

UNIVERSIDAD NACIONAL DE GENERAL SAN MARTÍN
COMISIÓN NACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA
INSTITUTO DE TECNOLOGÍA
"Prof. Jorge A. Sabato"

**Influencia del patrón de impresión en las propiedades
mecánicas y tasa de degradación de andamios
reabsorbibles elaborados por impresión 3D para
regeneración ósea (*)**

por Camila Adela Gallo Chaubell

Directoras del trabajo

Dra. Beatriz Aráoz

Dra. Élide B. Hermida

(*) Trabajo de Seminario para optar al título de Ingeniera en Materiales

República Argentina

2022

Resumen

Si se supera la capacidad de autoregeneración del hueso, ya sea porque existe un daño que alcanza un tamaño crítico o existen traumatismos de alta complejidad, es necesario intervenir. Para ello, se suelen utilizar métodos quirúrgicos como la colocación de injertos óseos y/o implantes. Estos injertos e implantes pueden derivar en diferentes complicaciones y la necesidad de procedimientos quirúrgicos adicionales, que aumentan el riesgo de infección y dificultan la recuperación del paciente.

La ingeniería de tejidos estudia y desarrolla andamios mediante diferentes procesos y materiales, que permiten y aumentan la regeneración de los tejidos óseos. Dentro de los procesos, se destaca la impresión 3D, que permite fabricar andamios que se ajustan a la necesidad del paciente. En cuanto a los materiales, el poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV), un copolímero de propiedades mecánicas y piezoeléctricas similares a lo que posee el hueso humano, y las ventajas de ser biodegradable, biocompatible y reabsorbible. Por otro lado, el biovidrio activo (BG), es un material cerámico que por su composición, en contacto con fluidos biológicos libera iones que regulan los ciclos de crecimiento, proliferación y diferenciación de las células encargadas de la regeneración ósea. Por sus propiedades, la combinación de estos dos materiales resulta atractiva para su uso en andamios.

En este trabajo, se elaboraron por extrusión filamentos tanto de PHBV como compuestos de PHBV con 4% de partículas de BG y con ellos se fabricaron andamios mediante impresión 3D. Se evaluó cómo influye en la degradación diferentes patrones de impresión, mediante la incubación a diferentes tiempos, en un medio que simula al biológico (SBF). Se encontró que la impresión 3D es una técnica viable para la realización de andamios con este material, que la degradación de los andamios de PHBV con los patrones considerados no cambia significativamente entre sí, pero si se denota la disminución de la rigidez y la fragilización a los 60 días de inmersión debido a la presencia del BG.

Palabras claves: Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato), PHBV, degradación, ingeniería de tejidos, regeneración ósea, SBF, biovidrio, impresión 3D, modelado por deposición fundida.

Abstract

If the self-regeneration capacity of the bone is exceeded, either because there is damage that reaches a critical size or there are highly complex traumas, it is necessary to intervene. For this, surgical methods are usually used, such as placement of bone grafts and/or implants. These grafts or implants can lead to different complications and further surgical procedures, which increase the risk of infection and hinder the patient's recovery.

Tissue engineering studies and develops scaffolds, through different processes and materials, that allow and increase the regeneration of bone tissues. Within the processes, 3D printing stands out, which allows the manufacture of scaffolds that adjust to the needs of the patient. Regarding materials, poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV), a copolymer with mechanical and piezoelectric properties similar to those of human bone, and the advantages of being biodegradable, biocompatible and resorbable. On the other hand, active bioglass (BG) is a ceramic material that, due to its composition, in contact with biological fluids, releases ions that regulate the cycles of growth, proliferation and differentiation of the cells responsible for bone regeneration. Due to their properties, the combination of these two materials is attractive for use in scaffolds.

In this work, both PHBV and PHBV with 4% BG particles composite filaments were extruded and scaffolds were fabricated using 3D printing. The influence of different printing patterns on degradation was evaluated by incubation at different times in a medium that simulates biological fluids (SBF). It was found that 3D printing is suitable for produce scaffolds of these materials, that the degradation of the PHBV scaffolds with the patterns considered does not change significantly among themselves but decrease in stiffness and increase fragility after 60 days of immersion due to in the presence of BG.

Keywords: Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), PHBV, degradation, tissue engineering, bone regeneration, SBF, bioglass, 3D printing, fused deposition modeling.

Agradecimientos

Utilizo la potestad que se me ha concedido como escritora de este trabajo, para dedicar esta sección a agradecer de pie, sin sombrero y de corazón, a todas aquellas personas que permitieron, impulsaron y apoyaron en mayor o menor medida, a que realice mi carrera universitaria y este trabajo, sin ánimos de olvidarme de nombrar a nadie.

En primera instancia, quiero agradecer a la Dra. Élica Hermida, quien me abrió las puertas a un espacio de alto nivel, tanto profesional como de calidez humana, como lo es el Lab3Bio, quien siempre mantuvo una excelente predisposición a cualquier cosa que necesité y con una altura impresionante me mostró lo que es ser profesional.

A la Dra. Beatriz Aráoz, quien me guió de cerca en cada paso en la realización de este trabajo, tanto en los buenos como en los malos días y que, sin su paciencia -e insistencia- no hubiese terminado y disfrutado tanto hacer este trabajo.

A toda la gente del Lab3Bio, Dai, Eze, Fer, Flor, Juli, Leo, Mer, Oxana, por los momentos compartidos, pero principalmente a Cami, Eve, Joaquín y Marcos, quienes obligatoriamente tenían que verme todos los días y siempre tendieron una mano para ayudarme.

Al grupo NanoFab - FAN, principalmente a Fabián, Brian, Bruno, Clara y Martín, que me abrieron el espacio desinteresadamente para que pudiese realizar gran parte de los procesos necesarios para este trabajo.

A Gonzalo y Ana Lucía, del grupo de Laboratorio de Microscopía Electrónica - Gcia. Materiales - CAC, quienes se esmeraron por demás para que pudiese realizar las micrografías.

A la UNSAM, a la CNEA y finalmente al Instituto Sabato, instituciones que permitieron que me forme en sus aulas y laboratorios, brindando siempre una educación de calidad.

A todos los docentes del Instituto Sabato, principalmente a Alma Bertolo, Andrés Di Donato, Eduardo Vicente, Fabián Álvarez, Guillermo Anteri, Luis Garcia Rodenas, Mariela del Grosso, Rubén Weht, Sergio Aricó y Vivianne Bruyère, a quienes destaco por el profesionalismo, la dedicación a la enseñanza y la calidez humana que demostraron tener.

A mis compañeros de curso, Andi, Dani, Esteban, Ivo, Karen, Manu y Xavi, con quienes compartimos todo este tiempo, donde las risas, memes, crisis estudiantiles y catarsis grupales no faltaron.

A la Capitán de Arsenales Mercedes Medancich, quien supo ser mi superior y mentora en mi paso como Soldado Voluntario del Ejército Argentino y le atribuyo el 0,01% de mi carrera, por toda la motivación y apoyo que me dió, para formarme y dar todo para ser una buen profesional.

A mis amigos de "The Real One", que me apoyaron siempre para que siguiera adelante.

A mis amigos woweros, Drizz, Gabo, John, Kohan, Pao y Randall, quienes fueron mala influencia pero a la vez, los que más estuvieron para mí cuando necesitaba hacer catarsis o reirme un rato, pasando tardes y noches enteras oficiando de apoyo moral.

A Peni y a Mar, quienes me demostraron que a pesar del tiempo, la distancia y la vida misma, siempre pero siempre están ahí.

A mis tíos y primos, que estuvieron ahí a su manera, a veces complicando las cosas pero muchas moviendo las fichas para que todo funcionara o simplemente alentándome.

A mis tías y primas del corazón Ana, Adriana, Silvia, Luli, Andre, las que elegí, por su amor, compañía y sus “vamos que vos podes” constantes.

A los Garrigó - Montagna, que me aceptaron como una más, dándome su amor y aliento en todos mis proyectos.

A mi ahijada Morena, que tan dulce como es y con lo poco que la carrera me permitió verla, siempre me dió su cariño.

A mis abuelas Susi y Lydia, y a mi papá, Hernán, quienes ya no están y en su peor momento, su mayor preocupación era que me vaya bien y me recibiera. Al fin, hoy les puedo decir que estoy acá.

A mis hermanos Alvaro, Alfredo, Mauro y Maylén, que son mi cielo, con sol y a veces con nubes, todo junto y al revés.

A mi tío Pablo, que no solo es una de las personas que más me impulsó a estudiar sino que es un verdadero ejemplo de persona de fierro, que incondicionalmente estuvo en los momentos más duros y sin dudas festejó conmigo los buenos.

A mis abuelos José y Luis, los que más insistieron para que estudie, que no quedó solo en palabras y realmente me dieron todo para que lo hiciera.

A mi mamá, quien me dió la vida, a pesar de todo lo que eso implicó. Que con sus aciertos y desaciertos, pero con mucho amor, siempre me inspiró a ser mejor persona y dar lo mejor de mí.

Por último, a Marian, mi fan número uno, mi ídolo, mi malcriador serial, mi socio en maldades y gestos nobles, mi compañero de vida, con quien formamos un dúo imparable, y que de seguro sin él, nada de esto no hubiese sido posible.

Acrónimos de las expresiones que aparecen en la bibliografía

BG	Vidrio bioactivo 45S5 (Bioglass 45S5)
CTMS	Clorotrimetilsilano (Chlorotrimethylsilane)
DMA	Analizador mecánico dinámico (Dynamic Mechanical Analysis)
ECM	Matriz extracelular (Extracellular matrix)
EDXS	Espectroscopia de dispersión en energía de rayos X (Energy-dispersive X-ray Spectroscopy)
FDM	Modelado por Deposición Fundida (Fused Deposition Modelling)
HA	Hidroxiapatita (Hydroxyapatite)
ME	Máquina de ensayos
PGA	Ácido poliglicólico (Poly(glycolic acid))
PHA	Polihidroxialcanoatos
PHBV	Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)
PHBV + BG	Compuesto de PHBV con 4% BG
PLGA	Ácido poli(láctico-co glicólico) (Poly(lactic-co-glycolic acid))
PLLA	Ácido poli-L-láctico (Poly(L-lactic acid))
RA	Relación de Aspecto
RX	Rayos X
SAXS	Difracción de rayos X de bajo ángulo (Small Angle X-ray Scattering)
SBF	Fluido Corporal Simulado (Simulated Body Fluid)
SEM	Microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscope)
WAXS	Difracción de rayos X de gran ángulo (Wide Angle X-ray Scattering)

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Regeneración ósea y andamios	1
1.1.2. Tejido óseo	2
1.2. PHBV	3
1.3. Biovidrio	4
1.4. Impresión de andamios	4
1.5. Degradación de andamios	5
1.6. Objetivo del trabajo	5
2. Materiales y métodos	6
2.1. Materiales	6
2.2. Silanización de biovidrio	6
2.3. Extrusión de filamentos	6
2.4. Impresión de andamios	7
2.4.1. Diseño 3D	7
2.4.2. Condiciones de Impresión	9
2.4.3. Corte láser de muestras	10
2.4.4. Evaluación de la fidelidad de la impresión y del corte láser	11
2.5. Ensayo de degradación	11
2.5.1. Preparación de SBF e inmersión de muestras	12
2.5.2. Evaluación de peso	13
2.6. Evaluación de la bioactividad	14
2.6.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	14
2.6.2. SAXS/WAXS	15
2.7. Análisis de propiedades mecánicas	15
2.7.1. Analizador mecánico dinámico (DMA)	16
2.7.2. Máquina de ensayos (ME)	16
3. Resultados	17
3.1. Fidelidad de impresión	17
3.2. Morfología de los andamios	17
3.3. Análisis de la degradación	22
3.3.1. Evaluación de peso	22
3.3.2. Variación de pH	23
3.3.3. Caracterización morfológica	23
3.2.4. Análisis de propiedades mecánicas	25
3.4. Bioactividad	28
3.1.3. SAXS/WAXS	30
4. Discusión	31
5. Conclusiones	36
6. Referencias bibliográficas	36
Apéndice A - Protocolos y procedimientos	37

A1. Elección de tamaño de probeta	37
A2. Silanización de Biovidrio	38
A3. Extrusión de filamentos	38
A4. Parámetros de corte láser.	41
A5. Protocolo de cambio de SBF	43
A6. Protocolo de medición de peso.	44
Apéndice B - Códigos de impresión	44
B1. Disco 33 mm - Patrón "L" - PHBV	44
B2. Disco 33 mm - Patrón "T" - PHBV	44
B3. Disco 15 mm - Patrón "L" - PHBV + BG	44
B4. Disco 15 mm - Patrón "T" - PHBV	45
Apéndice C - Secuencias de comandos	45
Apéndice D - Imágenes	45
D1. Comparación DMA y ME	45

1. Introducción

1.1. Regeneración ósea y andamios

El hueso es un material compuesto que posee una gran capacidad regenerativa, pero en casos de enfermedades como osteoporosis, infecciones, extracción de tumores o traumatismos de gran complejidad y/o de tamaño mayor a 2,5 cm, se excede la capacidad de sanación natural del hueso [1], [2]. En estos casos resulta necesario realizar un procedimiento quirúrgico, de manera tal de reemplazar la función perdida y de contribuir a la correcta regeneración. Actualmente, se emplean injertos óseos autólogos (del propio paciente) o alogénicos (provenientes de un donante). En el caso de los autólogos, no todos los huesos pueden ser utilizados como injerto, la zona donante puede sufrir morbilidad y dado que se realizan dos intervenciones, aumenta el riesgo de infecciones [1], [3], [4]. Por otro lado, los alogénicos pueden acarrear reacciones del sistema inmune o incluso poseen riesgo de transmisión de enfermedades [1], [3]. Además, en ambos casos, los injertos pueden tener propiedades mecánicas insuficientes para desempeñar las funciones del hueso en cuestión.

Por otra parte, también se utilizan implantes no degradables, donde los más estudiados y usados actualmente son de aleaciones de titanio $\alpha+\beta$ (Ti-6Al-4V) [5], [6]. Estos implantes presentan un módulo elástico alto, poseen resistencia a la corrosión, efecto de memoria de forma y buena biocompatibilidad, pero pueden generar problemas a largo plazo, siendo necesario su cambio al cabo de 15/20 años y se hace más notable en casos pediátricos por restricciones de crecimiento [5]. En cuanto a materiales poliméricos más utilizados, se encuentran el ácido poli-L-láctico (PLLA, siglas en inglés: poly(L-lactic acid)), ácido poliglicólico (PGA, siglas en inglés: poly(glycolic acid)) y el ácido poli(láctico-co glicólico) (PLGA, siglas en inglés: poly(lactic-co-glycolic acid)) [7], [8]. Estos materiales presentan como principal desventaja que pueden generar acumulación de plaquetas, lo que podría derivar en una trombosis (coágulo en una vena) [9]. Además, al degradarse generan acidificación en la zona donde se encuentran implantados, lo que puede resultar dañino si esta acidificación es muy alta [10].

Debido a esto, desde la ingeniería de tejidos, se ha propuesto a los andamios como alternativa para el tratamiento de dichas patologías. Los andamios son dispositivos biomédicos que asisten a la regeneración del tejido y están constituidos por materiales orgánicos, inorgánicos y/o compuestos. Propician la adhesión, proliferación y diferenciación celular, son biocompatibles, con la tendencia a que sean reabsorbibles, es decir que se degraden y sean reabsorbidos por el cuerpo del paciente conforme la zona afectada se regenera, sin generar reacciones adversas u otras complicaciones. Como requisito adicional

deben tener estructuras con poros interconectados de tamaños entre 100 y 800 μm , que permitan la colonización celular y el intercambio de nutrientes y desechos hacia el interior y exterior del andamio [1].

1.1.2. Tejido óseo

Los huesos o los tejidos óseos dan soporte al cuerpo y protección a los órganos internos, además de permitir el movimiento junto a los músculos y tendones. Están compuestos por tres fases: matriz extracelular (ECM, siglas en inglés: Extracellular Matrix), células óseas y agua [4]. La ECM está compuesta por un 30% de colágeno, biopolímero que le aporta elasticidad y por un 70% de hidroxipatita, un material inorgánico que le aporta rigidez. Las fracciones de estas fases darán lugar a los diferentes tipos de tejidos óseos: tejido compacto o hueso cortical y tejido esponjoso o hueso trabecular. Las propiedades mecánicas dependen del tipo de hueso y además de las características propias del paciente (edad, sexo y estado de salud) por lo que se consideraran valores medios o estimativos según bibliografía. Dos de las propiedades mecánicas más relevantes son la rigidez y tenacidad del hueso, las cuales se representan en la *Figura 1*, junto a varios de los materiales que se emplean para implantes óseos [4].

Módulo elástico del hueso varía entre 10 MPa y 20 GPa dependiendo de si es cortical o trabecular, y la zona del mismo [11].

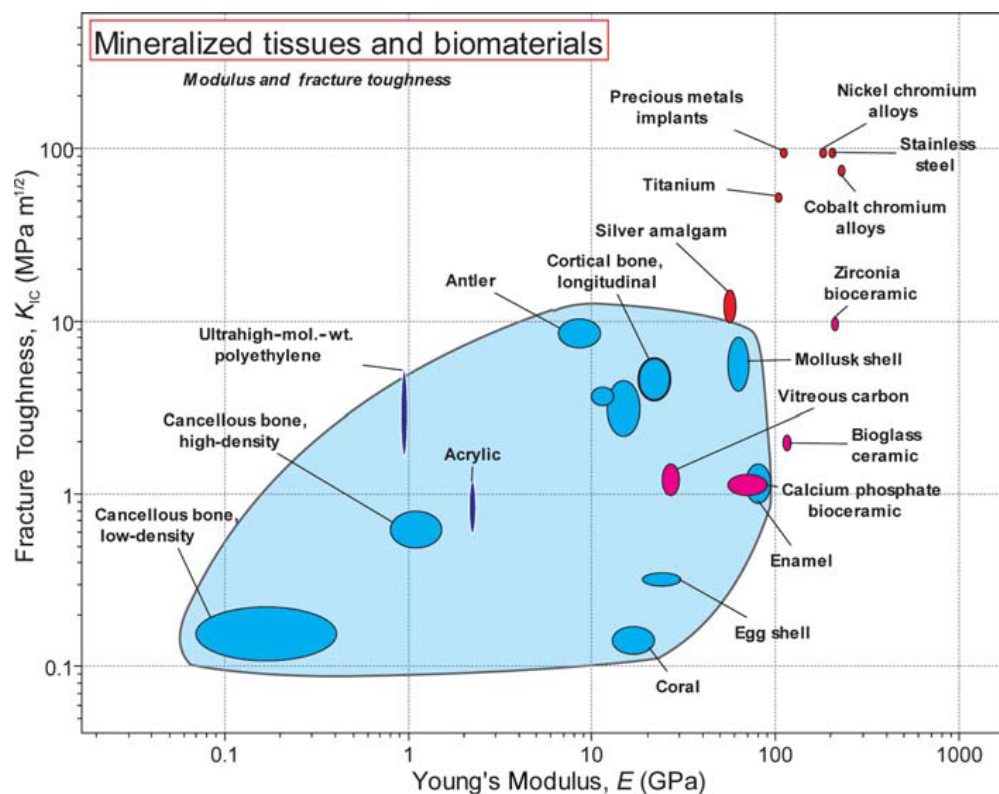


Figura 1. Módulo de Young (E) y tenacidad a la fractura (K_{IC}) de diferentes materiales, incluyendo huesos compactos (cortical bone) y esponjosos (cancellous bone). Elaboración con Granta Design CES a partir de datos de Oyen, 2008 [4].

1.2. PHBV

Como alternativa a los tratamientos actuales y desde la ingeniería de tejidos se ha propuesto a los polímeros biodegradables para producir andamios para regeneración ósea. En particular, el poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV), que es un copolímero de la familia de los polihidroxialcanoatos (PHA) y de los más estudiados debido a que es biocompatible, biodegradable, posee propiedades piezoeléctricas similares al hueso y es termo procesable [12]–[17]. Son polímeros que se obtienen por fermentación bacteriana siendo un proceso amigable con el medio ambiente en comparación a sus análogos sintéticos derivados del petróleo [12], [13], [18], [19]. Es un poliéster de hidroxibutirato (HB) e hidroxivalerato (HV) (Figura 2).

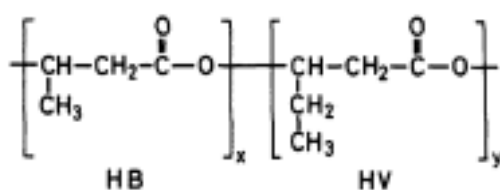


Figura 2. Estructura del PHBV

El PHBV es un polímero semicristalino, lo cual implica que ocurrirá una cristalización parcial cuando se enfríe por debajo de su temperatura de fusión. En la cristalización, las cadenas se acercan y se pliegan sobre sí mismas, formando placas llamadas lamelas (ver Figura 3). Las lamelas a su vez, se agrupan formando estructuras esferoidales llamadas esferulitas, las cuales crecen hasta encontrarse con otras esferulitas [20], [21]. Las regiones que están entre las lamelas y esferulitas son amorfas (Figura 3), y mediante un ataque químico, puede revelarse la forma de las últimas, como se ilustra en la Figura 4. La incorporación de los monómeros de HV aumenta la fracción amorfa del copolímero, por lo que disminuye la temperatura de fusión, el material tiende a ser más dúctil y flexible, y aumenta la velocidad de degradación [12], [18], [19], [22]. El contenido de HV usualmente varía entre 1 y 20%, que depende de su uso final [18], [19], [23]. Por otro lado, el PHBV tiene gran potencial para permitir el crecimiento de las células llamadas osteoblastos, las cuales sintetizan y son responsables del crecimiento de los tejidos óseos, siendo posible su uso en andamios de regeneración ósea [24], [25], [26].

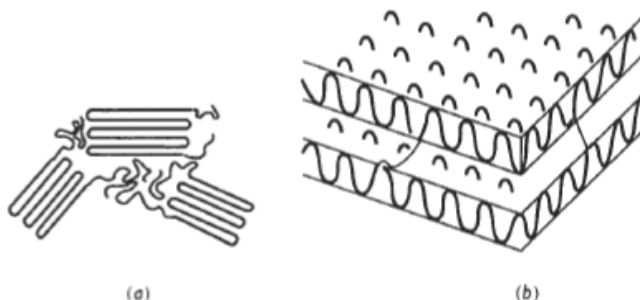


Figura 3. Esquema de formación de lamelas y esferulitas [21, p. 465].

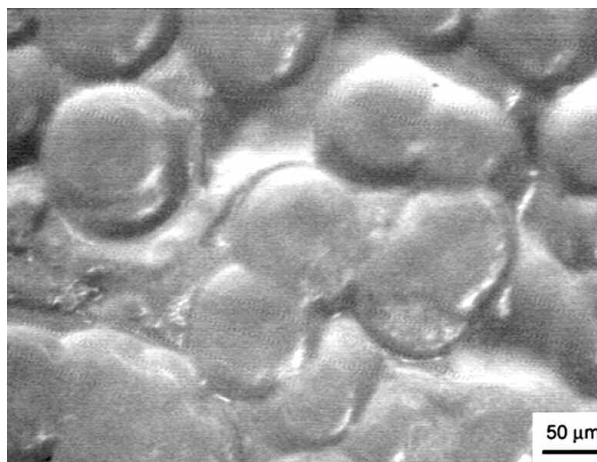


Figura 4. Superficie de PHBV, luego de ser atacado químicamente durante 18 min con una solución de NaOH, para eliminar las zonas amorfas y revelar las esferulitas [20].

1.3. Biovidrio

Los biovidrios activos son materiales que se componen básicamente de calcio, fósforo y dióxido de silicio [3]. Poseen propiedades osteointegrables y osteoinductivas [3]. El biovidrio en contacto con fluidos biológicos experimenta reacciones superficiales que conducen a la formación de una capa de hidroxiapatita (HA), similar a la existente en el hueso, en un proceso de osteoconducción que promueve la adhesión de biomoléculas, células y factores de crecimiento involucrados en la creación de hueso nuevo e induce la unión al preexistente [27].

El BG además es osteoinductor ya que los iones liberados en la disolución de las partículas, principalmente iones Si, estimulan genéticamente las células óseas involucradas en el proceso de regeneración, controla el ciclo celular de los osteoblastos hacia la diferenciación osteogénica y aumenta la proliferación de osteoblastos. Además, es angiogénico, ya que promueve la formación de vasos sanguíneos [28].

Una combinación de materiales que resulta prometedora para mimetizar la composición del hueso natural está dado por PHBV y el biovidrio de composición $45\text{SiO}_2-24,5\text{Na}_2\text{O}-24,5\text{CaO}-6\text{P}_2\text{O}_5$ (% m/m), Bioglass® 45S5 (BG) [8], [29], [30].

1.4. Impresión de andamios

La impresión 3D aplicada a medicina regenerativa es un método de fabricación que ha tomado impulso en los últimos años, principalmente porque permite fabricar estructuras personalizadas a partir de imágenes de tomografía o resonancia magnética del propio paciente. Además, es posible diseñar andamios a partir de combinar materiales con propiedades biológicas y mecánicas a la medida del tejido a reemplazar [7], [31]–[36]. Por otro lado, la técnica se ha democratizado debido al vencimiento de las diferentes patentes que limitaban el aprovechamiento de esta técnica de manufactura libre del pago de

aranceles [37]. Sumado a esto, dado que los equipos no son de gran tamaño ni poseen un precio excesivo, es factible la producción en lugares remotos o en grandes ciudades.

La impresión 3D por deposición fundida de filamento (FDM, siglas en inglés: fused deposition modeling) se basa en extruir un filamento hacia una boquilla caliente que funde el material y lo deposita capa por capa, dando forma al objeto diseñado.

Un requisito que deben cumplir los andamios es poseer poros interconectados para permitir el flujo de fluidos corporales, para que la cantidad de células que queden adheridas a éste sea suficiente para obtener una regeneración ósea eficiente y mediante la impresión 3D esto es posible [38], [39]. Por otra parte, es conocido que los osteoblastos prefieren estructuras tridimensionales para adherirse, por lo que es importante evaluar que los diferentes patrones de impresión y los volúmenes internos que se forman, sean compatibles al óptimo crecimiento de células [24].

El uso de PHBV en impresoras 3D comerciales resulta posible dado que su temperatura de fusión se encuentra en el rango de 160 a 180°C, según la porción de valerato que esté presente [18].

1.5. Degradación de andamios

Diferentes factores inciden en la degradación de un andamio en un cuerpo biológico. Para poder estudiar esto de manera *in vitro*, existen métodos en los cuáles las muestras son sumergidas en distintos medios que simulan al biológico.

La inmersión de las muestras en fluido símil biológico (SBF, por la denominación en inglés), permite observar y evaluar los efectos de degradación a la mínima velocidad posible, dado que no existen otros procesos que aumenten la cinética de degradación, como podría ser la acción enzimática. Se debe tener en cuenta que, el SBF, posee igual concentración de los distintos iones encontrados en el plasma sanguíneo, salvo los iones cloruro (Cl^-) y bicarbonato (HCO_3^-), que se encuentran en mayor y menor concentración respectivamente [40]. Según bibliografía, la preparación de un SBF corregido que posee las concentraciones de todos los iones igual al plasma sanguíneo, aumenta la inestabilidad en la solución y con ello la tendencia a precipitar carbonato de calcio, es por esto que se recomienda la utilización de SBF para evaluar la bioactividad [41]. Es interesante la evaluación en este medio, ya que actualmente existe vasta cantidad de publicaciones que lo utilizan, convirtiendo la utilización de SBF en un buen estándar de comparación entre materiales.

1.6 Objetivo del trabajo

El objetivo general de este trabajo es determinar la influencia del patrón de impresión: i) en la rigidez de un sustrato elaborado por FDM con PHBV cargado con partículas de vidrio bioactivo y ii) la degradación *in vitro* en una solución que simula el entorno biológico.

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

Para este trabajo se utiliza PHBV en polvo, con un 1,5% en mol de valerato, de la marca Tianan Biologic Material Co. Ltd. (<http://www.tianan-enmat.com/>, Julio 2022) (Ningbo, China).

Por otro lado, el BG utilizado corresponde al nomencado como 45S5 en presentación polvo, el cual se compone de 45% de silica (SiO_2), 24,5% de óxido de calcio (CaO), 6% de pentóxido de fósforo (P_2O_5) y 24,5% de óxido de sodio (Na_2O). El cual posee un módulo elástico de 35 MPa [42]. El BG fue sintetizado por el Dr. Ulises Gilabert en el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) (Buenos Aires, Argentina). El método de síntesis de las partículas de BG consiste en un proceso de fundición convencional, con precursores de grado analítico (SiO_2 , Na_2CO_3 , CaCO_3 and CaHPO_4) que se colocan en un crisol de platino a 1400°C durante 1,5 hs. Luego, se templea en agua y se muele el producto en etanol hasta obtener un tamaño de partícula promedio de $10\text{ }\mu\text{m}$ [43].

2.2. Silanización de biovidrio

El PHBV tiene la característica de ser hidrofóbico, en cambio el BG es hidrofílico. Entonces, para que se produzca una buena interfaz entre el PHBV y BG, es necesario realizar un tratamiento superficial para aumentar la interacción entre ellos. Esto permite obtener un filamento con mayor tenacidad lo que facilita la manipulación y su posterior uso en la impresión 3D [42]. El tratamiento consiste en recubrir con grupos silanos cada partícula de BG [44]. Para esto, por cada 2 g de BG, se utilizan 3 mL de Clorotrimetilsilano ($(\text{CH}_3)_3\text{SiCl}$, Sigma Aldrich, CAS N°75-77-4), 15 mL de Tolueno (Sigma Aldrich) y con la utilización de una campana de extracción de gases y desecador, se realiza el procedimiento como se detalla en el Apéndice A2.

2.3. Extrusión de filamentos

Los filamentos de PHBV y los de PHBV con 4% BG (PHBV + BG) se fabrican por medio de extrusión en una mini extrusora Thermo Fisher Scientific Process 11 (Figura 5) instalada en NanoFab - FAN (Buenos Aires, Argentina).

En este proceso, se alimenta la extrusora con la materia prima en polvo. Los dos tornillos corrotantes, dispuestos en la camisa calefaccionada de la extrusora, permiten el desplazamiento del material dentro de la extrusora y aportan al calentamiento y plastificación del polímero, ya que generan esfuerzos de corte sobre el material. A la salida

de la extrusora, se dispone una boquilla con diámetro similar al del filamento que se desea obtener.

Si bien el procedimiento de manufactura del filamento —detallado en el *Apéndice A3*— es esencialmente igual para PHBV que cuando se adiciona 4% BG silanizado al polímero, es necesario realizar una mezcla. Esta mezcla, de polvos de PHBV y BG, asegura homogeneidad en el material. Por otra parte, durante la extrusión de este compuesto, se debe realizar un paso previo, que consiste en hacer una carga de PHBV solo, de manera de obtener un filamento correctamente.

Parte de la dificultad de la extrusión de este material, se encuentra en la angosta ventana térmica de trabajo que posee el material (temperatura de fusión: 180°C y temperatura de inicio de degradación 220°C). A temperaturas o velocidades de giro de tornillo mayores a las que se usan en el presente trabajo, se supera la capacidad de enfriamiento del material, haciendo una tarea imposible el obtener un filamento homogéneo tanto en estado superficial como en dimensiones. Por otro lado, en el caso de utilizar temperaturas o velocidades menores, el material no plastifica y podría quedarse alojado en la extrusora e incluso dañarla, ya que aumentaría la presión y el torque que realiza el motor del equipo. Otra dificultad que presenta, es que, dado que el material se expande térmicamente y dependiendo de las velocidades de salida de la extrusora, se debe realizar una tensión sobre el filamento de manera tal que al enfriarse se mantenga en un espesor constante de $1,70 \pm 0,05 \text{ mm}$, ya que en el caso de obtener un filamento de menor o mayor espesor al antes mencionado, se producen cambios en el flujo del material durante la impresión y/o el filamento no puede pasar por la extrusora de la impresora.



Figura 5. A la izquierda, la mini extrusora Thermo Fisher Scientific Process 11. A la derecha, se observa mejor la tolva y la campana extractora de volátiles de la mini extrusora.

2.4. Impresión de andamios

2.4.1. Diseño 3D

Para la impresión de los andamios, primero es necesaria la creación de un modelo 3D en formato .stl con la geometría del tamaño final de la impresión. La aplicación utilizada para

este trabajo es la plataforma online y gratuita de Autodesk, *TinkerCAD* (<https://www.tinkercad.com/>, Julio 2022).

La elección de las dimensiones de los impresos se relaciona al tamaño de muestras que se van a ensayar (luego de ser cortadas, según se detalla en 2.4.3.) las cuales poseen un tamaño de 5 mm de alto y 10 mm de diámetro. El procedimiento para determinar las dimensiones de las muestras se detalla en el *Apéndice A1*. En el caso de los impresos de PHBV, se realizaron discos de 33 mm de diámetro y 5 mm de alto, lo que permite después de la impresión realizar una serie de cortes, y de un solo impreso, mayor cantidad de andamios de igual tamaño y condiciones (*Figura 6*). En cambio, para los andamios de PHBV + BG el modelo más pequeño, posee dimensiones de 15 mm de diámetro y 5 mm de alto (*Figura 7*). Este cambio se debe a que, el PHBV + BG posee un filamento mucho más frágil al PHBV, lo cual lo hace más propenso a la fractura y que de suceder durante la impresión, eligiendo el modelo más pequeño se perdería mucho menos material.

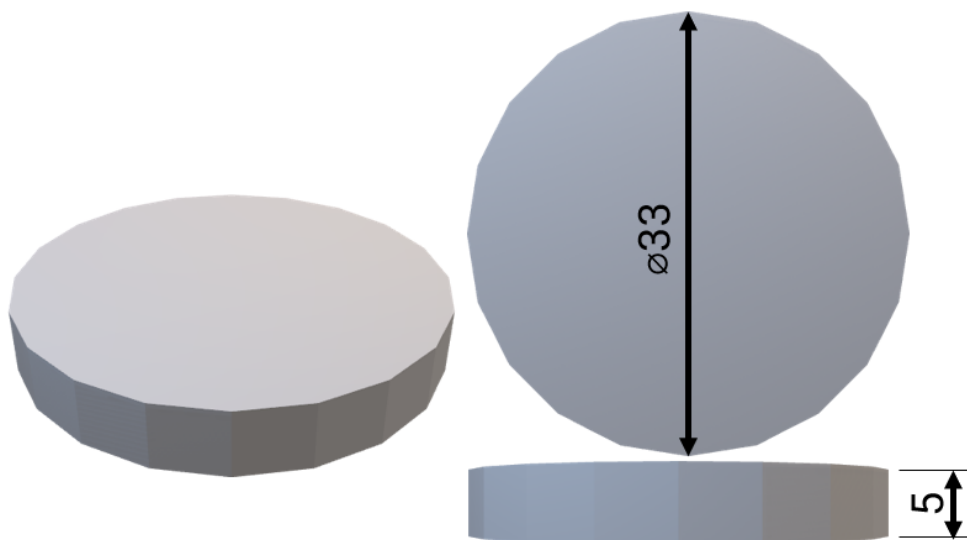


Figura 6. Modelo 3D del andamio de PHBV, imagen obtenida de la aplicación TinkerCAD. Medidas: 33 mm diámetro y 5 mm alto.

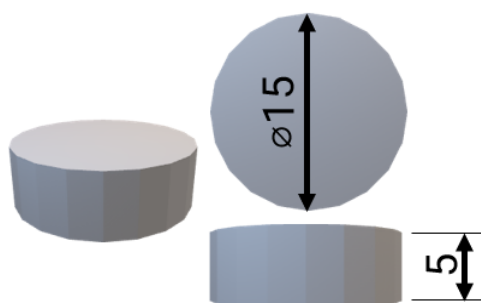


Figura 7. Modelo 3D del andamio de PHBV 4%BG, imagen obtenida de la aplicación TinkerCAD. Medidas: 15 mm diámetro y 5 mm alto.

Luego de realizar el modelo, éste se lleva al programa encargado de realizar el rebanado o “*slicing*”, es decir, los patrones de llenado que seguirá la impresión de cada capa, generando

un archivo de extensión .gcode, que lee la impresora. En el caso del patrón 0/90° (Figura 8), se utiliza el programa *Slic3r* (descargable de <https://slic3r.org/>, Julio 2022). De este programa se obtienen los archivos .gcode del disco de 33 mm de PHBV (ver Apéndice B1) y disco de 15 mm de PHBV + BG (ver Apéndice B3). El programa *Slic3r* es limitado en cuanto a los patrones y personalizaciones que se pueden lograr, por lo que, para subsanar esta restricción, en el caso del patrón 0/30/60° (Figura 9) es necesaria la utilización del programa *Ultimaker Cura 5.0.0* (descargable en <https://ultimaker.com/>, Julio 2022), el cual permite mayor personalización, además de la posibilidad de instalar extensiones que aumentan aún más las opciones respecto al programa base. De este se obtienen los archivos .gcode para el disco de 33 mm (ver Apéndice B2) y disco de 15 mm (ver Apéndice B4) de PHBV.

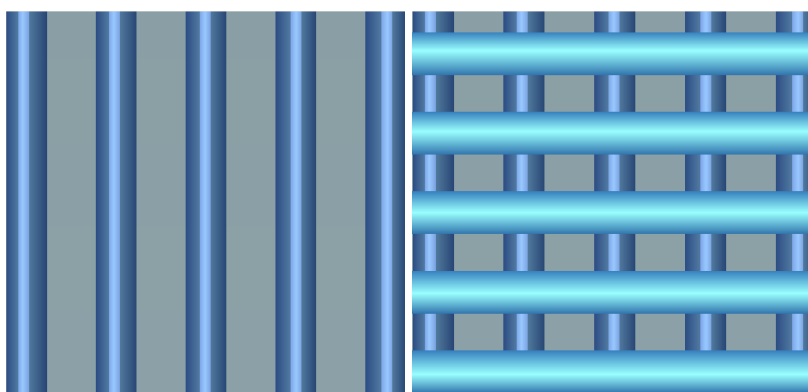


Figura 8. Esquema de capas en el modelo 0-90°. Se observa cómo la primera capa tiene una orientación, la segunda se encuentra a 90° de la anterior.

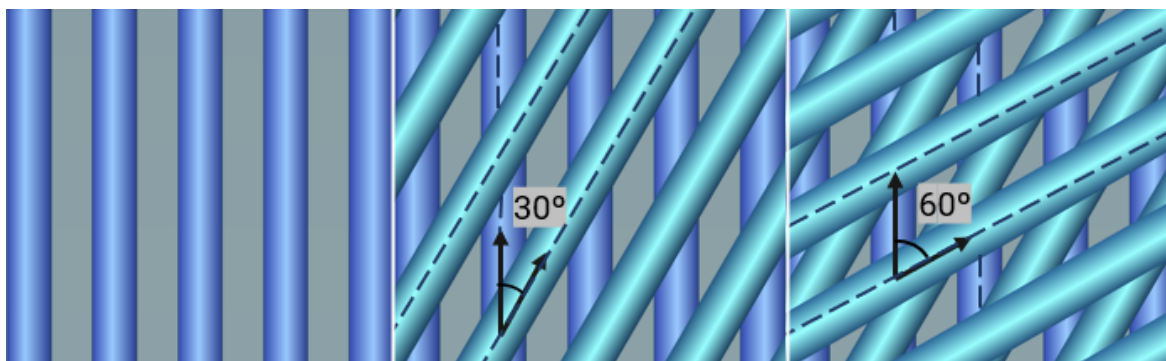


Figura 9. Esquema de capas en el modelo 0-30-60°. Se observa cómo la segunda capa se encuentra a 30° de la primera y la tercera a 60° de la primera.

2.4.2. Condiciones de Impresión

La impresión de los andamios se realiza con la impresora CODEX 2020 perteneciente al Laboratorio de Biomateriales, Biomecánica y Bioinstrumentación (Lab3Bio)-ITECA-UNSAM. Se imprimen tres tipos de andamios según el siguiente detalle de parámetros de impresión:

- ❖ Material del pico: Acero inoxidable
- ❖ Tamaño de pico: 0,5 mm
- ❖ Altura primera capa: 0,2 mm
- ❖ Altura a partir de la segunda capa: 0,4 mm

- ❖ Velocidad de impresión: 8 mm/min
- ❖ Distancia de la pollera (skirt): 3 mm
- ❖ Cantidad de polleras: 2
- ❖ Perímetro: 1 capa

Tabla 1. Parámetros de impresión, adecuados a la CODEX 2020.

Patrón	Material	Ángulos entre capas [°]	Temperatura de cama [°C]	Temperatura de extrusión [°C]
L	PHBV	0/90	105	196
T	PHBV	0/30/60	105	196
B	PHBV + BG	0/90	80	194

Es importante destacar que se utiliza un pico de acero inoxidable ya que resiste cambios de temperatura y la abrasión producida por materiales cerámicos particulados, evitando la aparición de residuos metálicos en los impresos [45].

2.4.3. Corte láser de muestras

Considerando que al imprimir, cada vez que el pico llega a un borde del impreso este “vuelve”, como se observa en la *Figura 10*, el material depositado en la “vuelta” proporciona un refuerzo en los bordes. Para evitar este efecto de borde y poder evaluar las propiedades del seno del impreso, es necesario el corte de los distintos impresos en muestras o andamios.

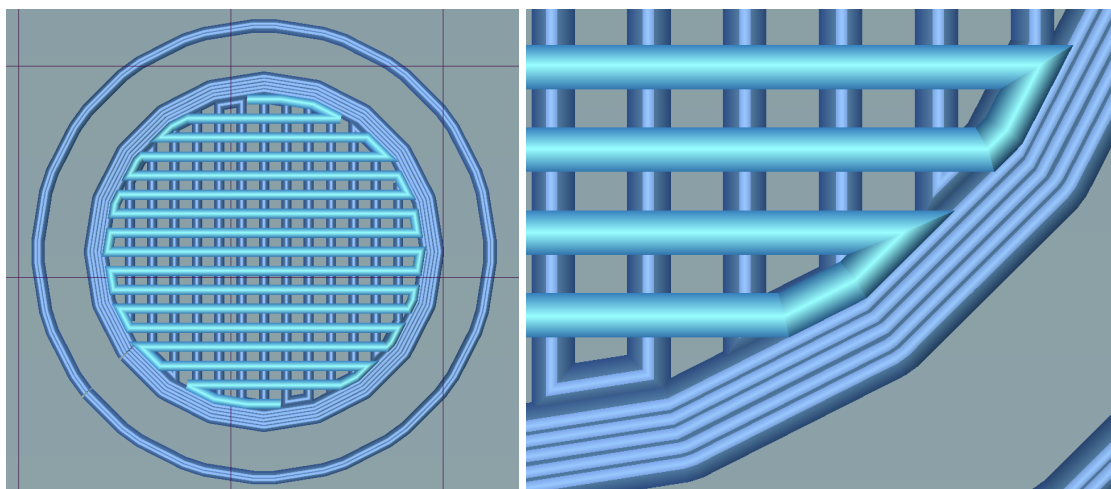


Figura 10. A la izquierda se observa un impreso 3D típico y a su derecha una ampliación de los bordes.

Con la cortadora y grabadora láser de potencia de corte máximo de 100W, perteneciente al Laboratorio de Prototipado de la Escuela de Ciencia y Tecnología (ECyT) - UNSAM, se genera un haz de luz capaz de cortar el material, obteniendo a partir de los impresos cilindros de 15 mm y 33 mm de diámetro, una y cinco piezas respectivamente, como se observa en los esquemas de la *Figura 11*.

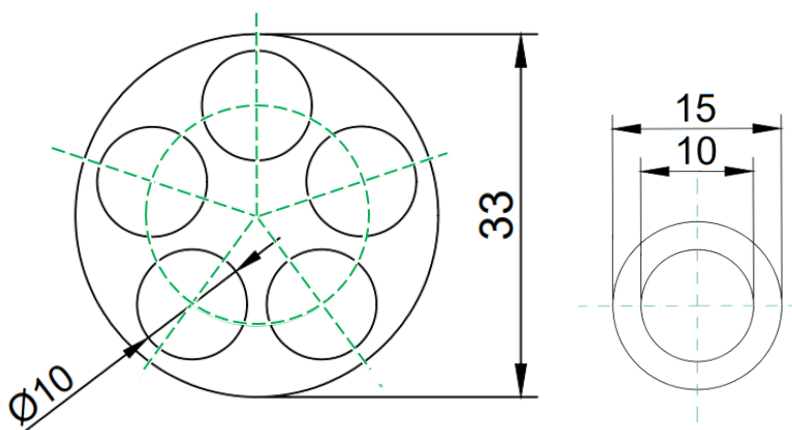


Figura 11. A la izquierda, esquema del corte de los cilindros de 33 mm de diámetro, donde se observa que se pueden obtener cinco piezas por cilindro impreso. A la derecha, esquema de corte de los cilindros de 15 mm de diámetro. Se observa que se puede obtener una sola pieza por cilindro impreso.

Las muestras o andamios esperados, como se observa en los esquemas de la *Figura 11*, en ambos casos, son cilindros de 10 mm de diámetro y 5 mm de alto. Como se menciona en el inciso 2.4.1, la elección de este tamaño de andamio se detalla en el *Apéndice A1*.

Para determinar los parámetros de corte, en el Laboratorio de Prototipado se realizaron ensayos sobre diferentes muestras de PHBV y elaboró un informe con los parámetros obtenidos para encontrar una configuración estable. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos, se aclaran en el *Apéndice A4* y se define para los cortes de las muestras, la utilización de 16 W de potencia y una velocidad de avance de 6 mm/s, ya que son los parámetros que mantienen la apertura de los poros laterales sin fundir ni sellarlos completamente.

2.4.4. Evaluación de la fidelidad de la impresión y del corte láser

Para tener buena fidelidad de los impresos 3D debe existir una variación mínima o nula en la relación dimensional entre el modelo y el impreso. Por lo que, para evaluar esta característica, se miden con calibre digital las dimensiones del cilindro obtenido, se toman imágenes ópticas y, por último, a través de un programa de análisis de imágenes se determinan los anchos de filamento impreso, las distancias entre filamentos y ángulos entre capas, a partir de utilizar una imagen de una escala graduada para calcular el tamaño en píxeles. En este trabajo se realiza la toma de imágenes con un celular Motorola ONE con ampliación 4.9x y su posterior análisis, mediante la utilización del programa de análisis de imágenes ImageJ® (obtenible de <https://imagej.nih.gov/ij/>, Julio 2022).

2.5. Ensayo de degradación

Se disponen muestras de cada uno de los tres patrones de impresión en un baño con solución similar fisiológica (SBF) durante distintos tiempos de inmersión: 0, 7, 15, 30, 45 y 60 días. Además, se realizan réplicas para su posterior análisis de propiedades mecánicas y

morfológicas. En el caso de los patrones “L” (0-90°, PHBV) y “T” (0-30-60°, PHBV), se realizan seis réplicas, de las cuales cinco son para evaluación de propiedades mecánicas y la restante para análisis morfológico. Por otro lado, dado que las tareas que conllevan la producción de muestras del patrón “B” (0-90°, PHBV + BG) y que se dispone de un tiempo reducido para la realización del presente trabajo, se realizan cuatro réplicas, de las cuales tres se emplearán para determinar sus propiedades mecánicas y la restante para el análisis morfológico.

Para identificar cada muestra o andamio se los nombra de la siguiente manera: Una letra correspondiente al patrón de impresión, seguido del número de días de inmersión y por último la letra “R” acompañada del número de réplica. Para ejemplificar, considerando una muestra de PHBV + BG, que su tiempo total de inmersión es o será 45 días y corresponde a la réplica número dos, resultaría su identificación como: “B45R2”.

2.5.1. Preparación de SBF e inmersión de muestras

El volumen de SBF que se utiliza para cada muestra corresponde a la relación que se observa en la *Ecuación 1*, donde intervienen la superficie de la muestra en mm^2 (S_m) y el volumen del medio necesario en mL (V_m). Considerando que la superficie (S_m) de un andamio (que se obtiene luego de cortar un impreso), y que este es un cilindro perfecto, lleno y sin poros, se corresponde al cálculo de la ecuación *Ecuación 2*, donde “r” es el radio y su altura “h”. Entonces, para $r = 5 \text{ mm}$ y $h = 5 \text{ mm}$, se obtiene un valor de $314,15 \text{ mm}^2$. Finalmente, utilizando la *Ecuación 1*, resulta en $31,41 \text{ mL}$ de volumen de SBF necesario. Se eligen como recipientes tubos falcon de 50 mL y se colocan 40 mL de medio, según recomendación en (Kokubo, 2006), ya que las muestras al ser porosas, en realidad poseen mayor superficie libre. Luego, se sumerge cada muestra dentro del tubo correspondiente, procurando que esté en la posición que se observa en la *Figura 12*, y por último se sumerge el tubo en un baño termostático *Figura 13* a una temperatura de $36,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

$$V_m = S_m / 10 \quad (\text{ec. 1})$$

$$S_m = 2 \pi r h + 2 \pi r^2 \quad (\text{ec. 2})$$

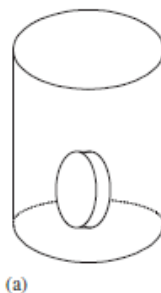


Figura 12. Esquema de cómo deben ser colocados los andamios dentro de los tubos falcon, completamente sumergidos en SBF. Imagen tomada de Kokubo, 2006.



Figura 13. Baño termostático HH-S4, que se utiliza para mantener la temperatura a 36,5°C durante la inmersión de las muestras y la preparación de SBF.

La preparación del SBF se realiza siguiendo el procedimiento propuesto en Kokubo, 2006 [40].

Materiales e insumos que se utilizan en el trabajo para la preparación de SBF:

- ❖ Balanza Analítica Acculab - Modelo: ALC-210.4 - Max: 210 g - Error: 0,0001 g
- ❖ Recipiente plástico liso de un litro
- ❖ Potasio Fosfato Dibásico (Anhidro) (K_2HPO_4) - CAS N° 7758-11-4
- ❖ Sodio Bicarbonato ($NaHCO_3$) - PM: 142,02
- ❖ Calcio Cloruro Dihidrato ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) - PM 147-01 - CAS N° 10035-04-8
- ❖ Sodio Sulfato (Anhidro) (Na_2SO_4) - PM: 142,04 - CAS N° 7757-82-6
- ❖ Tris Molecular biology grade ($C_4H_{11}NO_3$) - PM: 121,14

Considerando que, en la zona del cuerpo biológico donde se introduciría un andamio, existe un flujo de plasma sanguíneo a una temperatura de 36,5 °C, para simular las condiciones *in vivo*, disminuir el riesgo de proliferación de microorganismos y minimizar el tiempo destinado a la preparación del medio, se estableció un cambio periódico del medio en intervalos de 7 (siete días) y mientras se mantuvo a una temperatura constante de 36,5 °C. El protocolo de cambio de SBF se detalla en el Apéndice A5.

2.5.2 Evaluación de peso

Para evaluar cuantitativamente cuánto PHBV se degrada y disuelve en el medio, y la cantidad de HA que se forma, se propone evaluar la variación de peso tanto húmedo como seco que existe entre la muestra previo y post inmersión. Se sigue el procedimiento detallado en Apéndice A6.

En todas las muestras, con el peso inicial (W_0) y el peso húmedo (W_1) de cada una de ellas, se realiza el cálculo del grado de hinchamiento, debido a la absorción del medio en el andamio, siguiendo la Ecuación 3. Por otro lado, se realiza el cálculo de variación de peso

seco, donde se mide el peso seco (W_2) luego de que la muestra se seca durante dos días en desecador, a través de la *Ecuación 4*.

$$\% \Delta \text{Grado de hinchamiento} = \frac{(W_1 - W_0)}{W_0} * 100 \quad (\text{ec. 3})$$

$$\% \Delta \text{Peso Seco} = \frac{(W_2 - W_0)}{W_0} * 100 \quad (\text{ec. 4})$$

2.6 Evaluación de la bioactividad

Para evaluar la bioactividad del material, se estudia la formación de HA sobre el andamio. En este trabajo, se utilizarán tres técnicas para esta evaluación, que se detallan a continuación.

2.6.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Mediante microscopía electrónica de barrido (sigla en inglés: SEM), se estudia la morfología de los andamios a distintos tiempos de inmersión. Además, se realiza una espectroscopia de dispersión en energía de rayos X (sigla en inglés: EDXS). Se utiliza el microscopio electrónico FEI Quanta 200 del Laboratorio de Caracterización de Materiales (LCM) del Centro Atómico Constituyentes (CAC) - CNEA. La observación de las muestras, se realizan luego de metalizar con oro 99,9% en el equipo Q150T ES PLUS - Quorum del LCM-CAC-CNEA.

El funcionamiento del SEM se basa en la incidencia de un haz de electrones sobre la muestra que interactúa con la superficie de la misma, emitiendo diferentes señales que el equipo es capaz de detectar, mientras se hace un barrido línea a línea sobre una zona en forma de rectángulo. Para las imágenes tomadas en este trabajo, se consideran los electrones secundarios, que permiten obtener información de la superficie y un pequeño volumen superficial. Entonces, al tomar una imagen, los electrones secundarios que son emitidos de zonas salientes o escalones se observan como zonas brillantes mientras que cuando se observa un pozo o detrás de un saliente, se observan como zonas oscuras o sombras.

En cuanto al proceso del análisis de EDXS, se analiza otra de las señales que se emiten por la incidencia del haz de electrones, que corresponde a la radiación característica, la cual se debe a la ionización de las capas electrónicas internas y su posterior desionización (o desexcitación) de los átomos presentes en un volumen de aproximadamente $1 \mu\text{m}^3$ donde incide el haz. El análisis de esta radiación, permite identificar qué elementos se encuentran en la zona, mediante las energías (E) o longitudes de onda (λ) de los fotones que son emitidos.

Es necesaria la metalización de las muestras debido a que, como el PHBV es un polímero no conductor, al incidir en él con un haz de electrones, estos no tienen lugar al cual dispersarse lo que genera una acumulación de carga que termina por fundir la zona que se esté tratando de analizar. Entonces, si se metaliza, los electrones tienen un lugar de escape que permite los análisis correspondientes.

Para evaluar la bioactividad mediante imágenes SEM, se busca formaciones del tipo “coliflor” sobre la superficie del andamio, que corresponden al crecimiento típico de la HA [42]. Por otro lado, el espectrograma de EDXS que se realiza sobre dos puntos: en zonas con y sin formación de HA aparente. Del espectrograma se espera obtener valores de relación atómica de 1,62 y en masa de 1,9 para confirmar la formación de HA [46].

2.6.2. SAXS/WAXS

Se realizan ensayos de difracción de rayos X de bajo y alto ángulo (SAXS/WAXS, por sus siglas en inglés) en el equipo XEUSS 2.0 con una micro fuente de radiación de Cobre - K α ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$) de la marca XENOCSS del Laboratorio de Cristalografía Aplicada (LCA) del ITECA. La preparación de muestras, requiere tomar filamentos de cada uno de los impresos y colocarlos en el portamuestras del difractómetro, tratando de que los mismos se encuentren lo más pegados entre sí posible. Las condiciones para evaluar incluyen que el haz sea de alto flujo, y la medición se realice en ángulos 2θ entre $0,5$ y 45° . Por otro lado, se calcula el espaciado característico (d) a partir de la *Ecuación 5*.

$$d = \frac{\lambda}{2\sin\theta} \quad (\text{ec. 5})$$

El ensayo se realiza sobre el PHBV como polvo, previo a cualquier tratamiento térmico; luego, sobre un filamento de PHBV que fue sometido a un primer tratamiento térmico (extrusión) y por último, se realiza sobre PHBV luego de ser impreso por 3D, siendo el segundo tratamiento térmico al que se somete. Además, se hace una medición sobre PHBV + BG de WAXS y SAXS. Se espera observar diferencias en el PHBV luego de diferentes procesamientos térmicos y en la muestra de PHBV + BG detectar la formación de hidroxiapatita (ver picos característicos de los cristales de este cerámico).

2.7. Análisis de propiedades mecánicas

Los andamios se someten a un ensayo de compresión a velocidad de deformación constante. Para ello se emplean dos equipos distintos: un analizador mecánico-dinámico (DMA), con alta resolución a tensiones bajas y una máquina universal de ensayos (ME) para aplicar esfuerzos mayores. Para poder contrastar los datos obtenibles entre los dos equipos, se establecieron como condiciones la velocidad de ensayo en $1000 \mu\text{m}/\text{min}$ o $1 \text{ mm}/\text{min}$, y una velocidad de muestreo de 2 puntos/s para el DMA y 1 punto/ 10s para la ME.

De los datos de fuerza nominal y tiempo de ensayo, obtenidos de ambos equipos, se calculan los valores del esfuerzo (σ) y deformación (ε) ingenieriles: para el caso del esfuerzo (σ) siguiendo la Ecuación 6, donde "F" corresponde a la fuerza aplicada en unidades de Newton y "A" es el área inicial de la probeta en mm²; los valores de deformación según la Ecuación 7, donde " ΔL " corresponde al desplazamiento que realiza el equipo y " L_0 " la altura inicial de la probeta, ambos valores en mm. De esto, se grafica la curva esfuerzo vs deformación y se calcula el módulo elástico mediante regresión lineal. El módulo elástico calculado es aparente, ya que para los cálculos se considera que es un cilindro sólido no poroso. Luego, se calcula el valor de límite elástico, donde el material ya no se comporta linealmente, tomando como método diferencias respecto de la recta de elasticidad, se toma como valor el punto donde la curva se desplaza en un 0,05 MPa respecto de la recta de elasticidad [47].

$$\sigma = F/A \quad (\text{ec. 6})$$

$$\varepsilon = \frac{\Delta L}{L_0} \quad (\text{ec. 7})$$

Se realizaron secuencias de comando, en *Jupyter Notebook* (<https://jupyter.org/>, Julio 2022) en el lenguaje de programación *Python 3.10* (<https://www.python.org/>, Julio 2022), para procesar los datos y generar las curvas correspondientes para equipo, se detallan cuáles en el apartado del equipo correspondiente.

2.7.1. Analizador mecánico dinámico (DMA)

Se utiliza el DMA Q800 (TA instruments) perteneciente al Lab3Bio. El mismo permite una aplicación de fuerza de hasta 17 N, lo que permitiría observar el comportamiento del andamio a bajas cargas.

Los datos que se obtienen en el ensayo (fuerza normal aplicada sobre los andamios vs tiempo del ensayo), se procesan con la secuencia de comandos detallada en *Apéndice C1*, para facilitar su tratamiento y análisis. Por otro lado, se usa otra secuencia de comandos para generar los gráficos tanto de fuerza vs desplazamiento como esfuerzo vs deformación ingenieriles (ver *Apéndice C3*).

2.7.2. Máquina de ensayos (ME)

Para conocer el comportamiento de los andamios a cargas superiores a las del DMA, se utiliza la máquina de ensayos perteneciente al NanoFab - FAN, cuya capacidad máxima de carga es de 10 kN.

Los datos que se obtienen en el ensayo, se procesan con el secuencia de comandos detallado en *Apéndice C2* para facilitar el procesamiento y análisis. Por otro lado, se usa otra secuencia de comandos para generar los gráficos tanto de fuerza vs desplazamiento como esfuerzo vs deformación ingenieriles (ver *Apéndice C4*).

3. Resultados

3.1. Fidelidad de impresión

Se presentan en la *Tabla 2* las dimensiones de los impresos con el fin de evaluar la fidelidad de impresión. En la misma se muestran los valores medios con sus desvíos estándar y el error porcentual de cada modelo. El error porcentual de las dimensiones reales respecto a las del modelo, se encuentra dentro del 5% tanto para el PHBV y para PHBV + BG

Tabla 2. Mediciones de los distintos tipos de impresos.

	Valor modelo [mm]		Valor medio del impreso [mm]		Error relativo porcentual [%]	
Modelo	Altura	Diámetro	Altura	Diámetro	Altura	Diámetro
L - Grande	5,0	33,0	4,9 ± 0,1	32,3 ± 0,3	1,1	2,1
T - Grande	5,0	33,0	4,9 ± 0,1	32,1 ± 0,3	1,1	2,6
T - Chico	5,0	15,0	5,0 ± 0,1	14,5 ± 0,2	0,3	3,4
B - Chico	5,0	15,0	4,8 ± 0,1	14,9 ± 0,2	4,0	0,9

3.2. Morfología de los andamios

La *Figura 14* ilustra las muestras obtenidas por corte láser a partir de los impresos. Se destaca la calidad del corte en las muestras, aunque varias presentan pequeñas imperfecciones en la base del andamio alrededor de la zona de corte (rebabas). A partir de estas imágenes, se caracterizan cada uno de los tipos de andamios mediante el programa ImageJ®. Se detallan los valores dimensionales medidos y calculados de las muestras luego del corte láser en la *Tabla 3*. Los valores medidos de altura se encuentran en errores porcentuales alrededor de 5%, salvo el caso de los andamios tipo B, que se eleva a 8,4%. Cabe señalar que las diferencias que se presentan en diámetro es mayor al 5%, debido a que poseen un diámetro menor a 10 mm, dado que el archivo .CAD utilizado para realizar los cortes, poseía exactamente 10 mm, dejando en segundo plano el ancho del láser. Asimismo el corte láser modifica la superficie lateral de las muestras, como ilustra la *Figura 15*, que incluyen el redondeo u ovalización de los filamentos y poros de la superficie lateral. Debido a estas modificaciones, no se evalúan el alto de capa y tamaño de poros lateralmente, ya que podría no ser representativo a lo que sucede dentro del andamio.

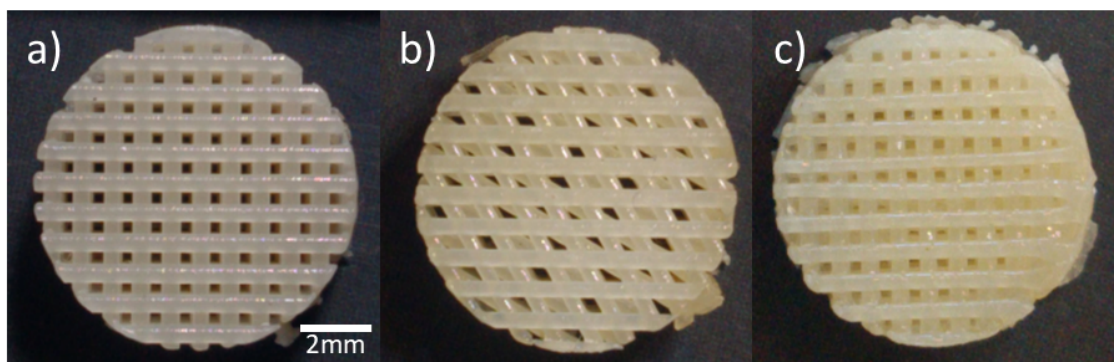


Figura 14. Muestras representativas de los andamios tipo L (a), tipo T (b) y tipo B (c).

Tabla 3. Dimensiones de las muestras previo a ensayar.

Modelo	Valor modelo [mm]		Valor medio [mm]		Error relativo porcentual [%]	
	Altura	Diámetro	Altura	Diámetro	Altura	Diámetro
L	5,00	10,00	$4,8 \pm 0,1$	$9,5 \pm 0,6$	3,6	5,6
T	5,00	10,00	$4,8 \pm 0,1$	$9,5 \pm 0,1$	4,6	5,6
B	5,00	10,00	$4,6 \pm 0,1$	$9,5 \pm 0,1$	8,4	5,0

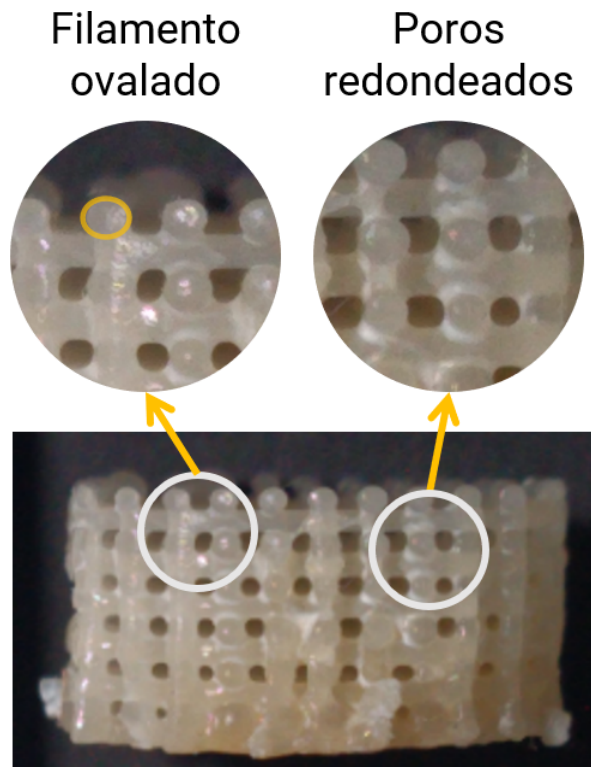


Figura 15. Imágenes laterales de andamios impresos 3D obtenidos por corte láser. El corte láser redondea las terminaciones superficiales de los filamentos impresos y los poros.

En los andamios tipo L, el ancho promedio de filamento es de $474 \pm 40 \mu m$ y la distancia promedio entre ellos es de $322 \pm 24 \mu m$. Además, se observa una superficie lisa sobre los andamios previo a la inmersión, como se ve en imagen de SEM de la Figura 16.

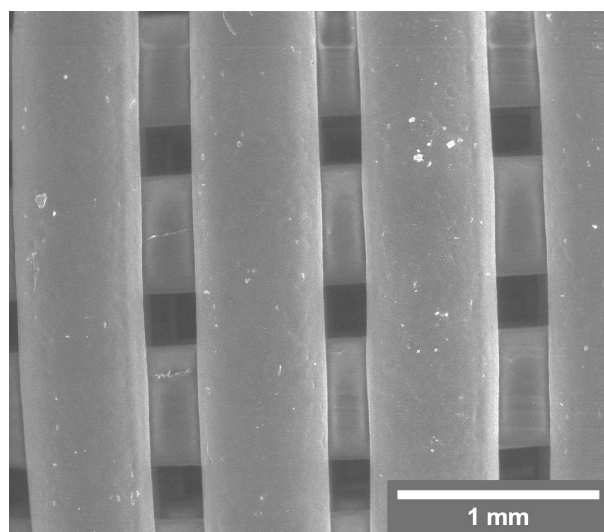


Figura 16. Andamio de PHBV donde se observa una superficie lisa.

En cuanto a los andamios del tipo T, el ancho de filamento para este tipo de andamio es de $484 \pm 24 \mu\text{m}$ y la distancia entre filamentos es de $460 \pm 66 \mu\text{m}$. Para evaluar la fidelidad de impresión de los filamentos en el ángulo entre capas impresas, se midieron según el esquema que presenta la imagen *Figura 17*, obteniéndose para el caso del ángulo entre la última y la penúltima capa una media de $30 \pm 2^\circ$ y para el caso de la última y antepenúltima capa una media de $59 \pm 3^\circ$. Según los histogramas presentados en la misma figura, la dispersión de las mediciones de los ángulos es de $\pm 10^\circ$.

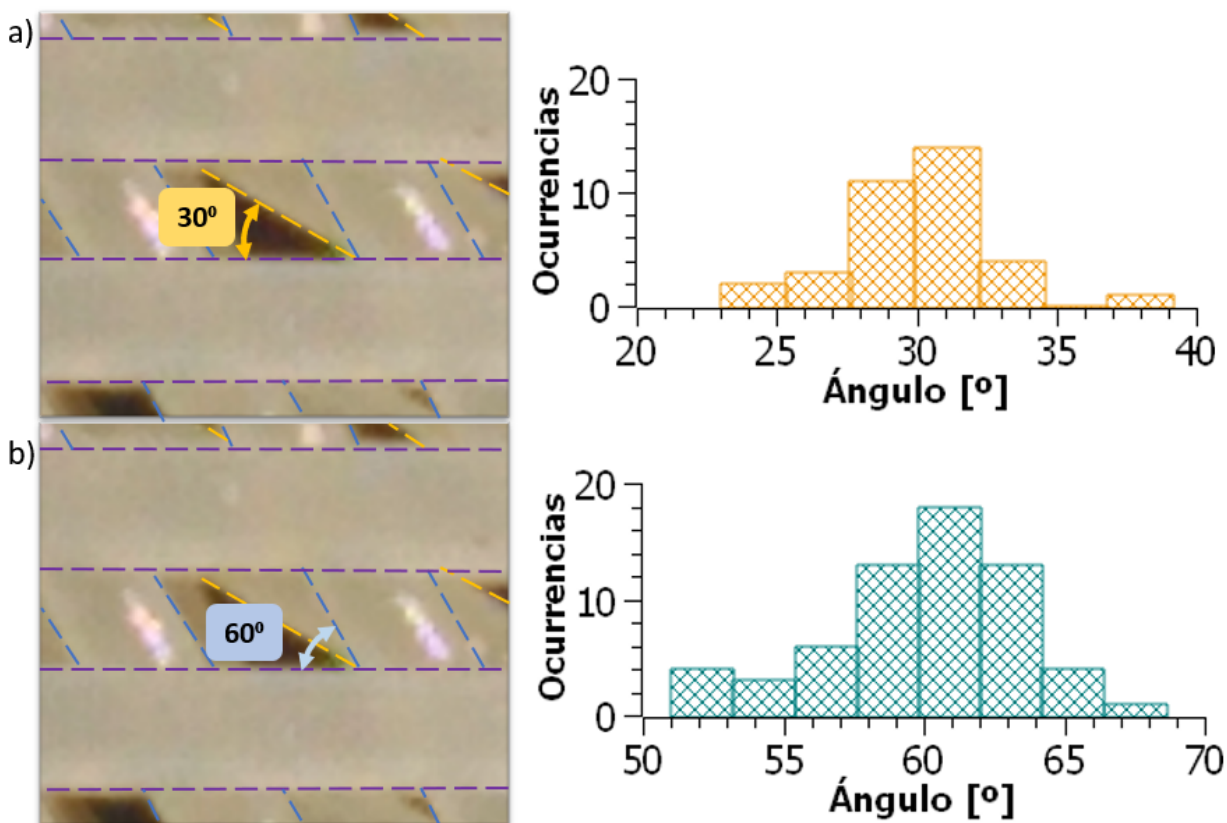


Figura 17. A la izquierda, el esquema de medición de los ángulos. A la derecha, la dispersión obtenida para cada tipo de ángulo.

Para el caso de los andamios tipo B, se obtiene un ancho de filamento de $437 \pm 88 \mu\text{m}$ y una distancia entre ellos de $349 \pm 81 \mu\text{m}$. Estas dimensiones presentan una mayor dispersión en los datos respecto a los otros tipos de andamio, que se observa como irregularidad de las líneas de impresión en las imágenes de SEM (*Figura 18*). Esta irregularidad se debe al filamento de PHBV+BG obtenido por extrusión, el cual no mantiene un espesor constante como lo hace el filamento de PHBV, como se observa en la *Figura 19*. En las micrografías de la *Figura 18*, se aprecian huecos a lo largo de las líneas impresas; huecos de similar tamaño se observan en los andamios tipo L.

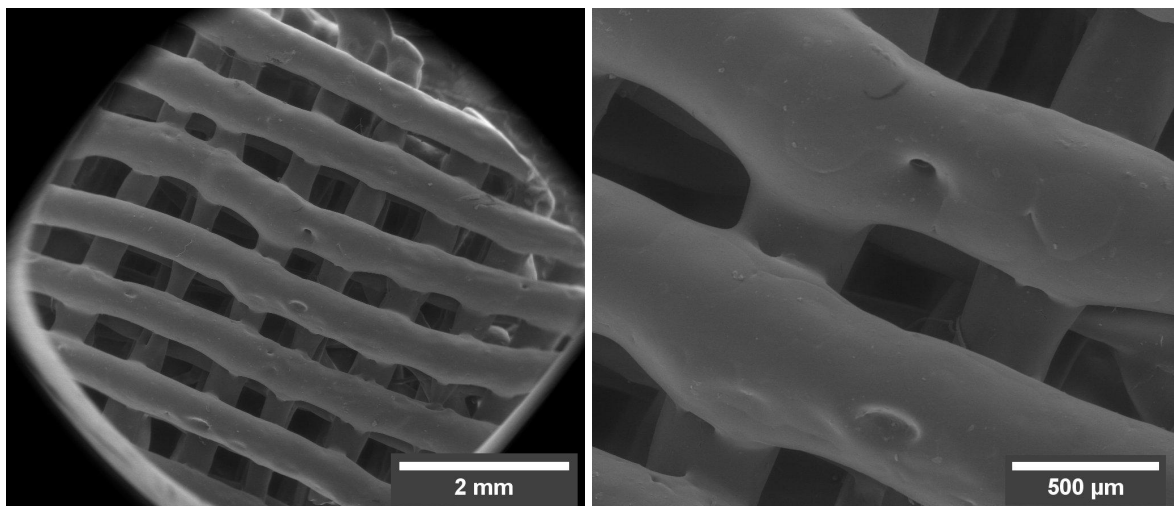


Figura 18. Superficie de muestra de la familia B. Se observan pozos de aproximadamente $0,1\mu\text{m}$

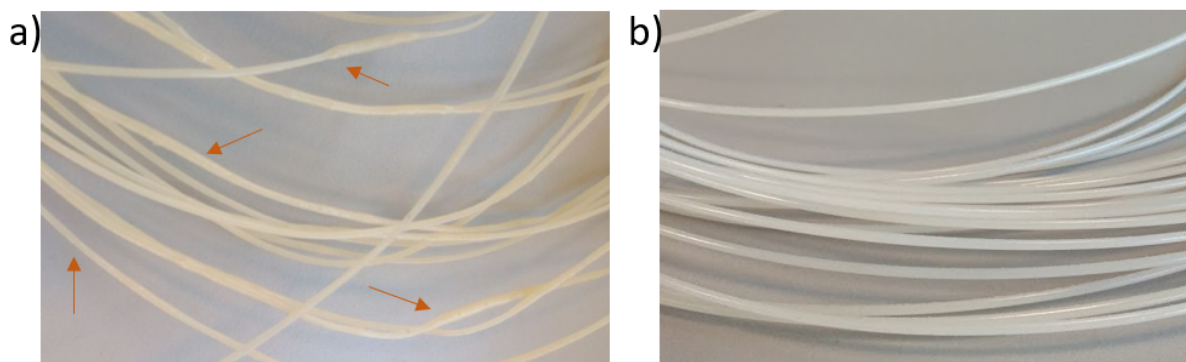


Figura 19. Comparación de filamentos obtenidos por extrusión para (a) PHBV+BG, donde se observan irregularidades y (b) PHBV que posee un filamento de diámetro constante

A modo de resumen, en la Tabla 4 y las figuras *Figura 20* y *Figura 21* se detallan los valores medios y errores del ancho y distancia entre filamentos, para los tres tipos de andamios considerados en este trabajo. Se puede observar cómo el ancho de filamento para los tipos L y T, poseen valores medios muy similares. Para el caso del tipo B, se tiene un ancho de filamento menor, pero con mayor desviación estándar debido a la heterogeneidad del filamento. Los andamios tipo L y B tienen una distancia media similar entre filamentos, dado que poseen igual patrón de diseño, mientras que el tipo T presenta mayor distancia por el cambio de patrón de diseño.

Tabla 4. Valores calculados a partir de las mediciones realizadas con ImageJ®

Tipo	Ancho filamento [μm]	Distancia entre filamentos [μm]
L	474 ± 40	322 ± 24
T	484 ± 24	460 ± 66
B	437 ± 88	349 ± 81

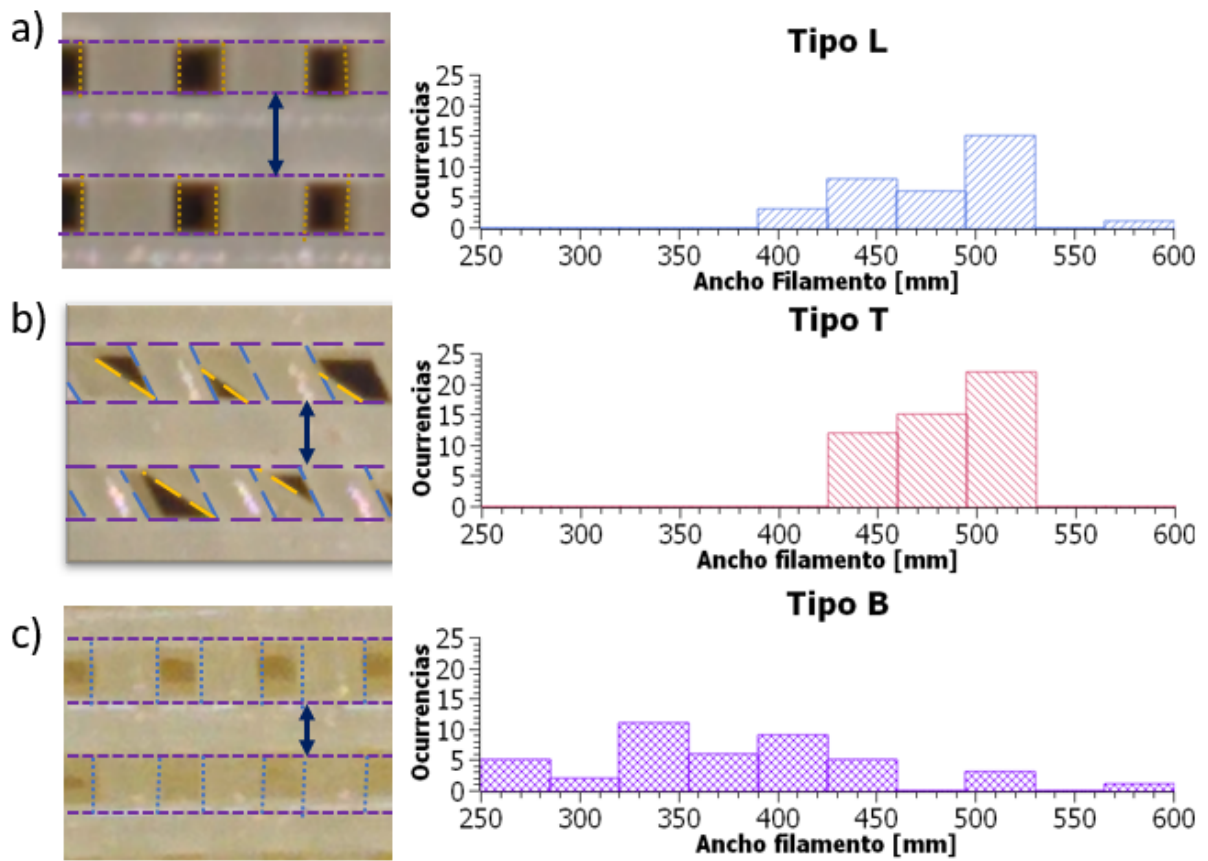


Figura 20. A la izquierda, un esquema de cómo se realizaron las mediciones de ancho de filamentos sobre las imágenes de los andamios y a la derecha la dispersión de las mismas, para cada tipo de andamio.

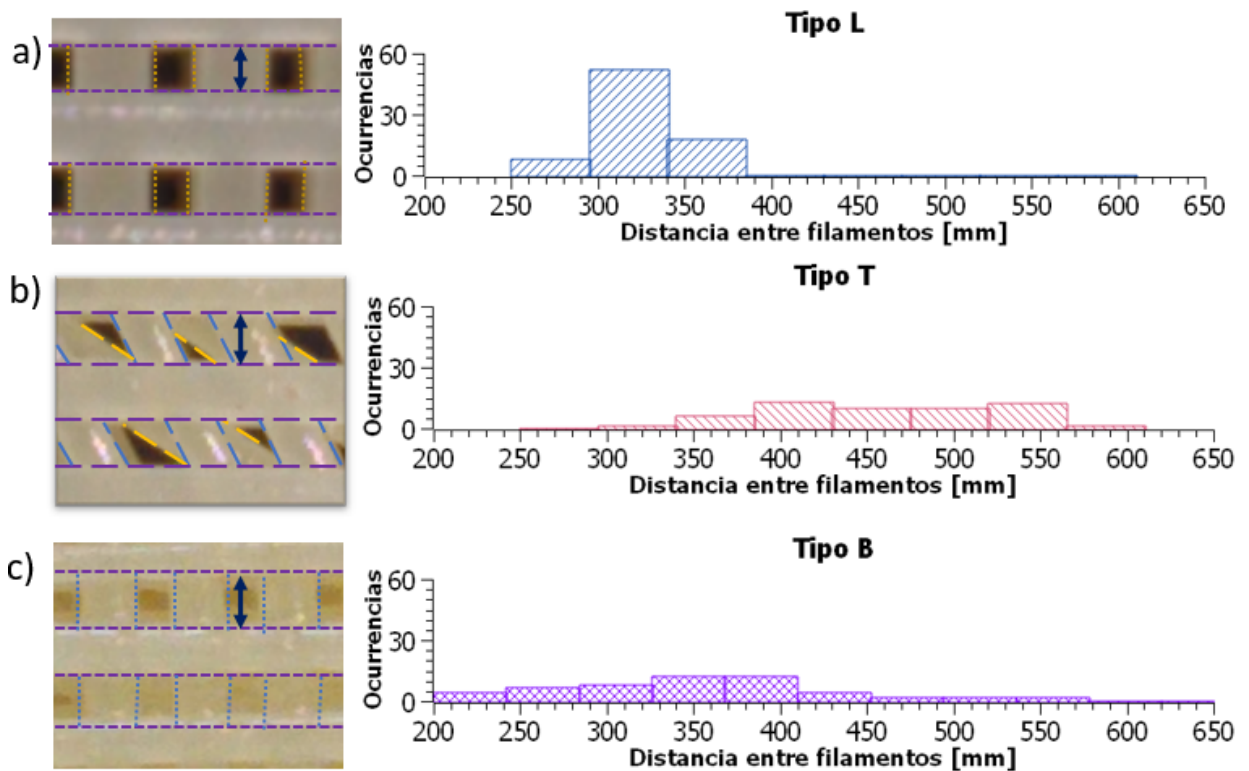


Figura 21. A la izquierda, un esquema de cómo se realizaron las mediciones de distancia entre filamentos sobre las imágenes de los andamios y a la derecha la dispersión de las mismas, para cada tipo de andamio.

3.3. Análisis de la degradación

3.3.1. Evaluación de peso

Luego de que las muestras permanecieron en inmersión en SBF, se midió la variación de peso húmedo y seco a fin de determinar el grado de hinchamiento y degradación. En la *Figura 22* y la *Figura 23* se presentan los resultados obtenidos. Se observa que para los andamios del tipo L no hay variación de peso húmedo que sea superior al 5%. En cambio, para los andamios del tipo T existe variación de peso húmedo y mayor dispersión. En los andamios tipo B el peso húmedo aumenta según el tiempo de inmersión.

En cuanto a la variación de peso seco, se puede observar en la *Figura 23* cómo en las muestras que poseen únicamente PHBV existe una disminución del peso conforme pasa el tiempo, mientras que, en el caso de las muestras con BG, existe un aumento considerable del peso.

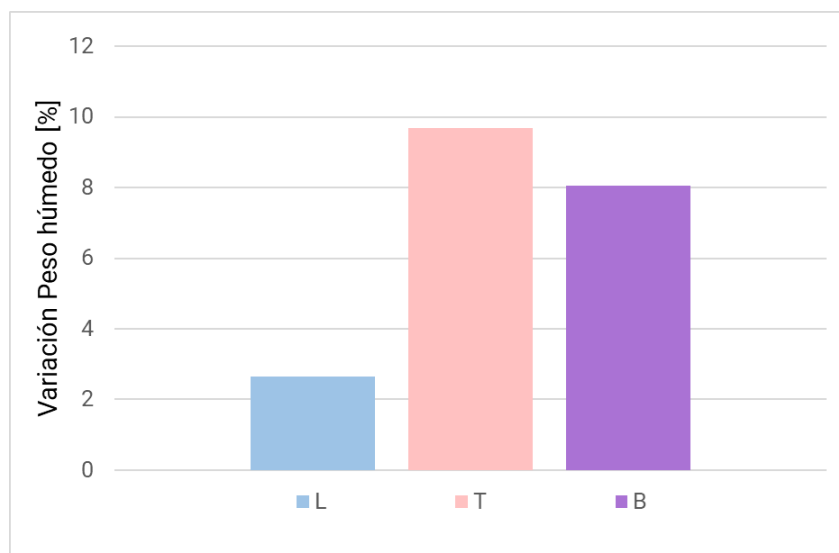


Figura 22. Variación de peso húmedo de los andamios para los tres patrones de impresión, luego de estar sumergidas 7 días.

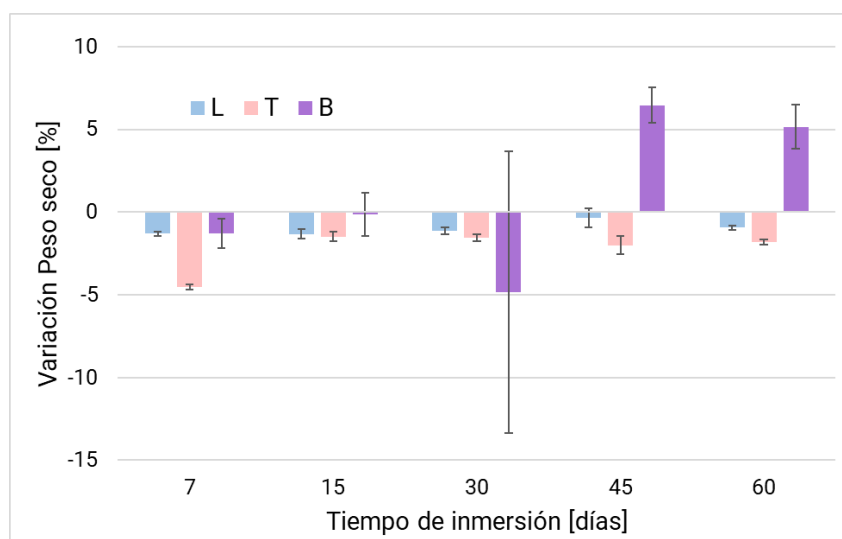


Figura 23. Variación de peso seco de los andamios para los tres patrones de impresión, luego de inmersión en distintos periodos de SBF.

3.3.2. Variación de pH

Se midió el pH del SBF al momento de su renovación, de los tres tipos de andamios. Se muestra en la *Figura 24* que la dispersión de valores medidos se encuentra dentro de 7,30 a 7,50 pH. Por otro lado, se muestra tomando el valor medio de los puntos medidos para cada tiempo de inmersión para los andamios tipo B y luego realizando una línea de tendencia, se puede observar en la *Figura 24d* que se mantiene el valor constante.

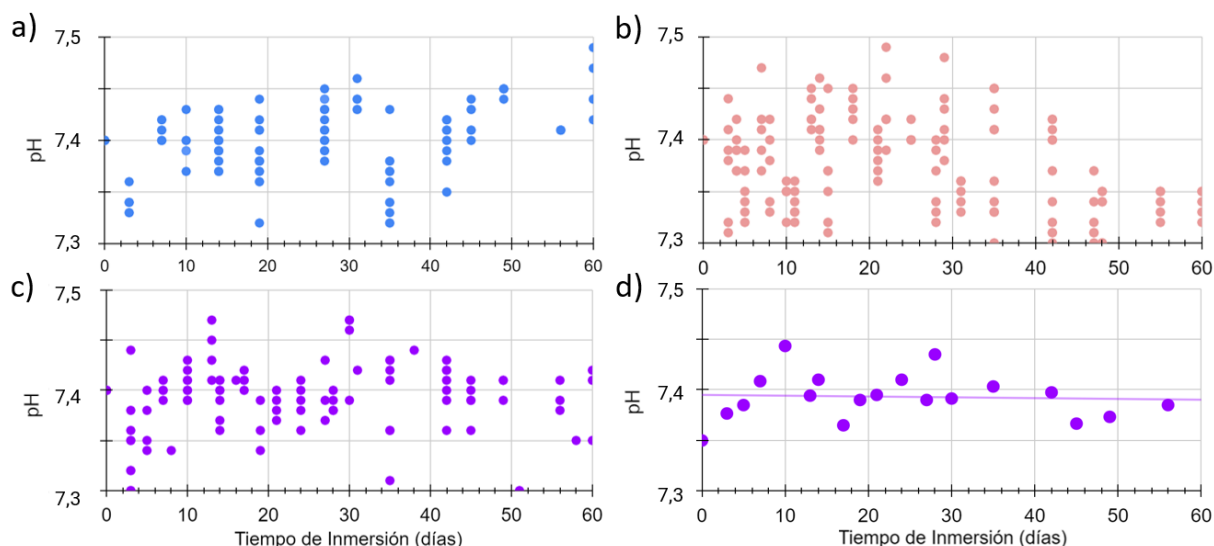


Figura 24. pH a distintos tiempos de inmersión para los andamios tipo (a) L, (b) T, (c) B. (d) Valores medios de las mediciones de cada tiempo de inmersión para andamios tipo B; la pendiente de la correlación lineal es cercana a cero.

3.3.3. Caracterización morfológica

La *Figura 25* muestra la superficie de una línea impresa de un andamio. Las depresiones de la superficie corresponden al límite entre esferulitas (arreglos esferoidales de regiones cristalinas y amorfas de PHBV). En la *Figura 26* se presenta la imagen SEM del estado de degradación de un andamio de PHBV después de haber sido incubados en SBF durante 60 días. Se observa erosión superficial, que se manifiesta como zonas blancas (detalle en *Figura 28*). Además, tanto para los andamios de tipo T como los de tipo B a 60 días de inmersión (*Figura 26* y *Figura 28*, respectivamente), se observa la formación de cavidades alrededor de las de esferulitas (detalle en *Figura 27*) que se forman en el material.

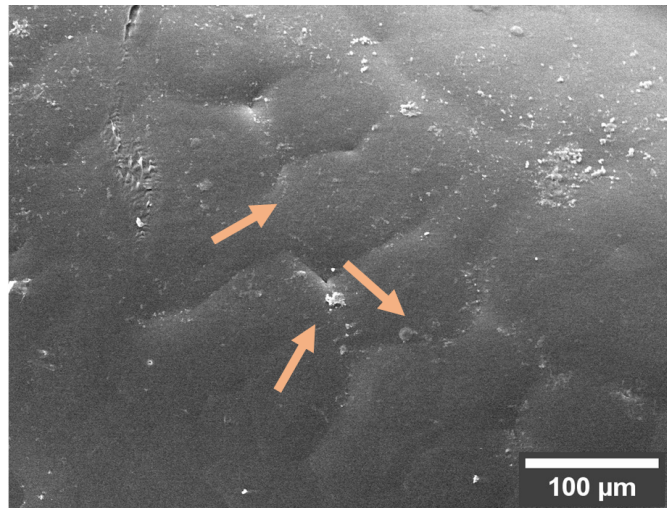


Figura 25. Esferulitas previo a la degradación en PHBV.

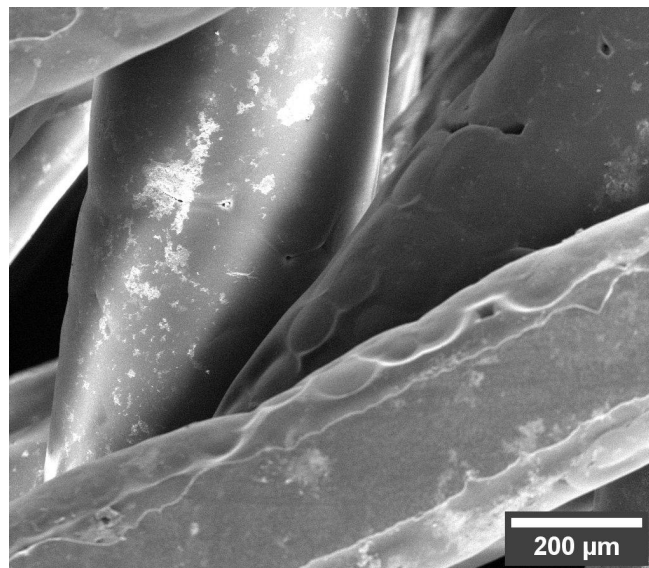


Figura 26. Imagen de SEM para los andamios tipo T luego de 60 días de inmersión. Se observan zonas blancas características de la erosión superficial y cavidades alrededor de las esferulitas.

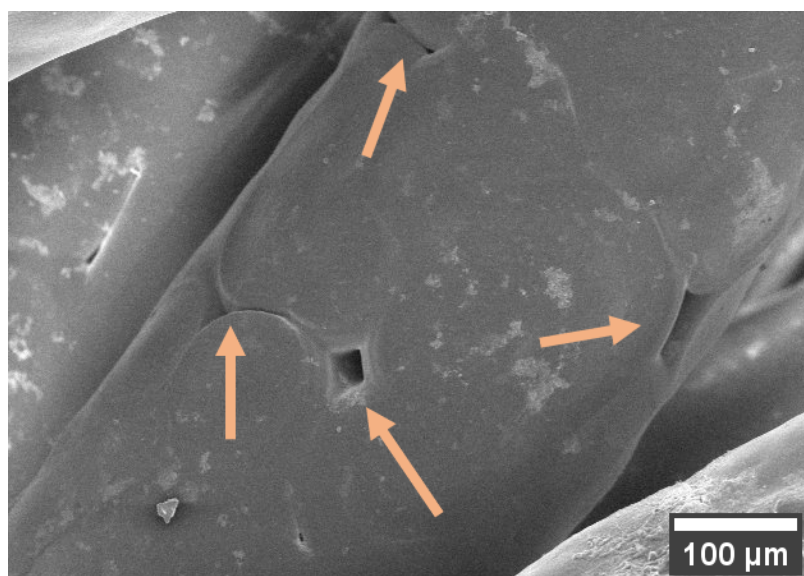


Figura 27. Imagen SEM andamios PHBV luego de 60 días de inmersión. Se marcan con flechas zonas cavitadas alrededor de las esferulitas

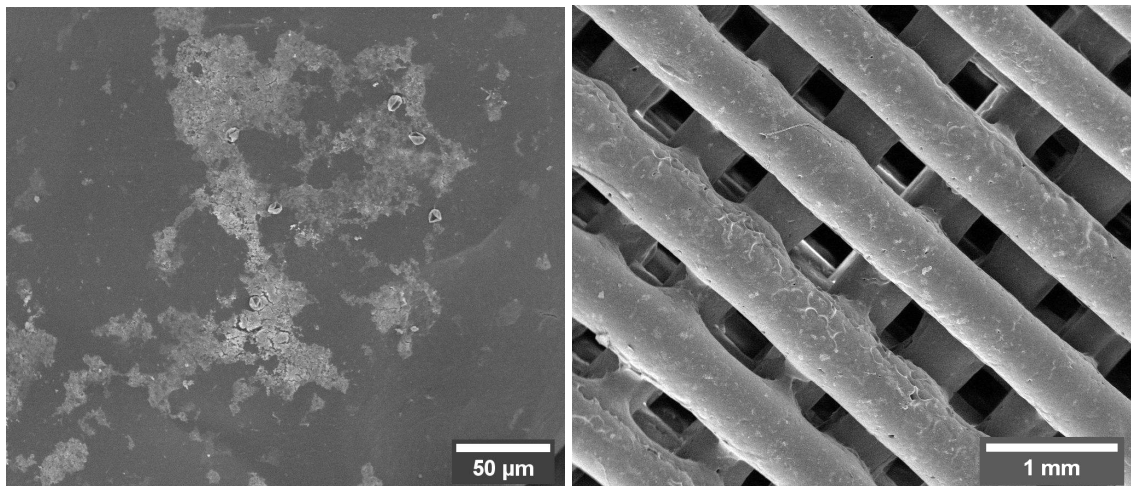


Figura 28. Superficie erosionada de un andamio luego de 60 días de inmersión. A la izquierda, para un andamio de tipo T a los 60 días de inmersión. A la derecha, para un andamio del tipo B.

3.2.4. Análisis de propiedades mecánicas

Tal como se resume en la *Tabla 5* y se representa en la *Figura 29* y la *Figura 30*, los valores de módulo de compresión para los andamios tipo L y T no presentan diferencias conforme aumenta el tiempo de inmersión. En cambio, para los andamios tipo B se observa una clara disminución del módulo elástico con el tiempo de inmersión. Los datos de B7 y B45 no se tomaron para el análisis ya que las muestras no poseen una buena calidad de impresión. Los datos de límite elástico de la *Tabla 6* y *Figura 31*, no muestran cambios para los andamios tipo T. Los andamios tipo L y tipo B presentan mayor variación en los valores de límite elástico.

Tabla 5. Módulo elástico para los distintos tipos de andamios.

	Módulo elástico - L [MPa]	Módulo elástico - T [MPa]	Módulo elástico - B [MPa]
0	294 ± 33	221 ± 39	337 ± 49
7	364 ± 7	184 ± 29	200
15	329 ± 35	204 ± 21	286 ± 80
30	281 ± 64	222 ± 48	206 ± 53
45	330 ± 63	211 ± 19	-
60	373 ± 27	190 ± 31	205 ± 17

Tabla 6. Límite elástico para los distintos tipos de andamios.

	Límite elástico - L [MPa]	Límite elástico - T [MPa]	Límite elástico - B [MPa]
0	10 ± 3	10 ± 2	31 ± 4
7	16 ± 1	6 ± 1	13 ± 5
15	18 ± 3	9 ± 1	21 ± 6
30	12 ± 4	9 ± 2	12 ± 2
45	21 ± 2	10 ± 1	-
60	17 ± 2	10 ± 2	22 ± 2

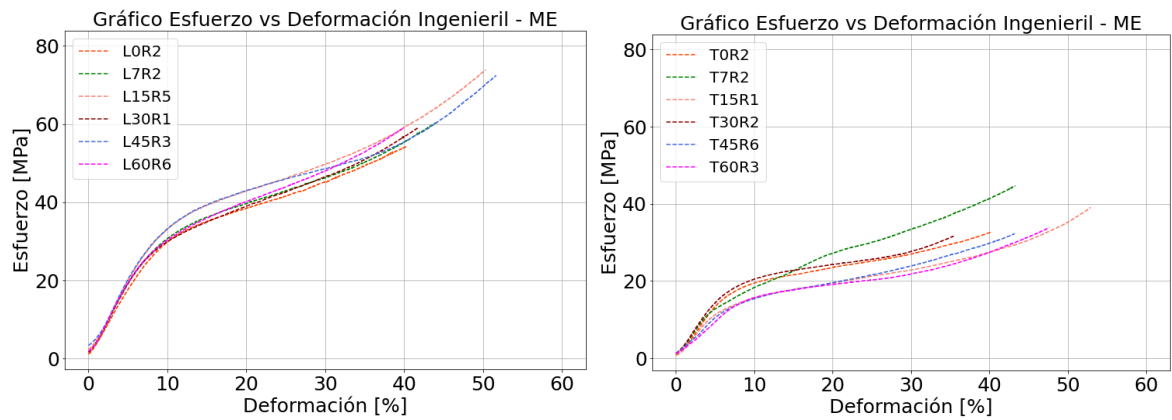


Figura 29. Gráficos de esfuerzo vs deformación ingenieril para los andamios tipo L a la izquierda y los tipo T a la derecha

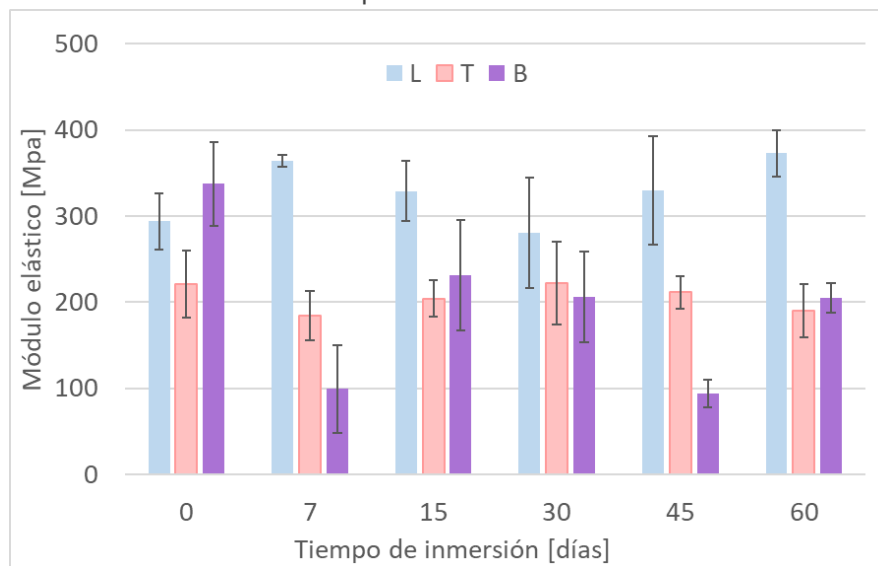


Figura 30. Módulo elástico para los distintos tipos de andamios.

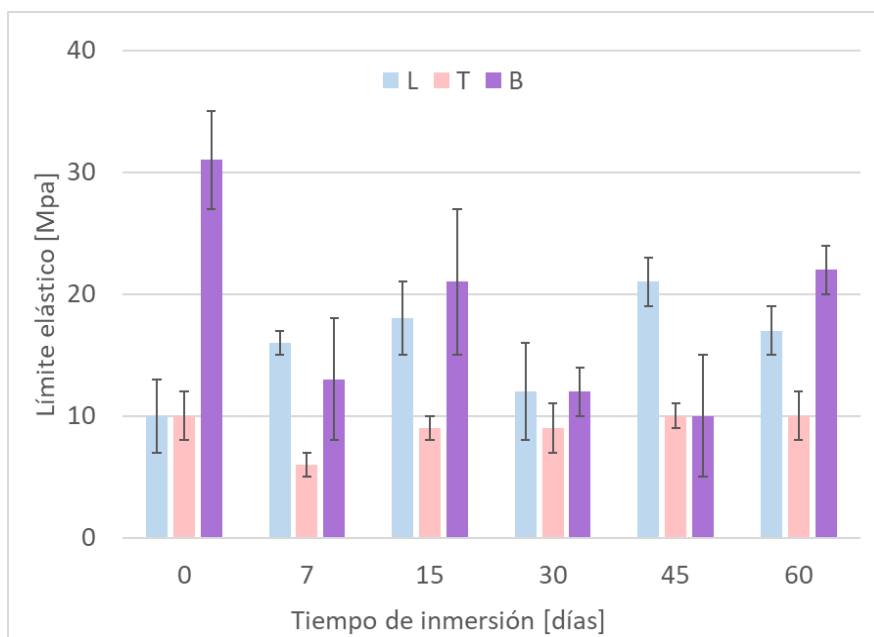


Figura 31. Límite elástico para los distintos tipos de andamios.



Figura 32. Andamio tipo B que estuvo sumergido en medio durante 60 días, luego del ensayo de compresión



Figura 33. Representación de las muestras con 60 días de inmersión luego de ser ensayadas por compresión. A la izquierda, tipo L y a la derecha, tipo T.

Las curvas de esfuerzo vs deformación (*Figura 29*), tanto para los andamios tipo L como para el tipo T no presentan variaciones destacables con el aumento de tiempo de inmersión, aunque sí entre tipos de andamios. Se observa que los andamios del tipo T presentan anisotropía, deformándose en mayor proporción en una dirección, por lo que luego de los ensayos se obtienen cilindros elípticos con una relación de aspecto (RA) promedio de 1,09, mientras que los andamios tipo L presentan un cambio mínimo de RA (ver *Figura 33*). En el caso de los andamios tipo B, considerando las curvas obtenidas para los andamios que no fueron sumergidos y aquellos que estuvieron en el tiempo máximo (60 días), es notable la diferencia de esfuerzos que toleran luego de ambos tiempos de inmersión. En el caso de la muestra no sumergida, presenta una curva como las obtenidas para los andamios tipo L. En la *Figura 32*, se puede observar cómo queda un andamio tipo B con 60 días de inmersión, luego de realizado el ensayo de compresión y comparado a los otros tipos de andamio (*Figura 33*), cómo se fracturan los filamentos que lo componen.

Las curvas obtenidas de los ensayos de compresión en el DMA, al ser superpuestas sobre las curvas de la ME, sólo cubren la primera parte de ellas (ver *Apéndice D1*). Es decir, las curvas del DMA sólo cubren la zona asociada al acomodamiento del polímero, debido a que las cargas de compresión empleadas son muy bajas para las estructuras planteadas, por lo que se desestiman del análisis en este trabajo.

3.4. Bioactividad

Un estimador de la bioactividad de un andamio para regeneración de tejido óseo es la formación de hidroxiapatita sobre su superficie. Se puede observar en la *Figura 34* que dentro de los primeros 15 días de inmersión en SBF se observa la formación de una estructura con forma de “coliflor”, compatible con HA. En la *Figura 35*, se ilustra la formación de HA en los huecos. A partir de la *Figura 36* se puede realizar la medición del espesor de la capa de HA, obteniéndose un valor de $7,5 \pm 0,4 \mu\text{m}$ a los 15 días de inmersión y de $9 \pm 1 \mu\text{m}$ a los 60 días de inmersión. Las últimas capas de los andamios del tipo B no poseen HA (*Figura 37*) mientras que sí se observa en el interior (*Figura 36 y Figura 37*). En la *Figura 38*, se pueden observar fisuras sobre la superficie del andamio.

Como segundo estimador de bioactividad, se mide con EDXS sobre dos puntos: uno sobre una formación de HA aparente y otro sin estructuras. Sobre una formación del tipo “coliflor”, se obtiene una relación en atómico Ca/P de 1,42 y relación en porcentaje másico de 1,85; el segundo punto, donde no se observan formaciones, no presenta picos significativos de Ca/P.

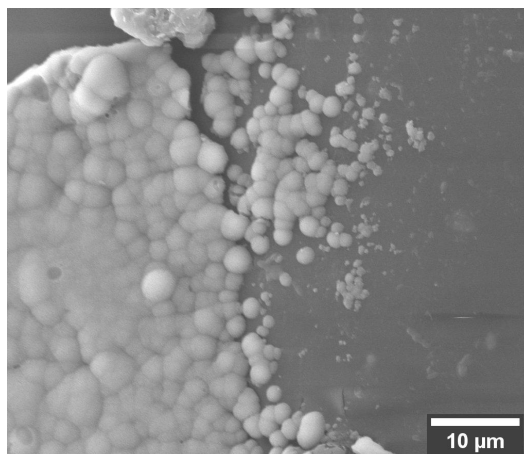


Figura 34. Formación de HA en filamento de andamio con BG a los 15 días de inmersión

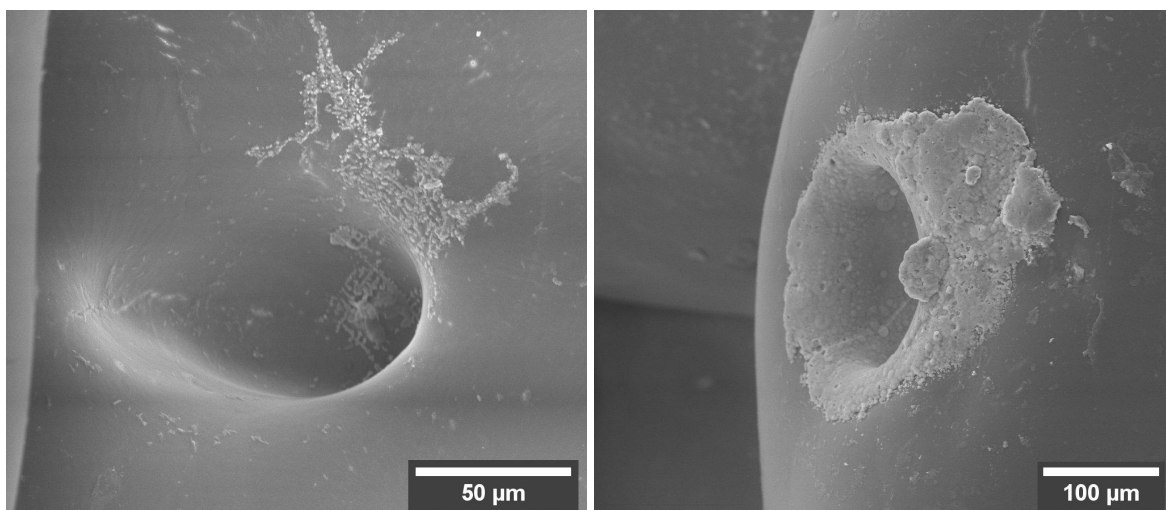


Figura 35. Formación de HA en un hueco en andamios con BG a los 15 días de inmersión.

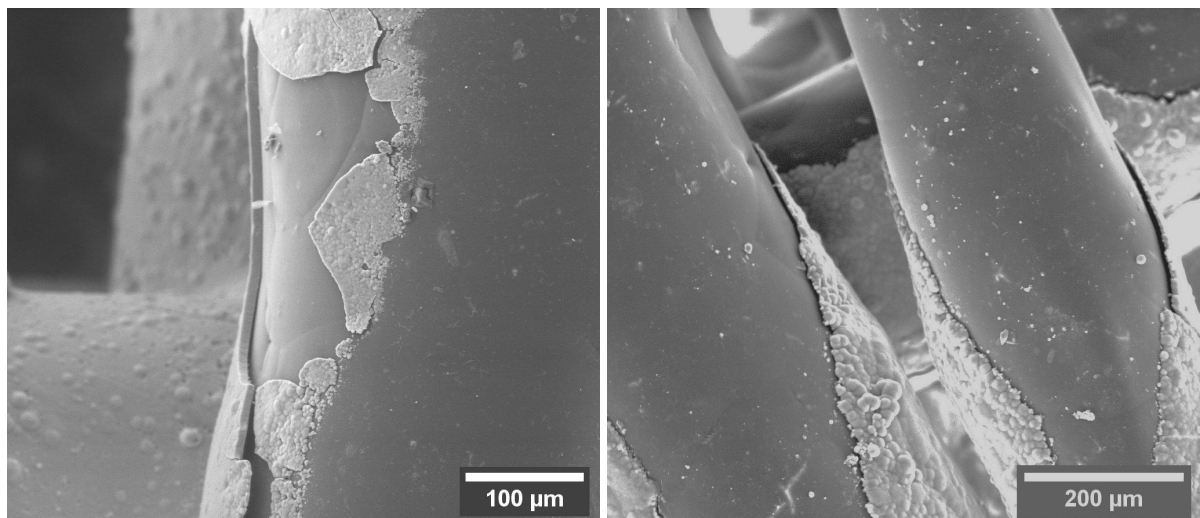


Figura 36. Formación de HA sobre andamios con BG a los 15 días de inmersión (izquierda) y a los 60 días de inmersión (derecha).

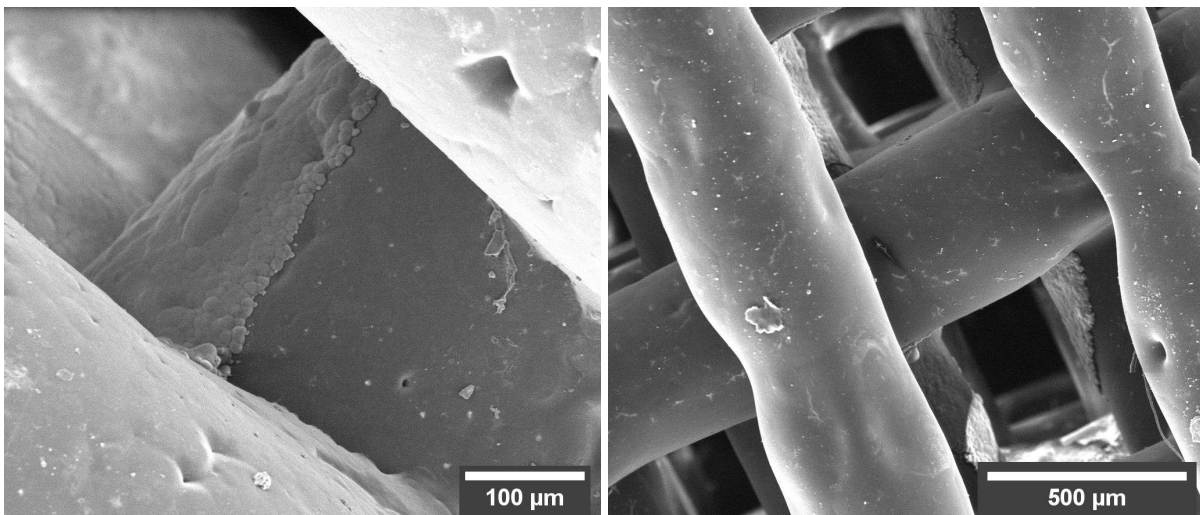


Figura 37. Formación de HA en los filamentos internos de un andamio del tipo B.

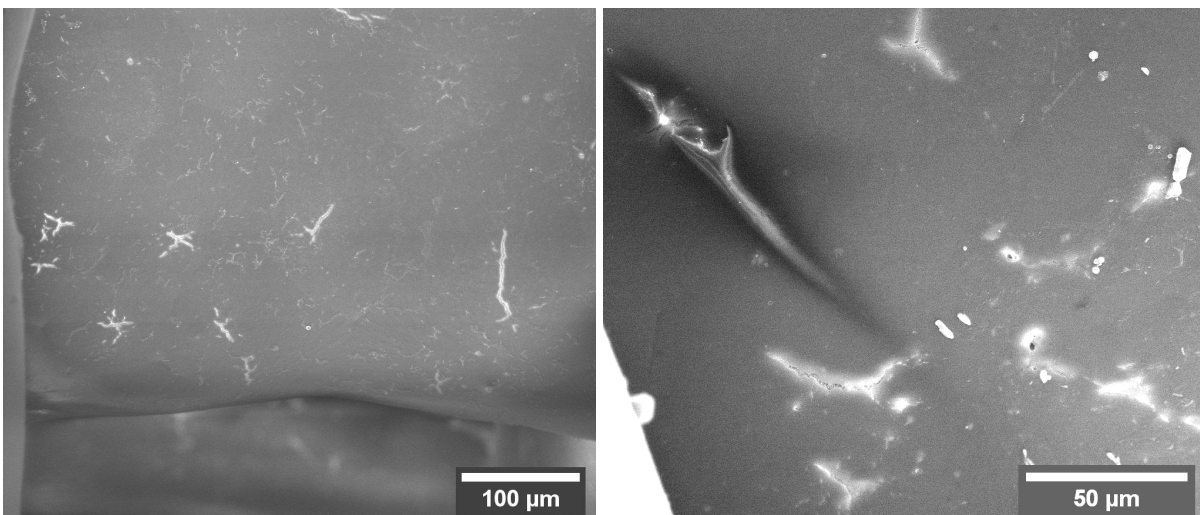


Figura 38. Formación de fisuras sobre andamios del tipo B a los 15 días (izquierda) y a los 60 días (derecha) de inmersión.

3.1.3. SAXS/WAXS

En la *Figura 39*, se presenta el difractograma para el PHBV luego de diferentes procesos que se realizan sobre el material durante este trabajo. Los resultados de WAXS muestran un difractograma típico de un polímero semicristalino, compuesto por un halo amorfo y diferentes picos. Además, puede observarse cómo conforme se realizan los sucesivos tratamientos térmicos se obtienen picos más definidos. Además, en el difractograma de PHBV+BG aparece un pico a $2\theta = 32^\circ$.

En la *Figura 40* se puede observar cómo en el difractograma de WAXS, el agregado de BG no modifica la posición de los picos que se observan en el difractograma anterior. Por otro lado, en el recuadro interno se puede observar el difractograma correspondiente al SAXS, el cual muestra que la adición de BG disminuye la capacidad de crecimiento de los cristales, siendo el espaciado característico (d) para PHBV 9,27 nm y 8,27 nm para PHBV+BG.

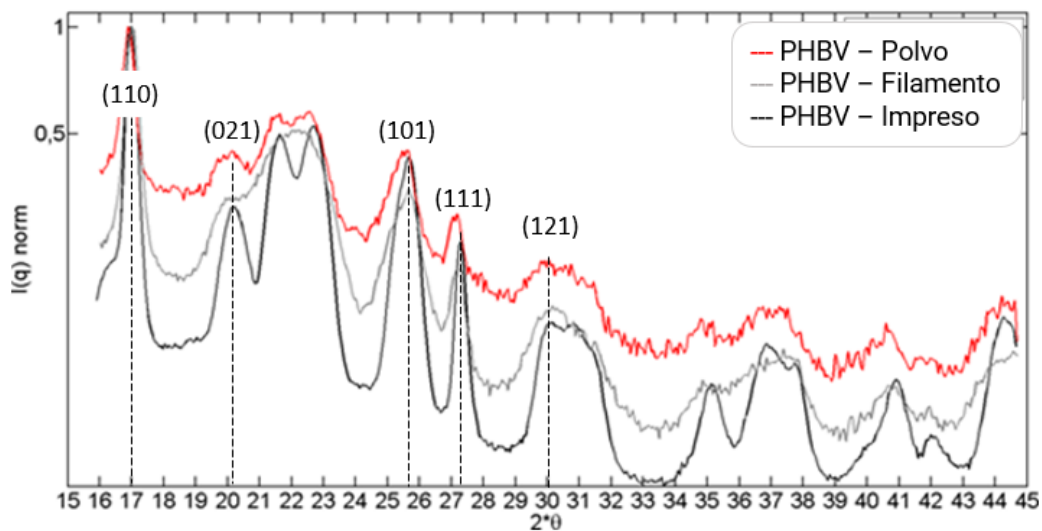


Figura 39. Difractograma donde se observan las diferencias conforme se realizan tratamientos térmicos sobre el PHBV.

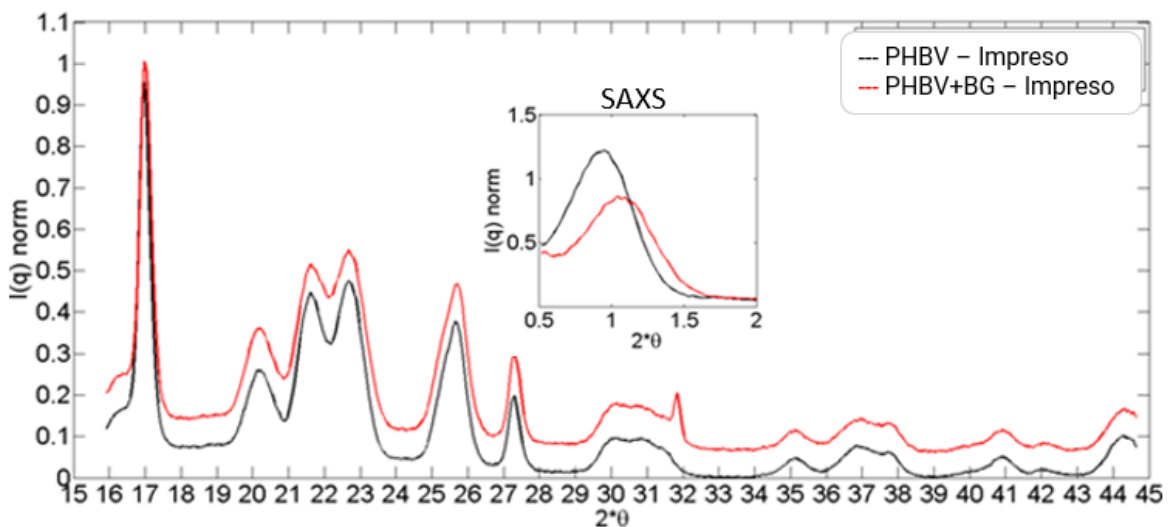


Figura 40. Difractogramas WAXS y SAXS (recuadro) para PHBV y PHBV+BG.

4. Discusión

En este trabajo se estudió el efecto de la degradación en medio biológico simulado (SBF) sobre las propiedades mecánicas de andamios impresos 3D en PHBV y BG para su potencial aplicación en regeneración de tejidos. Los andamios mostraron un decrecimiento de las propiedades mecánicas en función a la composición del material y al tiempo de inmersión, siendo los compuestos por PHBV + BG los más afectados. En la *Figura 41* se puede observar el efecto del tiempo de inmersión en SBF sobre las propiedades mecánicas del andamio compuesto por PHBV+BG.

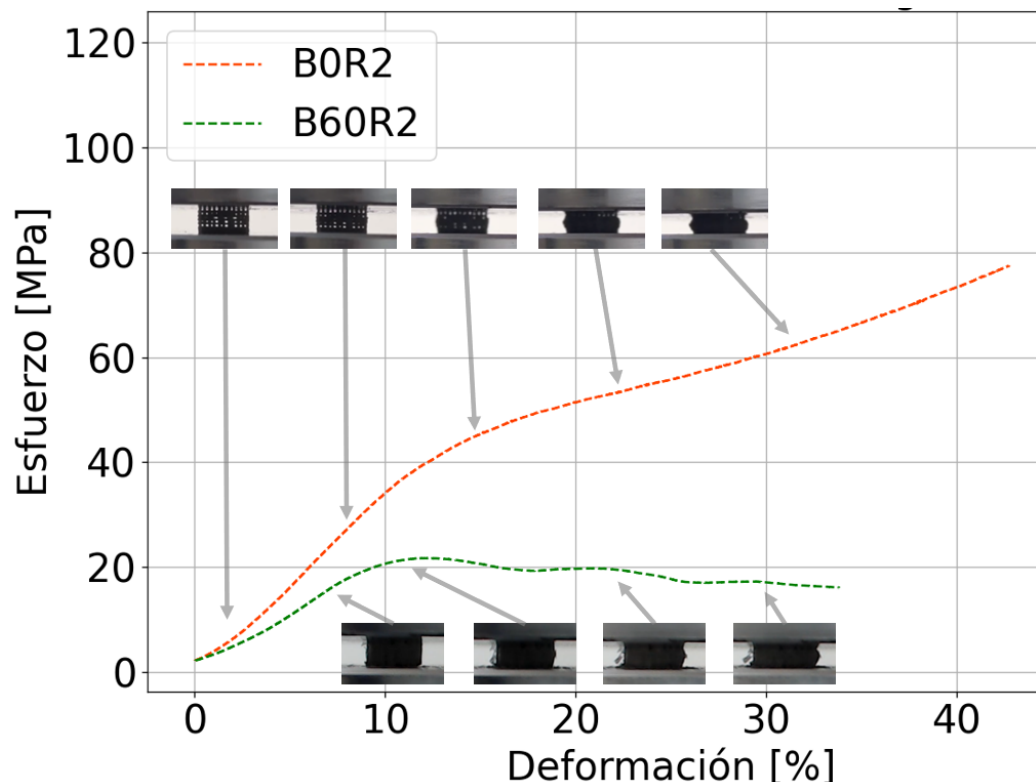


Figura 41. Esfuerzo vs deformación ingenieril para el andamios tipo B comparación entre 0 y 60 días de inmersión

El PHBV es un polímero hidrofóbico que restringe la entrada del líquido al andamio, sin embargo, pequeñas fisuras producidas en la superficie e interior del material durante el enfriamiento y formación de esferulitas y una baja difusión del medio en el material aseguran la reacción entre BG y SBF. Las reacciones que ocurren en el medio de degradación disminuyen la resistencia a la compresión presentando un comportamiento mucho más frágil por parte del andamio. El BG en medio SBF tiene la capacidad de liberar iones que propician la formación de una capa de hidroxiapatita (HA) sobre el andamio lo que le confiere propiedades osteoconductoras. La disminución de las propiedades mecánicas debido a la presencia de BG en el andamio, está asociado probablemente a la formación de HA dentro y fuera del andamio, ya que el pH del medio no se vió afectado por la liberación de iones desde el BG y que podrían favorecer la degradación hidrolítica del polímero. Así, la HA

puede formarse tanto sobre la superficie del material como se ve en las *Figura 34*, *Figura 35*, *Figura 36*, y *Figura 37*, así como en las fallas que se observan en la superficie [42]. La HA formada en las fallas, se expande en el seno del material, generando mayor cantidad de fisuras como se observan en la *Figura 38*, que terminan de fragilizar el material, acelerando la degradación y pérdida de propiedades mecánicas del material en comparación a los andamios sin BG. Esto se puede observar en la curva de un andamio tipo B a los 60 días (*Figura 41*), donde existe un máximo de resistencia a la compresión y otros dos picos más, los cuales representan la fractura de distintos filamentos y una consecuente disminución del área resistente.

La morfología de los andamios luego de permanecer en el medio de degradación durante 60 días (ver *Figura 26*), presenta una erosión superficial, que se manifiesta como zonas blancas (detalle en *Figura 28*). Además, tanto para los andamios de tipo T como los de tipo B a 60 días de inmersión (*Figura 26* y *Figura 28*, respectivamente), se observa la formación de cavidades alrededor de las de esferulitas que se forman en el material, debido a que estas zonas son de alta energía libre lo que permite la degradación del material en estos lugares con mayor facilidad [22].

En las mediciones de peso húmedo, se observa que para los andamios del tipo L la variación de peso húmedo se mantiene por debajo del 5%. En bibliografía se encuentra que el valor de hinchamiento o absorción de soluciones acuosas por parte del PHB es del 0,5%, que siendo contrastado con el 5% obtenido, se atribuye esta variación del 4,5% aprox. a líquido que queda ocluido en los poros de la estructura impresa [26]. Mediante un cálculo estimativo, se obtiene que la cantidad de poros por andamios es aproximadamente 540 poros. Considerando cada poro como un prisma rectangular, de tamaño según los parámetros de ancho y distancia de filamento en la última capa, y la distancia en altura que poseen las capas ($474 \times 322 \times 400 \mu m$), se obtiene que para llegar a un 5% del peso ($\sim 0,01$ g) tendrían que estar ocluidos 165 poros aproximadamente, que equivale al 30% de los poros. Por otro lado, para los andamios del tipo T existe variación de peso húmedo y mayor dispersión ya que la estructura posee caminos más tortuosos respecto a la geometría de los andamios tipo L, lo que podría dejar atrapado más líquido en el seno del andamio. Esto se ve a simple vista, debido a que, luego de apoyar el andamio en papel absorbente, se observa que el seno se encuentra más brillante por la presencia de líquido. Por ello, según cómo se coloque el andamio sobre papel absorbente o incluso la existencia de algún movimiento brusco, se facilita la salida del líquido. Los andamios tipo B, poseen mayor variación de peso húmedo conforme pasa el tiempo de inmersión, debido a que la presencia de BG en el compuesto PHBV + BG, aumenta la hidrofiliidad del andamio [29], [48], [49]. Esto se potencia conforme aumenta el tiempo de inmersión debido a la formación de HA, la cual es hidrofílica y tiende a absorber más líquido [50]. Sin embargo, existe una gran dispersión entre las

mediciones debido a que, durante la manipulación de los andamios ocurre el desprendimiento de HA. Así, suponiendo que se tiene un filamento cilíndrico de 10 mm de largo y 400 μm de diámetro y considerando el espesor de aproximadamente 7,5 μm de HA observado por SEM (ver *Figura 36*), se obtiene que una capa de HA homogénea sobre todo el filamento tiene un peso aproximado de 0,151 g, por lo que cualquier pérdida de HA dificulta obtener un valor representativo dentro de los andamios tipo B. Este método no resulta conveniente para cuantificar la degradación del sistema.

En cuanto a la variación de peso seco, se observa en las muestras de PHBV disminuye el peso conforme pasa el tiempo, debido a la degradación propia del polímero mientras que, en los andamios tipo B, existe un aumento de peso considerable a pesar de la degradación, que se relaciona, a la formación de HA que posee una contribución fuerte en el peso. Como se mencionó antes, la manipulación de los andamios puede desprender HA, por lo que el peso final observado no representa la realidad de la cantidad de HA formada, debiéndose buscar otro método para realizar esta determinación.

Los estimadores de bioactividad muestran la formación de hidroxiapatita sobre la superficie de los andamios. Se puede observar en la *Figura 34* que dentro de los primeros 15 días de inmersión en SBF se forma una capa de HA manifestado por una estructura superficial con forma de “coliflor” típica de la HA [40], [42]. Las últimas capas de los andamios del tipo B no poseen HA (*Figura 37*), lo cual se espera que sea producto de la manipulación y el enjuague con agua destilada de las muestras. Al usar como segundo estimador de bioactividad, el EDXS sobre la formación de coliflor se obtuvo una relación en atómico Ca/P de 1,42 y relación en porcentaje másico de 1,85. Estos valores se asemejan a la relación atómica 1,62 y en masa de 1,9 consignada en la literatura [46]. La diferencia en los valores de dichas relaciones puede estar asociada a presencia de BG remanente en la zona de medición.

En la *Figura 39*, se presenta el difractograma WAXS, el cual es típico de un polímero semicristalino, compuesto por un halo amorfo y los picos característicos de la celda ortorrómbica de los cristales de PHBV [51]. Además, puede observarse cómo conforme se realizan los sucesivos tratamientos térmicos se obtienen picos más definidos, debido a la cristalización del material aunque manteniendo un halo correspondiente a las zonas que se mantienen amorfas. La diferencia que aparece entre el difractograma de PHBV y PHBV+BG (*Figura 40*) es un pico a $2\theta = 32^\circ$, debido a la formación de NaCl durante el tratamiento de silanizado. En la *Figura 40* se puede observar cómo en el difractograma de WAXS, el agregado de BG no genera cambios en la estructura cristalina que se forma, manteniéndose los picos de la celda ortorrómbica. Por otro lado, en el recuadro interno se puede observar el difractograma correspondiente al SAXS, el cual muestra que la adición de BG disminuye la capacidad de crecimiento de los cristales, según el cálculo del espaciado característico.

El pos-procesamiento de las piezas impresas por corte láser para obtener las muestras produce una estructura de poros abiertos en toda la superficie, modificando mínimamente la morfología de los filamentos impresos y poros, que se ovalan por el corte. Además, presenta una excelente reproducibilidad en las dimensiones del andamio, que dadas las dimensiones de las piezas la posición al momento del corte genera cambios que representan únicamente hasta un 5% de la cantidad de cruces observables desde la última capa (*Figura 42*). Es destacable que los cortes que se realizaron para los ensayos previos y finalmente obtener los andamios, fueron simples (rectas y círculos). Por esto, si se deseara realizar cortes más complejos o en otros patrones, dependiendo de su tamaño, podría no ser apropiado el corte láser, ya que habría una limitación en la resolución del corte. Por lo que debería hacerse un análisis más exhaustivo del ancho del corte, las potencias y velocidades de avance utilizadas en el supuesto caso.



Figura 42. Esquema de cruces para dos andamios tipo L. A la izquierda, teniendo 90 cruces. A la derecha, teniendo 95 cruces.

La fidelidad de impresión tanto del PHBV y PHBV + BG es alta, ya que el error porcentual de las dimensiones reales respecto a las del modelo se encuentra dentro del 5%, que según bibliografía es un valor aceptable para otras aplicaciones de alta complejidad [31], [52]. Estas dimensiones presentan una mayor dispersión en los andamios tipo B respecto a los otros tipos debido a que se trata de la impresión de un material compuesto y la impresión se vio afectada por las variaciones de diámetro del filamento extruido aumentando la dispersión en los parámetros informados. Esta justificación también se aplica a la irregularidad de las líneas de impresión de un andamio tipo B observadas en las imágenes de SEM (*Figura 18*). En esta micrografía, se observan huecos a lo largo de la línea de impresión que se pueden asociar a la liberación, durante la extrusión, de vapor de agua u otros gases ocluidos en el filamento. En cuanto a la capacidad de reproducir el patrón de relleno, los andamios tipo L y B tienen una distancia media similar entre filamentos, dado que poseen igual patrón de diseño, mientras que el tipo T presenta mayor distancia por el cambio de patrón. Si bien los patrones fueron diseñados para poseer igual distancia entre filamentos, el cambio de

programa para el “slicing” del modelo 3D entre patrones, puede interpretar los parámetros dados al lenguaje de la impresora de forma diferente. Para las mediciones de los ángulos para los andamios tipo T, se tiene tanto para los ángulos a 30° como a 60° un rango de dispersión de $\pm 10^\circ$ que se debe al poco contraste entre filamentos de las imágenes utilizadas, al momento de tomar las mediciones en el programa imageJ®.

Cabe mencionar que, al principio del trabajo, se realizaron impresiones de base tanto rectangular como circular, por lo que se terminó optando para las muestras la impresión de los impresos de base circular (discos). Esta elección se debe a que, durante la impresión, el material fundido se deposita sobre una cama o base a menores temperaturas, en el caso de la primera capa y luego sobre las sucesivas capas de material, también a menores temperaturas. Entonces, el material depositado comienza a enfriarse mientras se deposita una nueva capa caliente, generando tensiones térmicas residuales. En el caso de las impresiones de base rectangular, la distribución de estas tensiones para los parámetros de impresión elegidos, inducían el pandeo del impreso y por ende, que este se despreque de la base. Una vez despegado de la base, se ven afectadas sus dimensiones y fidelidad de impresión. Por otro lado, la impresión con base circular, permite una distribución más homogénea de las tensiones residuales, permaneciendo estable hasta el final del proceso. Esto permite un uso consciente del material, ya que habría menos descarte y aumento de la productividad, dado que se disminuye el tiempo de impresión. Se puede observar la comparación entre estas dos opciones de impresos en la *Figura 43*.

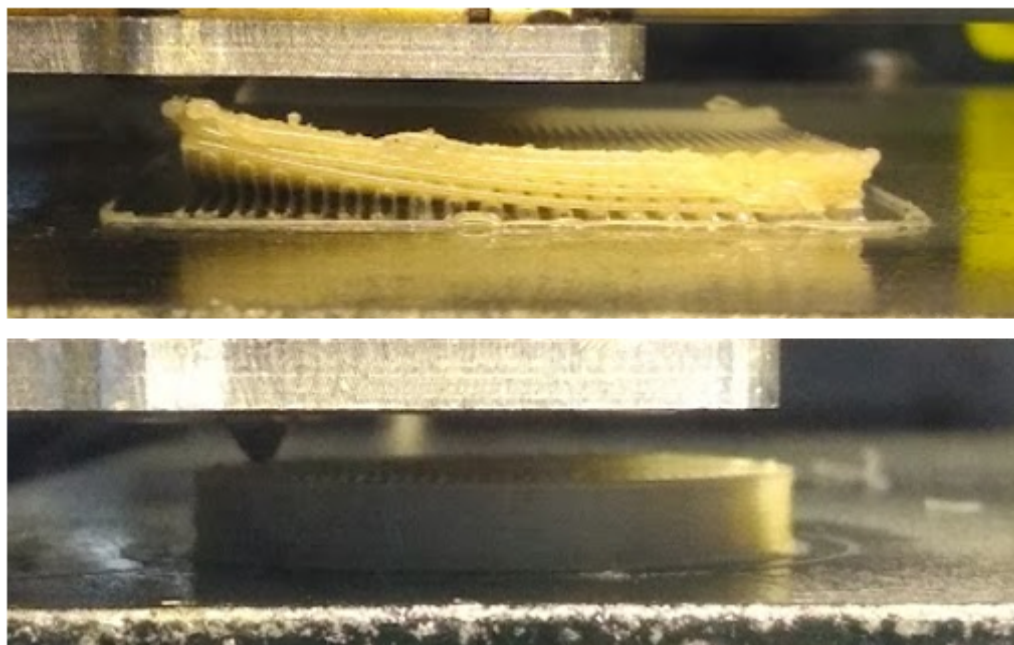


Figura 43. Comparación entre un impreso de PHBV de base rectangular donde se observa pandeo y despegue de la base (arriba) y otro impreso de base circular (abajo) el cual se mantiene correctamente durante todo el proceso.

5. Conclusiones

Se logró evaluar el comportamiento en compresión, sobre andamios de PHBV realizados mediante impresión 3D con dos patrones de impresión diferentes y sobre andamios de PHBV cargado con 4% BG, para diferentes tiempos de incubación en SBF. Se encontró que, existe diferencia en la resistencia a la compresión según su diseño, pero no hay un cambio en la velocidad de degradación con el aumento de tiempo de inmersión en el medio. En los andamios de PHBV + BG, existe una disminución considerable de la resistencia a la compresión conforme transcurre el tiempo de incubación, debido a la formación de HA, lo que genera cambios en las propiedades mecánicas.

En cuanto a trabajos a futuro se propone: i) Evaluar qué otros cambios genera este tipo de degradación en el andamio, incluyendo variación de peso molecular y análisis de FTIR-ATR para evaluar los grupos funcionales presentes antes y luego de la inmersión ii) La evaluación de más patrones de impresión, a fin de encontrar estructuras que posean propiedades mecánicas se adecúen a la zona de servicio. iii) Estudiar cómo se acelera la degradación por la presencia de enzimas en el mismo medio, a tiempos de incubación similares. iv) Utilizar un PHBV que posea mayor cantidad de monómero HV en su composición, de manera de ampliar la ventana de trabajo, ya que en bibliografía se encuentra que el aumento de HV disminuye la temperatura de fusión pero no así la temperatura de degradación, la cual permanece igual [18]. v) En cuanto a la mejora de propiedades mecánicas y procesabilidad, se propone evaluar la adición de diferentes aditivos que sean biocompatibles y aprobados por los distintos organismos de regulación como la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) o la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés).

6. Referencias bibliográficas

- [1] I. Roohani, G. C. Yeo, S. M. Mithieux, and A. S. Weiss, "Emerging concepts in bone repair and the premise of soft materials," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 74, pp. 220–229, Apr. 2022, doi: 10.1016/j.copbio.2021.12.004.
- [2] E. H. Schemitsch, "Size matters: Defining critical in bone defect size!," *J. Orthopaedic Trauma*, vol. 31, no. 10, pp. 20–21, 2017, doi: 10.1097/BOT.0000000000000978.
- [3] P. V. Giannoudis, H. Dinopoulos, and E. Tsiridis, "Bone substitutes: An update," *Injury*, vol. 36, no. 3, pp. S20–S27, Nov. 2005, doi: 10.1016/j.injury.2005.07.029.
- [4] M. L. Oyen, "The Materials Science of Bone: Lessons from Nature for Biomimetic Materials Synthesis," *MRS Bull.*, vol. 33, no. 1, pp. 49–55, Jan. 2008, doi: 10.1557/mrs2008.14.
- [5] K. Alvarez and H. Nakajima, "Metallic Scaffolds for Bone Regeneration," *Materials*, vol. 2, no. 3, pp. 790–832, Jul. 2009, doi: 10.3390/ma2030790.
- [6] M. Long and H. J. Rack, "Titanium alloys in total joint replacement—a materials science perspective," *Biomaterials*, vol. 19, no. 18, pp. 1621–1639, Sep. 1998, doi:

- 10.1016/S0142-9612(97)00146-4.
- [7] S. Bose, S. Vahabzadeh, and A. Bandyopadhyay, "Bone tissue engineering using 3D printing," *Mater. Today*, vol. 16, no. 12, pp. 496–504, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.mattod.2013.11.017.
- [8] K. Rezwan, Q. Z. Chen, J. J. Blaker, and A. R. Boccaccini, "Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 27, no. 18, pp. 3413–3431, Jun. 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.039.
- [9] X. Liu et al., "Blood Compatible Materials: State of the Art," *J. Mater. Chem. B*, p. 52.
- [10] N. A. Peppas and R. S. Langer, Eds., *Biopolymers II*. New York: Springer, 1995.
- [11] E. F. Morgan, G. U. Unnikrisnan, and A. I. Hussein, "Bone Mechanical Properties in Healthy and Diseased States," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 20, no. 1, pp. 119–143, Jun. 2018, doi: 10.1146/annurev-bioeng-062117-121139.
- [12] G. Policastro, A. Panico, and M. Fabbicino, "Improving biological production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) co-polymer: a critical review," *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, vol. 20, no. 2, pp. 479–513, Jun. 2021, doi: 10.1007/s11157-021-09575-z.
- [13] J. Liu et al., "Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Production by *Rhodospirillum rubrum* Using a Two-Step Culture Strategy," *J. Chem.*, vol. 2019, pp. 1–8, Aug. 2019, doi: 10.1155/2019/8369179.
- [14] S. P. Mohandas et al., "Biocompatibility of polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate films generated from *Bacillus cereus* MCCB 281 for medical applications," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 176, pp. 244–252, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.006.
- [15] L. Amaro et al., "Tailored Biodegradable and Electroactive Poly(Hydroxybutyrate-Co-Hydroxyvalerate) Based Morphologies for Tissue Engineering Applications," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 8, p. 2149, Jul. 2018, doi: 10.3390/ijms19082149.
- [16] J. Jacob, N. More, K. Kalia, and G. Kapusetti, "Piezoelectric smart biomaterials for bone and cartilage tissue engineering," *Inflamm. Regen.*, vol. 38, no. 1, p. 2, Dec. 2018, doi: 10.1186/s41232-018-0059-8.
- [17] H. Jiao, S. Song, K. Zhao, X. Zhang, and Y. Tang, "Synthesis and properties of porous piezoelectric BT/PHBV composite scaffold," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 31, no. 12, pp. 1552–1565, Aug. 2020, doi: 10.1080/09205063.2020.1764164.
- [18] Y. Wang et al., "Biosynthesis and Thermal Properties of PHBV Produced from Levulinic Acid by *Ralstonia eutropha*," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 4, p. e60318, Apr. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0060318.
- [19] K. Wang and R. Zhang, "Production of Polyhydroxyalkanoates (PHA) by *Haloferax mediterranei* from Food Waste Derived Nutrients for Biodegradable Plastic Applications," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 31, no. 2, pp. 338–347, Feb. 2021, doi: 10.4014/jmb.2008.08057.
- [20] É. Hermida and V. Casariego, "Morphology of Plastic Deformation and Fracture of a Biodegradable Biopolymer," *Microsc. Anal. Digit. CAMERAS IMAGE Anal. Suppl.*, vol. 23, no. 1, pp. 5–8, Jan. 2009.
- [21] D. R. Askeland, *The science and engineering of materials*, 3rd ed. Boston: PWS Pub, 1994.
- [22] K. Numata, H. Abe, and Y. Doi, "Enzymatic processes for biodegradation of poly(hydroxyalkanoate)s crystals," *Can. J. Chem.*, vol. 86, no. 6, pp. 471–483, Jun. 2008, doi: 10.1139/v08-004.
- [23] W. Li, P. Nooeaid, J. A. Roether, D. W. Schubert, and A. R. Boccaccini, "Preparation and

- characterization of vancomycin releasing PHBV coated 45S5 Bioglass®-based glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 34, no. 2, pp. 505–514, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2013.08.032.
- [24] Ł. Kaniuk, Z. J. Krysiak, S. Metwally, and U. Stachewicz, "Osteoblasts and fibroblasts attachment to poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydrovaleric acid) (PHBV) film and electrospun scaffolds," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 110, p. 110668, May 2020, doi: 10.1016/j.msec.2020.110668.
- [25] G. T. Köse, F. Korkusuz, P. Korkusuz, N. Purali, A. Özkul, and V. Hasirci, "Bone generation on PHBV matrices: an in vitro study," *Biomaterials*, vol. 24, no. 27, pp. 4999–5007, Dec. 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00417-4.
- [26] G.-Q. Chen and Q. Wu, "The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials," *Biomaterials*, vol. 26, no. 33, pp. 6565–6578, Nov. 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.036.
- [27] L. L. Hench, "The story of Bioglass®," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 17, no. 11, pp. 967–978, Nov. 2006, doi: 10.1007/s10856-006-0432-z.
- [28] J. R. Jones, "Review of bioactive glass: From Hench to hybrids," *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 1, pp. 4457–4486, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.actbio.2012.08.023.
- [29] M. Zhou and D. Yu, "Cartilage tissue engineering using PHBV and PHBV/Bioglass scaffolds," *Mol. Med. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 508–514, Jul. 2014, doi: 10.3892/mmr.2014.2145.
- [30] S. Verrier and A. R. Boccaccini, "Bioactive Composite Materials for Bone Tissue Engineering Scaffolds," in *Advances in Tissue Engineering*, PUBLISHED BY IMPERIAL COLLEGE PRESS AND DISTRIBUTED BY WORLD SCIENTIFIC PUBLISHING CO., 2008, pp. 279–311. doi: 10.1142/9781848161832_0014.
- [31] S. J. Hollister et al., "Design and Quality Control for Translating 3D-Printed Scaffolds," in *Essentials of 3D Biofabrication and Translation*, Elsevier, 2015, pp. 43–59. doi: 10.1016/B978-0-12-800972-7.00003-7.
- [32] R. Kankala, X.-M. Xu, C.-G. Liu, A.-Z. Chen, and S.-B. Wang, "3D-Printing of Microfibrous Porous Scaffolds Based on Hybrid Approaches for Bone Tissue Engineering," *Polymers*, vol. 10, no. 7, p. 807, Jul. 2018, doi: 10.3390/polym10070807.
- [33] S. Limmahakhun, A. Oloyede, K. Sitthiseripratip, Y. Xiao, and C. Yan, "3D-printed cellular structures for bone biomimetic implants," *Addit. Manuf.*, vol. 15, pp. 93–101, May 2017, doi: 10.1016/j.addma.2017.03.010.
- [34] X. Ye et al., "Integrating 3D-printed PHBV/Calcium sulfate hemihydrate scaffold and chitosan hydrogel for enhanced osteogenic property," *Carbohydr. Polym.*, vol. 202, pp. 106–114, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2018.08.117.
- [35] B. Zhang et al., "3D printed bone tissue regenerative PLA/HA scaffolds with comprehensive performance optimizations," *Mater. Des.*, vol. 201, p. 109490, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.matdes.2021.109490.
- [36] A. Melocchi et al., "Quality considerations on the pharmaceutical applications of fused deposition modeling 3D printing," *Int. J. Pharm.*, vol. 592, p. 119901, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119901.
- [37] N. A. Sears, D. R. Seshadri, P. S. Dhavalikar, and E. Cosgriff-Hernandez, "A Review of Three-Dimensional Printing in Tissue Engineering," *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 22, no. 4, pp. 298–310, Aug. 2016, doi: 10.1089/ten.teb.2015.0464.
- [38] R. Dimitriou, E. Jones, D. McGonagle, and P. V. Giannoudis, "Bone regeneration: current concepts and future directions," *BMC Med.*, vol. 9, no. 1, p. 66, Dec. 2011, doi: 10.1186/1741-7015-9-66.

- [39] I. Zein, D. W. Hutmacher, K. C. Tan, and S. H. Teoh, "Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications," *Biomaterials*, vol. 23, no. 4, pp. 1169–1185, Feb. 2002, doi: 10.1016/S0142-9612(01)00232-0.
- [40] T. Kokubo and H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?," *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–2915, May 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.017.
- [41] A. Oyane, K. Onuma, A. Ito, H.-M. Kim, T. Kokubo, and T. Nakamura, "Formation and growth of clusters in conventional and new kinds of simulated body fluids," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 64A, no. 2, pp. 339–348, Feb. 2003, doi: 10.1002/jbm.a.10426.
- [42] B. Aráoz and E. Karakaya, "[a][r] - 3D printed poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate).pdf," *J. Mater. Res.*, vol. 36, pp. 4000–4012, 2021, doi: 10.1557/s43578-021-00272-9.
- [43] M. Bertuola *et al.*, "Gelatin–alginate–hyaluronic acid inks for 3D printing: effects of bioglass addition on printability, rheology and scaffold tensile modulus," *J. Mater. Sci.*, vol. 56, no. 27, pp. 15327–15343, Sep. 2021, doi: 10.1007/s10853-021-06250-0.
- [44] B. Seed, "Silanizing Glassware," *Curr. Protoc. Cell Biol.*, vol. 8, no. 1, Oct. 2000, doi: 10.1002/0471143030.cba03es08.
- [45] T. Federico, "Diseño y caracterización de andamios reabsorbibles para emular tejido óseo y estimular mecanismos de osificación."
- [46] M. A. Scapin, S. N. Guilhen, M. E. B. Cotrim, and M. A. F. Pires, "DETERMINATION OF Ca/P MOLAR RATIO IN HYDROXYAPATITE (HA) BY X-RAY FLUORESCENCE TECHNIQUE," *São Paulo*, p. 7, 2015.
- [47] A. Galeski, Z. Bartczak, A. Vozniak, A. Pawlak, and R. Walkenhorst, "Morphology and Plastic Yielding of Ultrahigh Molecular Weight Polyethylene," *Macromolecules*, vol. 53, no. 14, pp. 6063–6077, Jul. 2020, doi: 10.1021/acs.macromol.9b02154.
- [48] H. Li, R. Du, and J. Chang, "Fabrication, Characterization, and in vitro Degradation of Composite Scaffolds Based on PHBV and Bioactive Glass," *J. Biomater. Appl.*, vol. 20, no. 2, pp. 137–155, Oct. 2005, doi: 10.1177/0885328205049472.
- [49] K. Xue, S. Zhang, J. Ge, Q. Wang, L. Qi, and K. Liu, "Integration of Bioglass Into PHBV-Constructed Tissue-Engineered Cartilages to Improve Chondrogenic Properties of Cartilage Progenitor Cells," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 10, p. 868719, May 2022, doi: 10.3389/fbioe.2022.868719.
- [50] T. G. Tihan, M. D. Ionita, R. G. Popescu, and D. Iordachescu, "Effect of hydrophilic–hydrophobic balance on biocompatibility of poly(methyl methacrylate) (PMMA)–hydroxyapatite (HA) composites," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 118, no. 2–3, pp. 265–269, Dec. 2009, doi: 10.1016/j.matchemphys.2009.03.019.
- [51] I. Zembouai, M. Kaci, S. Bruzard, A. Benhamida, Y.-M. Corre, and Y. Grohens, "A study of morphological, thermal, rheological and barrier properties of Poly(3-hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate)/polylactide blends prepared by melt mixing," *Polym. Test.*, vol. 32, no. 5, pp. 842–851, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.polymertesting.2013.04.004.
- [52] "Technical Considerations for Additive Manufactured Medical Devices - Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff," p. 31.
- [53] "Dynamic Mechanical Analysis: Basic Theory & Applications Training." TA instruments.

Apéndice A - Protocolos y procedimientos

A1. Elección de tamaño de probeta

La selección del tamaño de muestra, se basa en diferentes criterios: primero en las recomendaciones para ensayar las muestras por compresión en un analizador mecánico dinámico (DMA, siglas en inglés: Dynamic Mechanical Analysis), la norma ASTM 695-15 y en base a la experiencia con el material.

De acuerdo al manual de uso y recomendaciones del DMA de TA Instruments, que establece un criterio a partir de un factor de geometría, el cual debe permanecer dentro de un rango presentado en el mismo documento como se ilustra en la *Figura 44*, que depende del espesor t y del radio r de la muestra a medir, como se observa en la *Ecuación 8* [53].

$$\text{Factor de geometría} = \frac{t}{\pi r^2} \quad (\text{ec. 8})$$

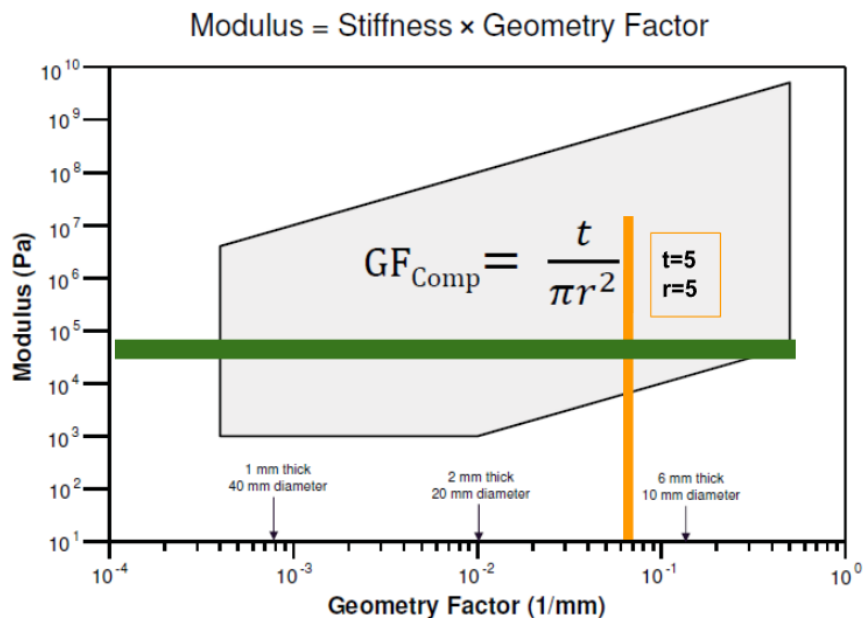


Figura 44. Gráfico tomado de [53] para la elección del tamaño de las piezas a ensayar por compresión. En verde (línea horizontal) los valores típicos de rigidez del PHBV y en amarillo (línea vertical) el factor de geometría aproximado para $t=5$ y $r=5$.

Estas dimensiones se toman como una adaptación a la norma ASTM 695-15, donde se estandariza el ensayo de compresión para plásticos dado que en bibliografía no se encontraron normas empleadas para impresiones 3D y la norma mencionada sólo considera piezas sólidas de baja porosidad. En la misma se establece que para realizar ensayos para medir módulo elástico y resistencia a la compresión, se debe cumplir una relación de delgadez, entre la altura y el diámetro de la muestra a ensayar la cual debe permanecer entre 11 y 16:1. Sumado a esto, si se considera el factor de geometría antes mencionado y los valores de este factor para poder realizar los ensayos en el DMA, es necesaria la adaptación de la norma al sistema de este trabajo. Otras consideraciones al momento de elegir este

tamaño, es que el obtener una impresión con una relación alto/diámetro mayor, como indica la norma, puede tener menor fidelidad de impresión por el tipo de impresora 3D y filamentos utilizados, los cuales no son los óptimos para obtener probetas reproducibles. Además, si se considera el tiempo de impresión, realizar muestras más grandes implican más tiempo donde aumenta la posibilidad de fallas ya que el filamento de PHBV + BG, es mucho más frágil que el de PHBV, por lo que de haber elegido una pieza mucho más grande y se quiebre el filamento durante la impresión, se perdería mucho material innecesariamente.

A2. Silanización de Biovidrio

Se describe el procedimiento para la realización del proceso de silanizado de BG.

Procedimiento:

1. Asumiendo que las partículas de BG fueran esferas de 5 μm de diámetro, se debe utilizar un volumen de solución que supere en 10 veces la superficie total de las partículas de BG. Considerando esto, se sumerge 0,1g de BG en 1,5 mL de una solución de clorotrimetilsilano (CTMS, Sigma-Aldrich) mezclado al 10 % m/m con tolueno. Dado que este solvente puede causar irritaciones en la piel, ojos y vías respiratorias, es necesario contar con los elementos de protección personal (EPP) (gafas, guantes)
2. Se deja evaporar el solvente en exceso bajo campana a temperatura ambiente. Como parte de la reacción se forma ácido clorhídrico que también se evapora.
3. Por último, se coloca el BG tratado en desecador, a temperatura ambiente, durante 24 horas.

A3. Extrusión de filamentos

A continuación se detalla el procedimiento tanto para la extrusión de PHBV como de PHBV 4%BG.

Procedimiento extrusión de PHBV:

1. Se establecen las temperaturas de la mini extrusora como se observa en la *Tabla 7* y la velocidad de los tornillos a 20 rpm.
2. Se enciende el sistema de extracción de volátiles y se acomoda la campana de extracción de volátiles, como se observan en la *Figura 5*. Es necesario a partir de este paso, la utilización de una máscara para evitar la inhalación de partículas.
3. Se pesa la cantidad de materia prima a procesar, considerando que se necesitan 30 g para llenar la mini extrusora y empezar a obtener un filamento de buenas condiciones, y por cada metro que se quiera preparar se debe adicionar, a estos 30 g, el peso requerido.
4. Una vez alcanzadas las temperaturas, comienza la carga del material a través de la tolva del equipo. La carga debe hacerse de manera continua y a igual velocidad durante todo

el proceso. Además, como el material a introducir se encuentra en formato polvo, es necesario realizar pequeños golpeteos sobre el polvo con una varilla plástica acorde al tamaño de la tolva, a medida que este se cargue en la misma, de manera que acompañen al material al entrar, de manera que éste se introduzca correctamente y de forma continua

5. Luego de introducir 30 g de material, se logra el llenado de la cavidad de los tornillos lo que permite que se empiece a extruir el material en formato filamento.
6. El filamento que sale de la extrusora, se debe tomar manualmente realizando un estiramiento, para lograr un espesor dentro de un rango de 1,5 a 1,8 mm. El estiramiento se regula según el espesor que se obtenga en el momento, el cual debe ser medido conforme se enfría.
7. Luego que se encuentra totalmente frío el filamento, delicadamente -ya que podría quebrarse- se enrolla para su posterior guardado. Esta etapa evita que, al enrollar el filamento, éste se pegue entre sí debido a las temperaturas con las que sale de la extrusora.
8. Cuando se llega a la carga de materia prima que se deseaba, se deja de cargar material a la tolva y se establece la velocidad de los tornillos a 5 rpm. De esta manera, se vacía el equipo.
9. Cabe observar que en los pasos (2) y (6), el material que salga de la extrusora debe ser retirado inmediatamente, caso contrario podría adherirse al pico y por su alta temperatura luego sería difícil su limpieza.

Tabla 7. Temperaturas de la mini extrusora para PHBV.

Sección	Pico	Zona 8	Zona 7	Zona 6	Zona 5	Zona 4	Zona 3	Zona 2
Temperaturas [°C]	170	175	180	180	180	190	190	190

En el caso de los filamentos de PHBV con BG, y previo a la extrusión, se debe realizar la mezcla de ambos polvos de manera tal de obtener PHBV con 4% en peso de BG. Para ello, se utiliza un molinillo o mezcladora a cuchillas como la que se observa en la *Figura 46*, de manera tal de obtener una mezcla homogénea. A fin de obtener 50 g de la mezcla de PHBV 4% BG, se toman 48 g de PHBV y 2 g de BG, y se sigue el procedimiento detallado luego.

Materiales para preparar 50 g de mezcla PHBV 4% BG:

- ❖ 48g PHBV
- ❖ 2g BG
- ❖ Cuchara de acero inoxidable
- ❖ Molinillo marca IKA modelo A11 basic

Procedimiento:

1. Se pesa 48g de PHBV y 2g de BG silanizado.
2. Se hace una mezcla simple con cuchara de acero inoxidable como se observa en la *Figura 45*.
3. Se coloca parte de la mezcla en el molinillo. Se debe observar que, manteniendo una cantidad moderada de polvo en el equipo, se evita que el mismo pueda ocasionar daños en el equipo.
4. Se acciona el molinillo tres veces.
5. Se retira la mezcla.



Figura 45. Imagen que muestra la mezcla simple del PHBV - 4% BG.



Figura 46. A la derecha, molinillo marca IKA modelo A11 basic.
A la izquierda, el tipo de cuchilla utilizada.

Materiales para la extrusión de PHBV 4%BG:

- ❖ Mini extrusora Thermo Fisher Scientific Process 11.
- ❖ PHBV en polvo y mezcla de PHBV con 4% en peso de BG
- ❖ Elementos de seguridad personal:
 - Guantes de látex
 - Anteojo de seguridad
 - Barbijo

Procedimiento extrusión de PHBV 4%BG:

1. Se realizan los pasos (2) a (7) requeridos para la fabricación de filamentos de PHBV, cargando PHBV solo.
2. Luego de haber cargado con PHBV la extrusora y que es posible obtener filamentos de este material, se comienza con la carga de la mezcla de PHBV 4%BG.
3. Se descartan los primeros metros de filamento obtenido, dado que es PHBV solo y se repiten los pasos (2) a (7) de la extrusión de PHBV pero cargando la tolva con la mezcla de polvos de PHBV 4%BG

A4. Parámetros de corte láser.

Sobre 3 muestras distintas (*Tabla 8*) se realizan diferentes pruebas de cortes (*Tabla 9*) con cortadora láser de 100W perteneciente al Laboratorio de Prototipado de la ECYT - UNSAM.

En la *Figura 47*, se observan los cortes realizados sobre la muestra 1, donde se puede observar que la separación de 2 mm es insuficiente, por lo que 4 mm parecería lo óptimo. El corte 3 es el más limpio y parejo, pero funde el material en exceso, por lo que se cierran los poros laterales. La potencia de 20% es excesiva para el corte que se precisa. Además, el pandeo interfiere en el corte. En la *Figura 48*, se observan los cortes realizados sobre la muestra 2, donde se puede observar que el primer corte es nítido y no funde por demás la pieza, mientras que el corte 2 tampoco funde excesivamente, pero éste no atraviesa completamente. En la *Figura 49*, se muestran cortes circulares con la elección del corte n°1 sobre la muestra 3.

Tabla 8. Detalle de las muestras para corte láser.

Muestra	Geometría	Dimensiones [mm]	Densidad [%]	Observaciones
1	Rectangular	15 x 30 x 5	55	- Posee pandeo. - Se realizan cortes paralelos a una distancia entre sí de 2 mm
2	Rectangular	20 x 30 x 3	50	- Posee pandeo. - Se realizan cortes paralelos a una distancia entre sí de 4 mm
3	Circular	33 x 5	55	- Superficie plana - Se realizan cortes circulares

Tabla 9. Detalle de los cortes realizados sobre cada una de las muestras. La potencia y velocidad elegidas son las correspondientes al corte n°1 de la muestra 3.

Muestra	N° de Corte	Potencia [%]	Velocidad de avance [mm/s]
1	1	20	1
	2	20	5
	3	20	10
	4	20	15
	5	20	20
2	1	16	10
	2	16	15
3	1	16	6
	2	16	8
	3	16	10
	4	16,5	6
	5	17	7,5
	6	17,5	5
	7	20	8
	8	20	10
	9	20	11

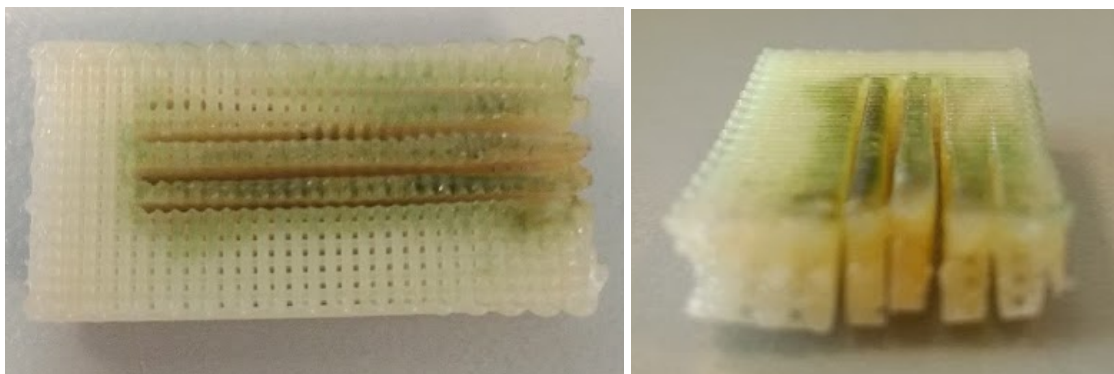


Figura 47. Cortes realizados sobre la muestra 1, a la izquierda se observa el frente de la muestra y a la derecha un lado. La coloración verduzca se debe a que la pieza al ser cortada se encontraba apoyada sobre un acrílico de colocación azul, que al realizar el corte y elevar las temperaturas ocurre difusión del color sobre la muestra.

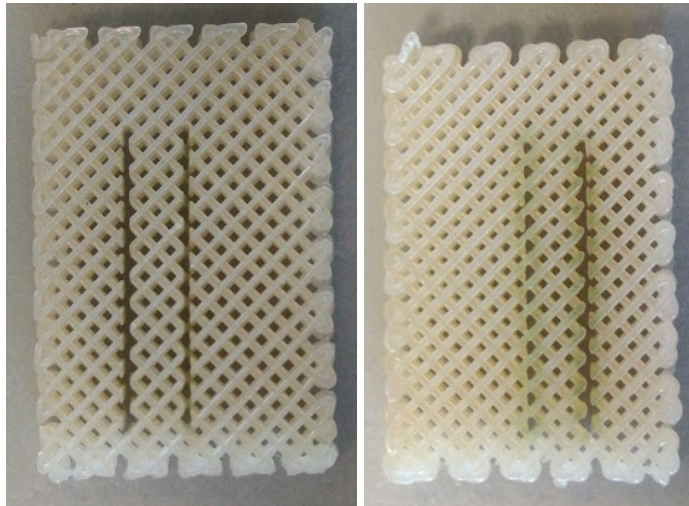


Figura 48. Cortes realizados sobre la muestra 2, a la izquierda se observa el frente de la muestra y a la derecha el dorso. El corte 1 corresponde al corte que se encuentra a la izquierda en la imagen de la izquierda. Se puede observar cómo el dorso del corte 2 (izquierda en imagen de la derecha), no fue cortado completamente, dejando únicamente una capa del impreso.

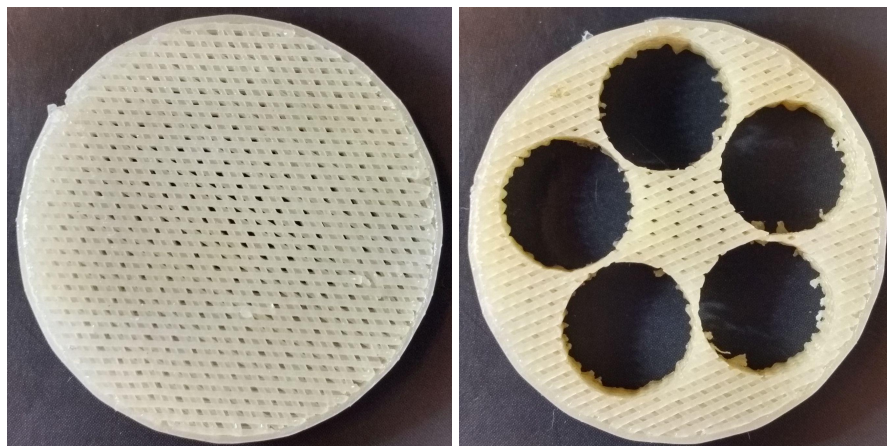


Figura 49. Cortes del tipo 1 de la muestra 3 sobre disco de 33 mm de diámetro.

A5. Protocolo de cambio de SBF

A continuación se detallan los pasos empleados durante el cambio de SBF.

Protocolo cambio SBF:

- ❖ Se retiran del baño termostático hasta 6 (seis) tubos falcon. Se saca del medio la muestra y se coloca encima de un papel absorbente, de manera que el líquido en su superficie sea absorbido.
- ❖ Se mide el pH del medio
- ❖ Se descarta el líquido
- ❖ Se llena nuevamente el tubo con 40 mL con SBF a temperatura ambiente.
- ❖ Se introduce la muestra en el medio, se asegura de cerrar la tapa del tubo correctamente. Se debe tener en cuenta la posición final, como se observa en la *Figura 12*
- ❖ Se coloca el tubo en el baño termostático hasta el próximo cambio.

A6. Protocolo de medición de peso.

Al llegar al tiempo de inmersión máximo de la muestra, se procede a realizar la medición de peso tanto húmedo como seco.

Materiales y equipos necesarios:

- ❖ Balanza Analítica Acculab - Modelo: ALC-210.4 - Max: 210 g - Error: 0,0001 g
- ❖ Cuchara de acero inoxidable
- ❖ Papel absorbente
- ❖ pHmetro Arcano - Modelo: PHS-3E - Rango temperatura: 0-99.9°C - Error: 0,05 pH

Protocolo variación de peso:

1. Se retira el tubo falcon correspondiente del baño termostático.
2. Se retira la muestra con una cuchara de acero inoxidable, procurando no generar ningún defecto extra a la pieza por presión o fricción.
3. Se mide y registra el pH del líquido.
4. La muestra se coloca sobre un papel absorbente, dejando que por capilaridad se escurra el líquido.
5. Se coloca la muestra de lado, de manera que escurra el líquido que quede por acción capilar.
6. Se realiza el pesaje "húmedo" de la muestra.
7. Luego, se coloca la muestra en el desecador y se genera vacío.
8. Pasados dos días en desecador, se toma registro del peso "seco".

Apéndice B - Códigos de impresión

En este apéndice se detallan los códigos de impresión de los distintos modelos utilizados en este trabajo. Los mismos pueden utilizarse para reproducirse en otras impresoras que posean características similares a la CODEX 2020 (Área de trabajo de 200 x 200 mm, temperatura de pico de 196 °C y cama de 105 °C). Por otro lado, existen plataformas web gratuitas, que permiten visualizar los archivos .gcode fácilmente, como por ejemplo: GCode Viewer (<https://gcode-viewer.com/>, Julio 2022).

B1. Disco 33 mm - Patrón "L" - PHBV

Se anexa en información suplementaria digital "TS_GCH_ApéndiceB1-Disco33L.gcode"

B2. Disco 33 mm - Patrón "T" - PHBV

Se anexa en información suplementaria digital "TS_GCH_ApéndiceB2-Disco33T.gcode"

B3. Disco 15 mm - Patrón "L" - PHBV + BG

Se anexa en información suplementaria digital "TS_GCH_ApéndiceB3-Disco15L.gcode"

B4. Disco 15 mm - Patrón "T" - PHBV

Se anexa en información suplementaria digital "TS_GCH_ApéndiceB3-Disco15T.gcode"

Apéndice C - Secuencias de comandos

Se anexa en información suplementaria digital "TS_GCH_ApéndiceC-Comandos.pdf", donde se encuentran:

- ❖ C1. Depurador datos DMA
- ❖ C2. Depurador datos ME
- ❖ C3. Gráficos DMA
- ❖ C4. Gráficos ME

Apéndice D - Imágenes

D1. Comparación DMA y ME

A continuación se muestra la *Figura 50* la cual muestra la representación de las curvas obtenidas por DMA y ME superpuestas. En ella se puede observar cómo el ensayo de DMA solo cubre la primera parte de la curva, lo que se relaciona con el acomodamiento del polímero.

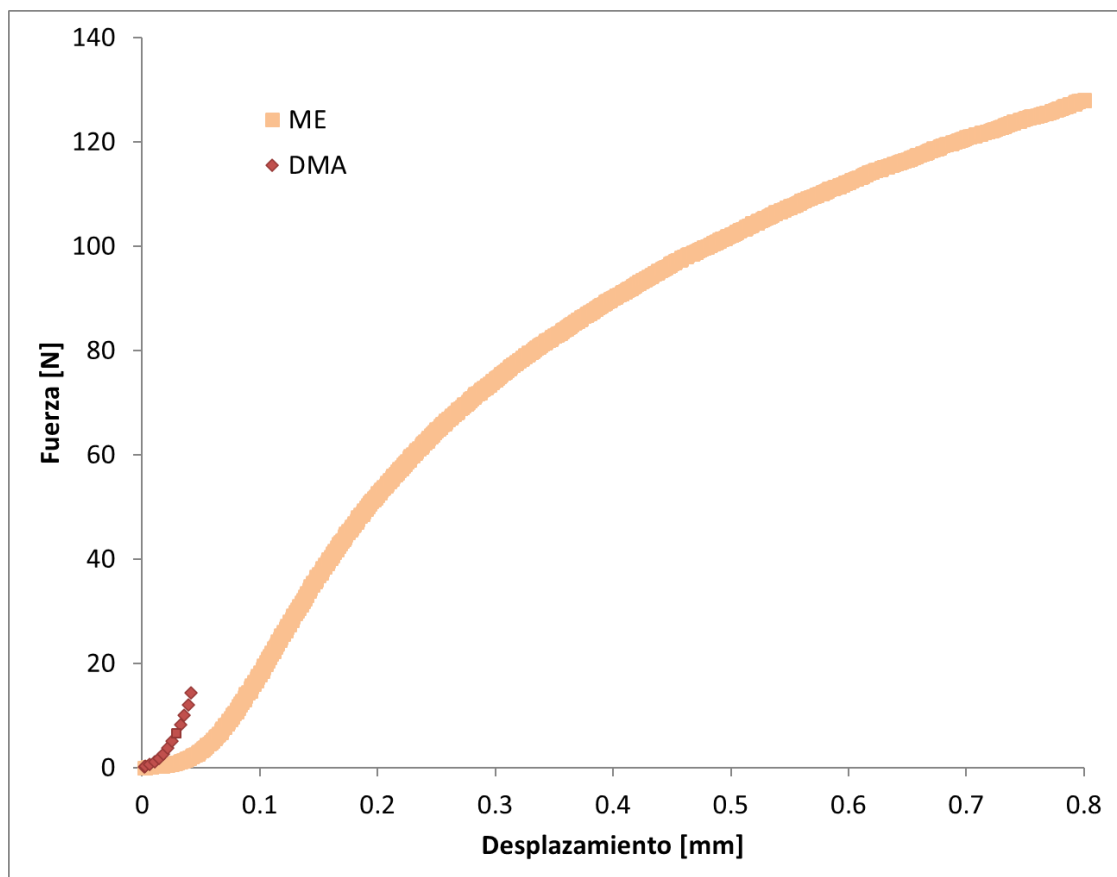


Figura 50. Curvas de fuerza vs desplazamiento que representa las curvas obtenidas para DMA y ME.