obtención de andamios óseos.

Bio-compatibilidad	Propiedades Mecánicas	Procesabilidad
- Biocompatibilidad	- Tenacidad	- Métodos de fabricación
- Osteointegración	- Módulo elástico	- Disponibilidad y
- Bioactividad	- Resistencia a la fatiga	calidad de materias
- Subproductos no	- Dureza	primas
tóxicos	- Resistencia al	- Capacidad y costos de
	desgaste	producción

4. OBJETIVOS

4.1. General

Desarrollar materiales porosos por impresión 3D a base de mezclas de PLA/PHB y nanohíbridos de hidroxiapatita-Ag-ZnO con propiedades antibacterianas dirigidos hacia su aplicación como andamios óseos.

4.2. Específicos

- Establecer las condiciones de síntesis de los nanohíbridos HAp-Ag-ZnO, de tal forma que las ZnO-NPs y Ag-NPs estén preferentemente adheridos en la superficie de la HAp.
- Incorporar de forma optimizada los nanohíbridos de HAp-Ag-ZnO a una mezcla polimérica de PLA/PHB.
- Estudiar la interacción química entre las nanopartículas de ZnO y Ag con la HAp.
- Determinar el efecto de la incorporación de los nanohíbridos de HAp-Ag-ZnO en materiales porosos base PLA/PHB sobre las propiedades mecánicas y antibacterianas en los materiales manufacturados.

5. HIPOTESIS

La incorporación de nanohíbridos jerárquicamente organizados a base de HAp decorada con nanopartículas de ZnO y Ag impartirá actividad antimicrobiana y propiedades de osteointegración a una mezcla de PLA/PHB sin deteriorar su desempeño mecánico ante cargas de compresión, de tal forma que tengan potencial aplicación en implantes óseos.

6. CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA

El desarrollo de la presente propuesta generará conocimiento a nivel de ciencia básica para el desarrollo de andamios óseos a partir de compuestos poliméricos multifuncionales a base de PLA/PHB con híbridos HAp-Ag-ZnO, de tal forma que éste proporcione actividad antibacteriana y propicie la regeneración ósea. Es importante mencionar que materiales híbridos con la arquitectura propuesta, así como su ruta de síntesis no ha sido reportada en la literatura y aun menos se ha explorado su impacto en materiales porosos obtenidos impresión 3D para su uso en andamios óseos.

7. METODOLOGÍA

La estrategia seguida en este trabajo se resume en la Figura 10. Primero, se llevó a cabo la síntesis de nanohíbridos, utilizando una matriz de experimentos que se detallara con detalle en la sección 7.1 de la metodología. De los materiales sintetizados se obtuvieron caracterizaciones morfológicas y fisicoquímicas. Una vez analizado los resultados de los nanohíbridos sintetizados se eligió el primer nanohíbrido de la Tabla 6 denotado como NHS-1. Posteriormente, se obtuvieron mezclas de PLA/PHB, PLA/PHB/HAp_1% (Hidroxiapatita al 1%) y PLA/PHB/NHS_1% (HAp-Ag-ZnO al 1%). Las mezclas fueron homogenizadas en fundido en una cámara de mezclado Brabender. De las mezclas anteriores se obtuvieron filamentos con un extrusor FilabotEX 6 extruder con diámetros de ~1.75 mm. Antes de la impresión de los materiales compuestos, se decidió evaluar las propiedades mecánicas a compresión de tres patrones de relleno con tres diferentes porcentajes/densidades de relleno (giroidal, hexagonal y triangular a 50, 70 y 90%), utilizando un filamento comercial. Una vez determinado el mejor patrón de relleno, se imprimieron los materiales compuestos. Los prototipos impresos a partir de las mezclas anteriores, se sometieron a ensayos mecánicos de compresión, así como a ensayos biológicos para determinar su actividad antibacteriana. La lista de los reactivos utilizados durante la etapa de síntesis se presenta en la Tabla 5, así como su porcentaje de pureza y fabricante.

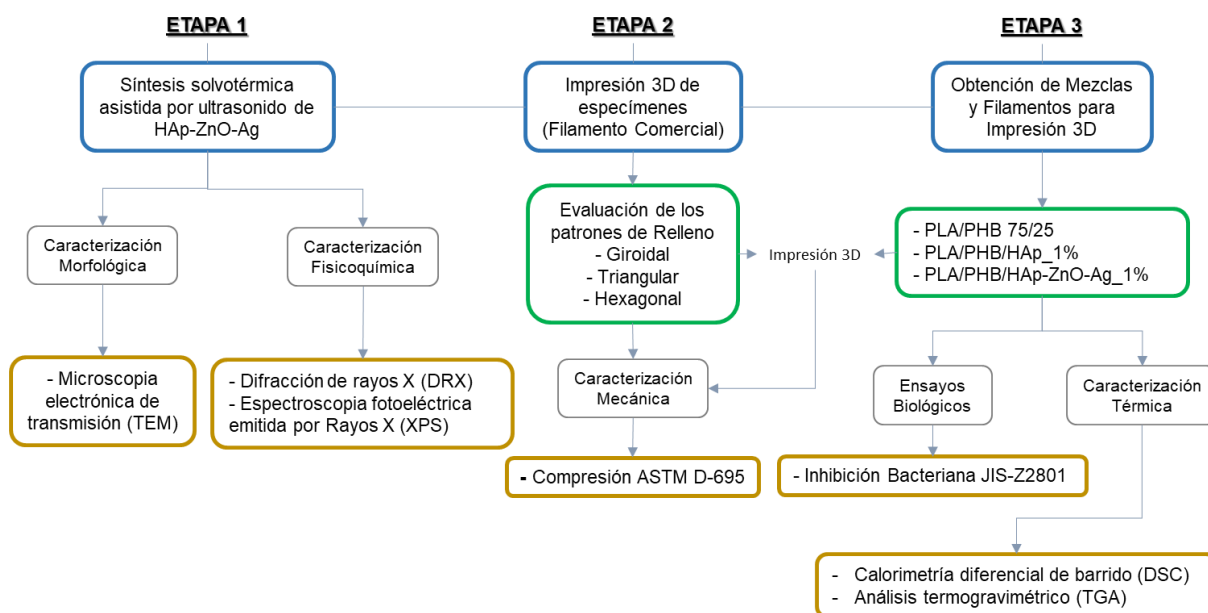


Figura 10. Esquema general del plan de trabajo.

Tabla 5. Reactivos utilizados para la síntesis de nanohíbridos de HAp-Ag-ZnO.

Material / Reactivo	Pureza (%)	Proveedor
Hidroxiapatita	≥ 97	Sigma-Aldrich
Hidroxido de sodio	≥ 98	
Nitrato de plata	≥ 99	
Acetato de zinc dihidratado	≥ 99	
Metanol anhidro	-	-

7.1. Síntesis de Nanohíbridos

Durante la etapa de la síntesis de HAp-Ag-ZnO se llevaron a cabo experimentos exploratorios a fin de delimitar las condiciones de síntesis y concentración de los precursores (Anexo 1). En cuanto al procedimiento de obtención de los nanohíbridos, se llevó a cabo la síntesis mediante un método solvotérmico asistido por ultrasonido, manteniendo una temperatura estable de 60°C, en el transcurso del procedimiento. Primero, se dispersaron por 30 min, tres sistemas que contenían 250 mg HAp en 125 mL de MeOH anhidro, los cuales se denotaron como NHS-1, NHS-2 y NHS-3 (para el nanohíbrido 1, 2 y 3). Posteriormente, a las dispersiones estables de HAp/MeOH se les adicionó gota a gota una disolución de NaOH [10mM] en diferente proporción para cada uno de los sistemas, 100, 200 y 300 mL respectivamente y se prosiguió dispersando por 15 min. Después, se agregaron 75, 150 y 225 mL respectivamente de una disolución de AgNO₃ [5mM] como precursor de las nanopartículas de Ag-NPs (dispersando 15 min). Finalmente se adicionaron 75, 150 y 225 mL respectivamente de una disolución de Zn(CH₃COO)₂·2H₂O [10mM] como precursor de ZnO-NPs (dispersando 2 h 15 min). Los productos resultantes se filtraron con un sistema al vacío, utilizando una membrana de teflón con tamaño de poro de 0.2 μ y se lavaron con MeOH hasta remover los residuos de los reactivos, posteriormente se secaron a 70°C, hasta la eliminación total de MeOH. Adicionalmente, los nanohíbridos fueron liofilizados para su posterior incorporación con la matriz polimérica de PLA/PHB. En la Tabla 6 se resumen las proporciones de los reactivos involucrados en la síntesis de los tres nanohíbridos anteriormente descritos.

Las concentraciones de AgNO₃ y Zn(CH₃COO)₂·2H₂O se pensaron de tal manera que se mantenga una relación 2:1 de los precursores de ZnO-NPs y Ag-NPs, respectivamente. Así mismo, la intención de variar los volúmenes en la serie de experimentos propuestos, radica en encontrar las proporciones ideales de Ag-NPs y ZnO-NPs sin que se sature la superficie de la HAp. En la Figura 11 A se esquematiza el sistema en el que se llevó a cabo la síntesis y en la Figura 11 B se muestra una imagen de la morfología idealizada de la síntesis de nanohíbridos.

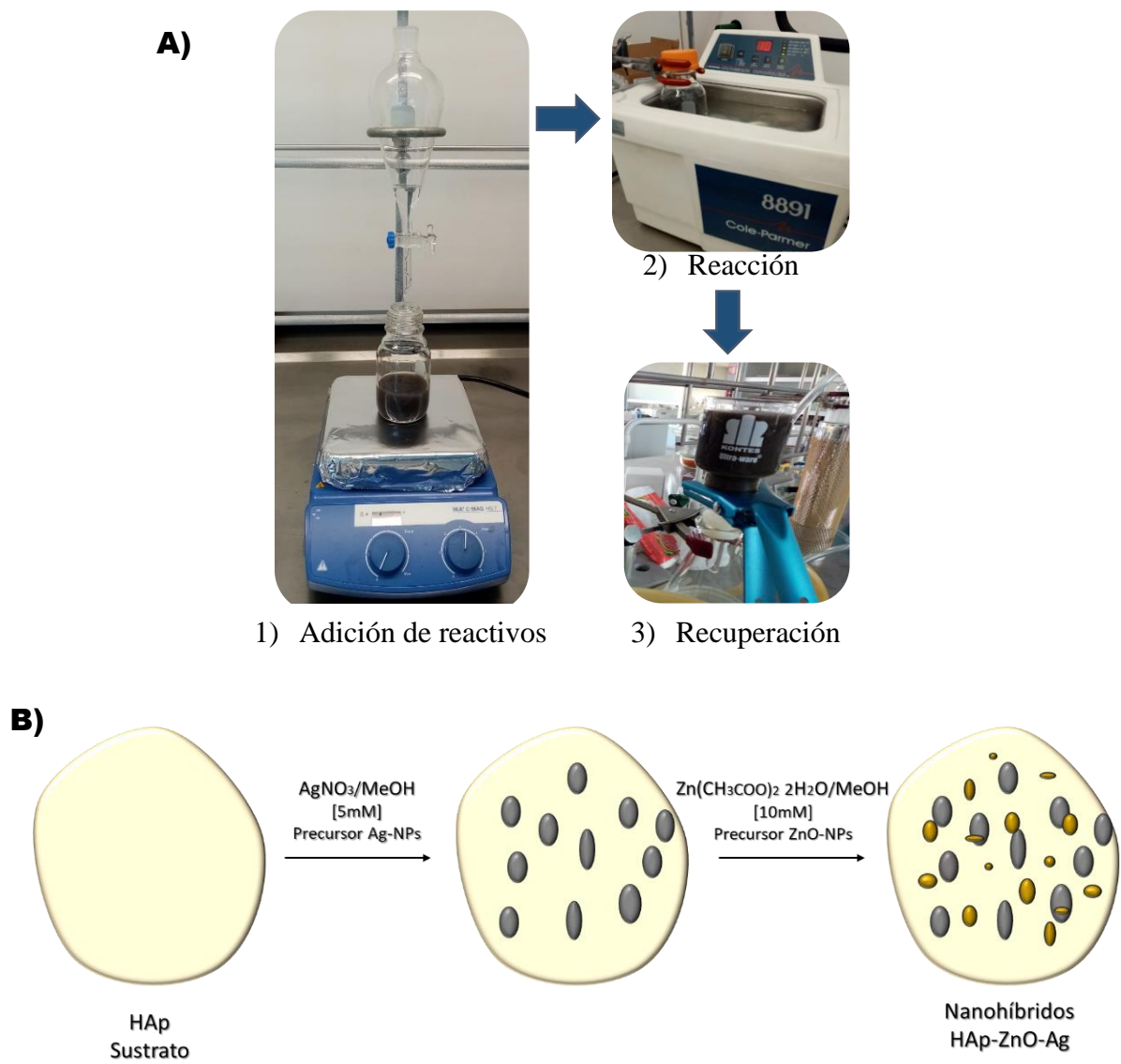


Figura 11. A) Diagrama del proceso de obtención de HAp-Ag-ZnO. B) Esquema idealizado de la síntesis de nanohíbridos

Tabla 6. Relación de volúmenes para la síntesis de HAp-Ag-ZnO.

Experimento	NaOH [10mM]	AgNO₃ [5mM]	Zn(CH₃COO)₂·2H₂O [10mM]
NHS-1	100	75	75
NHS-2	200	150	150
NHS-3	300	225	225

7.1.1. Caracterización de los Nanohíbridos Sintetizados

- Difracción de Rayos X

Las mediciones se llevaron a cabo en un difractómetro Bruker D8 advance con una fuente de radiación de Cu α ($\lambda = 1.54183 \text{ \AA}$) equipado con un detector D-teX Ultra, operado a 20 kV, a una velocidad de 3°/minuto, en un intervalo de 20 a 80° en 2θ con un ancho de paso de 0.02°.

- Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X (XPS)

Para el análisis de XPS se utilizó un equipo K-Alpha de la compañía Thermo Scientific, se empleó una fuente de rayos X monocromática con ánodo de aluminio, con una energía de 1 eV para escaneos y 1 keV para análisis de profundidad, el haz de corriente y el voltaje del cátodo de enfoque fueron de 3 mA y 1820 V, respectivamente. Los espectros de barrido amplio (survey) se obtuvieron con una energía de paso de 200 eV, la región de análisis fue de 1400 – 0 (eV) en energía de enlace.

- Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Las muestras fueron observadas por microscopía electrónica de transmisión para conocer detalles acerca de su morfología, distribución de tamaño de partícula y composición química. Las micrografías fueron tomadas por un microscopio FEI Titan 80-300 kV que cuenta con un detector de rayos X marca EDAX.

7.2. Obtención de Mezclas y Filamentos a Base de PLA/PHB

Para la obtención de mezclas se utilizaron PLA Luminy[®] 175 comercializado por Total Corbion y PHB Biomer[®] P226 distribuido por Biomer. Previo al mezclado, los polímeros prístinos fueron secados a 60°C por 24 h. Las mezclas de PLA/PHB (75:25 m/m), PLA/PHB con HAp al 1% (PLA/PHB/HAp_1%) y PLA/PHB con HAp-Ag-ZnO al 1% (PLA/PHB/NHS-1_1%) se homogenizaron en estado fundido a 190°C a 60 rpm durante 10 min, en una cámara de mezclado brabender. Posteriormente, las mezclas se molieron y cribaron utilizando una malla con apertura de 2 mm. En la Figura 12 se muestran las mezclas obtenidas antes de la molienda.

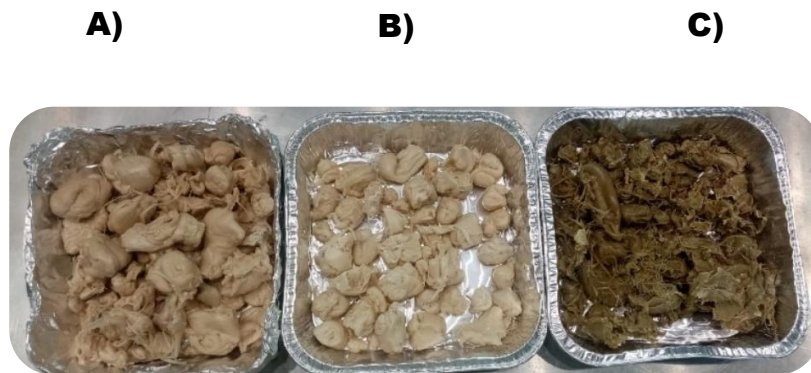


Figura 12. Fotografía de las mezclas antes de la molienda y cribado. A) PLA/PHB. B) PLA/PHB/HAp_1%. C) PLA/PHB/NHS-1_1%.

Los materiales resultantes de la molienda, fueron secados a 80°C durante 24 h. Después, se obtuvieron filamentos con diámetros de 1.75 mm, para impresión 3D, empleando un Filabot EX6 Extruder (Figura 13) con una temperatura de barril de 100 – 190°C.



Figura 13. Extrusor empleado para la obtención de filamentos Filabot EX6 Extruder.

7.2.1. Caracterización Térmica de los Filamentos Obtenidos a Partir de las Mezclas

- Calorimetría Diferencial de Barrido

Se analizaron muestras de PLA, PHB, PLA/PHB, PLA/PHB/HAp_1% y PLA/PHB/NHS-1_1% por calorimetría diferencial de barrido (DSC). Para el análisis de los materiales se utilizó un DSC Discovery 2500 de TA Instrument, las masas de las muestras oscilaron entre 8 a 11 mg y recibieron dos ciclos de calentamiento desde -25°C hasta 225°C y un ciclo de enfriamiento de 225°C hasta -25°C a una velocidad de calentamiento/enfriamiento de 10°C/min, en atmósfera de nitrógeno (50 ml/min).

- Análisis Termogravimétrico

Los análisis termogravimétricos de los materiales se realizaron en un TGA Discovery 5500 de TA Instruments y se obtuvo la curva térmica TGA de las muestras. Las muestras fueron calentadas desde 25°C hasta 800°C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min bajo atmósfera inerte (nitrógeno hasta 600°C y oxígeno hasta 800°C).

7.3. Obtención de Prototipos por Impresión 3D

Para la selección del patrón de relleno, se imprimieron especímenes cilíndricos (12.5 mm de diámetro y 25 mm de altura) empleando un filamento comercial de PLA para ensayos de compresión, utilizando una impresora FlashForge Inventor II y el software FlashPrint como interfaz. Los patrones de relleno estudiados fueron giroidal, hexagonal y triangular con densidades de relleno de 50, 70 y 90% para cada uno.

A partir de los ensayos de compresión de las probetas impresas con el filamento comercial, se eligió la configuración que presentó mejores propiedades mecánicas, y con ella se manufacturaron los materiales con las mezclas que se obtuvieron en la sección 7.2 de la metodología, para la obtención de especímenes para ensayos de compresión y ensayos biológicos para determinar su actividad antibacteriana. Las dimensiones de los especímenes impresos para determinar la actividad antibacteriana fueron de 20 x 20 mm y 3 mm de espesor.

En la Figura 12 se ilustran los modelos de los especímenes impresos en el software FlashPrint, así como el modelo de la impresora y los patrones de relleno evaluados para las pruebas mecánicas. Los parámetros, tales como la temperatura y velocidad de impresión, altura de capa, número de capas y el porcentaje/densidad de relleno de los patrones evaluados, se resumen en la Tabla 7.

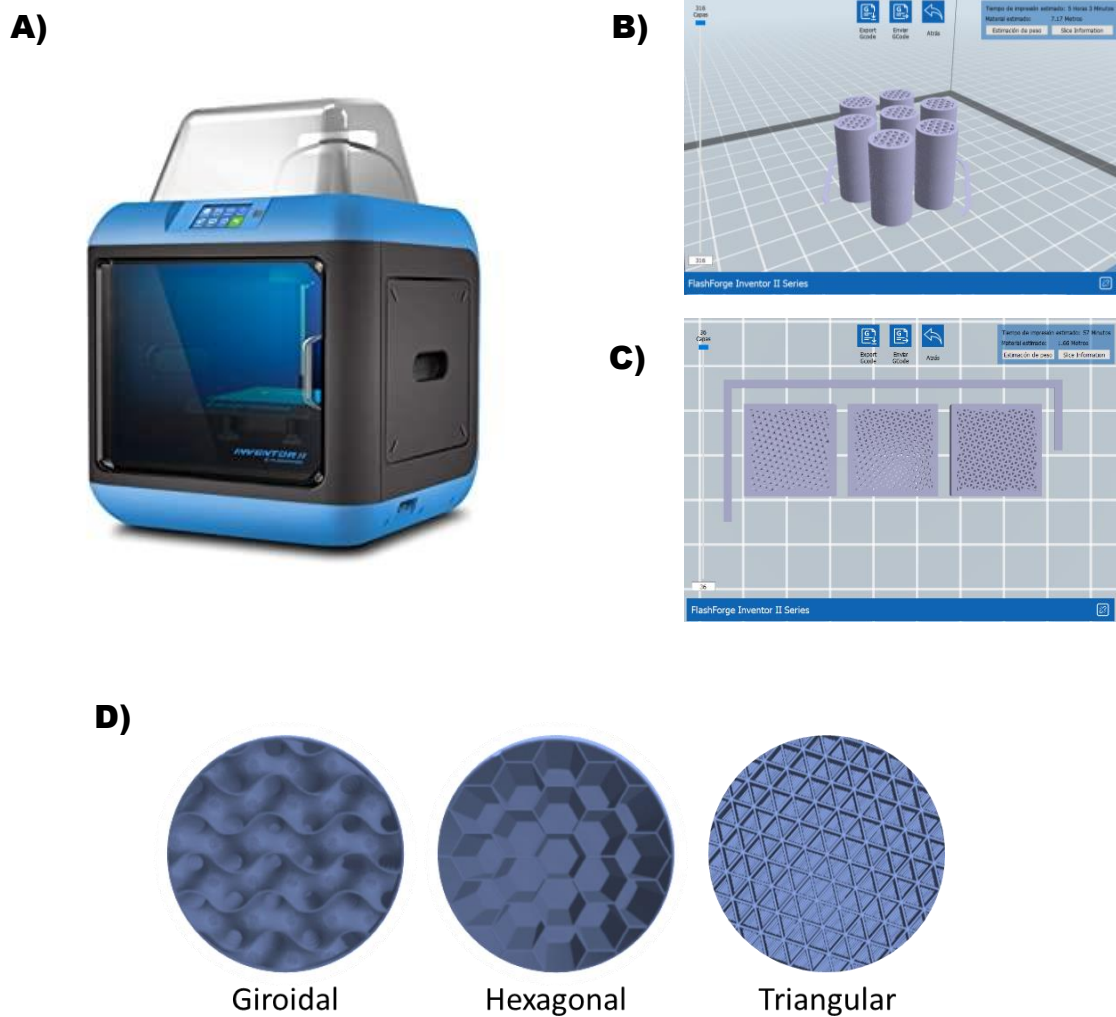


Figura 14. A) Impresora FlashForge Inventor II. B) Modelo CAD de los especímenes para ensayos de compresión. C) Modelo CAD de los especímenes para ensayos de inhibición bacteriana. D) Patrones de relleno evaluados con el filamento de PLA comercial.

Tabla 7. Parámetros de impresión A) PLA comercial. B) PLA/PHB. C) PLA/PHB/HAp_1% y D) PLA/PHB/NHS-1_1%.

Parámetros de impresión	Especificaciones			
	A	B	C	D
Temperatura de impresión (°C)	210	200	210	190
Velocidad de impresión (mm/s)	70	70	70	70
Altura de la capa (µm)	80	80	80	80
Número de capas	316	316	316	316
Patrón de relleno	Giroidal Hexagonal Triangular	Triangular	Triangular	Triangular
Densidad de relleno (%)	50, 70 y 90	90	90	90

7.3.1. Caracterización Mecánica de los Materiales Manufacturados

- Ensayos de Compresión

Las pruebas se realizaron en una maquina universal Shimadzu AGI 100, de acuerdo con la norma ASTM D 695 – 15. Los especímenes ensayados fueron de 25 mm de altura y 12.5 mm de diámetro, los cuales fueron sometidos a una carga de compresión monotónica a una tasa de desplazamiento de cabezal de 2 mm/min, empleando una celda de carga de 20 kN.

7.4. Pruebas de Inhibición Bacteriana sobre los Materiales Manufacturados

Para determinar la inhibición bacteriana en los materiales manufacturados por impresión 3D, se siguió el protocolo descrito en la referencia estándar industrial japonés Z 2801 (JIS – Z 2801). Se evaluó la actividad antibacteriana de especímenes impresos con PLA/PHB y PLA/PHB/HAp_1% con fines comparativos, y PLA/PHB/NHS-1_1%.

Adicionalmente, se prepararon especímenes con las mezclas anteriores, los cuales fueron sometidos a un tratamiento superficial con plasma, de tal forma que los nanohíbridos con actividad antibacteriana fueran expuestos. En la Figura 15 se muestran los especímenes impresos bajo el tratamiento con plasma de argón para posteriormente realizar las pruebas de inhibición bacteriana. El tratamiento por plasma se llevó a cabo en un reactor estático de configuración cilíndrica, durante 2 h por lado, utilizando argón como gas de flujo para la generación de plasma, utilizando una potencia de 80 W y una presión de ~0.25 mbar.



Figura 15. Fotografía de los especímenes impresos para las pruebas de inhibición bacteriana bajo el tratamiento superficial con plasma de argón.

Previo a la inoculación de bacterias, los especímenes impresos fueron desinfectados con etanol al 70%, posteriormente se inocularon los especímenes con *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, con aproximadamente 51,000 unidades formadoras de colonias (UFC) al tiempo cero (T_{0h}), finalmente se incubaron las bacterias hasta 24 horas (T_{24h}), donde se realizó un recuento de las UFC para *E. coli* y *S. aureus*.

Los recuentos se determinaron antes y después de la incubación, para determinar la actividad antibacteriana y el porcentaje de inhibición al crecimiento se utilizaron las fórmulas proporcionadas en la referencia estándar industrial japones JIS – Z 2801.

Actividad antimicrobiana:

$$R = \left(\log \frac{B_t}{B_0} - \log \frac{M_t}{B_0} \right) \dots\dots\dots (1)$$

Inhibición al crecimiento (%):

$$IC = \left(\frac{B_t - M_t}{B_t} \right) \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

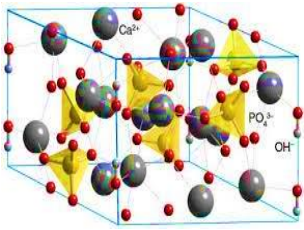
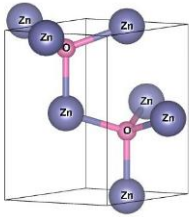
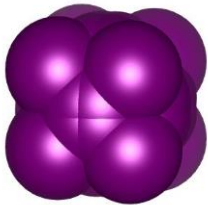
Donde: B_0 = UFC. mL⁻¹ de bacterias al inicio de la incubación, B_t = UFC. mL⁻¹ de bacterias después de 24 h de incubación y M_t = UFC. mL⁻¹ de bacterias después de 24 h de incubación en presencia de los nanohíbridos de HAp-Ag-ZnO.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Análisis Cristalográfico de los Nanohíbridos de HAp-Ag-ZnO

En la Tabla 8 se muestran los datos cristalográficos de los compuestos involucrados en la ruta de síntesis de HAp-Ag-ZnO. Por su parte, tanto la HAp como el ZnO se caracterizan por tener un sistema cristalino hexagonal. Mientras que las nanopartículas de Ag presentan un sistema cristalino cubico centrado en las caras (FCC, por sus siglas en inglés).

Tabla 8. Datos cristalográficos de los componentes involucrados en la síntesis de nanohíbridos^{104,105}.

Hidroxiapatita						
Estructura cristalográfica	Datos cristalográficos		Principales señales			
	<i>Sistema cristalino</i>	Hexagonal	<i>Plano</i>	<i>2θ (°)</i>		
	<i>Grupo espacial</i>	P6 ₃ /m			(211)	31.76
	<i>Parámetros de celda</i>	a=b=9.4 Å c=6.9 Å			(112)	32.14
			(300)	32.88		
			(202)	34.02		
			(113)	43.90		
Óxido de Zinc						
Estructura cristalográfica	Datos cristalográficos		Principales señales			
	<i>Sistema cristalino</i>	Hexagonal	<i>Plano</i>	<i>2θ (°)</i>		
	<i>Grupo espacial</i>	P6 ₃ /m			(100)	32.03
	<i>Parámetros de celda</i>	a=b=3.25 Å c=5.2 Å			(002)	34.17
			(101)	36.62		
			(102)	47.41		
			(110)	51.17		
Plata						
Estructura cristalográfica	Datos cristalográficos		Principales señales			
	<i>Sistema cristalino</i>	FCC	<i>Plano</i>	<i>2θ (°)</i>		
	<i>Grupo espacial</i>	Fm3m			(111)	38.00
	<i>Parámetros de celda</i>	a=b=c=4.08 Å			(200)	44.18
			(220)	64.34		
			(311)	77.32		

El análisis de difracción de rayos X se realizó para los nanohíbridos bajo las condiciones de síntesis estudiadas (Tabla 6), así como de HAp prístina (Figura 16). Por su parte, el difractograma de la HAp prístina muestra señales localizadas a $2\theta=21.67, 25.84^\circ, 28.86^\circ, 31.76^\circ, 32.08^\circ, 32.84^\circ, 34.06^\circ, 43.9^\circ, 46.6^\circ, 49.38^\circ$ y 53.2° , los cuales están asociados a los planos (200), (002), (102), (211), (112), (300), (202), (113), (222), (213) y (004) característicos de la estructura cristalina de la HAp^{43,51,106}.

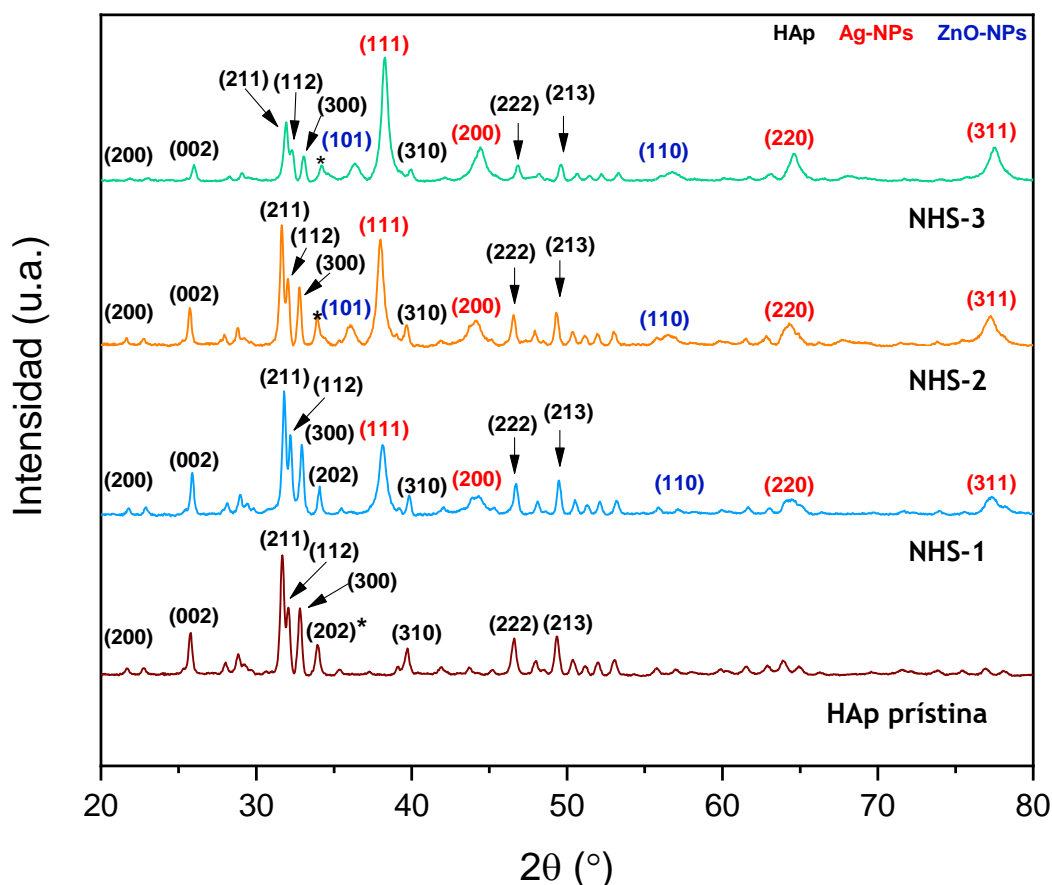


Figura 16. Difractogramas de la HAp prístina y los nanohíbridos sintetizados.

En contraste, los nanohíbridos de HAp-Ag-ZnO, además de presentar las señales características de la HAp prístina, también se muestran señales a $2\theta= 32.0^\circ, 44.18^\circ, 64.34^\circ$ y 77.32° , asociados a los planos (111), (200), (220) y (311) correspondientes a la estructura cúbica centrada en las caras de la plata^{104,107,108}. Así mismo, se puede apreciar la presencia de los picos característicos del ZnO $2\theta= 36.16^\circ$ y 56.56° correspondiente a los planos (101) y (110) respectivamente. No

obstante, es importante mencionar que las señales asociadas a los planos cristalinos (100), (002) y (101) del ZnO, localizados aproximadamente en $2\theta = 31.8^\circ$, 34.5° y 36.3° son difíciles de observar ya que se encuentran traslapados con los picos en los planos (300) y (202) de la HAp^{106,109}. Debido a la limitante anterior fue necesario realizar un ajuste de picos en los difractogramas de los nanohíbridos sintetizados, a fin de resolver la contribución de cada una de las señales, las cuales se presentan en la Figura 17.

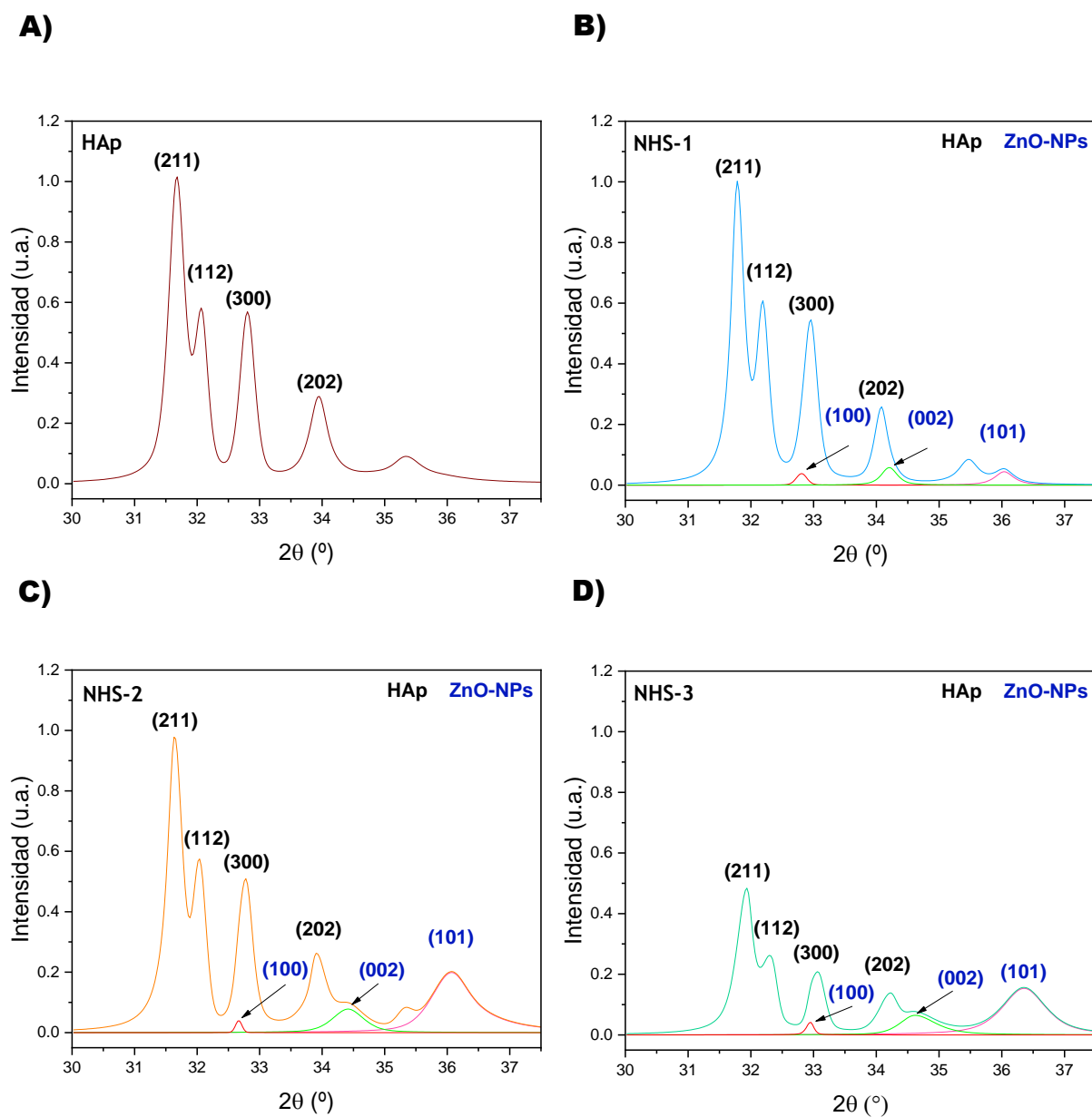


Figura 17. Ampliación y ajuste de picos para los difractogramas de A) HAp prístina. B) NHS-1. C) NHS-2 y D) NHS-3.

Una vez realizado el ajuste de picos (Figura 17) se pudieron identificar las señales características del ZnO localizados en $2\theta = 31.74^\circ, 34.32^\circ, 36.16^\circ$, que corresponden a los planos (100), (002), (101), que se encuentran traslapados en los planos (300) y (202) de la HAp. Con lo anterior se puede confirmar que las ZnO-NPs presentan una estructura hexagonal de tipo wurzita^{106,110}.

Otros factores que se pueden observar en los difractogramas de los nanohíbridos, son ligeros cambios en las posiciones 2θ de los picos característicos de HAp lo que puede indicar que coexista un dopado de la HAp con iones Zn^{2+} y/o Ag^+ . Por otro lado, se logra apreciar como los picos en $2\theta = 32.32$ y 36.16 incrementan conforme se aumentó el contenido del precursor de las ZnO-NPs (Figura 14 B, C y D). Así mismo, se observa en la Figura 17 D que los planos (211), (112) y (300) de la HAp disminuyeron su intensidad respecto al plano (111) de la plata para NHS-3 lo que indica que la Ag se encuentra en mayor proporción sobre la HAp.

Sin embargo, en el caso de NHS-1 los iones Ca^{2+} que son sustituidos por iones Ag^+ alteran la red cristalina de la HAp y los picos de difracción se vuelven más nítidos, también se encuentran mejor resueltos y la intensidad aumenta con la sustitución de iones Ag^+ por iones Ca^{2+} indicando que el tamaño de los cristales incremento en la fase de HAp con el contenido de Ag^{+111} .

Ahora bien, debido a que los iones Zn^{2+} presenta un radio iónico más pequeños (0.74 \AA , respectivamente) que los iones Ca^{2+} (0.99 \AA), es razonable inferir que su sustitución por Ca^{2+} resulte en una contracción de la estructura de HAp¹¹². Por otro lado, dado que el ion Ag^+ tiene un radio atómico mayor (1.28 \AA) que los iones Ca^{2+} (0.99 \AA) se esperaría una expansión en la estructura de la HAp¹¹¹.

Para comparar las afirmaciones anteriores, se determinaron las distancias interplanares (d) y parámetros de celda (a y c) de los nanohíbridos sintetizados, comparados con la HAp prístina, con la finalidad de evaluar con detalle los defectos de la red cristalina, causados por la sustitución de iones Ag^+ y/o Zn^{2+} . Para realizar los cálculos anteriores se utilizó la ecuación de la ley de Bragg y la ecuación para determinar los parámetros de red para una celda cristalina hexagonal^{83,111,113}.

Ecuación de la Ley de Bragg:

$$2d_{hkl}\text{sen}\theta = n\lambda \dots\dots\dots(3)$$

Donde: n es una constante sin unidades (tomada como 1); λ es la longitud de onda de los rayos X (0.1542nm); d es la distancia entre planos de la red cristalina (hkl) y θ es el ángulo entre los rayos incidentes y los planos de dispersión.

Ecuación para una celda hexagonal:

$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{4}{3} \left(\frac{h^2+hk+k^2}{a^2} \right) + \frac{l^2}{c^2} \dots\dots\dots(4)$$

Donde: d es la distancia entre planos de la red cristalina (hkl).

Así mismo se calculó el volumen para la celda hexagonal de la HAp prístina y de los nanohíbridos utilizando la siguiente relación $V = 2.589 a^2c$, reportada en la literatura¹¹³. Además, se calculó el tamaño de cristalito de acuerdo a la ecuación de Debye-Scherrer, evaluando el pico de mayor intensidad de la HAp (211).

Ecuación de Debye-Scherrer:

$$D = \frac{K\lambda}{\beta\text{cos}\theta} \dots\dots\dots(5)$$

Donde: K es una constante sin unidades (tomada como 0.9); β es el ancho de la línea a la mitad del máximo pico de intensidad y θ es la mitad del ángulo de difracción.

Los parámetros de la celda unitaria (a y c), así como los volúmenes de celda unitaria (V) y tamaño de cristalito calculados, se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9. Parámetros de celda y tamaños de cristalito de HAp prístina y los nanohíbridos.

Experimento	Parámetros de celda		Volumen (Å)	Tamaño de cristalito (Å)
	a (Å)	c (Å)		
HAp	9.50	6.93	1617.49	238.77
NHS-1	9.44	6.89	1591.14	280.78
NHS-2	9.50	6.92	1616.26	265.34
NHS-3	9.35	6.85	1550.59	206.23

Tal como se pudo observar en la Tabla 9 los parámetros de celda ‘a’ y ‘c’, así como los volúmenes de la celda para NHS-1 y NHS-3 disminuyen respecto a la HAp prístina, por lo cual se puede inferir que el ion con mayor influencia para estos dos casos sobre la red cristalina de la HAp fue el Zn^{2+} . Caso contrario en el NHS-2, los parámetros (‘a’ y ‘c’) y el volumen de celda no cambiaron respecto a la HAp prístina, lo que probablemente indique que este nula o parcialmente dopada con Zn^{2+} y/o Ag^+ . Respecto a lo anterior, se ha reportado previamente por Stanic¹¹⁴ et al. que el ión Ag^+ pueda no reemplazar total o parcialmente al ión Ca^{2+} , sin embargo, tiene la posibilidad de modificar el entorno cristalino de la HAp debido a que el ión Ag^+ puede ocupar cualquiera de los sitios intersticiales de la HAp y/o ZnO, dependiendo la cantidad de iones Ag^+ incorporados^{114,115}.

Madeeha Riaz⁸⁴ et al. y Omer Kaygili¹¹⁶ et al. coinciden con que el cambio en los parámetros de red de la HAp se atribuye a la diferencia en el radio iónico de la Ag^+ que puede llegar a sustituir los iones Ca^{2+} de la red cristalina de la HAp. Por su parte, LeGeros¹¹⁷ et al. informaron que la sustitución de iones Zn^{2+} por iones Ca^{2+} en la red cristalina de HAp produce una expansión en los parámetros de red ‘a’ y ‘c’ simultáneamente. Caso contrario Edwin Andrew Ofudje¹¹² et al. y Fumiaki¹¹⁸ et al. reportaron un aumento en el parámetro de red ‘a’ y una disminución en el parámetro de red ‘c’ al incrementar la concentración de iones Zn^{2+} incorporados en la estructura cristalina de la HAp.

Por otro lado, se observa gran diferencia en los tamaños de cristalito de los nanohíbridos respecto a la HAp prístina. En el caso de NHS-1 y NHS-2 existe un incremento del tamaño de cristalito, que de acuerdo con Jadalannagari¹¹⁹ et al. resulta de un aumento en los sitios de nucleación propiciado por los iones dopantes. En cuanto al NHS-3 el tamaño de cristalito se redujo con respecto a la HAp prístina y de los NHS-1 y NSH-2, lo que indica una disminución en los puntos de nucleación.

Cabe destacar que para el caso de los nanohíbridos sintetizados en este proyecto, se vuelve un poco más complejo el sistema al tener la presencia de dos iones que pueden dopar la estructura cristalina de la HAp. Lo anterior complica determinar con certeza la influencia de uno u otro ión sobre los parámetros de red y tamaño de cristalito de la HAp. Además, la HAp permite la sustitución de diversos iones su estructura, que pueden tener lugar en las posiciones de los iones Ca^{2+} , en los grupos PO_4^{3-} o en los grupos OH^- .

8.2. Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X

Los nanohíbridos sintetizados se analizaron por espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) para entender las posibles interacciones de la HAp con los iones Ag^+ y Zn^{2+} , así como determinar la presencia de ZnO-NPs y Ag-NPs. Algunas asignaciones de las señales de energía de enlace características para los enlaces de interés se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10. Energías de enlace características para el oxígeno, calcio, fósforo, zinc y plata. Extraído y adaptado del Lee¹²⁰ et al.

Orbital	Asignación	Intervalo de señal (\pm)
O1s	P_xO_y	532.2 – 534.3
	P = O	
Ca2p	ZnO	530.2 – 532.2
	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	347
P2p	P_xO_y	135.3
	P = O	
Zn2p	ZnO	1021.8 – 1022.5 y 1045.1
Ag3d	Ag	368.3

En la Figura 18 se muestran los espectros de barrido amplio (survey) tanto de la HAp prístina como de los nanohíbridos sintetizados. Como se observa en esta figura, en los espectros de los nanohíbridos además de observar la presencia de oxígeno, calcio y fósforo de la HAp, se aprecian las señales correspondientes a los orbitales Zn2p y Ag3d localizados en ~1050 y 380 eV respectivamente.

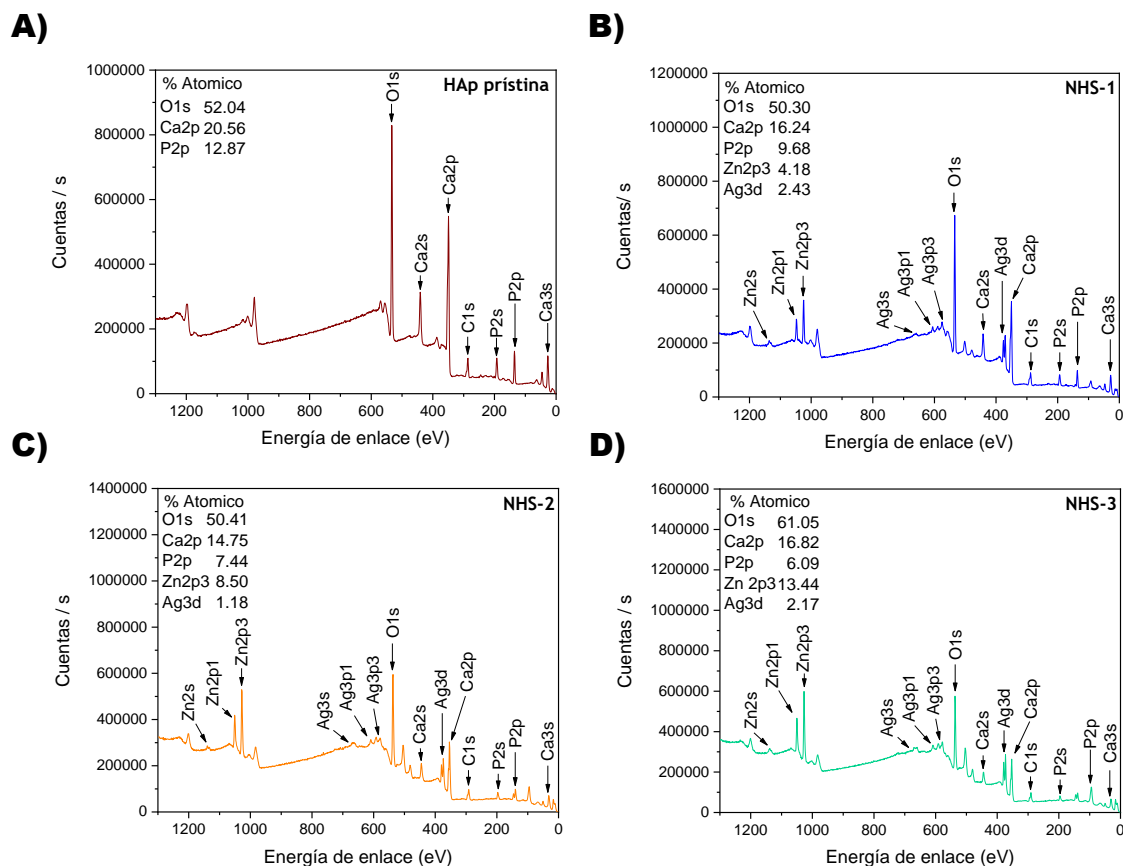


Figura 18. Espectros de barrido amplio de XPS. A) HAp prístina. B) NHS-1. C) NHS-2 y D) NHS-3.

Además, las relaciones molares Ca/P fueron determinadas a partir de XPS, tal y como se observa en la Tabla 11. Los resultados demostraron que conforme la cantidad de precursores para la obtención de las ZnO-NPs y Ag-NPs fue incrementando, los porcentajes de zinc y plata también fueron incrementando. Por el contrario, los porcentajes atómicos del calcio y fósforo fueron disminuyendo. Lo anterior sugieren que los materiales sintetizados fueron dopados por los

cationes Zn^{2+} y/o Ag^+ confirmando que existe una sustitución de los iones Ca^{2+} y/o grupos PO_4^{3-} en la estructura cristalina de la HAp²⁵.

Tabla 11. Contenido en porcentaje de calcio y fósforo, así como su relación molar de HAp prístina y los nanohíbridos sintetizados.

Muestra	Porcentaje de calcio	Porcentaje de fósforo	Relación Ca/P
HAp	20.56	12.87	1.60
NHS-1	16.24	9.68	1.68
NHS-2	14.75	7.44	1.98
NHS-3	16.82	6.09	2.76

En la Figura 19 se observan los espectros de XPS de alta resolución asociados a oxígeno (O1s) tanto de HAp prístina (Figura 19 A), como de NHS-1 (Figura 19 B), NHS-2 (Figura 19 C) y NHS-3 (Figura 19 D). Después de los ajustes de pico para O1s, se observaron dos señales para la muestra de HAp a energías de enlace de 531.88 y 533.42 eV asociados a grupos PO_4^{3-} , de acuerdo a lo reportado por Kumar¹²¹ et al. Sin embargo, también podría atribuirse a oxígeno de agua adsorbido^{121,122}. En contraste, para cada uno de los nanohíbridos sintetizados se observa un ligero desplazamiento en la energía de enlace que van desde 531.88 a 536.8 eV para las uniones P=O, y de 533.4 a 537.3 eV para las uniones de P_xO_y , como consecuencia de la incorporación/sustitución de iones Zn^{2+} y Ag^+ por iones Ca^{2+} . Por otro lado, se logra apreciar un pico en crecimiento correspondiente a la unión de zinc con oxígeno del ZnO ¹²⁰; para NHS-1 a una energía de enlace de 527.90 eV, en el caso de NHS-2 se observa un pico mejor definido a 535.6 eV y para NHS-3 se observa un pico en 536.7 eV.

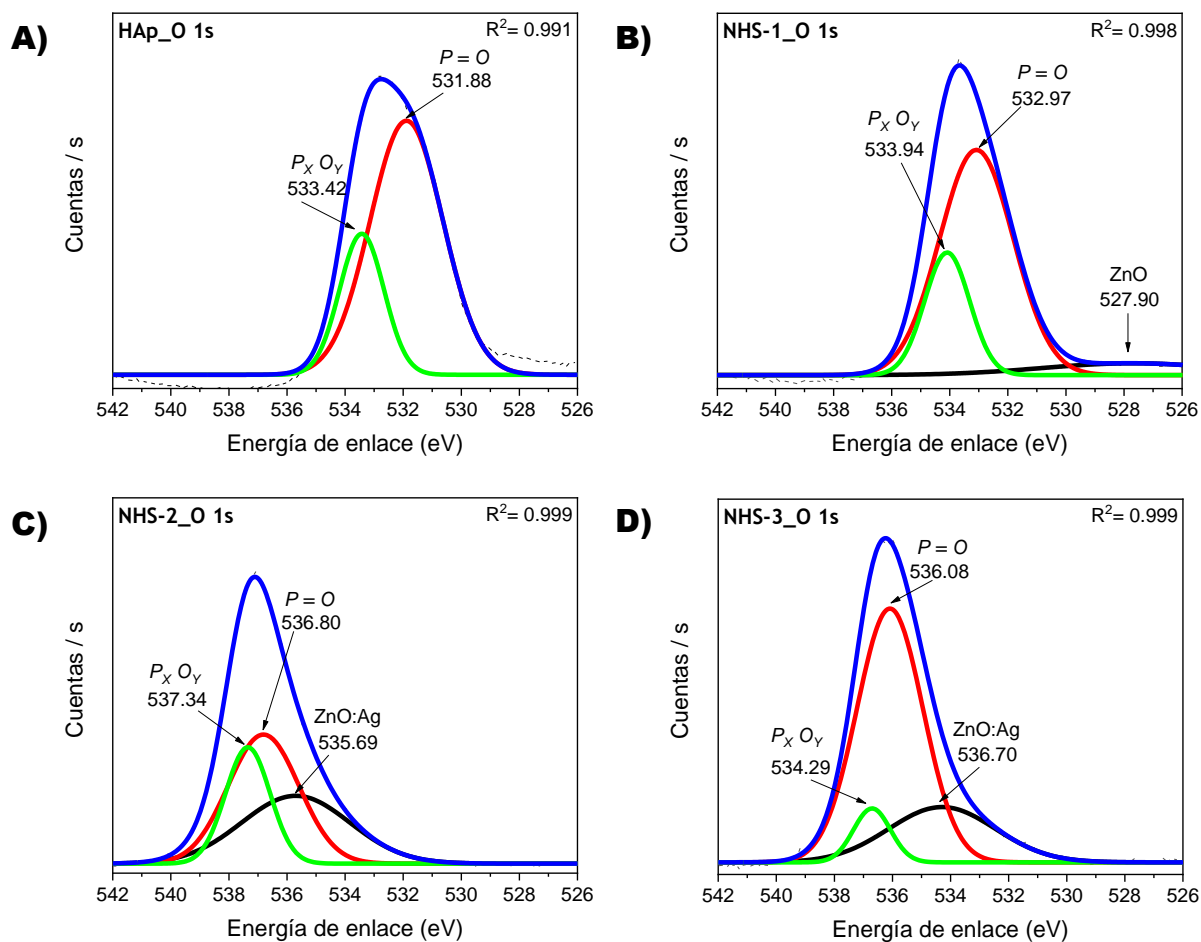


Figura 19. Espectros de alta resolución para O1s A) HAp prístina. B) NHS-1. C) NHS-2. D) NHS-3.

Por otra parte, los espectros de alta resolución para fósforo (P2p) de HAp prístina, NHS-1, NHS-2 y NHS-3 se pueden apreciar en la Figura 20. El espectro correspondiente a la HAp prístina para P2p (Figura 20 A) muestra dos señales a 133.43 y 135.21 eV de las líneas espectrales P2p_{3/2} y P2p_{1/2}, respectivamente, igualmente asociados a los grupos PO₄³⁻ de la HAp¹²². Por su parte, se observa que los picos correspondientes a las energías de enlace para P2p de NHS-1 (Figura 20 B), NHS-2 (Figura 20 C) y NHS-3 (Figura 20 D), resultantes del ajuste de picos, disminuyen su intensidad y se desplazan a valores menores con respecto a la HAp prístina. Lo anterior sugiere que existe un ligero reordenamiento en la estructura cristalina de la HAp debido a interacciones con la plata y/o zinc^{123,124}.

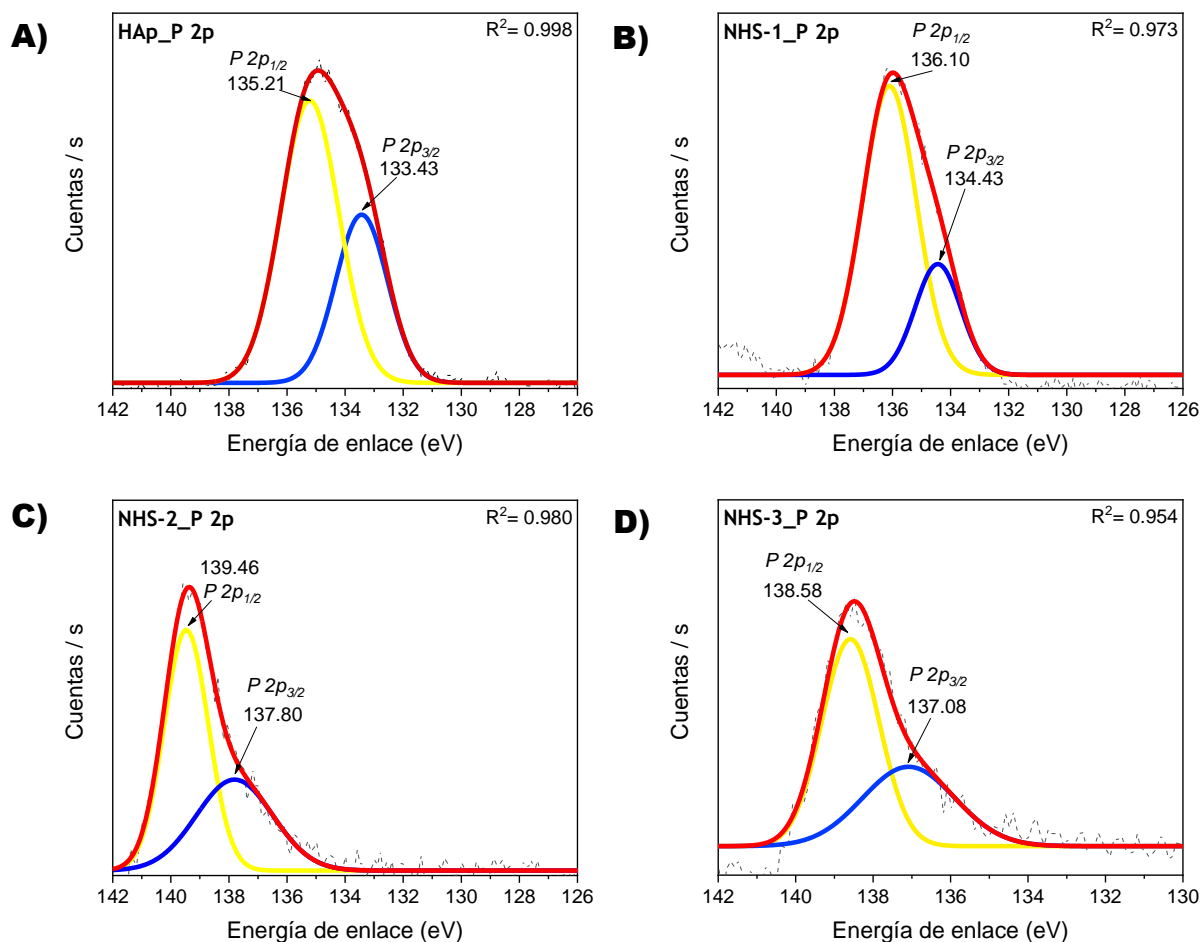


Figura 20. Espectros de alta resolución para P2p A) HAp prístina. B) NHS-1. C) NHS-2. D) NHS-3.

En cuanto al espectro del Ca2p para HAp prístina (Figura 21 A), se observan cuatro picos con intensidades máximas asociados a las energías de enlace de 347.97, 349.58, 351.51 y 352.35 eV para las líneas espectrales Ca2p_{1/2} y Ca2p_{3/2} respectivamente, que se encuentran asociados a las uniones con grupos PO₄³⁻ y oxígeno¹²⁵⁻¹²⁷. El pico identificado en 348.63 eV (Ca2p_{3/2}) de acuerdo a lo reportado por Catalin¹²⁵ et al. y Gomes¹²⁸ et al, están asociados a átomos de calcio unidos a grupos PO₄³⁻. Además, Battistoni et al. demostró que los picos de los espectros de fotoelectrones para calcio y fósforo son característicos de los estados de oxidación Ca²⁺ y P⁵⁺ respectivamente, de la HAp. De igual forma para los picos correspondientes a las energías de enlace para Ca2p resultantes del ajuste de picos para NHS-1 (Figura 21 B), NHS-2 (Figura 21

C) y NHS-3 (Figura 22 D) disminuyen su intensidad y se desplazan a valores menores con respecto a la HAp prístina, debido a la sustitución de iones Ag^+ y/o Zn^{2+} por iones $\text{Ca}^{2+}/\text{Ca}^{+123-}$ 125.

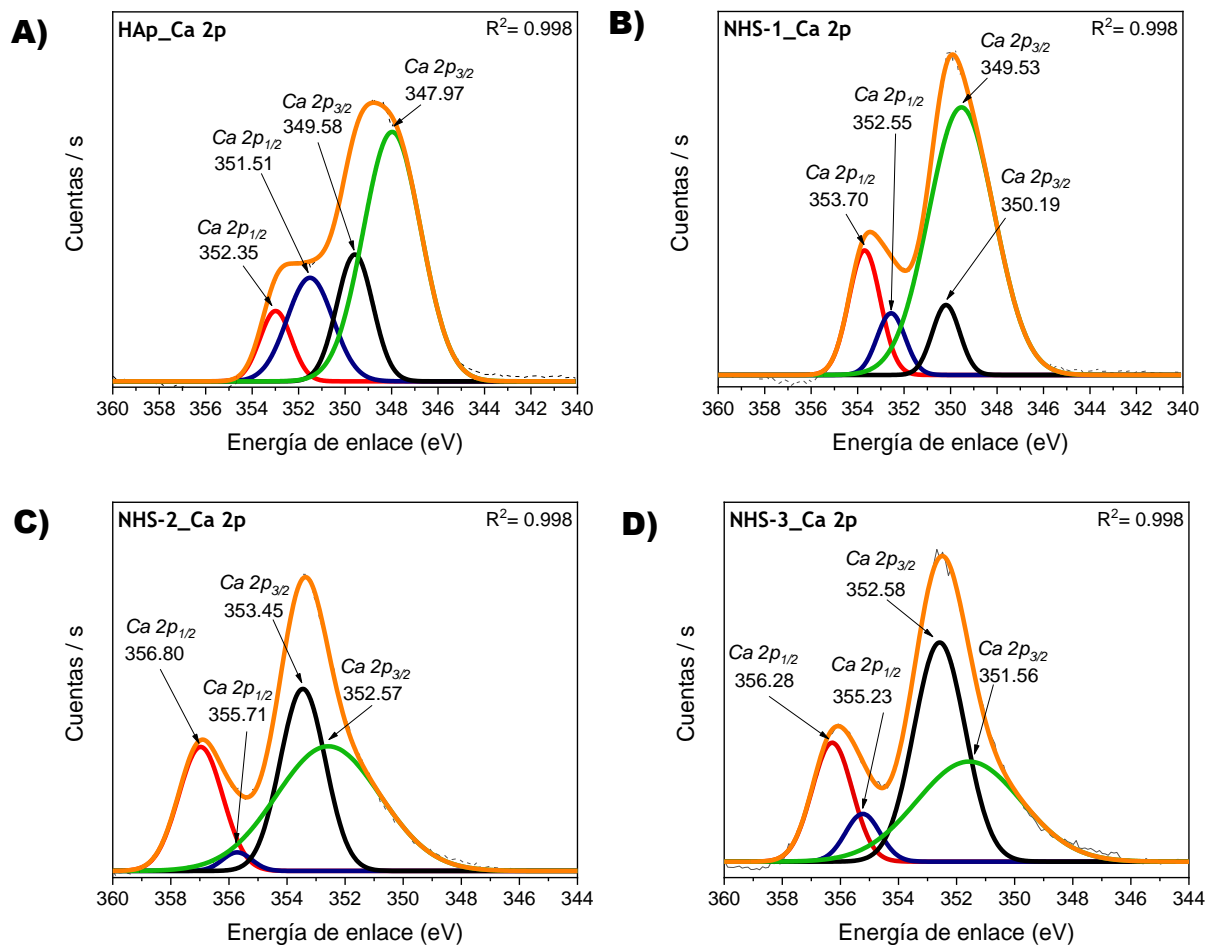


Figura 21. Espectros de alta resolución para Ca2p A) HAp prístina. B) NHS-1. C) NHS-2. D) NHS-3.

En cuanto a las energías de enlace para Ag3d, se aprecian picos en 376.18 eV ($\text{Ag } 3d_{3/2}$) y 370.22 eV ($\text{Ag } 3d_{5/2}$) asociados con Ag^0 proveniente de las Ag-NPs. Sin embargo, también se encuentran dos picos a una energía de enlace de 374.86 eV ($\text{Ag } 3d_{3/2}$) que identifica a la plata con un estado de oxidación de Ag^+ , lo que confirma que la plata se encuentra ligada a grupos PO_4^{3-} , lo cual concuerda con lo reportado por Yang¹²⁴ et al., Aravindan¹²³ et al. y Kumar¹²¹ et

al. El segundo pico se encuentra a una energía de enlace de 369.37 eV ($\text{Ag } 3d_{5/2}$) para el estado de oxidación Ag^{2+} que indica la posible interacción entre el óxido de zinc con la plata^{129–131}. Así mismo, los picos de $\text{Ag } 3d$ presentaron intensidades mayores y sus valores de energía de enlace fueron desplazándose a mayores energías de enlace, 379.49, 378.80, 372.66 y 370.63 eV para NHS-2 y 378.56, 377.29, 372.56 y 371.42 eV para NHS-3, cuyos estados de oxidación se relacionan a la Ag^+ y Ag^{2+} (Figuras 21D y 22D).

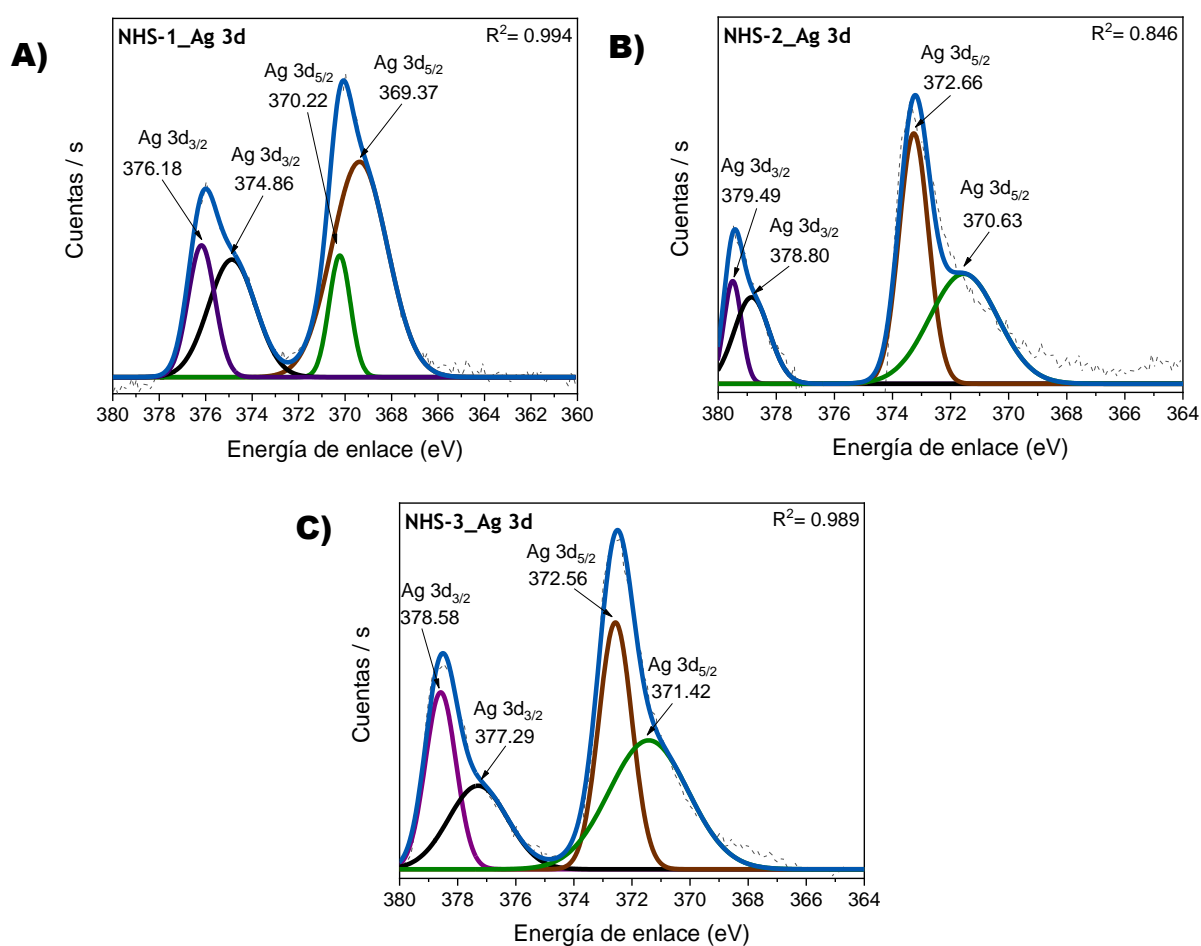


Figura 22. Espectros de alta resolución para $\text{Ag } 3d$ A) NHS-1. B) NHS-2. C) NHS-3

Sin embargo, en cuanto a los espectros de alta resolución para el Zn 2p para las muestras NHS-2 y NHS-3, se observan cuatro picos cuyas energías de enlace son 1050.02, 1044.97, 1026.85 y 1020.31 eV en NHS-2 (Figura 21E) y de 1049.27, 1046.30, 1026.28 y 1024.06 eV para NHS-3 (Figura 22E), indicando un aumento de iones Ag^{2+} en la estructura del óxido de zinc, de acuerdo con lo reportado por Azin¹²⁹ et al. En la Figura 23 se muestra una representación aproximada de HAp dopada con iones Zn^{2+} y iones Ag^+ (HAp:Zn:Ag) de acuerdo a los estados de oxidación determinados a partir de las energías de enlace citadas en la literatura. De igual forma en la Figura 24 se muestra una proyección aproximada para la estructura cristalina del ZnO dopado con plata (ZnO:Ag).

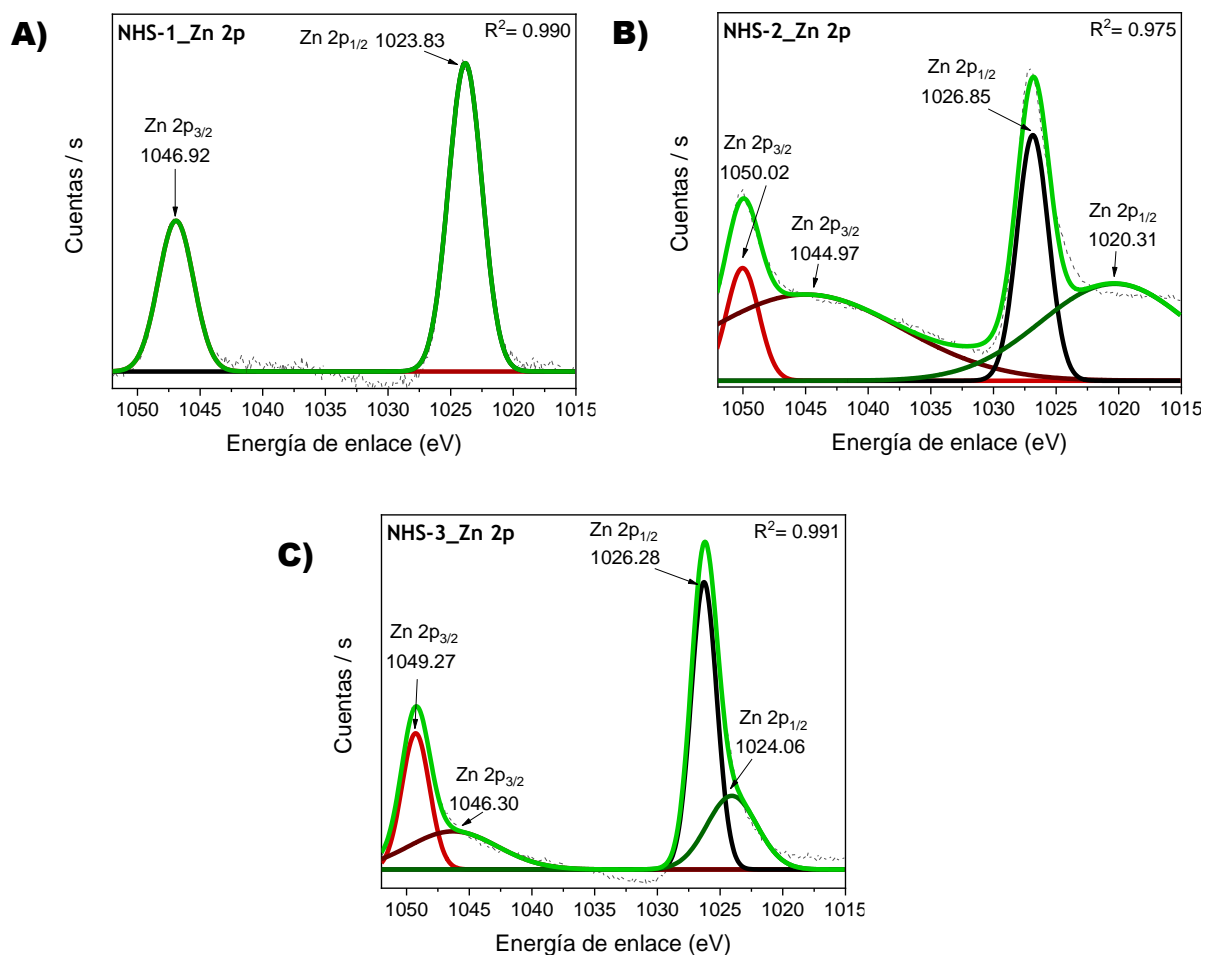


Figura 23. Espectros de alta resolución para Zn 2p A) NHS-1. B) NHS-2. C) NHS-3.

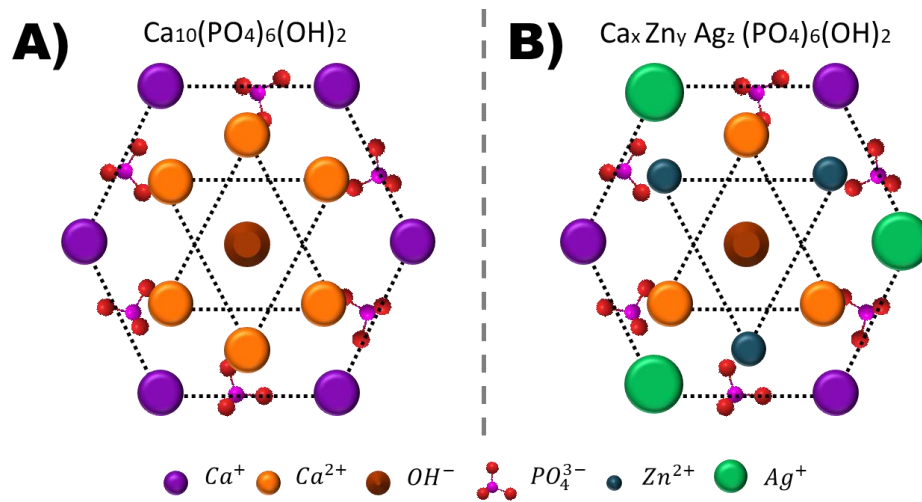


Figura 24. A) Proyección del plano (001) de HAp prístina Lu¹³² et al. B) Proyección aproximada del plano (001) de HAp:Zn:Ag determinada a partir de los estados de oxidación del zinc y la plata observados en XPS.

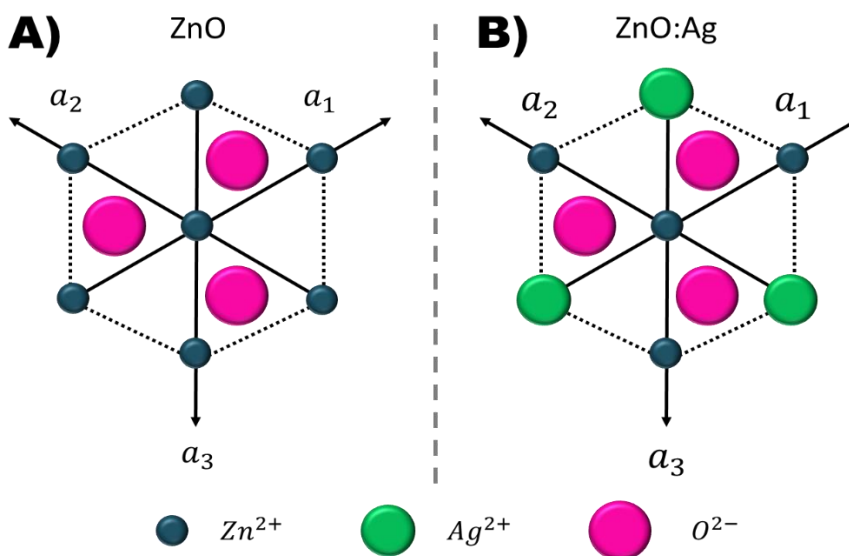


Figura 25. A) Proyección del plano (001) del ZnO. B) Proyección aproximada del plano (001) de ZnO:Ag determinada a partir de los estados de oxidación del zinc y la plata observados en XPS.

8.3. Microscopia Electrónica de Transmisión

En la Figura 26 A se muestra la micrografía de TEM para las nanopartículas de hidroxiapatita prístina (HAp), las cuales presentan una morfología esférica con un diámetro de partícula promedio de 39.4 nm (Figura 26 A). Por su parte, el patrón de difracción de electrones (Figura 25 B) reveló los planos cristalinos característicos de la HAp de acuerdo al cálculo de las distancias interplanares. La composición química de la HAp sin decorar, se obtuvo mediante el análisis de rayos X de energía dispersiva (EDS), en donde se identificaron los picos característicos de calcio (Ca), fósforo (P) y oxígeno (O), característicos de la HAp (Figura 26 C)⁵². El histograma de distribución de tamaño de partícula que se obtuvo de la micrografía de TEM (Figura 26 D), muestra que las nanopartículas se encuentran en un intervalo de diámetro entre 20 a 100 nm, donde aproximadamente el 70% está entre 30 y 60 nm.

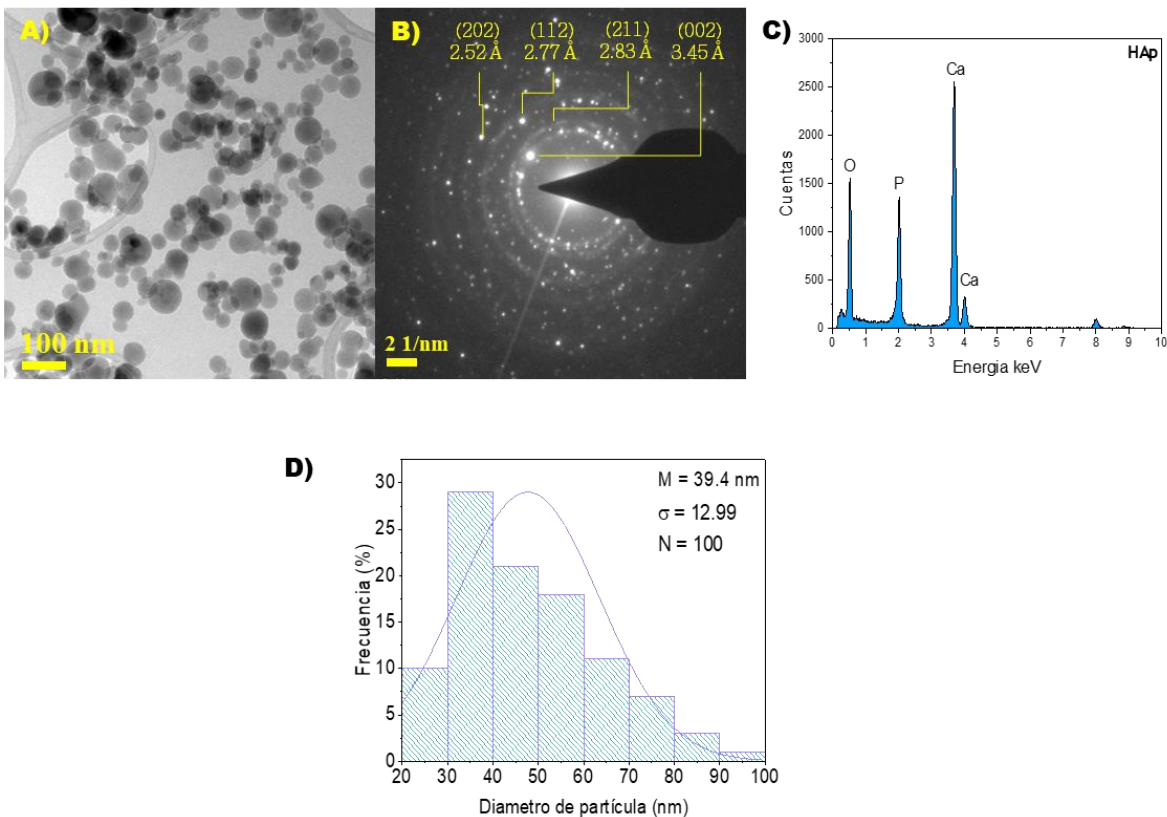


Figura 26. A) Micrografía. B) Patrón de difracción de electrones. C) Análisis EDS y D) Histograma de distribución de tamaño de partícula de HAp prístina.

En la Figura 27 A se muestra una micrografía del NHS-1, donde se logra apreciar pequeñas partículas de color más oscuro identificadas como las ZnO-NPs y/o Ag-NPs cuya forma es esférica, también se observa la distribución homogénea de las nanopartículas sobre la superficie de la HAp. En este sentido, se pudo corroborar la hipótesis de la morfología idealizada de la síntesis, donde las nanopartículas de ZnO y Ag estarían preferentemente depositadas en la superficie de la HAp, tal como se puede observar en la Figura 11 B. Cabe resaltar que la morfología obtenida puede propiciar una mejora en la actividad antibacteriana, puesto que el tamaño de las ZnO-NPs y/o Ag presentan un área superficial más grande, lo que se traduce en un área de contacto mayor al momento de interactuar con la pared/membrana celular de las bacterias. Por otro lado, el patrón de difracción de electrones de NHS-1 (Figura 27 B) reveló la presencia de los planos (211) y (002) característicos de la HAp, así como también el plano (110) del ZnO con estructura cristalina de tipo wurtzita y el plano (111) de la plata con estructura FCC. Adicionalmente, se comprobó la composición química de NHS-1 mediante el EDS (Figura 27 C), donde además de observar los picos de energía del Ca, P y O de la HAp, se aprecian los picos de energía del Zn y Ag.

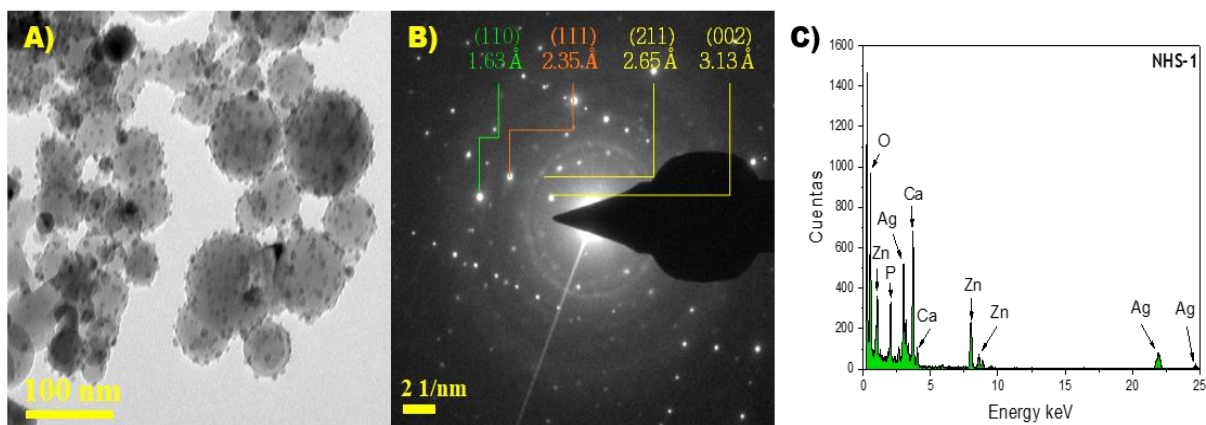


Figura 27. A) Micrografía. B) Patrón de difracción de electrones. C) Análisis EDS de NHS-1.

Por otra parte, la micrografía del NHS-2 (Figura 28 A) muestra aglomerados de las ZnO-NPs y/o Ag-NPs (regiones oscuras) saturando la superficie de la HAp, además se observa como el tamaño de las ZnO-NPs y Ag-NPs incremento, aunque también pueden ser aglomerados de las anteriores. También se observa en el patrón de difracción de electrones (Figura 28 B) la presencia de más planos cristalinos de Ag. En cuanto al EDS del NHS-2 (Figura 28 C), se

observan los picos de energía característicos del Zn y Ag además de los correspondientes al Ca, P y O.

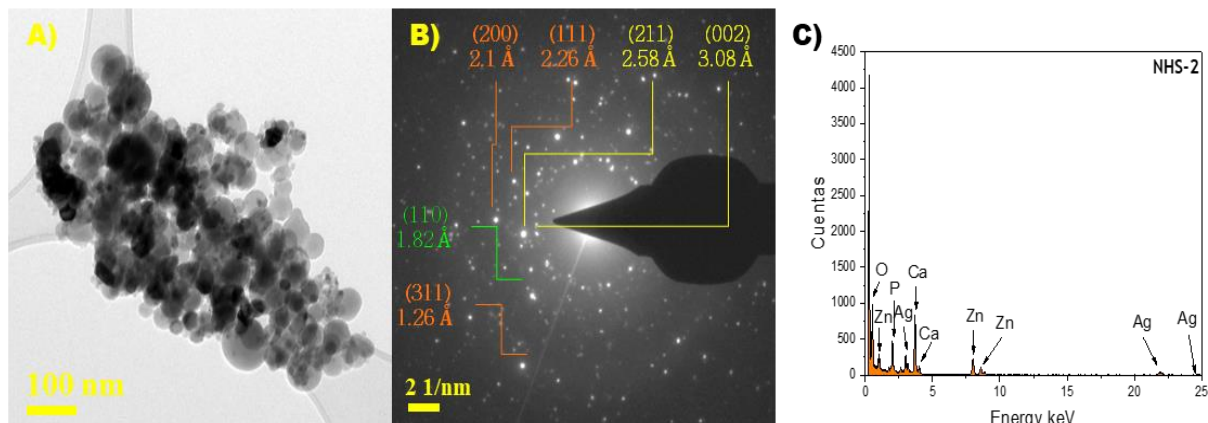


Figura 28. A) Micrografía. B) Patrón de difracción de electrones. C) Análisis EDS de NHS-2.

Finalmente, en la Figura 29 A se presenta la micrografía del NHS-3 donde se aprecian aglomerados de las con las ZnO-NPs y/o Ag-NPs sobre la superficie de la HAp al igual que con el NHS-2. Además se aprecia que la distribución de las ZnO-NPs y Ag-NPs se vuelve más heterogénea. Por otro lado, el patrón de difracción de electrones de NHS-3 reveló la presencia de más planos cristalinos del ZnO y Ag debido a la saturación de nanopartículas. Al igual que las muestras anteriores el NHS-3 mostro un EDS con los picos de energía característicos de la HAp (Ca, P y O), así como de Zn y Ag.

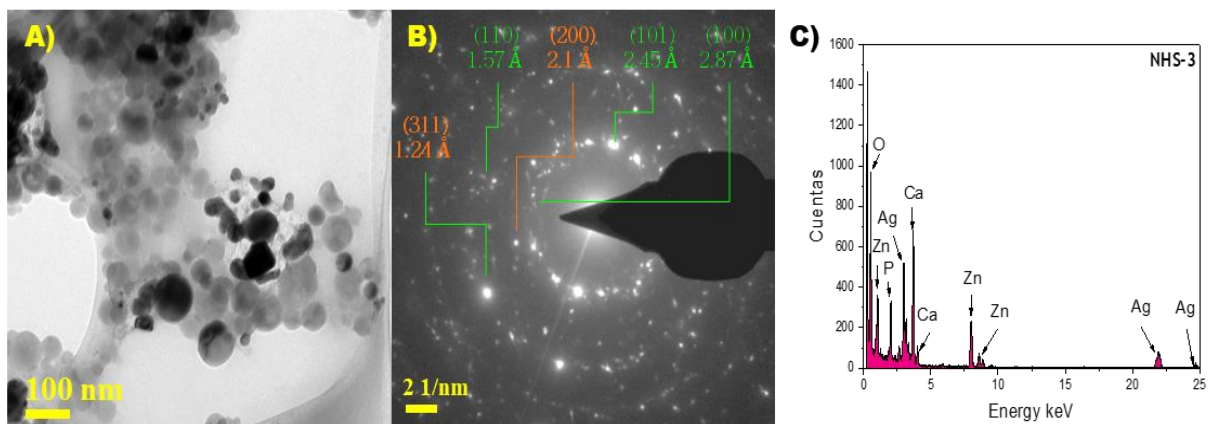


Figura 29. A) Micrografía. B) Patrón de difracción de electrones. C) Análisis EDS de NHS-3.

De acuerdo con los resultados previos, se decidió seleccionar el NHS-1 para su incorporación en la matriz polimérica de PLA/PHB, debido a la distribución homogénea de ZnO-NPs y Ag-NPs sobre la HAp, lo que teóricamente resultaría favorable sobre la inhibición bacteriana. Además, de acuerdo a la relación Ca/P = 1.68 calculada a partir de XPS resulta adecuada para la regeneración ósea, que si bien en este proyecto no se realizaron estudios que avalen el hecho anterior dan un indicio de la posibilidad de regenerar al tejido óseo. De acuerdo con lo anterior, es importante recalcar que la intención de sintetizar nanohíbridos de HAp-Ag-ZnO fue conferir la propiedad antibacteriana a la HAp sin modificar sus propiedades de regeneración ósea.

8.4. Difracción de Rayos-X en Mezclas Poliméricas

Los patrones de difracción de rayos x de los polímeros de las mezclas de PLA/PHB, PLA/PHB/HAp_1% y PLA/PHB/NHS-1_1%, se muestran en la Figura 30. El patrón de la mezcla de PLA/PHB es muy similar al patrón de difracción del PHB^{7,133}. En general, los patrones de PLA/PHB/HAp_1% y PLA/PHB/NHS-1_1% son muy similares al de PLA/PHB, con la excepción de que las intensidades en los picos de difracción disminuyen ligeramente interfiriendo con la cristalización de PHB. Sin embargo, es evidente que la cristalinidad y la tasa de crecimiento de cristales de PHB es más alta y rápidas que los de PLA, puesto que los picos de reflexión de PHB se observan incluso teniendo mayor proporción de PLA en las mezclas¹³³.

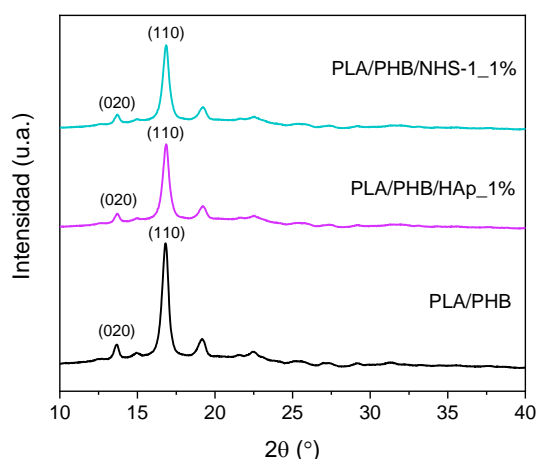


Figura 30. Patrones de difracción del PLA, PHB, PLA/PHB, PLA/PHB/HAp_1% y PLA/PHB/NHS-1%.

8.5. Calorimetría Diferencial de Barrido

Las curvas DSC de PLA, PHB, PLA/PHB, PLA/PHB/HAp_1% y PLA/PHB/NHS-1_1% se muestran en la Figura 31. El análisis DSC se llevó a cabo utilizando dos ciclos de calentamiento para determinar el segundo punto de fusión y borrar el historial térmico de las muestras. Durante el segundo ciclo de calentamiento, como se muestra en la Figura 31 C el PLA prístino presenta una Tg de aproximadamente 59.7°C y una Tm de aproximadamente 174.7°C. Para PHB prístino, se observa un pico de fusión en 167.5° C y una Tg de 52.4°C. Además, en el segundo ciclo de calentamiento, el PLA puro muestra un rastro similar al del primer ciclo, mientras que PHB puro muestra un pico de fusión doble correspondiente a la fusión de cristalitas de PHB recristalizados^{7,134}. Por otro lado, el PHB puro muestra una reducción significativa en el punto de fusión comparado con el del primer ciclo de calentamiento, debido a la degradación por escisión de la cadena de PHB⁷. Durante el proceso de enfriamiento, como se muestra en la Figura 31 B, el pico de cristalización de PLA no se aprecia claramente, mientras que el PHB puro muestra un pico de cristalización aproximadamente en 104.2°C.

En cuanto a la mezcla de PLA/PHB, esta exhibe una Tg de aproximadamente 54.9°C y una Tm de 174.55°C. De lo anterior se puede deducir que la mezcla presenta características térmicas preferentes por el PLA. Sin embargo, se logra apreciar un pico de cristalización durante el calentamiento recristalización en 85.4°C, indicando que la adición de PHB puede recristalizar al PLA. Se ha informado previamente en la literatura que la mezcla de PLA/PHB en proporciones 75/25 m/m es inmiscible. No obstante, de acuerdo con Min Zhang⁷ et al. y Mohamed¹³³ et al. el PLA se puede compatibilizar con el PHB, debido a la dispersión de cristales finos como tipo esferulitas que adopta la fase dispersa (PHB) en la fase continua (PLA) y que además actúan como agentes nucleantes en el PLA^{7,133,135}.

De manera general, se puede apreciar que la Tg de las mezclas no cambió notablemente por la adición de HAp-NPs y la presencia de los nanohíbridos respecto a los polímeros puros y la mezcla de PLA/PHB sin nanopartículas. Sin embargo, la mezcla de PLA/PHB tiene una temperatura de cristalización inferior a las mezclas de PLA/PHB/HAp_1% y PLA/PHB/NHS-1_1%. Lo anterior posiblemente se deba a que la presencia de las HAp-NPs y de los nanohíbridos también actúan como agentes nucleantes en la mezcla prístina. En resumen la

incorporación tanto de HAp-NPs y de NHS-1 proporcionó una mejora en la cristalinidad en la mezcla de PHB/PLA atribuido a sus valor de cristalinidad¹³⁶.

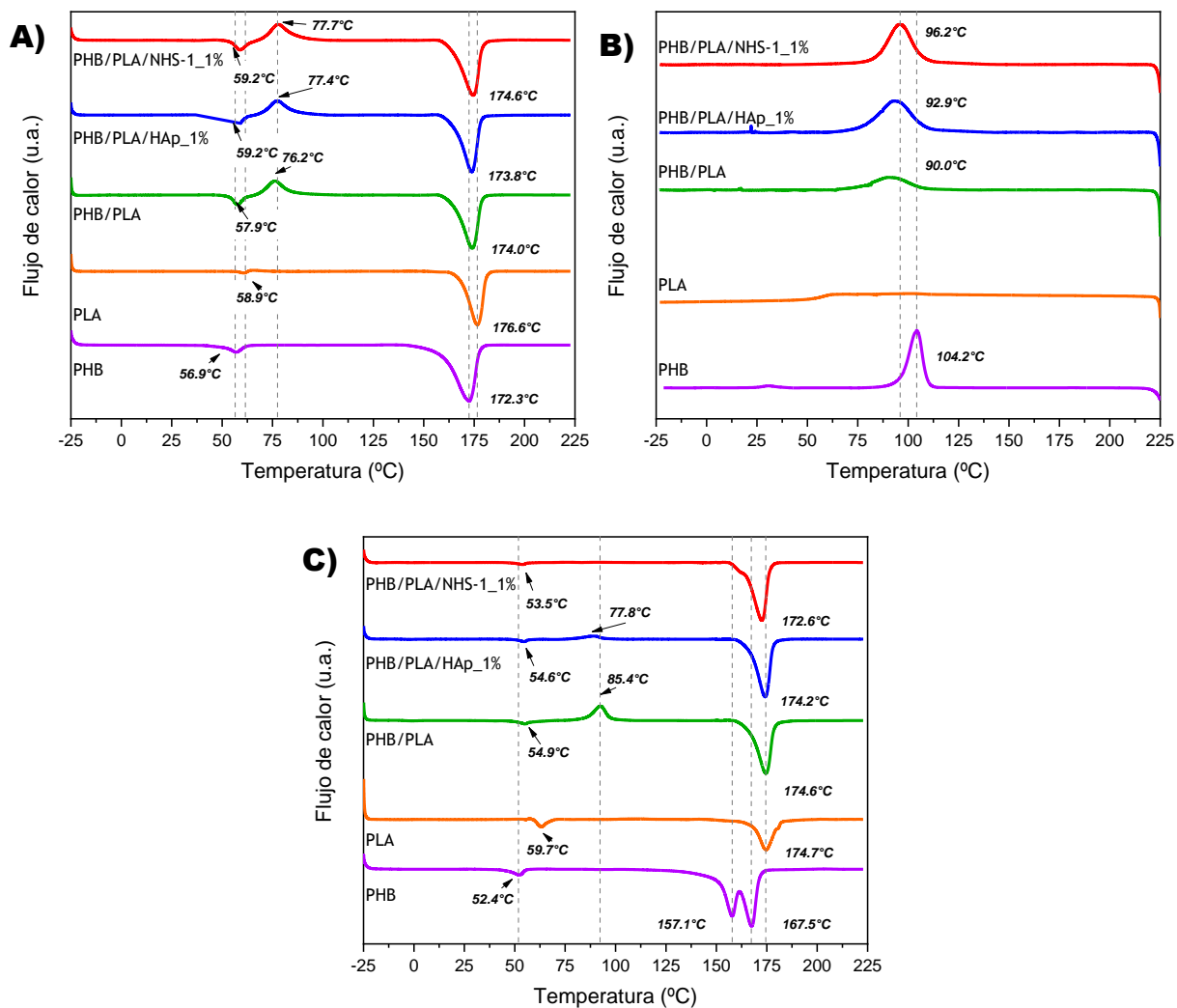


Figura 31. DSC del PLA y PHB prístinos, así como de sus mezclas PLA/PHB, PLA/PHB/HAp_1% y PLA/PHB/NHS-1_1%. A) 1er ciclo de calentamiento. B) ciclo de enfriamiento C) 2do ciclo de calentamiento.

8.6. Análisis Termogravimétrico

Los termogramas de las muestras de PLA y PHB prístinos se presentan en la Figura 32. El PLA prístino comienza a descomponerse en una sola etapa en $\sim 300^{\circ}\text{C}$ dejando el 0% de residuo carbonizado a 500°C , mientras que el PHB prístino se degrada en tres etapas, la primera comienza en $\sim 150^{\circ}\text{C}$ con una pérdida en masa del 2.82%, la segunda $\sim 260^{\circ}\text{C}$ con una pérdida en masa del 84.98% y la tercer etapa de descomposición se muestran a $\sim 325^{\circ}\text{C}$ con una pérdida en masa del 11.24%, estas degradaciones se atribuyen a la degradación de cadenas poliméricas con grupos carboxilo y a la formación de cadenas con grupos vinilo¹³⁶. En general, las pérdidas térmicas de peso de PHB y PLA eran bastante sensibles a la temperatura, con intervalos estrechos de temperatura de descomposición. Sin embargo, en la Figura 32 A se logra apreciar que el PLA es más estable térmicamente que PHB (Figura 32 B).

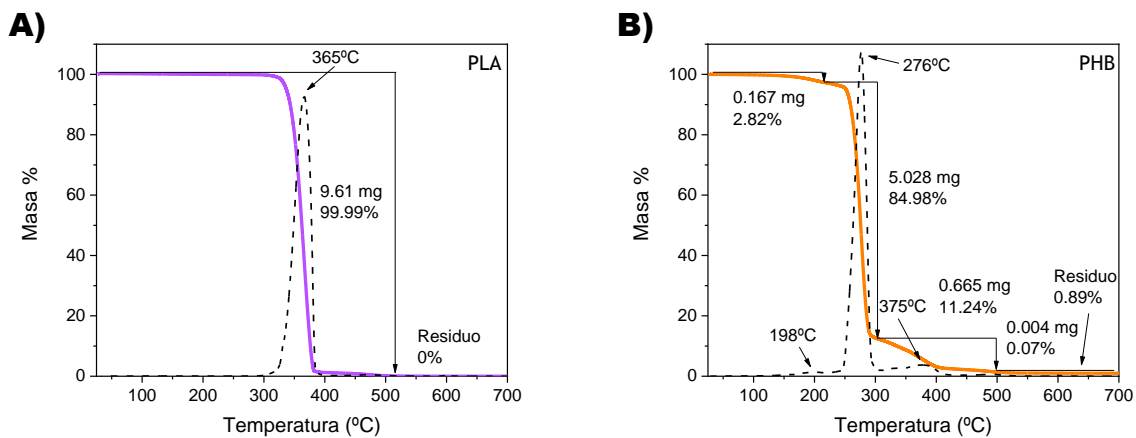


Figura 32. A) TGA del PLA prístino. B) TGA del PHB prístino.

Como era de esperarse, la descomposición térmica de PLA/PHB tiene lugar en dos etapas de degradación, la primera que ocurre a $\sim 190^{\circ}\text{C}$ con una pérdida en masa casi del 25% y otra en 276°C con una pérdida en masa aproximada del 75%, lo anterior sugiere que la presencia de los grupos carboxilo terminales y la escisión de la cadena oxidativa del PHB catalizan una reacción de hidrólisis en la mezcla, dado que su estabilidad térmica decrece en comparación al PLA prístino (Figura 33 A)¹³⁶.

Al igual que el PHB prístino, el TGA de PLA/PHB/HAp_1% consisten en tres etapas de degradación que ocurren en $\sim 200^{\circ}\text{C}$ con una pérdida en masa del 23.56%, $\sim 300^{\circ}\text{C}$ con una

pérdida en masa de 73.7% y a $\sim 375^{\circ}\text{C}$ con una pérdida en masa de 1.68%, dejando finalmente un residuo del 1% correspondiente a la HAp (Figura 33 B). En cuanto al TGA de PLA/PHB/NHS-1_1% (Figura 33 C), se observa como la presencia de NHS-1 mejora significativamente su estabilidad térmica respecto a los polímeros prístinos y a las mezclas anteriores, puesto que la primera etapa de descomposición de la mezcla que corresponde al PHB tiene lugar a partir de $\sim 198^{\circ}\text{C}$ con una pérdida en masa de 33.3%, la segunda descomposición ocurre en $\sim 300^{\circ}\text{C}$ y finalmente quedó un residuo de 0.35% aproximadamente. La mejora en la estabilidad térmica de PHB en mezclas de PLA/PHB, PLA/PHB/HAp_1% y PLA/PHB/NHS-1_1% indica que hay interacción entre PLA y PHB, aunque sean inmiscibles.

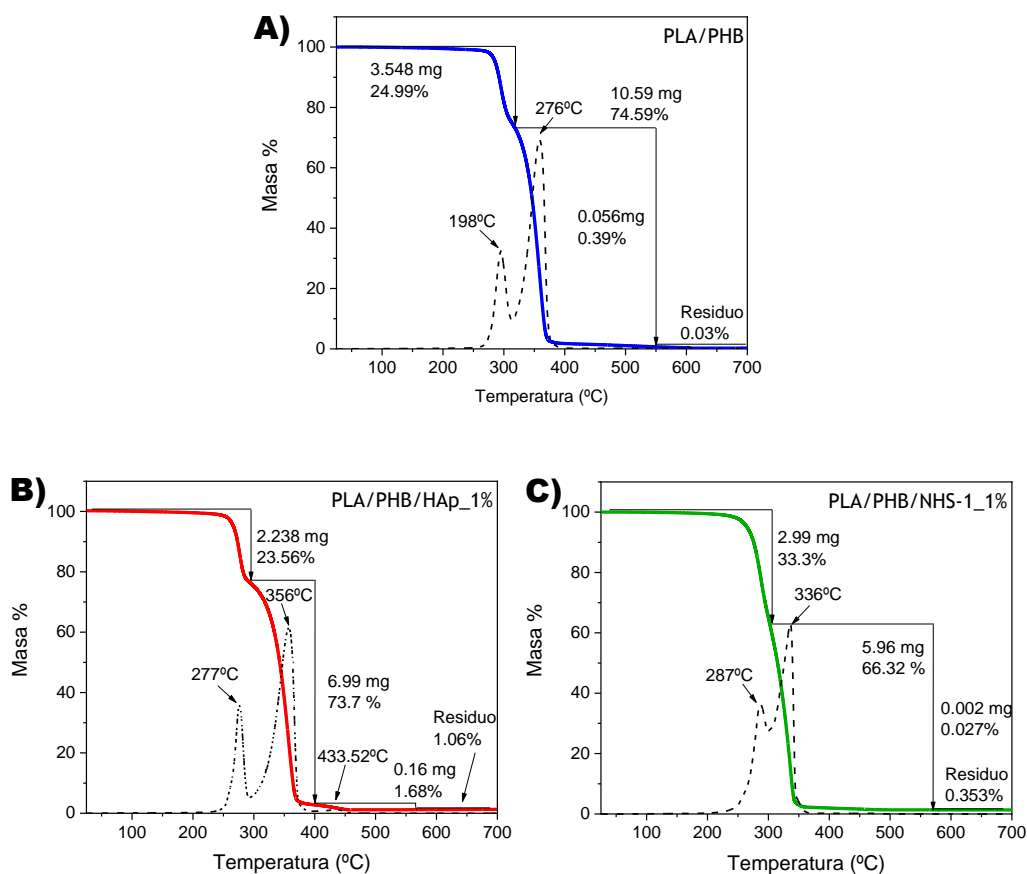


Figura 33. A) TGA PLA/PHB. B) TGA PLA/PHB/HAp_1%. C) TGA PLA/PHB/NHS-1_1%.

8.7. Ensayos de Compresión

Para estudiar el efecto del patrón de relleno sobre las propiedades mecánicas, se imprimieron especímenes a base de PLA (filamento comercial) y se sometieron ante cargas de compresión monotónica siguiendo las recomendaciones de la norma ASTM D685-15. Se analizaron especímenes con patrones de relleno giroidal, hexagonal y triangular a diferentes porcentajes de relleno (50, 70 y 90%) con la finalidad de evaluar las propiedades mecánicas óptimas que simulen al hueso trabecular. En la Figura 34 se muestran las curvas de esfuerzo-deformación (σ - ϵ) donde se aprecian los puntos de cedencia (puntos en color rojo).

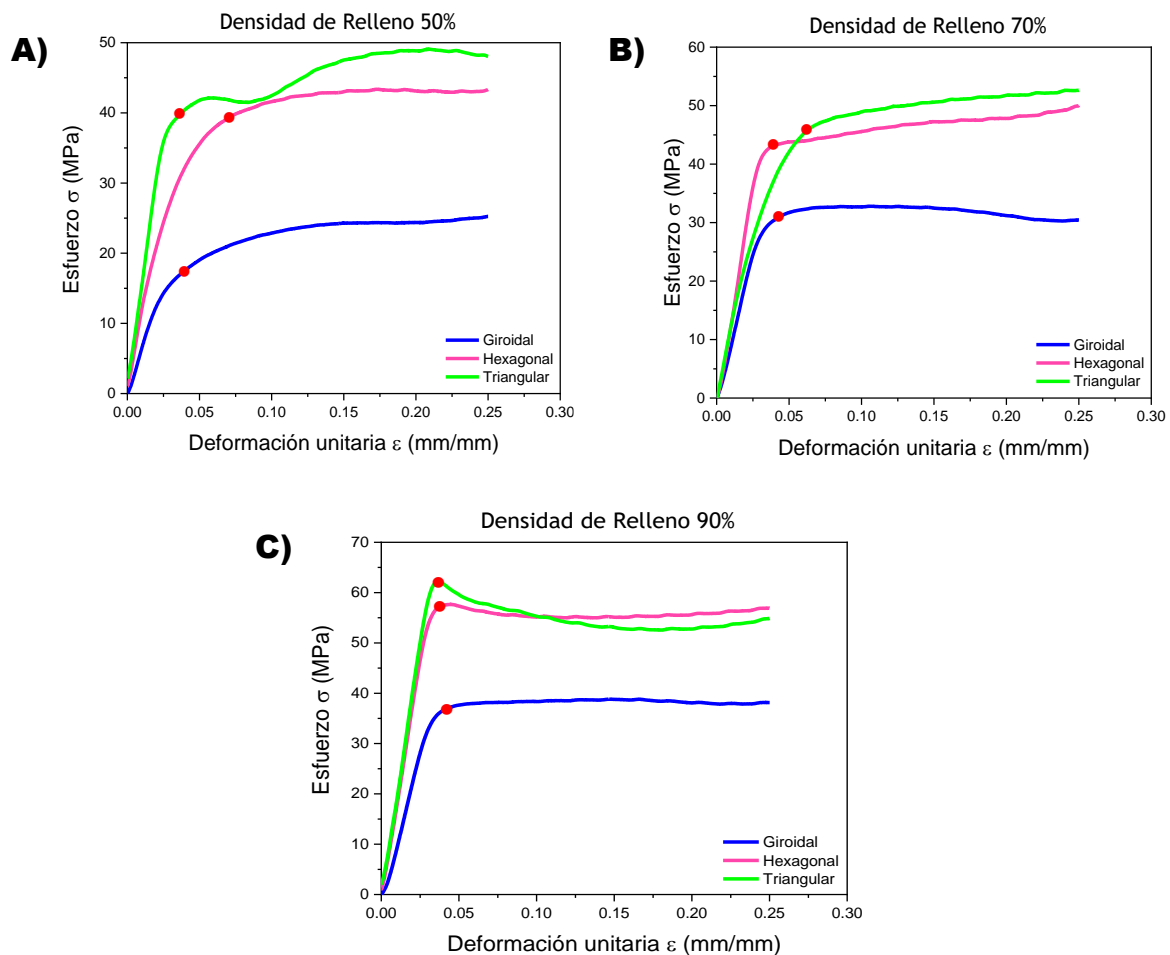


Figura 34. Curvas de σ - ϵ de los especímenes impresos en 3D. A) especímenes con densidad de relleno al 50%. B) especímenes con densidad de relleno de 70%. C) especímenes con densidad de relleno de 90%.

Adicionalmente, se muestran las gráficas del esfuerzo de fluencia (σ) (Figura 35 A) y el módulo elástico a compresión (E) (Figura 35 B) de los especímenes impresos con los diferentes patrones y densidades de relleno, donde; G-50, G-70 y G-90, representan al patrón giroidal con sus diferentes densidades de relleno; H-50, H-70, H-90, representan al patrón hexagonal con sus diferentes densidades de relleno; T-50, T-70 y T-90 represen al patrón triangular con sus diferentes densidades de relleno.

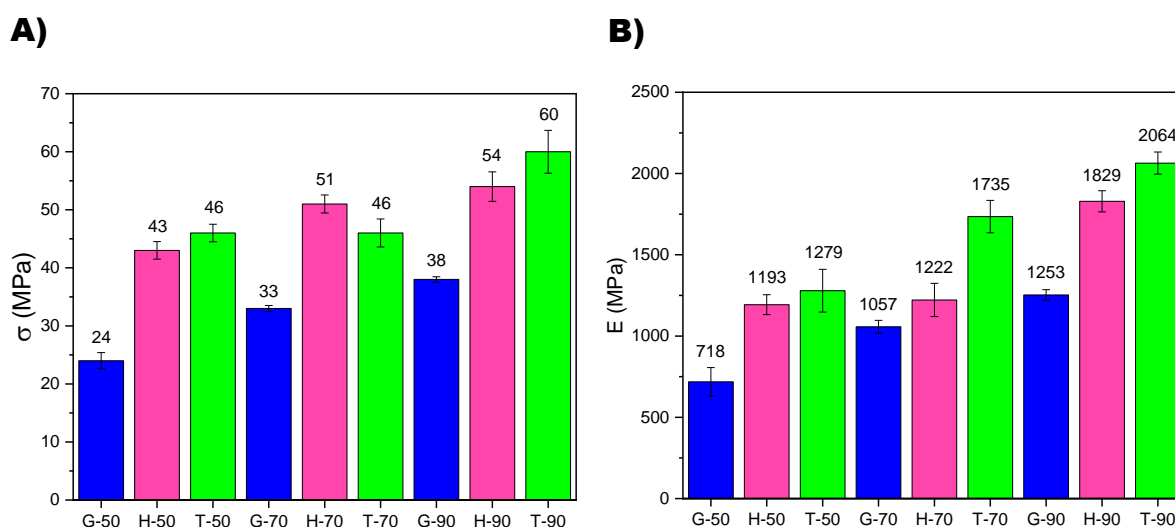


Figura 35. Ensayos de compresión de los especímenes impresos en 3D.
A) Esfuerzo de fluencia. B) Módulo de compresión.

Tanto el σ como el módulo de compresión incrementaron a medida que la densidad de relleno aumentó para todos los patrones de relleno. Sin embargo, se aprecia que el patrón de relleno triangular presenta un mayor módulo elástico a compresión y σ que los patrones hexagonal y giroidal para todas las densidades de relleno investigadas. La razón a la que se atribuye una mayor resistencia mecánica al patrón de relleno triangular es por la presencia de más puntos de contacto por unidad de área¹³⁷. Aunado a lo anterior, se ha informado que las propiedades mecánicas a compresión de especímenes impresos en 3D dependen del número de puntos de contacto y que el número de capas con puntos de contacto por unidad de área definen la resistencia mecánica contra una carga externa¹³⁷. Además, el bajo módulo elástico a compresión

puede estar relacionado a que las capas no contactan por completo con el nivel anterior de capas de construcción¹³⁷.

De acuerdo con lo reportado en la literatura, el hueso trabecular/esponjoso presenta un módulo de hasta 3,000 MPa. Por lo tanto, a partir de este estudio, se consideró adecuado utilizar el patrón de relleno triangular con un 90% de relleno para la impresión de especímenes con las mezclas de PLA/PHB, PLA/PHB/HAp_1% y PLA/PHB/NHS-1_1%. Los diagramas de σ - ϵ de las mezclas anteriores se observan en la Figura 36, donde se aprecian los puntos de cedencia (puntos en color rojo).

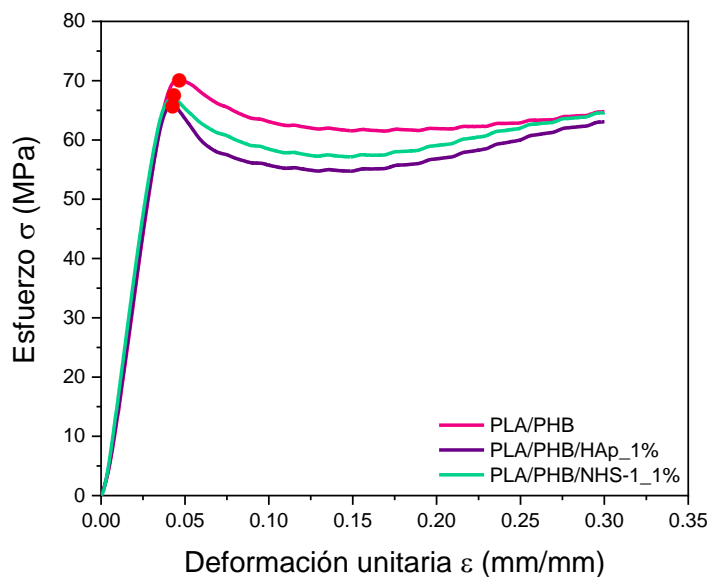


Figura 36. Curvas de σ - ϵ de los especímenes impresos en 3D con patrón triangular al 90% de relleno, con las mezclas de PLA/PHB, PLA/PLA/HAp_1% y PLA/PHB/NHS-1_1%.

Los especímenes impresos con la mezcla de PLA/PHB mostraron un módulo de compresión de aproximadamente 2060 MPa y un esfuerzo máximo de 70 MPa, valores que se encuentran en el intervalo reportado para el hueso trabecular. En la Figura 37 se logra apreciar que prácticamente no hubo cambios en el esfuerzo máximo y módulo elástico a compresión de los especímenes impresos con las mezclas de PLA/PHB/HAp_1% y PLA/PHB/NHS-1_1% respecto a los especímenes impresos con la mezcla de PLA/PHB.

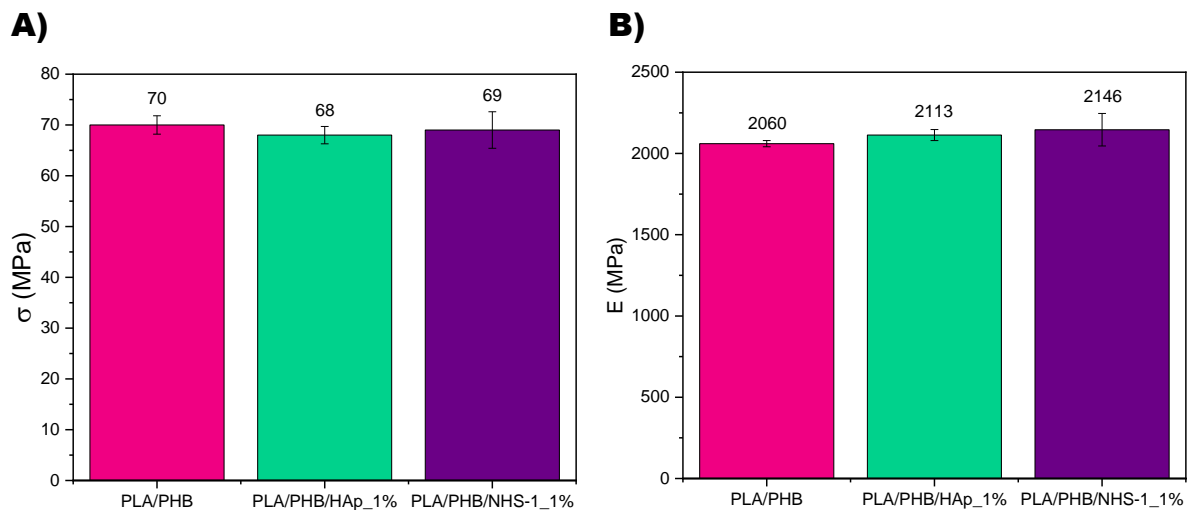


Figura 37. Ensayos de compresión de los especímenes impresos en 3D de las mezclas de PLA/PHB, PLA/PHB/HAp_1% y PLA/PHB/NHS-1_1%.
A) Esfuerzo de fluencia. B) Módulo de compresión.

8.8. Pruebas Antibacterianas

Se llevó a cabo la evaluación de la actividad antimicrobiana de prototipos impresos con las mezclas de PLA/PHB, PLA/PHB/HAp_1% y PLA/PHB/NHS-1_1% frente a *E. coli* y *S. aureus*, adicionalmente se prepararon prototipos con las mezclas anteriores y se realizó un tratamiento superficial con plasma de argón, con la finalidad de erosionar la superficie de la matriz polimérica y tratar de exponer más a los nanohíbridos de HAp-Ag-ZnO (NHS-1). En las Tablas 12 y 13 se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los prototipos impresos frente a *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente.

Tabla 12. Comportamiento de la actividad antimicrobiana de los prototipos impresos en 3D frente a *Escherichia coli*.

Muestra	T_{0h} (UFM/mL)	T_{24h} (UFM/mL)	Actividad antimicrobiana (%)	Inhibición (%)
PLA/PHB	51,000	19,300,000	0.63	0
PLA/PHB (plasma argón)	51,000	31,000,000	0.18	0
PLA/PHB/HAp_1%	51,000	34,400,000	0.38	0
PLA/PHB/HAp_1% (plasma argón)	51,000	108,000,000	-0.37	0
PLA/PHB/NHS-1_1%	51,000	4,710	3.99	90.7
PLA/PHB/NHS-1_1% (plasma argón)	51,000	20	6.39	99.9

Tabla 13. Comportamiento de la actividad antimicrobiana de prototipos impresos en 3D frente a *Staphylococcus aureus*.

Muestra	T _{0h} (UFM/mL)	T _{24h} (UFM/mL)	Actividad antimicrobiana (%)	Inhibición (%)
PLA/PHB	51,000	53,500,000	0.24	0
PLA/PHB (plasma argón)	51,000	104,000,000	-0.09	0
PLA/PHB/HAp_1%	51,000	73,100,000	0.11	0
PLA/PHB/HAp_1% (plasma argón)	51,000	92,800,000	-0.04	0
PLA/PHB/NHS-1_1%	51,000	35,000	3.37	31.37
PLA/PHB/NHS-1_1% (plasma argón)	51,000	450	5.26	99.1

Como era de esperarse, los prototipos impresos con las mezclas de PLA/PHB y PLA/PHB/HAp_1% no mostraron actividad antimicrobiana aún con el tratamiento superficial con plasma de argón. En el caso de los prototipos impresos sin nanohíbridos de HAp-Ag-ZnO (NHS-1) la población microbiana se ve incrementada en gran medida al final del periodo de exposición de 24 horas. No obstante, los prototipos impresos con la mezcla de PLA/PHB/NHS-1_1% sin plasma, mostraron una actividad antimicrobiana del 90.7% y 31.37% frente a *E. coli* y *S. aureus* respectivamente. La actividad antibacteriana de los prototipos impresos con la mezcla de PLA/PHB/NHS-1_1% tratada con plasma de argón incrementó hasta un 99.9% y 99.1% frente a *E. coli* y *S. aureus* respectivamente. De acuerdo a la norma, se considera aceptable un valor de actividad antimicrobiana (R) superior a 2, por lo que se podría establecer que a partir de una concentración del 1% de NHS-1, presente en la mezcla polimérica de

PLA/PHB permite la inhibición y reducción significativa del 99% la población de *E. coli* y *S. aureus*, en relación a la población registrada para los prototipos impresos sin NHS-1, después de un periodo de exposición de 24 horas. En la Figura 38 se muestra un gráfico comparativo de la inhibición para *E. coli* y *S. aureus* de los especímenes impresos con la mezcla de PLA/PHB/NHS-1_1% con y sin tratamiento por plasma. En el sentido estricto de evaluación de la actividad antimicrobiana se puede considerar que con una concentración del 1% de NHS-1 en la matriz polimérica de PLA/PHB tratado con plasma de argón, existe una completa inhibición de bacterias, ya que la reducción de la población microbiana de este material con respecto a lo registrado con el material ausente de nanopartículas/nanohíbridos, representa un material con actividad antimicrobiana con un 99.9 % de inhibición de la bacteria *E. coli* y 99.1% para *S. aureus*.

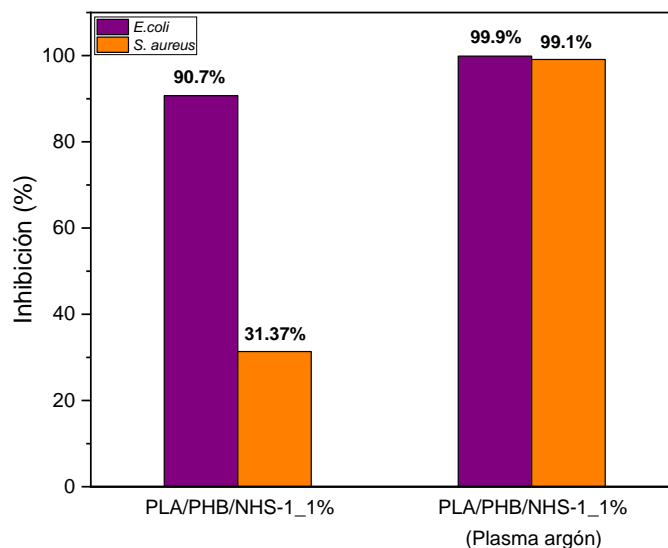


Figura 38. Gráfica de la inhibición de *E. coli* y *S. aureus* en prototipos impresos con PLA/PHB/NHS-1_1% tratados con plasma de argón y sin tratar.

9. CONCLUSIONES

- Se desarrolló una nueva ruta asistida por ultrasonido para sintetizar de manera homogénea nanopartículas de Ag y ZnO en hidroxiapatita (HAp).
- El contenido de los precursores de ZnO y Ag juega un papel importante en la arquitectura del material híbrido.
- El contenido más bajo de precursores de ZnO y Ag produce un material organizado jerárquicamente con hidroxiapatita esférica decorada de manera homogénea con nanopartículas esféricas de ZnO y Ag.
- Se determinó que el patrón triangular al 90% de relleno presenta un módulo elástico adecuado para manufacturar piezas con posible aplicación en andamios óseos.
- Las propiedades mecánicas a compresión de los prototipos porosos a base de PLA/PHB e HAp-Ag-ZnO no disminuyeron con respecto al de PLA/PHB.
- Se confirmó la actividad antibacteriana para *E. coli* y *S. aureus* en los especímenes impresos a base de PLA/PHB e HAp-Ag-ZnO.
- Se alcanzó una inhibición bacteriana de ~100 % para *E. coli* y *S. aureus* en especímenes de PLA/PHB e HAp-Ag-ZnO cuando se trataron por plasma de argón.
- Los materiales desarrollados en este trabajo tienen un gran potencial para andamios impresos en 3D basados en polímeros para la ingeniería de tejidos óseos.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Collins, M. N. *et al.* Scaffold Fabrication Technologies and Structure/Function Properties in Bone Tissue Engineering. *Adv. Funct. Mater.* **31**, (2021).
2. Porter, J. R., Ruckh, T. T. & Papat, K. C. Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnol. Prog.* **25**, 1539–1560 (2009).
3. Ueda, M. Tissue engineered bone; Application for implant surgery. *Inflamm. Regen.* **31**, 202–218 (2011).
4. Zhao, P. *et al.* Fabrication of scaffolds in tissue engineering: A review. *Front. Mech. Eng.* **13**, 107–119 (2018).
5. Zhao, K., Deng, Y., Chen, J. C. & Chen, G. Q. Polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds with good mechanical properties and biocompatibility. *Biomaterials* **24**, 1041–1045 (2003).
6. Raza, Z. A., Abid, S. & Banat, I. M. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **126**, 45–56 (2018).
7. Zhang, M. & Thomas, N. L. Blending polylactic acid with polyhydroxybutyrate: The effect on thermal, mechanical, and biodegradation properties. *Adv. Polym. Technol.* **30**, 67–79 (2011).
8. Goel, A., Meher, M. K., Gulati, K. & Poluri, K. M. Chapter 3 - Fabrication of Biopolymer-Based Organs and Tissues Using 3D Bioprinting. in (eds. Ahmad, N., Gopinath, P. & Dutta, R. B. T.-3D P. T. in N.) 43–62 (Elsevier, 2019). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815890-6.00003-7>.
9. Mukherjee, P., Rani, A. & Saravanan, P. Chapter 4 - Polymeric Materials for 3D Bioprinting. in (eds. Ahmad, N., Gopinath, P. & Dutta, R. B. T.-3D P. T. in N.) 63–81 (Elsevier, 2019). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815890-6.00004-9>.
10. Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. da S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J. & Cerri, P. S.

Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res. Int.* **2015**, 421746 (2015).

11. Rho, J. Y., Kuhn-Spearing, L. & Zioupos, P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med. Eng. Phys.* **20**, 92–102 (1998).
12. Duarte, V. Remodelado de huesos humanos sometidos a estímulos mecánicos y piezoeléctricos por el método de los elementos de contorno. (2015). doi:10.13140/RG.2.2.36692.04484.
13. Thomas, T., Martin, A. & Lafage-Proust, M.-H. Fisiología del tejido óseo. *EMC - Podol.* **13**, 1–17 (2011).
14. Roeder, R. K., Converse, G. L., Kane, R. J. & Yue, W. Hydroxyapatite-reinforced polymer biocomposites for synthetic bone substitutes. *JOM* **60**, 38–45 (2008).
15. Hu, C., Ashok, D., Nisbet, D. R. & Gautam, V. Bioinspired surface modification of orthopedic implants for bone tissue engineering. *Biomaterials* **219**, 119366 (2019).
16. Adler, J. T. Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice, 40th Edition. *J. Surg. Res.* **158**, 28–29 (2010).
17. Fernández, B. M., Máster, T. F. De & Ndice, Í. Tratamiento de defectos óseos mediante técnicas de ingeniería tisular. (2016).
18. Sikavitsas, V. I., Temenoff, J. S. & Mikos, A. G. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials* **22**, 2581–2593 (2001).
19. Cowin, S. C. Bone poroelasticity. *J. Biomech.* **32**, 217–238 (1999).
20. Weinbaum, S., Cowin, S. C. & Zeng, Y. A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *J. Biomech.* **27**, 339–360 (1994).
21. Thi, M. M., Kojima, T., Cowin, S. C., Weinbaum, S. & Spray, D. C. Fluid shear stress remodels expression and function of junctional proteins in cultured bone cells. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **284**, 389–403 (2003).
22. Leticia María Lemus Cruz, C. E., Urrutia, Z. A. & Castell, A. C. L. Origen y evolucion

- de los implantes dentales. *Rev. Habanera Ciencias Medicas* **8**, (2009).
23. Gerhardt, L.-C. & Boccaccini, A. R. Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials* vol. 3 (2010).
 24. Kaur, G. *et al.* Mechanical properties of bioactive glasses, ceramics, glass-ceramics and composites: State-of-the-art review and future challenges. *Mater. Sci. Eng. C* **104**, 109895 (2019).
 25. Cai, R. *et al.* Synthesis and antimicrobial activity of mesoporous hydroxylapatite / zinc oxide nanofibers. *Mater. Des.* **87**, 17–24 (2015).
 26. Marchetti, E. *et al.* Biomateriales en cirugía ortopédica. *EMC - Técnicas Quirúrgicas - Ortop. y Traumatol.* **2**, 1–24 (2010).
 27. Soria, J. M. *et al.* Uso de biomateriales en medicina regenerativa , aspectos básicos y aplicaciones en el Sistema Nervioso Use of biomaterials in regenerative medicine , basic aspects and applications in the Nervous System. *Trauma Fund. Mapfre* **20**, 15–22 (2008).
 28. Asadi, N., Del Bakhshayesh, A. R., Davaran, S. & Akbarzadeh, A. Common biocompatible polymeric materials for tissue engineering and regenerative medicine. *Mater. Chem. Phys.* **242**, (2020).
 29. El-Ghannam, A. & Ducheyne, P. 1.9 Bioactive Ceramics. in *Integral Biomaterials II* (ed. Ducheyne, P. B. T.-C. B. I. I.) 204–234 (Elsevier, 2017). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.10169-9>.
 30. Albrektsson, T. & Johansson, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur. Spine J.* **10**, S96–S101 (2001).
 31. Howard, D., Buttery, L. D., Shakesheff, K. M. & Roberts, S. J. Tissue engineering: Strategies, stem cells and scaffolds. *J. Anat.* **213**, 66–72 (2008).
 32. Holland, T. A. & Mikos, A. G. Review: Biodegradable Polymeric Scaffolds. Improvements in Bone Tissue Engineering through Controlled Drug Delivery BT - Tissue Engineering I. in (eds. Lee, K. & Kaplan, D.) 161–185 (Springer Berlin Heidelberg, 2006). doi:10.1007/b137205.

33. Roseti, L. *et al.* Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Mater. Sci. Eng. C* **78**, 1246–1262 (2017).
34. Lopes, D., Martins-Cruz, C., Oliveira, M. B. & Mano, J. F. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. *Biomaterials* **185**, 240–275 (2018).
35. Hubbell, J. A. Bioactive biomaterials. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 123–129 (1999).
36. Diana Lopes, Cláudia Martins-Cruz, Mariana B. Oliveira, J. F. M. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. *Biomaterials* **185**, 240–275 (2018).
37. Park, J. & Lakes, R. S. *Biomaterials: An introduction: Third edition. Biomaterials: An introduction: Third edition* (2007). doi:10.1007-978-0-387-37880-0.
38. Nakamura, J., Sugawara-Narutaki, A. & Ohtsuki, C. 16 - Bioactive ceramics: Past and future. in *Bioceramics* (eds. Osaka, A. & Narayan, R. B. T.-B.) 377–388 (Elsevier, 2021). doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102999-2.00016-8.
39. Bairo, F. Bioactive Glasses and Glass-Ceramics. in *Encyclopedia of Materials: Technical Ceramics and Glasses* (ed. Pomeroy, M. B. T.-E. of M. T. C. and G.) 614–623 (Elsevier, 2021). doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.12088-0.
40. Ducheyne, P. & Qiu, Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* **20**, 2287–2303 (1999).
41. DUCHEYNE, P. Bioceramics: material characteristics versus in vivo behavior. *J. Biomed. Mater. Res.* **21**, 219–236 (1987).
42. Reyes-Gasga, M. V. G.-G. y J. LA HIDROXIAPATITA, SU IMPORTANCIA EN LOS TEJIDOS MINERALIZADOS Y SU APLICACIÓN BIOMÉDICA. *Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas* **9**, 90–95 (2006).
43. Londoño López, M., Echevarría, A. & De La Calle, F. Características cristal químicas de la hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas. *Rev. EIA* 109–118 (2006).
44. Saxena, V., Shukla, I. & Pandey, L. M. Chapter 8. Hydroxyapatite: an inorganic ceramic for biomedical applications. *Materials for Biomedical Engineering: Nanobiomaterials in*

- Tissue Engineering* (Elsevier Inc., 2019). doi:10.1016/B978-0-12-816909-4.00008-7.
45. Szcze, A., Ho, L. & Chibowski, E. Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* **249**, 321–330 (2017).
 46. Sequeda, L. G., Díaz, J. M., Gutiérrez, S. J. & Perdomo, S. J. Obtención de hidroxiapatita sintética por tres métodos diferentes y su caracterización para ser utilizada como sustituto óseo. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm* **41**, 50–66 (2012).
 47. Ferraz, M. P., Monteiro, F. J. & Manuel, C. M. Hydroxyapatite nanoparticles : A review of. *J. Appl. Biomater. Biomech.* **2**, 74–80 (2004).
 48. Villani, A., Millán, A. & González, G. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y CERÁMICA DE HIDROXIAPATITAS PRODUCIDAS POR DISTINTOS MÉTODOS DE SÍNTESIS : Parte II : EFECTOS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO PHYSICO-CHEMICAL AND CERAMIC CHARACTERIZATION OF HYDROXYAPATITE OBTAINED BY DIFFERENT SYNTHESIS METHODS . *Rev. la Fac. Ing. U.C.V* **30**, 201–209 (2015).
 49. Riches, P. *et al.* 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioact. Mater.* **3**, 278–314 (2017).
 50. Zhou, H., Lawrence, J. G. & Bhaduri, S. B. Fabrication aspects of PLA-CaP/PLGA-CaP composites for orthopedic applications: A review. *Acta Biomater.* **8**, 1999–2016 (2012).
 51. Carvalho Zavaglia, C. A., Silva, R. F., Santos, S. A. & Pellicari de Lima, C. R. Caracterización de recubrimientos de hidroxiapatita depositadas sobre la aleación Ti6Al7Nb a través de aspersion térmica a plasma. *Biomecánica* **8**, (2000).
 52. Reis de Vasconcellos, L. M. *et al.* Porous titanium associated with CaP coating: In vivo and in vitro osteogenic performance. *Mater. Res.* **21**, (2018).
 53. Lopera, A. *et al.* Synthesis of high crystallinity biphasic calcium phosphates/gold nanoparticles composites by solution combustion method with antimicrobial response. *Boletín la Soc. Española Cerámica y Vidr.* (2021) doi:https://doi.org/10.1016/j.bsecv.2021.03.007.

54. Radhakrishnan, S. *et al.* Fabrication of 3D printed antimicrobial polycaprolactone scaffolds for tissue engineering applications. *Mater. Sci. Eng. C* **118**, 111525 (2021).
55. Ye, Z. *et al.* Biomimetic mineralized hybrid scaffolds with antimicrobial peptides. *Bioact. Mater.* **6**, 2250–2260 (2021).
56. Craciunescu, O., Seciu, A.-M. & Zarnescu, O. In vitro and in vivo evaluation of a biomimetic scaffold embedding silver nanoparticles for improved treatment of oral lesions. *Mater. Sci. Eng. C* **123**, 112015 (2021).
57. Zazo, H., Millán, C. G., Colino, C. I. & Lanao, J. M. *Applications of Metallic Nanoparticles in Antimicrobial Therapy. Antimicrobial Nanoarchitectonics: From Synthesis to Applications* (Elsevier Inc., 2017). doi:10.1016/B978-0-323-52733-0.00015-X.
58. Dizaj, S. M., Lotfipour, F., Barzegar-Jalali, M., Zarrintan, M. H. & Adibkia, K. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C* **44**, 278–284 (2014).
59. Kaushik, M. *et al.* Investigations on the antimicrobial activity and wound healing potential of ZnO nanoparticles. *Appl. Surf. Sci.* **479**, 1169–1177 (2019).
60. Mao, C. *et al.* Photo-Inspired Antibacterial Activity and Wound Healing Acceleration by Hydrogel Embedded with Ag/Ag@AgCl/ZnO Nanostructures. *ACS Nano* **11**, 9010–9021 (2017).
61. Augustine, R. *et al.* Electrospun polycaprolactone membranes incorporated with ZnO nanoparticles as skin substitutes with enhanced fibroblast proliferation and wound healing. *RSC Adv.* 24777–24785 (2014) doi:10.1039/c4ra02450h.
62. Azam, A. *et al.* Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. *Int. J. Nanomedicine* **7**, 6003–6009 (2012).
63. Sirelkhatim, A. *et al.* Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Lett.* **7**, 219–242 (2015).

64. Li, M. *et al.* Potent and durable antibacterial activity of ZnO-dotted nanohybrids hydrothermally derived from ZnAl-layered double hydroxides. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **181**, 585–592 (2019).
65. Bera, R. K., Mandal, S. M. & Raj, C. R. Antimicrobial activity of fluorescent Ag nanoparticles. *Lett. Appl. Microbiol.* **58**, 520–526 (2014).
66. Ahmad, A. & Ibrahim, N. Synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activity using the lichen *Parmotrema praesorediosum*. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 121–127 (2014).
67. Zinjarde, S. S. Bio-inspired nanomaterials and their applications as antimicrobial agents. *Chronicles Young Sci.* **3**, 74–82 (2012).
68. Rajeshkumar, S., Bharath, L. V & Geetha, R. Chapter 17 - Broad spectrum antibacterial silver nanoparticle green synthesis: Characterization, and mechanism of action. in *Micro and Nano Technologies* (eds. Shukla, A. K. & Iravani Characterization and Applications of Nanoparticles, S. B. T.-G. S.) 429–444 (Elsevier, 2019). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102579-6.00018-6>.
69. Radzig, M. A. *et al.* Biointerfaces Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: Influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **102**, 300–306 (2013).
70. Kerativitayanan, P., Carrow, J. K. & Gaharwar, A. K. Nanomaterials for Engineering Stem Cell Responses. *Adv. Healthc. Mater.* **4**, 1600–1627 (2015).
71. Vázquez-olmos, A. R., Vega-jiménez, A. L. & Paz-díaz, B. Mecanosíntesis y efecto antimicrobiano de óxidos metálicos nanoestructurados Mechanosynthesis and antimicrobial effect of nanostructured metal oxides. *Mundo Nano* **11**, 29–44 (2018).
72. Radzig, M. A. *et al.* Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: Influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **102**, 300–306 (2013).
73. Lallo, B. *et al.* Increased antibacterial activity of ZnO nanoparticles: Influence of size and surface modification. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **177**, 440–447 (2019).

74. Tang, S. & Zheng, J. Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles : Structural Effects. *Adv. Healthc. Mater.* **7**, 1–10 (2018).
75. Kolodziejczak-Radzimska, A. & Jesionowski, T. Zinc oxide-from synthesis to application: A review. *Materials (Basel)*. **7**, 2833–2881 (2014).
76. Bohara, R. A. Chapter 1 - Introduction and Types of Hybrid Nanostructures for Medical Applications. in *Micro and Nano Technologies* (eds. Ashok Bohara, R. & Thorat, N. B. T.-H. N. for C. T.) 1–16 (Elsevier, 2019). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813906-6.00001-9>.
77. Rejab, M. R. B. M. *et al.* Historical Development of Hybrid Materials. in (eds. Hashmi, S. & Choudhury, I. A. B. T.-E. of R. and S. M.) 445–455 (Elsevier, 2020). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.10546-6>.
78. Talari, M. K., Majeed, A. B. A., Tripathi, D. K. & Tripathy, M. Synthesis, characterization and antimicrobial investigation of mechanochemically processed silver doped ZnO nanoparticles. *Chem. Pharm. Bull.* **60**, 818–824 (2012).
79. Trandafilović, L. V. *et al.* ZnO/Ag hybrid nanocubes in alginate biopolymer: Synthesis and properties. *Chem. Eng. J.* **253**, 341–349 (2014).
80. Zhang, Y. *et al.* The synergetic antibacterial activity of Ag islands on ZnO (Ag/ZnO) heterostructure nanoparticles and its mode of action. *J. Inorg. Biochem.* **130**, 74–83 (2014).
81. Zamperini, C. A. *et al.* Antifungal Applications of Ag-Decorated Hydroxyapatite Nanoparticles. *J. Nanomater.* (2013) doi:[10.1155/2013/174398](https://doi.org/10.1155/2013/174398).
82. Begam, H., Kundu, B., Chanda, A. & Kumar, S. MG63 osteoblast cell response on Zn doped hydroxyapatite (HAp) with various surface features. *Ceram. Int.* **43**, 3752–3760 (2017).
83. Predoi, D. *et al.* Textural, Structural and Biological Evaluation of Hydroxyapatite Doped with Zinc at Low Concentrations. *Materials* vol. 10 (2017).
84. Riaz, M. *et al.* Synthesis of monophasic Ag doped hydroxyapatite and evaluation of

- antibacterial activity. *Mater. Sci. Eng. C* **90**, 308–313 (2018).
85. Ofudje, E. A., Adeogun, A. I., Idowu, M. A. & Kareem, S. O. Synthesis and characterization of Zn-Doped hydroxyapatite: scaffold application, antibacterial and bioactivity studies. *Heliyon* **5**, e01716 (2019).
 86. Somnath Ghosh, a V. S. Goudar, a K. G. Padmalekha, b S. V. Bhat, b S. S. I. and H. N. V. ZnO/Ag nanohybrid: synthesis, characterization, synergistic antibacterial activity and its mechanism. *RSC Adv.* **2**, 930–940 (2012).
 87. Miao, S. *et al.* Fabrication and evaluation of Zn containing fluoridated hydroxyapatite layer with Zn release ability. *Acta Biomater.* **4**, 441–446 (2008).
 88. Ito, A., Ojima, K., Naito, H., Ichinose, N. & Tateishi, T. Preparation, solubility, and cytocompatibility of zinc-releasing calcium phosphate ceramics. *J. Biomed. Mater. Res.* **50**, 178–183 (2000).
 89. Tan, L., Yu, X., Wan, P. & Yang, K. Biodegradable Materials for Bone Repairs : A Review. *J. Mater. Sci. Technol.* **29**, 503–513 (2013).
 90. Nair, L. S. & Laurencin, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* **32**, 762–798 (2007).
 91. Lizarraga, L., Thomas, C., Juan Ignacio, C.-M. & Roy, I. Tissue Engineering: Polyhydroxyalkanoate-Based Materials and Composites. *Encycl. Polym. Appl. First Ed.* 2652–2675 (2018) doi:10.1201/9781351019422-140000458.
 92. Armentano, I. *et al.* Processing and characterization of plasticized PLA/PHB blends for biodegradable multiphase systems. *Express Polym. Lett.* **9**, 583–596 (2015).
 93. Noda, I., Satkowski, M. M., Dowrey, A. E. & Marcott, C. Polymer Alloys of Nodax Copolymers and Poly(lactic acid). *Macromol. Biosci.* **4**, 269–275 (2004).
 94. Mabrouk, M., Beherei, H. H. & Das, D. B. Recent progress in the fabrication techniques of 3D scaffolds for tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **110**, (2020).
 95. Hann, S. Y. *et al.* Dual 3D printing for vascularized bone tissue regeneration. *Acta*

- Biomater.* **123**, 263–274 (2021).
96. Turnbull, G. *et al.* 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioact. Mater.* **3**, 278–314 (2018).
 97. Daminabo, S. C., Goel, S., Grammatikos, S. A., Nezhad, H. Y. & Thakur, V. K. Fused deposition modeling-based additive manufacturing (3D printing): techniques for polymer material systems. *Mater. Today Chem.* **16**, 100248 (2020).
 98. Vaezi, M., Zhong, G., Kalami, H. & Yang, S. 10 - Extrusion-based 3D printing technologies for 3D scaffold engineering. in *Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds* (eds. Deng, Y. & Kuiper, J. B. T.-F. 3D T. E. S.) 235–254 (Woodhead Publishing, 2018). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100979-6.00010-0>.
 99. Sultan, S., Siqueira, G., Zimmermann, T. & Mathew, A. P. 3D printing of nano-cellulosic biomaterials for medical applications. *Curr. Opin. Biomed. Eng.* **2**, 29–34 (2017).
 100. Podroužek, J., Marcon, M., Ninčević, K. & Wan-Wendner, R. Bio-inspired 3D infill patterns for additive manufacturing and structural applications. *Materials (Basel)*. **12**, 1–12 (2019).
 101. Hosseinpour, S. *et al.* Application of selected scaffolds for bone tissue engineering: a systematic review. *Oral Maxillofac. Surg.* **21**, 109–129 (2017).
 102. Q. Chen, J. A. R. and A. R. B. Tissue Engineering Scaffolds from Bioactive Glass and Composite Materials. *Top. Tissue Eng.* **4**, (2008).
 103. De Witte, T. M., Fratila-Apachitei, L. E., Zadpoor, A. A. & Peppas, N. A. Bone tissue engineering via growth factor delivery: From scaffolds to complex matrices. *Regen. Biomater.* **5**, 197–211 (2018).
 104. Bykkam, S., Ahmadipour, M. & Narisngam, S. Extensive Studies on X-Ray Diffraction of Green Synthesized Silver Nanoparticles. *Adv. Nanoparticles* **4**, 1–10 (2015).
 105. Fatiatun, F. FABRICATION OF GRAPHENE OXIDE/ZINC OXIDE NANOCOMPOSITE THROUGH SPRAYING METHOD FOR SOLAR CELL APPLICATION. (2018).

106. Dimitrijevi, Suzana; Vojislav Stanić; Jelena Antić-Stanković; Midorag Mitrić, Bojan Jokić, Ilija B. Plećas, S. R. Applied Surface Science Synthesis , characterization and antimicrobial activity of copper and zinc-doped hydroxyapatite nanopowders. *Appl. Surf. Sci.* **256**, 6083–6089 (2010).
107. Parameswari, A., Mohamed Asath, R., Premkumar, R. & Milton Franklin Benial, A. SERS and quantum chemical studies on N-methylglycine molecule on silver nanoparticles. *J. Mol. Struct.* **1138**, 102–109 (2017).
108. Jyoti, K., Baunthiyal, M. & Singh, A. Characterization of silver nanoparticles synthesized using *Urtica dioica* Linn. leaves and their synergistic effects with antibiotics . *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* **9**, 217–227 (2016).
109. Popa, C. L. *et al.* Structural characterization and optical properties of hydroxyapatite/collagen matrix. *Rom. Reports Phys.* **68**, 1149–1158 (2016).
110. Koodziejczak-Radzimska, A., Markiewicz, E. & Jesionowski, T. Structural characterisation of ZnO particles obtained by the emulsion precipitation method. *J. Nanomater.* **2012**, (2012).
111. Riaz, M. *et al.* Synthesis of monophasic Ag doped hydroxyapatite and evaluation of antibacterial activity. *Mater. Sci. Eng. C* **90**, 308–313 (2018).
112. Andrew, E., Idowu, A., Abidemi, M. & Olateju, S. Synthesis and characterization of Zn-Doped hydroxyapatite : scaffold application , antibacterial and bioactivity studies. *Heliyon* **5**, e01716 (2019).
113. Webster, T. J., Massa-schlueter, E. A., Smith, J. L. & Slamovich, E. B. Osteoblast response to hydroxyapatite doped with divalent and trivalent cations. *Biomaterials* **25**, 2111–2121 (2004).
114. Stanić, V. *et al.* Synthesis, structural characterisation and antibacterial activity of Ag+-doped fluorapatite nanomaterials prepared by neutralization method. *Appl. Surf. Sci.* **337**, 72–80 (2015).
115. Zamiri, R., Singh, B. K., Dutta, D., Reblo, A. & Ferreira, J. M. F. Electrical properties of

- Ag-doped ZnO nano-plates synthesized via wet chemical precipitation method. *Ceram. Int.* **40**, 4471–4477 (2014).
116. Kaygili, O. *et al.* Structural and Dielectrical Properties of Ag- and Ba-Substituted Hydroxyapatites. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **24**, 1001–1008 (2014).
 117. Legeros, R. Z. & Legeros, J. P. Chapter 9 DENSE HYDROXYAPATITE. in *An Introduction to Bioceramics* 139–180 (1971). doi:https://doi.org/10.1142/9789814317351_0009.
 118. Miyaji, F., Kono, Y. & Suyama, Y. Formation and structure of zinc-substituted calcium hydroxyapatite. *Mater. Res. Bull.* **40**, 209–220 (2005).
 119. Jadalannagari, S. & Deshmukh, K. Antimicrobial activity of hemocompatible silver doped hydroxyapatite nanoparticles synthesized by modified sol – gel technique. *Appl Nanosci* **4**, 133–141 (2014).
 120. Lee, H., Zhang, X., Hwang, J. & Park, J. Morphological Influence of Solution-Processed Zinc Oxide Films on Electrical Characteristics of Thin-Film Transistors. *Materials (Basel)*. **9**, 851 (2016).
 121. Chaudhary, R. *et al.* Electrochemical Reconstruction of Zn_{0.3}Co_{2.7}(PO₄)₂·4H₂O for Enhanced Water Oxidation Performance. *ACS Appl. Energy Mater.* **3**, (2020).
 122. Battistoni, C. *et al.* Surface characterization of biocompatible hydroxyapatite coatings. *Surf. Interface Anal.* **29**, 773–781 (2000).
 123. Aravindan, S., VENKATACHALAM, R. & Nallaiyan, R. Influence of Ag₂O on crystallisation and structural modifications of phosphate glasses. *Phase Transitions - PHASE TRANSIT* **85**, 1–20 (2012).
 124. He, G. *et al.* Facile controlled synthesis of Ag₃PO₄ with various morphologies for enhanced photocatalytic oxygen evolution from water splitting. *RSC Adv.* **9**, 18222–18231 (2019).
 125. Negrila, C. C., Predoi, M. V, Iconaru, S. L. & Predoi, D. Development of Zinc-Doped Hydroxyapatite by Sol-Gel Method for Medical Applications. *Molecules* vol. 23 2986

- (2018).
126. Wang, L., Di, C., Li, T., Chun, Y. & Xu, Q. Catalysis Science & Technology calcium oxide / carbon solid base materials. *Catal. Sci. Technol.* (2015) doi:10.1039/C5CY01028D.
 127. Achour, A. *et al.* Synthesis and characterization of porous CaCO₃ micro/nano-particles. *Eur. Phys. J. PLUS* **132**, 1–9 (2017).
 128. Gomes, G. *et al.* Nd:YAG (532 nm) pulsed laser deposition produces crystalline hydroxyapatite thin coatings at room temperature. *Surf. Coatings Technol.* **329**, (2017).
 129. Ziashahabi, A., Prato, M., Dang, Z., Poursalehi, R. & Naseri, N. The effect of silver oxidation on the photocatalytic activity of Ag/ZnO hybrid plasmonic/metal-oxide nanostructures under visible light and in the dark. *Sci. Rep.* **9**, 11839 (2019).
 130. Li, W. *et al.* Facile synthesis of cubic Ag / Ag₂O composites and its shape- dependent photo-catalytic activity examination. *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* **30**, 5366–5374 (2019).
 131. Aranda, A. *et al.* Influence of silver electrochemically deposited onto zinc oxide seed nanoparticles on the photoelectrochemical performance of zinc oxide nanorod films. *Nanomater. Nanotechnol.* **9**, 1–9 (2019).
 132. Lu, X. *et al.* Hexagonal hydroxyapatite formation on TiO₂ nanotubes under urea. *CrystEngComm* **13**, 3741–3749 (2011).
 133. Abdelwahab, M. A. *et al.* Thermal, mechanical and morphological characterization of plasticized PLA–PHB blends. *Polym. Degrad. Stab.* **97**, 1822–1828 (2012).
 134. Furukawa, T. *et al.* Structure , Dispersibility , and Crystallinity of Poly (hydroxybutyrate)/ Poly (L -lactic acid) Blends Studied by FT-IR Microspectroscopy and Differential Scanning Calorimetry. *Macromolecules* **38**, 6445–6454 (2005).
 135. Zhang, Lianlai, X. C. and D. X. Miscibility, crystallization and morphology of poly(B-hydroxybutyrate)/poly(d,l-lactide blends. *Polymer (Guildf)*. **37**, 235–241 (1996).

136. Aydemir, D. & Gardner, D. J. Biopolymer blends of polyhydroxybutyrate and polylactic acid reinforced with cellulose nanofibrils. *Carbohydr. Polym.* **250**, 116867 (2020).
137. Aloyaydi, B., Sivasankaran, S. & Mustafa, A. Investigation of infill-patterns on mechanical response of 3D printed. *Polym. Test.* **87**, 106557 (2020).

11. ANEXOS

Anexo 1. Experimentos preliminares realizados para la síntesis de nanohíbridos de HAp-Ag-ZnO.

N°	Concentraciones			
	HAp/MeOH	NaOH [10 mM]	AgNO ₃ [5mM]	Zn(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O [10 mM]
	mg/mL	mL	mL	mL
1	50/25	20	15	15
2		40	30	30
3		60	45	45

Anexo 2. Experimentos a escala realizados para la síntesis de nanohíbridos de HAp-Ag-ZnO, de acuerdo al Anexo 1.

N°	Concentraciones			
	HAp/MeOH	NaOH [10 mM]	AgNO ₃ [5mM]	Zn(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O [10 mM]
	mg/mL	mL	mL	mL
1	250/125	100	75	75
2		200	150	150
3		300	225	225