

Cinvestav

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN NANOCIENCIAS Y
NANOTECNOLOGÍA**

**“Elaboración de Compositos electrohilados de Nanotubos de
Carbono e Hidroxiapatita usando como Matriz Polimérica el Ácido
Poliláctico para Regeneración Ósea”**

T E S I S

Que presenta

M.C. RAMÓN ROMÁN DOVAL

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Directores de la Tesis:

**DR. MAURICIO ORTEGA LÓPEZ, SEES, Depto. De INGENIERIA
ELECTRICA, CINVESTAV- IPN**

**DR. JUAN MORALES CORONA, Grupo de POLIMEROS, Depto. De FISICA,
UAM-IZTAPALAPA**

Ciudad de México

Noviembre del 2017

Dedicatoria

Primeramente quiero dar gracias a dios por brindarme la vida y la oportunidad de seguir preparándome y superándome como persona.

A mi esposa Erika Mayte González por haber apoyado a continuar con mi doctorado, dándome palabras de aliento y amor para seguir adelante y al igual que a mis hijos Frida Aimelek y Ryan Abraham por la paciencia y el tiempo que no les dedique por estar trabajando en el proyecto. Por todo esto y más gracias, y gracias por creer en mí.

A mis padres y hermanos que siempre estuvieron pendientes de cómo iba avanzando en mi proyecto y preocupándose por mi salud. Gracias por estar ahí y brindar su apoyo incondicional como solo la familia sabe dar.

MIL GRACIAS Y BENDICIONES A TODOS.

Agradecimientos

Quiero extender mis agradecimientos y dar gracias a mis asesores Mauricio Ortega y Juan Morales por orientarme y apoyarme durante mi estancia doctoral.

Se agradece al CONACYT por otorgar la beca para realizar mis estudios de Doctorado en el programa de Nanociencias y Nanotecnología, Cinvestav, Zacatenco.

Agradezco al Dr. J. Gerardo Cabañas Moreno coordinador del programa de Nanociencias y Nanotecnología por el apoyo prestado durante la estancia doctoral.

Además, se agradece al Dr. Jaime Santoyo y Técnico Ángel Guillen Cervantes por su apoyo en microscopia y a LANE, Cinvestav por el apoyo prestado para la caracterización de las muestras del trabajo de tesis.

Agradezco a la Dra. Andrea De Vizcaya Ruiz, Biol. Marisela Uribe Ramírez, Vicente Escamilla Rivera, Aidé Solorio Rodríguez y a su equipo de trabajo del departamento de Toxicología (Laboratorio-26), Cinvestav por apoyar a la realización de las pruebas de toxicidad.

Se agradece al Dr. Roberto Olayo y a los laboratorios de la UAM-I del departamento de Polímeros por los equipos prestados para la realización del trabajo de tesis.

A mis amigos Manuel Valdez, Alejandro Gómez, Rosario Herrera, Heriberto Cruz y compañeros que me brindaron su apoyo, por todo gracias.

RESUMEN

En este trabajo se hace énfasis en la elaboración de andamios con orientación a los injertos óseos. Los andamios realizados fueron fabricados a base de un polímero biodegradable que lleva por nombre Acido Poli láctico (PLA), este polímero fue usado como matriz polimérica para la incorporación de hidroxiapatita (HA) y nanotubos de carbono multipared (MWCNTs).

Los andamios obtenidos tienen una morfología porosa similar al hueso esponjoso, visto a través de HRSEM. Las técnicas de caracterización FTIR y Raman-Confocal mostraron una interacción química entre la molécula del PLA con el ion de calcio de la hidroxiapatita el cual está afectando la morfología de las fibras. Esta interacción se pudo observar en los espectros Raman presentados en este trabajo donde un pico proveniente de la molécula del PLA (873 cm^{-1} C-COO estiramiento) cambia de intensidad cuando la HA es incorporada. El análisis de Rayos-x muestra la fase cristalina de HA/MWCNTs y la fase amorfa de las fibras. Se hizo un análisis termogravimétrico y de calorimetría diferencial de barrido (DSC / TGA) para saber la transición vítrea de los andamios, esta fue de alrededor de $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se realizaron varias pruebas donde se evaluaron la viabilidad de la cantidad de hidroxiapatita y nanotubos de carbono en la matriz polimérica, esto con el objetivo de optimizar las propiedades mecánicas de los andamios sin que estos causen una citotoxicidad fuera del rango aceptable para aplicaciones biológicas. Los andamios que se sometieron para la prueba de evaluación fueron sometidos a tracción mostrando un módulo de Young de 50 a 85 MPa. Una vez hecha la optimización el módulo de Young obtenido fue de 19.99 MPa. Por otro lado, el ensayo de MTS in-vitro se llevó a cabo usando células hFOB 1.19 (ATCC CRL-11372) en tiempos de 24 y 48 hrs. Los resultados mostraron que la viabilidad de los materiales (HA y MWCNTs) arriba del 25% en peso se reduce. Con este resultado se sugirió usar un máximo de 200 mg de HA con una relación en peso de 19:1 con respecto a los MWCNTs, y los resultados obtenidos mostraron una diferencia significativa en el metabolismo celular entre los andamios de PLA, PLA-HA y PLA-HA/MWCNTs, lo que revela que la incorporación de HA y MWCNTs proporcionan una superficie más adecuada para la osteointegración.

ABSTRACT

In this work, we focus on the development scaffolding to bone grafts. Scaffolds were manufactured from a biodegradable polymer that is called Poly Lactic Acid (PLA); this polymer was used as polymer matrix for incorporating hydroxyapatite (HA) and multiwall carbon nanotubes (MWCNTs).

The scaffolds have morphology similar a porous that of a spongy bone, corresponding to HRSEM. FTIR and Raman were used to observe functional groups and how the materials are interacting with each other. The important chemical interaction that was observed is the interaction of PLA molecule with the calcium ion from the HA which affects the morphology of PLA fibers. This interaction is observable in the Raman spectrum of PLA where there is a change of intensity of the peak 873 cm^{-1} (C–COO stretching) when the HA is incorporated. XRD shows the crystalline phase of HA/MWCNTs and the amorphous phase of the fibers. Differential scanning calorimetry/Thermogravimetric analysis (DSC/TGA) was made to know the glass transition of the scaffolds, this was about 65 C. Many tests were made where the viability of amount of hydroxyapatite and multi-wall carbon nanotubes was evaluated in the polymeric matrix. This was made for optimized the mechanical properties of scaffolds with an acceptable cytotoxicity for biological applications. The scaffolds subjected under tension showed a Young module of 50-85 MPa. One time the optimized was done, the Young module was of 19.99 MPa. On the other hand, the MTS in-vitro assays using the hFOB 1.19 (ATCC CRL-11372) cells, for cell exposure time of 24 and 48 h, revealed that viability reduces for HA/MWCNT's ratio values over 25 wt %. Our results suggest that a maximum HA/MWCNT's ratio of 19:1 could be acceptable for cell proliferation while maintaining HA at 200 mg, and the results showed a significant difference in cell metabolism between the PLA, PLA-HA and PLA-HA/MWCNTs scaffolds, revealing that the incorporation of HA and MWCNTs provide a more suitable surface for osseointegration.

INDICE

ÍNDICES DE FIGURAS Y TABLAS	2
INTRODUCCIÓN	6
1. - ANTECEDENTES	7
1.1.- Cerámicas	12
1.2.- Ingeniería de tejidos óseos	13
2. - ESTADO DEL ARTE DE LOS MATERIALES QUE CONFORMAN LOS ANDAMIOS PARA EL IMPLANTE ÓSEO	16
2.1.- Estado del arte del Ácido poli láctico (PLA).....	16
2.1.1.- síntesis y estructura química.....	16
2.1.2.- Propiedades físicas y químicas.....	18
2.1.3.- Aplicaciones en la industria médica y farmacéutica.	18
2.2. - Estado del arte de los nanotubos de carbono.....	19
2.2.1. - Carbono (C) $1S^22S^22P^2$	19
2.2.2.-Nanotubos de Carbono.	20
2.2.3.-Nanotubos de Carbono multicapa (MWCNTs).....	22
2.2.4.- Síntesis de Nanotubos de Carbono.	23
2.2.5.- Purificación y Funcionalización de los MWCNTs.....	23
2.3.- Estado del arte de la Hidroxiapatita.....	24
2.3.1.- Propiedades fisicoquímicas de la Hidroxiapatita.....	25
2.3.2.- Métodos de obtención de la hidroxiapatita.....	26
3.- PROCESO DE ELECTROHILADO.....	28
4.- JUSTIFICACIÓN	31
5.- OBJETIVOS	32

6.- METODOLOGÍA.....	33
6.1. – Materiales.....	33
6.2. – Preparación de los MWCNTs.....	33
6.3.- Preparación de la solución para el electrohilado.....	34
6.4.- Proceso de electrohilado de la solución polimérica con HA/MWCNTs.	34
6.5.- Caracterización del composito electrohilado.....	36
6.5.1. – Caracterización fisicoquímica.....	36
6.5.2.- Análisis biológico.....	40
6.5.2.1. -Métodos de citotoxicidad.....	40
7.- RESULTADOS Y DISCUSIONES	42
7.1. – Caracterización de los MWCNTs.....	42
7.1.1. -Morfología y análisis elemental de los MWCNTs.....	42
7.1.2. - Análisis FETEM.....	43
FASE 1 del Proyecto.....	44
7.2.- Evaluación de las nanoparticulas de hidroxiapatita y nanotubos de carbono de multicapa en la matriz electrohilada de PLA.....	44
7.2.1.- Caracterización del composito electrohilado por HRSEM.....	45
7.2.2. - Caracterización del composito electrohilado por Rayos-X.....	46
7.2.3. -Caracterización del composito electrohilado por FTIR.....	48
7.2.4.- Caracterización del composito electrohilado por RAMAN.....	49
7.2.5. - Caracterización del composito electrohilado por DSC/TGA.....	52
7.2.6. – Pruebas Mecánicas de Tensión.....	56
7.2.7. – Viabilidad celular del composito electrohilado usando la línea celular hFOB 1.19 (ATCC CRL-11372).....	60
FASE 2 DEL PROYECTO.....	63

8.- OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS Y SU EFECTO EN LOS RESULTADOS FINALES.	63
8.1.- Resultados HRSEM de los andamios de PLA-HA/MWCNTs, segunda fase.	63
8.2.- Análisis FTIR, segunda fase.	65
8.3.- Espectroscopia Raman, segunda fase.	66
8.4.- Ensayos de tracción, segunda fase.	67
8.5.- Ensayo citotóxico, segunda fase.	68
9.- CONCLUSIONES	71
10.- PERSPECTIVAS.....	72
11.- BIBLIOGRAFIA	73

ÍNDICES DE FIGURAS Y TABLAS

Fig. 1.-incidencia promedio de las fracturas de cadera en hombres y mujeres mexicanos (2000-2006).....	8
Fig. 2.- Cantidad de fracturas de cadera estimada para hombre y mujeres mexicanos de 2005 hasta 2050.....	9
Fig. 3.- Tipos de fracturas comunes en México.....	9
Fig. 4.- Ácido Láctico.....	16
Fig. 5.- Polimerización del PLA a partir del LA.....	18
Fig. 6.- El carbono (C) tiene cuatro electrones de enlace en su envoltura de valencia, así como los no metales, el C necesita ocho electrones para completar su envoltura de valencia. De ésta manera el C forma cuatro enlaces con otros elementos. Los electrones del número cuántico 2 reorganizan su energía formando orbitales (4) “orbitales híbridos”; un solo átomo de C puede mantener unida una molécula, o hilera de átomos entrelazados por C como una proteína, pero otras moléculas complejas como polímeros orgánicos.....	20
Fig. 7.- (a) Estructura del grafito cristalino, donde se observa las capas de grafito 2D hexagonales. (b) Estructura cristalina del diamante, donde se observa la estructura densamente empaquetada, la cual provee de la dureza característica. (c) Estructura cristalina del fullereno C60, donde se observan 12 anillos pentagonales y 20 hexagonales. (d) Estructura cristalina del Nanotubo de carbono, donde se observan las semiestructuras de fullerenos en sus extremos [15].	20
Fig. 8.-Tipos de estructuras de los nanotubos de carbono.....	21
Fig. 9.-Nanotubos multicapa formados por nanotubos de pared simple, las componentes del vector de quiralidad de los SWCNT del interior al exterior de los MWCNT son (a) quiralidad (7,0) (8,6) (b) quiralidad (13,0) (14,6) (c) quiralidad (7,0) (8,6) (8,13) [15, 19].	22
Fig. 10.-Estructura hidroxiapatita sintética (HA) con fórmula química [Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂] [22].....	25
Fig. 11.-Obsérvese a la Izquierda un corte histológico de un hueso esponjoso humano y a la derecha un corte de Hidroxiapatita HAP-200, nótese la similitud de su estructura física y de su porosidad [23].....	25

Fig. 12.- Proceso de electrohilado.....	29
Fig. 13.-Equipo Standard Unit, NEU-01 para la elaboración del composito electrohilado.....	36
Fig. 14.-Procedimiento en Wolfram Mathematica 10 para la generación de resultados de las pruebas de tensión.....	38
Fig. 15.-Probetas y equipo de tracción para las pruebas de tensión.....	39
Fig. 16.-Imagen SEM de MWCNTs producido por CVD.	42
Fig. 17.-Imágenes FETEM de diferentes MWCNTs a los 20 y 50 nm, donde se pueden ver los diámetros interno y externo de los MWCNTs.....	43
Fig. 18.-Difracción de electrones por área seleccionada de MWCNTs.....	43
Fig. 19.- Imagen SEM de la matriz de PLA electrohilada con hidroxiapatita-MWCNTs.....	45
Fig. 20.-Histograma de la distribución del diámetro de las fibras electrohiladas de PLA + HA/MWCNTs.	45
Fig. 21.-Análisis elemental de las fibras electrohiladas de PLA + HA/MWCNTs.	46
Fig. 22.-Rayos-X, espectros de los compositos de PLA, PLA-HA, PLA + HA-MWCNTs.....	47
Fig. 23.- Espectro FTIR-ATR del composito electrohilado de PLA + HA/MWCNTs.	48
Fig. 24.- Imagen obtenida por Raman-Confocal del composito de PLA+HA-MWCNTs.....	49
Fig. 25.- Espectros Raman; A) Espectro de la HA obtenido de la región brillante de las fibras del composito, B) Espectro del composito de PLA que fue hecho de manera independiente, C) espectro de los MWCNTs obtenidos de la zona oscura de las fibras del composito, y D) espectro por área del composito de PLA + HA-MWCNTs el cual indica que no hay interacción química entre el PLA y HA-MWCNTs.	51
Fig. 26.- Análisis DSC-TGA del andamio de PLA.....	52
Fig. 27.-Análisis DSC del andamio de PLA donde se observa la transición vítrea.....	53
Fig. 28.-Análisis DSC/TGA de los compositos de PLA+HA y PLA+HA-MWCNTs.....	54
Fig. 29.- Análisis DSC del composito de PLA+HA.	55
Fig. 30.-Análisis DSC del composito de PLA+HA-MWCNTs.....	56
Fig. 31.-Isotermas de los compositos analizados por BET.	58

Fig. 32.-Grafica de tensión-deformación de diferentes compositos electrohilados.....	59
Fig. 33.-Ensayo MTS a las 24 h y 48 h para observar la viabilidad celular de las células hFOB en el extracto de PLA + HA/MWCNTs, y un estudio complementario de LDH para observar el comportamiento celular a las 24 h.....	61
Fig. 34.-a) Imagen HRSEM de andamios de PLA-HA/MWCNTs que muestran la morfología de las fibras de la muestra. b) Histograma de los diámetros de las fibras (0.407 $\mu\text{m} \pm 0.006$).	64
Fig. 35.-Rugosidad aritmética de los andamios de PLA-HA/MWCNTs: a) PLA = 7.376 \pm 0.36, b) PLA-HA= 13.994 \pm 0.92 and c) PLA-HA/MWCNTs = 13.802 \pm 0.69 μm	64
Fig. 36.- Espectro FTIR de a) PLA, b) PLA-HA and PLA-HA-MWCNTs.	65
Fig. 37.-Una forma esquemática de la posible interacción del ión-dipolo de la molécula PLA con el ion calcio.	66
Fig. 38.-Raman de andamios de a) PLA, b) PLA-HA, y c) PLA-HA/MWCNT. La Figura 35d muestra las bandas de Raman G y D de MWCNTs, que aparecieron como las bandas débiles en el espectro Raman de HA/MWCNT (indicado por los círculos en la figura 7c).	66
Fig. 39.-Graficas de esfuerzo-deformación de los andamios de PLA, PLA-HA, and PLA-HA/MWCNTs.....	68
Fig. 40.- Actividad mitocondrial y la viabilidad celular de las células hFOB evaluadas por el método de reducción MTS y MTT respectivamente en andamios de PLA, PLA-HA y PLA-HA/MWCNTs.	69

TABLAS

Tabla 1.- Lugar de fractura y método de fijación en 117 casos.	10
Tabla 2.- Tipo de fijación y la tasa de fracaso de los implantes en 117 fracturas.....	10
Tabla 3.-Propiedades físicas de la hidroxiapatita [24]......	26
Tabla 4.- Cantidad de reactivos para la síntesis de hidroxiapatita [22].	27
Tabla 5. – Parámetros del proceso de electrohilado.....	35

Tabla 6.- Condiciones de fabricación los electrohilados para la obtención del andamio.	44
Tabla 7.-Resultados DSC de los diferentes materiales analizados.	55
Tabla 8.-Datos obtenidos del análisis BET indicando el volumen total de poro de los compositos electrohilados.	57
Tabla 9.-Tabla de resultados del equipo BET para la obtención del volumen porcentual de las muestras del composito.	58
Tabla 10.-Módulo de Young del andamio de PLA y los compositos de PLA + HA/MWCNTs. La muestra M-1 representa una cantidad de 500 mg de HA y 166 mg de MWCNT. La muestra M-2 representa una cantidad de 750 mg de HA y 187 mg de MWCNT.	60
Tabla 11.-Parámetros del proceso de electrospinning para obtener morfología que beneficie la biointegración.	63
Tabla 12.-Esfuerzo-Deformación de los andamios de PLA, PLA-HA y PLA-HA/MWCNTs.	67

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es un campo de la ciencia aplicada en la comprensión y el dominio de las propiedades de la materia a nivel nanométrico. Se enfoca en los campos de la ciencia y técnicas en los que se estudian, obtienen y manipulan de manera controlada los materiales, sustancias y dispositivos a escala nanométrica. Un nanómetro es 1×10^{-9} partes de un metro.

Una de las áreas de mayor influencia de la nanotecnología es la nanomedicina, que permite curar enfermedades desde el propio cuerpo actuando sobre las células o moléculas. Puesto que las enfermedades se desarrollan generalmente a microescala y a nanoescala, la mejor forma de combatir las es utilizar nanomáquinas artificiales que ejecuten con mayor rapidez y eficacia, la misma función que el organismo cuando combate a los virus utilizando anticuerpos y células destructoras.

Entre los materiales más estudiados se encuentran los nanotubos de carbono, estos pueden ser considerados como materiales de una dimensión, ideales como agentes de refuerzo y estructuras conductoras de la electricidad entre otras aplicaciones. En la nanomedicina estos son estudiados por su enorme potencial debido a sus propiedades mecánicas, eléctricas y de biocompatibilidad una vez funcionalizados.

Una de las áreas en la que incursiona la nanomedicina es la ingeniería de tejidos, esta es una disciplina relativamente nueva con un campo de investigación y desarrollo amplio que involucra los conocimientos de diversas áreas, tales como: bioingeniería, ciencias de la vida, fisicoquímica, biología y ciencia de los materiales. La ingeniería de tejidos usa los conocimientos de las ciencias mencionadas para mejorar o reemplazar funciones biológicas. Una parte fundamental en la ingeniería de tejidos es el andamio o soporte de las células, los cuales generalmente son polímeros biodegradables. Este trabajo consiste en la elaboración de andamios poliméricos generados por la técnica de electrohilado, teniendo como matriz polimérica ácido poli láctico (PLA) con hidroxiapatita y nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) para darles una mejor biocompatibilidad y mejorar las propiedades de tensión.

1. - ANTECEDENTES

La nanotecnología es el desarrollo de dispositivos fabricados a escalas atómicas, moleculares y macromoleculares, en rango nanométrico. Estas nanopartículas tienen importantes aplicaciones en el campo médico, especialmente en las áreas de diagnóstico y terapia. Ya vemos avances en el desarrollo de dispositivos con tecnología nano para la detección temprana de enfermedades infecciosas e incluso de cáncer. Estos avances también presentan enormes beneficios en los campos terapéuticos para el desarrollo de medicamentos con metodologías que permiten efectos específicos en el lugar deseado [1].

En el campo de los polímeros, es posible el desarrollo de superficies de nanofibras con integridad estructural que pueden ser diseñadas para demostrar características bioquímicas específicas. Lo que podría llevar a que estos tejidos de nanofibras con química de superficie específica, se puedan adherir a células para controlar las funciones de éstas. Las características de estos tejidos (mallas) de nanofibras demuestran una morfología y química similar a la matriz extracelular del tejido natural (amplio rango de distribución de diámetro de poros, alta porosidad, propiedades mecánicas efectivas y propiedades bioquímicas específicas), presentando la posibilidad de aprovechar polímeros y biopolímeros en aplicaciones como membranas multifuncionales, elementos estructurales biomédicos (el andamiaje utilizado en la ingeniería de tejidos, recubrimientos para heridas, órganos artificiales, reparación vascular, etc.), textiles especializados y filtros para partículas sub-micra, entre muchas más aplicaciones de nanofibras poliméricas en el campo de la biomedicina [1].

El hueso generalmente tiene la capacidad de regenerarse completamente, pero requiere un espacio muy pequeño de fractura o algún tipo de andamio para hacerlo. Los injertos óseos pueden ser autólogos (hueso de la cosecha del propio cuerpo del paciente, a menudo de la cresta ilíaca), aloinjerto (hueso de cadáver por lo general obtenido de un banco de huesos), o sintética (a menudo de sustancias de hidroxiapatita u otros de origen natural y biocompatible) con similares propiedades

mecánicas al hueso. La mayoría de los injertos óseos se espera que se reabsorban y se sustituyan el hueso natural cura con el tiempo de unos meses [2].

Existen datos bibliográficos con respecto a la cantidad de personas con diagnósticos de enfermedades óseas detectadas en México. Los tipos de lesiones reportados estadísticamente son fracturas de vertebra, pelvis, húmero, muñeca y cadera. Para las fracturas de cadera la incidencia promedio para hombres y mujeres mexicanas de 50 años del 2000-2006 se observa en la figura 1. Los datos fueron obtenidos del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y secretaria de salud (SS), donde se indica que aproximadamente se destinan 200 implantes óseos por estado Mexicano al mes.

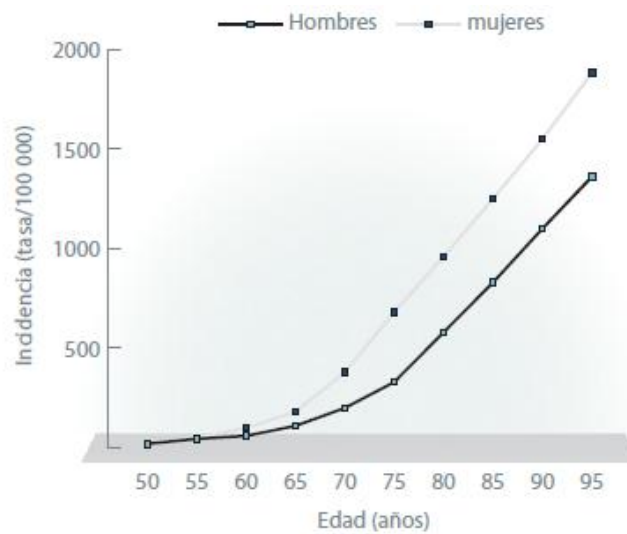


Fig. 1.-incidencia promedio de las fracturas de cadera en hombres y mujeres mexicanos (2000-2006). El índice de cantidad de fracturas de cadera estimadas para hombre y mujeres mexicanos de 2005 hasta 2050 se muestra en la figura 2.

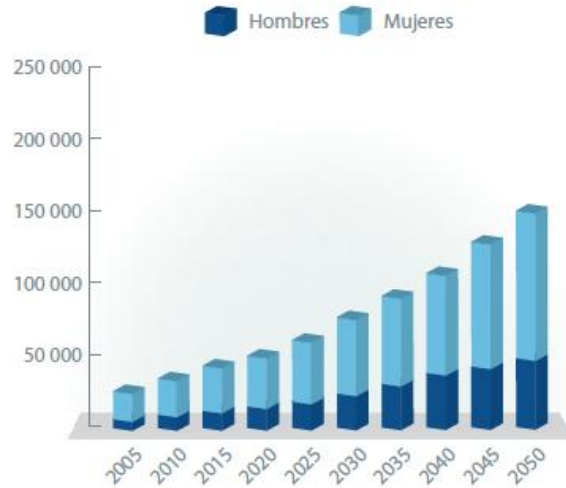


Fig. 2.- Cantidad de fracturas de cadera estimada para hombre y mujeres mexicanos de 2005 hasta 2050.

De manera general se reporta la frecuencia de otras fracturas osteoporóticas principales en hombres y mujeres, como se reporta en la figura 3.



Fig. 3.- Tipos de fracturas comunes en México.

En un estudio se operaron 117 extremidades en 105 pacientes donde el fémur tiene el más alto número fijación interna; en la tabla 1 se observa las fracturas comunes y el método de fijación. Así mismo se detectaron algunos implantes fallidos como los indicado en la tabla 2.

Tabla 1.- Lugar de fractura y método de fijación en 117 casos.

Hueso	Placa metálica	Clavos	Otros métodos	Total
Fémur	28	32	1	61(52.1%)
Tibia	13	15	3	31(26.5%)
Húmero	5	4	1	10(8.6%)
Cubito	4	0	4	8(6.8%)
Radio	2	4	1	7(6%)
Total	52 (44.4%)	55(47%)	10(8.6%)	117(100%)

Tabla 2.- Tipo de fijación y la tasa de fracaso de los implantes en 117 fracturas.

Tipo de fijación	Total de implantes	Implantes fallidos
Placa metálica	52	3
Clavos	55	1
Otros	10	0
Total	117	4

En la interface injerto óseo-huésped existe una compleja relación donde múltiples factores pueden intervenir en la correcta incorporación del injerto; dentro de ellos destacan la zona de implantación, vascularización del injerto, interface hueso-huésped, inmunogenética entre donante y huésped, técnicas de conservación, factores locales y sistémicos diversos (hormonales, uso de medicamentos, calidad ósea, enfermedades crónicodegenerativas) y las propiedades mecánicas (que dependen del tamaño, la forma y tipo de injerto utilizado). De manera inicial se debe determinar

cuál es la función que debe cumplir el injerto a utilizar [3]. Los injertos tienen diferentes propiedades: [3]

- *Osteogénesis: síntesis* de hueso nuevo a partir de células derivadas del injerto o del huésped. Requiere células capaces de generar hueso.
- *Osteoinducción*: proceso por el que las células madre mesenquimatosas son reclutadas en la zona receptora y a su alrededor para diferenciarse en condroblastos y osteoblastos. La diferenciación y el reclutamiento son modulados por factores de crecimiento derivados de la matriz del injerto, cuya actividad es estimulada al extraer el mineral óseo. Entre los factores de crecimiento se encuentran las proteínas morfogenéticas óseas, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, interleucinas, factor de crecimiento fibroblástico, factores de crecimiento pseudoinsulínico, factores estimuladores de las colonias de granulocitos y factores estimuladores de las colonias granulocitos- macrófagos. También se liberan factores angiogénicos, como el factor de crecimiento vascular derivado del endotelio y la angiogenina.
- *Osteoconducción*: proceso en el que tiene lugar un crecimiento tridimensional de capilares, tejido perivascular y células madre mesenquimatosas, desde la zona receptora del huésped hacia el injerto. Este andamiaje permite la formación de hueso nuevo mediante un patrón previsible, determinado por la biología del injerto y el entorno mecánico de la interface huésped-injerto.

De manera ideal un injerto óseo debe tener estas tres propiedades, además de ser biocompatible y proporcionar estabilidad biomecánica. Criterios para que un injerto se considere ideal (según Block y Kent) [3]:

1. Tener capacidad para producir hueso por proliferación celular de osteoblastos viables trasplanta dos o por osteoconducción de células a lo largo de la superficie del injerto.
2. Poseer la facultad de producir hueso por osteoinducción de las células mesenquimatosas recogidas en el injerto.
3. Remodelación del hueso inicialmente formado en hueso laminar maduro.

4. Mantenimiento del hueso maduro a través del tiempo sin que la función cause perdida del mismo.
5. Permitir la estabilidad del implante cuando es colocado simultáneamente con el injerto.
6. Bajo riesgo de infección
7. Fácil de utilizar
8. Baja antigenicidad
9. Alto nivel de seguridad (infecciones cruzadas).

1.1.- Cerámicas

Los materiales osteoconductivos deben tener una porosidad que permita la vascularización y provea un área de adherencia a las células osteogénicas. El tamaño del poro óptimo para que esto ocurra es entre 100 y 500 μm , con un volumen total de poros de 75 a 80 %; además, los compuestos deben ser no inmunogénicos y el hueso debe tener una capacidad alta de adherencia a los mismos [4].

La hidroxiapatita y los compuestos de fosfato cálcico son los materiales más utilizados como materiales osteoconductivos ya que cumplen con estas características, sin embargo, tienen propiedades biomecánicas pobres con baja capacidad para soportar las sollicitaciones en flexión y compresión, produciendo con facilidad fracturas del material, lo que los imposibilita para realizar reconstrucciones que requieran estas propiedades. Cuando se utilizan estos compuestos, un factor importante a considerar es la tasa de biorreabsorción de las mismas, que generalmente es prolongada y afecta la remodelación ósea en el sitio de colocación; la tasa de biorreabsorción está determinada por la densidad del compuesto y su capacidad para ser revascularizado [4].

El fosfato tricálcico es una cerámica porosa que se convierte de manera parcial en hidroxiapatita una vez implantada en el cuerpo. El fosfato tricálcico es más poroso y

se reabsorbe más rápido que la hidroxiapatita, lo que le da ventaja para favorecer la remodelación ósea, sin embargo, lo hace biomecánicamente más débil a las fuerzas de compresión [4].

La hidroxiapatita coralina es procesada por un intercambiador electrotermal que convierte el fosfato cálcico de coral a hidroxiapatita cristalina, cuyos poros tienen un diámetro entre 200 y 500 μm y su estructura es muy similar a la del hueso esponjoso. Bucholz reportó que el injerto autólogo esponjoso y el cristal de hidroxiapatita tienen un desempeño clínico similar cuando son utilizados para rellenar defectos óseos metafisarios que provocan hundimiento de superficies articulares en las fracturas de platillo tibial. Una contraindicación para utilizar este material en metafisis es la existencia de un defecto articular que permita la migración del material hacia la articulación [4]

Cho y colaboradores reportaron el uso de cajas intersomáticas de PEEK rellenas de calcio bifásico y las comparó con cajas rellenas de injerto autólogo de cresta iliaca en pacientes con espondilosis cervical en los que se realizó descompresión anterior y artrodesis; indicó tasas de unión de 100 % más rápidas en el grupo con injerto autólogo a los cinco meses, contra 100 % a los seis meses en el grupo con de fosfato cálcico, sin embargo, los días de hospitalización, tiempo quirúrgico, sangrado fueron menores en este grupo, además no hubo morbilidad de la toma del injerto, que en el grupo de injerto autólogo fue de 6 %. Concluyeron que el uso de fosfato cálcico es una buena opción como alternativa al injerto autólogo en estos pacientes [5].

1.2.- Ingeniería de tejidos óseos

El tejido óseo es un material natural que mantiene una rigidez y resistencia elevadas con un peso mínimo. Se puede decir que la fase mineral del hueso le confiere su resistencia a la compresión y cizalladura, mientras que el colágeno le proporciona resistencia a la tracción.

El tejido óseo está constituido principalmente por una matriz extracelular mineralizada y células especializadas: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Estas células, aunque constituyen menos del 2% del volumen total de hueso, son las más

importantes en el desarrollo y regeneración del tejido óseo a través de la actividad que llevan a cabo.

En la actualidad la comunidad científica ha desarrollado la utilización de los principios básicos de la biología, química, matemáticas, física e ingeniería, para diseñar materiales y compuestos materiales con células para mejorar o asistir la reconstrucción quirúrgica de los tejidos dañados; las características de los diseños intentan replicar los procesos biológicos básicos de los diferentes tejidos. Estos conceptos se conocen como biomimética y la aplicación de los mismos para la restauración, reparación, reemplazo, montaje o regeneración de la función se conoce como *ingeniería de tejidos* [6].

El hueso formado por ingeniería de tejidos debe contener una matriz extracelular biomimética, células capaces de diferenciarse en osteoblastos y factores de crecimiento que envíen señales que promuevan el reclutamiento celular, la mitogénesis, la diferenciación y la renovación celular. Las matrices que funcionan como andamios para el crecimiento celular deben ser absorbibles y favorecer el anclaje y desarrollo de las células a los mismos, por lo general son polímeros sintéticos que cumplen con estas características y que, además, son fáciles de producir; la cantidad puede ser ilimitada y tiene potencial de degradación que les permite ser sustituidos por la regeneración tisular. En la actualidad no se cuenta todavía con un material sintético que cumpla con todas estas características, se encuentran en desarrollo los estudios que permitirán que estas tecnologías sean aplicables clínicamente; cuando esto suceda, su uso deberá estar basado en estudios que demuestren la seguridad, efectividad y costo-beneficio.

Los materiales poliméricos naturales y sintéticos se han encontrado ser adecuados para aplicaciones en ingeniería de tejidos. Entre ellos, quitina y quitosano han sido ampliamente utilizados en la ingeniería de tejido óseo y también en la administración de fármacos. Se ha tenido un creciente interés en el desarrollo de nuevos materiales poliméricos sintéticos para aplicaciones médicas, su absorción depende del material del que se obtuvo, de la localización específica en el organismo, así como el proceso de curación. Los polímeros sintéticos bioabsorbibles con capacidades de degradarse,

es gracias a reacciones de hidrólisis en condiciones fisiológicas dentro del cuerpo, y eliminarse completamente por vías metabólicas. Los andamios elaborados a partir de este tipo de polímeros ofrecen la posibilidad de crear tejidos completamente naturales dejando de lado los problemas de infección.

Los polímeros de tipo biodegradable se clasifican en cuatro categorías principales, basándose en su origen y producción:

1. Polímeros directamente extraídos de fuentes naturales: Polímeros extraídos de animales o vegetales. Ejemplos; Polisacáridos (almidón y celulosa), proteínas (caseína, gluten).
2. Polímeros producidos por síntesis química clásica, a partir de monómeros biológicos renovables: Ejemplo; PLA, un biopolíester obtenido a partir de monómeros de ácido láctico.
3. Polímeros producidos por microorganismos o bacterias modificadas genéticamente: Los principales polímeros de este grupo son los polihidroxialcanatos (PHAs).
4. Polímeros sintéticos.

Uno de los nanocompuestos de actual interés en el área de la medicina regenerativa es la mezcla de nanotubos de carbono (NTC) e hidroxiapatita (HA). Este nanocompuesto ha sido estudiado para aplicaciones de ingeniería de tejidos óseos.

Los nanotubos y nanofibras de carbono han sido utilizados en la preparación de materiales compuestos estructurales, dispositivos semiconductores, y sensores. Los recientes avances en la modificación química de estas nanoestructuras han conducido a mejorar sus propiedades de biocompatibilidad y solubilidad y ampliando así la gama de materiales que están siendo investigados para aplicaciones biológicas [7].

2. - ESTADO DEL ARTE DE LOS MATERIALES QUE CONFORMAN LOS ANDAMIOS PARA EL IMPLANTE ÓSEO

2.1.- Estado del arte del Ácido poli láctico (PLA).

El ácido poli-láctico [PLA, $(C_3H_4O_2)_n$] es un polímero biodegradable, cuya molécula precursora es el ácido láctico. Es un material altamente versátil, que se hace a partir de recursos renovables al 100%, como son la maíz, la remolacha, el trigo y otros productos ricos en almidón. Este ácido tiene muchas características equivalentes e incluso mejores que muchos plásticos derivados del petróleo, lo que hace que sea eficaz para una gran variedad de usos [8].

2.1.1.- síntesis y estructura química.

El punto de partida para la obtención del PLA es el ácido láctico. El ácido láctico (LA) es el ácido 2-hidroxiopropanoico [8], ver figura 4.

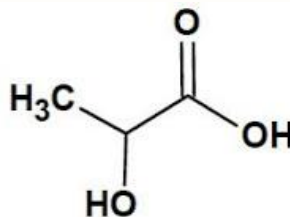


Fig. 4.- Ácido Láctico.

El ácido láctico fue descubierto hacia 1780 por el químico sueco Carl Wilhelm Scheele pero solo fue obtenido a escala industrial hacia 1880 en Estados Unidos por Charles Avery. Sus principales aplicaciones industriales se han basado en sectores como:

- Alimentario (acidulante, saborizante, emulsificante, y conservante)
- Farmacéutico (humectantes y pomadas de uso tópico)
- Cosmético (emulsificante en forma de un éster)
- Plásticos (aditivo, agente de terminado, como disolvente en forma de éster)

Existen dos procesos básicos de obtención de ácido láctico (LA) que consisten en rutas químicas y biotecnológicas. Actualmente la ruta biotecnológica produce más del 95 % del consumo mundial de LA [9, 10].

La ruta biotecnológica consiste en la fermentación de carbohidratos con bacterias y hongos, aunque industrialmente está más extendida la fermentación vía bacteriana. Una de las principales ventajas de las rutas biotecnológicas, es obtención de LA en sus formas enantioméricas, y no como mezcla racémica, tal y como ocurre en la vía química. Sus principales desventajas son: Largos tiempos de fermentación (6 días), bajas productividades (1,35 g/L/h) [9, 10].

La obtención de LA por vía fermentativa discurre básicamente a través de cuatro etapas [9, 10].

- Fermentación
- Hidrólisis del lactato de calcio
- Esterificación y destilación
- Hidrólisis del éster

Los procesos comerciales de obtención se basan en la utilización de bacterias termófilas, de fermentación rápida, y que permiten que el uso de sustratos baratos, con mínima adición de nutrientes. Algunos de los sustratos más empleados en la fermentación láctica son: sacarosa de caña de azúcar, y de remolacha azucarera, lactosa de lactosueros y dextrosa de almidones hidrolizados [9,10].

El ácido poli láctico puede ser sintetizado directamente del ácido láctico, se puede alcanzar un mayor peso molecular si se transforma primero el ácido en un diéster cíclico conocido como polilactida, llevándose la polimerización por apertura de anillo usando por lo general un octoato de estaño como catalizador (a nivel laboratorio se emplea comúnmente cloruro de estaño (II)). Este mecanismo no genera agua adicional, por lo tanto, una amplia gama de pesos moleculares puede obtenerse [11], ver figura 5.

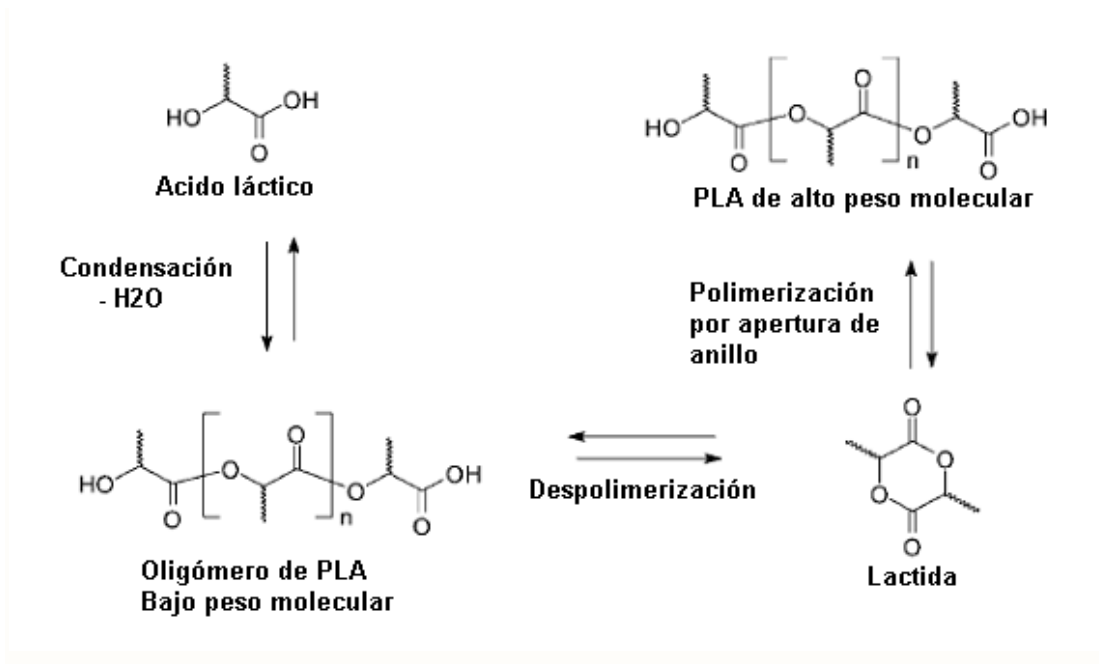


Fig. 5.- Polimerización del PLA a partir del LA.

La polimerización de una mezcla racémica de ácidos L y D-lácticos por lo general conduce a la síntesis de poliácidos-DL-láctico (PDLLA), que es amorfo. El uso de catalizadores estereoespecíficos puede llevar a PLA heterotáctico de mayor cristalinidad. El grado de cristalinidad y otras muchas características importantes, es en gran parte controlado por la relación de enantiómeros D y L que se utiliza, y en menor medida del tipo de catalizador utilizado [11].

2.1.2.- Propiedades físicas y químicas.

Debido a la naturaleza quiral del ácido láctico, pueden obtenerse distintos tipos de polímero: el poliácido-L-láctico (PLLA) es el producto resultante de la polimerización de ácido L, L-láctico (también conocido como L-láctico). El PLLA tiene una cristalinidad de alrededor del 37%, una temperatura de transición vítrea entre 60-65°C, una temperatura de fusión entre 173-178°C y un módulo de elasticidad entre 2,7 a 16 GPa. Sin embargo, el PLA resistente al calor puede soportar temperaturas de 110°C [12].

2.1.3.- Aplicaciones en la industria médica y farmacéutica.

El ácido poliláctico se ha convertido en un material indispensable en la industria médica, donde es utilizado desde hace varios años. El ácido poliláctico es un

polímero biodegradable, bioabsorbible (que significa que puede ser asimilado por nuestro sistema biológico). Sus características y absorbibilidad hacen del PLA un candidato ideal para implantes en el hueso o en el tejido (cirugía ortopédica, oftalmología, ortodoncia, lanzamiento controlado de medicamentos contra el cáncer), y para suturas (cirugía del ojo, cirugía del pecho y abdomen) [13].

Las características mecánicas, farmacéuticas y de bioabsorción son dependientes de parámetros controlables tales como la composición química y el peso molecular del polímero. El margen de tiempo para la bioabsorción del polímero puede ser de tan sólo unas semanas a algunos años y se puede regular por medio de diversas formulaciones y de la adición de radicales en sus cadenas [13].

2.2. - Estado del arte de los nanotubos de carbono.

2.2.1. - Carbón (C) $1S^22S^22P^2$

El carbono es un elemento químico de número atómico 6 y símbolo C. Es sólido a temperatura ambiente. Dependiendo de las condiciones de formación, puede encontrarse en la naturaleza en distintas formas alotrópicas, carbono amorfo y cristalino en forma de grafito o diamante. Es el pilar básico de la química orgánica; se conocen cerca de 10 millones de compuestos de carbono, y forma parte de todos los seres vivos conocidos [14].

El carbono es uno de los elementos que se encuentran con mayor frecuencia en la naturaleza, es capaz de formar diversas combinaciones con otros átomos y con átomos de su mismo tipo gracias a su configuración electrónica y tiene muchas aplicaciones. En la Fig. 6 se muestra la partícula del carbono [14]. Existen varias formas de carbono, incluyendo el grafito, el diamante y las moléculas de hidrocarburos como se muestra en la Figura 7., entre ellas los nanotubos de carbono.

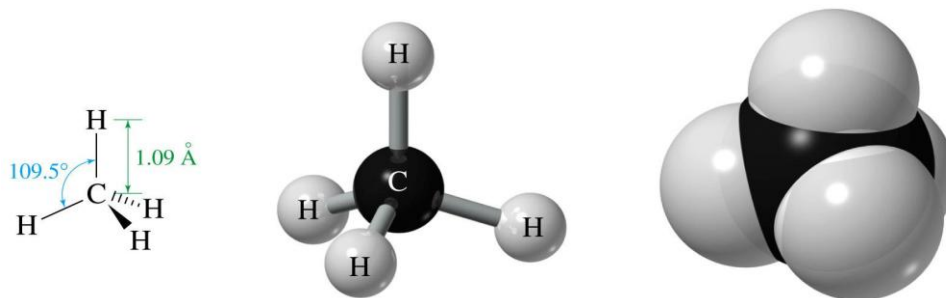


Fig. 6.- El carbono (C) tiene cuatro electrones de enlace en su envoltura de valencia, así como los no metales, el C necesita ocho electrones para completar su envoltura de valencia. De ésta manera el C forma cuatro enlaces con otros elementos. Los electrones del número cuántico 2 reorganizan su energía formando orbitales (4) “orbitales híbridos”; un solo átomo de C puede mantener unida una molécula, o hilera de átomos entrelazados por C como una proteína, pero otras moléculas complejas como polímeros orgánicos.

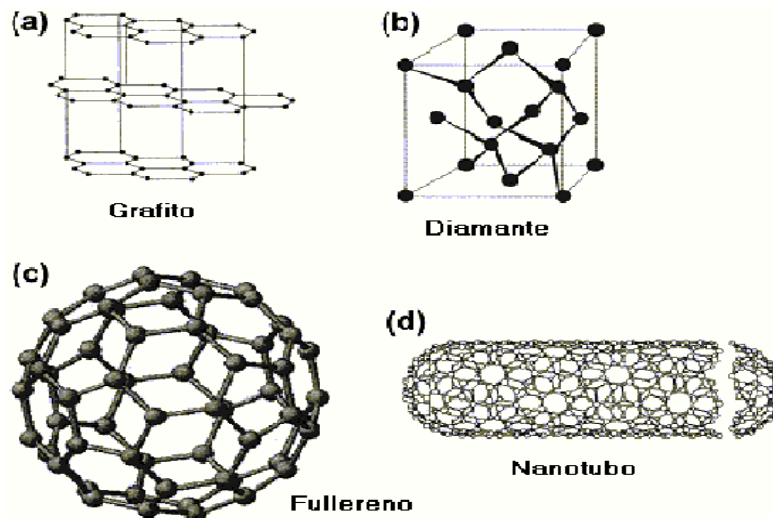


Fig. 7.- (a) Estructura del grafito cristalino, donde se observa las capas de grafito 2D hexagonales. (b) Estructura cristalina del diamante, donde se observa la estructura densamente empaquetada, la cual provee de la dureza característica. (c) Estructura cr cristalina del fullereno C60, donde se observan 12 anillos pentagonales y 20 hexagonales. (d) Estructura cristalina del Nanotubo de carbono, donde se observan las semiestructuras de fullerenos en sus extremos [15].

2.2.2.-Nanotubos de Carbono.

Los nanotubos de carbono son estructuras cilíndricas muy alargadas en comparación con su diámetro, que suele ser solo de algunos cuantos nanómetros, por lo que se consideran estructuras unidimensionales. Su enlace químico es una hibridación del orbital SP_2 muy similar al enlace de los átomos en el grafito. Debido a su configuración molecular presentan extraordinarias propiedades macroscópicas y microscópicas, son elementos muy flexibles y resistentes a las fuerzas mecánicas, en

cuanto a las propiedades eléctricas, soportan una gran densidad de corriente eléctrica y tienen una movilidad eléctrica superior a la de cualquier material conocido ($10\ 000\ \text{cm}^2/\text{Vs}$) lo que los hace atractivos para la fabricación de circuitos que trabajen en el régimen de las altas frecuencias [16]. Los nanotubos se pueden clasificar en dos tipos, nanotubos de pared simple (SWCNT) y nanotubos de multipared (MWCNT), como se muestra en la Figura 8 [15].

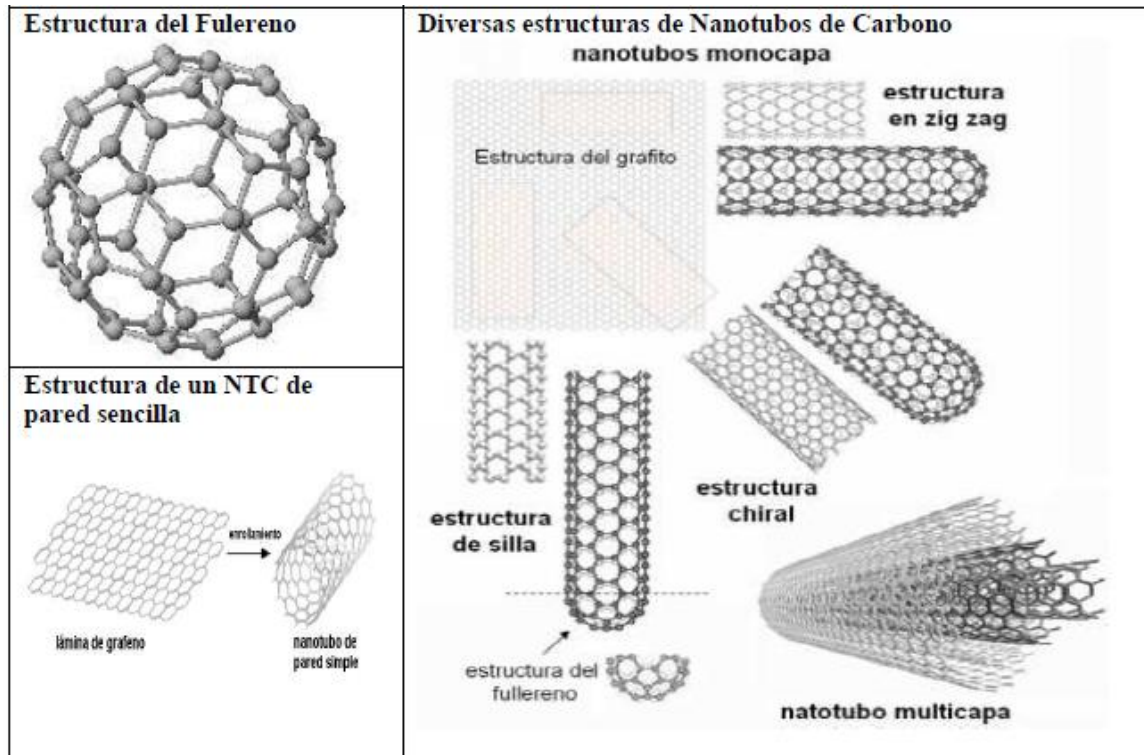


Fig. 8.-Tipos de estructuras de los nanotubos de carbono.

Lijima (1991) fue el primero en reportar la formación de los MWCNT en un reactor Kratschmer-Huffman para sintetizar fullerenos, la obtención de los MWCNT se realizó mediante el procedimiento de descarga de arco produciendo tubos de láminas de grafito que eran coaxiales en un intervalo de 2 hasta 50 nm, con un espacio entre capas de aproximadamente $3.4\ \text{Å}$, diámetros de 4 a 30 nm y longitudes mayores a $1\ \mu\text{m}$. El SWCNT es una lámina de grafito enrollada formando un tubo con un diámetro de 1.4 nm. Este diámetro de tubo es similar al diámetro de los fullerenos (C_{60}). Los MWCNT están constituidos por tubos concéntricos con espacios entre capas de $3.4\ \text{Å}$ y diámetros desde 10 hasta 20 nm. Las longitudes de estos dos tipos

de tubos pueden ser de cientos de micrones. En términos de propiedades mecánicas los CNT son los materiales más resistentes que existen en comparación con otros materiales sintetizados (xerogeles, zeolitas sintéticas, etc.). Un nanotubo tiene un módulo de Young de 1.2 TPa y un límite de resistencia que puede ser de cientos de veces mayor que el del acero, lo cual les permite soportar grandes tensiones antes de la ruptura mecánica [18].

2.2.3.-Nanotubos de Carbono multicapa (MWCNTs).

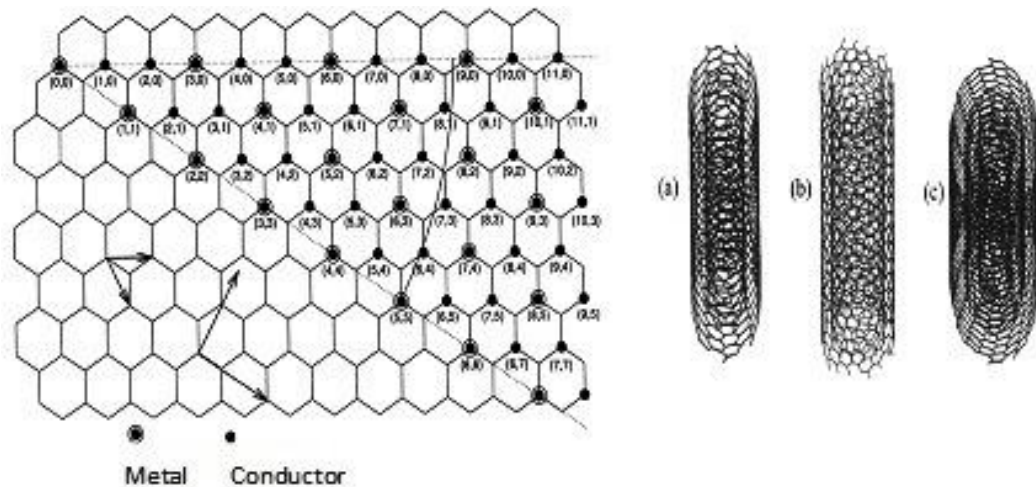


Fig. 9.-Nanotubos multicapa formados por nanotubos de pared simple, las componentes del vector de quiralidad de los SWCNT del interior al exterior de los MWCNT son (a) quiralidad (7,0) (8,6) (b) quiralidad (13,0) (14,6) (c) quiralidad (7,0) (8,6) (8,13) [15, 19].

Los nanotubos de multicapa están de hecho, formados por nanotubos de pared simple acomodados concéntricamente para formar un tubo. Estos pueden ser construidos por múltiples nanotubos con diferentes quiralidades como se muestra en la Figura 9, por lo que su comportamiento eléctrico está en función de los nanotubos de pared simple del cual se constituya el nanotubo de multipared, su aplicación más importante en la electrónica es la de utilizar como superconductores [19].

2.2.4.- Síntesis de Nanotubos de Carbono.

Existen diversos métodos para la síntesis de nanotubos de carbono entre ellas las más usadas son:

- Cámara de descarga de arco eléctrico.
- Ablación por láser.
- Deposición química de vapor (CVD).

2.2.5.- Purificación y Funcionalización de los MWCNTs.

La purificación se refiere a la remoción de catalizadores metálicos de los MWCNTs provenientes de algunos métodos de síntesis de estos nanomateriales. Algunos de los métodos son el tratamiento con ácido sulfúrico, uso de solución de ácido nítrico bajo condiciones de reflujo y utilizando mezclas de estos dos ácidos; éstos tratamientos pueden crear defectos en las paredes laterales de los MWCNTs, además cuando se oxidan disminuyen la superficie, los defectos que se presentan al purificarlos con estos ácidos alteran las propiedades mecánicas de los MWCNTs. Otro método de purificación reportado es mediante la utilización de polímeros orgánicos, el tratamiento con peróxido de hidrogeno, así como el uso de fuentes alternativas como microondas y ultrasonido [20, 21].

La funcionalización se define como la modificación de propiedades por la adsorción de átomos o moléculas en las paredes exteriores de los nanotubos de carbono. Se pueden obtener cambios en las propiedades físicas de la superficie de estas nanopartículas, como lo son la solubilidad y dispersión, las cuales son importantes en las propiedades biológicas de los MWCNTs, ya que les permite tener una mejor interacción con moléculas biológicas.

La manipulación de los MWCNTs ha sido limitada debido a que son insolubles en la mayoría de los solventes comunes. En cambio, la funcionalización orgánica de los MWCNTs ha permitido un alto nivel de solubilidad en cloroformo, diclorometano, acetona, metanol, etanol e incluso en agua [20, 21].

Por medio de la oxidación química de MWCNTs se pueden agregar diversos grupos funcionales como ácidos carboxílicos, aminas y amidas. Los MWCNTs se

pueden oxidar al reaccionar con una mezcla de ácido nítrico y ácido sulfúrico, con lo cual se introducen grupos carboxílicos en sus extremos. Mediante la química del grupo carboxílico y en muchos casos su activación a cloruros de acilo, permite el acoplamiento de moléculas por medio de unión covalente formando enlaces tipo éster y amidas.

Funcionalización de nanotubos mediante plasma, mostrando ventajas en comparación con el tratamiento químico, ya que la superficie del nanotubo se modifica fácilmente.

La funcionalización por medio de enlaces de tipo covalente ha resultado muy prometedora, ya que se forma un enlace fuerte entre los grupos funcionales adicionados y los SWCNTs. Sin embargo, los MWCNTs pueden interactuar con las moléculas de diversas maneras. Hay dos tipos de funcionalizaciones: **las covalentes** en la cuales se introducen grupos funcionales creando enlace a los MWCNTs, ejemplo de ello es la funcionalización con ácidos carboxílicos y aminas.

La unión por medio de adsorción se ejemplifica con el antraceno y derivados, siendo moléculas poliaromáticas, presentando interacciones tipo π - π con los MWCNTs [20, 21].

Las funcionalizaciones no covalentes se basan en la adsorción de moléculas como surfactantes, compuestos aromáticos y polímeros como poliacrilamida, poliestireno, entre otros, que no alteran las propiedades de los MWCNTs [20, 21].

El ultrasonido y las microondas son fuentes alternativas que se utilizan para dispersar en solución los MWCNTs, mejorando la interacción entre los diversos grupos funcionales y los carbonos sp^2 de los MWCNTs. Con el fin de mejorar la dispersión y la adhesión interfacial. La irradiación de microondas puede iniciar polimerizaciones en el MWCNTs a partir de un monómero iniciador [20, 21].

2.3.- Estado del arte de la Hidroxiapatita.

La hidroxiapatita sintética (HA) con fórmula química $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ es un fosfato de calcio con una composición química muy similar a la del hueso humano, lo cual la hace biocompatible con los tejidos vivos. La biocompatibilidad promueve su

aceptación y adecuada osteointegración en el medio biológico, y su no toxicidad, estabilidad química, y bioactividad por lo cual su uso en variadas aplicaciones médicas [22].

2.3.1.- Propiedades fisicoquímicas de la Hidroxiapatita.

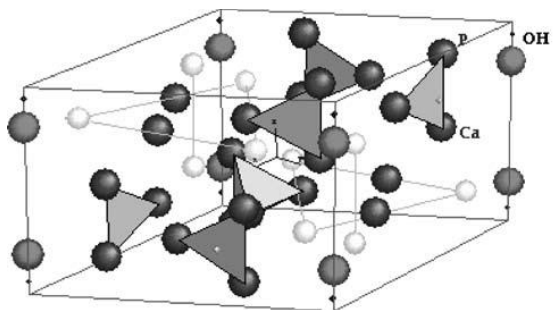


Fig. 10.-Estructura hidroxiapatita sintética (HA) con fórmula química $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ [22].

El estudio de la HA se ha realizado desde hace varias décadas; Aaron y Posner (1958) propusieron su estructura cristalina a partir del análisis de un monocristal. Este fosfato cristaliza en el sistema hexagonal, grupo de simetría P63/m, con valores de red $a = b = 9,432 \text{ \AA}$ y $c = 6,88 \text{ \AA}$ (figura 10). El carácter iónico de la HA la hace una cerámica dura, refractaria, con punto de fusión mayor que $1500 \text{ }^\circ\text{C}$. Además, este carácter iónico le proporciona la capacidad de la sustitución parcial o completa de iones de la red por otros de tamaño similar (PO_4^{3-} por HPO_4^{2-} , Ca^{2+} por K^+ o Mg^{2+} , OH^- por F^- , Cl^- , Br^-) (4) y le proporciona su propiedad de insolubilidad. La relación ideal Ca/P es 10:6 (1,6667), su densidad calculada es de $3,219 \text{ g/cm}^3$ y sus propiedades mecánicas varían de acuerdo con el proceso de manufactura; la HA policristalina tiene un módulo elástico alto, 40-117 Gpa [22].

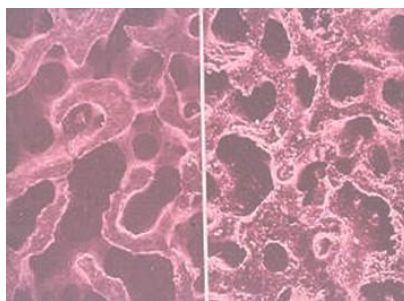


Fig. 11.-Obsérvese a la Izquierda un corte histológico de un hueso esponjoso humano y a la derecha un corte de Hidroxiapatita HAP-200, nótese la similitud de su estructura física y de su porosidad [23].

La forma morfológica de la hidroxiapatita para el tejido óseo se muestra en la figura 11. Las condiciones de síntesis influyen en las propiedades y características físicas de la hidroxiapatita, estas se presentan en la tabla 3.

Tabla 3.-Propiedades físicas de la hidroxiapatita [24].

Propiedades	Valores
Formula teórica	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂
Densidad teórica	3,16 gr/cm ³
Punto de fusión	1650 ° C
Se vuelve inestable	1350 ° C
Grupo espacial	P63/m
Hexagonal	P21/b
Monoclínica	
Parámetros de red	a = b = 9.41 – 9.44 Å c = 6.84 – 6.94 Å
Capacidad calorífica	184.07 cal/K Mol a 298.16 0 K 180.16 cal/K Mol a 298.15 ° K
Punto de fusión	1614 ° C

2.3.2.- Métodos de obtención de la hidroxiapatita.

En lo que respecta a su preparación, la hidroxiapatita puede ser obtenida a partir de esqueletos de animales o bien de manera sintética por medio de diferentes rutas de síntesis química; en este último caso pueden obtenerse materiales con diferentes características físico-químicas y morfológicas controladas y con diversas ventajas, entre las que se pueden mencionar la alta pureza y composición homogénea, distribución monomodal y tamaños de partícula nanométricos, entre otras.

Existen diferentes métodos de síntesis entre los más usados están los siguientes:

- El método sol-gel.
- Co-precipitación asistida por agitación ultrasónica.
- cristalización hidrotérmica.

El método más común para la obtención de HA es el de precipitación, con el que se obtienen cantidades apreciables del material de forma económica y fácilmente

reproducibile. En este método, sin embargo, se deben controlar el pH, la temperatura de reacción, el tiempo de la reacción, la atmósfera de tratamiento y la relación Ca/P de los reactivos, para impedir la aparición de otras fases como los ortofosfatos. Una HA apropiada para cualquier aplicación específica debe controlar su composición, las impurezas, morfología, cristalinidad, tamaño del cristal y de las partículas. Las variaciones pequeñas en las anteriores características ocasionan diferentes comportamientos del material implantado, tanto en su bioactividad y rango de disolución como en su reabsorción [22].

Para la síntesis de hidroxiapatita se pueden usar los parámetros mostrados en la tabla 4.

Tabla 4.- Cantidad de reactivos para la síntesis de hidroxiapatita [22].

Síntesis	Reactivos	Cantidad (g)	Amoniaco (mL)
Número 1	Ca (NO ₃) ₂ 4H ₂ O	94.034	60
	NH H ₂ PO ₄	27.5	150
Número 2	Ca (NO ₃) ₂ 4H ₂ O	94.0397	55
	NH H ₂ PO ₄	27-767	90
Número 3	Ca (NO ₃) ₂ 4H ₂ O	94.04	50
	NH H ₂ PO ₄	27.76	180

3.- PROCESO DE ELECTROHILADO

En el proceso de “electrospinning” se utiliza un alto voltaje para crear un campo electrostático fuerte, con el fin de atraer partículas eléctricamente cargadas de una solución o fluido polimérico desde un cono inyector hacia una superficie donde se solidifica formando micro y nanofibras.

El proceso consiste en la disolución del polímero previamente preparado, se carga en una jeringa de inyecciones que mediante un tubo de plástico inerte se conecta a una aguja. Una bomba de infusión o perfusión unida al émbolo de la jeringuilla genera una presión y un flujo constante que a través del tubo se trasmite a la disolución del polímero en la aguja. Por el efecto de la polarización y la carga originadas por el campo eléctrico, la solución es arrojada hacia una superficie conductora (colector) a una distancia entre los 5 y 30cm del cono o aguja. Durante la creación del chorro inyectado, el solvente gradualmente se evapora, y el producto obtenido se deposita en forma de manta o capa compuesta de nano o micro fibras con diámetros entre 50 nm y 10 μm [25].

En el flujo electro-hidrodinámico del chorro, las cargas son inducidas en el fluido a través de la distancia de separación de los electrodos (punta de aguja y colector metálico), rompiéndose la tensión superficial a través del campo eléctrico y descomponiéndose en una tangencial (t) y una normal (n), formando el cono de Taylor, ver figura 12.

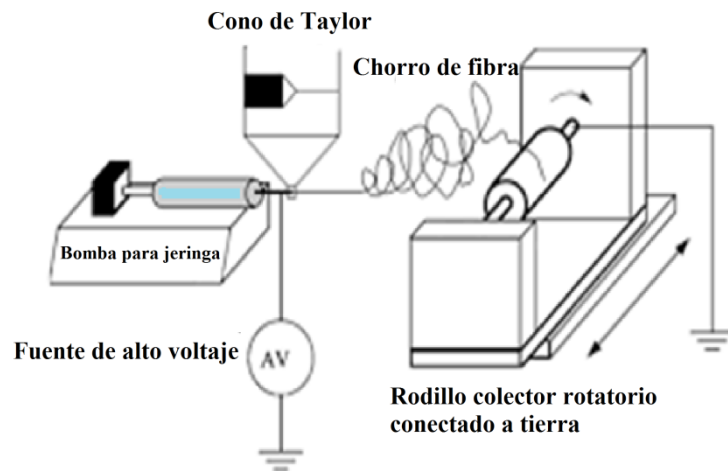


Fig. 12.- Proceso de electrohilado.

La explicación general de cada una de las variables del proceso de electrohilado se explica a continuación:

- La distancia entre la aguja y el colector [26, 27]:
 - Las fibras pueden romperse debido a su propio peso.
 - Mayor estiramiento de la solución.
 - Obtención de fibras delgadas.
 - Aparición de defectos (beads) en las fibras al trabajar con muy altas o muy bajas distancias.
 - Poco tiempo para la evaporación del solvente por tanto, las fibras llegan húmedas al plato colector.
- Temperatura [28]:
 - La humedad en el ambiente podría determinar la velocidad de evaporación del disolvente en la solución.
 - A humedad relativa baja un disolvente volátil podría evaporarse muy rápido.
 - Incrementa la rápida evaporación y puede ocasionar una reducción en la viscosidad de la solución.

- Voltaje [28, 29, 30]: La influencia del voltaje depende de las propiedades viscoelásticas del material base, por ello es importante analizar el comportamiento para cada polímero con su respectivo disolvente.
 - Voltajes altos hace que más fluido se transporte en el chorro lo que resulta en fibras con mayores diámetros.
 - Un incremento en la aplicación del voltaje decrece el diámetro de las nanofibras y aumenta la probabilidad de obtener fibras con defectos (beads).
 - Un voltaje alto permite un mayor estiramiento de la solución debido a la presencia de mayor fuerza de coulomb en el chorro y un fuerte campo eléctrico.
- Velocidad de inyección [31]:
 - Un flujo de salida menor podría ser benéfico ya que el disolvente tendría más tiempo para evaporarse evitando la formación de defectos en las fibras.
 - Cuando el flujo de salida se incrementa ocurre un incremento en el diámetro de las fibras y posiblemente en el tamaño de los defectos.
 - Un mínimo valor de volumen de solución a la salida del capilar debería ser mantenido para obtener un cono de Taylor estable.
 - el flujo de salida determina la cantidad de solución disponible para el proceso de electrospinning.

4.- JUSTIFICACIÓN

Los defectos óseos causados por lesiones en la superficie articular y enfermedades como la osteoartritis, daños en la superficie de la articulación, alteración mecánica de la superficie articular que limitan el cartílago, alteración mecánica del cartílago y hueso subcondral han aumentado. Por estas razones, la ingeniería de tejidos ha desarrollado una variedad de andamios para reconstruir la estructura de tejidos y órganos para regenerar y reparar las funciones del tejido dañado a base de biopolímeros como el PLA, PVA, PEO, PCL, PVP, etc.

En la ortopedia los metales son la opción más común para el reemplazo total de hueso o fijaciones del implante. Las excelentes propiedades mecánicas de los metales se reúnen los requisitos necesarios para las aplicaciones de hueso de soporte de carga. Sin embargo, el metal puede fallar debido a la tensión de blindaje, afloje las articulaciones debido al desgaste, y la compatibilidad limitada con el tejido óseo. Implantes fallidos requieren varias cirugías de revisión desafiantes que drásticamente aumentan los costos y el tiempo de recuperación. Los injertos óseos se han utilizado para rellenar defectos en el hueso causados por estados clínicos o traumatismos, tales como fracturas con pérdida ósea, infección ósea, o tumores óseos.

Como podemos observar el área de oportunidad en biotecnología para los materiales avanzados es muy amplia, y el realizar una investigación en un nuevo material para aplicaciones óseas es factible. En el caso del nuevo material que se desarrolló se ve como algo prometedor para la aplicación de implantes óseos. Las características que tienen los nanotubos de carbono y la hidroxiapatita en el área de implantes óseos, por separados es prometedor como lo podemos leer en la literatura científica.

El realizar un composito o andamios a base de nanotubos de carbono e hidroxiapatita en un matriz polimérica como lo es el PLA, se pretende mejorara las propiedades mecánicas, térmicas y físicas de este material. Tomando en cuenta las propiedades particulares de cada material para su aplicación.

5.- OBJETIVOS

Objetivo general

- Realización de compositos electrohilados usando una matriz polimérica y reforzándola con nanotubos de carbono e hidroxiapatita para aplicación ósea.

Objetivos específicos

- Funcionalización de los nanotubos de carbono para reducir la citotoxicidad.
- Elaboración de compositos por la técnica de electrohilado.
- Caracterización del composito hilado.
- Análisis in vitro con células osteoblasticas al composito obtenido.

6.- METODOLOGÍA

6.1. – Materiales.

Los MWCNTs usados en este trabajo fueron aportados por el departamento de *Física del área de polímeros de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa (UAM-I)*, los cuales fueron sintetizados por el método de deposición química en fase vapor (CVD).

La hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$) utilizada para la realización del trabajo fue comprada a *Sigma-Aldrich México*. El ácido poli láctico (INGEO 3251D) fue comprado a *PromaPlast, Mexico*.

6.2. – Preparación de los MWCNTs.

Los nanotubos de carbono de múltiples paredes fueron sintetizados por pirolisis CVD. Antes de la síntesis de MWCNTs, el oxígeno es desplazado del reactor por medio de un flujo de argón, que también se usa para burbujear benceno (el precursor de carbono orgánico) que se evapora gradualmente. La fuente de carbono como vapor de benceno se introduce en el tubo de cuarzo mantenido a una temperatura de 750 °C mediante un flujo de argón. El ferroceno (catalizador metálico), expuesto inicialmente a la temperatura de sublimación (90-110 ° C) cerca de la entrada del tubo de cuarzo, es transportado junto con el vapor de benceno. La reacción química que conduce a la formación de los MWCNTs ocurre en la pared del cuarzo del tubo. Aquí el ferroceno se descompone para producir los centros catalizadores de hierro a partir de los cuales se desarrolla MWCNTs. Típicamente, 150 ml de benceno y 1.2 g de ferroceno se usaron en la síntesis de los MWCNTs.

Los MWCNTs fueron funcionalizados por tratamiento de ácidos concentrados para la integración de los grupos carboxilo (COOH) y la eliminación de impurezas del carbono, así como residuos del catalizador para reducir de su citotoxicidad. Este tratamiento se realizó usando ácido nítrico (HNO_3) al 60 % y ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 96 % en una proporción de 3:2 v/v a 60 °C por 5 hrs., posteriormente se neutralizó la mezcla con hidróxido de sodio (NaOH) 3M (molar). Subsecuentemente la mezcla

es pasada a una centrifuga marca Hettich modelo Rotina 420 R, para la separación por gravedad a 4 000 rpm. El proceso de centrifugado es realizado 4 veces, por lapsos de tiempo de 15 min, para el lavado de los nanotubos de carbono con agua destilada y finalmente con acetona a 99.56 %. El material de MWCNTs obtenido es secado en vacío a una temperatura de 50 °C por 24 hrs, los MWCNTs fueron caracterizados por microscopía electrónica de barrido de alta resolución Zeiss (HRSEM-AURIGA), microscopia electrónica de barrido de emisión de campo de alta resolución (HRTEM-Jeol 2100F), y Espectroscopia RAMAN (WiTec, ALPHA300 RA+).

6.3.- Preparación de la solución para el electrohilado.

Se disolvió 1.2 g de PLA en 9 ml de cloroformo (CHCl_3) a 99.9% por un tiempo de 5 h, posteriormente a este tiempo se agregó 1 ml de etanol a 99.94%, obteniendo así la solución polimérica. Para los experimentos de evaluación se usaron el 56% y 64% (1200 mg) de PLA, 35% y 27% (750 y 500 mg) de HA y 9% de MWCNTs (187 y 166 mg) respectivamente. Como resultado de las pruebas de MTS y LDH se modificaron las condiciones de trabajo con el objeto de obtener mejor respuesta celular a los andamios, las concentraciones son las siguientes: PLA; 1200 mg (85.8%), HA; 188 mg (13.5%) y MWCNTs; 10 mg (0.7%). La forma general de preparación de la solución a electrohilar es la siguiente: Una vez preparada la solución polimérica, se adhieren los porcentajes de HA-MWCNTs y se sónica por 10 minutos para obtener la mezcla lo más homogénea posible, una vez terminado el proceso mencionado se procedió a electrohilar la solución.

6.4.- Proceso de electrohilado de la solución polimérica con HA/MWCNTs.

La disolución del polímero previamente preparado con HA-MWCNTs, se carga en una jeringa de inyecciones que mediante una manguera inerte se conecta a una aguja. Una bomba de infusión o perfusión unida al émbolo de la jeringuilla genera una presión y un flujo constante que a través de la manguera se trasmite la disolución del polímero preparado a la aguja. Por el efecto de la polarización y la carga originadas por el campo eléctrico, la solución es arrojada hacia una superficie conductora (rodillo colector) a una distancia de 15cm del cono o aguja. Durante la creación del

chorro inyectado, el solvente gradualmente se evapora, y el producto obtenido se deposita en forma de manta o capa compuesta de nano o micro fibras con diámetros entre 50 nm y 10 μ m.

El proceso de electrohilado se realizó en un equipo comercial (Standard unit, NEU-01, ver figura 13) donde las variables para los experimentos de evaluación y optimización se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. – Parámetros del proceso de electrohilado

Parámetros del proceso del proceso de electrohilado	Valores de la relación F-1	Valores de la relación F-2
Caudal (mL/h)	10	3
Voltaje (kV)	30	15
Temperatura (°C)	35	30
Distancia entre el rodillo colector y la aguja (cm)	15	15
Velocidad del rodillo colector (rpm)	1000	1700

Explicando las variables que se tienen en el proceso de electrohilado y que es lo que controlan se extiende esta parte desde la preparación de la solución. Primeramente se diluyo el polímero (PLA) que conformara la matriz polimérica, este se diluye con disolventes (Cloroformo y Etanol) que permitan una dilución completamente del polímero utilizado para evitar que se tape la aguja. Se puede observar que se le agrega etanol esto para no tener una solución tan concentrada, ya que una solución muy concentrada perjudicaría a la formación de las fibras debido a la alta viscosidad. Al agregar etanol también aumentamos la constante dieléctrica, teniendo un efecto de mayor transporte de cargas provocando un mayor estiramiento los cual nos ayuda para reducir o prevenir los defectos en las fibras llamadas “BEADS”, El diluir la solución con etanol hace que la tensión superficial de la solución sea menor. Una solución muy diluida también perjudica al proceso de hilado ya que el voltaje rompería más fácilmente la tensión superficial del polímero y la solución caería en forma de gota. Una buena dilución también promueve que se obtengan fibras más homogéneas. Los polímeros son dieléctricos y sometidos al campo eléctrico del proceso de electrohilado pueden considerarse como dipolos eléctricos compuestos por

cargas negativas y positivas, respondiendo al campo eléctricos del proceso hace que ocurra el estiramiento de la solución formando el cono de Taylor.



Fig. 13.-Equipo Standard Unit, NEU-01 para la elaboración del composito electrohilado.

6.5.- Caracterización del composito electrohilado.

6.5.1. – Caracterización fisicoquímica.

La morfología y distribución de los andamios fueron observadas por microscopía electrónica de barrido de alta resolución Zeiss (HRSEM- AURIGA) a 1 Kv, con este mismo equipo se realizó un análisis químico a 10 Kv para determinar la composición química de los andamios. Se midieron los diámetros de las fibras que conforman los andamios con ayuda del programa ImageJ y se procesaron para un análisis estadístico.

Se realizó un análisis de infrarrojo (IR- Perkin Elmer GX espectro), para determinar los grupos funcionales presentes en los andamio. Otro análisis realizado es el de difracción de Rayos-x (D8 Advance X-ray diffractometer, Bruker) con fuente de cobre (1.541\AA) 0.02 en pasos, para determinar el grado de cristalinidad de la

estructura de las muestra electrohiladas. Los datos obtenidos del estudio de difracción de Rayos-x se analizaron con la ayuda del programa Match 2 y la base de datos EVA. La presencia de los nanotubos de carbono en los andamios electrohilado es compleja y se determinó realizando un estudio de RAMAN confocal (WiTec, ALPHA300 RA+), para corroborar la incorporación de estos.

La pérdida de peso de los andamios electrohilados en función de la temperatura se determinaron en un equipo Thermo-Gravimetric Analysis Q600, TA Instruments. La muestra fue calentada de 30 °C a 500 °C a una velocidad de 10 °C/min.

Las pruebas mecánicas fueron medidas bajo tensión uniaxial (El equipo usado para la prueba fue diseñado y construido especialmente para materiales suaves en el Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM) de acuerdo a la norma D1708-ASTM. Se realizaron probetas de los andamios electrohilados de PLA, PLA + HA, y PLA + HA-MWCNTs (concentración en peso de 3:1 y 19:1) bajo la norma antes mencionada. Las pruebas se realizaron a una velocidad de deformación de 10 mm/min. Los valores de carga y desplazamiento durante las pruebas fueron medidos por una celda de carga (110 N) y un transformador diferencial variable lineal (LVDT) (± 50 mm), respectivamente; todos los datos fueron registrados por un instrumento virtual programado en Lab-VIEW.

Los datos obtenidos y guardados en archivos con extensión *.dat* fueron importados y procesados en *Wolfram Mathematica 10* para la obtención de la curva esfuerzo en función de la deformación. Para el cálculo de la deformación (ϵ) se define por la siguiente expresión:

$$\frac{L-L_0}{L_0} = \frac{\Delta L}{L_0}$$

Para esta expresión se programó una fusión en *Mathematica 10*, así mismo para el módulo de Young el cual se define por la siguiente expresión:

$$Y = \frac{\text{Esfuerzo de tensión}}{\text{Deformación por tensión}} = \frac{F^\perp/A}{\Delta L/L_0} = \frac{F^\perp * L_0}{A * \Delta L}$$

Para la determinación del área transversal, se toma en cuenta el ancho de la probeta y el espesor de ella, este último varia y por tal motivo los espesores son medidos con un

vernier digital para su mayor exactitud. En la figura 14 se muestra como se fueron procesando los datos en Wolfram Mathematica 10 para las pruebas de tensión.

Muestra A1

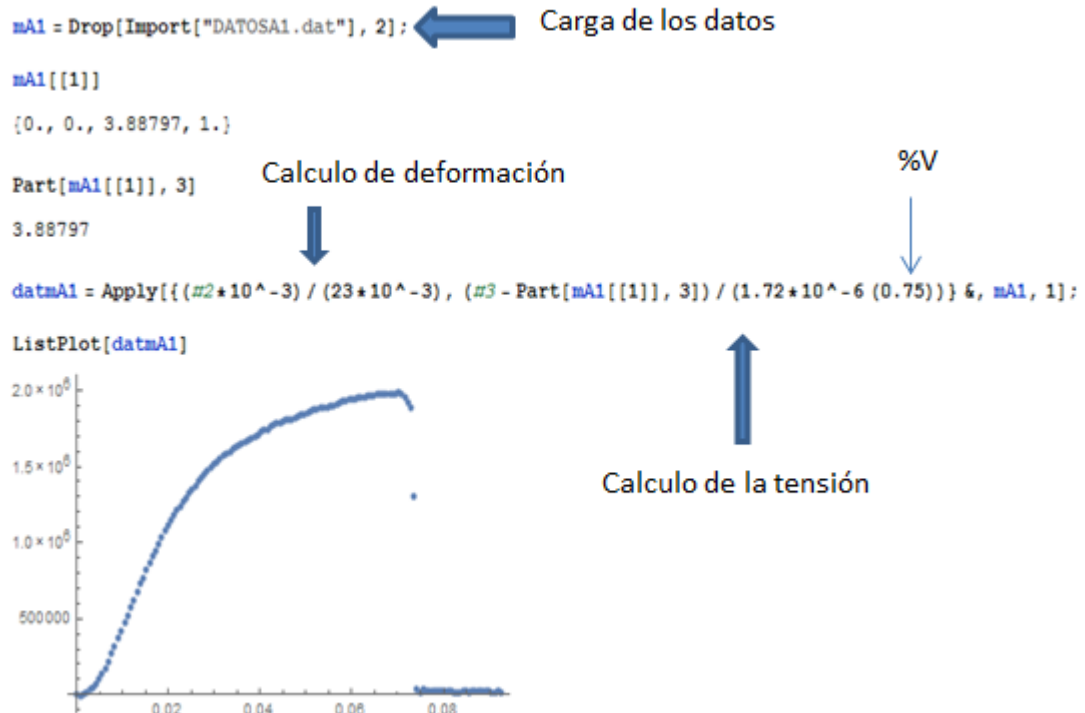


Fig. 14.-Procedimiento en Wolfram Mathematica 10 para la generación de resultados de las pruebas de tensión.

En la figura 15 a se puede observar las probetas de los andamios electrohilados bajo la norma D1708-ASTM, en la figura 15 b se puede observar el software donde se registran los resultados de las pruebas de tensión, y en las figuras 15 c y d, se puede observar el equipo de tracción donde las probetas son sometidas a tensión y como estas son fracturadas.

Los andamios electrohilados no se consideran un sólido en su totalidad, por lo que se realizó un análisis Brunauer-Emmett-Teller (BET, TriStar 3000 Micromeritics). Esta técnica explica la física de adsorción de gases de moléculas en una superficie sólida y sirve como base para una técnica de análisis importante para la medición de la

superficie específica de un material, la cual está dada por la siguiente formula:

$$SA_{BET} = \frac{(CSA)(6.023 \times 10^{23})}{(22414 \text{ cm}^3 \text{ STP})(10^{18} \text{ nm}^2 / \text{m}^2)(S+Y_{INT})}$$

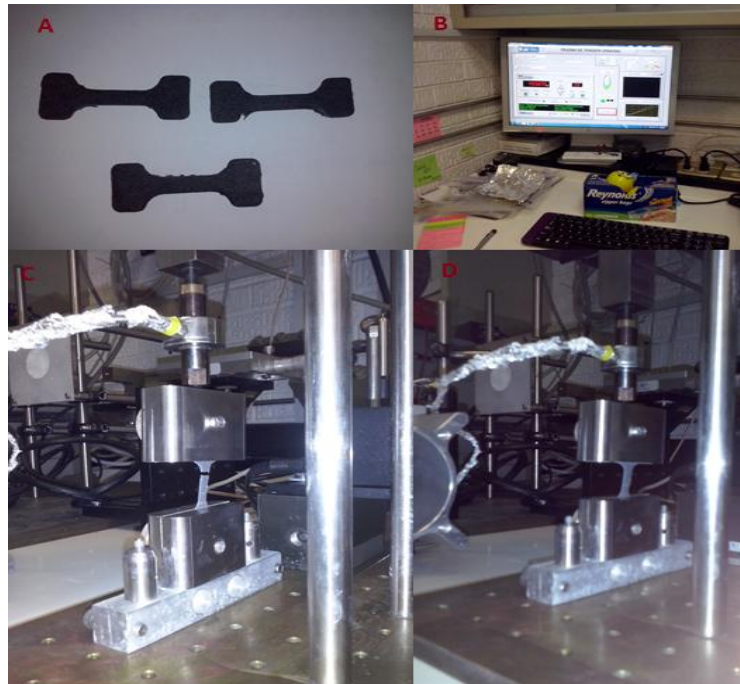


Fig. 15.-Probetas y equipo de tracción para las pruebas de tensión.

Para determinar la superficie específica del material utilizamos los resultados que determino el equipo y el procedimiento para determinar la corrección de espacio libre del mismo. Los cálculos realizados fue a través de las siguientes formulas:

$$V_{SYS} = 760 \text{ mmHg} \times \frac{V_h}{P_h}, V_{sam} = \frac{W_{sam}}{D_{sam}}, V_{gas} = V_{sam} \frac{273.13 \text{ } ^\circ\text{K}}{77.15 \text{ } ^\circ\text{K}} \text{ Y } \%V = \left(\frac{V_{SYS} - V_{gas}}{V_{gas}} \right)$$

Donde V_{sys} es el volumen del sistema, V_h es la cantidad de gas diferencial entre los volúmenes del gas y la muestra, P_h es la presión absoluta de la muestra, V_{sam} es el volumen de la muestra, W_{sam} es el peso de la muestra, D_{sam} es la densidad de la muestra, V_{gas} es el volumen del gas y el $\%V$ es el porcentaje de volumen específico de la muestra. El equipo toma como constantes la temperatura y presión estándar, esto refiere a 760 mmHg y 273.13 °K, los 77.15 °K refiere a la temperatura del nitrógeno líquido. Finalmente se dividió el volumen del sistema con el volumen del gas, el resultado es multiplicado por 100 para la obtención del porcentaje del área específica de nuestros andamios.

6.5.2.- Análisis biológico.

Para el estudio in vitro del cultivo celular, el composito de PLA con HA-MWCNTs se cortó en un área de 6 cm². Posteriormente, se esterilizaron por irradiación UV durante 24 hrs., y se lavaron 2 veces con PBS de acuerdo con la Norma ISO 10993-5 para la evaluación de la citotoxicidad in vitro [16]. Para la obtención de los extractos del composito se utilizó 1 ml de medio de cultivo con suero bovino fetal al 10% como vehículo, ya que puede extraer sustancias polares y no polares que también soporta el crecimiento de células en cultivo. Las condiciones de extracción fueron de 48 horas a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂.

La línea celular utilizada fue osteoblastos humanos adherentes (hFOB 1.19 (ATCC CRL-11372)), que se cultivaron en el medio de mezcla 1:1 de F12 de Ham de Medio Dulbecco Modificado Medio Eagle, con 2.5 mM L-glutamina (sin rojo fenol), suplementado con suero bovino fetal al 10%, penicilina-estreptomicina al 1%, antimicótico al 1% y 0,3 mg / ml de geneticina (G418). Las células se mantuvieron a 34 °C en una atmósfera de 5% de CO₂. Para experimentar, las células se sembraron a una densidad de 5000 células por pocillo antes de la exposición.

6.5.2.1. -Métodos de citotoxicidad.

La citotoxicidad en andamios de PLA con HA-MWCNTs se evaluó por MTS (3- (4, 5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfofenil) 2H-tetrazolio) y ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH).

LDH es una enzima citoplasmática, presente en todos los tipos celulares y se libera rápidamente en el medio de cultivo después del daño de la membrana plasmática. Esta enzima se puede medir en el sobrenadante usando una reacción enzimática. El aumento de la actividad de la enzima en el sobrenadante se relaciona directamente con el número de células muertas. El ensayo de MTS es un método colorimétrico que mide la conversión de formazan por enzimas que se encuentran sólo en las células que tienen actividad metabólica. La cantidad de formazan es directamente proporcional al número de células vivas.

En el día de la exposición se lavaron las células y se expuso a 100, 50, 25, 12,5 y 6,25% (vol / vol) de los compositos de PLA con extractos de HA-MWCNTs diluidas en medio de cultivo completo durante 24 y 48 horas en una placa de 96 pocillos.

Una vez que se completó el tiempo de exposición, 100 µl de sobrenadante fue tomada y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. 50 µl del sobrenadante se transfirieron a una placa de 96 pocillos donde se añadió la mezcla de reacción para la determinación de LDH. Las muestras se incubaron durante 30 minutos y protegidos de la luz a temperatura ambiente. Las lecturas espectrofotométricas se realizaron a 490 nm y 690 nm en el instrumento TECAN Infinite® 200. Un experimento independiente se llevó a cabo por cuadruplicado. Triton X-100 al 1% se utilizó como control positivo para la muerte celular, como las células de control negativas con el medio.

Para la determinación de MTS, después de terminar el periodo de exposición; se retiró el medio de los pocillos de la placa, y se añadieron 100 µl de medio fresco que contiene 10 µl de reactivo MTS se incubó durante 4 horas protegidos de la luz a 33,5 °C. Las lecturas espectrofotométricas se realizaron a 490 nm y 690 nm en el TECAN Infinite® 200 instrumento. Se realizó un experimento por cuadruplicado.

7.- RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1. – Caracterización de los MWCNTs.

7.1.1. -Morfología y análisis elemental de los MWCNTs.

Entre las herramientas más comunes para caracterizar las morfologías y dimensiones de MWCNTs (en forma de polvo) es SEM. En la actualidad, las imágenes SEM se utilizan para caracterizar la morfología general de MWCNTs y también para cuantificar el grado de homogeneidad de las muestras, así como las dimensiones de los túbulos.

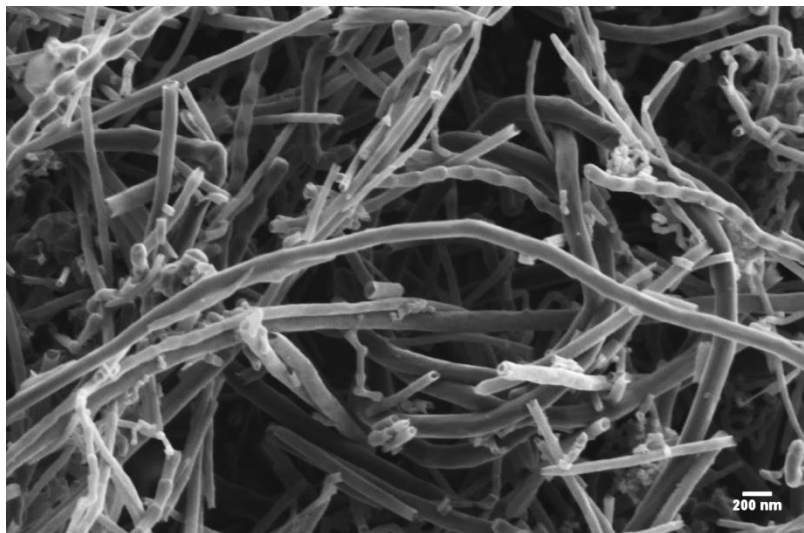


Fig. 16.-Imagen SEM de MWCNTs producido por CVD.

La morfología de los MWCNTs se observa en la figura 16. Los MWCNTs se pueden observar cómo están enredados aleatoriamente y en forma de fideos agudados, esta particularidad es notable en los nanotubos de carbono obtenidos por el método de CVD. En la imagen 13 es notable que los MWCNTs no presentan muchas impurezas debido a la purificación y funcionalización previa a la que fueron sometidos, los diámetros presentes varían de entre 60-90 nm como se ve a mayor detalle con el estudio TEM.

7.1.2. - Análisis FETEM.

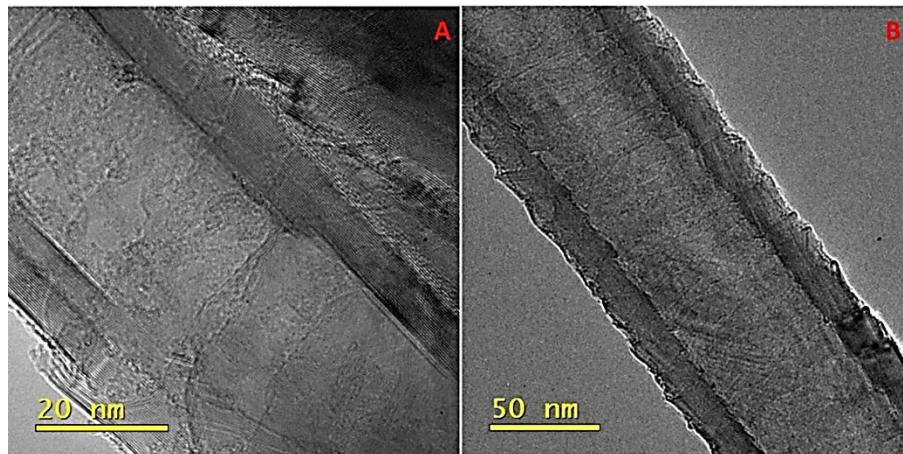


Fig. 17.-Imágenes FETEM de diferentes MWCNTs a los 20 y 50 nm, donde se pueden ver los diámetros interno y externo de los MWCNTs.

Los MWCNTs son analizados por FETEM, donde se observa que no hay numerosas acumulaciones de impurezas, como se muestra en las figuras 17. En la figura 17a y 17b El interior del agujero de MWCNTs es de ~ 30-50 nm de diámetro y el diámetro exterior es de ~ 60- 90 nm de diámetro respectivamente.

Otro hecho que se puede obtener por FETEM es por difracción de electrones área seleccionada (SAED). Los patrones SAED podrían utilizarse para estimar la cristalinidad global de MWCNTs sin embargo, se recomienda el uso de haz a 120 KeV porque si se utiliza una tensión de estado elevado puede dañar las paredes de los MWCNTs [32]. En la Figura 18 se muestra el patrón de la difracción de electrones por área seleccionado (SAED), donde se puede observar como electrones difractados forman una estructura hexagonal.

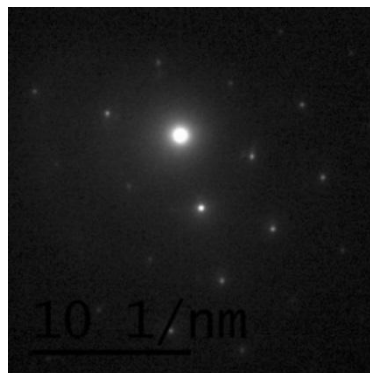


Fig. 18.-Difracción de electrones por área seleccionada de MWCNTs.

FASE 1 del Proyecto

7.2.- Evaluación de las nanopartículas de hidroxiapatita y nanotubos de carbono de multicapa en la matriz electrohilada de PLA.

La primera fase del estudio consistió en realizar el composito electrohilado con condiciones que nos ayudaran a comprender mejor el efecto que tienen las variables de hilado en las fibras. Una de las propiedades buscadas fue el obtener poros superficiales que nos ayuden a formar andamios de cultivo 3D; estos se forman cuando los poros superficiales del composito son lo suficientemente amplios para que las células se introduzcan en ellos obteniendo andamios que se asemejen a las funciones del tejido a rehabilitar. Otro aspecto importante es la morfología de las fibras las cuales se podría decir que se dividen en dos tipos; lisas y rugosas. Teniendo en cuenta que el composito electrohilado está orientado al hueso esponjoso, la mejor opción para nosotros sería fibras rugosas lo cual nos ayudaría a obtener una mejor adhesión celular. En la tabla 6 se muestran las condiciones de elaboración de los primeros compositos electrohilados.

Tabla 6.- Condiciones de fabricación los electrohilados para la obtención del andamio.

Parámetros del proceso del proceso de electrohilado	Valores de la relación F-1
Caudal (mL/h)	10
Voltaje (kV)	30
Temperatura (°C)	35
Distancia entre el rodillo colector y la aguja (cm)	15
Velocidad del rodillo colector (rpm)	1000

7.2.1.- Caracterización del composito electrohilado por HRSEM.

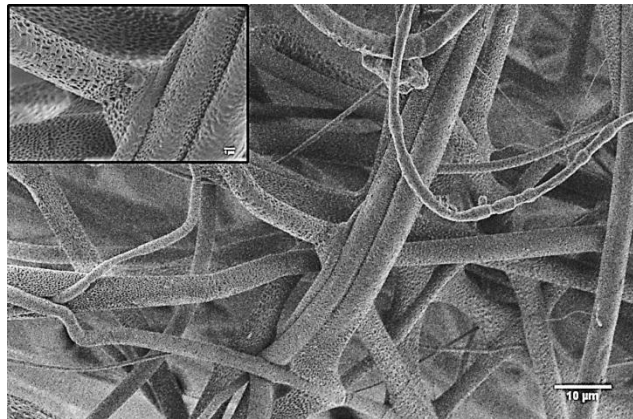


Fig. 19.- Imagen SEM de la matriz de PLA electrohilada con hidroxiapatita-MWCNTs.

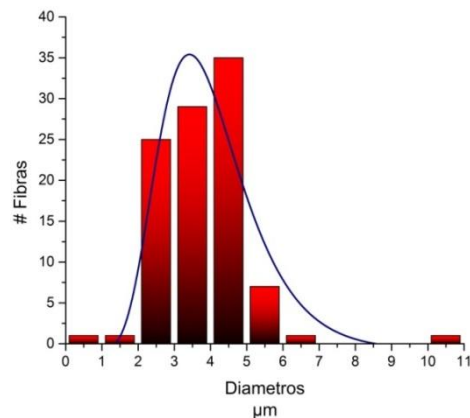


Fig. 20.-Histograma de la distribución del diámetro de las fibras electrohiladas de PLA + HA/MWCNTs. La figura 19 muestra la morfología de las fibras electrohiladas del material compuesto de PLA + HA/MWCNTs. Puede verse que la forma de la fibra no es uniforme, ésta desuniformidad de las fibras es debido en gran parte al encapsulamiento de la HA y los MWCNTs, se puede observar también fibras con diferentes diámetros, 1 μm a 5 μm. Además, se muestra que la red de fibras forma poros superficiales anchos de aproximadamente 10 μm, suficiente para que las células osteoblasticas puedan introducirse en el andamio y formar una cultura 3D. Se aprecia que las fibras tienen una superficie rugosa dando la apariencia de pequeños poros en la superficie de la fibra, esta apariencia porosa es muy similar a la morfología del hueso esponjoso. Este tipo de superficie da una mejor adhesión de las células sobre las fibras, y en muchas ocasiones es provocado por la humedad relativa y altos

voltajes [33, 34]. En este trabajo se hicieron pruebas con diferentes variables (temperatura, voltaje, caracterización de las fibras con y sin HA y MWCNTs) para determinar si la morfología rugosa obtenida fue provocada por la humedad relativa o por influencia de HA/MWCNTs, determinando que tanto la humedad relativa y la HA fueron factores para la obtención de la mencionada rugosidad de las fibras. Las imágenes fueron procesadas con el software libre Imagen-J para determinar el diámetro medio de las fibras obteniendo 3.96 ± 0.177 micras, ver figura 20. En la imagen 19 no puede apreciarse la HA y MWCNTs debido a que se encuentran encapsulados en las fibras de PLA, por lo que se presentara más adelante la técnica de Raman-Confocal para ratificar el mencionado encapsulamiento de los materiales dichos con anterioridad.

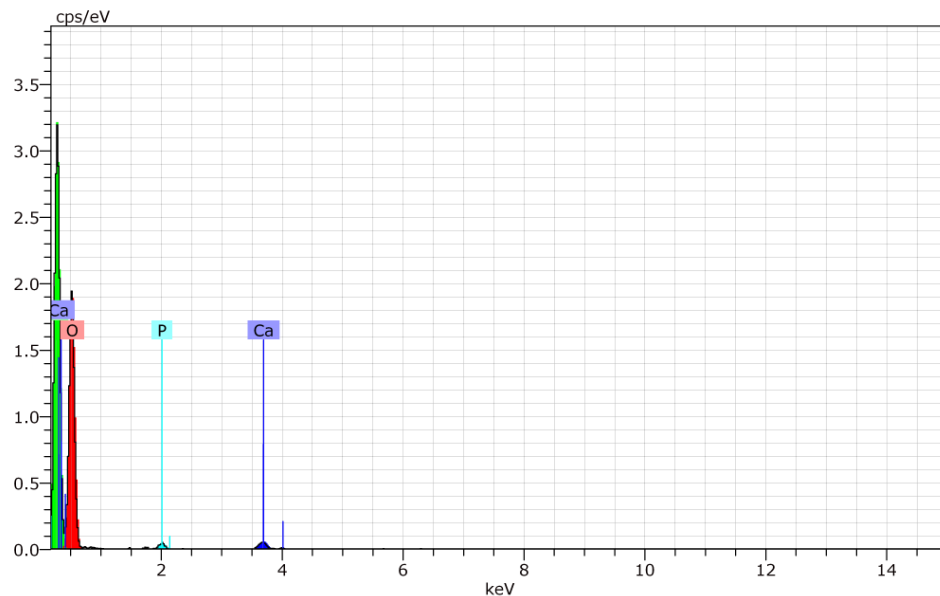


Fig. 21.-Análisis elemental de las fibras electrohiladas de PLA + HA/MWCNTs.

El análisis químico elemental hecho por área seleccionada, se observa en la figura 21, donde observamos que ciertamente están presentes los elementos de la hidroxiapatita (fosforo y calcio), así como el carbono proveniente de los MWCNTs.

7.2.2. - Caracterización del composito electrohilado por Rayos-X.

La técnica de rayos-X con la ayuda de la base de datos EVA, nos ayuda a conocer las fases cristalinas que tienen el material compuesto formado por electrospinning. Se

realizó el análisis de rayos-x para la obtención del grado de cristalinidad del composito, para esto se realizó un estudio por separado de compositos electrohilados de PLA, PLA + HA, PLA + HA/MWCNTs. El estudio fue hecho con un barrido 5-70 grados con pasos de 02.

El resultado de la difracción de rayos X se muestra en la figura 22, donde se puede observar una cresta que se inicia y termina ~ 10-35 en el espectro de PLA. La cresta está indicando que las fibras de los andamios de PLA tienen una estructura amorfa [35].

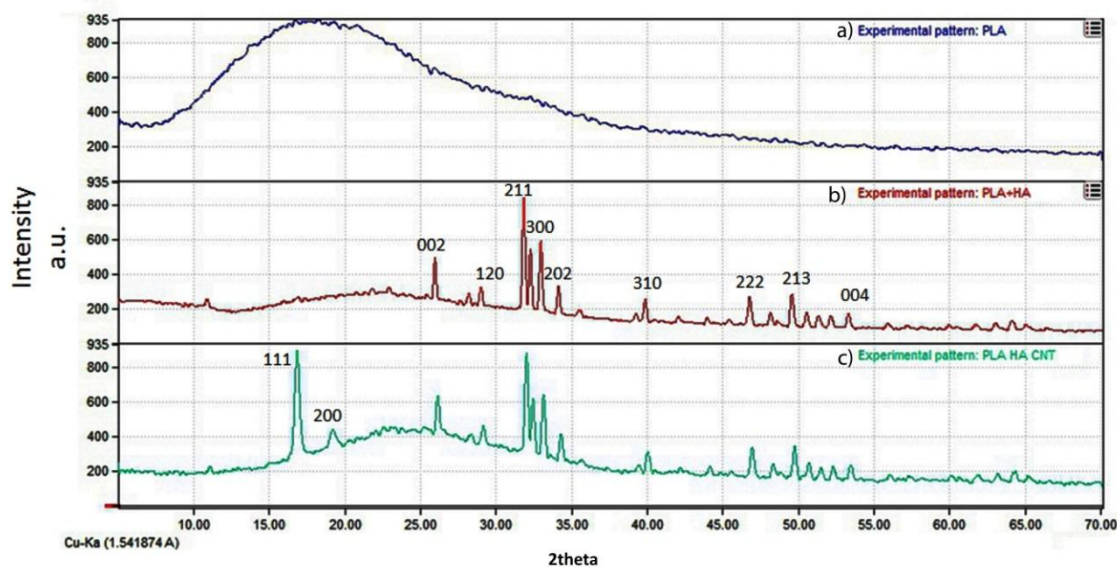


Fig. 22.-Rayos-X, espectros de los compositos de PLA, PLA-HA, PLA + HA-MWCNTs.

En la figura 22 también se puede observar la difracción de rayos-X de PLA + HA, mostrando los picos cristalinos de la HA, indicando sus planos correspondientes en (002) en 16.5°, (211) en 31.5° y (300) en 33.5°, característica del empaquetamiento de la estructura hexagonal. En la tercera imagen se puede ver la difracción de rayos-X, el pico de difracción en la posición $2\theta = 17^\circ$, plano (200), este pico es característico de los nanotubos de carbono de paredes múltiples. Como se puede ver el composito tiene picos de difracción característicos de los tres elementos que lo

forman [36, 37]. Además, el pico difractado más representativo de la hidroxiapatita se da a $31,5^\circ$ y MWCNTs de $16,5^\circ$, ángulos de Bragg.

7.2.3. -Caracterización del composito electrohilado por FTIR.

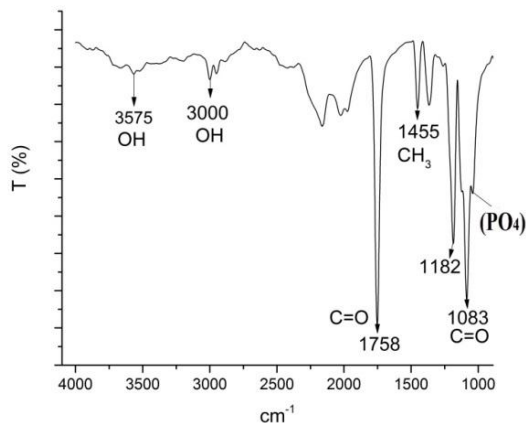


Fig. 23.- Espectro FTIR-ATR del composito electrohilado de PLA + HA/MWCNTs.

Esta técnica proporciona un espectro de reflexión de las bandas de los grupos funcionales de las sustancias inorgánicas y orgánicas, por lo cual es posible realizar una identificación de los materiales. El espectro FTIR-ATR de los compuestos PLA + HA/MWCNTs se muestra en la figura 23, el espectro muestra los grupos funcionales presentes; donde la banda de 1083 cm^{-1} son las vibraciones de los grupos C=O, estas mismas bandas de vibración se producen a 1182 y 1758 cm^{-1} , estas bandas son representativos de la molécula de PLA ((C₃H₄O₂)_n) [38]. La banda de 1182 cm^{-1} también muestra la vibración de los grupos funcionales P=O de la molécula de hidroxiapatita [39], esto es confirmado por el pequeño pico en 1032 cm^{-1} , característica de la (PO₄) molécula de hidroxiapatita. En 1455 cm^{-1} está presente el (grupo metilo) CH₃ vibración que pertenecer a la molécula de PLA. El grupo de carbonato (CO₃) tiene una vibración a 1431 cm^{-1} , característico de estequiométrica de la HA. En este espectro no es posible distinguir picos característicos de los nanotubos de carbono, la señal principal es muy estrecha con la vibración de los grupos CH₃ y OH. El espectro muestra las vibraciones del composito de PLA + HA-MWCNTs [40, 41].

7.2.4.- Caracterización del composito electrohilado por RAMAN.

Esta técnica nos va a proporcionar un análisis químico dando información sobre las vibraciones de los enlaces de las moléculas. Con los estudios anteriores se ha analizado el grado de cristalinidad de las fibras que conforman los andamios, la composición química y como se están integrando sus elementos con forme a las vibraciones de sus grupos funcionales, ahora para complementar esta información y ratificar la incorporación de los MWCNTs obtuvimos imágenes con RAMAN CONFOCAL utilizando un láser verde para poder observar los MWCNTs incorporados en las fibras de los andamios y sus espectros.

En la figura 24 se puede apreciar la red polimérica formada por el PLA, donde se observan zonas negras que podría ser una indicación de aglomerados de nanotubos, lo que indica que aunque la solución se sometió a ultrasonidos antes de la inyección, los nanotubos volvieron a aglomerarse de nuevo formando grupos de ellos. También se pueden apreciar algunas zonas brillantes que pueden estar asociados con la HA, ya que se trata de un material cerámico, y por lo tanto puede brillar al reflejar la luz que está encendida. Esto demuestra que las fibras tienen una distribución de tamaño, como ya se ha analizado con HRSEM.

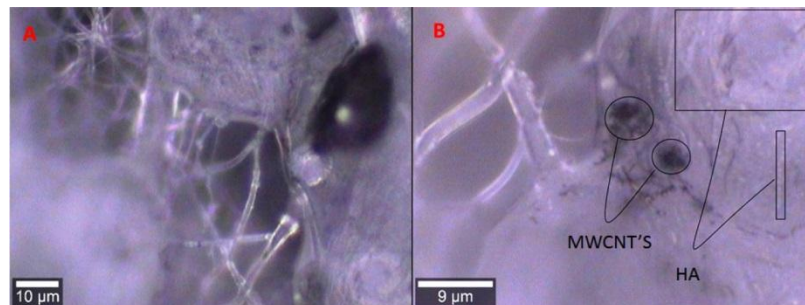


Fig. 24.- Imagen obtenida por Raman-Confocal del composito de PLA+HA-MWCNTs.

La figura 24 muestra las fibras y cómo los MWCNTs están incorporados en ellas. Se observa que los MWCNTs se incorporan en las fibras, sin embargo, la incorporación no es homogénea y hay algunas aglomeraciones. El estudio Raman se llevó a cabo mediante análisis por área y punto para observar las vibraciones moleculares; para obtener el espectro de los MWCNTs, el análisis se hizo donde se observa los aglomerados de MWCNTs, *zonas oscuras* (figura 25d) [44]. La contribuciones de la

molécula de PLA se observa en la figura 25a [43], la figura 25b muestra la incorporación de la HA y su vibración característica a 992cm^{-1} [42], la figura 25c muestra el espectro del composito electrohilado donde se observa dispersión y se ratificó que no hay una interacción química entre PLA y HA/MWCNTs y que estas nanopartículas solamente se incrustan y encapsulan en las fibras del composito.

El espectro de los MWCNTs mostrado en la figura 25, muestra las bandas D, G y G', que son características de los mismos. Se observa que no hay vibración del modo de respiración radial (GBR), que es característico de los SWCNT. La banda D es indicativo de defectos en los MWCNTs causados por las impurezas carbonosas con hibridación sp_3 , que rompen los enlaces sp_2 de las paredes MWCNTs. Otro punto a tener en cuenta en esta banda es que la amplitud de la señal base es identificar la presencia de carbono amorfo, y la intensidad de enlaces sp_2 tipo de referencia, y la relación de las intensidades de las bandas D y G, se obtuvo información sobre el número de defectos presentes. Esto podría ser una razón por la que los MWCNTs no tienen una buena dispersión en las fibras debido a que la funcionalización no fue suficiente. La banda G corresponde a los movimientos de alejamiento y enfoques de átomos de carbono con enlaces sp_2 . La banda G' se atribuye a una banda de sobretono D. No es necesario de la presencia de defectos para ver la señal de G', ya que normalmente no es la presencia de materiales con enlaces sp_2 [44, 45].

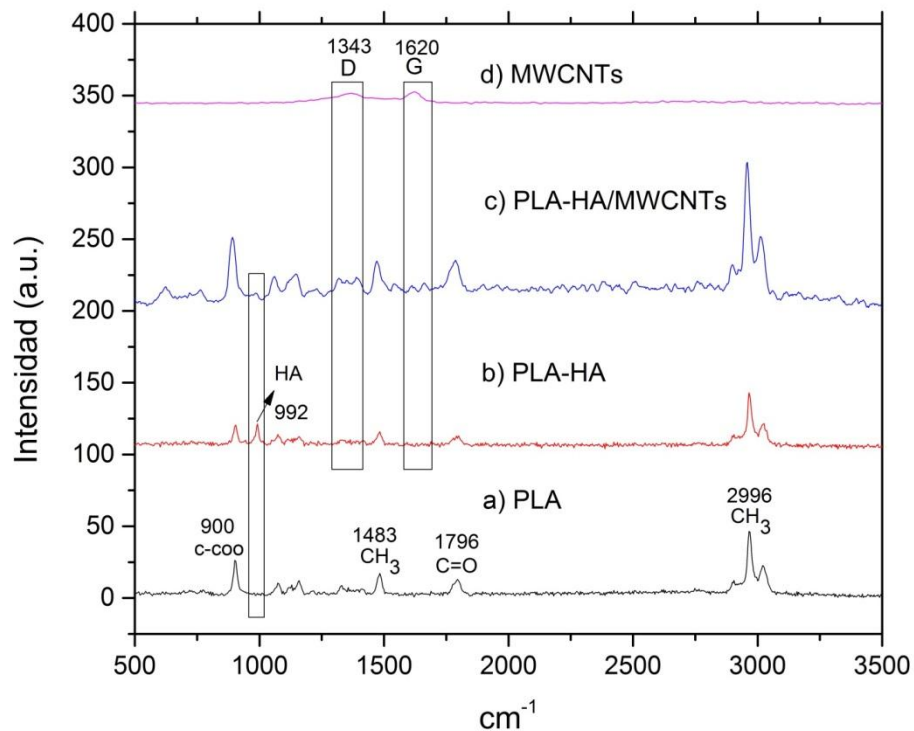


Fig. 25.- Espectros Raman; A) Espectro de la HA obtenido de la región brillante de las fibras del composito, B) Espectro del composito de PLA que fue hecho de manera independiente, C) espectro de los MWCNTs obtenidos de la zona oscura de las fibras del composito, y D) espectro por área del composito de PLA + HA-MWCNTs el cual indica que no hay interacción química entre el PLA y HA-MWCNTs.

7.2.5. - Caracterización del composito electrohilado por DSC/TGA.

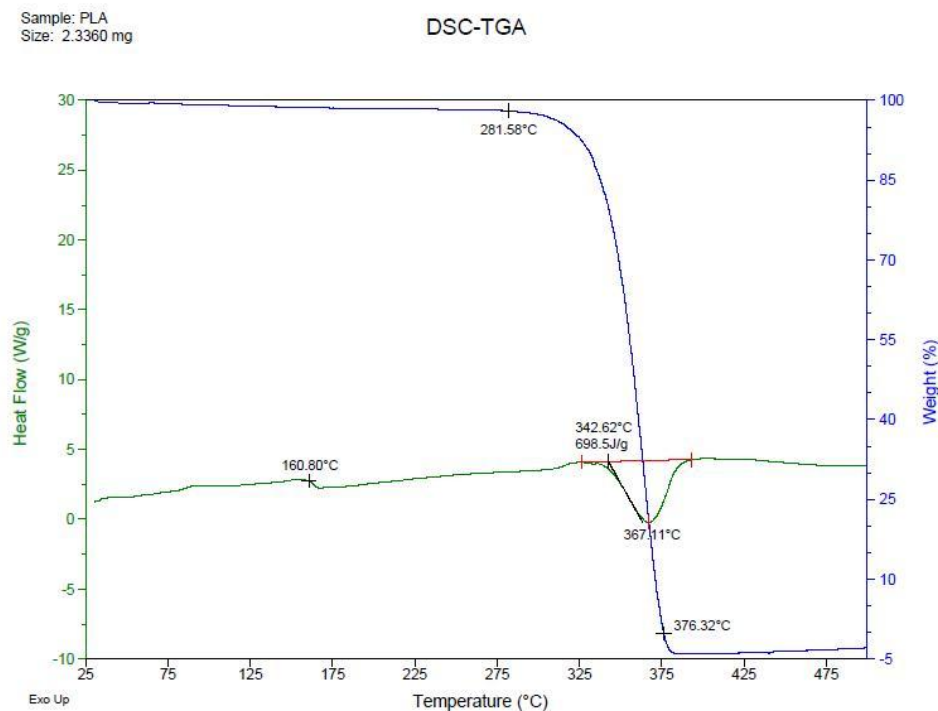


Fig. 26.- Análisis DSC-TGA del andamio de PLA.

El análisis termogravimétrico (TGA) se utiliza para medir los cambios de peso en los andamios electrohilados en función de la temperatura en atmósfera de nitrógeno controlada. La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica de medición para detectar transiciones endotérmicas y exotérmicas, así como determinar las temperaturas de transformación y entalpía de sólidos en adición a los líquidos como una función de la temperatura. El objetivo de hacer este estudio es conocer la transición vítrea de los andamios para tener un parámetro de ello con respecto a la temperatura del cuerpo humano y observar si había un cambio estructural. El primer estudio se hizo para el andamio de PLA para conocer su comportamiento, este se muestra en la figura 26, donde las fibras de ácido poli láctico están perdiendo peso con respecto a la temperatura. Se puede observar que existe un deterioro sustancial que comienza a unos 281 °C y la pérdida de toda su masa a 376 °C. En el análisis DSC muestra una reacción endotérmica que comienza en aproximadamente 342 °C

con una entalpía de 698.5 J/g, esta reacción coincide con la pérdida de masa de las fibras, lo que indica la correlación entre ellos en la temperatura de degradación de las fibras de PLA. La transición vítrea de PLA se da entre 60-65 °C, esto se puede observar en la figura 27, en esta imagen se puede observar dos reacciones endotérmicas, uno de ellas comienza a las 30 °C, y tiene una entalpía de 1.618 J/g. El segundo comienza alrededor de 41 °C con una entalpía de 3.575 J/g [46-48].

En la figura 28 se muestra el análisis DSC/TGA de los compositos electrohilados de PLA + HA y PLA + HA/MWCNTs funcionalizados con grupos carboxilo. Como se mencionó anteriormente la de transición vítrea del PLA se da entre 60-65 °C, en la figura 28 no se ve en detalle en donde está presente la transición, este análisis se muestra a mayor detalle en las figuras 29 y 30. En la figura 28 muestra la reacción endotérmica que se produce en el análisis DSC, la cual se está dando en aproximadamente 367 °C para el composito de PLA + HA y a 365 °C para el composito de PLA + HA/MWCNTs, estas tienen una entalpía de 592.1 J/g y 383.4 J/g respectivamente, indicando la correlación entre la temperatura y la degradación de los compositos analizados [49]. También puede observarse que el peso completo en ambos estudios no se pierde, porque los nanotubos de carbono e hidroxiapatita tienen una temperatura mayor de degradación [50-52].

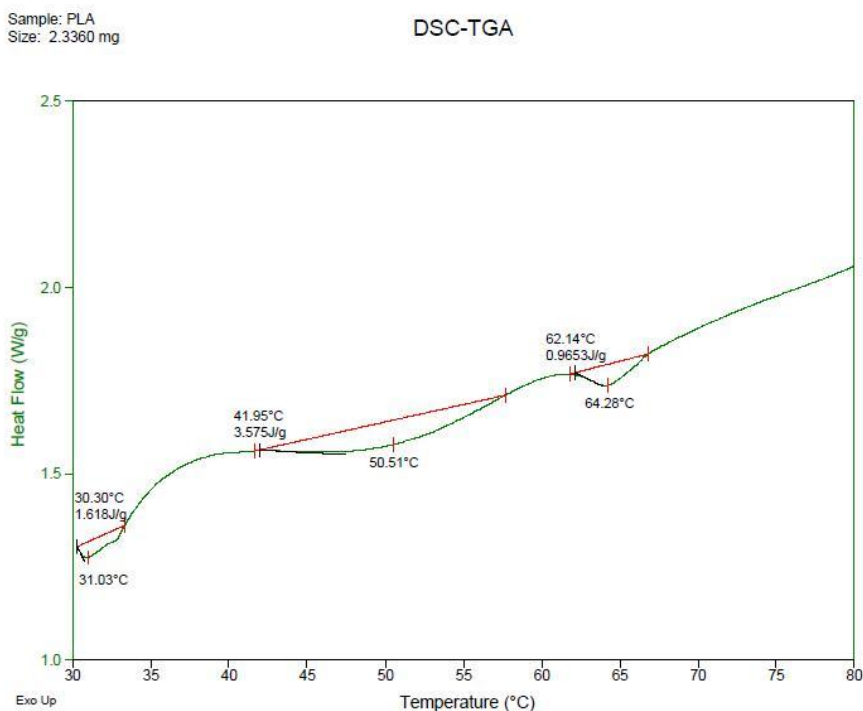


Fig. 27.-Análisis DSC del andamio de PLA donde se observa la transición vítrea.

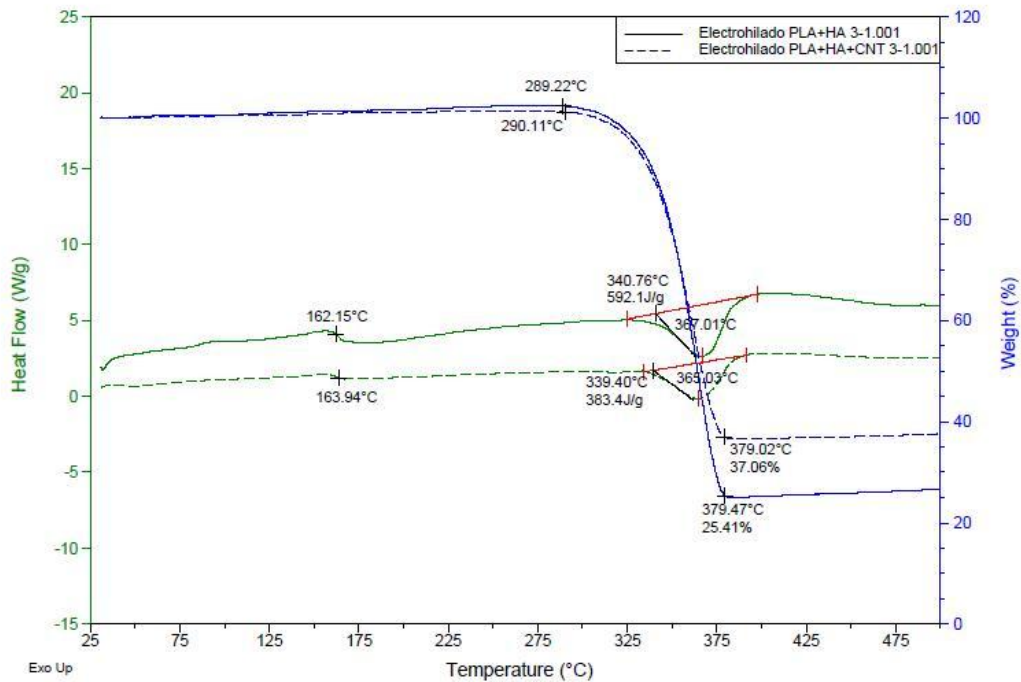


Fig. 28.-Análisis DSC/TGA de los compositos de PLA+HA y PLA+HA-MWCNTs.

En la figura 29 se muestra el análisis DSC de las reacciones endotérmicas, pero no tan notable como en los andamios de PLA. Se observa que las presentes reacciones tienen una entalpía más bajo que en los andamios de PLA incluso las reacciones no son muy notables. Los resultados sugieren que las reacciones se deben a la baja pérdida de masa que se observa en el termograma de TGA (Figura 28). El composito de PLA + HA, es un material compuesto o híbrido al adherirle la HA, por lo tanto sus propiedades cambian y son diferentes que el de los andamios de PLA. Así teniendo en cuenta lo anterior y analizando las propiedades de la HA, las propiedades del composito cambian [50-52]. Como las propiedades del material compuesto (PLA + HA) están cambiando, al parecer este cambio provoco que no se esté presentando la transición vítrea para este composito.

La figura 30 muestra el análisis por DSC del composito de PLA + HA/MWCNTs que muestra sólo una reacción endotérmica que comienza en aproximadamente 38 °C y terminando a 60 °C y tiene una entalpía de 6.83 J/g. El sistema del PLA + HA/MWCNTs tiene una energía de absorción de aproximadamente 0.6717 J/g más que el sistema de PLA pero con un comportamiento diferente. Los compositos de

PLA + HA/MWCNTs son considerados un material compuesto o híbrido, por lo tanto, sus propiedades cambian debido a las propiedades de HA y MWCNTs [53-58]. Aun tomando en cuenta lo anterior y las entalpías de los diferentes andamios, es difícil concluir si se da la transición vítrea para este composito [47].

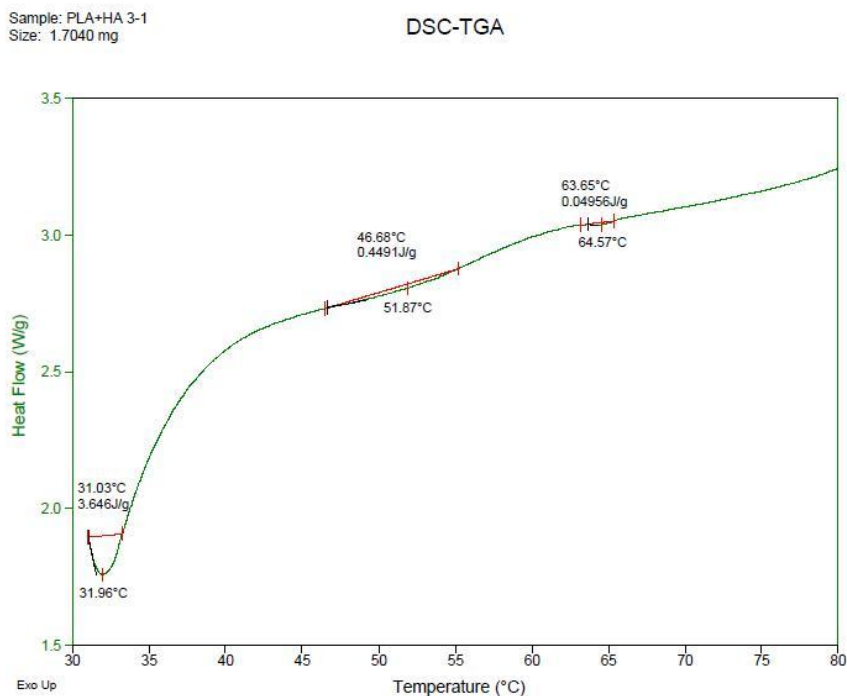


Fig. 29.- Análisis DSC del composito de PLA+HA.

La Tabla 7 muestra los resultados obtenidos en el análisis de DSC/TGA y de acuerdo con estos, la temperatura no será un inconveniente para implantar los andamios del PLA. Como se sabe, la temperatura del cuerpo humano es de 36 ° C a continuación, esta temperatura no induce cambios en su morfología como se ha visto en el análisis DSC/TGA.

Tabla 7.-Resultados DSC de los diferentes materiales analizados.

Sample	T _g (°C)	ΔH (J/g)	ΔH(J/g)	ΔH(J/g)
		About (31 °C)	About (51°C)	About (64°C)
PLA	64.28	1.618	3.575	0.9653

PLA+HA	---	3.646	0.449	0.049
PLA+HA+MWCNT's	?	---	6.830	---

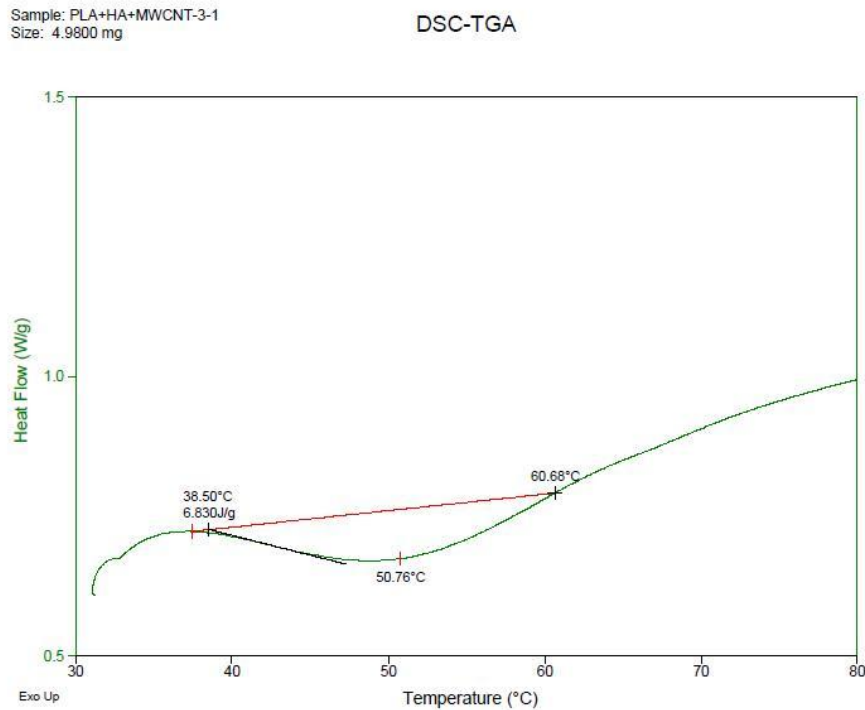


Fig. 30.-Análisis DSC del composito de PLA+HA-MWCNTs.

7.2.6. – Pruebas Mecánicas de Tensión.

Para la obtención de las pruebas de tensión, primero se obtiene un análisis BET (Brunauer-Emmett-Teller) de los andamios electrohilados para saber qué tipo de superficie y porosidad tiene el material obtenido, esto tiene como objeto el obtener el porcentaje de superficie específica del composito electrohilado.

Se realizaron diferentes ensayos de tensión de diferentes compositos electrohilados para observar su comportamiento en esta prueba mecánica. Los cálculos de corrección del porcentaje de área efectiva de andamios se obtuvo mediante análisis BET para obtener resultados lo más fiel posible. En la tabla 8 se muestran los resultados del análisis BET de de los compositos electrohilados, y se observa el

volumen de poro total de los andamios que tiene aproximadamente la misma proporción.

Tabla 8.-Datos obtenidos del análisis BET indicando el volumen total de poro de los compositos electrohilados.

	PLA+HA+MWCNTs
BET g/m²	M-1 0.7845
	M-2 1.0271
Volumen Total de Poro g/ cm³	M-1 0.0007
	M-2 0.0009

Las isotermas obtenidos del análisis BET se pueden observar en la figura 31 donde se muestra la relación entre la cantidad de gas adsorbido por unidad de masa del sólido y la presión relativa de equilibrio. Estos isotermas son características de solidos macroporosos o no porosos, así como un indicativo de una adsorción física en multicapas. El rápido ascenso inicial corresponde a la formación de la primera capa formando una cóncava respecto al eje de las abscisas, al seguir aumentando la presión se forma la segunda capa de moléculas adsorbidas que tiene un comportamiento cuasilineal, y así sucesivamente hasta que se produce la completa cubierta de la superficie de la muestra y llenado de los poros. Al punto de la cóncava donde inicia el comportamiento cuasilineal se le denomina punto “B”, y es un indicativo que se ha completado la monocapa y empieza la formación de las monocapas. La relación entre el volumen de gas adsorbido y la presión relativa de equilibrio debería asemejarse a una recta “ $y = a + bx$ ”, ya que el método BET no es válido si no se obtiene una recta o si hay una interacción negativa [59-61].

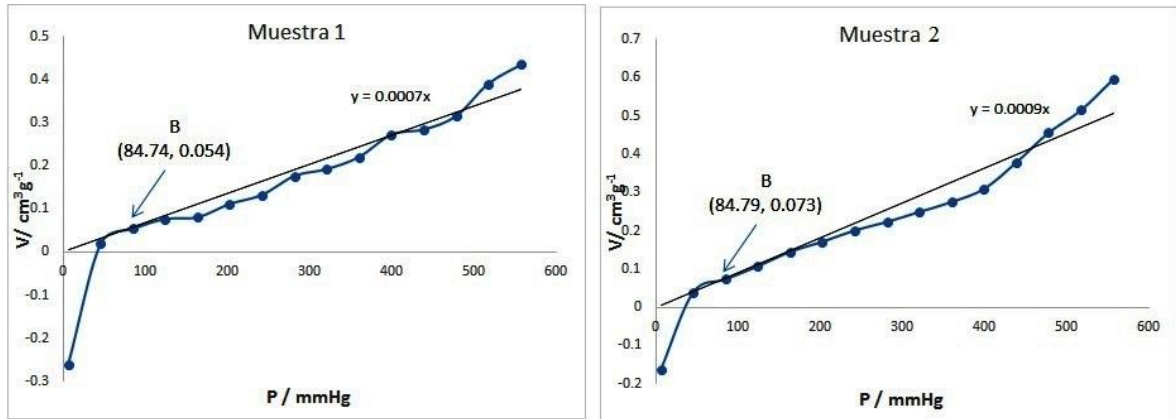


Fig. 31.-Isotermas de los compositos analizados por BET.

Para términos prácticos obtuvimos el volumen de la muestra en porcentaje como se muestra en la tabla de resultados 9, para la obtención del volumen en términos porcentual se realizó de la siguiente manera:

$$\% V = \left(\frac{V_{SYS} - V_{gas}}{V_{gas}} \right) * 100$$

Los resultados obtenidos en términos porcentual del volumen de la muestra se tomaron en cuenta para la corrección de la superficie específica en las pruebas mecánicas.

Tabla 9.-Tabla de resultados del equipo BET para la obtención del volumen porcentual de las muestras del composito.

	Muestra 1		Muestra 2	
		Uds		Uds
Cantidad de gas diferencial (V_h)	0.079	cm ³	0.091	cm ³
Presión máxima de la muestra (P_h)	556.82	mmHg	556.28	mmHg
Peso de la muestra (W_{sam})	0.0079	g	0.0114	g
Densidad	0.454	g/cm ³	0.571	g/cm ³
V_{sys}	0.108	cm ³	0.124	cm ³
V_{sam}	0.017	cm ³	0.0199	cm ³
V_{gas}	0.382	cm ³	0.071	cm ³
%de Muestra	75.043	%	75.213	%

El ensayo de tracción es importante para evaluar el comportamiento mecánico del andamio. Las nanoestructuras de HA/MWCNTs dentro de la matriz PLA promueven un efecto de confinamiento para restringir el movimiento segmentario del polímero y mejorar el rendimiento mecánico. Se investigó el efecto de la cantidad de HA/MWCNTs en las propiedades mecánicas de las fibras de PLA. Los resultados influirán en la fase 2 del trabajo sobre el composito electrohilado o andamios para buscar mejores propiedades mecánicas sin afectar la proliferación celular con la toxicidad de las nanopartículas. Por lo tanto, es necesario tener una relación adecuada entre el máximo de nanopartículas que se pueden utilizar para dar las propiedades mecánicas adecuadas, no provocando una citotoxicidad que nos cause muerte celular y no inhiba de una proliferación celular en los compositos. La figura 32 muestra la gráfica de tensión-deformación del composito de PLA + HA/MWCNTs. Dos zonas se están mostrando en el gráfico; la zona elástica y la zona plástica [62], los resultados obtenidos en los ensayos de tracción se procesaron en *Wolfram Mathematica 10*.

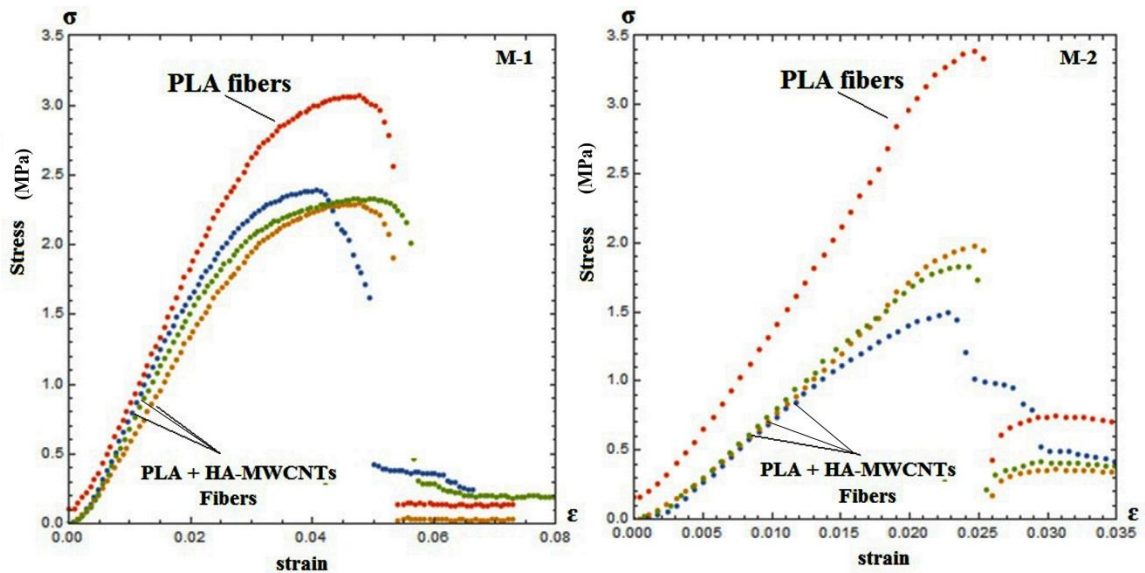


Fig. 32.-Gráfica de tensión-deformación de diferentes compositos electrohilados.

Los resultados promedio de estos ensayos de tracción muestran que el módulo de Young es de 81.875 ± 8.1 MPa, el resumen de los resultados de tensión se muestran en la tabla 10. La humedad afecta a los resultados de las pruebas mecánicas del material, así como que puede causar una reducción en la resistencia y la dureza [63].

Tabla 10.-Módulo de Young del andamio de PLA y los compositos de PLA + HA/MWCNTs. La muestra M-1 representa una cantidad de 500 mg de HA y 166 mg de MWCNT. La muestra M-2 representa una cantidad de 750 mg de HA y 187 mg de MWCNT.

Muestras	Modulo de Young (MPa)	STD \pm (MPa)
PLA	33.007	2.578
PLA+HA+MWCNT M-1	81.875	8.984
PLA+HA+MWCNT M-2	86.597	5.505

Los resultados de las pruebas de tensión son más altos en comparación con los obtenidos por otros autores que fabrican andamios PLA + HA, aunque estas propiedades mecánicas dependen de las condiciones electrospinning, disolventes, tipo de hidroxiapatita y la morfología principalmente. También hay obras donde las propiedades mecánicas son muy superiores a los obtenidos en este trabajo, esto varía según lo anterior, y uno de los factores más influyentes en estas pruebas es la morfología de la fibra [64, 65, 66].

7.2.7. – Viabilidad celular del composito electrohilado usando la línea celular hFOB 1.19 (ATCC CRL-11372).

El ensayo de MTS se realizó para determinar la citotoxicidad de los diferentes andamios PLA con el objetivo de identificar potencialmente la relación entre HA y MWCNTs que combina buenas propiedades mecánicas y biocompatibilidad. Los resultados del ensayo MTS se presentan en la Figura 33. Después de 24 h y 48 h de exposición de extractos de PLA con HA/MWCNTs, no mostraron efecto significativo sobre la viabilidad celular a concentraciones más bajas (6,25%, 12,5% y 50%). La única reducción en la viabilidad de la hFOB se observó a una concentración de extracto al 100%, la exposición a extracto concentrado alto en células hFOB induce una reducción en el formazan producido. Estos resultados sugieren un potencial deterioro de las mitocondrias de las células hFOB inducidas por andamios extracto. Sin embargo, cabe destacar que entre los andamios, las concentraciones bajas de extractos de HA/MWCNTs mostraron la mayor biocompatibilidad en las células hFOB.

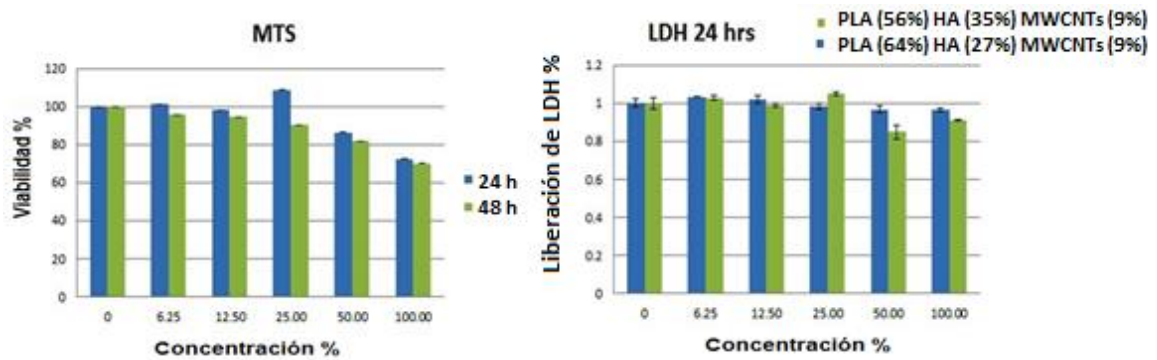


Fig. 33.-Ensayo MTS a las 24 h y 48 h para observar la viabilidad celular de las células hFOB en el extracto de PLA + HA/MWCNTs, y un estudio complementario de LDH para observar el comportamiento celular a las 24 h.

Un análisis complementario de LDH a las 24 h mostró la estabilidad en las diferentes muestras de concentraciones con respecto al control (Figura 33). En la Figura 33 se observa que a una concentración del 25% que existe viabilidad celular a las 24 h y 48 h, teniendo en cuenta el límite establecido para el cultivo celular es del 80%. En el análisis de LDH suplementario se observa que en la concentración del 25% existe una baja activación de la LDH. Este hecho parece sugerir el límite de nanopartículas que se pueden añadir al andamio. Por otro lado, hay actividad celular después del 25%, aunque MTS indica baja viabilidad.

Este análisis fue de gran ayuda para tratar de entender el comportamiento de las células de acuerdo con una serie de nanopartículas que deben utilizarse en los andamios. De acuerdo con estos resultados, la cantidad aproximada de HA que se sugiere usar es de 188 mg y 10 mg de MWCNTs con una concentración del PLA al 12% (p/v).

Investigaciones sugieren que los compuestos poliméricos realizan mejores resultados usando una concentración de nanotubos de carbono entre 0,5% en peso y 1% en peso. Los porcentajes de peso superiores al 4% disminuyen las propiedades mecánicas porque estos compuestos tienen una mayor porosidad y una distribución homogénea baja de los nanotubos. El porcentaje de peso que se obtuvo en este trabajo fue de 0,8% con respecto al PLA al 12% (p/v), reforzando lo descrito en la literatura [67, 68]. Sin embargo, los porcentajes dados en el estado del arte de los nanotubos están

orientados para obtener las mejores propiedades mecánicas sin tener en cuenta la parte toxicológica. Esta investigación tiene en cuenta el efecto citotóxico de los nanotubos de carbono para proporcionar la cantidad más adecuada de nanotubos de carbono y dar las mejores propiedades mecánicas.

Es bien sabido que la hidroxiapatita beneficio biocompatibilidad debido a sus propiedades químicas y físicas son similares a los huesos humanos [69]. Sin embargo, en un compuesto, su comportamiento es similar a los nanotubos de carbono. La hidroxiapatita con mayor porcentaje causa alta porosidad y baja distribución homogénea en un compuesto; Por lo tanto, las propiedades mecánicas disminuye [70].

FASE 2 DEL PROYECTO

8.- OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS Y SU EFECTO EN LOS RESULTADOS FINALES.

La segunda etapa del trabajo consiste en tomar los resultados de la fase 1 para optimizar nuestros andamios, y así reportar la fabricación y caracterización de andamios electrohilados de ácido poli láctico bajo las nuevas condiciones obteniendo características y propiedades que benefician la biointegración y conformación del cultivo 3D. Se seleccionaron variables específicas del proceso de electrospinning para obtener propiedades que pudieran imitar el tejido óseo. Este objetivo debe ser abordado mediante el uso de hidroxiapatita y nanotubos de carbono multipared para mejorar las propiedades y lograr la función mímica. Se utilizó una proporción en peso de 19:1 de HA/MWCNTs que mejora las propiedades biológicas y mecánicas de los andamios [71].

Los nuevos parámetros de electrohilado se muestran en la tabla 11.

Tabla 11.-Parámetros del proceso de electrospinning para obtener morfología que beneficie la biointegración.

PARAMETROS DEL PROCESO DE ELECTROHILADO	VALORES F-2
Caudal (mL/h)	3
Voltage (kV)	15
Temperatura (°C)	30
Distancia entre la aguja y el rodillo colector (cm)	15
Velocidad del rodillo colector (rpm)	1700

8.1.- Resultados HRSEM de los andamios de PLA-HA/MWCNTs, segunda fase.

Es bien sabido que tanto la composición química y la morfología de la superficie de andamios son características determinantes de un sustrato para la proliferación de células adecuadas [72-74]. Como se explicó en el apartado anterior, los parámetros de electrohilado se adaptaron para obtener andamios de PLA que imiten la morfología

del tejido óseo para promover la biointegración de los andamios y estimular la proliferación de los osteoblastos.

La figura 34a muestra una imagen HRSEM típica de los andamios de PLA-HA/MWCNTs, mientras que la figura 34b muestra el histograma construido con los valores de diámetro de las fibras medidas en diferentes regiones de una muestra representativa usando el software ImageJ, obteniendo un diámetro medio de las fibras de $0.407 \mu\text{m}$. Vale la pena observar que todas las muestras preparadas mostraron una topología como la que se muestra en la Figura 3a., la cual se compone de fibras orientadas al azar con una superficie rugosa que se asemeja a la morfología del hueso [29, 63, 75].

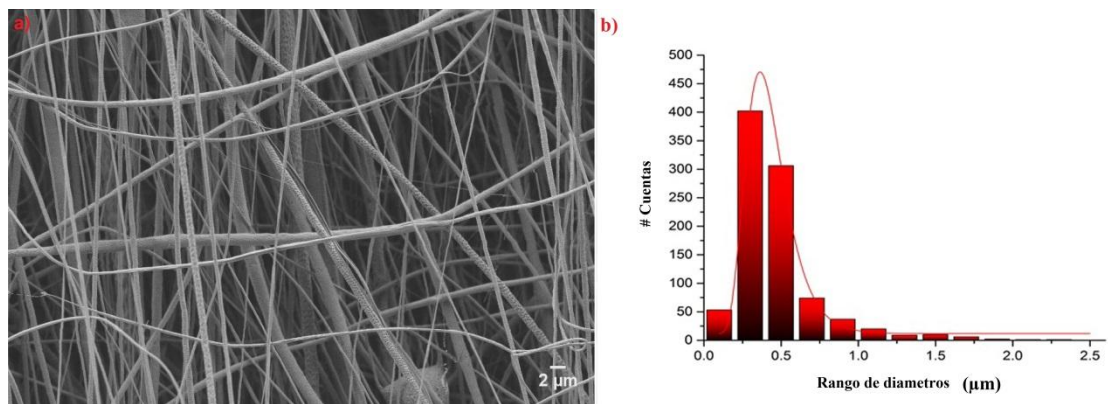


Fig. 34.-a) Imagen HRSEM de andamios de PLA-HA/MWCNTs que muestran la morfología de las fibras de la muestra. b) Histograma de los diámetros de las fibras ($0.407 \mu\text{m} \pm 0.006$).

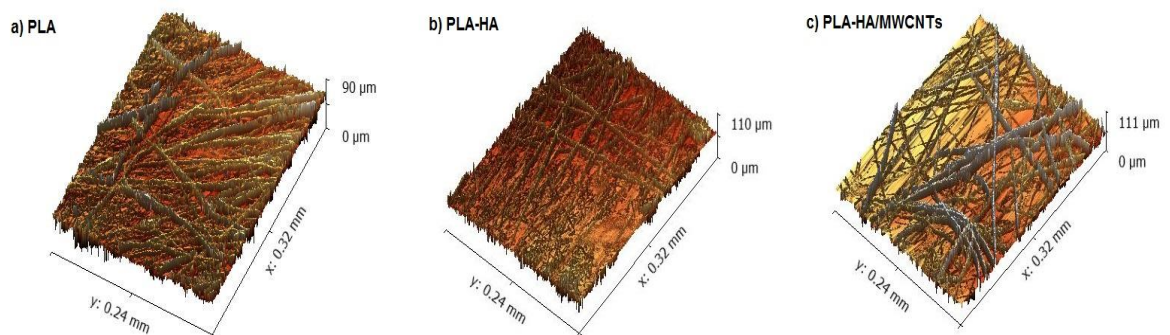


Fig. 35.-Rugosidad aritmética de los andamios de PLA-HA/MWCNTs: a) PLA = 7.376 ± 0.36 , b) PLA-HA = 13.994 ± 0.92 and c) PLA-HA/MWCNTs = $13.802 \pm 0.69 \mu\text{m}$.

En la imagen 35 podemos observar como los andamios hilados forman una figura 3D, donde es muy claro que al incorporar HA/MWCNTs obtenemos una superficie

porosa mayor con respecto a la de PLA; esto nos da como resultado una posible mejor adhesión celular [76-77]. Los valores de rugosidad aritmética (Ra) de los andamios de PLA, PLA-HA y PLA-HA/MWCNTs fueron de 7.376 ± 0.36 , 13.994 ± 0.92 y 13.802 ± 0.69 μm respectivamente. La rugosidad aritmética fue obtenida usando un Perfilometro óptico 3D Contour Elite™.

8.2.- Análisis FTIR, segunda fase.

Los espectros de absorción de FTIR de los andamios de PLA, PLA-HA y PLA-HA/MWCNTs se muestran en la figura 36. Todos ellos muestran las vibraciones de IR correspondientes al grupo C = O a 1751 y 1085 cm^{-1} , y el grupo CH_3 a 1452 cm^{-1} , las bandas 1128 y 1041 cm^{-1} corresponden a las vibraciones C = O y OH; todas estas vibración provenientes de la molécula PLA (figura 36a) [78-79]. Al incorporar la HA, la banda 1128 cm^{-1} se ensancha y la banda 1041 cm^{-1} se desplaza a 1043 cm^{-1} , esto sugiere que hay una interacción ión-dipolo entre el grupo OH de PLA y el ion Ca^{2+} de HA [80], como se ilustra en la figura 37. Obsérvese que no se pudo detectar la banda FTIR MWCNT probablemente debido a su distribución y la incorporación en una Pequeña cantidad en la matriz PLA. Un efecto similar también fue observado por Aleksandra Weselucha-Birczynska [81].

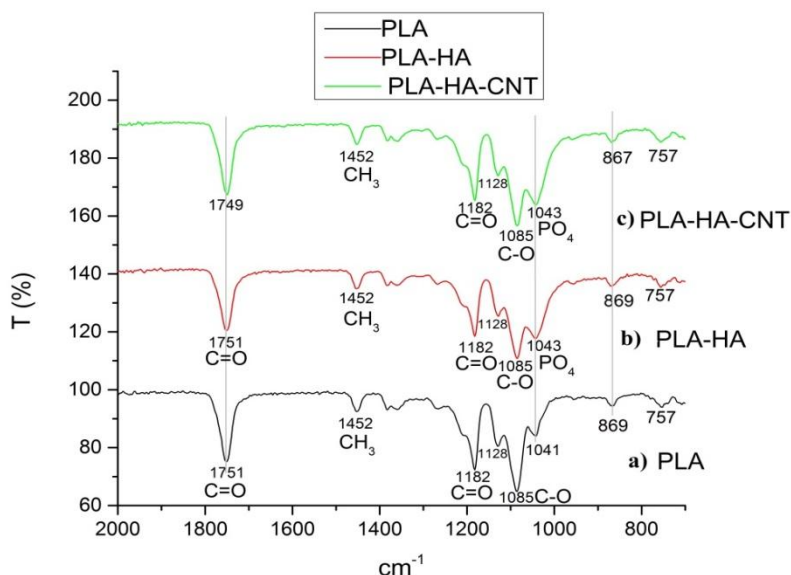


Fig. 36.- Espectro FTIR de a) PLA, b) PLA-HA and PLA-HA-MWCNTs.

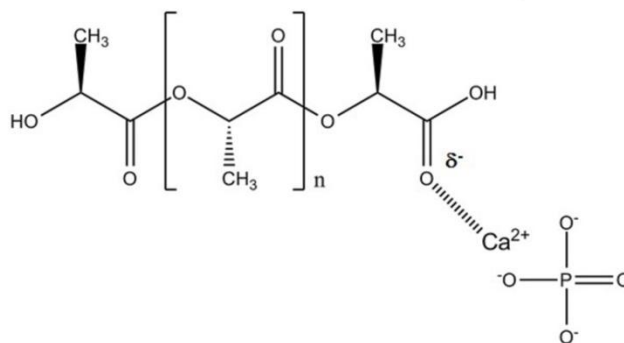


Fig. 37.-Una forma esquemática de la posible interacción del ión-dipolo de la molécula PLA con el ion calcio.

8.3.- Espectroscopia Raman, segunda fase.

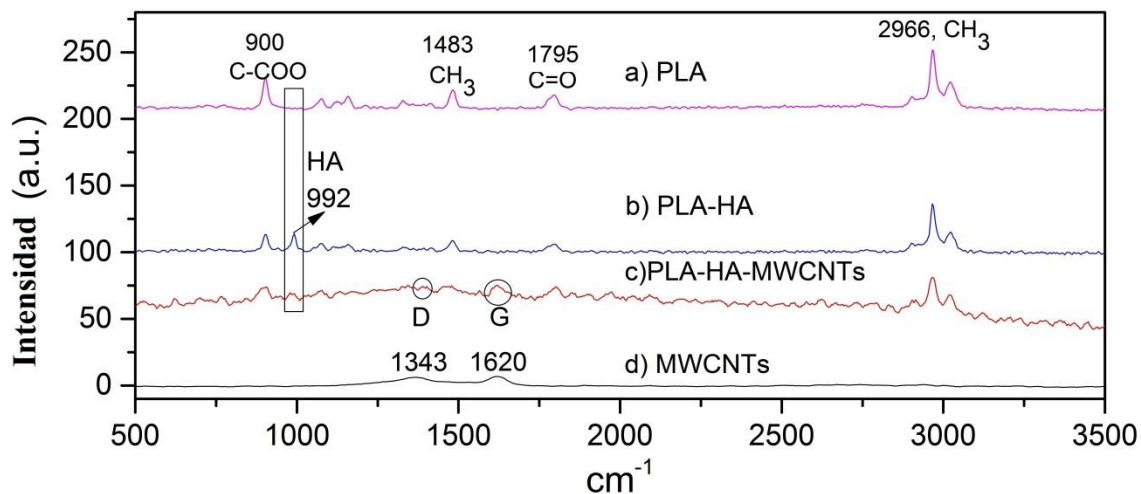


Fig. 38.-Raman de andamios de a) PLA, b) PLA-HA, y c) PLA-HA/MWCNT. La Figura 35d muestra las bandas de Raman G y D de MWCNTs, que aparecieron como las bandas débiles en el espectro Raman de HA/MWCNT (indicado por los círculos en la figura 7c).

La técnica Raman se llevó a cabo para la investigación adicional sobre la incorporación de HA y MWCNTs en la matriz de PLA. La Figura 38 muestra espectros Raman de: (a) PLA puro, (b) compuesto de PLA-HA y (c) compuesto de PLA-HA/MWCNTs. El espectro Raman de PLA (Figura 38a) muestra sus bandas típicas a 2966 y 1483 cm^{-1} correspondiendo al estiramiento simétrico CH_3 , el estiramiento $\text{C} = \text{O}$ a 1795 cm^{-1} y el estiramiento C-COO a 900 cm^{-1} . La adición de

HA y HA-MWCNTs a la matriz de PLA preserva todas las bandas Raman PLA y se detectaron nuevas bandas. Obsérvese que el espectro de PLA-HA (Figura 38b) muestra la vibración característica del grupo de fosfato de HA (PO₄) a 992 cm⁻¹ [82], lo que indica que la HA se ha incorporado de manera efectiva en los andamios de PLA. Sin embargo, los MWCNTs eran apenas detectables porque se observaron bandas débiles de Raman en 1368 (banda D) y 1620 cm⁻¹ (banda G) [83-84] en el espectro PLA-HA/MWCNTs (Figura 38c).

8.4.- Ensayos de tracción, segunda fase.

Las propiedades mecánicas de los andamios preparados se evaluaron midiendo el esfuerzo bajo deformación para cada muestra. El módulo de elasticidad se obtuvo a partir de los datos de esfuerzo-deformación (Figura 39) utilizando el software Texture Expert Exceed 7.16 y aplicando la Young Eq. 1 [62].

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{F/S}{\Delta L/L}$$

La Figura 39 muestran las curvas tensión-deformación de los andamios PLA, PLA-HA y PLA-HA/MWCNTs, las cuales muestran un módulo de Young promedio de 6.983, 17.725 y 19.993 MPa respectivamente. Por lo tanto, la resistencia mecánica del andamio mejora a medida que se añaden HA y MWCNT al soporte de PLA. Este aumento se debe a una buena dispersión del nanomaterial en las fibras y al cambio de las variables de electrospinning para mejorar las propiedades de tracción [64-65]. Los resultados de los ensayos de tracción se muestran en la tabla 12 con la correspondiente desviación estándar.

Tabla 12.-Esfuerzo-Deformación de los andamios de PLA, PLA-HA y PLA-HA/MWCNTs.

Muestras	Módulo de Young (MPa)	STD ± (MPa)
PLA	6.983	0.017
PLA-HA	17.725	0.074
PLA+HA/MWCNTs	19.993	0.071

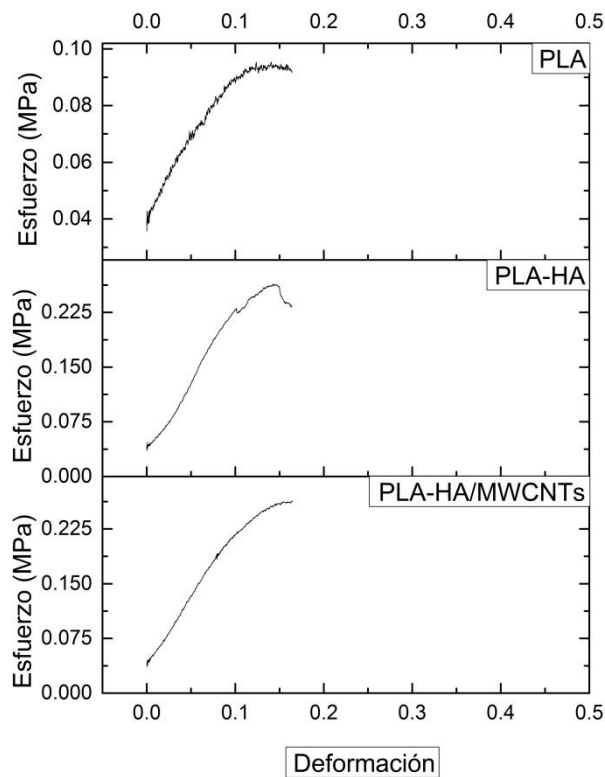


Fig. 39.-Graficas de esfuerzo-deformación de los andamios de PLA, PLA-HA, and PLA-HA/MWCNTs.

8.5.- Ensayo citotóxico, segunda fase.

Debido a la posible interacción directa y prolongada entre el andamio PLA-HA/MWCNTs y el tejido óseo, la evaluación de su biocompatibilidad es una etapa crítica para detectar compuestos y caracterizar de los efectos potencialmente dañinos de los andamios antes del uso clínico. El ensayo de citotoxicidad in-vitro descrito en la norma ISO 10993-1: 2009 tiene por objeto proteger a los seres humanos de riesgos potencialmente biológicos derivados del uso de dispositivos médicos a través de la medición cualitativa y cuantitativa de la viabilidad de las células cultivadas. Por lo tanto, decidimos evaluar el potencial citotóxico de los andamios PLA-HA/MWCNTs a través de la exposición directa o indirecta (extractos) de osteoblastos humanos.

La actividad mitocondrial y la viabilidad del crecimiento de células de osteoblastos de hFOB (ATCC CRL-11372) en andamios de PLA se ensayaron después a 24, 48 y 72 h de incubación.

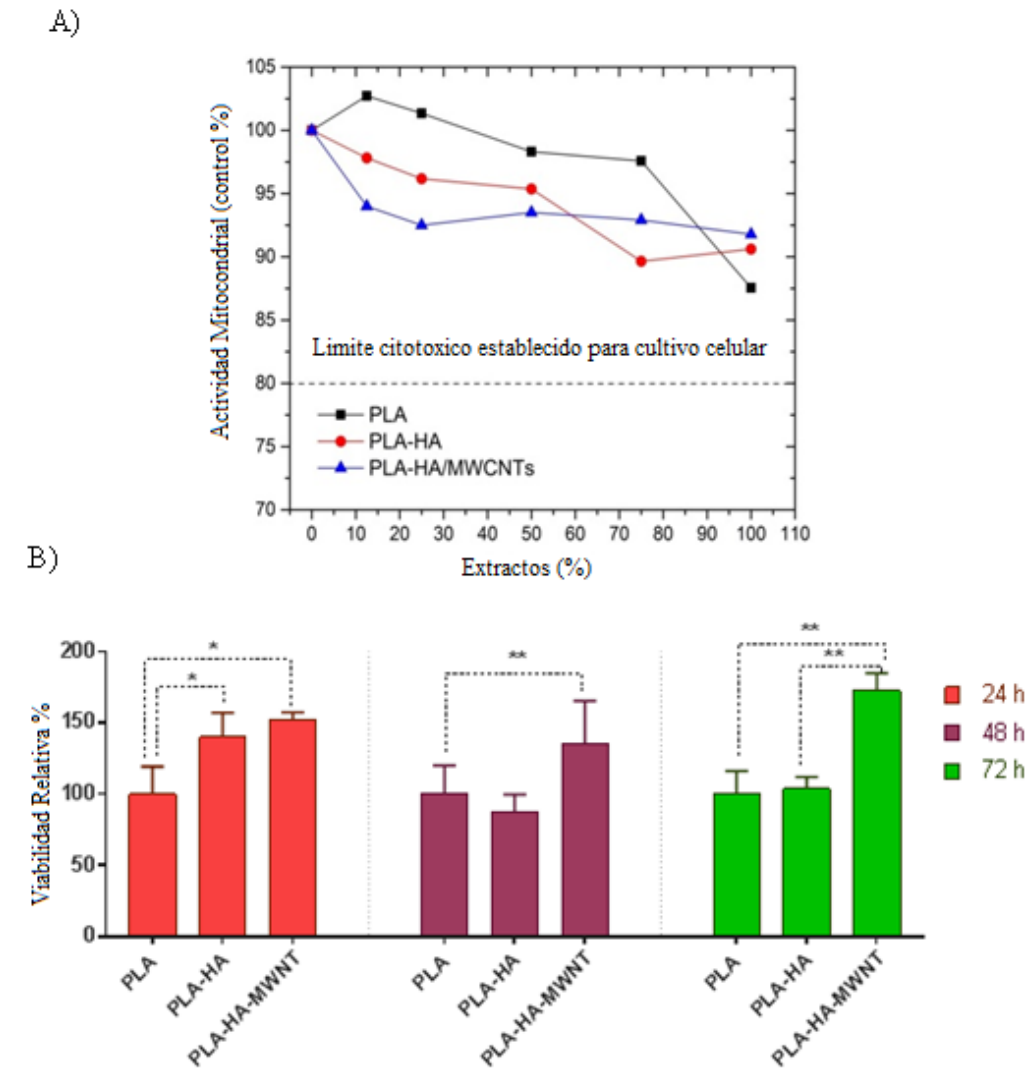


Fig. 40.-Actividad mitocondrial y la viabilidad celular de las células hFOB evaluadas por el método de reducción MTS y MTT respectivamente en andamios de PLA, PLA-HA y PLA-HA/MWCNTs.

La figura 40A muestra que el efecto citotóxico de los tres extractos de andamios sobre la actividad mitocondrial no fue significativo debido a que los valores obtenidos estaban entre los rangos de toxicidad permisible (80-100%).

En la figura 40B, se tomó como referencia (100%) el andamio PLA, esto con la finalidad de verificar si la adición de HA y HA-MWNT al PLA mejoran las propiedades que faciliten el anclaje celular y proliferación de los osteoblastos. Por lo anterior todos los valores de PLA tienen el 100% de viabilidad. A las 24 horas se ve un ligero incremento en la viabilidad de los cultivos que crecieron sobre el PLA-HA y el PLA-HA-MWNT, esto indica que las modificaciones hacen que haya más osteoblastos sobre estos dos andamios. Sin embargo, a los 48 y 72 horas se hace evidente que algo sucedió con el andamio PLA-HA ya que la viabilidad cae y es muy similar al grupo de comparación. Lo anterior puede deberse a que muchos osteoblastos se unen inicialmente, pero no son capaces de seguir proliferando, recordar que la células tienen tiempo de duplicación cercano a las 30 horas. Por lo tanto lo que vemos a las 24 horas puede ser el reflejo de lo que se sembró inicialmente. Por el contrario en el andamio PLA-HA-MWNT, a las 72 horas hay más células que en las 24, por lo que se hipotetiza que esta superficie además de permitir que los osteoblastos se unan en mayor cantidad, también proveen una superficie adecuada para que estos proliferen (se dividan). Esto trasladado en un organismo, representaría ventajas por que los tiempos de saneamiento o osteointegración serían más rápidos en los andamios PLA-HA-MWNT respecto al PLA solo.

9.- CONCLUSIONES

El trabajo de tesis consistió en usar un biopolímero como lo es el ácido poli láctico (PLA), para la realización de un composito electrohilado con hidroxiapatita (HA) y nanotubos de carbono de multicapa para ayudar a la regeneración del tejido óseo. La HA y MWCNTs fueron introducidos en las fibras de PLA actuando esta como una matriz polimérica; La HA fue utilizada por sus propiedades químicas similares a las del hueso humano, teniendo esta una interacción ion-Dipolo con la molécula de PLA ocasionando un cambio morfológico en las fibras obtenidas las cuales propicia una mejor adhesión celular. La integración de MWCNTs en principio fue utilizado en primer plano para mejorar las propiedades mecánicas del composito, por lo cual se integraron grandes cantidades de estos en el composito, mas sin embargo se comprobó que estas cantidades grandes ciertamente aumentan las propiedades mecánicas, pero también aumenta el grado de toxicidad. Se adecuo una proporción entre HA y MWCNTs para su uso en el composito de manera que no inhibiera la proliferación celular en el composito electrohilado. Esta adecuación dio como resultado una mejor superficie para las células osteoblasticas para conformar andamios de cultivo 3D.

Con lo anterior quedo demostrado también que la técnica de electrohilado es una técnica eficaz para la producción y obtención de matrices porosas. Se lograron obtener andamios con una buena porosidad superficial suficiente para que las celular osteoblasticas puedan introducirse en la matriz y formar andamios 3D, así mismo dicha porosidad también promueve una mejor adhesión celular. Se observó también que el cambio de las propiedades cuando los materiales HA/MWCNTs cambiaron de manera contundente mostrando la versatilidad de la técnica para crear compositos electrohilados. Se demostró como la versatilidad de la técnica de electrohilado cambia las propiedades de las matrices poliméricas con forme a las propiedades que se deseen con tan solo mover los parámetros de hilado.

10.- PERSPECTIVAS

Con los resultados obtenidos en el trabajo de tesis que se presentó, este trabajo tiene como objeto seguir mejorando la biocompatibilidad de los andamios de PLA y pasar de modelos *in vitro* a modelos *in vivo*.

Para seguir mejorando los modelos *in vitro* se necesita más evidencia sobre la viabilidad de los andamios de PLA con HA/MWCNTs. Se pueden realizar estudios sobre la adhesión celular y obtener imágenes de esta. Otro punto que se puede desarrollar es si las nanoparticulas de HA/MWCNTs causan efectos sobre la morfología de la célula, esto además del estudio de LDH se podría trabajar tiñendo los núcleos y el cito esqueleto de las células.

Para los modelos *in vivo*, se tendría que realizar un protocolo para el uso de los andamios en animales para poder obtener resultados con éxito.

Otro punto muy importante sería utilizar un copolímero para seguir mejorando la adhesión celular debido que los resultados demostraron que una matriz de PLA no es suficiente para inducir buena adhesión celular. O por otro lado también se puede considerar el uso de alguna proteína para el mejoramiento de la adhesión.

Finalmente, es de nuestro interés observa si es mejor los nanotubos de carbono o los óxidos de grafeno para su uso en andamios polímeros con orientaciones biológicas.

11.- BIBLIOGRAFIA

- [1].- Albert Ortiz M., Nanotecnología y biomedicina, NOVA - Publicación Científica EN CIENCIAS BIOMÉDICAS - ISSN: 1794-2470 Vol.7 No. 11 ENERO - JUNIO DE 2009:1-110.
- [2]. Venugopal, J., & Ramakrishna, S. (2005). Applications of polymer nanofibers in biomedicine and biotechnology. *Applied biochemistry and biotechnology*, 125(3), 147-157.
- [3].- Zárate-Kalfópulos, B., & Reyes-Sánchez, A. (2006). Injertos óseos en cirugía ortopédica. *Cirugía y Cirujanos*, 74(3), 217-222.
- [4]. - . Bucholz, R. W., Carlton, A., & Holmes, R. (1989). Interporous hydroxyapatite as a bone graft substitute in tibial plateau fractures. *Clinical orthopaedics and related research*, 240, 53-62.
- [5]. Cho, D. Y., Lee, W. Y., Sheu, P. C., & Chen, C. C. (2005). Cage containing a biphasic calcium phosphate ceramic (Triosite) for the treatment of cervical spondylosis. *Surgical neurology*, 63(6), 497-503.
- [6]. - Urist, M. R. (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science*, 150(3698), 893-899.
- [7]. - Ludwig, S. C., & Boden, S. D. (1999). Osteoinductive bone graft substitutes for spinal fusion: a basic science summary. *Orthopedic Clinics of North America*, 30(4), 635-645.
- [8]. - Södergård, A., & Stolt, M. (2010). Industrial production of high molecular weight poly (lactic acid). *Poly (Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications*, 27-41.
- [9].- Yun, J. S., Wee, Y. J., & Ryu, H. W. (2003). Production of optically pure L (+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(4), 416-423.

- [10].- Datta, R., Tsai, S. P., Bon Signore, P., Moon, S. H., & Frank, J. R. (1995). Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives. *FEMS microbiology reviews*, 16(2-3), 221-231.
- [11]. - Södergård, A., & Stolt, M. (2002). Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Progress in polymer science*, 27(6), 1123-1163.
- [12]. - Garlotta, D. (2001). A literature review of poly (lactic acid). *Journal of Polymers and the Environment*, 9(2), 63-84.
- [13]. - Auras, R. A., Lim, L. T., Selke, S. E., & Tsuji, H. (Eds.). (2011). *Poly (lactic acid): synthesis, structures, properties, processing, and applications* (Vol. 10). John Wiley & Sons.
- [14]. - Chang R., Química 10 ma, ISBN: 978-607-15-0307-7.
- [15]. - Terrones, M., & Terrones, H. (2003). The carbon nanocosmos: novel materials for the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 361(1813), 2789-2806.
- [16]. - Dresselhaus, M. S., Dresselhaus, G., & Eklund, P. C. (1996). *Science of fullerenes and carbon nanotubes: their properties and applications*. Academic press.
- [17].- Ahmad, W. Y., & Zakaria, M. B. (2000). Drawing Lewis Structures from Lewis Symbols: A Direct Electron-Pairing Approach. *J. Chem. Educ*, 77(3), 329.
- [18]. - Iijima, S. (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *nature*, 354(6348), 56.
- [19]. - Takesue, I., Haruyama, J., Kobayashi, N., Chiashi, S., Maruyama, S., Sugai, T., & Shinohara, H. (2006). Superconductivity in entirely end-bonded multiwalled carbon nanotubes. *Physical review letters*, 96(5), 057001.
- [20]. - Kumar, M., & Ando, Y. (2010). Chemical vapor deposition of carbon nanotubes: a review on growth mechanism and mass production. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 10(6), 3739-3758.

- [21]. - Andrade Guel, M. L., López López, L. I., & Sáenz Galindo, A. (2012). Nanotubos de carbono: funcionalización y aplicaciones biológicas. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 43(3), 9-18.
- [22]. - Londoño-López, M. E., Echavarría-Velásquez, A., & Calle, F. D. L. (2014). Características cristalquímicas de la hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas.
- [23]. - <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/1054/2/>, Consulta (28 de octubre Del 2013).
- [24].-<http://www.membranechemicals.com/es/membrane-test/eds-energy-dispersive-spectroscopy/>, consulta (10 de junio del 2014).
- [25]. - Li, D., Wang, Y., & Xia, Y. (2003). Electrospinning of polymeric and ceramic nanofibers as uniaxially aligned arrays. *Nano letters*, 3(8), 1167-1171.
- [26]. - Ki, C. S., Baek, D. H., Gang, K. D., Lee, K. H., Um, I. C., & Park, Y. H. (2005). Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin–formic acid solution. *Polymer*, 46(14), 5094-5102.
- [28]. - Demir, M. M., Yilgor, I., Yilgor, E. E. A., & Erman, B. (2002). Electrospinning of polyurethane fibers. *Polymer*, 43(11), 3303-3309.
- [29]. - Huang, Z. M., Zhang, Y. Z., Kotaki, M., & Ramakrishna, S. (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites science and technology*, 63(15), 2223-2253.
- [30]. - Lee, J. S., Choi, K. H., Ghim, H. D., Kim, S. S., Chun, D. H., Kim, H. Y., & Lyoo, W. S. (2004). Role of molecular weight of atactic poly (vinyl alcohol)(PVA) in the structure and properties of PVA nanofabric prepared by electrospinning. *Journal of Applied Polymer Science*, 93(4), 1638-1646.
- [31]. - Yuan, X., Zhang, Y., Dong, C., & Sheng, J. (2004). Morphology of ultrafine polysulfone fibers prepared by electrospinning. *Polymer International*, 53(11), 1704-1710.

- [32]. - Aqel, A., El-Nour, K. M. A., Ammar, R. A., & Al-Warthan, A. (2012). Carbon nanotubes, science and technology part (I) structure, synthesis and characterisation. *Arabian Journal of Chemistry*, 5(1), 1-23.
- [33]. Leong, M. F., Rasheed, M. Z., Lim, T. C., & Chian, K. S. (2009). In vitro cell infiltration and in vivo cell infiltration and vascularization in a fibrous, highly porous poly (D, L-lactide) scaffold fabricated by cryogenic electrospinning technique. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 91(1), 231-240.
- [34]. Zong, X., Ran, S., Fang, D., Hsiao, B. S., & Chu, B. (2003). Control of structure, morphology and property in electrospun poly (glycolide-co-lactide) non-woven membranes via post-draw treatments. *Polymer*, 44(17), 4959-4967.
- [35]. R. K.Chandrasekhar, T. S. Montgomery, W. Mei, *Acta Biomater.* 2005, 1 (6), 653-662.
- [36]. Chen, M. L., & Oh, W. C. (2011). Synthesis and highly visible-induced photocatalytic activity of CNT-CdSe composite for methylene blue solution. *Nanoscale research letters*, 6(1), 398.
- [37]. Dinarvand, P., Seyedjafari, E., Shafiee, A., Babaei Jandaghi, A., Doostmohammadi, A., Fathi, M. H., ... & Soleimani, M. (2011). New approach to bone tissue engineering: simultaneous application of hydroxyapatite and bioactive glass coated on a poly (L-lactic acid) scaffold. *ACS applied materials & interfaces*, 3(11), 4518-4524.
- [38].- Rosales, C., Sabino, M., Perera, R., Rojas, H., & Romero, N. (2014). ESTUDIO DE MEZCLAS DE POLI (ÁCIDO LÁCTICO) CON POLIPROPILENO Y NANOCOMPUESTOS CON MONTMORILLONITA. *La Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales, RLMM*, 34(1).
- [39]. Trommer, R. M., Dos Santos, L. A., & Bergmann, C. P. (2007). Técnica alternativa para obter recobrimentos de hidroxiapatita (Alternative technique to obtain hydroxyapatite coatings). *Cerâmica*, 53, 153-158.

- [40]. EM. Rivera-Muñoz, Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges 2011, 75-95, InTech.
- [41]. Mallakpour, S., Abdolmaleki, A., & Tabebordbar, H. (2016). Production of PVC/ α -MnO 2-KH550 nanocomposite films: Morphology, thermal, mechanical and Pb (II) adsorption properties. *European Polymer Journal*, 78, 141-152.
- [42]. Koutsopoulos, S. (2002). Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods. *Journal of biomedical materials research*, 62(4), 600-612.
- [43]. Kang, S., Hsu, S. L., Stidham, H. D., Smith, P. B., Leugers, M. A., & Yang, X. (2001). A spectroscopic analysis of poly (lactic acid) structure. *Macromolecules*, 34(13), 4542-4548.
- [44]. JH. Lehman, M. Terrones, E. Mansfield, KE. Hurst, V. Meunier, Carbon 2001, 34 (13), 4542–4548.
- [45]. SolarSKI, S., Ferreira, M., & Devaux, E. (2005). Characterization of the thermal properties of PLA fibers by modulated differential scanning calorimetry. *Polymer*, 46(25), 11187-11192.
- [46].- Oksman, K., Skrifvars, M., & Selin, J. F. (2003). Natural fibres as reinforcement in polylactic acid (PLA) composites. *Composites science and technology*, 63(9), 1317-1324.
- [47].- Painter, P. C., & Coleman, M. M. (2008). *Essentials of polymer science and engineering*. DEStech Publications, Inc.
- [48].- Gómez-Pachón E. Y., Sánchez-Arévalo F. M., Sabina F. J., Maciel-Cerda A., Montiel-Campos R.: Characterisation and modelling of the elastic properties of poly(lactic acid) nanofibre scaffolds. *Journal of Materials Science*, **48**, 8308-8319 (2013).

- [49].- Abdal-hay A., Sheikh F. A., Lim J. K.: Air jet spinning of hydroxyapatite/poly(lactic acid) hybrid nanocomposite membrane mats for bone tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **102**, 635- 643 (2013).
- [50].- Chun-Jen L., Feng-Huei L., Ko-Shao C., Jui-Sheng S.: Thermal decomposition and reconstitution of hydroxyapatite in air atmosphere. *Biomaterials*, **20**, 1807-1813 (1999).
- [51].- Bom D., Andrews R., Jacques D., Anthony J., Chen B., Meier M. S., Selegue J. P.: Thermogravimetric Analysis of the Oxidation of Multiwalled Carbon Nanotubes: Evidence for the Role of Defect Sites in Carbon Nanotube Chemistry. *Nano Letters*, **2**, 615-619 (2002).
- [52].- Gregg S. B. McKee and Kenneth S. Vecchio.: Thermogravimetric Analysis of Synthesis Variation Effects on CVD Generated Multiwalled Carbon Nanotubes. *The Journal of Physical Chemistry B*, **110**, 1179-1186 (2006).
- [53].- Xiong J., Zheng Z., Qin X., Li M., Li H., Wang X.: The thermal and mechanical properties of a polyurethane/multi-walled carbon nanotube composite. *Carbon*, **44**, 2701-2707(2006).
- [54].- Velasco-Santos C., Martinez-Hernandez A. L., Fisher F. T., Ruoff R., Castaño V. M.: Improvement of Thermal and Mechanical Properties of Carbon Nanotube Composites through Chemical Functionalization. *Chemistry of Materials*, **15**, 4470-4475 (2003).
- [55].- Ignjatovic N., Tomic S., Dakic M., Miljkovic M., Plavsic M., Uskokovic D.: Synthesis and properties of hydroxyapatite/poly-L-lactide composite biomaterials. *Biomaterials*, **20**, 809-816 (1999).
- [56].- Wang P. E., Chaki T. K.: Sintering behaviour and mechanical properties of hydroxyapatite and dicalcium phosphate. *Journal of Materials Science Materials In Medicine*, **4**, 150-158 (1993).

- [57].- Suchanek W., Yoshimura M.: Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *Journal of Materials Research*, **13**, 94-117 (1998).
- [58].- Callister W. D., Rethwisch D. G.: *Materials Science and Engineering: An Introduction*. John Wiley and Sons Inc., United States of America (2010).
- [59].- FAGERLUND G.: Determination of specific surface by the BET method. *Matériaux et Construction*, **6**, 239-245 (1973).
- [60].- Bau S., Witschger O., Gensdarmes F., Rastoix O., Thomas D.: A TEM-based method as an alternative to the BET method for measuring off-line the specific surface area of nanoaerosols. *Powder Technology*, **200**, 190-201(2010).
- [61].- Walton, K. S., & Snurr, R. Q. (2007). Applicability of the BET method for determining surface areas of microporous metal-organic frameworks. *Journal of the American Chemical Society*, *129*(27), 8552-8556.
- [62].- Askeland, D. R., Fulay, P. P., & Wright, W. J. (2011). *The science and engineering of materials*. Nelson Education.
- [63]. De Vrieze, S., Van Camp, T., Nelvig, A., Hagström, B., Westbroek, P., & De Clerck, K. (2009). The effect of temperature and humidity on electrospinning. *Journal of materials science*, *44*(5), 1357.
- [64]. Jeong, S. I., Ko, E. K., Yum, J., Jung, C. H., Lee, Y. M., & Shin, H. (2008). Nanofibrous poly (lactic acid)/hydroxyapatite composite scaffolds for guided tissue regeneration. *Macromolecular bioscience*, *8*(4), 328-338.
- [65]. Sabir, M. I., Xu, X., & Li, L. (2009). A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. *Journal of Materials Science*, *44*(21), 5713-5724.
- [66]. Abdal-hay, A., Sheikh, F. A., & Lim, J. K. (2013). Air jet spinning of hydroxyapatite/poly (lactic acid) hybrid nanocomposite membrane mats for bone tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *102*, 635-643.

[67] Sumfleth, J., Adroher, X. C., & Schulte, K. (2009). Synergistic effects in network formation and electrical properties of hybrid epoxy nanocomposites containing multi-wall carbon nanotubes and carbon black. *Journal of materials science*, 44(12), 3241.

[68] Ashrafi, B., Hubert, P., & Vengallatore, S. (2006). Carbon nanotube-reinforced composites as structural materials for microactuators in microelectromechanical systems. *Nanotechnology*, 17(19), 4895.

[69] Oliveira, J. M., Silva, S. S., Malafaya, P. B., Rodrigues, M. T., Kotobuki, N., Hirose, M., ... & Reis, R. L. (2009). Macroporous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering applications: Physicochemical characterization and assessment of rat bone marrow stromal cell viability. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 91(1), 175-186.

[70] Roeder, R. K., Sproul, M. M., & Turner, C. H. (2003). Hydroxyapatite whiskers provide improved mechanical properties in reinforced polymer composites. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 67(3), 801-812.

[71]. Román-Doval, R., Morales-Corona, J., Olayo, R., Escamilla-Rivera, V., Uribe-Ramírez, M., & Ortega-López, M. (2016). *Mater. Res. Express*, 3(12), 125402.

[72]. Ngiam, M., Liao, S., Patil, A. J., Cheng, Z., Chan, C. K., & Ramakrishna, S. (2009). The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering. *Bone*, 45(1), 4-16.

[73]. Lao, L., Wang, Y., Zhu, Y., Zhang, Y., & Gao, C. (2011). Poly (lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 22(8), 1873-1884.

[74]. Badami, A. S., Kreke, M. R., Thompson, M. S., Riffle, J. S., & Goldstein, A. S. (2006). Effect of fiber diameter on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells on electrospun poly (lactic acid) substrates. *Biomaterials*, 27(4), 596-606.

- [75]. Teo, W. E., & Ramakrishna, S. (2006). A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology*, 17(14), R89.
- [76]. Alla, R. K., Ginjupalli, K., Upadhyaya, N., Shammas, M., Ravi, R. K., & Sekhar, R. (2011). Surface roughness of implants: a review. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 25(3), 112-118.
- [77]. Persson, M., Lorite, G. S., Kokkonen, H. E., Cho, S. W., Lehenkari, P. P., Skrifvars, M., & Tuukkanen, J. (2014). Effect of bioactive extruded PLA/HA composite films on focal adhesion formation of preosteoblastic cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 121, 409-416.
- [78]. Yang, S. L., Wu, Z. H., Yang, W., & Yang, M. B. (2008). Thermal and mechanical properties of chemical crosslinked polylactide (PLA). *Polymer Testing*, 27(8), 957-963.
- [79]. Socrates, G. (2004). *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts*. John Wiley & Sons.
- [80]. Rehman, I., & Bonfield, W. (1997). Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 8(1), 1-4.
- [81]. Wesełucha-Birczyńska, A., Frączek-Szczypta, A., Długoń, E., Paciorek, K., Bajowska, A., Kościelna, A., & Błażewicz, M. (2014). Application of Raman spectroscopy to study of the polymer foams modified in the volume and on the surface by carbon nanotubes. *Vibrational Spectroscopy*, 72, 50-56.
- [82]. Silva, C. C., & Sombra, A. S. B. (2004). Raman spectroscopy measurements of hydroxyapatite obtained by mechanical alloying. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 65(5), 1031-1033.
- [83]. Zhang, H. B., Lin, G. D., Zhou, Z. H., Dong, X., & Chen, T. (2002). Raman spectra of MWCNTs and MWCNT-based H₂-adsorbing system. *Carbon*, 40(13), 2429-2436.

[84]. Antunes, E. F., Lobo, A. O., Corat, E. J., Trava-Airoldi, V. J., Martin, A. A., & Veríssimo, C. (2006). Comparative study of first-and second-order Raman spectra of MWCNT at visible and infrared laser excitation. *Carbon*, 44(11), 2202-2211.

[85]. Mei, F., Zhong, J., Yang, X., Ouyang, X., Zhang, S., Hu, X., ... & Deng, X. (2007). Improved biological characteristics of poly (L-lactic acid) electrospun membrane by incorporation of multiwalled carbon nanotubes/hydroxyapatite nanoparticles. *Biomacromolecules*, 8(12), 3729-3735.

[86]. Lee, J. B., Park, H. N., Ko, W. K., Bae, M. S., Heo, D. N., Yang, D. H., & Kwon, I. K. (2013). Poly (L-lactic acid)/hydroxyapatite nanocylinders as nanofibrous structure for bone tissue engineering scaffolds. *Journal of biomedical nanotechnology*, 9(3), 424-429.