UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Obtención de un scaffold cerámico de fosfato de calcio a partir de estereolitografía cerámica con potencial aplicación en regeneración de tejido óseo.

Carolina Duque Uribe

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela de Física.
Medellín, Colombia
2024

Obtención de un scaffold cerámico de fosfato de calcio a partir de estereolitografía cerámica con potencial aplicación en regeneración de tejido óseo.

Carolina Duque Uribe

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ingeniería Física

Director (a):

PhD Claudia Patricia García García

Línea de Investigación:

Biomateriales

Grupo de Investigación:

Materiales Cerámicos y Vítreos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Escuela de Física

Medellín, Colombia

2024

A los curiosos

Tú, no te detengas ante ningún reto. Y no pases a formar parte de ningún gremio. Que nunca te puedan definir ni encasillar.

Andrés Caicedo.

Agradecimientos

Quiero agradecer inicialmente a mi directora de tesis, la profesora Claudia Patricia García, por su invaluable acompañamiento personal y académico, porque ha sido un modelo por seguir y creyó en mi aun cuando yo no lo hacía. Igualmente quiero agradecer al grupo de Cerámicos y Vítreos de la universidad Nacional de Colombia, por el apoyo que de alguna forma u otra brindaron para el desarrollo de esta tesis.

Agradezco al profesor Alejandro Peláez de la Universidad Cooperativa de Colombia y su grupo de Investigación de Odontología Multidisciplinar, al profesor Alex Ossa de la Universidad Eafit, a la Profesora Claudia Ossa de la Universidad de Antioquia y su grupo de Biomateriales y al profesor Néstor Rojas y los miembros del CIMEX, por poner a disposición sus conocimientos e infraestructuras y brindarme herramientas de trabajo necesarias para poder llevar a feliz término este trabajo. A la Doctora Ana Isabel Moreno por brindarme su apoyo y conocimiento, acompañarme, ser profesora y guía en el desarrollo de los ensayos biológicos y siempre estar atenta a solucionar cualquier duda con paciencia.

Agradezco a la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, la cual cumplió un papel fundamental en mi proceso de formación personal y profesional, además hizo posible la financiación parcial del proyecto “DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE SCAFFOLDS CERÁMICOS A TRAVÉS DE ESTEREOLITOGRAFÍA CON POTENCIAL APLICACIÓN EN INGENIERÍA DE TEJIDOS” con código HERMES 57524 en el marco de la convocatoria nacional para el fortalecimiento de la formación a través del apoyo a proyectos de investigación, creación artística e innovación 2022-2024, modalidad Única: Proyectos de investigación, creación artística e innovación de la Universidad Nacional de Colombia 2022-2024.

También quiero agradecer a Carolina Cárdenas, Sebastián Restrepo y a todo el personal del laboratorio de Minerales y Materiales avanzados de Sumicol, Corona, por su acompañamiento, apoyo, y motivación constante y abrirme las puertas de su laboratorio para llevar a cabo gran parte experimental de esta tesis.

Agradezco a mis amigos, especialmente a Carlos Gómez por ser gran compañía iniciando en esta vida de investigación, a Laura Osorio y Andrea Hernández por su motivación contante en este proceso, a mi amiga y compañera de maestría Melisa Buendía por compartir junto a mi experiencias inolvidables dando clase, en las asignaturas y congresos, y a mi gran amigo Pablo Bedoya por su compañía incondicional durante toda mi maestría aun en la distancia, y por su apoyo en el desarrollo de gráficas para este trabajo. También me siento muy agradecida con mi pareja, Sebastián Graciano porque siempre creyó en mí, me motivó a continuar cuando quería tirar la toalla y escuchó todas mis preocupaciones sin dudar que podría lograrlo.

Finalmente, y no menos importante agradezco a mis padres y familia. A mis tías Ana Cristina y Marisol, y a mis primas Ana Isabel, Sara y Susana, por haberme apoyado desde el principio en esto, creer en mí, darme alientos durante todo el proceso y ofrecerme su compañía de tantas formas que fueron posibles. A mi padre, Alberto Duque por inculcarme la pasión por la ciencia y las ganas de aprenderlo todo, por sus dudas que me hacían fortalecer mis ideas y por siempre estar presente observando y maravillándose por lo que hacía. A mi madre, Luz Stella Uribe, por madrugar conmigo cada que lo necesité, por querer saber siempre si estaban funcionando las cosas y por siempre mostrarse orgullosa de mis logros. Siempre sentí que estaban conmigo y eso hizo posible que no desfalleciera nunca.

Gracias a Dios y a la vida por esta gran oportunidad.

Resumen

Los scaffolds basados en las superficies minimales triplemente periódicas (TPMS) cumplen las condiciones necesarias para ser utilizados en ingeniería tisular. En esta tesis se desarrollaron scaffolds de alúmina (Al) y fosfatos de calcio (CaP) a través de la técnica de estereolitografía cerámica, utilizando geometrías TPMS Giroide y Schwartz P. para ser aplicados en la regeneración de tejidos óseos. Se realizaron suspensiones con cargas cerámicas de 35, 40 y 50 vol% con los dos materiales, las cuales se caracterizaron reológicamente y para ambos casos se encontró que las más viscosas eran las de 50 vol% con valores de 1.1 Pa·s para CaP y de 0.78 Pa·s para Al. A las muestras impresas de ambos materiales se les hizo un tratamiento térmico para eliminar la resina y sinterizar los cuerpos cerámicos. A los andamios híbridos y cerámicos se les tomaron imágenes digitales, SEM y FESEM. Las contracciones volumétricas más altas fueron las de las muestras con menor porcentaje de carga (35 vol%) de geometría giroide, con valores de 58.4% para las de Al y de 79.4% para los de CaP. Las muestras que más cantidad de grietas presentaron fueron las de Al con geometría Schwartz P. Los scaffolds que presentaron mayor resistencia a la compresión fueron los híbridos para ambos materiales. La geometría giroide de Al sinterizada presentó resistencias más altas que la Schwartz P, siendo la de 50Al la mejor con un valor de 0.4 ± 0.2 MPa. En el caso de CaP sinterizados la mayor resistencia mecánica fue para 50CaP con un valor de 0.83 ± 0.06 MPa. Dichos valores son comparables con los del hueso esponjoso y cortical. Finalmente, los scaffolds de 50 vol% de Al y CaP se impregnaron con extractos de propóleos de Tame, Arauca, Colombia. Para los de Al se evaluó la actividad antimicrobiana, demostrando que existe una mejor respuesta frente a *S. aureus* que a *E. Coli*. Para los de CaP, se evaluó la citotoxicidad y proliferación celular, demostrando que el material con y sin propóleo no presenta efectos tóxicos sobre las células y que existe una mejor respuesta de crecimiento celular en aquellos que están impregnados.

Palabras clave: Estereolitografía, regeneración ósea, fosfatos de calcio, alúmina, scaffolds.

Abstract

Production of ceramic calcium phosphate scaffold via ceramic stereolithography with potential application in bone tissue regeneration

Scaffolds based on triple periodic minimal surfaces (TPMS) satisfy the necessary conditions to be used in tissue engineering. In this thesis, alumina (Al) and calcium phosphate (CaP) scaffolds were developed through the ceramic stereolithography technique, using TPMS gyroid and Schwartz P geometries to be applied in bone tissue regeneration. Suspensions with ceramic fillers of 35, 40 and 50 vol% were made with the two materials, which were characterized rheologically and for both cases it was found that the most viscous were those of 50 vol% with values of 1.1 Pa·s for CaP and 0.78 Pa·s for Al. The printed samples of both materials were heat treated to remove the resin and sinter the ceramic bodies. Digital photographs, SEM and FESEM were taken of the hybrid and ceramic scaffolds. The highest volumetric shrinkages were those of the samples with the lowest percentage of load (35 vol%) of gyroid geometry, with values of 58.4% for Al and 79.4% for CaP. The samples with the highest number of cracks were those of Al with Schwartz P geometry. The scaffolds with the highest compressive strength were the hybrids for both materials. The Sintered Al gyroid geometry presented higher strengths than the Schwartz P, being the 50Al the best with a value of 0.4 ± 0.2 MPa. In the case of sintered CaP, the highest mechanical strength was for 50CaP with a value of 0.83 ± 0.06 MPa. Such values are comparable with those of cancellous and cortical bone. Finally, the 50 vol% Al and CaP scaffolds were impregnated with propolis extracts from Tame, Arauca, Colombia. The antimicrobial activity of the Al scaffolds was evaluated, demonstrating a better response to *S. aureus* than to *E. coli*. For CaP, cytotoxicity and cell proliferation were evaluated, demonstrating that the material with and without propolis did not present toxic effects on the cells and that there was a better response to cell growth in those that were impregnated.

Keywords: stereolithography, bone regeneration, calcium phosphates, alumina, scaffolds

Contenido

Pág.

Resumen ..... **XI**

Abstract ..... **XII**

Lista de figuras ..... **XVI**

Lista de tablas ..... **XIX**

Lista de Símbolos y abreviaturas ..... **XX**

Introducción **1**

Justificación **4**

Objetivos **6**
Objetivo general 6
Objetivos específicos 6

Estructura de la tesis **7**

1. Marco Teórico y estado del arte **11**
1.1 Tejido óseo y traumatismos 11
1.2 Ingeniería de tejidos 13
1.3 Manufactura aditiva 15
1.4 Estereolitografía. 17
1.4.1 Resinas utilizadas en estereolitografía 21
1.5 Estereolitografía cerámica 23
1.5.1 Preparación de la suspensión 24
1.5.2 Creación de la pieza 26
1.5.3 Desaglomeración 26
1.5.4 Sinterización 26
1.6 Fosfatos de Calcio 27
1.6.1 Estructura y composición 28
1.6.2 Síntesis de fosfatos de calcio 30
1.7 Alúmina 33
1.8 Scaffolds en la Ingeniería de Tejidos 34

2. Obtención de scaffolds cerámicos de alúmina a partir de estereolitografía cerámica con potencial aplicación en regeneración de tejido óseo. **43**
Abstract 43

Resumen 44
2.1 Introducción 45
2.2 Materiales y métodos 49
2.2.1 Resina y partículas de alúmina 49
2.2.2 Suspensión de las partículas de alúmina en la resina 50
2.2.3 Obtención de los Scaffolds 51
2.2.4 Procesamiento posterior de los cuerpos verdes cerámicos 52
2.2.5 Caracterización de los scaffolds 53
2.2.6 Impregnación de los scaffolds sinterizados con propóleo 54
2.2.7 Evaluación antimicrobiana 55
2.2.8 Prueba de degradación 56
2.2.9 Análisis estadístico 57
2.3 Resultados y discusión 57
2.3.1 Caracterización del polvo cerámico 57
2.3.2 Caracterización de la resina y la suspensión 58
2.3.3 Caracterización de los scaffolds 61
2.3.4 Comportamiento mecánico 65
2.3.5 Evaluación Antimicrobiana de los scaffolds impregnados con propóleo 67
2.3.6 Degradación *in vitro* 69
2.4 Conclusiones 70

3. Obtención de scaffolds cerámicos biocompatibles de fosfatos de calcio a partir de estereolitografía cerámica 73
Abstract 73
Resumen 74
3.1 Introducción 76
3.2 Materiales y métodos 78
3.2.1 Resina y partículas de fosfatos de calcio 78
3.2.2 Suspensión de las partículas de fosfatos de calcio en la resina 80
3.2.3 Obtención de los scaffolds 81
3.2.4 Procesamiento posterior de los cuerpos verdes cerámicos 83
3.2.5 Caracterización de los scaffolds 84
3.2.6 Prueba de degradación 85
3.2.7 Impregnación de los scaffolds sinterizados con propóleo 86
3.2.8 Ensayo biológico 86
3.2.9 Análisis estadístico 88
3.3 Resultados y discusión 88
3.3.1 Caracterización del polvo cerámico 88
3.3.2 Caracterización de la resina y la suspensión 90
3.3.3 Caracterización de los scaffolds 92
3.3.4 Comportamiento mecánico 96
3.3.5 Degradación in vitro 98
3.3.6 Ensayo biológico de los scaffolds impregnados con propóleo 99
3.4 Conclusiones 101

4. Comparaciones generales 103

5. Conclusiones generales y recomendaciones 109
5.1 Conclusiones 109
1.1 Recomendaciones 110

A. Anexo: Caracterización de la resina 113
Metodología para la caracterización de la resina.....113
Resultados de la caracterización 115

B. Anexo: Síntesis de nanoestructuras de fosfatos de calcio por autocombustión en solución 119

C. Anexo: Articulo 1.....121

D. Anexo: Articulo 2.....122

Bibliografía 123

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1. Arquitectura del hueso 12
Figura 1-2: Esquema de una máquina de estereolitografía. (a) Por escaneo con láser con orientación de arriba hacia abajo (b) por proyección con orientación de abajo hacia arriba 19
Figura 1-3: Estructura Molecular de los monómeros (a) acrilatos (b) epoxi. 22
Figura 1-4: Pasos de la estereolitografía cerámica. (1) preparación de la suspensión (2) creación de la pieza, (3) Desaglomeración y (4) sinterización. 24
Figura 1-5: Esquema de los pasos de la síntesis de combustión en solución. 32
Figura 2-1: Suspensión de resina – Alúmina. (a) Proceso de preparación de la suspensión y (b) caracterización reológica de la suspensión. 50
Figura 2-2: Impresión de las muestras. (a) Maquina que funciona bajo la metodología DLP utilizada para la impresión de las muestras, con la cubeta adaptada para utilizar bajos contenidos de mezcla. (b) modelo CAD de geometría Giroide, vista superior y lateral. (c) Modelo CAD de la geometría Schwartz P., vista superior y lateral. 52
Figura 2-3: Tratamiento térmico de los scaffolds de alúmina. (a) horno utilizado para el tratamiento térmico de desaglomerado de la resina y sinterizado de los cuerpos verdes. (b) Muestra de scaffolds después del proceso térmicos (c) Curva de tratamiento térmico a la que fueron sometidas las muestras de 35Al, 40Al y 50Al. 53
Figura 2-4: Caracterización mecánica de las muestras de alúmina en una máquina de ensayos universal. 54
Figura 2-5: evaluación antimicrobiana. Preparación de prueba de zonas de inhibición. . 56
Figura 2-6: Caracterización de las partículas. (a) Distribución de tamaño de partícula de la alúmina.(b) Difractograma de rayos X de la alúmina. 58

Figura 2-7: Caracterización de la suspensión. (a) Análisis termogravimétrico y calorimetría diferencia de barrido de la probeta de 50Al. (b) Curvas de velocidad de cizalla vs viscosidad de la resina líquida sin carga cerámica y con los diferentes porcentajes de carga cerámica. 60

Figura 2-8: Fotografías digitales de los scaffolds obtenidos por impresión DLP: Antes del proceso de sinterizado con geometría Giroide (a) 35Al, (b) 40Al, (c) 50Al y después del proceso de sinterizado con geometría Giroide (d) 35Al, (e) 40Al y (f) 50Al. Antes del proceso de sinterizado con geometría Schwartz P. (g) 35Al, (h) 40Al, (i) 50Al y después del proceso de sinterizado con geometría Schwartz P. (j) 35Al, (k) 40Al y (l) 50Al. 62

Figura 2-9: Imágenes SEM y FESEM de: Scaffolds Giroide antes del sinterizado a (a) 35Al, (b) 40Al y (c) 50Al. Scaffolds giroide después del sinterizado a (d y g) 35Al, (e y h) 40Al y (f y i) 50Al. Scaffolds Schwartz P. antes del sinterizado a (j) 35Al, (k) 40Al y (l) 50Al. Scaffolds Schwartz P. después del sinterizado a (m) 35Al, (n) 40Al y (o) 50Al. 64

Figura 2-10: Curvas representativas de Esfuerzo vs Deformación para los scaffolds con geometría (a) Giroide antes del sinterizado, (b) Giroide después del sinterizado, (c) Schwartz P. antes del sinterizado y (d) Schwartz P. después del sinterizado. 66

Figura 2-11: Resultados evaluación antimicrobiana. (a) Inhibición de la formación de biopelículas (b) formación de zona de inhibición. 69

Figura 2-12: Pérdida de peso de los scaffolds 50Al después del sinterizado en función del tiempo de remojo en PBS. 70

Figura 3-1: Proceso de síntesis por autocombustión o combustión en solución realizado. 80

Figura 3-2: Preparación de la suspensión de resina – Fosfatos de calcio..... 81

Figura 3-3: Impresión de las muestras. (a) Maquina que funciona bajo la metodología DLP utilizada para la impresión de las muestras, con la cubeta adaptada para utilizar bajos contenidos de mezcla. (b) modelo CAD de geometría Giroide, vista superior y lateral. .. 82

Figura 3-4: Imagen modelo CAD y curva de tratamiento térmico. (a) Imagen superior y lateral del modelo CAD de la geometría Giroide, (b) Curva de tratamiento térmico a la que fueron sometidas las muestras de 35CaP, 40CaP y 50CaP. 84

Figura 3-5: Scaffolds de 50CaP impregnados con propóleo proveniente de la región de Arauca, Colombia y sin impregnar. 86

Figura 3-6: Ensayo biológico realizado a los scaffolds de fosfatos de calcio con y sin impregnación de propóleo. Imagen del cultivo control de la línea celular de L929. Ensayo de MTT para la viabilidad celular. 87

Figura 3-7: Caracterización de las partículas de Fosfatos de Calcio. (a) Histograma resultante de las mediciones de tamaño de partícula tomadas con el software ImageJ y analizadas por el software Origin de la distribución del tamaño de partícula de los Fosfatos de Calcio (cenizas) utilizados en la mezcla de resina-cerámica para la impresión por DLP. (b) Ejemplo de imagen de FESEM utilizada para hacer las mediciones de los tamaños de partículas y agregados. (c) Difractograma de Rayos X de las partículas de fosfatos de calcio después del tratamiento térmico y sinterizado. 89

Figura 3-8: Caracterización de la suspensión. (a) Análisis termogravimétrico y calorimetría diferencia de barrido de la probeta de 50CaP. (b) Curvas de velocidad de cizalla vs viscosidad de las mezclas con los diferentes porcentajes de carga cerámica. 92

Figura 3-9: Fotografías digitales de los scaffolds obtenidos por impresión DLP con geometría Giroide. Antes del proceso de sinterizado (a) 35CaP, (b) 40CaP, (c) 50CaP y después del proceso de sinterizado (d) 35CaP, (e) 40CaP y (f) 50CaP. 93

Figura 3-10: Imágenes SEM y FESEM de: Scaffolds Giroide antes del sinterizado (a, d) 35Al, (b, e) 40Al y (c, f) 50Al. Después del sinterizado a (g, j) 35Al, (h, k) 40Al y (i, l) 50Al. 95

Figura 3-11: Curvas de Esfuerzo vs Deformación para los scaffolds con geometría Giroide (a) antes del sinterizado y (b) después del sinterizado. 97

Figura 3-12: Valores de pérdida e incremento de masa de los scaffolds 50CaP después del sinterizado en función del tiempo de remojo en PBS. 99

Figura 3-13: Proliferación celular de la línea celular L929 en scaffolds del 50% p/V de fosfatos de calcio con (50CaP+P) y sin impregnación (50CaP) de extracto etanólico de propóleo proveniente de Arauca, Colombia a las 24h, 96h y 6 días. 101

Figura 4-1: Comparaciones comportamiento reológico entre las suspensiones de (a) Alúmina y (b) Fosfatos de calcio. 104

Figura 4-2: Comparaciones en las curvas de tratamiento térmico para los scaffolds de (a) Alúmina y (b) Fosfatos de calcio. 107

Figura 5-1: FTIR resina comercial. (a) Resina sin curar (b) Resina curada. 116

Figura 5-2: Análisis termogravimétrico de resina comercial. 116

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1: Características generales de los principales Fosfatos de Calcio. 29
Tabla 2-1: Porcentajes de contracciones volumétricas y grosor de las paredes antes y después del sinterizado para los scaffolds giroide y primitiva de 35Al, 40Al y 50Al. 63
Tabla 2-2: Valores de Resistencia máxima a la compresión y Modulo de Young para los scaffolds con geometría giroide y Schwartz Primitiva antes y después del proceso de sinterizado. 67
Tabla 3-1: Valores de contracción volumétrica, resistencia máxima a la compresión y Modulo de Young para los scaffolds con geometría giroide, antes y después del sinterizado, en las diferentes concentraciones de carga cerámica. 93
Tabla 4-1: Valores de contracción volumétrica y resistencia máxima a la compresión para los scaffolds con geometría giroide antes y después del sinterizado en las diferentes concentración de carga cerámica de Alúmina y Fosfatos de calcio. 106

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
Cd	Profundidad de gelificación	n. a	ecuación 1-1
Dp	profundidad de penetración	n. a	ecuación 1-1
Ec	energía crítica	n. a	ecuación 1-1
Emax	Energía máxima	n. a	ecuación 1-1
rpm	revoluciones por minuto	n. a	n. a
W_0	peso muestra inicial seca	g	ecuación 2-1 y 3-1
W_t	peso muestra seca después	g	ecuación 2-1 y 3-1

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
φ	parámetro relación oxidante / combustible	n. a	Ecuación 4-1 y 4-2

Abreviaturas

Abreviatura	Término
35Al	Suspensión de 35 vol% de alúmina con resina
35CaP	Suspensión de 35 vol% de fosfatos de calcio con resina
40Al	Suspensión de 40 vol% de alúmina con resina
40CaP	Suspensión de 40 vol% de fosfatos de calcio con resina
50AISI	Scaffolds de 50 vol% de alúmina sinterizados e impregnados de propóleo
50Al	Suspensión de 50 vol% de alúmina con resina
50AlSC	Scaffolds de 50 vol% de alúmina sinterizados sin impregnar de propóleo
50CaP	Suspensión de 50 vol% de fosfatos de calcio con resina
50CaP+P	Scaffolds de 50 vol% sinterizados impregnados con propóleo
BHI	Brain heart infusion
BYK	Dispersante Disperbyk
C-	Control negativo

C+	Control positivo
Ca	Calcio
CAD	Diseño asistido por computadora
CaP	Fosfatos de calcio
CP	Control propóleo
CPF	Pirofosfatos cálcicos
CSTL	Estereolitografía cerámica
DE	Desviación estándar
DLP	Procesamiento digital por luz / Proyección de luz digital
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRX	Difracción de rayos X
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DTP	Distribución tamaño de partícula
E. Coli	*Escherichia coli*
FC	Fosfatos de calcio
FDM	Modelado por deposición fundida
FESEM	Microscopia por emisión de campo
FTIR	Espectroscopía por transformada de Fourier
HA	Hidroxiapatita
IR	Índice de refracción
LDM	Modelado por deposición líquida
MPa	Mega Pascales
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio
NTU	Unidades nefelométricas de turbidez
OCP	Fosfato octacálcico
P	Fosforo
Pa	Pascal
PBS	Buffer de fosfato
PI	Fotoiniciador
S. Aureus	*Staphylococcus aureus*
SBF	fluido fisiológico simulado
SEM	microscopia electrónica de barrido
STL	Estereolitografía
TGA	Termogravimetría
TPMS	Superficies minimales triplemente periódicas
UFC	Unidades formadoras de colonia
UV	Ultravioleta
β-TCP	Fosfato tricálcico beta

Introducción

Alrededor del mundo, cada día hay cientos de personas que requieren tratamientos relacionados con el tejido óseo debido a diversos factores tales como el incremento de accidentes de tráfico, aumento de enfermedades degenerativas o congénitas, mayor longevidad en la población, entre otros. Sólo en Latinoamérica se proyecta que para el año 2050 el porcentaje de personas mayores a 50 años será del 49%, lo cual incrementa el riesgo de sufrir enfermedades óseas como la osteoporosis (1), que a su vez incrementa el número de fracturas sufridas por la población. En Colombia, se estima que alrededor de 3 millones de mujeres sufren de osteopenia y 1.5 millones sufren de osteoporosis (2,3). Las lesiones asociadas con accidentes de tráfico son consideradas un problema de salud pública ya que son la octava causa de muerte en el mundo, especialmente en población joven de 15 a 29 años. Se estima que cada año mueren 1,24 millones de personas por estos accidentes y 50 millones resultan heridas (4). En muchos casos, la única manera de poder tratar dichas dolencias es a través de reparaciones parciales o sustituciones completas del órgano o tejido afectado (5). En muchas ocasiones es posible llevar a cabo autoinjertos óseos; sin embargo, esto requiere de procedimientos quirúrgicos dolorosos y se puede comprometer el funcionamiento del órgano o tejido sano, el ciclo de producción es largo, e incluso, en algunos casos la cantidad de injerto extraído puede ser insuficiente o el tamaño y la forma del hueso autógeno no siempre coincide con el defecto (6,7). Los injertos aloplásticos, los cuales son provenientes de materiales fabricados sintéticamente, surgen como una respuesta a la necesidad de hacer los reemplazos requeridos (7), valiéndose de la ingeniería tisular, la cual emplea estructuras conocidas como scaffolds o andamios para sustituir el tejido u órgano dañado. Éstos últimos imitan las características de la matriz extracelular y permiten la incorporación en el cuerpo huésped (5).

La regeneración ósea necesita andamios porosos y que sean estables a nivel mecánico para así favorecer la integración tisular y la angiogénesis, lo cual es indispensable para la regeneración del tejido (8). Los scaffolds pueden ser biodegradables y que se reemplacen

completamente por tejido nuevo o también existen andamios cerámicos biocompatibles algunos de los cuales no se degradan y otros son bioinertes (5). Las propiedades biomecánicas deben ser compatibles con el tejido nativo, es por eso que es necesario lograr un equilibrio óptimo entre la porosidad, la resistencia mecánica y tamaño de poro para formación del nuevo tejido óseo (8).

Los scaffolds basados en superficies minimales triplemente periódicas (TPMS), garantizan, gracias a su diseño, una porosidad interconectada y un control adecuado de ésta. Se ha demostrado que las características geométricas de los andamios como la curvatura de la superficie, el tamaño y la forma de los poros tienen una gran influencia en el rendimiento celular de los mismos (5). Estas estructuras además muestran una mayor permeabilidad a los fluidos que otras, lo que puede ser beneficioso para el suministro de nutrientes *in vivo* (9).

La manufactura aditiva o impresión 3D facilita la construcción de scaffolds, los cuales tienen un grado de complejidad casi imposible de alcanzar a través de las técnicas convencionales. Entre los diferentes tipos de tecnologías, las más conocidas son el modelado por deposición fundida (FDM), el modelado por deposición líquida (LDM) y la estereolitografía (STL) (5), o el procesamiento digital por luz (DLP), siendo estos dos últimos los más prometedores, pues tienen como ventajas el grado muy alto de precisión, bajo costo de fabricación, tiempos de ciclos cortos (10), y mayor eficiencia de impresión (9). Además, el DLP al basarse en fotopolimerización de imágenes transversales completas, no tiene limitaciones en cuanto a la construcción de los recorridos de láseres o extrusores como en otros casos sí sería necesario (11).

Para las diferentes aplicaciones biomédicas que tienen los materiales, los metales han sido de gran uso como soporte de cargas debido a sus excelentes propiedades mecánicas. Sin embargo, éstos presentan tendencia a la corrosión estando en contacto con fluidos fisiológicos durante periodos extensos de tiempo. Los polímeros sintéticos, aunque han sido utilizados para scaffolds, son materiales inertes, por lo cual no inducen a la adhesión celular ni a la formación de tejido (12,13). Además, para los casos en que se utilizan como hidrogeles, se presentan dificultades en la manipulación del propio material, en falta de uniformidad al cargar las células, o incluso pueden ser muy difíciles de esterilizar (14). Es por eso que para la regeneración de tejidos óseos se buscan materiales que a nivel

biológico sean superiores. Los cerámicos basados en fosfatos de calcio han mostrado un gran potencial ya que presentan una excelente biocompatibilidad, buen rendimiento, capacidad de degradación (11), buena estabilidad mecánica, resistencia al desgaste y a la corrosión (15). Éstos se han considerado como un material ideal para las reparaciones de defectos óseos pues tienen una composición muy similar a la del tejido óseo natural (11). La hidroxiapatita es un componente mineral primario de los dientes y huesos, y ha sido conocida por su capacidad de interconectarse con los tejidos vecinos, tener propiedades osteoinductoras y fomentar la unión celular dentro de sus poros (15,16). Otros derivados de los fosfatos de calcio también presentan alta biocompatibilidad y, sobre todo, excelente biodegradabilidad, lo que permite que el material cerámico sea absorbido y convertido en tejido óseo nuevo (17) favoreciendo la adhesión de células óseas, la proliferación de estas y dando paso a la mineralización de la superficie (10).

La estructura y el método de preparación de scaffolds cerámicos es crucial para obtener piezas satisfactorias para las reparaciones de tejidos óseos (11). A través de las técnicas más tradicionales de manufactura cerámica, es imposible lograr formas tan complejas como son los scaffolds (10). Hasta hace poco, los scaffolds han sido fabricados por métodos basados en extrusión o agentes espumantes, sin embargo, estas metodologías crean los poros al azar y por tanto no garantizan el control de estos (15), hay escasa personalización de las piezas, poca precisión y tiempos de ciclos muy largos (18). La impresión 3D es una tecnología más versátil y permite ser utilizada para la fabricación de andamios cerámicos.

En el presente trabajo, se plantea el desarrollo de scaffolds de fosfatos de calcio a través de la técnica de estereolitografía cerámica, utilizando diseños basados en las TPMS, para ser utilizados potencialmente en la ingeniería de tejidos, más específicamente en la regeneración de tejidos óseos.

Justificación

Debido a que hay una acelerada irrupción de la tecnología en el desarrollo de soluciones médicas, odontológicas y también en las industrias en general, se ve la necesidad de ir a la par con los procesos de innovación científica que permitan avanzar y competir a nivel de calidad, funcionalidad y costos. Es así como se plantea el uso de la técnica de estereolitografía cerámica para la creación de andamios cerámicos con potencial uso en la regeneración de tejidos.

Los injertos aloplásticos, provenientes de materiales fabricados sintéticamente, surgen como una respuesta a la necesidad de contar con los dispositivos médicos apropiados para hacer los reemplazos requeridos en las intervenciones quirúrgicas asociadas al hueso (8), valiéndose de la ingeniería tisular, la cual emplea estructuras conocidas como scaffolds para sustituir el tejido u órgano dañado. Para su correcto funcionamiento en la regeneración ósea, un scaffold, además de ser altamente biocompatible, debe ser poroso, tener una porosidad interconectada y estabilidad mecánica para así favorecer la integración tisular y la angiogénesis, lo cual es indispensable para la regeneración del tejido (5,12). Las geometrías basadas en superficies minimales triplemente periódicas (TPMS) garantizan, gracias a su diseño, una porosidad interconectada y un control adecuado de ésta. Estas estructuras exhiben una mayor permeabilidad a los fluidos lo que puede ser beneficioso para el suministro de nutrientes *in vivo* (13). Para fabricar scaffolds con geometrías y composiciones compatibles con el hueso, es recomendable utilizar materiales similares a su parte inorgánica, como los fosfatos de calcio, facilitando su adaptación en el organismo y mejorando la biocompatibilidad y bioactividad. Sin embargo, lograr procesar materiales cerámicos biocompatibles con geometrías complejas y porosidades interconectadas sigue siendo un reto, el cual evidentemente no puede abordarse desde el procesamiento cerámico convencional.

A pesar de que la manufactura aditiva o impresión 3D se conoce alrededor del mundo hace más de 20 años, es un campo en el cual la investigación sigue vigente tratando de lograr piezas cada vez más precisas y funcionales. La estereolitografía es una técnica que se ha ido posicionando con fines avanzados para el desarrollo tecnológico en el área de ingeniería tisular. Sin embargo, es una tecnología que en Colombia no es explotada a gran

escala y son pocas las empresas que la utilizan como herramienta. Es por esto por lo que en el grupo de Materiales Cerámicos y Vítreos se decidió emprender en este trabajo con la intención de conocer y afianzar la técnica en el laboratorio. Se cuenta con una máquina de estereolitografía sencilla y se exploró la potencialidad de la técnica en aplicaciones asociadas con biomateriales. El presente trabajo involucra aprovechar la experticia que se tiene en la síntesis de fosfatos de calcio y su probada actividad favorable en el crecimiento celular. Se les dio un valor agregado a las partículas de fosfatos de calcio sintetizadas por la técnica de autocombustión, de tal forma que se obtuvo, a partir de ellas, un scaffold de alta precisión y geometría controlada y favorable para la interacción con los tejidos biológicos.

Lograr el dominio de la técnica de la estereolitografía para producir cuerpos cerámicos de alta precisión y complejidad geométrica potencia el uso de la técnica para desarrollar productos cerámicos diversos de altas exigencias funcionales.

Objetivos

Objetivo general

Obtener andamios cerámicos de fosfato de calcio producidos con geometrías complejas a partir de estereolitografía cerámica con potencial aplicación en ingeniería de tejidos óseos.

Objetivos específicos

1. Obtener una suspensión estable de alto contenido de partículas de fosfatos de calcio en una resina fotopolimerizable que pueda ser utilizada en la técnica de estereolitografía cerámica.
2. Dilucidar una curva de tratamiento térmico ajustada para la degradación térmica de la resina y la sinterización del material cerámico.
3. Producir cuerpos cerámicos con formas geométricas que garanticen la interconectividad de poros utilizando la técnica de estereolitografía cerámica.
4. Identificar las características del cuerpo cerámico obtenido haciendo uso de las técnicas de caracterización disponibles en el medio.

Estructura de la tesis

Esta tesis está dividida en cuatro capítulos relacionados con el desarrollo de los objetivos específicos planteados anteriormente. A continuación, se describe con algo de detalle lo que se podrá encontrar en cada uno de ellos.

El primer capítulo titulado "*Marco teórico y estado del arte*" presenta el marco teórico y el estado del arte de aquellos aspectos necesarios para el desarrollo de la tesis. Se incluye información sobre manufactura aditiva y en especial la estereolitografía y estereolitografía cerámica que es la técnica empleada en el desarrollo de esta tesis, también se habla sobre fosfatos de calcio, alúmina e ingeniería de tejidos, además la problemática asociada al desarrollo de implantes para la regeneración ósea utilizando materiales adecuados.

Los capítulos dos y tres se presentan en formato de artículo científico independientes. En ellos se encuentra un resumen del trabajo realizado en el capítulo, seguido por la introducción de la temática particular del capítulo, la metodología empleada, resultados y discusión y por último las conclusiones del capítulo. Cabe resaltar que la información incluida en estos dos capítulos corresponde enteramente a los artículos publicados o en proceso de publicación como productividad de la tesis, los cuales se pueden consultar en los anexos.

En el capítulo dos, titulado "*Obtención de scaffolds cerámicos de alúmina a partir de estereolitografía cerámica con potencial aplicación en regeneración de tejido óseo*", se presenta la investigación realizada con partículas de alúmina, la cual inicialmente no estaba planteada en el proyecto de tesis. Para desarrollar adecuadamente el trabajo y lograr los objetivos general y específicos, en donde se puntualizaba el uso de fosfatos de calcio, fue necesario hacer un acercamiento inicial a la técnica de estereolitografía cerámica para adquirir la experticia necesaria y garantizar su dominio. Por la disponibilidad del material y costos de producción, se realizó el proceso de entrenamiento utilizando como materia prima una resina fotopolimerizable de naturaleza acrílica proporcionada por la empresa New Stetic (Guarne, Antioquia, Colombia) y partículas comerciales de tamaño micrométrico de alúmina. La alúmina es un material inerte el cual no presenta alta

interacción con la resina ni afectaciones a nivel biológico. Como resultado del trabajo realizado con la alúmina, se publicó un artículo en el cual se aborda la metodología de impresión 3D por estereolitografía para obtener piezas completamente cerámicas de alúmina con dos geometrías tipo TPMS las cuales se compararon entre sí. En el artículo se incluye la caracterización de la resina, las partículas de alúmina y la mezcla entre ambas. Además, se presentan las condiciones de impresión adecuadas, el tratamiento térmico realizado a los cuerpos verdes, necesario para el desaglomerado de la resina y el sinterizado de los cuerpos de alúmina, así como la caracterización morfológica y mecánica de los scaffolds híbridos y cerámicos obtenidos. También se presenta el estudio de la impregnación de los cuerpos cerámicos con un extracto etanólico de propóleo proveniente de la región de Tame (Arauca, Colombia) y su actividad antimicrobiana frente a las cepas de *S. aureus* y *E. Coli*, especies relacionadas con las infecciones que se presentan en reemplazos y sustituciones óseas.

El capítulo tres, titulado "*Obtención de scaffolds cerámicos biocompatibles de fosfatos de calcio a partir de estereolitografía cerámica*", comprende el trabajo realizado para cumplir con los objetivos general y específicos haciendo uso de una resina fotopolimerizable y partículas de fosfatos de calcio sintetizadas por el método de autocombustión en el laboratorio de Cerámicos y Vítreos de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Se menciona la caracterización de la resina nuevamente, de las partículas de fosfatos de calcio y la formulación de la pasta cerámica para la impresión y su caracterización reológica. Se enuncian las condiciones de impresión utilizadas, el tratamiento térmico para el desaglomerado de la resina y la sinterización del cuerpo cerámico de fosfatos de calcio y la caracterización tanto morfológica como mecánica de los scaffolds híbridos y completamente cerámicos. También se incluye la impregnación de los cuerpos cerámicos con un extracto etanólico de propóleo proveniente de la región de Tame (Arauca, Colombia) y el estudio de la citotoxicidad frente a la línea celular L929.

En el capítulo cuatro, titulado "*Comparaciones generales*", se hace una breve comparación de los resultados obtenidos para scaffolds con geometría tipo TPMS giroide con partículas de alúmina y fosfatos de calcio. Se comparan los resultados de las viscosidades para las suspensiones con ambas partículas, así como las contracciones volumétricas y resistencias mecánicas de los scaffolds híbridos y completamente cerámicos.

Finalmente se encuentran las conclusiones y las recomendaciones a las que se llegó después de desarrollar esta tesis. En la última sección están los anexos en donde se presentan algunos resultados previos a este trabajo que fueron necesarios para el desarrollo experimental de la tesis como lo es la caracterización de la resina comercial utilizada y el procedimiento de la síntesis por combustión en solución, así como los artículos publicados y sometidos a revisión científica que fueron desarrollados durante el proyecto con número Hermes 57524 financiado por la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, y que son producto de este trabajo investigativo.

1. Marco Teórico y estado del arte

Este capítulo abordará los conceptos básicos sobre la ingeniería de tejidos, así como los necesarios para entender la manufactura aditiva, ahondando en la técnica de estereolitografía y su variación en estereolitografía cerámica. Se hablará sobre las partículas utilizadas en esta tesis las cuales son la alúmina y los fosfatos de calcio, sus principales características y métodos de síntesis. Finalmente se mencionarán algunas aplicaciones de scaffolds de diferentes materiales cerámicos en la ingeniería de tejidos y el impacto de éstos en ella.

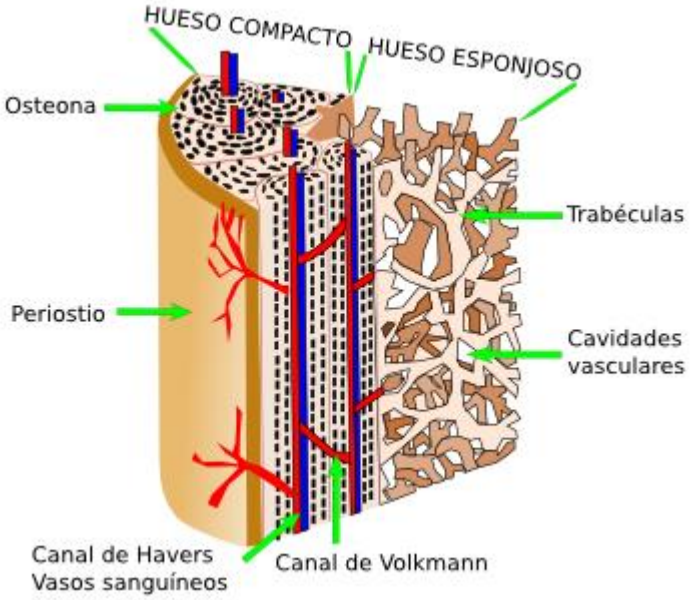
1.1 Tejido óseo y traumatismos

El hueso es un tejido dinámico, vascularizado, con capacidad de regenerarse y remodelarse sin dejar cicatriz, además tiene la capacidad de emplear rápidamente sus reservas metabólicas y minerales de acuerdo con los defectos que presente. Su función es proporcionar estructura al cuerpo, servir como reserva mineral y es el encargado de soportar las contracciones musculares que permiten el movimiento y protegen los órganos internos (19,20). Su estructura y organización están establecidas según una demanda orgánica, responden con eficiencia a las necesidades funcionales y está adaptado para resistir las cargas con elasticidad adecuada (19). La característica diferenciadora del hueso frente al resto de tejidos es el alto contenido de sustancias inorgánicas minerales como calcio y fósforo, combinadas con una matriz orgánica rica en agua y colágeno.

El hueso posee una estructura jerárquica, compuesta de diferentes niveles a medida que se varía la escala y cada una de estas escalas o niveles va a tener influencia en las características biomecánicas del mismo (21). Desde el punto de vista macroscópico, el hueso está formado por una zona tipo cáscara cilíndrica dura y densa de hueso cortical que se hace más fina a medida que aumenta la distancia desde el centro del eje del hueso

hacia las superficies articulares. El hueso cortical engloba cantidades crecientes de hueso trabecular poroso, también denominado esponjoso. En los seres humanos, el hueso esponjoso tiene una porosidad del 50-90%. Por el contrario, el hueso cortical tiene una estructura mucho más densa con una porosidad del 3-12% (22). En la figura 1-1, se muestra la arquitectura del tejido óseo, haciendo una clara diferenciación entre el hueso cortical (compacto) y el hueso esponjoso, mostrando además la complejidad estructural del tejido esponjoso en cuanto a su porosidad y la interconectividad de estos poros.

Figura 1-1. Arquitectura del hueso



Nombre de la fuente: atlas de histología vegetal y animal. Megías, M. Molist, P. Pombal, MA (23).

Los traumas ortopédicos son una causa frecuente e importante de morbilidad y discapacidad en la sociedad actual. Estos eventos afectan a personas de todas las edades por lo que resulta de gran importancia entender la respuesta natural del tejido óseo a las fracturas con el fin de tener respuestas que sean adecuadas desarrollando estrategias para su reparación (24). Cuando ocurre una fractura, se presenta una perturbación mecánica que hace que sea imprescindible brindar una estabilidad relativa o absoluta según donde se localice el problema. Además, es importante recalcar que, aunque las lesiones óseas sean tratadas de acuerdo con los protocolos establecidos, puede ocurrir que el hueso no sea capaz de repararse por sí mismo. Esto puede darse por diferentes

motivos, entre ellos, algunos factores propios del paciente o factores propios de la fractura como lesiones de tejido blando o el hecho de que el defecto sea de un tamaño crítico.

Como se mencionó, el hueso tiene la capacidad de regenerarse, permitiendo la reparación de muchas lesiones sin necesidad de intervenciones quirúrgicas complejas. Sin embargo, se presentan más retos cuando existen defectos óseos grandes como los que producen la resección de tumores óseos o las fracturas grandes sin unión. Actualmente, se han explorado otras alternativas a los autoinjertos, las cuales consisten en la utilización materiales sintéticos para el uso de matrices implantables con las características fundamentales del tejido óseo para que se dé la correcta reparación. Estas nuevas metodologías utilizan la ingeniería de tejidos como estrategia para resolver dichos problemas.

1.2 Ingeniería de tejidos

La ingeniería tisular es un campo de la ingeniería biomédica el cual se ha estado desarrollando rápidamente y ha surgido como respuesta a la dificultad que existe para cubrir la alta demanda de trasplantes de órganos y tejidos (25). Ésta se enfoca en diferentes tejidos específicos. La regeneración de tejido óseo, por ejemplo, se sustenta en el uso de biomateriales de origen natural o sintético para llenar defectos. Es frecuente el uso de hueso liofilizado, hidroxiapatita o fosfatos de calcio, entre otros. Así mismo el uso de células madre para terapia celular o el uso de biomoléculas concentradas a partir de derivados de la sangre En la ingeniería de tejidos, se utilizan estructuras de andamiaje en combinación con células o componentes con actividad biológica para inducir la regeneración de tejidos a nivel *in vitro* e *in vivo* (26).

En el mundo se realizan alrededor de 2.2 millones de procedimientos al año los cuales implican algún tipo de injerto para manejar las pérdidas de hueso en ortopedia, neurocirugía y odontología (27). Dichas pérdidas de estructura ósea pueden ser consecuencia de defectos congénitos, traumas o patologías y traen secuelas que afectan la calidad de vida de los pacientes (28). Los autoinjertos y los aloinjertos son el estándar de referencia para tratar este tipo de anomalías. Los autoinjertos óseos son aquellos en donde el hueso es obtenido del propio paciente y puede ser parte del hueso esponjoso,

cortical vascularizado o cortical no vascularizado, lo cual permite formar hueso nuevo por mecanismos de osteogénesis. Los aloinjertos son aquellos que provienen de individuos de la misma especie y también son considerados osteoinductores. Sin embargo, ambos tipos tienen limitaciones tales como el rechazo del individuo receptor, la transmisión de enfermedades, la baja calidad del tejido, el aumento de morbilidad del sitio donante e incluso el fallo por baja vascularización o infecciones (7,22). Es por esto por lo que se estudian los injertos aloplásticos o sintéticos, los cuales son provenientes de materiales fabricados sintéticamente y permiten su implementación en la regeneración ósea. Estos últimos, se encuentran en variadas formas, tamaños y texturas y pueden ser de diferentes materiales como polímeros, cerámicos o compuestos. La respuesta biológica dependerá de las técnicas de fabricación de los injertos o implantes, la porosidad, el grado de absorción e interacción con el medio (7).

En las reparaciones de tejido óseo, se han centrado muchos esfuerzos en lograr fortalecer el proceso de la regeneración ósea, pensando en que los pacientes puedan recuperar su hueso natural y no deban mantener un implante de forma permanente. Sin embargo, según las condiciones de los defectos que se presenten y los tamaños de estos, en ocasiones resulta más fácil implantar biomateriales que sean resistentes y que su actividad de biodegradación no sea muy alta. Es así, que la ingeniería de tejidos ha incurrido en el uso de matrices tridimensionales, las cuales requieren de herramientas básicas como andamios 3D, compuestos biológicos y células para ser aplicados. Además, es necesario que los injertos provean un ambiente, estructura o material físico apropiado para la osteogénesis (que es la síntesis del hueso nuevo a partir de células derivadas del injerto o del huésped), la vascularización y la angiogénesis para permitir la llegada de nutrientes y salida de productos del metabolismo (7,20).

La creación de dichas matrices tridimensionales, conocidas como andamios o scaffolds no es tan sencilla de abordar por metodologías convencionales, ya que como fue mencionado, es necesario contar con geometrías complejas, de poros interconectados que permitan cumplir las necesidades básicas que tiene un implante óseo, siendo similar a la estructura del tejido natural. Es así como la manufactura aditiva o impresión 3D juega un papel de vital importancia.

1.3 Manufactura aditiva

La manufactura aditiva es el término formal que se utiliza para hablar de prototipado rápido y es popularmente conocido como Impresión 3D. Básicamente es la creación de piezas a través de un modelo de datos digital o CAD. Ésta simplifica notablemente la fabricación de objetos complejos, que con otras técnicas de manufactura tradicionales quizá tomaría más tiempo, o sería imposible de lograr. El prototipado rápido únicamente necesita alimentarse con las dimensiones básicas del diseño, un entendimiento de cómo funcionan las máquinas de trabajo y los materiales que se utilizarían para construir las piezas (29,30).

El principio básico de cómo opera la impresión 3D consiste en adicionar material capa por capa, en donde cada una de éstas es una sección delgada de lo que es el sólido del CAD original (29,31,32). Inicialmente se tiene la pieza a realizar en algún software de diseño, se le hace una transformación a dicho archivo pasando a uno que tiene por nombre STL, el cual es el rebanado o *slicing* del prototipo, y es en donde está la información de cada capa que se le enviará a la máquina, junto con un archivo de código G con las instrucciones necesarias para llevar a cabo la formación del objeto con la materia prima que se utilice, según la técnica de manufactura aditiva (26,29).

Entre las técnicas de manufactura aditiva hay clasificaciones como lo son: los procesos de fusión en lecho de polvo, los sistemas basados en extrusión, la inyección de material, la inyección de aglutinante, los procesos de laminación, los procesos de deposición de energía dirigida, las tecnologías de escritura directa y los procesos de fotopolimerización en cuba o estereolitografía (29,33,34). Todas cumpliendo con un mismo objetivo el cual es lograr obtener piezas con morfologías complejas de alta precisión y funcionalidad.

Los procesos de fusión en lecho de polvo fueron de los primeros comercializados de las técnicas de manufactura aditiva, siendo una de las más comerciales la sinterización selectiva por láser. Dentro de las características básicas de los procesos de fusión en lecho de polvo se incluyen una o varias fuentes térmicas para inducir la fusión entre las partículas del polvo, un método para controlar la fusión en una región determinada de cada capa y mecanismos para añadir y alisar las capas de polvo. Las fuentes térmicas más comunes son los láseres. La sinterización selectiva por láser se desarrolló originalmente para producir prototipos poliméricos, pero el enfoque se amplió a polvos metálicos y cerámicos.

El proceso de construcción de la pieza se da dentro de una cámara cerrada para mantener una temperatura elevada, justo por debajo del punto de fusión o de la temperatura de transición vítrea del material en polvo (29). El precalentamiento del polvo y el mantenimiento de una temperatura elevada y uniforme son necesarios para que la energía del láser no tenga que ser tan alta. Normalmente el láser que se utiliza para la fusión del material es de dióxido de carbono, para el caso de materiales poliméricos o cerámicos y de Nd-YAG (granate de itrio y aluminio dopado con impurezas de neodimio), para el caso de los metales (29). La fusión se hace de forma localizada gracias al efecto del láser mientras las partículas se encuentran sueltas dentro de un lecho, el cual se controla por un pistón. El pistón baja la misma cantidad del grosor de una capa cuando la anterior se forma (35). Una gran desventaja de esta técnica es que la precisión se limita al tamaño de partículas del material y se debe evitar el uso de materiales que puedan oxidarse (35,36).

Los sistemas basados en extrusión son los más populares del mercado. Normalmente se utiliza el calor para fundir el material y ser empujado a través de un sistema de alimentación por tractor que crea la presión necesaria para la extrusión. El material que se extruye debe estar en un estado semisólido cuando sale de la boquilla, y éste debe solidificarse sin perder su forma. Además, el material debe poder unirse al mismo que ya ha sido extruido para que se obtenga la estructura sólida deseada. La tecnología basada en extrusión más común es el modelado por deposición fundida (FDM) (29). Se emplean filamentos poliméricos que alimentan un cabezal de impresión, el cual lo funde y extruye para depositar el polímero sobre una plataforma, siguiendo la geometría dada en cada capa. Al ser un proceso que no incluye ningún tratamiento térmico de curado, lo convierte en una opción económica. Sin embargo, su desventaja se puede apreciar en las resoluciones que se presentan, sobre todo en el eje Z, ya que es imposible obtener piezas completamente lisas por esta metodología (37,38). Además, los tiempos de obtención de las piezas pueden ser largos.

La manufactura aditiva se ha convertido en una opción óptima para el desarrollo de diferentes tipos de piezas al comprender varios métodos de adición de material capa a capa que permite diseñar estructuras porosas, interconectadas y con geometrías complejas. Sin embargo, la estereolitografía resalta entre todas por ser una técnica que fabrica piezas de alta calidad, con muy buena resolución, versátil y permite acabados más suaves y tiempos de trabajo relativamente cortos (26,31,34,39).

1.4 Estereolitografía.

A mediados de 1980, el ingeniero físico Charles Chuck Hull, mientras experimentaba con materiales curables a luz UV, vio que exponiendo éstos al escaneo por un láser similar al que se utiliza en impresoras láseres, podría solidificar el polímero e incluso la fotopolimerización podría seguir el patrón del láser, dejando una capa sobre otra previamente solidificada. Fue así como comenzó la estereolitografía y al corto tiempo se creó la empresa 3D Systems la cual sacó al mercado máquinas de estereolitografía para empezar a utilizar la técnica a nivel industrial (26,29). Aunque esta metodología de impresión 3D lleva bastante tiempo en el mercado, no pierde vigencia debido a la variedad de aplicaciones de las piezas obtenidas a partir de ésta.

Como cualquier tecnología de impresión 3D, la estereolitografía trabaja con un diseño asistido por computadora (CAD), al cual se le hace un *slicing* y posteriormente se lleva a cabo la impresión capa a capa. En este caso, las capas que se hacen, generalmente de grosores entre 25 y 100 µm (26), son de resina polimerizable que tiene como base monómeros, sean acrilatos o epóxicos, que se exponen sucesivamente a la radiación láser para hacerlos pasar de líquido a sólido. De esta forma se va solidificando el material capa a capa generando el objeto 3D. El rayo láser tiene la energía suficiente para inducir el proceso de fotopolimerización uniendo los pequeños monómeros y finalmente tener una cadena polimérica reticulada (31).

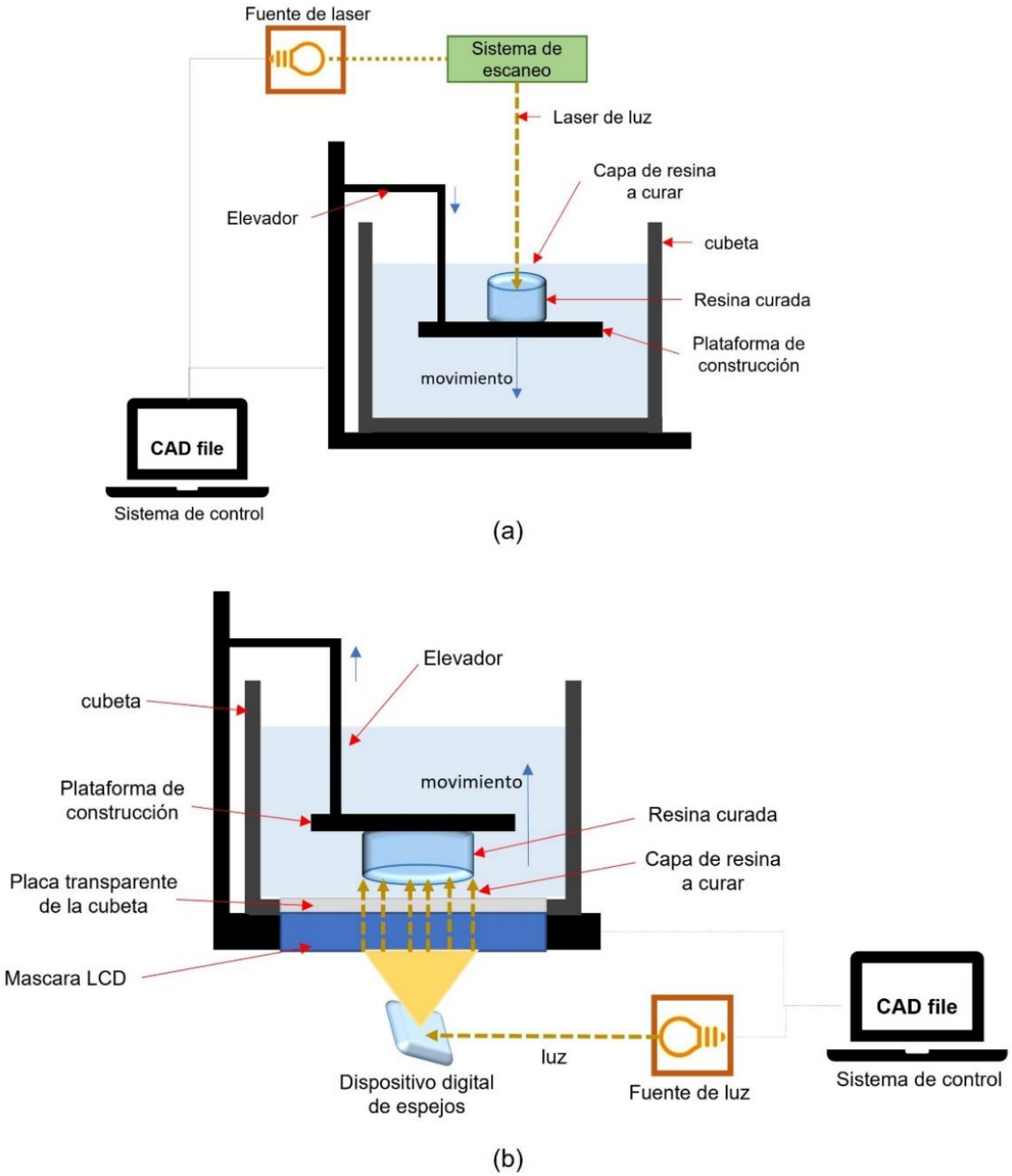
En general, las máquinas de estereolitografía tienen unos componentes principales, los cuales se enumeran a continuación: el recipiente en donde se deposita la resina líquida, comúnmente llamado cuba o *vat*, una plataforma móvil a manera de ascensor que sube y baja, a la cual se adherirá las capas de resina sólida formando el objeto, un sistema óptico y un sistema de control. El sistema óptico dependerá del mecanismo de la aplicación de luz que utilice la máquina, pero en general tiene una fuente de luz y un juego de lentes para direccionar el rayo láser o una serie de pantallas LCD para proyectar las imágenes de cada capa (31).

Independientemente del tipo de mecanismo con el que se puede aplicar la luz UV a la resina líquida, previo al paso de la fotopolimerización, las máquinas de estereolitografía funcionan todas bajo la misma dinámica. La plataforma se posiciona en la zona de resina

líquida, la luz incide y genera el proceso de polimerización, la sección que quedó sólida se adhiere a la plataforma, ésta cambia de posición subiendo o bajando, dejando que fluya la resina líquida y permita la deposición de la siguiente capa y se repite el proceso hasta finalmente tener todas las capas necesarias solidificadas (26).

Existen dos tipos de orientaciones a las cuales pueden trabajar las máquinas, una orientación de ***arriba hacia abajo*** y otra de ***abajo hacia arriba***. Para la primera, la fuente de luz se ubica en la parte superior de la máquina. La plataforma se posiciona, estando sumergida, en la superficie de la resina, dejando solo una fina capa de la misma entre el exterior y la placa, en ese punto la luz incide la zona, solidifica la sección de resina iluminada y para darle paso a la realización de la capa siguiente, la plataforma baja o se sumerge un poco más dejando nuevamente una delgada película de resina líquida en la parte de arriba (ver *figura 1-1(a*)) (31). La desventaja de este método es que se gasta más material y se corre el riesgo que la pieza se despegue de la placa de la plataforma una vez se sumerja ya que la resina líquida le ejerce presión hacia arriba. Para el caso en que la orientación es de ***abajo hacia arriba*****,** la fuente de luz se encuentra en la parte de inferior de la máquina, la cuba o recipiente que contiene la resina líquida tiene una base transparente, generalmente de un material como teflón, y la plataforma no se encuentra sumergida. Una vez se inicie el proceso, la plataforma baja hasta el fondo de la cubeta, dejando una pequeña capa de resina líquida entre la base transparente y la placa, la luz incide el material, se solidifica y queda adherida a la plataforma, ésta sube, y para hacer la capa siguiente baja nuevamente hasta el fondo dejando la capa delgada que será solidificada justo después de la anterior (31) (Ver *Figura 1-1(b*)). Aunque este método implica que la adhesión de la capa solidificada inicial con la placa de la plataforma sea netamente por fuerzas mecánicas y eso puede causar que se desprenda, permite usar menores cantidades de resina, no necesitar ningún tipo de elemento extra en la máquina para hacer “repinte” de resina cada que se va a solidificar y la capa iluminada no está expuesta a la atmósfera lo que no permite que se dé la inhibición por oxígeno (26).

Figura 1-2: Esquema de una máquina de estereolitografía. (a) Por escaneo con láser con orientación de arriba hacia abajo (b) por proyección con orientación de abajo hacia arriba



Nombre de la fuente: Carolina Duque Uribe.

Existen dos mecanismos para aplicar la luz a la resina líquida durante el proceso, ***estereolitografía basada en escaneo*** y ***estereolitografía basada en proyección***. En el primer enfoque se utiliza un escáner o rayo láser para solidificar cada capa. Tiene un sistema de espejos los cuales rotan según las indicaciones que le da el sistema de control, y permiten enfocar y dirigir el láser en toda la sección de la resina dando la forma del objeto para polimerizar un volumen conocido como hebras. Con esta forma, las máquinas funcionan de arriba hacia abajo, tardan más tiempo pues se tiene que seguir con un solo láser toda la sección y aunque es bueno para imprimir piezas de gran tamaño disminuye la resolución de las piezas (26,29,31). El enfoque basado en proyección, comúnmente conocido como ***Proyección de luz digital (DLP)***, cura toda la capa a la vez utilizando una máscara de luz a través de la cual una lámpara ilumina la superficie de la resina. La máscara recibe las instrucciones del sistema de control para saber cuáles secciones son las que debe iluminar y cuales apagar y de esta forma, las partes que estén iluminadas serán las que se polimericen. Con esta metodología se reducen los tiempos de impresión pues de lo único que dependerá es de la máscara, el espesor de la capa y el tiempo de exposición requerido. Además, permite hacer piezas más pequeñas ya que tiene mayor resolución y se pueden hacer más en un mismo proceso, por lo cual puede reducir costos (26,31).

En la estereolitografía existen parámetros que se pueden clasificar como técnicos y fotosensibles. Los parámetros técnicos son aquellos que se pueden ajustar desde la máquina o el archivo STL, tales como el grosor de las capas, la potencia de la luz o del láser incidente y la velocidad de escaneo o impresión. Los parámetros fotosensibles se refieren a las propiedades que son propias de la resina como la dosis de energía necesaria para generar la reacción de fotopolimerización o la profundidad de penetración para el curado (31). Para una resina dada, la profundidad de curado estará determinada por la energía de la luz incidente. Esta energía se puede controlar ajustando la potencia de la fuente de la luz, la velocidad del movimiento del rayo láser, o la velocidad de exposición para el caso en que se utiliza sistema de proyección (26). Como la resina que se utiliza convencionalmente en estereolitografía es relativamente transparente o translúcida, se facilita el paso de la luz ultravioleta, y la distribución de la intensidad de la luz en este medio permite el proceso de fotopolimerización y determina las áreas curadas (31).

Cuando se está haciendo el modelado del fotocurado, se describe que la luz expuesta tiene un valor de energía máximo (*Emax*) en la superficie de la resina; la cual se va atenuando exponencialmente a medida que la luz penetra a través de la resina. Por lo cual se puede decir que la penetración de la luz UV es limitada debido a que hay dispersión y absorción. El grado de fotopolimerización aumenta con la luz UV y la resina llega a un punto denominado *punto de gel* en donde ha pasado de estar líquida a sólida. El parámetro que da cuenta de la profundidad en donde la energía es suficiente para que se llegue al punto de gelificación se denomina *Cd,* y esa energía requerida para gelificar se llama *energía crítica* (*Ec*). La resina se convierte en gel si la energía de la luz es mayor que la energía crítica (*Ec*), de lo contrario sigue siendo un líquido (26,31). Cd se calcula de la forma:

$$Cd = Dp\ ln(\frac{Emax}{Ec})$$ Ecuación 1-1(26,29,31,32)

Donde *Dp* es la profundidad de penetración a la que la intensidad de la luz se reduce a *1/e* (29). Ambos parámetros, *Cd* y *Dp*, son intrínsecos de la resina y son independientes de la exposición. La curva resultante de *Cd* vs *Ln (Emax)*, se le conoce como *curva de trabajo* para describir el comportamiento del fotocurado (29,31). Finalmente, el sobre curado que se genera siempre que se está solidificando una capa es muy importante, ya que es gracias a éste que las capas individuales se mantienen conectadas unas a otras. Es la profundidad a través de la cual la luz incidente penetra la capa inferior adyacente ligeramente y aumenta el curado de ésta (31).

1.4.1 Resinas utilizadas en estereolitografía

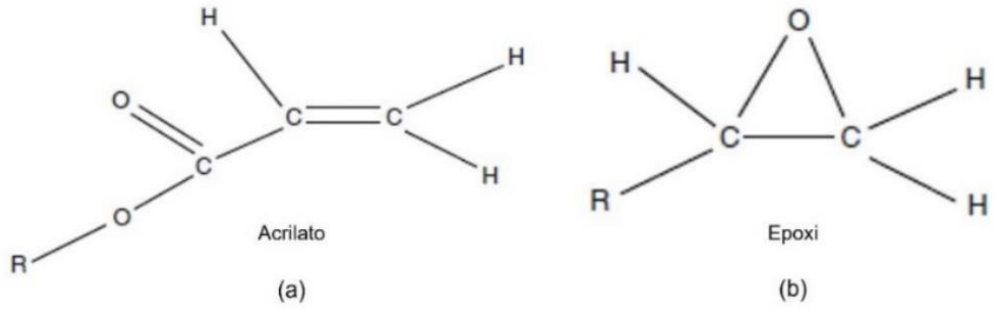
Las primeras patentes que salieron al mercado de las resinas utilizadas en estereolitografía fueron publicadas entre 1988 y 1990. Estas resinas fueron preparadas a base de acrilatos, que se caracterizan por su alta reactividad, aunque generan piezas frágiles debido a que la polimerización de los acrilatos generaba rizos y encogimientos. Así mismo, se conocieron las resinas con composición epoxi que produjeron piezas más precisas y duras que las anteriores debido a que se generaban menores contracciones entre los polímeros. Sin embargo, las resinas epoxi tienen desventajas en la baja velocidad de fotopolimerización y alta fragilidad. Es por lo anterior, que se empezaron a realizar mezclas,

añadiendo acrilatos a las resinas epoxi con el fin de disminuir la fragilidad y facilitar la polimerización a velocidades menores. Hoy en día se utilizan comúnmente resinas a base de ambos polímeros lo que ha potenciado notablemente la estereolitografía.

La estructura molecular del ***acrilato*** (ver *Figura 1-2 (a)*) hace que la polimerización de las resinas de este tipo sea a través de radicales libres. Se forman cadenas largas de monómeros unidos, una vez la resina se vuelve reactiva gracias a un componente llamado *foto iniciador*, construyendo la cadena linealmente mediante la adición de segmentos de monómeros. Cuando la cadena ya ha crecido bastante, empieza a ocurrir la reticulación ya que la cadena se empieza a arquear en sí misma.

Los ***epoxis*** son los fotopolímeros catiónicos más comunes. Éstos presentan en su estructura molecular un anillo (ver *figura 1-2 (b)*), el cual se abre cuando reaccionan, dando lugar a sitios para hacer otros enlaces químicos. Dicha apertura del anillo genera un cambio en el volumen, ya que el número y los tipos de enlaces son esencialmente idénticos antes y después de la reacción. Así, las resinas epoxi suelen tener contracciones mucho más pequeñas y menos tendencia a deformarse y rizarse. Sin embargo, la velocidad en la polimerización es baja (29).

Figura 1-3: Estructura Molecular de los monómeros (a) acrilatos (b) epoxi.



Nombre de la Fuente: I. Gibson, D. Rosen, y B. Stucker. *Additive Manufacturing Technologies.* Springer New York, 2015. DOI: 10.1007/978-1-4939-2113-3. (29)

El proceso de fotopolimerización da cuenta de la unión de diferentes monómeros y oligómeros formando cadenas de éstos mucho más largas. Este proceso usa un líquido, sea resina o un fotopolímero, como materia prima. Normalmente estos materiales reaccionan a radiaciones con longitudes de onda cercanas al UV o incluso al espectro

visible. Ante la radiación, estos materiales desencadenan una serie de reacciones químicas y se solidifican. A esta reacción se le conoce como fotopolimerización (29). La fotopolimerización necesita de oligómeros y monómeros como los anteriormente mencionados que se polimerizan para formar una estructura altamente reticulada. Además de éstos, también necesita de algo conocido como *Foto iniciador (PI)*. Normalmente los monómeros no generan especies reactivas para iniciar la polimerización por sí mismos haciendo uso de la radiación incidente, por tanto, los foto-iniciadores, que son orgánicos y de bajo peso molecular, se utilizan para generar dichas especies reactivas que atacarán los grupos funcionales de los monómeros y oligómeros. Cuando el grupo funcional se descompone, el enlace doble que existía entre carbonos permite la formación de nuevos enlaces con carbonos de otra molécula de monómero diferente.

Existen foto-iniciadores de radicales libres y catiónicos. Los primeros forman radicales libres que atacan los dobles enlaces. Los segundos producen ácidos cuando se exponen a la luz y éstos reaccionan fácilmente con un enlace en monómeros específicos e induce la polimerización (31).

Entre otros componentes, a las resinas también se le agregan diluyentes reactivos con el fin de reducir la viscosidad de los oligómeros y controlar las propiedades de las capas curadas, o dispersantes cuando se agregan partículas que necesitan ser suspendidas en el medio.

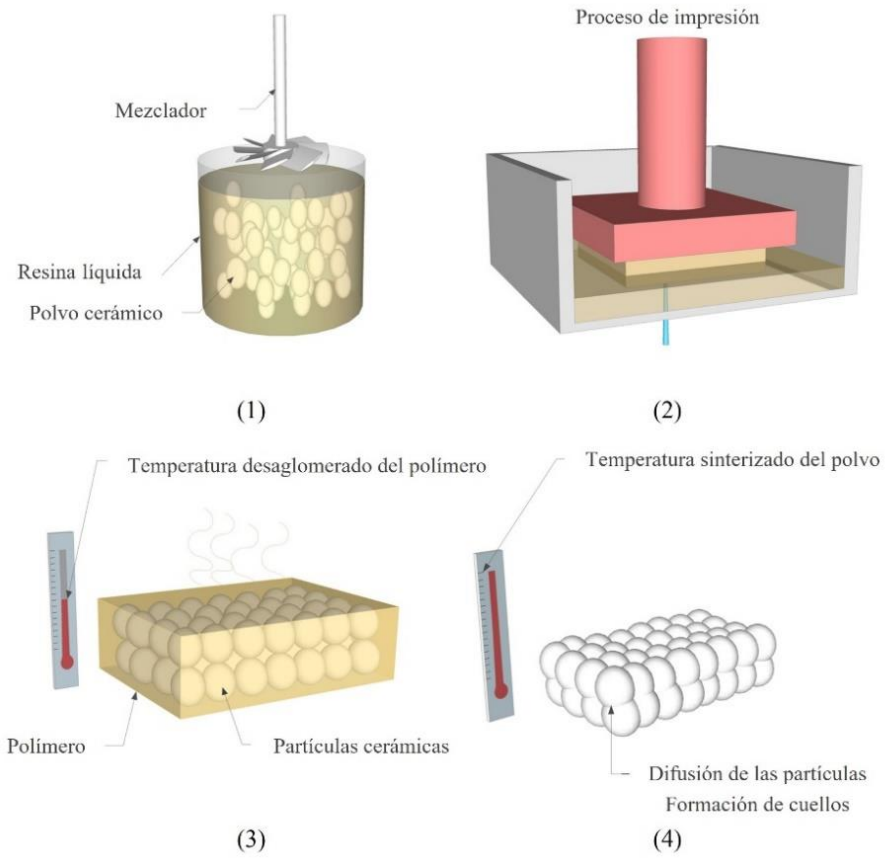
1.5 Estereolitografía cerámica

El método de estereolitografía se ha adaptado para hacer piezas completamente cerámicas usando una suspensión de resina fotopolimerizable con polvos cerámicos [18]. Inicialmente se propuso la adición de rellenos como vidrios y microesferas de cerámica a una resina cruda con el fin de reducir los típicamente grandes *Cd*; se propuso que las partículas dispersas en la resina podrían desviar la luz incidente haciendo que disminuyera dicho parámetro y aumentando la opacidad (31).

El proceso de estereolitografía cerámica (CSTL) cuenta con unos pasos esenciales los cuales son: la preparación de la suspensión resina-cerámica fotopolimerizable (*Figura 1-*

3, paso 1), la creación de la pieza (*Figura 1-3*, paso 2), el desaglomerado de la resina (*Figura 1-3*, paso 3) y la sinterización del cuerpo verde cerámico (*Figura 1-3*, paso 4).

Figura 1-4: Pasos de la estereolitografía cerámica. (1) preparación de la suspensión (2) creación de la pieza, (3) Desaglomeración y (4) sinterización.



Nombre de la Fuente: S. Zakeri, M. Vippola, y E. Levänen, *A comprehensive review of the photopolymerization of ceramic resins used in stereolithography*, Addit. Manuf., vol. 35, p. 101177, oct. 2020, doi: 10.1016/j.addma.2020.101177 (31).

1.5.1 Preparación de la suspensión

La preparación de la resina foto endurecible con partículas cerámicas requiere de una dispersión homogénea de las partículas. Agregar partículas a una resina cruda convencional aumenta notablemente la viscosidad y, por tanto, el procesamiento de dicha resina se convierte en algo más complejo. Inicialmente se deben secar las partículas a

temperaturas entre 120 y 200 °C. Para disminuir la viscosidad de las resinas cerámicas y contribuir a la reducción del índice de refracción (IR), se utilizan diluyentes. La idea es manejar viscosidades inferiores a los 3000 mPa·s (31). Además, también se utilizan dispersantes en contenidos bajos alrededor del 2 y 8% con relación al volumen del polvo cerámico con la intención de evitar una sedimentación rápida de la suspensión sólida y no generar aglomerados de las partículas (34). Dentro de los dispersantes utilizados para fabricar piezas por estereolitografía cerámica se encuentran el poliacrilato de amonio (PAA-NH4) (Zhen Wang et al. (40), algunos tensoactivos (Yihang Wei et al. (41)) y Solsperse 17000 (Chengwei Feng et al [6]) entre otros.

Los polvos cerámicos utilizados en estereolitografía cerámica deben cumplir los siguientes requisitos (31):

- Presentar una pequeña variación del índice de refracción (IR) con la resina cruda. Los materiales cerámicos tienen IRs que oscilan entre 1,5 y 2,6. Los monómeros en su mayoría presentan IRs de aproximadamente 1,5, por lo tanto, se recomienda utilizar polvos con IRs bajos como la sílice, alúmina o fosfatos de calcio los cuales tienen un IR aproximado de 1,6.

- El polvo no debe absorber fuertemente la luz UV, ya que ésta debe penetrar la resina para el proceso de fotopolimerización.

- El tamaño de partícula del polvo cerámico debe ser más pequeño (d_{50}) que el grosor de la capa que se está curando, la cual normalmente está en el rango de 25 a 100 µm. En general se sugiere un tamaño de partícula entre 0.5 y 10 µm.

El objetivo es lograr obtener una alta densidad de partículas para poder producir piezas cerámicas con buena integridad dimensional y estructural, por lo cual el contenido de polvo cerámico debe ser lo más alto posible. Se recomienda manejar porcentajes alrededor del 50% en volumen o más pues de esta forma se mejoran propiedades finales como la porosidad, acelera el proceso de aglomerado, reduce la contracción en la sinterización y evita deformaciones o grietas, y permite tener piezas cerámicas sinterizadas densas y homogéneas (31).

1.5.2 Creación de la pieza

La construcción de la pieza cerámica tiene pasos muy similares a la estereolitografía convencional. Durante la fotopolimerización de la resina cerámica los monómeros y oligómeros actúan como aglutinantes y serán los constituyentes de una matriz alrededor de las partículas uniendo éstas entre sí. En general el cuerpo compuesto es más rígido y resistente que la parte polimérica pura (31). Los pasos de la impresión son los mismos que ya han sido descritos previamente.

1.5.3 Desaglomeración

El proceso de desaglomerado tiene la finalidad de eliminar el aglutinante polimérico del cuerpo verde, obteniendo un componente cerámico con alta porosidad interna y baja densidad (34). Se debe analizar previamente el comportamiento térmico de la resina para garantizar la selección del tratamiento térmico adecuado para desaglomerar. El aumento de temperatura es lento para evitar contracciones muy altas, formación de gas y mantener una distribución uniforme de la temperatura durante el proceso. Normalmente se lleva hasta 500 °C (31).

1.5.4 Sinterización

La sinterización consiste en compactar a alta presión polvos mezclados homogéneamente y, una vez compactados, realizar un tratamiento térmico a una temperatura inferior a la de fusión de la mezcla, obteniendo una pieza consolidada y compacta. Este procedimiento de fabricación proporciona una gran cohesión de los polvos, creando enlaces fuertes entre las partículas, que acaban uniéndose en un solo bloque. En la sinterización, las partículas continúan en estado sólido a pesar de la alta temperatura, siempre que esta permanezca por debajo del punto de fusión del compuesto al que se quiere dar forma. En el proceso, la difusión atómica tiene lugar entre las superficies de contacto de las partículas para que resulten unidas químicamente, formando un solo bloque, Esta unión se da a través de la formación de cuellos entre partículas.

En el proceso de sinterización del cuerpo verde una vez pasó por el desaglomerado de la resina, se presentan contracciones las cuales deben ser estudiadas y revisadas con cuidado según la utilidad que se le vaya a dar a la pieza final. Las temperaturas de sinterizado dependen completamente del tipo de partícula cerámica que se utilice. Para el caso de los fosfatos de calcio, son temperaturas alrededor de los 1000 y 1100 °C (34) y para la alúmina son temperaturas alrededor de los 1700 y 1800 °C (42).

1.6 Fosfatos de Calcio

Los fosfatos de calcio (*FC / CaP*) son materiales cerámicos utilizados con gran interés en los campos de la biología, geología, medicina e industria. Su formación, las funciones que pueden realizar y las aplicaciones dependen de su estructura, composición, solubilidad y estabilidad (43). Hoy en día se considera que los fosfatos de calcio son de especial importancia y los materiales desarrollados a partir de éstos se han tenido en cuenta principalmente gracias a que son los constituyentes inorgánicos más importantes de los tejidos duros de los vertebrados (44,45).

En el último cuarto del siglo XVII aparecieron los primeros estudios sobre la estructura y composición de huesos, dientes y otros tipos de tejidos calcificados, y fue en 1769 cuando el químico y metalúrgico sueco Johan Gottlieb Gahn descubrió la evidencia de que existían fosfatos de calcio en los huesos. Mas adelante en el siglo XIX se expuso que los huesos consisten principalmente de una membrana gelatinosa en el periodo más temprano de la vida animal, la cual con su envejecimiento adquiere gradualmente fosfatos de calcio para adquirir la dureza y durabilidad propia de los componentes óseos (44).

En el sistema ternario $Ca(OH)_2$-H_3PO_4-H_2O son conocidos once fosfatos de calcio que se distinguen entre sí por la variación de la relación molar de calcio a fósforo (*Ca/P*) (43). El nombre Apatita, es el que se le da a un grupo de minerales con la misma estructura cristalográfica y en el caso de los fosfatos de calcio se refiere a aquellos que tienen una relación Ca/P comprendida entre 1,5 y 1,67 óseos (44). La *Tabla 1-1* resume la lista de fosfatos de calcio junto con sus parámetros estructurales, producto de solubilidad y relación Ca/P.

1.6.1 Estructura y composición

De manera general se puede hablar sobre tres aspectos importantes en las estructuras de los fosfatos cálcicos: fosfatos de calcio ácidos, whitlockita y fosfato tricálcico anhídrido y las estructuras apatitíticas.

Los fosfatos de calcio ácidos están caracterizados por tener una estructura de “hoja corrugada”, que tiene dos moléculas por celda unidad compuestas por cadenas CaH_2PO_4- en donde los Ca se comparten entre dos hojas de tetraedros de PO_4 y donde las moléculas de H_2PO_4- y H_2O ocupan el espacio entre las hojas corrugadas.

Las estructuras de Whitlockita y Fosfato tricálcico anhídrido (β-TCP), son muy similares entre sí. La Whitlockita se forma en sistemas acuosos en presencia de iones de Mg^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}. En ésta los iones HPO_4- y Mg^{2+} juegan un papel importante en la estructura; mientras que el β-TCP es un polimorfo perteneciente a la estructura molecular $Ca_3(PO_4)_2$ en la cual no hay presencia de iones de Mg^{2+}. A una temperatura de 1125 °C la fase β-TCP se convierte a α-TCP.

El caso de las estructuras de la hidroxiapatita (HA) y el Fosfato Octacálcico (OCP), es muy similar al anterior, ya que ambas son muy parecidas entre sí. Los dos compuestos presentan una estructura laminar, en el caso de la HA puede ser hexagonal o monoclínica, la principal diferencia radica en el ordenamiento de los iones OH, lo cual altera fuertemente propiedades como la cinética de disolución del compuesto.

Para los ortofosfatos de calcio, su composición normalmente se determina a partir de la relación *Ca/P* y cuando los sistemas son hidratados, se tiene en cuenta la cantidad de agua. En el caso de apatitas no estequiométricas, la composición se determina por el contenido de hidróxidos. Tanto las apatitas como los Fosfatos de Calcio Amorfos se caracterizan por presentar estructuras no estequiométricas y por la incorporación de iones. Las apatitas no estequiométricas presentan comúnmente relaciones *Ca/P* más bajas de 1.67 (43).

Tabla 1-1: Características generales de los principales Fosfatos de Calcio.

Nombre y Formula Química	**Grupo espacial y parámetros de red**	**Relación Ca/P**
MCPM: Fosfato monocálcico monohidratado $Ca(H_2PO_4)_2.\ H_2O$	Triclínico a=5.6261 b=11.889	0.50
MCPA: fosfato monocálcico anhídrido $Ca(H_2PO_4)_2$	Triclínico a=7.5577 b=8.2531	0.50
DCPD: Fosfato dicálcico dihídratado $CaHPO_4.2H_2O$	Monoclínico a=5.812 b=15.180	1.00
DCPA: Fosfato dicálcico anhídro $CaHPO_4$	Triclínico a=6.910 b=6.627	1.00
OCP: fosfato octacálcico $Ca_{0.8}H_2(PO_4)_6.5H_2O$	Triclinico a=19.692 b=9.523	1.33
α-TCP: fosfato tricálcico alfa $\alpha\text{-}Ca_3(PO_4)_2$	Monoclínico a=12.887 b=27.280	1.50
β-TCP: fosfato tricálcico beta $\beta\text{-}Ca_3(PO_4)_2$	Romboédrico (Hexagonal) a=b=10.439	**1.50**
HA: hidroxiapatita $Ca_5(PO_4)_3OH$	Hexagonal a=b=9.4206	**1.67**
FAp: Fluorapatita $Ca_5(PO_4)_3F$	Hexagonal a=b=9.367	1.67
ClAp: Clorapatita $Ca_5(PO_4)_3Cl$	Monoclínico a=9.628 b=2a	1.67
CO_3Ap: Apatita carbonatada A- CO_3Ap $Ca_{10}(PO_4)_6CO_3$ B- CO_3Ap $Ca_{10}(PO_4)_{6-x}(CO_3)_{3x/2}(OH)_2$	Para A- CO_3Ap Monoclínico a=9.557 b=2a	
TTCP: fosfato tetracálcico $Ca_4(PO_4)_2O$	Monoclínico a=7.023	2.00

(Tomada y adaptada del libro *"Calcium Phosphates in biological and industrial Systems"*) (43).

Los fosfatos de calcio han sido muy utilizados para aplicaciones biomédicas y dentales. Las ventajas de la hidroxiapatita (HA) respecto a los otros fosfatos de calcio, son su estabilidad en condiciones fisiológicas, su biocompatibilidad, bioactividad, osteoconductividad, no toxicidad y que no genera inflamaciones perjudiciales, además de

que su composición es muy similar a la del hueso. Hay estudios que han demostrado que los andamios porosos de hidroxiapatita han presentado mejores resultados en términos de adhesión, proliferación y diferenciación celular de las células del tipo de los osteoblastos, en comparación con la HA denso sinterizado. A su vez, el fosfato tricálcico β-TCP, también proporciona grandes ventajas frente a otros materiales como la alúmina y la zirconia, pues es bioabsorbible, fácilmente asimilable, biocompatible y químicamente similar al componente mineral del hueso y dientes. Aunque la HA suele ser similar al hueso humano receptor, su degradación es más lenta que la del β-TCP, que se absorbe más rápidamente y se sustituye por hueso recién formado, lo que hace que este material sea muy beneficioso en situaciones donde se necesita la pronta degradación (46).

1.6.2 Síntesis de fosfatos de calcio

Existe una gran variedad de rutas que se utilizan para la preparación de fosfatos de calcio como estado sólido, rutas químicas sol gel, precipitación, coprecipitación, hidrotermal, métodos de combustión, entre otros.

Entre los métodos en seco se encuentra el de estado sólido y el mecano-químico. En el primero se obtienen partículas de tamaño micrométrico, con geometrías diversas y porosas y con fases de HA y β-TCP. Es una metodología de bajo costo y que permite ser escalable, sin embargo, se obtienen grandes aglomerados, hay baja homogeneidad composicional y distribución de tamaño de partícula irregular (47). Las rutas en estado sólido se usan frecuentemente para la fabricación de compuestos cerámicos. Para el caso de la metodología mecano-química las partículas que se obtienen son de tamaño nanométrico, son con formas de nano granos o varillas, la fase que predomina es HA, es de bajo costo, permite obtener buena cristalinidad y alta reproducibilidad; su desventaja es que las muestras se pueden contaminar durante la molienda y también se forman grandes aglomerados (48).

Hay diferentes tipos de métodos químicos. En la precipitación se obtienen partículas de tamaños variados entre nanométricos y micrométricos (49) y en la coprecipitación las partículas son nanométricas (50). En general estas rutas son simples y permiten controlar el tamaño de las partículas manejando el tiempo de envejecimiento y la temperatura de

reacción (51). La estructura que se obtiene por esta técnica comúnmente es HA, pero la gran desventaja es que se da aglomeración en los productos y no hay fácil control de los parámetros de reacción.

Por la metodología Sol-gel se da un alto control estequiométrico, las partículas obtenidas son esféricas con tamaño nanométrico y pueden alcanzar hasta algunas micras, las fases principales que se obtienen son HA y β-TCP, pero los procesos solo se pueden hacer a baja escala, los reactivos son costosos y los productos resultan con grandes aglomerados.

Las reacciones hidrotermales se fundamentan en el uso de autoclaves donde se pueda tener un control de la temperatura y la presión, las cuales son condiciones críticas durante la síntesis para los procesos de cristalización y disolución, puesto que pueden acelerarlos para obtener sistemas de contornos de superficies regulares y de tamaños bien definidos. En esta técnica también es importante controlar el pH. Las partículas que se obtienen pueden ser tanto nanométricas como micrométricas y pueden ser de múltiples fases como HA, β-TCP, entre otros. Su gran desventaja es que las producciones son a baja escala y cuando se deben usar surfactantes para el control de los tamaños de partículas, éstos pueden ser costosos (52–55).

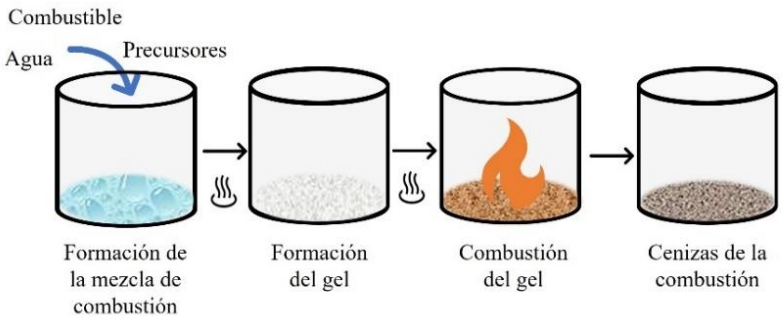
Las técnicas de ***combustión*** son reacciones químicas exotérmicas producto de fenómenos de oxido-reducción entre los precursores de los óxidos deseados (por lo general sales) los cuales dentro de la reacción corresponden a los oxidantes y un reductor que corresponde al combustible empleado. Usualmente los combustibles empleados pueden ser ácido cítrico, glicina, urea, entre otros. En estas reacciones el calor liberado producto de la oxido-reducción entre el combustible y el oxidante permite alcanzar una temperatura conocida como la *temperatura de flama*, la cual afecta a su vez de forma directa o indirecta las propiedades morfológicas finales de los polvos. En esta metodología se da la formación de fases de HA, β-TCP, DCPD y mezcla de fosfatos. El inconveniente es que el control de la morfología es complejo pero los agregados que se forman son nanométricos, además es una metodología de bajo costo, con montajes simples, económica y que permite ser implementada en variedad de aplicaciones avanzadas (56–58).

La ***síntesis por combustión en solución*** es una metodología que ahorra tiempo y energía, en la cual los productos finales que se obtienen son de gran pureza de fase y con

características de polvo superiores como mayor área superficial, distribución de tamaño de partícula estrecha, aglomeración óptima y mejores propiedades de sinterización. Otra gran ventaja es que puede utilizarse con una gran variedad de precursores, tanto solubles como insolubles.

Básicamente, la síntesis por combustión en solución consta de tres pasos principales como son la formación de la mezcla de combustión, la formación del gel y la combustión del gel, como se muestra en la *Figura 1-4*. Los precursores se mezclan en una solución acuosa con un combustible orgánico y se expone al calor. Tras la deshidratación de la solución, se forma una red de gel en la mezcla de combustión. El proceso de combustión entre el combustible y el oxidante, los cuales están conectados en la red de gel, se inicia mediante la fuente térmica. La descomposición del gel debe ser preferiblemente en un solo paso, uniforme, rápida y en un estrecho intervalo de temperaturas para garantizar que no se dé la formación de productos no deseados. Después de unos pocos segundos, se obtiene un polvo esponjoso, en donde las características de éste están relacionadas con los parámetros de síntesis elegidos (59).

Figura 1-5: Esquema de los pasos de la síntesis de combustión en solución.



Nombre de la Fuente: Tomada como referencia de (59), adaptada y traducida por Carolina Duque Uribe.

Mas información del proceso de combustión en solución y de la metodología detallada que se llevó a cabo en esta tesis, se encuentra en el *anexo B*.

1.7 Alúmina

El óxido de aluminio, más conocido como alúmina (Al_2O_3), es uno de los componentes más importantes en la constitución de las arcillas y esmaltes pues confiere propiedades como elevado punto de fusión, dureza y otras propiedades que lo convierten en un material cerámico útil para su uso a nivel industrial. Este material existe en la naturaleza en forma de corindón y de esmeril, la primera es la forma más común de óxido de aluminio cristalino, siendo termodinámicamente más estable.

Comúnmente, a nivel industrial se emplea el método Bayer para producir alúmina a partir de la bauxita (60). Esta última es una roca sedimentaria con un contenido de aluminio relativamente alto, siendo la principal fuente de éste en el mundo. En el proceso Bayer, la bauxita se lava, se pulveriza y se disuelve en hidróxido de sodio a alta presión y temperatura, resultando un líquido el cual contiene una disolución de aluminato de sodio y residuos como hierro, silicio y titanio. Los residuos se dejan depositar en el fondo de los tanques contenedores para ser eliminados posteriormente. La solución de aluminato de sodio clarificada se bombea dentro de un precipitador añadiendo partículas finas de alúmina con el fin de inducir la precipitación de las partículas de alúmina puras, lo que se conoce como proceso de siembra, y una vez que el líquido se enfría, las partículas se depositan en el fondo, se extraen y son sometidas a una temperatura de 1100°C para eliminar el agua contenida, producto de la cristalización. El resultado es un polvo blanco de alúmina pura.

A nivel industrial la alúmina es utilizada de muchas maneras, como aislante térmico y eléctrico, como recubrimiento para evitar procesos oxidativos, para la absorción de agua, entre otros. Además, se sabe que las propiedades fisicoquímicas que posee la alúmina hacen que juegue un papel importante en el uso de ésta para aplicaciones biomédicas. Su alta dureza y resistencia a la abrasión, así como su energía superficial y estabilidad química, la han hecho un excelente material para su uso a nivel biológico sobre todo en temas de regeneración ósea (61).

1.8 Scaffolds en la Ingeniería de Tejidos

La ingeniería de tejidos es un área interdisciplinaria pues engloba conocimientos tanto ingenieriles como de ciencias de la vida, enfocados hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que restauran, reemplazan, mantienen o mejoran las funciones de los tejidos. Entre los 3 principios bajo los cuales funciona este tipo de ingeniería son: reemplazo de células que tienen funciones necesarias, entrega de sustancias inductoras de tejidos, ya sean factores de crecimiento o diferenciación y células que crecen en andamios tridimensionales (62).

Los scaffolds o andamios, vistos desde un enfoque biológico, son implantes con ciertas características necesarias, los cuales sirven como estructura de soporte de células que son sembradas en ellos para permitir que éstas crezcan y generen matriz extracelular y tejidos nuevos (26). El scaffold debe tener alta porosidad y un tamaño de poro adecuado, debe tener un área superficial amplia, en ocasiones debe ser biodegradable y su tasa de degradación debe ser comparable con la del crecimiento del nuevo tejido, debe tener integridad mecánica para mantener la estructura y sobre todo no debe ser tóxico para las células, es decir debe estar hecho con un material biocompatible y la interacción con éstas debe ser positiva para mejorar la adhesión celular, la proliferación y crecimiento, la migración y la diferenciación (62).

La estereolitografía se ha convertido en una alternativa viable para la fabricación de scaffolds dado su potencial para controlar la resolución y fabricar piezas de geometrías complejas. Se conocen trabajos donde se fabrican scaffolds de materiales compuestos polímero-cerámico y completamente cerámicos. Con los materiales compuestos se han utilizado diferentes tipos de partículas para mezclarlas con resinas fotopolimerizables. Dentro de las partículas se cuentan nanotubos de carbono, grafeno, nano silicatos, cerámicas, entre otros. El objetivo de fabricar compuestos es la mejora en propiedades mecánicas, térmicas o eléctricas o incrementar la biocompatibilidad. Es común encontrar el uso de dispersantes para disminuir la viscosidad de las resinas y mejorar la penetración de la luz en el proceso de impresión (63).

Partículas cerámicas como circonia, vidrio bioactivo, alúmina e hidroxiapatita o fosfatos de calcio se han utilizado con los fotopolímeros para mejorar la resistencia mecánica y sobre

todo la bioactividad (63) creando scaffolds con fines biomédicos potenciando ciertas características según las necesidades. Weiguo Bian et al. (64) crearon un scaffold “bifásico” inspirado en el complejo osteocondral con una fase de hueso con una red de canales 3D, una fase de cartílago y una estructura interfase transicional entre el cartílago y el hueso. La composición fue Fosfato tricálcico y colágeno tipo I y se utilizó para su realización una combinación de estereolitografía cerámica y la técnica de *gel casting*. Jin Woo Lee et al. (65) también trabajaron con la mezcla de un polímero (poli (fumarato de propileno)) e Hidroxiapatita para crear, en este caso, una pieza dental. En ambos estudios se reportó que la técnica de estereolitografía es superior a otras para la fabricación de elementos con estructuras muy refinadas. O. Guillaume et al. (66) plantearon un scaffold compuesto de polímero y partículas de tamaño nanométrico de HA. En la investigación comparan diferentes porcentajes de carga cerámica en la resina y descubren que, a mayor carga cerámica, aumentó la hidrofilicidad, la rugosidad de la superficie, las propiedades mecánicas y la biocompatibilidad. En el laboratorio de cerámicos y vitreos de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, se trabajó la técnica de estereolitografía para obtener un scaffold de material hibrido entre una resina comercial de naturaleza acrílica e hidroxiapatita. Se obtuvieron scaffolds con geometría interconectada a los cuales se les observó un comportamiento mecánico en donde las partículas de HA participaban mejorando la resistencia a mayor concentración de éstas. La resina al ser hidrofóbica obligó a que se hiciera un proceso de deposición de plasma para mejorar las condiciones de mojabilidad de la superficie de los scaffolds. Estos, al estar en contacto con la línea celular L929 demostraron ser biocompatibles y bioactivos favoreciendo la proliferación celular lo cual no ocurría con los scaffolds que no tenían partículas de HA (67).

Los materiales cerámicos tienen muchas aplicaciones debido a sus propiedades como dureza, resistencia, buen comportamiento a altas temperaturas, resistencia al choque térmico, gran estabilidad química y ausencia de citotoxicidad (31,34). Sin embargo, siempre ha sido un reto darles forma y procesarlos debido a su fragilidad; además los métodos convencionales de procesamiento cerámico como lo son el prensado, la extrusión o el colado, no permiten producir piezas con altos detalles y precisión, se consume más energía (68) y tiempo, se necesitan moldes y las piezas sinterizadas deben ser mecanizadas finalmente (31).

La implementación de la manufactura aditiva con cerámicos ha sido muchísimo más lenta que con materiales como polímeros debido al problema que se presenta para obtener

piezas con buena resolución (34). Así, la estereolitografía, una de las técnicas de manufactura aditiva más antiguas, surge como solución gracias a la forma en la que trabaja solidificando resinas mediante luz, permitiendo la creación de cuerpos más precisos y detallados. El método se ha adaptado usando una suspensión fotopolimerizable de polvos cerámicos con el líquido de monómeros o resina (32).Con la técnica de estereolitografía se han desarrollado diferentes cuerpos con cerámicos, empleando alúmina, circonia, carburo de silicio, diferentes fosfatos de calcio entre otros (8–11,17,18,31,32,34,69–75).

Uno de los primeros en mencionar la adición de rellenos como vidrios o microesferas cerámicas a una resina cruda fue Fan quien tenía como propósito reducir el parámetro Cd. La adición de partículas haría que la luz se dispersara dando como resultado un decrecimiento en el valor de Cd, aumentando la opacidad de la resina (31). Griffith et al. trabajaron en la dispersión de polvos cerámicos diversos tales como alúmina, sílica y nitruro de silicio en una resina curable en el UV con cargas alrededor del 45-55 vol% (34).

Diferentes autores han abordado el tema de scaffolds basados en alúmina, demostrando que con este material se pueden obtener piezas de alta calidad, bajo coste, buena porosidad y buenas propiedades mecánicas gracias a las microestructuras obtenidas. Di An et al. (68) trabajaron con una carga del 50% en volumen de Al_2O_3 y una mezcla orgánica de acrilamidas. Su proceso fue a través de la técnica de estereolitografía y usaron un tratamiento térmico para eliminar la resina con un posterior sinterizado, permitiendo obtener sus piezas cerámicas adecuadamente. En el caso de António V.M Esteves et al. (16) trabajaron una mezcla de alúmina e hidroxiapatita a diferentes porcentajes con una arquitectura del hueso trabecular fabricados por DLP. La carga cerámica fue del 55% en peso en la resina. Los autores mencionaron que la adición de Hidroxiapatita a las mezclas genera la formación de Hibonita lo que hace que se contrarresten las características a nivel mecánico que da la alúmina, pero favorece la osteoconductividad (61). En general el uso de alúmina se ha incrementado notablemente para ámbitos médicos como alternativa para reemplazar piezas metálicas en componentes femorales o dentales (69) debido a sus buenas propiedades mecánicas, de anticorrosión y estabilidad química, lo cual evita que se disuelva en el medio fisiológico. Sin embargo, este material está limitado por su capacidad de desarrollar una membrana fibrosa no adherente en la interfase cuando se utiliza como material de implante. Además, la bio inercia de la alúmina es una gran desventaja para la fabricación de scaffolds, ya que parece no ser capaz de mejorar la

osteointegración. Algunos estudios mencionan el uso de recubrimientos con hidroxiapatita para mejorar lo anterior (46), o se debería considerar el uso de otro tipo de elementos externos al material cerámico para proporcionar propiedades que quizá solo no posea, como se trabaja en esta tesis, utilizando productos naturales para conferirle mejores propiedades biológicas aprovechando las buenas características mecánicas de la alúmina.

Comparada con la alúmina, la circonia tiene una mayor resistencia a la flexión, una tenacidad mucho mayor, un módulo de Young menor y una capacidad de ser pulida para tener mejor acabado superficial superior. Este material también se ha utilizado con fines médicos gracias a sus características mecánicas y al ser inerte no genera reacciones adversas en el cuerpo (69). Se han utilizado diferentes tipos de circonia como la 3Y-TZP, la ZTA (alúmina circonítrica infiltrada en vidrio) y la Mg-PSZ (circonia parcialmente estabilizada). La Y-TZP (circonia tetragonal estabilizada con itrio) tiene unas propiedades mecánicas más elevadas en comparación con las otras, y en general es la más utilizada con fines biomédicos. Algunas de las limitaciones del Y-TZP son su baja conductividad térmica y su rápida degradación cuando se expone a altas temperaturas, lo que reduce la resistencia y la tenacidad (46). Jong-Hyun Kim et al. (76) realizaron un trabajo en donde crearon piezas dentales a través de la técnica de estereolitografía o proyección digital por láser (DLP) con carga cerámica del 50% en peso. Después de un proceso térmico de degradación del aglutinante y sinterizado, obtuvieron las piezas sin defectos apreciables, con una buena densificación y por ende una alta resistencia a la flexión y alta transmitancia ópticas. La circonia se ha utilizado ampliamente para aplicaciones dentales (69,76,77). Sin embargo, la gran desventaja que poseen los implantes totalmente cerámicos de este material es que, una fracción elevada de partículas cerámicas puede provocar un desgaste excesivo de los dientes naturales opuestos por abrasión (78) y los métodos de fabricación de cerámicas con propiedades deseables y geometrías complejas siguen siendo ineficaces y requieren una gran cantidad de energía (79).

Zhen Wang et al (80) diseñaron scaffolds con porosidad en gradiente, similar al que estudiaron con una sección transversal de fémur natural, que presentaron un buen comportamiento teniendo un módulo elástico comparable al hueso esponjoso, Xiangjia Li et al (81) realizaron un scaffolds con una estructura jerárquica biomimética de poros en este caso utilizando hidroxiapatita (HA) y fosfato tricálcico (TCP), donde las partículas de HA/TCP eran de tamaño nanométrico. Zibo Liu et al (74) también hicieron andamios cerámicos de HA, Laurent Le Guéhennec et al. (82) pellets y scaffolds para estudios *in vivo*

e *in vitro* con HA y fosfatos de calcio bifásicos, Sa Liu et al. (17) prepararon una resina cerámica con una base polimérica de acrilatos comerciales y partículas β-TCP para la creación de scaffolds cilíndricos con poros cuadrados interconectados. En todos estos estudios, se mostraron buenos efectos de biocompatibilidad y proliferación celular. Aunque la técnica de cargar la resina con las partículas cerámicas para llevar a cabo el proceso de curado es actualmente muy utilizada, se han propuesto diferentes trabajos en donde se utiliza la estereolitografía con el fin de crear moldes huecos para colar en ellos la pasta cerámica de composición apatítica y así fabricar piezas menos porosas. T.M. Gabriel Chu et al. (71,83) trabajaron con HA, realizando moldes con diferentes características geométricas para poder hacer las piezas cerámicas que se necesitaban. Inicialmente diseñaron un archivo CAD y después la técnica de STL y llevaron a cabo el molde o pieza hueca de material polimérico de naturaleza epoxi. Una vez terminados éstos, agregaron una resina a base de acrilatos con un 40% en volumen de hidroxiapatita al molde y se curó hasta obtener un sólido. Finalmente, todo el conjunto de molde y pieza con cerámica, lo exponen a un tratamiento térmico en donde la estructura epoxi y el aglutinante de acrilatos son eliminados y las partículas de HA son sinterizadas quedando con la geometría en principio deseada. Las piezas realizadas con canales ortogonales o radiales fueron evaluadas mecánica y biológicamente. Ambos tipos mostraron regeneración ósea normal, sin embargo, la forma general de hueso regenerado era significativamente diferente entre ambas, lo que daba pie para empezar a pensar que controlando la geometría del injerto o andamio que se pusiera, se controla la formación del hueso que se regenerará. Así mismo, Jong Young Kim et al. (84) realizaron satisfactoriamente scaffolds de HA haciendo uso de un molde creado por STL. La pieza polimérica era a base de una resina comercial, posteriormente se inyectaron partículas de HA al cuerpo hueco y se llevó el conjunto completo a un tratamiento térmico para eliminar el polímero y sinterizar la cerámica. Esta metodología les permitió crear los scaffolds cerámicos con buenas propiedades morfológicas.

Varios trabajos se trazan como objetivo el estudio de las estructuras, sus geometrías y cómo éstas influyen biológica y mecánicamente. Chen Jiao et al. (85) investigaron scaffolds con porosidad irregular basados en el polígono Thiessen (Voronoi) que mantuvieron buenas propiedades mecánicas y cuando tienen una irregularidad moderada, la resistencia a la compresión aumentó en un 30% debido a que se evita la concentración de tensiones y se cambia la trayectoria de transferencia de estas. Antonio V.M. Esteves et al. (16)

crearon una suspensión de dos materiales diferentes, Alúmina e HA y realizaron scaffolds con la estructura similar a la de un hueso humano, es decir, con poros irregulares interconectados. Christina Schmidleithner et al. (8) hicieron scaffolds cerámicos también por la técnica de DLP en este caso con fosfato beta-tricálcico (β-TCP) con cuatro geometrías diferentes para compararlas entre sí, obteniendo también buenos resultados y presentando que las estructuras fabricadas de β-TCP pueden tener aplicaciones prometedoras igualmente en la ingeniería de tejidos. Jin-Ho Kang et al. (86) con la fabricación de scaffolds con 3 estructuras diferentes; octaédrica, circular y cuadrada, con poros interconectados, comparando las características entre sí, demostraron que la estructura octaédrica tenía mejores propiedades mecánicas e incluso mostraron que éstas tenían una diferencia notoria en la proliferación y diferenciación celular, lo que indica que un cambio en la estructura geométrica del andamio preparado por el proceso de STL, utilizando biocerámicas, tiene un efecto físico y biológico positivo significativo. Haowen Liang et al. (87) también realizaron la comparación entre 3 estructuras de scaffolds diferentes de HA: una superficie TPMS Schwartz P., una cúbica centrada en el cuerpo y en forma de poro cúbico. Presentando que los tres tipos de scaffolds presentaban propiedades de compresión comparables con las del hueso esponjoso y buenas propiedades de biocompatibilidad.

Además de la composición química que deben tener los scaffolds para que se cumplan todas las características necesarias, una estructura óptima es fundamental, tanto para tener buenas propiedades mecánicas como biológicas (osteoconductividad) (75), como ha sido mencionado. En la búsqueda de geometrías que satisfagan dichas cuestiones, se ha estado investigando una morfología conocida como superficies minimales triplemente periódicas o TPMS en las cuales una señal periódica construye estructuras reticulares tridimensionales mediante la interconexión de una celda unidad. Estas estructuras garantizan, a través de su diseño, una porosidad interconectada y un control del porcentaje de porosidad y del tamaño de estos. Las TPMS tienen dos méritos importantes, por una parte, la estructura completa puede expresarse con precisión mediante funciones matemáticas. Gracias a esto, la porosidad o el volumen de la superficie específica pueden controlarse directamente ajustando los parámetros de la función. Por otro lado, las superficies de los TPMS son muy suaves, sin bordes afilados ni uniones como las de las estructuras reticulares lo cual mejora la proliferación celular (5). Estas configuraciones,

junto con el desarrollo de ellas, a través de la manufactura aditiva, permite la obtención de scaffolds con mayor complejidad favoreciendo la ingeniería tisular en sí misma.

Ihsan Ullah et al. (75), Ya. Yu Filippov et al. (88), Xiang Li et al. (89), Hao Zhu et al. (11), y Xiaolong Huang et al (90) fabricaron scaffolds con geometría giroide (TPMS) usando estereolitografía con fosfatos de calcio obtenidos por diferentes métodos, demostrando en general, que dichas estructuras mostraban alto potencial a nivel biológico ya que inducían correctamente el crecimiento de tejido y la integración con el andamio.

Algunos trabajos recientes, como el publicado por Yue Wang et al. (91) utilizan fosfatos de calcio bifásico de tamaño nanométrico para crear un scaffold con estructura giroide, poros cuadrados interconectados, poros triangulares interconectados y poros circulares interconectados. Con una suspensión con 65% en peso de carga cerámica, estudian los diferentes efectos de dispersión, concentraciones del fotoiniciador y propiedades reológicas. El dispersante óptimo para trabajar fue 9% en peso de BYK111 para la modificación de la superficie de las nanopartículas, la concentración adecuada del fotoiniciador dependió de la dosis de energía y en general los scaffolds presentaron buenas propiedades mecánicas y biológicas. En el trabajo de K. Prem Ananth et al. (92) también trabajan con una cerámica bifásica de fosfatos de calcio para la creación de piezas por estereolitografía utilizando cargas cerámicas de 40 vol% y 9% en peso de Disperbyk (BYK) como dispersante. En este caso las geometrías fueron circulares y tipo concha y se estudiaron los diferentes tipos de sinterizado y se hicieron ensayos biológicos respaldando la aplicación en regeneración ósea. El estudio de la afectación de las muestras en función de la temperatura de sinterizado de éstas, también lo estudiaron Hsuan Chen et al. (93) con suspensiones con fosfatos de calcio bifásicos de 30, 40 y 50 % en peso; y los efectos de las porosidades de las muestras lo han examinado autores como P. V. Evdokimov et al. (94) utilizando geometrías con porosidad en gradiente con suspensiones entre 20 y 30 vol% de fosfatos de calcio.

Aunque se han desarrollado estudios en donde trabajan los fosfatos de calcio como materia prima para realizar piezas cerámicas con fines biológicos, y las TPMS son bastante trabajadas hoy en día, no se ha encontrado ninguna referencia que date que esto se esté desarrollando en Colombia, y sobre todo, los trabajos que hablan de TPMS no ahondan mucho en el tema de la geometría y su influencia a nivel celular, tema tratado en un trabajo

anterior del grupo de materiales cerámicos y vítreos con diferente técnica de manufactura aditiva y diferente material cerámico (5).

2. Obtención de scaffolds cerámicos de alúmina a partir de estereolitografía cerámica con potencial aplicación en regeneración de tejido óseo.

En este capítulo se presenta toda la investigación que resultó del trabajo previo con las partículas de alúmina. Este trabajo se hizo para afianzar la técnica de estereolitografía cerámica antes de llevar a cabo todo el trabajo con fosfatos de calcio y darles solución a los objetivos de esta tesis.

Abstract

Tissue engineering proposes scaffolds as an alternative for the treatment of different diseases and injuries affecting bone tissue. Scaffolds mimic the extracellular matrix so they must be highly porous, with well distributed and interconnected pores. Triple periodic minimal surfaces (TPMS) are structures whose characteristics fit well with these requirements. Ceramic stereolithography 3D printing allows these complex geometries to be precisely obtained using ceramic materials. Alumina (Al_2O_3) is a ceramic material well known for its chemical and mechanical stability properties. The use of alumina in biomedical applications as an alternative to replace metal parts in bone components has been increasing. In this work, a suspension of alumina particles in a light-curing resin is developed in order to be implemented in the printing of ceramic scaffolds with TPMS-type geometries by the ceramic stereolithography technique for possible biomedical applications. The resin used is acrylic in nature and the alumina particles are micrometer sized. The rheological behavior of the suspension was studied with ceramic load percentages of 35, 40 and 50 vol% in order to choose the most favorable conditions for

printing the parts. The three suspensions presented low viscosities, being the 50 vol% sample the one that presented the highest viscosity, with an average value of 0.77 Pa·s. These viscosities were suitable for the ceramic stereolithography printing process. Scaffolds with TPMS Gyroid and Schwartz P. geometry were obtained and morphologically and mechanically characterized before and after sintering. The scaffolds made with the polymer-ceramic combination before sintering showed better compressive strength than the sintered parts. All-ceramic scaffolds with gyroid geometry showed compressive strength values of 0.4 MPa, which is comparable to that of human trabecular bone. The alumina scaffolds with gyroid geometry were impregnated with propolis extracts from the region of Arauca, Colombia in order to evaluate their antimicrobial activity against the standard strains *Staphylococcus aureus* (ATCC 29212) and *Escherichia coli* (ATCC 25922). The scaffolds evaluated showed better antibacterial activity in the case of the *S. aureus* strain. The 50Al scaffolds after sintering were subjected to a degradation test in PBS where the chemical stability of the resin was verified since the samples at days 1, 5, 8 and 12 maintained the initial weight and no significant changes were observed in the percentage of weight loss.

Resumen

La ingeniería tisular propone los scaffolds como alternativa para el tratamiento de diferentes enfermedades y lesiones que afectan el tejido óseo. Los scaffolds imitan la matriz extracelular por lo que son altamente porosos, con poros bien distribuidos e interconectados. Las superficies minimales triplemente periódicas (TPMS) son estructuras cuyas características se ajustan bien a estos requerimientos. La impresión 3D por estereolitografía cerámica permite la obtención de estas geometrías complejas con precisión utilizando materiales cerámicos. La alúmina (Al_2O_3) es un material cerámico bien conocido por sus propiedades de estabilidad química y mecánica. El uso de alúmina en aplicaciones biomédicas como alternativa para reemplazar piezas metálicas en componentes óseos, ha ido en aumento. En esta sección del trabajo se desarrolla una suspensión de partículas de alúmina en una resina fotopolimerizable con el fin de ser implementada en la impresión de scaffolds cerámicos con geometrías tipo TPMS por la técnica de estereolitografía cerámica para posibles aplicaciones biomédicas. La resina

utilizada es de naturaleza acrílica y las partículas de alúmina son de tamaño micrométrico. Se estudió el comportamiento reológico de la suspensión con porcentajes de carga cerámica de 35, 40 y 50 vol% y así escoger las condiciones más favorables para la impresión de las piezas. Las tres suspensiones presentaron viscosidades bajas, siendo la muestra de 50 vol% aquella que presentó mayor viscosidad, con un valor promedio de 0.77 Pa·s. Dichas viscosidades fueron adecuadas para el proceso de impresión por estereolitografía cerámica. Se obtuvieron scaffolds con geometría TPMS Giroide y Schwartz P. los cuales fueron caracterizados morfológica y mecánicamente antes y después del sinterizado. Los scaffolds fabricados con la combinación polímero-cerámico antes del sinterizado presentaron mejor resistencia a la compresión que las piezas sinterizadas. Los scaffolds completamente cerámicos con geometría giroide presentaron valores de resistencia a la compresión de 0.4 MPa, valor que es comparable con el del hueso trabecular humano. Los scaffolds de alúmina con geometría giroide se impregnaron con extractos de propóleos provenientes de la región de Arauca, Colombia con el fin de evaluar su actividad antimicrobiana frente a las cepas estándar *Staphylococcus aureus* (ATCC 29212) y *Escherichia coli* (ATCC 25922). Los scaffolds evaluados presentaron mejor actividad antibacteriana para el caso de la cepa *S. aureus*. Los scaffolds de 50Al después del sinterizado fueron sometidos a una prueba de degradación en PBS en donde se comprobó la estabilidad química de la alúmina ya que las muestras a los días 1, 5, 8 y 12 mantuvieron el peso inicial y no se observaron cambios significativos en el porcentaje de pérdida de peso.

2.1 Introducción

Alrededor del mundo cientos de personas sufren de traumatismos o enfermedades óseas que los obligan a buscar tratamientos en donde se requieren reparaciones o reemplazos del hueso afectado (5). En muchas ocasiones se pueden llevar a cabo autoinjertos, sin embargo, los procedimientos quirúrgicos requeridos son dolorosos para el paciente y se puede comprometer el funcionamiento del órgano o tejido sano, además en muchas ocasiones el tejido extraído para utilizar como sustituto puede ser insuficiente o el tamaño y la forma de este no coincide con el defecto a reparar (6,7). Los injertos provenientes de materiales fabricados sintéticamente surgen como una solución a la necesidad de dichos

reemplazos (7), valiéndose de la ingeniería tisular y medicina regenerativa en la que se ofrecen alternativas para recuperar la función de los tejidos dañados.

La ingeniería de tejidos se estructura mediante tendencias generales y se enfoca en tejidos específicos, como es la regeneración del tejido óseo, que a su vez se sustenta en el uso de biomateriales de origen natural o sintético para llenar defectos, el uso de terapias celulares o biomoléculas concentradas a partir de sangre (como plasma rico en plaquetas u otros) y el uso de andamios tridimensionales para el reemplazo de tejidos. Estas últimas, son estructuras las cuales imitan las características de la matriz extracelular y permiten su incorporación en el cuerpo huésped (5,95–98). Los andamios que se utilizan para la regeneración ósea deben ser porosos y poseer buena estabilidad mecánica para así favorecer la integración con el tejido y la angiogénesis, lo cual es indispensable para la regeneración (8). Los scaffolds pueden ser biodegradables, biocompatibles o inertes, permitiendo la coexistencia entre el material y el tejido nuevo sin afectar el entorno biológico (5). Las propiedades biomecánicas deben ser compatibles con el tejido nativo, por lo que es necesario lograr una relación óptima entre la porosidad, la resistencia mecánica y tamaño de poro para formación del nuevo tejido óseo (8). Así, las geometrías como las superficies minimales triplemente periódicas (TPMS) resultan atractivas para la creación de andamios, ya que tienen un diseño que garantizan una porosidad interconectada y un control adecuado de ésta (99). Se han estudiado los comportamientos de compresión de estas estructuras debido a su porosidad y capacidad de absorber energía (100–103) lo que resulta muy prometedor para aplicaciones en reparaciones del tejido óseo si se logra llegar a un equilibrio entre las propiedades mecánicas propias de la geometría y del tipo de material que se utilice. Además, se ha demostrado que en scaffolds con curvaturas como las obtenidas con este tipo de superficies, el tamaño y la forma de los poros tienen una alta influencia en el rendimiento celular (5). Además, estas estructuras muestran una mayor permeabilidad a los fluidos lo que es beneficioso para el suministro de nutrientes *in vivo* (9).

La manufactura aditiva o impresión 3D facilita la construcción de scaffolds con geometrías tipo TPMS, las cuales tienen un grado de complejidad casi imposible de alcanzar a través de técnicas convencionales de manufactura. Comprende varios métodos con adición de material capa a capa que permite diseñar estructuras porosas e interconectadas y permite tener mayor libertad en la creación de piezas sin necesidad de utilizar moldes o ensambles

adicionales (26,29). Entre las diferentes técnicas de impresión 3D que existen, se destacan la estereolitografía (STL) y la proyección digital de luz (DLP), debido a que tienen ventajas como el alto grado de precisión que se puede alcanzar, los bajos costos de fabricación, los tiempos de ciclos cortos (10) y mayor eficiencia de impresión (9). Estas técnicas consisten en la solidificación de una resina o fotopolímero que se encuentra inicialmente en estado líquido, mediante un haz de laser o la proyección digital de luz por imágenes, con una frecuencia y potencia lumínica concretas, normalmente en el espectro UV. La luz sigue la superficie y su contorno sucesivamente capa a capa solidificando el material hasta tener la pieza tridimensional final (26).

El método de estereolitografía se ha adaptado para hacer piezas completamente cerámicas usando una suspensión de resina fotopolimerizable con polvos cerámicos (32). Inicialmente se propuso la adición de rellenos como vidrios y microesferas de cerámica a una resina cruda, planteando que las partículas dispersas en la resina podrían desviar la luz incidente haciendo que disminuyera la profundidad de curado y aumentando la opacidad (31). El proceso de estereolitografía cerámica (CSTL) cuenta con unos pasos esenciales los cuales son: la preparación de la suspensión resina-cerámica fotopolimerizable, la creación de la pieza, el desaglomerado de la resina y la sinterización del cuerpo verde cerámico. El objetivo es lograr obtener una alta densidad de partículas para poder producir piezas cerámicas con buena integridad dimensional y estructural, por lo cual el contenido de polvo cerámico debe ser lo más alto posible. Se recomienda manejar porcentajes alrededor del 50% en volumen pues de esta forma se mejoran propiedades finales como la porosidad, acelera el proceso de desaglomerado, reduce la contracción en la sinterización y evita deformaciones, lo que permite tener piezas cerámicas sinterizadas densas y homogéneas (31).

Se conocen trabajos donde se fabrican scaffolds de materiales compuestos polímero-cerámico y completamente cerámicos. El propósito de fabricar compuestos es la mejora en propiedades mecánicas, térmicas o eléctricas o incrementar la biocompatibilidad (9,31,32,34,63,69,70,72). La mayoría de los trabajos donde se utiliza la alúmina mezclada con aglutinantes poliméricos para estereolitografía, abordan el estudio de las propiedades mecánicas del objeto resultante, la reología y comportamiento de la suspensión, el efecto en la impresión a causa del tamaño de las partículas, los componentes de la mezcla o las condiciones adecuadas para el desaglomerado de la resina y la sinterización del cuerpo verde (104–110). Dentro de las aplicaciones que se incluyen en las publicaciones se

pueden mencionar como sobresalientes la creación de moldes o prototipos de microcomponentes ingenieriles (107,111). Algunos trabajos realizados acerca de scaffolds con alúmina, demuestran que se pueden obtener piezas de alta calidad, bajo coste, buena porosidad y buenas propiedades mecánicas gracias a las microestructuras obtenidas (16,61,68). El uso de alúmina se ha incrementado para ámbitos médicos como alternativa para reemplazar piezas metálicas en componentes óseos como femorales o dentales (69) debido a sus buenas propiedades mecánicas, de anticorrosión y estabilidad química, lo cual evita que se disuelva en el medio fisiológico. Sin embargo, no hay antecedentes de estudios en donde se desarrollen scaffolds cerámicos totalmente de alúmina con geometrías tipo TPMS a través de la técnica de estereolitografía cerámica y que sean con el propósito de aplicarlos en la regeneración de tejido óseo.

Los scaffolds, como dispositivos implantables, han mostrado ser efectivos en los procesos de regeneración ósea. Sin embargo, se requieren cirugías para su uso, lo cual conlleva a riesgos asociados a contraer infecciones que pueden entorpecer los procesos de cicatrización necesaria en las reparaciones, por lo que resulta de gran interés desarrollar estrategias que logren inhibir bacterias y demás microrganismos que puedan afectar (112). Una estrategia que ha tomado fuerza es la utilización de productos naturales, siendo uno de ellos los propóleos. Éstos son sustancias resinosas producidas por las abejas a partir de diversas ceras, gomas, polen y savia que se encuentran en las plantas que rodean las colmenas y que las utilizan para aislar el frío y proteger de algunas plagas (113). La flora que rodea la colmena influye en las propiedades del propóleo, que varía según la zona geográfica en que se encuentre (114). Algunos propóleos se han descrito como posibles agentes antioxidantes, citotóxicos y con actividad antibacteriana (115,116), además han mostrado eficacia en el control de especies resistentes a terapias antibióticas (117) asociando su actividad antibacteriana a la presencia de fenoles, flavonoides y triterpenos, entre otros (116), lo que los hace muy prometedores para su aplicación en procedimientos asociados a las reparación del tejido óseo.

En el presente trabajo se desarrolla una mezcla de resina acrílica con partículas de alúmina con el fin de ser implementada en la impresión de scaffolds cerámicos con geometrías TPMS Giroide y Schwartz P. por la técnica de estereolitografía cerámica para posibles aplicaciones biomédicas. La resina fue caracterizada y se estudió el comportamiento reológico de la mezcla resina-alúmina, con diferentes porcentajes de carga cerámica, para

verificar que las condiciones reológicas favorecieran la impresión de las piezas. Se obtuvieron scaffolds del compuesto con geometrías Giroide y Schwartz P. de buena calidad. Dichos scaffolds se sometieron a un tratamiento térmico controlado para eliminar la resina y lograr la sinterización de los cuerpos cerámicos. Los scaffolds cerámicos resultantes se caracterizaron morfológica y mecánicamente. La geometría y el porcentaje de carga cerámica que presentaron mejores resultados en la prueba mecánica a la compresión, se seleccionaron para obtener muestras a las cuales, después del tratamiento térmico, fueron sometidas a un proceso de impregnación con extractos de propóleo proveniente de la región de Arauca, Colombia con el fin de evaluar su actividad antimicrobiana frente a las cepas estándar *Staphylococcus aureus* (ATCC 29212) y *Escherichia coli* (ATCC 25922), relacionadas con las infecciones dadas en procesos quirúrgicos de reparaciones tisulares.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Resina y partículas de alúmina

Para la fabricación de los scaffolds por estereolitografía se utilizó una resina comercial Portux Print 3D Model sin pigmentar (New Stetic), la cual se analizó por medio de termogravimetría (TGA) en un equipo TA Instruments Discovery 550 con atmósfera de aire y una rampa de calentamiento de 10 °C/ min hasta 1000 °C, y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) en un equipo Shimadzu IRTracer-100 con un accesorio para medir la transmitancia, antes y después de curar. Los espectros se adquirieron en un rango espectral de 500 - 4000 cm^{-1}. Estos resultados se presentan en un trabajo anterior (67) (Ver *anexo A*).

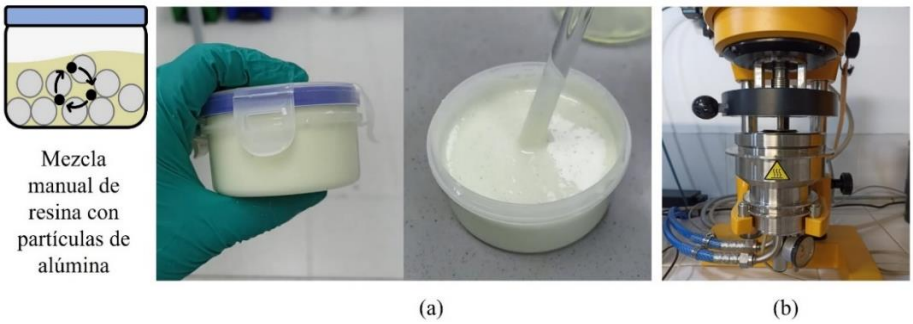
Las partículas de Alúmina que se utilizaron en la suspensión de resina-cerámica que sirve como materia prima en la impresión de las muestras, son comerciales (Nabalox Nabaltec, Schwandorf, Alemania). El tamaño de las partículas se determinó en un equipo Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, USA) con un rango de medición de 0,020 µm a 2000.000 µm. Las partículas se sometieron a análisis de difracción de rayos X (DRX) con un difractómetro de doble círculo Xpert-Pro PANanalytical Radiation Cu- Ka (=0,15406 nm) en un rango de difracción de 0-80° (2θ). Las partículas se des aglomeraron previo a la mezcla con la

resina, en un molino de bolas (Retsch PM 100) tratándolas durante 20 minutos a 250 rpm con intervalos de 5 minutos e inversión de giro.

2.2.2 Suspensión de las partículas de alúmina en la resina

Se trabajaron suspensiones con concentraciones de 35 vol% (35Al), 40 vol% (40Al) y 50 vol% (50Al) de partículas de alúmina en la resina. Se dispuso en un beaker la cantidad de resina requerida para la preparación de cada lote el cual debe ser un volumen suficiente para llenar la cubeta de la impresora en donde se realizó el proceso. A ésta se le adicionaron las partículas poco a poco mientras se mezclaba manualmente (*Figura 2-1 (a)*) en un recipiente plástico con 30 esferas de alúmina de un diámetro de 10 mm durante 10 minutos para homogeneizar la mezcla. Las diferentes suspensiones, al igual que la resina sin carga, se caracterizaron reológicamente mediante curvas de velocidad de cizalladura (Shear rate) vs viscosidad en un reómetro Rheotest (Alemania) con un sistema plato-plato de 36 mm y gap de 1 mm con barrido de tazas de 0 a 100 s^{-1} en 300 s (*Figura 2-1(b)*). A la suspensión 50Al también se le realizó análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) en un equipo TA Instruments Discovery 550 con atmósfera de aire y una rampa de calentamiento de 10 °C/min desde temperatura ambiente hasta 1200 °C, para determinar si se presentaban cambios térmicos cuando la resina contenía la mayor carga cerámica con la que se trabajó. Para ello se utilizó una probeta de 4 mm de diámetro y 1.5 mm de alto, impresa en la misma máquina en que se imprimieron los scaffolds y con los mismos parámetros de impresión.

Figura 2-1: Suspensión de resina – Alúmina. (a) Proceso de preparación de la suspensión y (b) caracterización reológica de la suspensión.



Nombre de la Fuente: Carolina Duque Uribe.

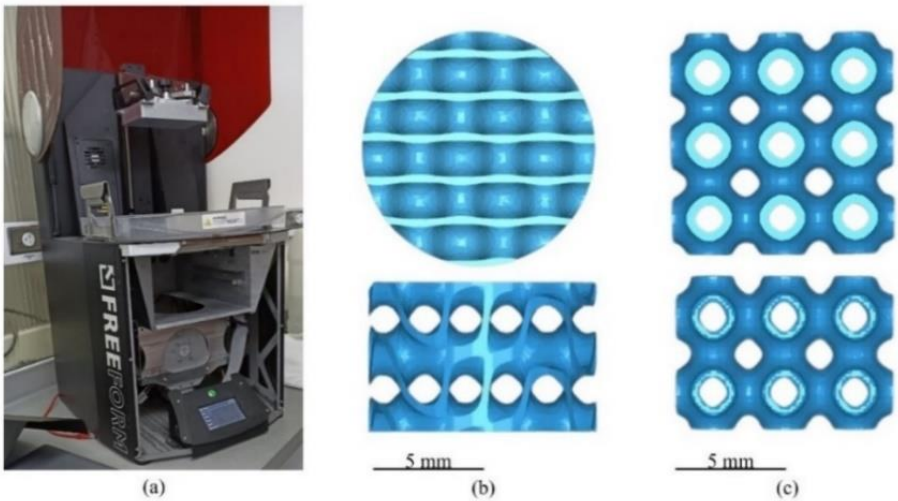
2.2.3 Obtención de los Scaffolds

Para la impresión de los scaffolds por estereolitografía se utilizó una impresora 3D Asiga PICO2HD (Australia) (*Figura 2-2(a)*) que trabaja por procesamiento digital de luz (DLP) con una fuente de luz de longitud de onda de 385 nm. El archivo CAD del prototipo a imprimir, se somete a un proceso de *slicing* o rebanado por capas. Dicha información se le envía a la máquina la cual, a través del uso de máscaras, proyecta cada sección o plano sobre la resina líquida. La plataforma móvil de la máquina se ubica en la parte inferior del eje z sumergida en la cubeta con resina dejando entre ella y el fondo del recipiente un lecho delgado de material que se solidifica cuando la luz incide dando la forma de la capa. La plataforma sube con la resina ya sólida y adherida mecánicamente a ella y vuelve a sumergirse hasta el fondo para repetir el proceso las veces necesarias hasta que se obtenga el objeto con la geometría diseñada (67).

Los parámetros de impresión y el *slicing* fueron configurados por medio del software Asiga Composer, con un grosor de capa de 0,05 mm, un tiempo de exposición de 68 s para las capas inferiores y 15 s para el resto de las capas. Las TPMS seleccionadas para la geometría de los scaffolds fueron una Giroide con forma externa de cilindro de 10 mm de diámetro, 8 mm de alto, y una porosidad del 80.5% y una Schwartz P. con forma externa de cubo de 10 mm de diámetro, 8 mm de altura y una porosidad de 25%. Estas geometrías fueron seleccionadas debido a su buena resistencia a la compresión y su tenacidad (99,101,102) y se presentan en la *Figura 2-2(b-c)*. Las porosidades de ambas estructuras fueron calculadas haciendo uso del software ImageJ con una imagen del modelo CAD en donde se calculó el volumen de material y el volumen de poros. Es importante aclarar que ambas geometrías tienen porosidad macroscópica y microscópica, la porosidad macroscópica es el resultado de tener una geometría tipo TPMS y la porosidad microscópica es propia del material y del proceso del sinterizado del cuerpo verde. En este caso, solo se midió la macroscópica. Los poros interconectados de las estructuras TPMS se pueden describir a través de funciones trigonométricas, y éstos fueron modelados por el software MathMod® en un trabajo previo del grupo de Cerámicos y Vítreos de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín (99). Inicialmente se obtuvo la celda unitaria de cada TPMS, que se replicó en tres dimensiones, 3 veces en los ejes de

coordenadas XY y 2 veces en el eje de coordenadas Z, de modo que las superficies resultantes consistieron en 18 celdas unitarias en total.

Figura 2-2: Impresión de las muestras. (a) Maquina que funciona bajo la metodología DLP utilizada para la impresión de las muestras, con la cubeta adaptada para utilizar bajos contenidos de mezcla. (b) modelo CAD de geometría Giroide, vista superior y lateral. (c) Modelo CAD de la geometría Schwartz P., vista superior y lateral.

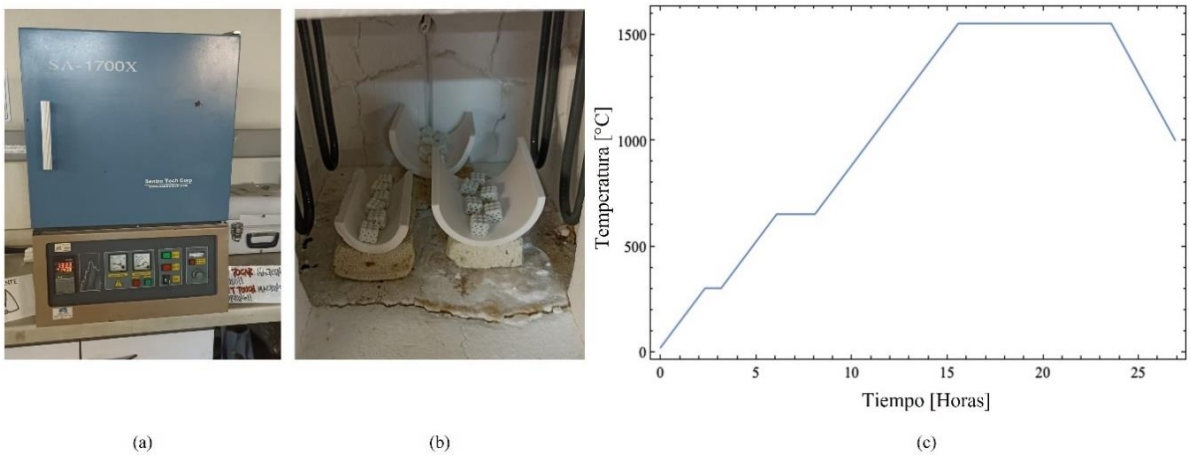


Nombre de la fuente: Carolina Duque Uribe.

2.2.4 Procesamiento posterior de los cuerpos verdes cerámicos

Una vez impresas las muestras, se limpiaron durante 3 minutos en alcohol isopropílico y se les realizó un proceso de post curado con una cámara Anycubic Wash & Cure Plus Machine (Anycubic, China) a una longitud de onda de 405 nm durante 50 minutos. Posteriormente, las muestras se sometieron a tratamiento térmico en un horno SA-1700X, (Sentro tech corp, USA)(*Figura 2-3(a-b)*) para la eliminación de la resina y posterior sinterización del material cerámico. La curva del tratamiento térmico utilizado se puede apreciar en la *figura 2-3(c)*. La temperatura máxima alcanzada fueron 1550 °C y una vez terminado el tiempo del proceso del sinterizado, el enfriamiento fue lento, de acuerdo con las condiciones del horno, hasta alcanzar la temperatura ambiente de 25 °C.

Figura 2-3: Tratamiento térmico de los scaffolds de alúmina. (a) horno utilizado para el tratamiento térmico de desaglomerado de la resina y sinterizado de los cuerpos verdes. (b) Muestra de scaffolds después del proceso térmicos (c) Curva de tratamiento térmico a la que fueron sometidas las muestras de 35Al, 40Al y 50Al.



Nombre de la fuente: Carolina Duque Uribe.

2.2.5 Caracterización de los scaffolds

Los scaffolds con partículas de alúmina antes y después del procesamiento térmico de calcinación de la resina y sinterizado del cuerpo verde, fueron caracterizados por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía de emisión de campo (FESEM). Para la adquisición de las imágenes, las muestras se fijaron en una cinta de grafito, se les realizó un recubrimiento delgado en oro (Au) (DENTON VACUUM desk IV) y se analizaron en el microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM 6490 LV, JEOL, Alemania) en alto vacío para obtener imágenes de alta resolución y en un Microscopio Electrónico de Emisión de Campo Dual (Beam FIB-FESEM, Thermo Fisher Scientific, modelo Socios 2 LoVac), respectivamente. En el SEM se empleó el detector de electrones secundarios para evaluar la morfología y topografía de las muestras y el análisis elemental se realizó mediante una microsonda de rayos X-EDX (INCA PentaFETx3, oxford instruments, UK). En el FESEM se utilizó un detector EDX (UltraDry EDS modelo No: SDBX-30PM-B). Así mismo, los scaffolds antes del sinterizado y después del mismo fueron sometidos a pruebas de resistencia a la compresión en una máquina de ensayos universal (Instron 3366, instron, MA, USA) con un desplazamiento constante de 0.001 mm/s (*Figura 2-4*). Se tomaron

medidas en 5 scaffolds de cada tipo con las mismas condiciones. Para calcular el porcentaje de contracción volumétrica que se dio en los scaffolds después del proceso de sinterizado, se tomaron las dimensiones externas de ambos tipos de scaffolds con un calibrador análogo (Discover tools, china) tanto para muestras antes y después del sinterizado. En los scaffolds con geometría Giroide, se midió el diámetro y el alto y en los scaffolds con geometría Schwartz P. se midió cada lado del cubo. En el CAD también se midió el volumen teórico de material para cada tipo de geometría haciendo uso del software ImageJ, así como los grosores de paredes tanto para el modelo CAD como para los scaffolds impresos y después del sinterizado con las imágenes digitales.

Figura 2-4: Caracterización mecánica de las muestras de alúmina en una máquina de ensayos universal.

Nombre de la fuente: Carolina Duque Uribe.

2.2.6 Impregnación de los scaffolds sinterizados con propóleo

Los scaffolds de 50Al de geometría Giroide impresos y sinterizados fueron impregnados con extracto de propóleo proveniente de Arauca, Colombia, los cuales fueron obtenidos en un trabajo previo del grupo de Cerámicos y Vítreos de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín (116). Para esto, se añadieron 20 µL de extracto etanólico de propóleo sobre la superficie. Los andamios mojados con el extracto se colocaron en una cámara de presión positiva (Wiropress, BEGO, Alemania) durante 5 minutos a 2.4 Bar. La

absorción del extracto por parte del scaffold se confirmó mediante la observación del cambio de coloración del andamio y la revisión de la humedad de una servilleta sobre la cual se encontraban las muestras. Una vez se confirmó que el extracto había sido absorbido, el proceso se repitió hasta que el volumen total impregnado fue de 100 µL.

2.2.7 Evaluación antimicrobiana

Para la evaluación antimicrobiana se utilizaron dos grupos de andamios, los 50Al de geometría Giroide sinterizados impregnados del extracto etanólico de propóleos (50AlSI) y los 50AL sinterizados sin impregnar que fueron utilizados como grupo control (50AlSC). Se realizaron dos tipos de ensayos, viabilidad de Biopelículas mono especie y medición de zona de inhibición. Para ambas pruebas, se esterilizaron todos los grupos de scaffolds exponiéndolos a luz UV durante 30 minutos por cada una de sus caras.

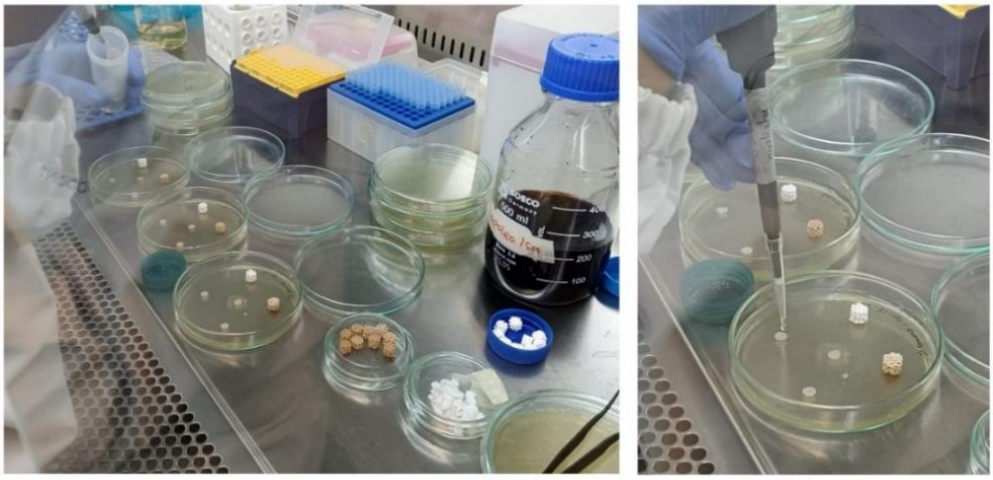
La actividad antimicrobiana se evaluó frente a las cepas estándar *Staphylococcus aureus* (ATCC 29212) y *Escherichia coli* (ATCC 25922) siguiendo el procedimiento descrito por el *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*. Las cepas se inocularon previamente en placas de Petri que contenían Agar Mueller Hinton (Merck, Alemania) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas en una incubadora (Thermo Scientific, USA). Para obtener los inóculos bacterianos, las cepas se cultivaron hasta la fase exponencial en medio *Brain Heart Infusion Broth (BHI*) (Scharlau, Alemania) a 37 °C por 24 horas y se ajustaron diluyendo cultivos frescos hasta alcanzar una turbidez equivalente a 90 NTU (aproximadamente 1.5x108 UFC/mL) (116).

Para las pruebas de inhibición de la formación de biopelículas se utilizaron scaffolds 50AlSI y 50AlSC. Cada grupo se inoculó con 1 mL del inóculo de las cepas respectivas y se incubaron en un plato de 96 pozos durante 24 horas a 37 °C y 5% de CO_2. Tras el periodo de incubación, se realizaron 3 lavados con PBS (Merck, Alemania) para eliminar las bacterias no adheridas y luego se añadieron 100 µL de Bromuro de 3-(4.5-dimetil-2-tiazolil)-2.5-difenil-2H-tetrazolio (MTT) (Merck, Alemania) y 900 µL de medio *BHI* para ser incubados nuevamente por 1 hora a 37 °C y 5% de CO_2 con agitación. Finalizado este tiempo, se retiró la solución de MTT y se añadieron 500 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, USA). Se observaron cambios de coloración y se midió la absorbancia a 550 nm

en un espectrofotómetro (Multiscan Go, Zeiss, Alemania). El experimento se realizó por triplicado.

Para las medidas de la zona de inhibición solamente se trabajó con la cepa de Staphylococcus aureus (ATCC 29212). Se vertieron 20 mL de medio Agar Mueller Hinton en placas de Petri y se inoculó con el inóculo bacteriano (aproximadamente 1.5x108 UFC/mL). Se colocaron los andamios 50AlSI y 50AlSC. Se utilizaron filtros de 5 mm de diámetro con Clorhexidina (Merck, Alemania) y PBS (Merck, Alemania) impregnados, como control positivo (C+) y negativo (C-), respectivamente y con propóleo como control de éste (CP). Tras 24 horas de incubación a 37 °C y 5% de CO_2, se midió la zona de inhibición en mm utilizando el software ImageJ. El experimento se realizó por triplicado.

Figura 2-5: evaluación antimicrobiana. Preparación de prueba de zonas de inhibición.



Nombre de la fuente: Carolina Duque Uribe.

2.2.8 Prueba de degradación

De acuerdo con la norma ASTMF 1635-16, el ensayo de degradación in vitro se realizó para estudiar la pérdida de peso de los scaffolds 50Al giroide, después del proceso de sinterizado, durante 12 días, inmersos en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (pH 7.4, Sigma-Aldrich, USA). Se realizaron mediciones en los días 1, 5, 8 y 12. Cada muestra se sumergió independientemente en 20 mL de PBS en recipientes de polietileno sellados y se guardaron en una incubadora (Thermo Scientific, USA) a 37 °C y 5% de CO_2. Los días

en los que se evaluaron las condiciones de las muestras, se midió el pH de cada recipiente con un pH metro (PH700, Apera, USA), se sacaron las muestras del PBS, se lavaron con agua destilada y éstas se secaron a 30 °C durante 15 minutos en una estufa (Binder, Alemania). Una vez las muestras estuvieron secas, se midió el peso de cada una en una balanza (Adam, Equipment, UK). La pérdida de masa se calculó teniendo en cuenta la ecuación 1. Cada medición en los días seleccionados se realizó por triplicado.

$$Perdida\ de\ masa\ (\%) = \frac{W_0 - W_t}{W_0}\ x\ 100 \qquad \text{Ecuación 2-1}$$

Donde W_0 es el peso de la muestra inicial seca y W_t es el peso de la muestra seca después del tiempo seleccionado.

2.2.9 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media ± desviación estándar (DE). El análisis estadístico se realizó con el programa Minitab Statistical software (Minitab Inc.). Para evaluar la significancia de los grupos experimentales se realizó un Anova multivariado. Un valor $p \leqq 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Las gráficas se realizaron utilizando El sofware Wolfram Mathematica (Wolfram) y en el software Origin (OriginLab corporation).

2.3 Resultados y discusión

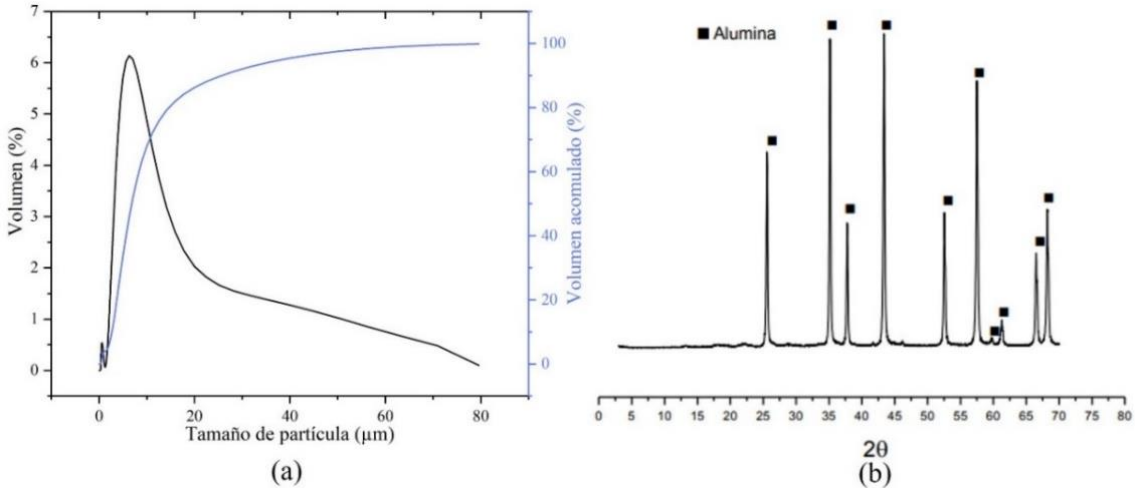
2.3.1 Caracterización del polvo cerámico

La *Figura 2-6(a)* muestra la gráfica resultante de la Distribución de tamaño de partícula (DTP) de las partículas de alúmina utilizadas. En él puede verse que el 90% de las partículas están por debajo de 25.729 µm, el 50% por debajo de 6.842 µm y el 10% por debajo de 2.708 µm. Es importante conocer y controlar el tamaño de partícula ya que para la impresión 3D por la técnica de estereolitografía (STL) o procesamiento digital de luz (DLP), el tamaño medio de las partículas cerámicas o agregados que se añaden al polímero debe ser más pequeño que el espesor de la capa. De lo contrario, la resolución vertical de la pieza se podría ver afectada (31). En este caso, la mayoría de las partículas

tienen un tamaño menor o igual a 25.729 µm, el cual es inferior al tamaño de capa utilizado de 0.05 mm y por lo tanto no afecta la resolución de impresión.

La *Figura 2-6(b)* contiene el difractograma de rayos X de la alúmina utilizada. Se observa que el material corresponde a α alúmina de alto grado de cristalinidad. Los picos característicos de la alúmina α (corindón) con un sistema cristalográfico romboédrico con picos 2θ situados a 28.8°, 35.1°, 37.8°, 43.4° y 57.6°, los cuales se presentan esbeltos y bien definidos

Figura 2-6: Caracterización de las partículas. (a) Distribución de tamaño de partícula de la alúmina. (b) Difractograma de rayos X de la alúmina.



Nombre de la fuente: Carolina Duque Uribe.

2.3.2 Caracterización de la resina y la suspensión

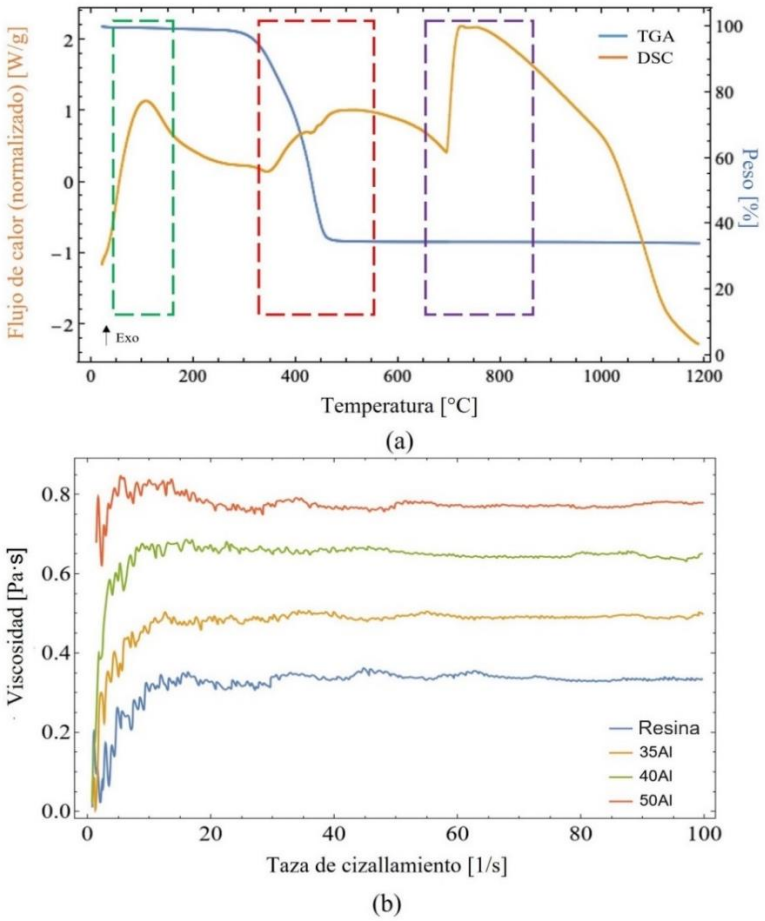
Los resultados y análisis de los FTIR para la resina antes y después de ser curada y del análisis termogravimétrico (TGA), se presentan en un trabajo previo (67) y muestran que la resina utilizada es de naturaleza acrílica presentando un comportamiento termogravimétrico propio de resinas de este tipo. Además, en el TGA, se observa que las mayores pérdidas de masa se presentan entre los 300 y 470°C. La *figura 2-7(a)* muestra la curva resultante del ensayo de TGA y DSC para una muestra de 50Al. En la curva de TGA se puede observar que el fenómeno de pérdida de masa es igual al reportado en (67). Las mayores pérdidas se presentan entre los 300 y los 470°C. A partir de esta temperatura,

las pérdidas son mínimas, casi imperceptibles, se conserva el peso correspondiente a la cantidad de partículas presentes en la probeta estudiada, lo que indica que la resina no sufre cambios al estar en contacto con las partículas, que puedan generar diferencias en el desaglomerado. En la gráfica correspondiente al DSC, se observan tres picos señalados en recuadros punteados. Un pico exotérmico cercano a los 110°C, resaltado con el recuadro verde, se atribuye a reacciones de polimerización que se continúan presentando aún después del proceso de impresión debido al aumento de temperatura. Este resultado coincide con lo presentado por diferentes autores que han trabajado con resinas poliméricas de naturaleza acrílica (118–120). La región exotérmica entre los 300 y los 600°C, resaltada con el recuadro rojo, representa la mayor pérdida de masa de la resina presente en la muestra correspondiente a la degradación del polímero (120,121), tal como indica el TGA en esta misma región. Finalmente, la zona resaltada con el recuadro morado, después de los 650°C exhibe un comportamiento exotérmico que indica que el proceso de descomposición del polímero continúa, sugiriendo que quedan residuos de carbono en la muestra de alúmina después de las temperaturas entre los 300 y 600°C pese a que los cambios en el TGA son mínimos(122).

Las curvas de velocidad de cizalla vs viscosidad de la resina líquida sin carga cerámica y con los diferentes porcentajes de carga cerámica se presentan en la *figura 2-7(b)*. Como se puede observar, las tres mezclas trabajadas y la resina sola presentaron un comportamiento reológico newtoniano. Además, la estabilidad de las mezclas fue de alrededor de una hora, lo cual es suficiente para el proceso de impresión con los parámetros utilizados. Comúnmente, las resinas con mayores valores de viscosidad que se pueden utilizar para imprimir por estereolitografía sin complicaciones alcanzan aproximadamente los 5 Pa·s (26). Además, para que una suspensión de partículas-resina sea apropiada para los procesos de SLA o DLP, su viscosidad debe ser relativamente baja de tal manera que durante la impresión se auto nivele el material en la cubeta de la máquina. Las resinas cargadas con materiales sólidos deben tener viscosidades inferiores a 3 Pa·s (31). El nivel de sólidos debe ser lo más alto posible para mejorar la sinterización del polvo en el cuerpo verde, dando lugar a cuerpos densificados sin una contracción excesiva que pueda causar defectos. Sin embargo, la carga de sólidos no debe causar una viscosidad inadecuada ni cambiar el comportamiento de cizallamiento fino de la suspensión (16). Como se puede observar, la resina sin carga cerámica tiene una viscosidad cercana a los 0.32 Pa·s, siendo considerada una resina de baja viscosidad. Las

muestras de 35Al, 40Al y 50Al tuvieron una viscosidad promedio de 0.48 Pa·s, 0.64 Pa·s y de 0.78 Pa·s, respectivamente. A pesar de que la carga cerámica utilizada fue relativamente alta, de 35, 40 y 50 vol% las viscosidades no aumentan significativamente para afectar las condiciones de impresión. La suspensión 50Al es la que presenta mayor viscosidad, siendo aún inferior a 1 Pa·s y quedando por debajo de las viscosidades reportadas para suspensiones resina-cerámica en la literatura. Además, haciendo un análisis de la capacidad de impresión por estereolitografía con estas mezclas, en ningún caso se presentaron complicaciones para utilizarlas en la máquina DLP. En todos los casos, la resina fluyó con facilidad a medida que se formó una nueva sección y no se hicieron cambios en los parámetros de impresión entre una composición y otra.

Figura 2-7: Caracterización de la suspensión. (a) Análisis termogravimétrico y calorimetría diferencia de barrido de la probeta de 50Al. (b) Curvas de velocidad de cizalla vs viscosidad de la resina líquida sin carga cerámica y con los diferentes porcentajes de carga cerámica.



Nombre de la fuente: Carolina Duque Uribe.

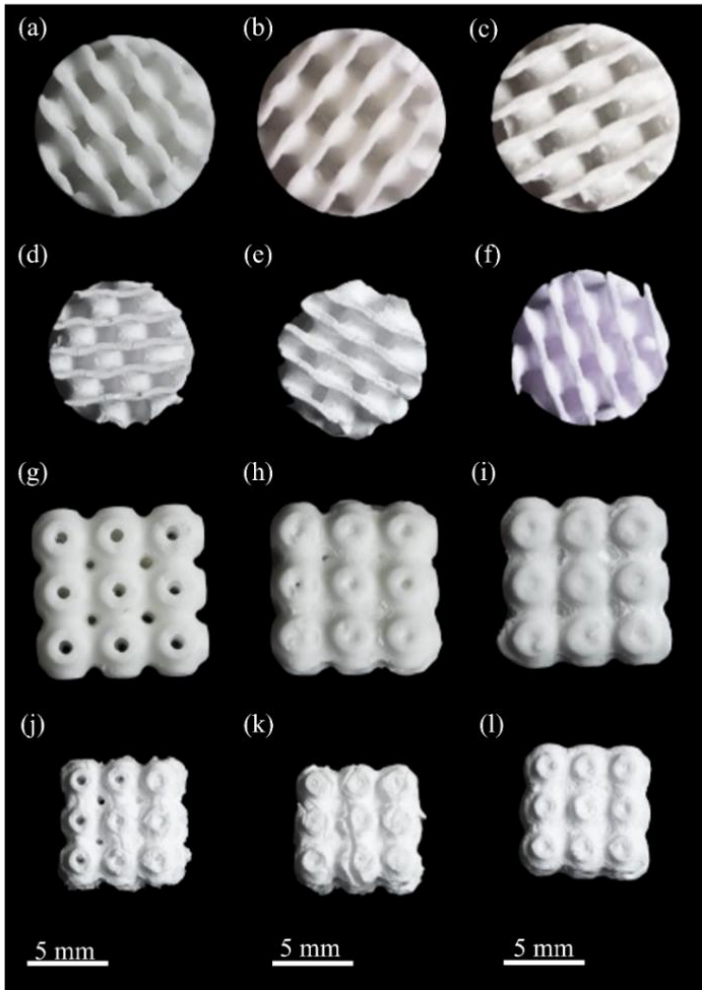
2.3.3 Caracterización de los scaffolds

Los scaffolds obtenidos al final de la impresión por procesamiento de luz digital (DLP) del compuesto polímero-cerámico y después del tratamiento de postcurado y sinterizado, pueden ser observados en la *figura 2-8*. Se imprimieron exitosamente scaffolds cilíndricos con geometría Giroide y scaffolds cúbicos con geometría Schwartz P. con dimensiones de 10 x 8 mm (diámetro/base x altura) en ambos casos. Macroscópicamente no se observan diferencias en la morfología entre los scaffolds del mismo tipo obtenidos con los diferentes porcentajes de partículas y con el modelo CAD (*figura 2-2(b-c)*). Los scaffolds presentan porosidad interconectada y cada geometría tiene el mismo porcentaje de porosidad que el modelo CAD el cual es del 80.5% para la geometría giroide y de 25% para la geometría Schwartz P, dicho porcentaje se conserva en las muestras después del sinterizado. La tonalidad blanca opaca se debe a la alta cantidad de partículas presentes en ellos. Sin embargo, En la *figura 2-8(a-c)* y *(g-i)* se observan mejores acabados en los scaffolds con geometría Giroide que en los de geometría Schwartz P., en donde algunos de los poros, después del proceso de impresión, quedaron obstruidos por resina. La geometría Schwartz P. tiene la característica de que posee mayor volumen de material sólido, de 604.5 mm^3, comparado con la geometría Giroide que tiene un volumen de material de 121.6 mm^3. Es probable que, en las secciones de la base de los scaffolds con geometría Schwartz P., debido a los tiempos de exposición en las capas iniciales que se usan para garantizar la adherencia a la plataforma de la máquina, se manifiesten efectos de sobrecurado. Pese a esto, la geometría se asemeja en su totalidad al diseño del modelo CAD utilizado.

En la *figura 2-8(d-f)* y *(j-l)* se observan los mismos scaffolds después del proceso de sinterizado. Se puede observar una contracción volumétrica debida al tratamiento térmico en el cual la resina desaparece completamente, dichas contracciones se presentan en la *tabla 2-1*. Además, se observó un adelgazamiento en las paredes de los scaffolds antes y después del sinterizado. Los valores de estos grosores también se presentan en la *tabla 2-1.* Se puede apreciar que la mayor contracción fue la de las muestras con 35Al, lo cual era lo esperado, dado que éstas presentan la menor cantidad de partículas y por lo tanto el mayor porcentaje de resina. Pese a que se dan estas contracciones en las diferentes concentraciones, la geometría de poros interconectados propia de la TPMS se conserva sin deformaciones apreciables. Además, se observa que la geometría que más

contracciones volumétricas sufre, independiente de la concentración de carga cerámica que posea, es la Giroide. Esto se debe a que presenta un volumen menor de material comparada con la geometría Schwartz P., por lo cual, se presentan más sitios en la figura geométrica donde las partículas se acercan y forman cuellos en el proceso de sinterización.

Figura 2-8: Fotografías digitales de los scaffolds obtenidos por impresión DLP: Antes del proceso de sinterizado con geometría Giroide (a) 35Al, (b) 40Al, (c) 50Al y después del proceso de sinterizado con geometría Giroide (d) 35Al, (e) 40Al y (f) 50Al. Antes del proceso de sinterizado con geometría Schwartz P. (g) 35Al, (h) 40Al, (i) 50Al y después del proceso de sinterizado con geometría Schwartz P. (j) 35Al, (k) 40Al y (l) 50Al.



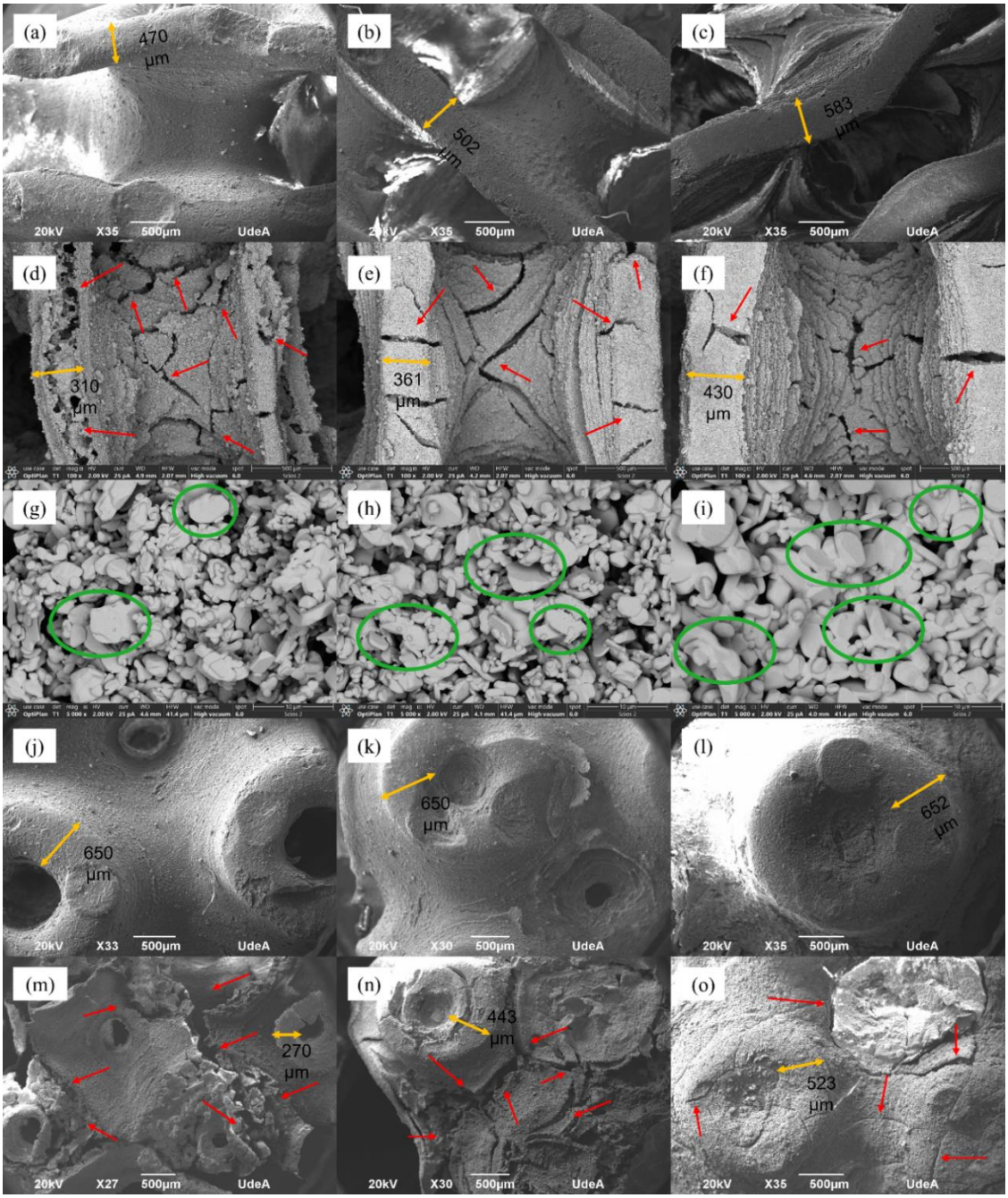
Nombre de la fuente: Carolina Duque Uribe.

Tabla 2-1: Porcentajes de contracciones volumétricas y grosor de las paredes antes y después del sinterizado para los scaffolds giroide y primitiva de 35Al, 40Al y 50Al.

Tipo	Porcentaje Contracciones Volumétricas		Grosor paredes de los scaffolds [µm]			
	Giroide	Schwartz P.	Antes sinterizado		Después sinterizado	
			Giroide	Schwartz P.	Giroide	Schwartz P.
35Al	58.4%	52.3%	473 ± 53	693 ± 50	310 ±11	269 ± 46
40Al	51.4%	41.2%	502 ± 26	627 ± 22	361 ± 11	443 ± 52
50Al	43.5%	33.2%	583 ± 22	607 ± 56	429 ± 20	523 ± 42

En la *figura 2-9* se presentan las imágenes SEM *figura 2-9(a-c, j-o)* y FESEM *figura 2-9(d-i)* de las dos geometrías trabajadas a las diferentes concentraciones de carga cerámica, antes y después del sinterizado. Para el caso de los scaffolds Giroide antes del sinterizado *Figura 2-9(a-c)* no se observan diferencias significativas entre las muestras de distintas concentraciones y con el modelo CAD (*Figura 2-2(b-c)*), las paredes de los scaffolds se ven con un alto contenido de partículas cerámicas, se alcanzan a ver las capas propias del proceso de impresión y no es posible observar la resina que sirve en este caso como aglutinante. Los grosores de las paredes para las muestras antes y después del sinterizado también se muestran en la figura con flechas amarillas. Puede verse que los grosores entre los 3 tipos de concentraciones cambian, siendo los scaffolds con paredes más gruesas aquellos que son 50Al, debido a la alta cantidad de partículas que se tienen en la superficie de las paredes y que influyen directamente en dicha medición. Para los scaffolds de Schwartz P. antes del sinterizado (*figuras 2-9(j-l)*) se puede evidenciar que en el scaffolds 35Al la geometría quedó con los poros formados y sin ningún tipo de deformación, sin embargo, los scaffolds 40Al y 50Al si presentan los poros obstruidos por material, defecto propio del sobrecurado mencionado anteriormente. Para los scaffolds después del proceso de sinterización, en ambas geometrías se evidencian grietas, las cuales se señalan con flechas rojas, como resultado de las contracciones volumétricas que se presentan en ellos. Los scaffolds 35Al de ambas geometrías después del sinterizado (*Figuras 2-9(d)* y *(m)*) son los que presentan mayor cantidad de grietas, siendo el scaffold Schwartz P. el que más defectos muestra. La mayor cantidad de defectos los presenta la geometría Schwartz Primitiva, indicando que los scaffolds que mejor sinterizado tuvieron fueron los de geometría Giroide y de ellos, el que menos grietas presentó fue el de 50Al, en donde los defectos se dieron mayormente en secciones internas curvas de la geometría.

Figura 2-9: Imágenes SEM y FESEM de: Scaffolds Giroide antes del sinterizado (a) 35Al, (b) 40Al y (c) 50Al. Scaffolds giroide después del sinterizado (d y g) 35Al, (e y h) 40Al y (f y i) 50Al. Scaffolds Schwartz P. antes del sinterizado (j) 35Al, (k) 40Al y (l) 50Al. Scaffolds Schwartz P. después del sinterizado (m) 35Al, (n) 40Al y (o) 50Al.



Nombre de la fuente: Carolina Duque Uribe.

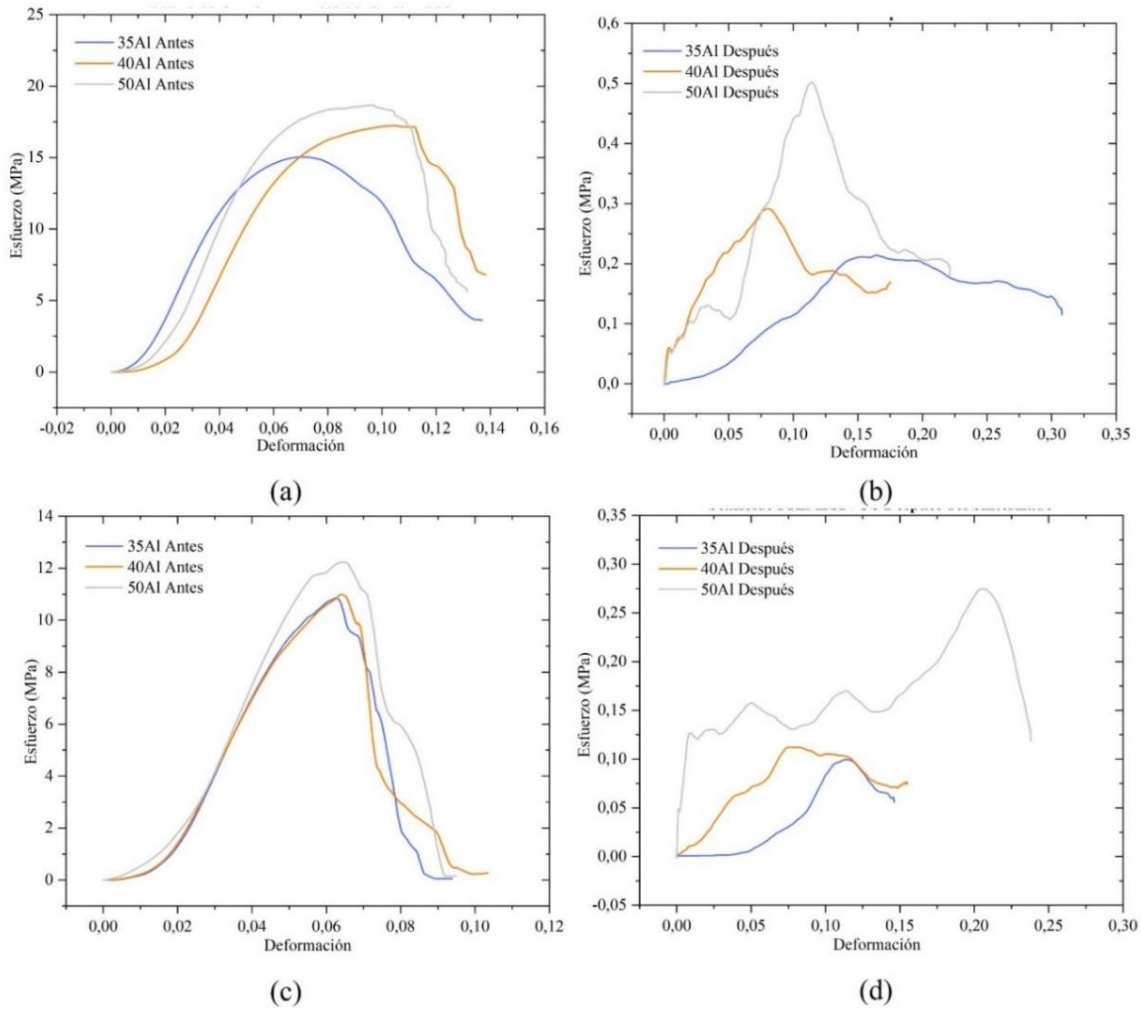
Los scaffolds de geometría Schwartz P. presentan mayor cantidad de defectos después del sinterizado debido a que presentan el mayor volumen de material, por lo que en el momento del desaglomerado de la resina, debe eliminarse mayor cantidad y su extracción genera mayores puntos de tensión, agrietando e impidiendo el correcto sinterizado. Sin embargo, como se muestra en las *figuras 2-9(g-i),* ambas geometrías, presentan cuellos del sinterizado, encerrados en color verde, lo cual muestra que la temperatura a la cual se sometieron los cuerpos verdes fue adecuada para la formación de éstos.

2.3.4 Comportamiento mecánico

En la *figura 2-10* se presentan curvas representativas de los resultados obtenidos de Esfuerzo vs deformación de los scaffolds Giroide y Schwartz P., antes y después del sinterizado en el ensayo mecánico a compresión. Adicionalmente, la resistencia máxima promedio y el Módulo de Young promedio que se obtuvieron para cada tipo de scaffold se encuentran en la *tabla 2-2*. En la comparación estadística entre los scaffolds antes y después del sinterizado se obtuvieron valores p inferiores a 0.05 en los tres tipos de concentraciones, por lo que se puede decir que si hay diferencias significativas en los resultados obtenidos. Los scaffolds fabricados con la combinación polímero-cerámico antes del sinterizado presentaron la mayor resistencia a la compresión (*figura 2-10(a, c)*) y mayores valores del módulo de Young, lo que indica que la carga cerámica se encuentra bien adherida a la resina, le confiere rigidez a las piezas y los cuerpos impresos y curados son íntegros y con baja cantidad de defectos. Después del proceso del sinterizado, los scaffolds totalmente cerámicos (*Figura 2-10(b, d)*), presentaron menores resistencias a la compresión debido, por un lado, a la presencia de fisuras propias del proceso de contracción generado por la eliminación de la resina y, por otro lado, a la fragilidad características de los productos cerámicos. El módulo de Young da cuenta de las propiedades elásticas del cuerpo impreso. Los valores de éste para los cuerpos híbridos son mayores que para los cuerpos cerámicos, efecto directamente relacionado con las características de la resina presente en los cuerpos híbridos y con la fragilidad de los materiales cerámicos obtenidos (123). En los cuerpos cerámicos un menor módulo de Young implica que hay mayores deformaciones ante un esfuerzo efectuado sobre el scaffold indicando menor rigidez en este tipo de material. El tamaño de las partículas de alúmina es de orden micrométrico y al acercarse durante el proceso de sinterización,

producen puntos de contacto relativamente distantes entre éstas, generando espacios vacíos o poros en el cuerpo sinterizado de orden micrométrico o mayores. Ante los esfuerzos, aparecen fracturas que se propagan a través del material cerámico confiriéndole menores resistencias. En los cuerpos híbridos, la presencia de la resina evita o minimiza la cantidad y el tamaño de los poros lo cual confiere a estos materiales mayores resistencias mecánicas y mayores módulos de Young.

Figura 2-10: Curvas representativas de Esfuerzo vs Deformación para los scaffolds con geometría (a) Giroide antes del sinterizado, (b) Giroide después del sinterizado, (c) Schwartz P. antes del sinterizado y (d) Schwartz P. después del sinterizado.



Nombre de la fuente: Carolina Duque Uribe.

Tabla 2-2: Valores de Resistencia máxima a la compresión y Modulo de Young para los scaffolds con geometría giroide y Schwartz Primitiva antes y después del proceso de sinterizado.

Resistencia a la compresión de las muestras con ambas geometrías								
Tipo	**Geometría Giroide**				**Geometría Schwartz P.**			
	Módulo de Young [MPa]		**Resistencia máxima [MPa]**		**Módulo de Young [MPa]**		**Resistencia máxima [MPa]**	
	Antes	**Después**	**Antes**	**Después**	**Antes**	**Después**	**Antes**	**Después**
35Al	248 ± 28	1.2 ± 0.5	13.8 ± 0.9	0.4 ± 0.2	200 ± 44	0.7 ± 0.5	10.9 ± 0.9	0.11 ± 0.03
40Al	213 ± 17	2.0 ± 1.4	15 ± 1	0.26 ± 0.05	216 ± 36	1.1 ± 0.6	10.8 ± 0.4	0.12 ± 0.07
50Al	223 ± 28	5.7 ± 2.9	17 ± 2	0.46 ± 0.06	233 ± 34	2.3 ± 1.9	11 ± 2	0.4 ± 0.1

En la comparación estadística entre ambas geometrías, nuevamente se obtuvieron valores p inferiores a 0.05 para los tres tipos de concentraciones, indicando que si hay diferencias significativas entre la geometría giroide y la geometría Schwartz P. Se puede observar que los scaffolds de geometría Giroide (*Figura 2-10(b)*) presentan una mayor resistencia a la compresión en comparación con los de geometría Schwartz P. (*Figura 2-10(d)*). Esta última. tiene una estructura en donde los agujeros son interconectados a lo largo de los ejes X, Y, Z, lo que hace que sea más propensa a la fractura gracias a su tensión normal altamente concentrada en dichas secciones y a la tensión de cizallamiento durante el periodo de compresión (124). Las cargas que soportan los scaffolds cerámicos con geometría Giroide son mayores debido a que los orificios de la estructura no se encuentran en el mismo plano, al contacto directo de las estructuras vecinas y a la localización alternada de los poros dentro de la geometría haciendo que su deformación se amortigüe y tenga mayores resistencias que la Schwartz P. (102,124). Dichos valores de resistencia mecánica a la compresión, pese a ser bajos, se encuentran dentro de los valores reportados para el hueso trabecular ya que depende del lugar anatómico (16).

2.3.5 Evaluación Antimicrobiana de los scaffolds impregnados con propóleo

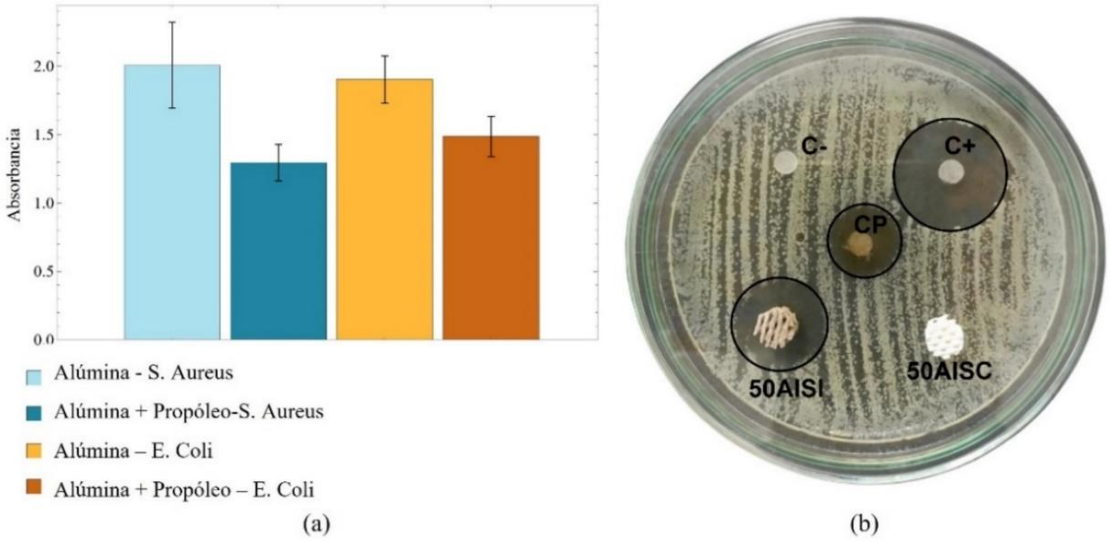
La *figura 2-11(a)* ilustra la viabilidad de las biopelículas formadas por las cepas de *S. aureus* y *E. coli* después de 24 horas. En el análisis estadístico, la comparación entre los

scaffolds control y aquellos impregnados con propóleo frente a ambos tipos de cepas bacterianas, tienen valores p menores a 0.05, por lo que si hay diferencias significativas entre ambas muestras. Estos resultados demuestran que decrece la viabilidad microbiológica de las muestras que están impregnadas con el propóleo (50AlSI) comparadas con aquellas que no poseen propóleo (50AlSC). Para ambos tipos de cepas se puede ver un decrecimiento, sin embargo, es mucho más notorio para la cepa *S. aureus*. En algunos casos, la actividad antibacterial del propóleo contra *S. aureus* se le atribuye a la presencia de Flavonoides, flavones, isoflavones, entre otros (116). El propóleo y sus derivados tienden a afectar la membrana celular de las bacterias, comprometiendo su metabolismo. El propóleo es más eficaz contra las bacterias Gram positivas, como *S aureus*, debido a que este tipo de bacterias no producen una elevada concentración de enzimas hidrolíticas en la membrana, evitando así contrarrestar los efectos del propóleo (125).

Debido a que se presentó una mejor actividad antibacteriana para el caso de la cepa S. aureus, se realizó la medición del halo inhibitorio en ésta. En la *figura 2-11(b)* se puede observar la zona (en mm) mostrando un resultado en donde *S. aureus* presenta gran sensibilidad al propóleo formando un halo alrededor del scaffold impregnado con éste.

Las muestras cargadas con propóleo presentaron halos de 17 ± 4 mm contra *S aureus*, y la muestra sin propóleo no presentó halo. Lo que indica que el propóleo impregnado en el scaffold es el responsable de la inhibición. El halo presente en los scaffolds 50AlSI es significativo y difiere poco del halo formado alrededor de la Clorhexidina, que fue usada como control positivo, la cual presentó halos de 24 ± 4 mm, además los resultados en este ensayo son consistentes con los presentados por algunos autores que reportaron halos de inhibición entre 10 y 14 mm contra *S. aureus* para propóleos provenientes de Brasil (116,126). Cabe destacar que la presencia del propóleo en los scaffolds proporciona efectos adversos y reducción en la biopelícula lo que demuestra su efectividad en cepas multirresistentes como lo es la *S. aureus,* la cual es causante de muchas infecciones durante los procesos de reparaciones tisulares por su facilidad de mutar y su alta resistencia a los tratamientos antibacterianos.

Figura 2-11: Resultados evaluación antimicrobiana. (a) Inhibición de la formación de biopelículas (b) formación de zona de inhibición.



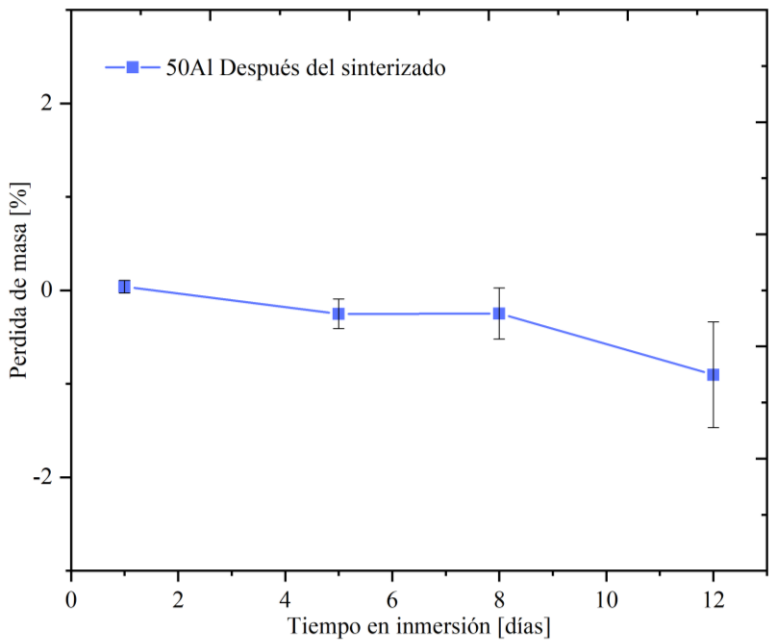
Nombre de la fuente: Carolina Duque Uribe.

2.3.6 Degradación *in vitro*

El comportamiento de degradación in vitro de los andamios de 50Al después del sinterizado se estudió mediante la inmersión en solución PBS durante un periodo de 1, 5, 8 y 12 días. Los resultados de este experimento se presentan en la *Figura 2-12*. Se observó que el porcentaje de pérdida de peso no fue significativo, lo que quiere decir que la tasa de degradación no aumenta en función de los días transcurridos. El porcentaje de pérdida de peso se mantiene alrededor del 0% en los cuatro tiempos en que se realizaron mediciones. Dicho resultado es comparable con trabajos en donde la adición de polvos de alúmina a materiales compuestos biodegradables retrasa la degradación de éstos (127,128). En este caso, al tener un material únicamente de alúmina, se evidencia si estabilidad química la cual hace que en los tiempos establecidos no se perciban efectos de degradación. Esta estabilidad, hace prometedor el uso de alúmina en reparaciones esqueléticas (61). Se pueden observar pequeñas ganancias de peso las cuales son insignificantes dentro del rango de desviación presentado, Sin embargo, esto puede deberse al intercambio iónico con el medio circundante, generando una deposición de sales del PBS sobre la superficie que pueden quedar retenidas en los poros del material,

presentando esta fluctuación en los valores de masa. Este fenómeno también fue reportado por (129).

Figura 2-12: Pérdida de peso de los scaffolds 50Al después del sinterizado en función del tiempo de remojo en PBS.



Nombre de la fuente: Carolina Duque Uribe.

2.4 Conclusiones

En el presente trabajo se desarrollaron scaffolds con geometría TPMS Giroide y Schwartz P. a través de la técnica de impresión 3D de procesamiento digital de luz (DLP) con una resina comercial de naturaleza acrílica y cargada con partículas de alúmina al 35 vol%, 40 vol% y 50 vol%. La resina presentó un comportamiento típico de una resina acrílica en el ensayo de TGA y tanto la resina como las suspensiones con los diferentes porcentajes de partículas, presentaron viscosidades bajas y adecuadas para el proceso de impresión. Los scaffolds obtenidos se sometieron a un tratamiento térmico que resultó exitoso tanto en el proceso de eliminación de la resina que sirve como aglutinante de las partículas, como para la sinterización de estas, obteniendo cuerpos cerámicos densos de geometría compleja, que conserva la forma establecida en el diseño CAD, la cual cumple con las

necesidades específicas para ser utilizadas en la regeneración de tejidos. Se obtuvieron fotografías digitales de los scaffolds antes de la sinterización y después de la misma calculando en ellas las contracciones volumétricas típicas del proceso sin que se vieran afectadas las geometrías, demostrando que aquellas muestras con mayores contracciones son las que tienen menor carga cerámica (35Al) o así mismo, mayor cantidad de resina. Se observaron las imágenes tomadas con SEM y FESEM en donde se mostró que los scaffolds después del proceso de sinterización presentan grietas generadas durante el tratamiento térmico, siendo los scaffolds con geometría Schwartz P. los que presentan mayor cantidad de defectos de este tipo. La mayor cantidad de grietas se atribuyen a las tensiones concentradas en las zonas de los poros interconectados, las cuales también son responsables de hacer que estos scaffolds tengan menores resistencias mecánicas a la compresión. Dichas grietas son propias del proceso de eliminación de la resina y sinterizado de las partículas, pues se generan tensiones en el cuerpo con la salida del material polimérico. La buena respuesta a la compresión por parte de los scaffolds del material compuesto resina-cerámica, potencia el uso de estos cuerpos impresos en aplicaciones en las que se requieren similares cargas mecánicas, ya sean piezas estructurales de componentes biológicos o en otros campos ingenieriles. Los scaffolds cerámicos que mejor respuesta mecánica presentaron fueron los de la geometría Giroide, así que éstos fueron impregnados exitosamente con un extracto de propóleo proveniente de Tame, Arauca, Colombia. Los scaffolds impregnados fueron evaluados en cuanto a su actividad antimicrobiana, demostrando que existe una mejor respuesta frente a *S. aureus* que frente a *E. Coli*. Finalmente, la prueba de degradación, sumergiendo los scaffolds cerámicos 50Al, demostró la estabilidad química de la alúmina pues durante los días de ensayo no se observaron cambios significativos en el peso, haciendo que los porcentajes de pérdida de peso se mantuvieran iguales durante toda la prueba.

La obtención de cuerpos cerámicos por medio de la técnica de estereolitografía cerámica, con geometrías complejas, imposibles de obtener por los métodos de procesamiento tradicional, abre grandes posibilidades para aplicaciones de materiales cerámicos en áreas donde la forma geométrica de los cuerpos cerámicos sea decisiva para su aplicación. En el área de biomateriales, obtener cuerpos cerámicos densos de alúmina con geometrías complejas potencia la estereolitografía cerámica como una técnica apta para la obtención de partes del cuerpo geométricamente complejas que requieran altas prestaciones mecánicas y de estabilidad química.

3. Obtención de scaffolds cerámicos biocompatibles de fosfatos de calcio a partir de estereolitografía cerámica

En este capítulo se presenta toda la investigación realizada con las partículas de fosfatos de calcio, dando solución a los objetivos general y específicos planteados en esta tesis.

Abstract

Bone fractures and degenerative diseases are the most common clinical problems associated with the skeletal system and most of them require surgery for repair, which requires the use of implantable devices of customized sizes and shapes. These are based on scaffolds, which are structures that mimic the characteristics of the extracellular matrix of the affected organs or tissues and allow their incorporation into the host organism. They must have high and well-distributed porosity and interconnected pores to facilitate cell penetration, nutrient diffusion, and vascular growth. Triple periodic minimal surfaces (TPMS) are geometries that are emerging as suitable for use as scaffolds. In addition, the use of materials similar to the composition of bone, such as calcium phosphates, is suggested to facilitate their adaptation in the body and improve biocompatibility and bioactivity. 3D printing by stereolithography and digital light processing are techniques that facilitate obtaining ceramic bodies with these geometries, offering advantages such as greater precision and efficiency. In this work, calcium phosphate ceramic scaffolds were developed by the ceramic stereolithography technique, using TPMS-based designs, to be potentially used in bone tissue regeneration. The resin used is acrylic in nature and the

calcium phosphate particles were synthesized by self-combustion obtaining mostly hydroxyapatite and β-TCP phases of micrometer size. Resin suspensions were obtained with 35, 40 and 50 vol% loading of micrometer-sized calcium phosphate particles and dispersant at 10 w% with respect to particle weight. The dispersions were rheologically characterized to ensure viscosities suitable for 3D printing. The 50 vol% suspension had the highest viscosity. The three types of mixtures were used for ceramic stereolithography printing of scaffolds with TPMS gyroid geometry obtaining green bodies which were morphologically and mechanically characterized before and after sintering. Volumetric shrinkages were measured for each type of batch, morphological characteristics were evaluated through digital images and FESEM images and their mechanical resistance to compression was studied. Scaffolds made with the polymer-ceramic combination before sintering showed better compressive strength than sintered parts. All-ceramic scaffolds with gyroid geometry showed compressive strength values up to 0.9 MPa, which is comparable to that of cancellous and cortical bone. The scaffolds that presented the best results were those with 50 vol% of calcium phosphates, for which they were subjected to degradation tests in PBS as well as to an impregnation with ethanolic extract of propolis from Arauca, Colombia to perform biological analysis with cells of the L929 cell line and to observe cell proliferation on the samples. The results obtained enhance the ceramic stereolithography technique as suitable for obtaining scaffolds with optimal characteristics as a potential application in the regeneration or repair of bone tissues.

Resumen

Las fracturas óseas y las enfermedades degenerativas son los problemas clínicos más comunes asociados al sistema óseo y la mayoría de ellos requieren cirugía para su reparación, lo que exige el uso de dispositivos implantables de tamaños y formas personalizados. Éstos se basan en andamios, que son estructuras que imitan las características de la matriz extracelular de los órganos o tejidos afectados y permiten su incorporación al organismo huésped. Deben tener una porosidad elevada y bien distribuida, y poros interconectados para facilitar la penetración celular, la difusión de nutrientes y el crecimiento vascular. Las superficies minimales triplemente periódicas (TPMS) son geometrías que se perfilan como adecuadas para su uso como andamios.

Además, se sugiere utilizar materiales similares a la composición del hueso, como los fosfatos de calcio, para facilitar su adaptación en el organismo y mejorar la biocompatibilidad y la bioactividad. La impresión 3D por estereolitografía y el procesado digital de la luz son técnicas que facilitan la obtención de cuerpos cerámicos con estas geometrías, ofreciendo ventajas como una mayor precisión y eficiencia. En este trabajo se desarrollaron andamios cerámicos de fosfato cálcico mediante la técnica de estereolitografía cerámica, utilizando diseños basados en TPMS, para ser potencialmente utilizados en la regeneración de tejido óseo. La resina utilizada es de naturaleza acrílica y las partículas de fosfatos de calcio fueron sintetizadas por autocombustión obteniendo mayormente fases de hidroxiapatita y β-TCP de tamaño micrométrico. Se obtuvieron suspensiones de resina con carga del 35, 40 y 50 vol% de partículas de fosfatos de calcio de tamaño micrométrico y dispersante al 10 w% respecto al peso de partículas. Las dispersiones se caracterizaron reológicamente para garantizar viscosidades adecuadas para impresión 3D. La suspensión de 50 vol% fue la que presentó mayor viscosidad. Los tres tipos de mezclas se utilizaron para la impresión por estereolitografía cerámica de andamios con geometría TPMS giroide obteniendo cuerpos verdes los cuales fueron caracterizados morfológica y mecánicamente antes y después del sinterizado. Se midieron las contracciones volumétricas para cada tipo de lote, se evaluaron las características morfológicas a través de imágenes digitales e imágenes FESEM y se estudió su resistencia mecánica a la compresión. Los scaffolds fabricados con la combinación polímero-cerámico antes del sinterizado presentaron mejor resistencia a la compresión que las piezas sinterizadas. Los scaffolds completamente cerámicos con geometría giroide presentaron valores de resistencia a la compresión hasta de 0.9 MPa, valor que es comparable con el del hueso esponjoso y cortical. Los scaffolds que presentaron mejores resultados fueron los del 50 vol% de fosfatos de calcio, por lo cual fueron sometidos a pruebas de degradación en PBS, así como a una impregnación con extracto etanólico de propóleo proveniente de Arauca, Colombia para realizar análisis biológicos con células de la línea celular L929 y observar la proliferación celular sobre las muestras. Los resultados obtenidos potencian la técnica de estereolitografía cerámica como adecuada para la obtención de andamios con características óptimas como potencial aplicación en la regeneración o reparación de tejidos óseos.

3.1 Introducción

En el mundo hay cientos de personas que sufren de traumatismos y enfermedades óseas que requieren tratamientos, reparaciones parciales o incluso sustituciones completas las cuales son complejas y altamente costosas (5). Una de las soluciones que la medicina ha planteado es el uso de autoinjertos. Sin embargo, se puede comprometer el funcionamiento del órgano o tejido sano, el ciclo de producción y obtención es largo, e incluso, en algunos casos, la cantidad de injerto extraído es insuficiente o el tamaño y la forma del hueso autógeno no coincide con el defecto (6,7). Por ello la ciencia ha puesto su empeño en desarrollar tratamientos y técnicas novedosas que hagan posible la regeneración de tejido óseo, tales como el uso de materiales que permita la obtención de dispositivos implantables con características similares al hueso en cuanto a propiedades mecánicas, biocompatibles, entre otras (8,130).

Los dispositivos implantables, denominados andamios, requieren una estructura porosa con tamaño adecuado e interconexión entre los poros para permitir la migración celular, la vascularización, el flujo de oxígeno y nutrientes y la eliminación de desechos. Además, debe contar con la capacidad de mantener el soporte de cargas, que es una de las principales funciones del tejido óseo (8). Para cumplir con los requerimientos de los andamios, se han estudiado geometrías basadas en superficies minimales triplemente periódicas (TPMS) ya que, gracias a su diseños, garantizan la porosidad interconectada y el control de esta, además han demostrado que gracias a la curvatura que poseen tienen gran influencia en el rendimiento celular y favorecen la permeabilidad de los fluidos (5,9). Entre las estructuras tipo TPMS más conocidas se encuentra la Giroide. Ésta tiene la característica de que separa el espacio en dos laberintos de pasajes opuestos y congruentes (124), lo cual puede dar una buena resistencia mecánica y modulo elástico comparable con el hueso esponjoso natural. Las células que son sembradas en las estructuras tipo Giroide, muestran mejor viabilidad celular comparada con otras geometrías TPMS ya que su diseño permite que las células penetren más libremente y que el medio fluya mejor a través de sus porosidades (5,131).

Geometrías como las TPMS son prácticamente imposibles de obtener por técnicas de manufactura convencionales. Por esa razón, la manufactura aditiva o impresión 3D

constituye una herramienta estratégica ya que con su construcción capa a capa facilita la creación de piezas con formas complejas (132). La estereolitografía (STL) y el procesamiento digital por luz (DLP), resaltan entre todas las técnicas de impresión 3D, ya que permiten obtener piezas con un alto nivel de precisión y mayor eficiencia (9) haciéndolas prometedoras para obtener scaffolds destinados a la regeneración ósea. Estos sistemas utilizan una resina fotocurable, que capa a capa se polimeriza por exposición a la luz. El sistema DLP garantiza la irradiación de luz simultánea en toda la sección transversal deseada, lo que reduce el tiempo de procesamiento en comparación con la STL que ilumina con láser (8). En estas técnicas la resina fotocurable puede ser modificada, agregándole partículas cerámicas, con el fin de obtener piezas híbridas (polímero/cerámico) o completamente cerámicas. En este último caso las partículas serán rodeadas por el polímero reticulado en la impresión. Una vez impreso el cuerpo verde, éste se lleva a un tratamiento térmico para desaglomerar la resina y sinterizar el cerámico (91,133). Es importante evitar la formación de grietas en el proceso térmico, así que se deben usar altas cargas de sólidos, teniendo en cuenta que se debe controlar cuidadosamente la viscosidad para que no se vea afectada la autonivelación en el proceso de impresión. Se ha demostrado que las partículas cerámicas de tamaño nanométrico son beneficiosas para mejorar las propiedades mecánicas de la pieza final, pero presentan más dificultades en la preparación de la mezcla, ya que tienen una elevada superficie específica y mayor facilidad para aglomerarse (91).

Entre los materiales utilizados con el objetivo de fabricar andamios para la reparación ósea, se incluye una amplia gama de materiales cerámicos, poliméricos y compuestos (134). Generalmente, dependiendo de la habilidad de estimular el tejido óseo, los materiales se clasifican en bioinertes o bioactivos; en estos últimos se incluyen polímeros naturales como el colágeno, cerámicos como los fosfatos de calcio o vidrios bioactivos (45). Los fosfatos de calcio han demostrado tener un gran potencial ya que son biocompatibles, tienen un buen rendimiento, algunos tienen capacidad de degradación (11), cuentan con buena estabilidad mecánica, además tienen una composición muy similar al tejido óseo lo que favorece la adhesión y proliferación celular y promueve la mineralización (10).

Los scaffolds, como dispositivos implantables, han mostrado ser efectivos en los procesos de regeneración ósea. Sin embargo, se ha estudiado la adición de compuestos naturales para conferirles propiedades que el material del scaffold no podría brindar como actividad antibacteriana o potenciar las propiedades de biocompatibilidad y bioactividad. Los

propóleos se han utilizado para el tratamiento de muchas enfermedades y reparaciones quirúrgicas debido a su actividad biológica (135). Éstos son sustancias resinosas producidas por las abejas a partir de diversas ceras, gomas, polen y savia que se encuentran en las plantas que rodean las colmenas y que las utilizan para aislar el frío y proteger de algunas plagas (113). La flora que rodea la colmena influye en las propiedades del propóleo, que varía según la zona geográfica en que se encuentre (114). Algunos propóleos se han descrito como posibles agentes antioxidantes y con actividad antibacteriana (115,116). También pueden considerarse como antiinflamatorios y restauradores de tejidos, ayudando en las curaciones de heridas y son buenas alternativas para la regeneración de tejidos (135–137).

En el presente trabajo se desarrolló una mezcla de resina acrílicas con partículas de fosfatos de calcio, haciendo uso de un dispersante, con el fin de ser implementada en la impresión de scaffolds cerámicos con geometría TPMS giroide por la técnica de estereolitografía cerámica para posibles aplicaciones biomédicas. La resina fue caracterizada y se estudió el comportamiento reológico de la mezcla resina-fosfatos de calcio, con diferentes porcentajes de carga cerámica, para verificar que las condiciones reológicas favorecieran la impresión de las piezas. Se obtuvieron scaffolds del compuesto con geometrías Giroide de buena calidad. Dichos scaffolds se sometieron a un tratamiento térmico controlado para eliminar la resina y lograr la sinterización de los cuerpos cerámicos. Los scaffolds cerámicos resultantes se caracterizaron morfológica y mecánicamente. El porcentaje de carga cerámica que presentó mejores resultados en la prueba mecánica a la compresión se seleccionó para obtener muestras que después del tratamiento térmico, fueron sometidas a pruebas de degradación y a un proceso de impregnación con extractos de propóleo proveniente de la región de Arauca, Colombia con el fin de evaluar la citotoxicidad y proliferación de la línea celular L929 en éstas.

3.2 Materiales y métodos

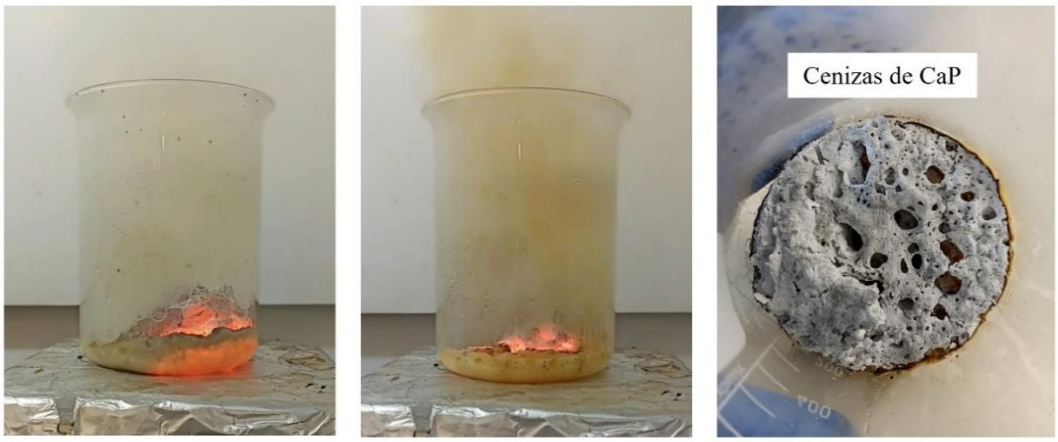
3.2.1 Resina y partículas de fosfatos de calcio

Para la fabricación de los scaffolds por estereolitografía se utilizó una resina comercial Portux Print 3D Model sin pigmentar (New Stetic), la cual se analizó y caracterizó en un

trabajo previo (67) (Ver *anexo A*) por medio de Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y termogravimetría (TGA), en un equipo TA Instruments Discovery 550 con atmósfera de aire y una rampa de calentamiento de 10 °C/min hasta 1000 °C, y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) en un equipo Shimadzu IRTracer-100 con un accesorio para medir la transmitancia, antes y después de curar. Los espectros se adquirieron en un rango espectral de 500-4000 cm^{-1}.

Las partículas de fosfatos de calcio, que se utilizaron en la suspensión de resina-cerámica usada para la impresión de las muestras, fueron sintetizadas por el método de autocombustión (*figura 3-1*) siguiendo el procedimiento experimental presentado en un trabajo anterior (138) (Ver *Anexo B*). Nitrato de calcio tetrahidratado $Ca(NO_3)_2 4H_2O$ (Merck) e Hidrógeno Fosfato di amónico $(NH_4)_2HPO_4$ (Alfa Aesar) fueron usados como materias primas precursoras de calcio y fosforo, respectivamente. Como combustible se utilizó Glicina $C_2H_5NO_2$ (Merck) y como catalizador se utilizó ácido nítrico HNO_3. A diferencia del procedimiento presentado en (138), las cenizas no fueron tratadas térmicamente, sino que fueron utilizadas directamente para las mezclas e impresión. A éstas se les hizo un macerado manual durante 5 minutos y un proceso de desaglomerado en un molino de bolas (Retsch PM 100) tratándolas durante 15 minutos a 250 rpm con intervalos de 5 minutos e inversión de giro. Las partículas se caracterizaron estructuralmente por medio de difracción de Rayos X con un difractómetro de doble círculo Xpert-Pro PANanalytical Radiation Cu-Ka (λ=0,15406 nm) en un rango de difracción de 10° a 50° (2θ) y se midió su tamaño de partícula, tomando imágenes por microscopía de emisión de campo (FESEM) para analizarlas posteriormente en el software de ImageJ y hacer un recuento estadístico de 200 partículas. Para la adquisición de las imágenes, las muestras se fijaron en una cinta de grafito, se les realizó un recubrimiento delgado en oro (Au) (DENTON VACUUM desk IV) y se analizaron en un Microscopio Electrónico de Emisión de Campo Dual (Beam FIB-FESEM, Thermo Fisher Scientific, modelo Socios 2 LoVac).

Figura 3-1: Proceso de síntesis por autocombustión o combustión en solución realizado.

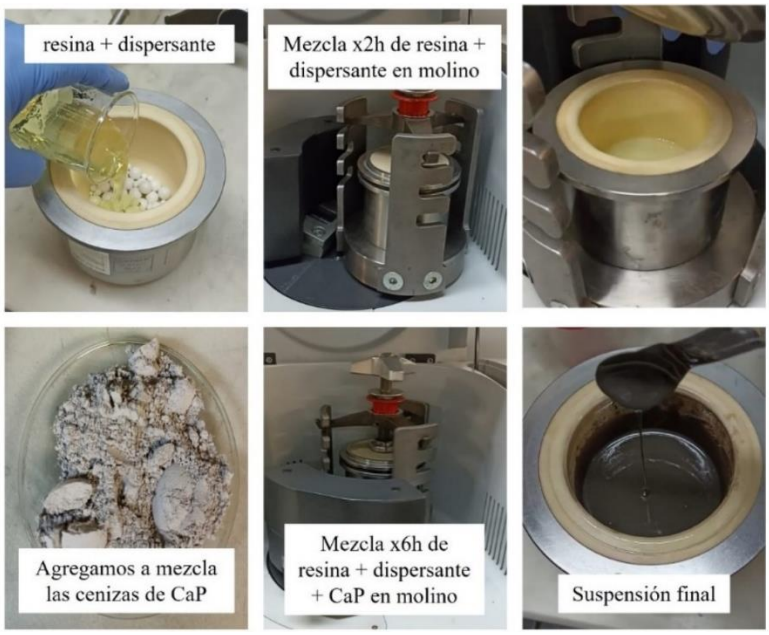


Nombre de la fuente: Carolina Duque Uribe.

3.2.2 Suspensión de las partículas de fosfatos de calcio en la resina

Se trabajaron suspensiones con concentraciones de 35 (35CaP), 40 (40CaP) y 50 (50CaP) vol% de partículas de fosfatos de calcio (cenizas). Para la preparación de cada lote se realizó un proceso de 6 horas de mezcla en dos secciones con un molino de bolas (Retsch PM 100). La primera sección fue la mezcla de la resina comercial Portux Print 3D Model sin pigmentar (New Stetic) con un dispersante Disperbyk-167 (Altana) al 10 w% respecto a la carca cerámica a utilizar en cada bache, durante 2 horas a 250 rpm con pausas de 30 s en intervalos de 5 minutos con inversión de giro. Finalizadas las 2 horas de la primera sección, se adicionó el polvo cerámico en la concentración requerida para cada lote, y se dispuso nuevamente en el molino con las mismas condiciones durante 4 horas para obtener una mezcla homogénea (*Figura 3-2*).

Figura 3-2: Preparación de la suspensión de resina – Fosfatos de calcio.



Nombre de la fuente: Carolina Duque Uribe.

Las diferentes suspensiones se caracterizaron reológicamente mediante curvas de velocidad de cizalladura vs viscosidad, en un viscosímetro BOHLIN VISCO88BV (Bohlin Instruments). A la suspensión 50CaP también se le realizó análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) en un equipo TA Instruments Discovery 550 con atmósfera de aire y una rampa de calentamiento de 10 °C/min desde temperatura ambiente hasta 1200 °C, para determinar la ocurrencia de cambios térmicos en la mezcla con la mayor carga cerámica trabajada. Para ello se utilizó una probeta de 4 mm de diámetro y 1.5 mm de alto, impresa en la misma máquina en que se imprimieron los scaffolds y con los mismos parámetros de impresión.

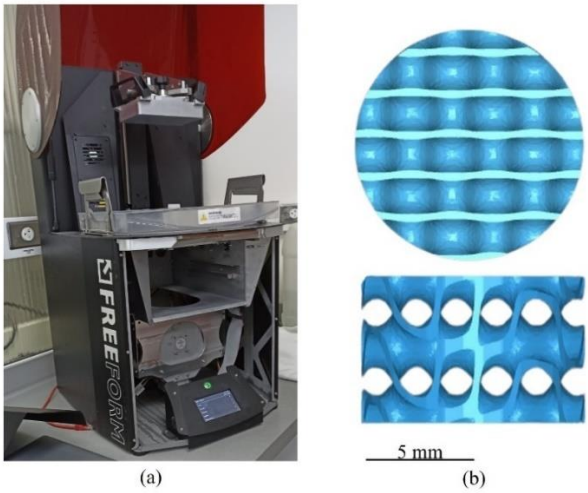
3.2.3 Obtención de los scaffolds

En el proceso de estereolitografía (STL) y procesamiento digital de luz (DLP), el archivo CAD del prototipo a imprimir, se somete a un proceso de slicing por capas. Dicha información se le envía a la máquina que, a través del uso de máscaras, proyecta cada sección horizontal sobre la resina líquida. La plataforma móvil de la máquina se ubica en

la parte inferior del eje Z sumergida en la cubeta que contiene la resina líquida, dejando entre el fondo del recipiente y la plataforma un lecho delgado de material, que se solidifica ante la incidencia de la luz UV conformando la capa con forma y espesor establecido. La plataforma asciende con la capa ya sólida y adherida mecánicamente, permitiendo que la resina llene nuevamente toda la cubeta y vuelve a sumergirse hasta el fondo para repetir el proceso las veces necesarias para solidificar todas las secciones que forman el objeto (67).

En este trabajo se utilizó la impresora Asiga PICO2GD (*figura 3-3(a)*), la cual trabaja con la metodología DLP con una fuente de luz con longitud de onda de 385 nm. Los parámetros de impresión y el slicing fueron configurados por medio del software Asiga Composer, utilizando un grosor de capa de 0.05 mm, un tiempo de exposición de 68 s para las primeras capas y 15 s para el resto de las capas. La TPMS seleccionada para la geometría de los scaffolds fue de una Giroide la cual se puede ver en la *figura 3-3(b)*. con forma externa cilíndrica de 10 mm de diámetro, 8 mm de alto y una porosidad del 80.5 vol%, Dicha porosidad, se midió haciendo uso del software ImageJ y una imagen del modelo CAD en donde se calculó el volumen de material y el volumen de poros. La porosidad a la que se refiere en esta sección es a nivel macroscópico, la cual es el resultado de la geometría tipo TPMS. La porosidad microscópica es propia del material, sea compuesto o sea sólo cerámico. en los cuerpos híbridos puede estar constituida por pequeños poros alrededor de las partículas cerámicas en contacto con la resina y luego en los cuerpos sinterizados proviene del contacto de una partícula con otra y el mismo proceso térmico. En este caso, solo se midió la macroscópica. Los poros interconectados de las estructuras TPMS se pueden describir a través de funciones trigonométricas, y éstos fueron modelados por el software MathMod® en un trabajo previo (99). Inicialmente se obtuvo una celda unitaria de la TPMS que se replicó en tres dimensiones, 3 veces en los ejes de coordenadas XY y 2 veces en el eje de coordenadas Z de modo que las superficies resultantes consistieron en 18 celdas unitarias en total.

Figura 3-3: Impresión de las muestras. (a) Maquina que funciona bajo la metodología DLP utilizada para la impresión de las muestras, con la cubeta adaptada para utilizar bajos contenidos de mezcla. (b) modelo CAD de geometría Giroide, vista superior y lateral.



Nombre de la fuente: Carolina Duque Uribe.

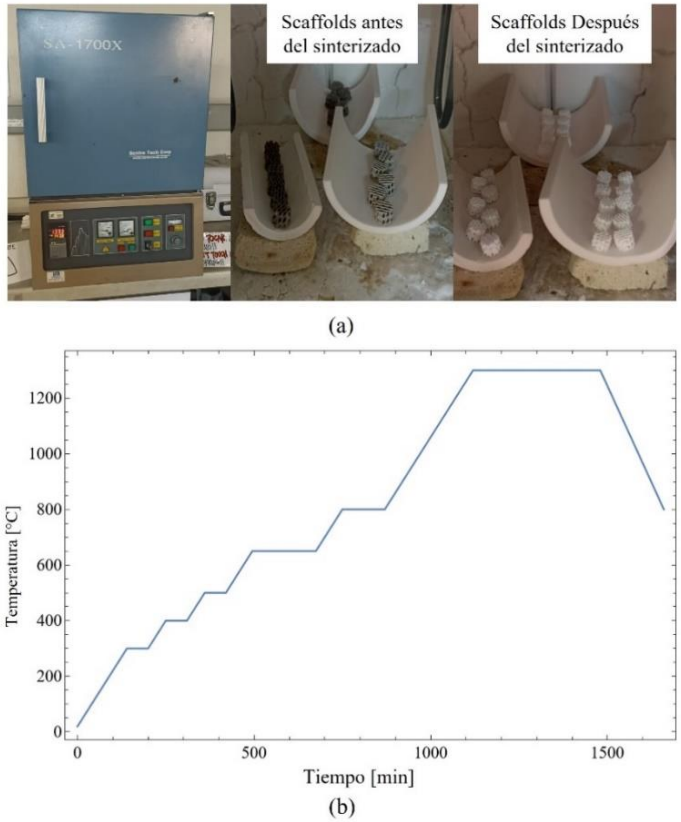
3.2.4 Procesamiento posterior de los cuerpos verdes cerámicos

En el proceso de estereolitografía cerámica se deben llevar a cabo unos pasos esenciales para obtener piezas completamente cerámicas, los cuales son: la preparación de la suspensión resina-cerámica fotopolimerizable, la creación o impresión de la pieza, el desaglomerado de la resina y la sinterización del cuerpo verde cerámico. El objetivo es lograr obtener una alta densidad de partículas para poder producir piezas cerámicas con buena integridad dimensional y estructural y lograr un correcto sinterizado de la pieza una vez se dé el proceso de desaglomerado de la resina (31).

Una vez impresas las muestras, se limpiaron durante 3 minutos en alcohol isopropílico y se les realizó un proceso de post curado con una cámara Anycubic Wash & Cure Plus Machine (Anycubic, China) a una longitud de onda de 405 nm durante 50 minutos. Posteriormente, las muestras se sometieron a tratamiento térmico en un horno SA-1700X, (Sentro tech corp, USA) (*figura 3-4(a)*) para la eliminación de la resina y posterior sinterización del material cerámico. La curva del tratamiento térmico utilizado se puede apreciar en la *figura 3-4(b)*. La temperatura máxima alcanzada fueron 1300 °C. En el proceso se realizó una pausa de 2 horas a 800°C para garantizar el cambio de fase de los fosfatos de calcio obtenidos y una vez terminado el tiempo del proceso del sinterizado, el enfriamiento fue lento, de acuerdo con las condiciones del horno, hasta alcanzar la temperatura ambiente de 25 °C.

Los cuerpos cerámicos sinterizados se caracterizaron por medio de difracción de Rayos X con un difractómetro de doble círculo Xpert-Pro PANanalytical Radiation Cu-Ka (λ=0,15406 nm) en un rango de difracción de 10-50° (2θ).

Figura 3-4: Imagen modelo CAD y curva de tratamiento térmico. (a) Imagen superior y lateral del modelo CAD de la geometría Giroide, (b) Curva de tratamiento térmico a la que fueron sometidas las muestras de 35CaP, 40CaP y 50CaP.



Nombre de la fuente: Carolina Duque Uribe.

3.2.5 Caracterización de los scaffolds

Los scaffolds cerámicos de fosfatos de calcio obtenidos mediante DLP antes y después del tratamiento térmico de desaglomerado de la resina y sinterizado del cuerpo verde, fueron caracterizados por medio de microscopia de emisión de campo (FESEM). Para la adquisición de las imágenes, las muestras se fijaron en una cinta de grafito, se les realizó un recubrimiento delgado en oro (Au) en una maquina DETON VACUUM desk IV y se

analizaron en el microscopio electrónico de emisión de campo dual (Beam FIB-FESEM, Thermo Fisher Scientific, modelo Socios 2 LoVac). Así mismo, los scaffolds antes y después del sinterizado fueron sometidos a pruebas de resistencia mecánica a la compresión en una máquina de ensayos universal (Instron 3366, instron, MA, USA) con un desplazamiento constante de 1 mm/s, tomando medidas en 5 scaffolds de cada tipo de concentración con las mismas condiciones. Para calcular el porcentaje de contracción volumétrica que se dio en el tratamiento térmico, se tomaron las dimensiones externas de las muestras con un calibrador análogo (Discover tools, china) tanto para las muestras antes y después del sinterizado midiendo el diámetro y la altura. En el archivo CAD también se midió el volumen teórico de la geometría haciendo uso del software ImageJ, así como los grosores de las paredes tanto para el modelo CAD como para los scaffolds impresos y después del sinterizado.

3.2.6 Prueba de degradación

De acuerdo con la norma ASTMF 1635-16, el ensayo de degradación in vitro se realizó para estudiar la pérdida de peso de los scaffolds 50CaP, después del proceso de sinterizado, durante 23 días, inmersos en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (pH 7.4, Sigma-Aldrich, USA). Se realizaron mediciones en los días 1, 5, 8, 12, 15 y 23. Cada muestra se sumergió independientemente en 20 mL de PBS en recipientes de polietileno sellados y se guardaron en una incubadora (Thermo Scientific, USA) a 37 °C y 5% de CO_2. Los días en los que se evaluaron las condiciones de las muestras, se midió el pH de cada recipiente con un pH metro PH700 (Apera, USA). Se sacaron las muestras del PBS, se lavaron con agua destilada y éstas se secaron a 30 °C durante 15 minutos en una estufa (Binder, Germany). Una vez las muestras estuvieron secas, se midió el peso de cada una en una balanza (Adam equipment, UK). La pérdida de masa se calculó teniendo en cuenta la ecuación 1. Cada medición en los días seleccionados se realizó por triplicado.

$$Perdida\ de\ masa\ (\%) = \frac{W_0 - W_t}{W_0}\ x\ 100 \qquad \text{Ecuación 3-1}$$

Donde W_0 es el peso de la muestra inicial seca y W_t es el peso de la muestra seca después del tiempo seleccionado.

3.2.7 Impregnación de los scaffolds sinterizados con propóleo

Los scaffolds de 50CaP impresos y sinterizados fueron impregnados con extractos de propóleo proveniente de Arauca, Colombia, con una concentración de 0.7mg/mL, los cuales fueron obtenidos en un trabajo anterior (116). Para esto, inicialmente se depositaron 20 µL del extracto etanólico de propóleo sobre la superficie de cada scaffold y éstos se colocaron en una cámara de presión positiva (Wiropress, BEGO, Alemania) durante 5 minutos a 2.4 Bar. La absorción del extracto por parte del scaffold se confirmó mediante la observación del cambio de coloración del andamio y la revisión de la humedad de una servilleta sobre la cual se encontraban las muestras. Una vez se confirmó que el extracto había sido absorbido, el proceso se repitió hasta que el volumen total impregnado fue de 80 µL. Las muestras se pueden observar en la *figura 3-5*.

Figura 3-5: Scaffolds de 50CaP impregnados con propóleo proveniente de la región de Arauca, Colombia y sin impregnar.

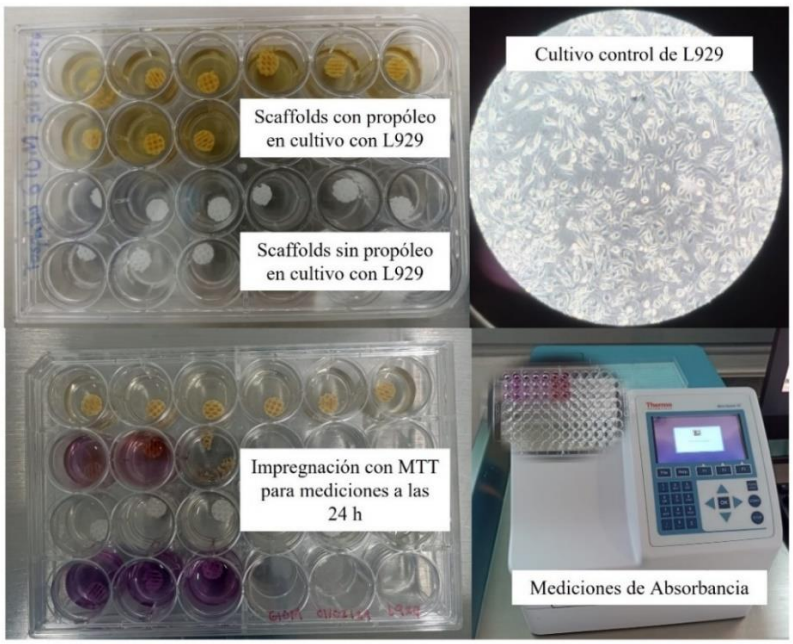
Nombre de la fuente: Carolina Duque Uribe.

3.2.8 Ensayo biológico

Para la evaluación de la bioactividad se utilizaron dos grupos de muestras, scaffolds 50CaP impregnados del extracto etanólico de propóleo (50CaP+P) y scaffolds 50CaP sin impregnar, los cuales fueron esterilizados con luz UV, previo al ensayo. Se realizó una prueba de citotoxicidad con MTT utilizando platos de 24 pozos. En cada pozo se depositó

un scaffold de cada tipo y sobre éstos se sembraron 50.000 células de la línea celular L929 (*NCTC clone 929 [L cell, L-929, derivative of Strain L]) ATCC Nr. CCL-1*, utilizando como medio DMEM al 10% V/V de suero bovino fetal, estreptomicina al 1% V/V y anfotericina B al 1% V/V (Gibco, USA). Para garantizar el correcto crecimiento de las células, se realizó un control consistente de la misma cantidad de células sembradas sin ningún tipo de scaffold. Sin embargo, dichos controles no se tuvieron en cuenta para las mediciones. La prueba se realizó tomando medidas a las 24 y 96 horas y a los 6 días. Cada día en los que se realizaron mediciones, se eliminó el medio en el que se encontraban los diferentes scaffolds, se lavaron los pozos y las muestras con Lactato de Ringer para eliminar las células muertas, se agregó la solución de MTT, la cual fue preparada con una concentración de 1 mg/mL en medio DMEM, se dejaron en la incubadora por 2 horas y pasado este tiempo se midió la absorbancia a 570 nm de cada pozo con scaffolds 50CaP y 50CaP+P comparándolas entre sí en un espectrofotómetro (Multiscan Go, Zeiss, Alemania). Las muestras por cada condición y las mediciones de estas se realizaron por triplicado.

Figura 3-6: Ensayo biológico realizado a los scaffolds de fosfatos de calcio con y sin impregnación de propóleo. Imagen del cultivo control de la línea celular de L929. Ensayo de MTT para la viabilidad celular.



Nombre de la fuente: Carolina Duque Uribe

3.2.9 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media ± desviación estándar (DE). El análisis estadístico se realizó con el programa Minitab Statistical software (Minitab Inc.). Para evaluar la significancia de los grupos experimentales se realizó un Anova multivariado. Un valor $p \leqq 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Las gráficas se realizaron utilizando El sofware Wolfram Mathematica (Wolfram) y en el software Origin (OriginLab corporation).

3.3 Resultados y discusión

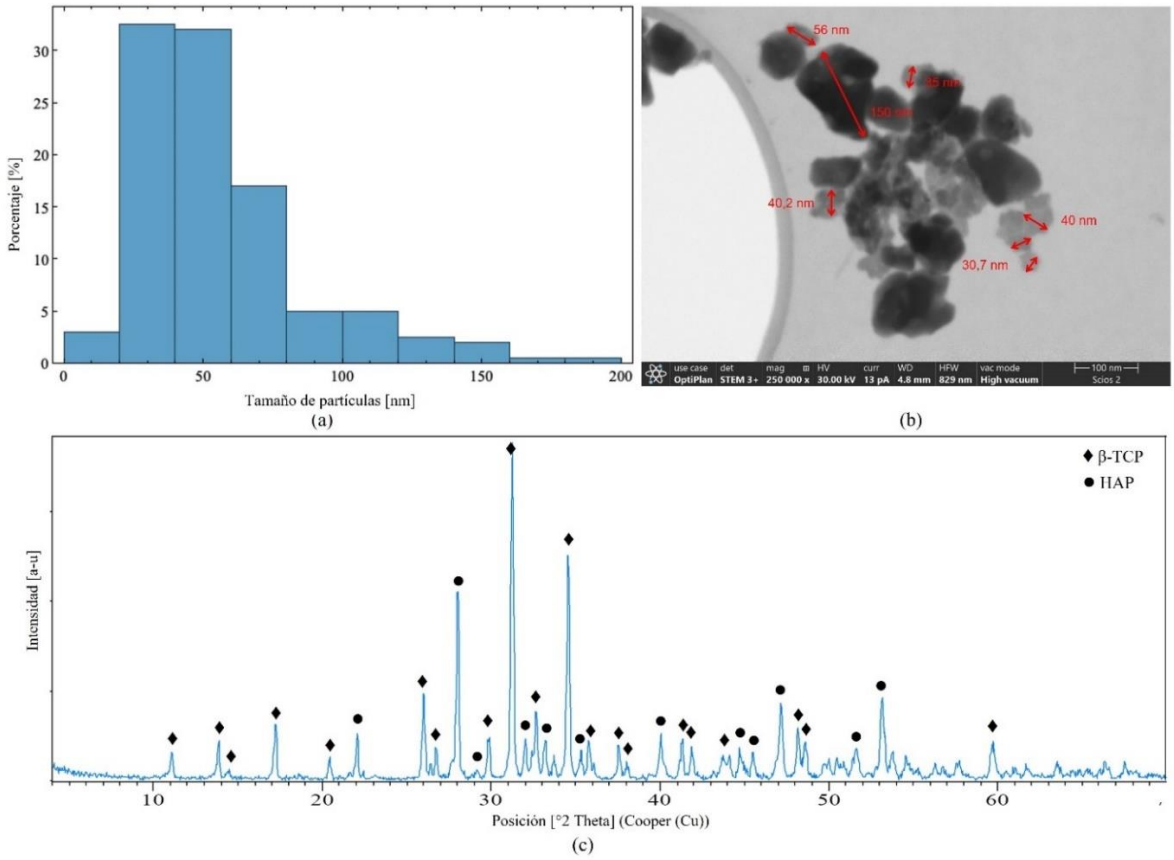
3.3.1 Caracterización del polvo cerámico

La *figura 3-7(a)* muestra el histograma resultante del análisis de la distribución de tamaño de partícula (DTP) de las partículas de fosfatos de calcio (cenizas) utilizadas. En él puede verse que el 32.5% de las partículas tienen un tamaño entre 20 y 40 nm y el 90% de las partículas tienen tamaños inferiores a los 100 nm. Se puede ver en la *figura 3-7(b)* la presencia de agregados alrededor de 150 nm compuestos por nanopartículas de morfología granular o esférica. Es importante tener un control sobre el tamaño de las partículas y agregados utilizados en la impresión por DLP ya que el tamaño de éstos debe ser más pequeño que el espesor de la capa, de lo contrario, la resolución vertical de la geometría impresa se podría ver afectada (31). En este caso, la mayoría de las partículas tienen un tamaño menor al tamaño de capa utilizado de 0.05 mm, por lo tanto, lo que permite concluir que la resolución de la impresión no se verá afectada.

En el difractograma de Rayos X de las cenizas reportado en (138), se evidenció la formación de dos fases principales de fosfato de calcio: la hidroxiapatita, que indexa con el patrón JCPDS (010740566) (HA), y la fase tricálcica de fosfato cálcico β, correspondiente a la ficha JCPDS (01-070-2065 β-TCP). También se muestran las fases minoritarias de pirofosfato cálcico 01-073-0440 (CPF). *La figura 3-7(c)* muestra el difractograma de rayos X del material después del tratamiento térmico y sinterizado, en el cual se observa que mejoró la cristalización de las fases mayoritarias y desapareció la fase

de pirofosfato. Esto indica que, durante el proceso de eliminación de la resina, las cenizas resultantes del proceso de auto combustión alcanzan su cristalinidad y adoptan las características estructurales de las fases cristalinas presentes en el producto final.

Figura 3-7: Caracterización de las partículas y scaffolds de Fosfatos de Calcio. (a) Histograma resultante de las mediciones de tamaño de partícula tomadas con el software ImageJ y analizadas por el software Origin de la distribución del tamaño de partícula de los Fosfatos de Calcio (cenizas) utilizados en la mezcla de resina-cerámica para la impresión por DLP. (b) Ejemplo de imagen de FESEM utilizada para hacer las mediciones de los tamaños de partículas y agregados. (c) Difractograma de Rayos X de los scaffolds de fosfatos de calcio después del tratamiento térmico y sinterizado.



Nombre de la fuente: Carolina Duque Uribe.

3.3.2 Caracterización de la resina y la suspensión

Las características del comportamiento térmico y de las moléculas que componen la resina antes y después de curada, se presentan en un trabajo previo (67) (Ver *anexo A*). Es posible dilucidar que la resina utilizada es de naturaleza acrílica, el comportamiento termogravimétrico fue el propio de resinas de este tipo y, además, después de utilizar la resina en el proceso de impresión, ésta no presenta cambios ni formación o desaparición de grupos funcionales. En el TGA se observa que las mayores pérdidas de masa se dan entre los 300 y 470°C. *La figura 3-8(a)* muestra la curva resultante del ensayo de TGA y DSC para una muestra de 50CaP. En la curva del TGA se puede observar que la pérdida de masa presenta el mismo comportamiento de la resina sin carga cerámica presentado en (67)(Ver *anexo A*). Las mayores pérdidas se dan entre los 300 y los 470 °C. A partir de esta temperatura se observa que las pérdidas de masa son mínimas y queda un porcentaje de peso remanente, correspondiente a la cantidad de partículas cerámicas presentes en la probeta estudiada, indicando que la resina no presenta ninguna alteración al estar en contacto con las partículas de fosfato de calcio, por lo que no se muestran diferencias en el proceso de desaglomerado de la resina con o sin carga cerámica. En el DSC se presentan tres regiones señaladas con recuadros punteados. Un pico exotérmico cercano a los 110°C, enmarcado en el recuadro verde, se atribuye a reacciones de polimerización que siguen ocurriendo en la resina ya solidificada (118–120). La región exotérmica cercana a 300 y 400°C, corresponde a la reacción de degradación de la resina y en donde se ve representada la mayor pérdida de masa de la muestra. Dicha degradación se presenta por procesos de oxidación o separación de la cadena polimérica en puntos aleatorios (121). Este comportamiento fue evidenciado también por Yong Zeng et al (139). Finalmente, la zona resaltada en el recuadro morado después de los 650°C muestra un pico exotérmico que indica que el proceso de descomposición del polímero se sigue presentando a estas altas temperaturas; sugiriendo que quedan residuos de carbono en la muestra, pese a que las pérdidas de masa que se observan en el TGA son variaciones mínimas (122).

Las curvas de velocidad de cizalla vs viscosidad de las mezclas con los diferentes porcentajes de carga cerámica se presentan en la *figura 3-8(b)*. Como se puede observar, las 3 mezclas trabajadas presentaron un comportamiento reológico no newtoniano, pseudo plástico, con un adelgazamiento por cizallamiento, el cual puede explicarse por la

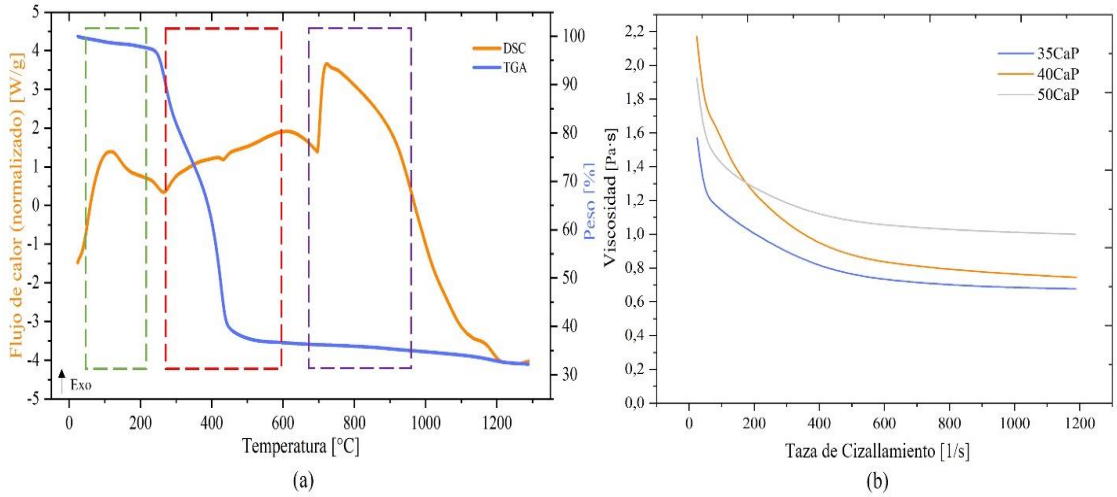
destrucción de la microestructura de red, que tuvo lugar a partir de la interacción entre las partículas y entre éstas con los monómeros de la resina, al aumentar la velocidad de cizalla (140). Dicho comportamiento está ampliamente soportado en la bibliografía (10,40,86,91,141).

Comúnmente las resinas con valores más altos de viscosidad que se pueden utilizar para imprimir por estereolitografía sin tener inconvenientes alcanzan los 5 Pa·s (26). Sin embargo, para que una suspensión resina-cerámica sea adecuada para los procesos de impresión, su viscosidad debe ser relativamente baja de tal manera que durante la impresión se auto nivele la mezcla en la cubeta y el material particulado no cause interferencias en el proceso, por lo que las resinas cargadas deben tener viscosidades inferiores a los 3 Pa·s (31). Además, la cantidad de sólidos presentes debe ser la más alta posible para que el proceso de sinterización ocurra adecuadamente, dando lugar a cuerpos densificados sin una contracción excesiva que pueda causar defectos. No obstante, la carga de sólidos no debe causar una viscosidad inadecuada ni cambiar el comportamiento de cizallamiento fino de la suspensión (16) por lo que el uso de dispersantes puede ser de gran ayuda. Para el caso de las 3 mezclas, las viscosidades después de velocidades de cizalla superiores a los 400 s^{-1} no superan los 1.2 Pa·s, siendo la de mayor viscosidad la mezcla de 50CaP, cuyo valor de viscosidad está por debajo de los valores reportados para suspensiones resina-cerámica para estereolitografía. El uso del dispersante BYK en las suspensiones fue indispensable para obtener mezclas con buena fluidez y estabilidad de las partículas. Esto podría deberse al anclaje del grupo fosfato del BYK, que hace que se combine fácilmente con las partículas de fosfato de calcio, mientras que su cadena final tiene afinidad por los medios no acuosos (140) dando lugar a una capa que funciona como barrera en la superficie para la interacción entre las partículas cerámicas generando la fuerza de repulsión suficiente entre éstas (91).

Las viscosidades obtenidas para los tres tipos de mezclas son exitosas, pues la viscosidad de las resinas aumenta exponencialmente con el incremento de contenido cerámico lo cual es un resultado esperado, sin afectar el proceso de impresión. Algunos trabajos que incluyen cargas superiores al 40 vol% están limitados a utilizar partículas del orden micrométrico, dado que las nanopartículas tienen grandes áreas de superficie de reacción por unidad de volumen, por lo que es complejo preparar resinas cerámicas con altos contenidos de nano partículas y hay pocas investigaciones donde se logre esto (140,142). Así, el uso de nanopartículas de fosfatos de calcio en este trabajo da resultados

prometedores de suspensiones cerámicas con viscosidades adecuadas para la impresión 3D por estereolitografía cerámica.

Figura 3-8: Caracterización de la suspensión. (a) Análisis termogravimétrico y calorimetría diferencia de barrido de la probeta de 50CaP. (b) Curvas de velocidad de cizalla vs viscosidad de las mezclas con los diferentes porcentajes de carga cerámica.



Nombre de la fuente: Carolina Duque Uribe.

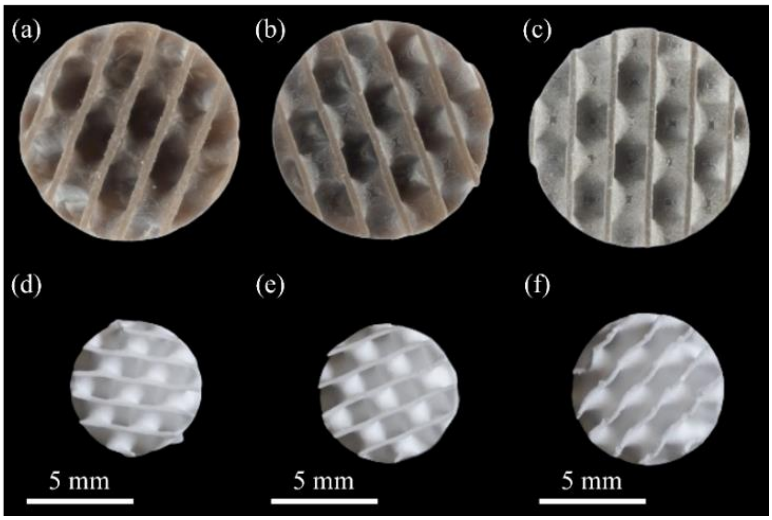
3.3.3 Caracterización de los scaffolds

Los scaffolds obtenidos al final de la impresión por procesamiento de luz digital (DLP) de la suspensión resina-cerámica, y después del tratamiento del postcurado y sinterizado, pueden ser observados en la *Figura 3-9*. Se imprimieron con éxito scaffolds cilíndricos con geometría Giroide con dimensiones de 10 x 8 mm (diámetro x altura) y porosidad del 80.5 vol%. Macroscópicamente no se observan diferencias en la morfología entre los scaffolds obtenidos con los diferentes porcentajes de partículas y el modelo CAD (*figura 3-3(b)*). Los scaffolds presentan porosidad interconectada y el porcentaje de porosidad de conserva en las muestras después del sinterizado. Los scaffolds presentan una tonalidad gris opaca antes del proceso de sinterizado (*figura 3-9(a-c)*), lo cual se debe a la alta cantidad de partículas presentes en ellos y que éstas aún no han sido sometidas a tratamiento térmico. El aspecto superficial de los scaffolds es liso y sin defectos sobresalientes y no se observaron obstrucciones de los poros propios de los scaffolds que pudieran indicar

procesos de sobrecurado, por lo que los parámetros de impresión seleccionados fueron los adecuados.

En la *figura 3-9(d-f)* se observan los mismos scaffolds después del proceso de sinterizado. Se puede evidenciar una contracción volumétrica debida al tratamiento térmico en el cual la resina desaparece completamente. Los valores de las contracciones se presentan en la tabla 1 para cada tipo de scaffold obtenido. Además, se observó un adelgazamiento en las paredes de los scaffolds antes y después del sinterizado. Los valores de estos grosores también se presentan en la *tabla 3-1*. Se puede apreciar que la mayor contracción ocurrió en las muestras 35CaP, lo cual era lo esperado, dado que son las muestras con la menor cantidad de partículas y por lo tanto el mayor porcentaje de resina. Pese a que se dan estas contracciones en las diferentes concentraciones, la geometría propia de la TPMS giroide se conserva sin deformaciones apreciables y sin cambios en el porcentaje de porosidad del diseño.

Figura 3-9: Fotografías digitales de los scaffolds obtenidos por impresión DLP con geometría Giroide. Antes del proceso de sinterizado (a) 35CaP, (b) 40CaP, (c) 50CaP y después del proceso de sinterizado (d) 35CaP, (e) 40CaP y (f) 50CaP.



Nombre de la fuente: Carolina Duque Uribe.

Tabla 3-1: Valores de contracción volumétrica, resistencia máxima a la compresión y Modulo de Young para los scaffolds con geometría giroide, antes y después del sinterizado, en las diferentes concentraciones de carga cerámica.

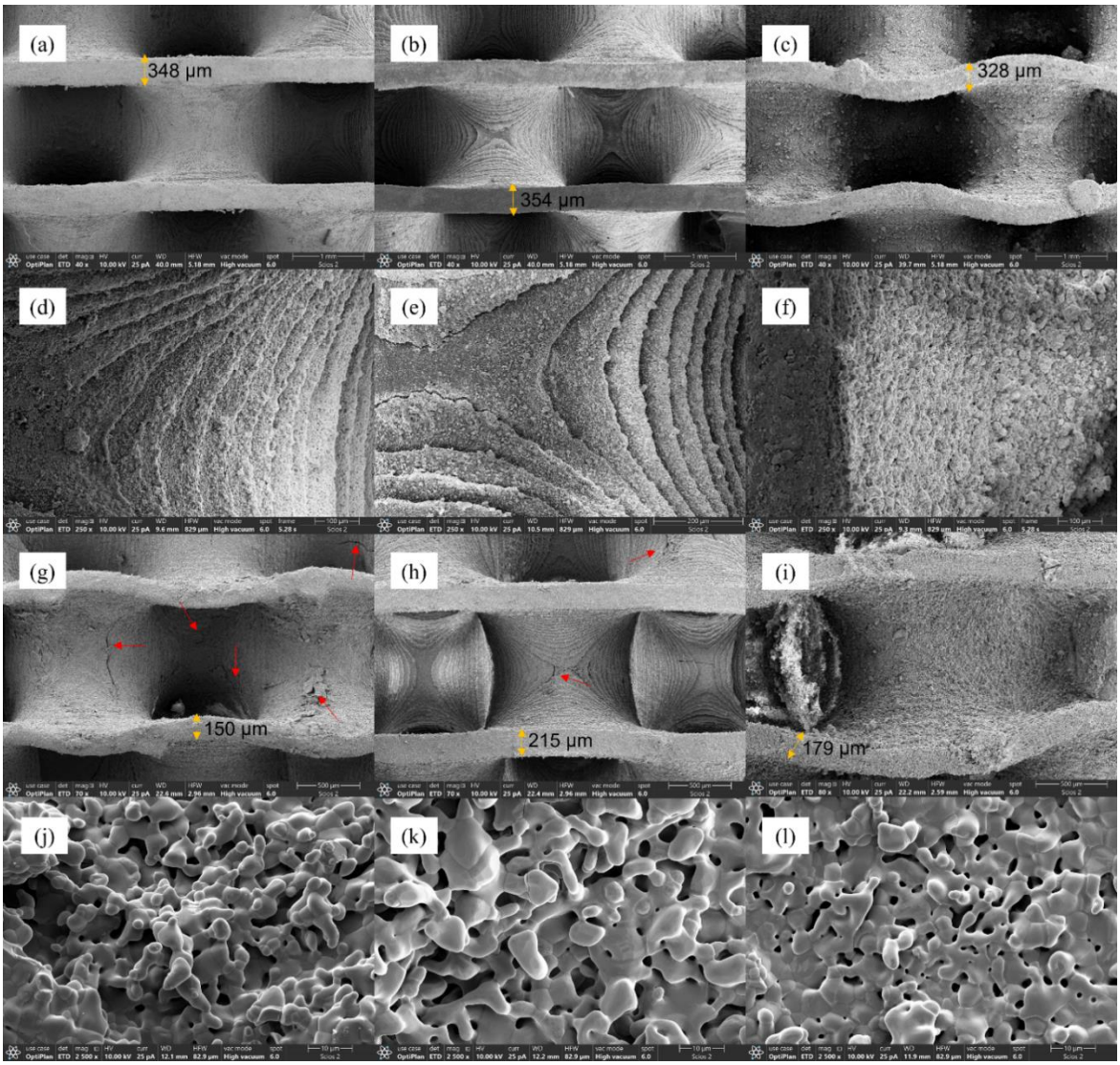
Tipo	Contracción volumétrica	Módulo de Young [MPa]		Resistencia máxima a la compresión [MPa]		Grosor paredes de los scaffolds [µm]	
		Antes sinterizar	Después sinterizar	Antes sinterizar	Después sinterizar	Antes sinterizar	Después sinterizar
35CaP	79.4%	75 ± 21	34 ± 17	4 ± 1	0.83 ± 0.06	348 ± 28	150 ± 18
40CaP	72.1%	50 ± 12	32 ± 16	3.2 ± 0.5	0.9 ± 0.2	354 ± 21	215 ± 8
50CaP	68.8%	57 ± 6	40 ± 13	3.4 ± 0.6	0.9 ± 1	328 ± 17	179 ± 20

En la *figura 3-10* se presentan las imágenes FESEM de las muestras con geometría giroide a las diferentes concentraciones de carga cerámica, antes y después del sinterizado. Para el caso de los scaffolds antes del sinterizado (*Figuras 3-5(a-f)*) no se observan diferencias significativas entre los tres tipos de muestras y con el modelo CAD (*figura 3-3(b)*), las paredes de los scaffolds se ven con un alto contenido de partículas cerámicas, se alcanzan a ver las capas propias del proceso de impresión y no es posible observar la resina que sirve en este caso como aglutinante. Los grosores de las paredes para las muestras antes y después del sinterizado también se muestran en la *figura 3-10* con flechas amarillas. No se observan diferencias significativas entre los grosores de las paredes de las muestras antes del curado, teniendo en cuenta que las incertidumbres de estas medidas hacen que los valores se solapen. Sin embargo, existe una tendencia a que las muestras de 35CaP Y 40CaP tengan mayor grosor de las paredes, lo cual puede ser resultado de mayores curados generados en el proceso de impresión dado que la menor cantidad de partículas genera menos atenuación de la luz y por tanto una exposición mayor en los mismos tiempos. El grosor de 50CaP es menor, debido a que el tiempo de curado no aumentó y al tener más partículas que los otros dos tipos de concentraciones, éstas atenúan más la luz y el tiempo de exposición en cada capa no alcanza a ser suficiente para formar rebordes. En los scaffolds después del proceso de sinterización, las muestras de 35CaP son las que tienen menor grosor de paredes, ya que al tener menor cantidad de partículas la contracción es mayor. Entre los espesores de 40CaP y 50CaP se observa que 50CaP tiene valores menores, lo que puede indicar que el proceso de sinterizado del material fue mejor debido a la alta cantidad de partículas y la buena formación de cuellos en el sinterizado.

Para los scaffolds después del proceso de sinterización (*Figuras 3-10(g-l)*), se evidencian algunas grietas, como resultado de las contracciones volumétricas que se presentan en ellos, las cuales se señalaron con flechas rojas. Los scaffolds 35CaP son los que presentan mayor cantidad de grietas, nuevamente debido a que éstas presentan la menor cantidad de partículas y el mayor porcentaje de resina y fueron objeto de las mayores contracciones.

Para el caso de los scaffolds de 40CaP y 50CaP las grietas son casi imperceptibles, lo que indica un adecuado tratamiento térmico. La curva que se utilizó tiene pausas de una hora cada 100 °C lo que hace que los aumentos de temperatura en el momento del desaglomerado sean pausados y garanticen una salida de la resina sin generar tensiones excesivas, además la temperatura de sinterizado de 1300 °C fue adecuada para que los cuerpos quedaran densos, como se puede observar en las imágenes de la *figura 3-10(j, k, l)* en donde se ven los cuellos del sinterizado y en donde éstos son mayores y quedan menos poros a medida que aumenta la carga cerámica.

Figura 3-10: Imágenes SEM y FESEM de: Scaffolds Giroide antes del sinterizado (a, d) 35Al, (b, e) 40Al y (c, f) 50Al. Después del sinterizado (g, j) 35Al, (h, k) 40Al y (i, l) 50Al.



Nombre de la fuente: Carolina Duque Uribe.

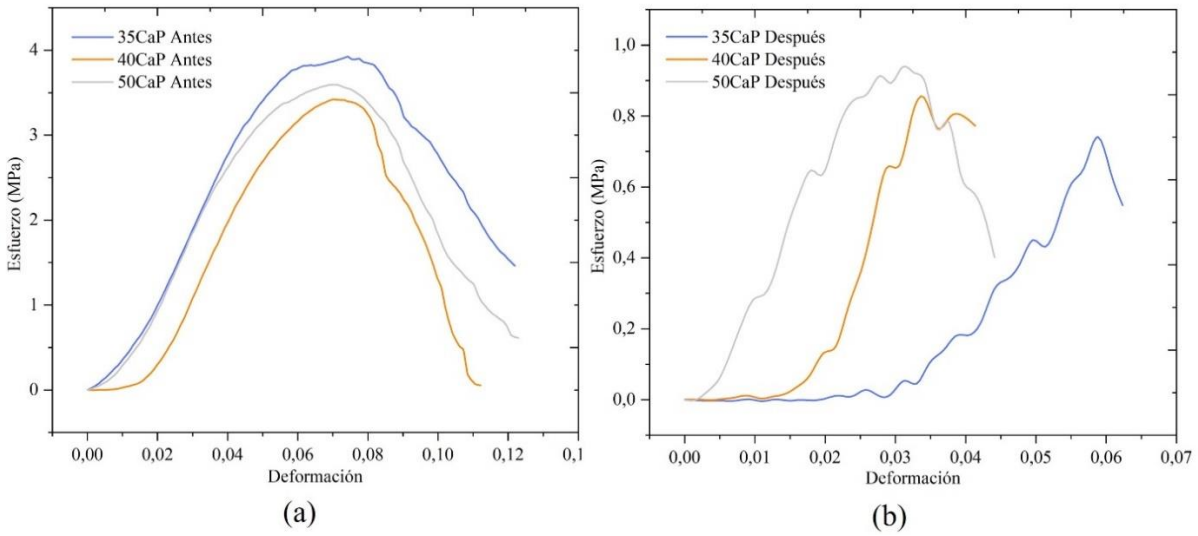
3.3.4 Comportamiento mecánico

En la *figura 3-11* se presentan las curvas de Esfuerzo vs deformación que se obtuvieron de los scaffolds con geometría giroide, antes y después del sinterizado en el ensayo mecánico a compresión. La resistencia máxima a la compresión y el módulo de Young que se obtuvo para cada tipo composición se encuentran en la *tabla 3-1.* En la comparación estadística entre los scaffolds antes y después del sinterizado se obtuvieron valores p inferiores a 0.05 para los tres tipos de concentraciones, por lo que se puede decir que si hay diferencias significativas en los resultados obtenidos. Los scaffolds fabricados con la combinación de polímero-cerámico antes del sinterizado presentaron mayor resistencia mecánica a la compresión y mayores módulos de Young, lo que indica que la carga cerámica se encuentra bien adherida a la resina, lo cual contribuye a conferirle rigidez a las piezas. Los cuerpos del material compuesto impresos y postcurados son íntegros y con bajas cantidades de defectos. Una resistencia mecánica de la muestra al 35CaP antes del sinterizado ligeramente más alta, puede indicar una mayor presencia de pequeños defectos en las muestras asociadas con la cantidad de partículas de fosfatos de calcio, además de una mayor presencia de aglomerados que pueden causar ligeras disminuciones en las resistencias de los cuerpos cerámicos a cargas de compresión. Sin embargo, los valores presentados no presentan diferencias significativas entre un porcentaje de partículas y otro. Resultados similares se obtuvieron en un trabajo anterior trabajando con menores porcentajes de carga (67), Además ese aumento en la resistencia mecánica para las muestras de 35CaP puede estar reflejando un mejor curado durante el proceso de impresión por la más baja cantidad de partículas además de la influencia del grosor de sus paredes, como fue mencionado anteriormente. Los resultados de resistencia máxima a la compresión de los cuerpos híbridos alcanzan valores dentro del rango del hueso esponjoso humano (0.6-15 MPa) (143), por lo cual pueden ser también considerados como alternativas para reparaciones óseas en donde se requieran piezas con alta resolución, buenos acabados y buena resistencia a cargas mecánicas sin que la pieza sufra procesos de degradación acelerada. El módulo de Young da información de las propiedades elásticas del material o del cuerpo impreso. Los valores de éste para los cuerpos híbridos son más altos que en los completamente cerámicos, efecto directamente relacionado a las características de rigidez conferidas por la presencia de la resina y con

la porosidad generada en los cuerpos cerámicos ante la proximidad de las partículas de tamaño nanométrico durante el proceso de sinterización.

Después del proceso de sinterizado, los scaffolds totalmente cerámicos presentaron menores resistencias a la compresión debido a las fisuras presentes del proceso de contracción dada por la eliminación de la resina y la generación de tensiones en el cuerpo durante dicho proceso, al poco volumen de material que se tiene en el caso de este tipo de geometría TPMS y a la fragilidad característica del material cerámico. El comportamiento entre los tres tipos de concentraciones era el esperado, presentando mejor resistencia mecánica cuando la carga cerámica es más alta. Ambos resultados (resistencia a la compresión y modulo elástico) para los tres tipos de concentración de partículas, coinciden con los reportados para el hueso esponjoso y cortical, por lo cual este tipo de scaffolds son prometedores para las aplicaciones médicas con aplicaciones en las reparaciones óseas (10,80). En los cuerpos cerámicos, un menor módulo de Young implica que con menores esfuerzos, los cuerpos presentan mayores deformaciones, lo cual refleja un comportamiento más frágil típico de un material completamente cerámico. Para el caso de los scaffolds cerámicos, el que presentó mejor comportamiento mecánico a la compresión fue el 50CaP, por lo que esta geometría fue la seleccionada para realizar la impregnación de extractos etanólico de propóleos y ensayos biológicos.

Figura 3-11: Curvas de Esfuerzo vs Deformación para los scaffolds con geometría Giroide (a) antes del sinterizado y (b) después del sinterizado.

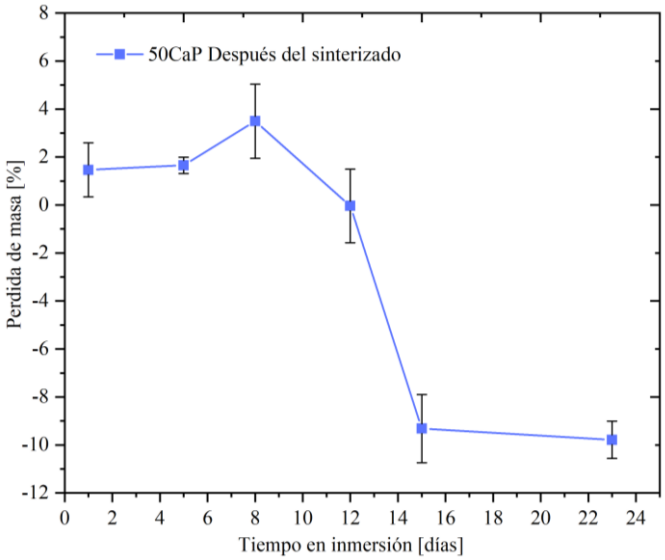


Nombre de la fuente: Carolina Duque Uribe.

3.3.5 Degradación in vitro

El comportamiento de degradación in vitro de los andamios 50CaP después del proceso de sinterizado se estudió mediante la inmersión en solución PBS durante un periodo de 1, 5, 8, 12, 15 y 23 días. Los resultados de este experimento se presentan en la *figura 3-12*. Para el caso en que la pendiente es positiva se consideran como perdidas de masa y cuando son negativas se consideran como aumentos o ganancias de masa. Los scaffolds conservaron su forma durante toda la prueba, sin presentar deformaciones evidentes. El pH del PBS en el que estaba cada muestra permaneció constante y cercano al pH inicial del PBS (7.4), indicando la estabilidad del material en el tiempo. En los primero días se da una interacción química entre los scaffolds y el medio haciendo que se depositen sales en la superficie de las muestras (129), presentando fluctuaciones en estos días iniciales de inmersión. Sin embargo, como se puede ver en la *figura 3-12*, la disolución de las sales es rápida debido a la alta interacción con el medio gracias a la rugosidad de la muestra, por ende, el día 8 se evidencia una pérdida de masa significativa. La ganancia de masa que se observa a partir del día 12, hasta el día 23, resulta de la misma interacción de los fosfatos de calcio del scaffold con el medio y a su propiedad bioactiva, lo que hace que se depositen fases apatítica en la superficie del material aumentando su masa, un resultado similar se observó en un trabajo previo donde se comprobó la alta bioactividad de los fosfatos de calcio, generando fases apatítica en la superficie de scaffolds (67). Las ganancias de masa aumentan considerablemente entre el día 12 y 15, indicando que en dichos días se presentan las mayores deposiciones de fases apatítica. El día 23 el aumento no es significativo respecto a los anteriores por lo que se está llegando a la estabilidad en las interacciones químicas del material con el medio circundante.

Figura 3-12: Valores de pérdida e incremento de masa de los scaffolds 50CaP después del sinterizado en función del tiempo de remojo en PBS.



Nombre de la fuente: Carolina Duque Uribe.

3.3.6 Ensayo biológico de los scaffolds impregnados con propóleo

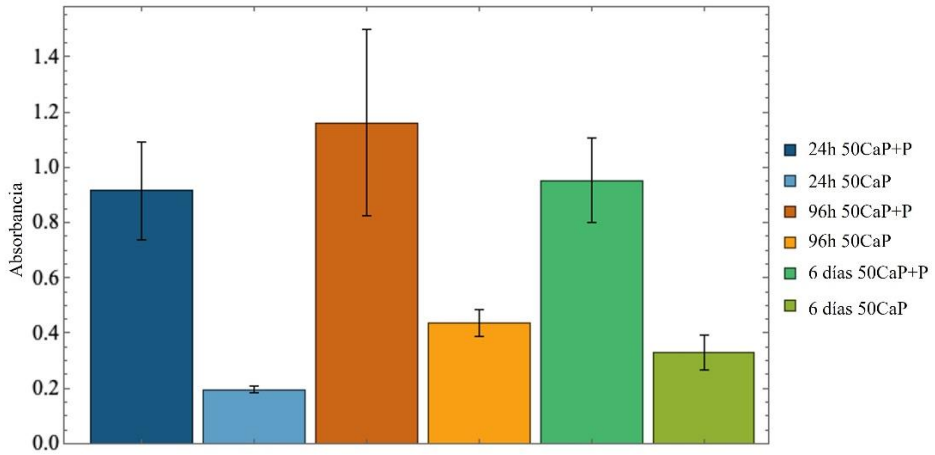
Una vez se realizó la impregnación de los scaffolds, éstos cambiaron su tonalidad a tonos marrón, efecto esperado debido a que el propóleo queda dentro de la matriz cerámica y éste tiene dicho color. Además, la impregnación fue exitosa debido a que no causo ningún tipo de daño en la integridad y estructura de los scaffolds de 50CaP ni generó variaciones en el tamaño de este.

Debido a que, en los tres tiempos de medición los controles de células se encontraban viables, se realizó la prueba de MTT para cada tipo de scaffold y se hicieron las mediciones de respectivas como fue descrito. En la *figura 3-13* se presentan los resultados exitosos de proliferación celular y citotoxicidad para cada tipo de scaffold en los diferentes tiempos, en términos de la absorbancia. Las enzimas oxidorreductasas celulares, reducen el tinte del MTT a su forma insoluble Formazán, generando una coloración purpura a la solución, a la que se le puede medir la absorbancia dando cuenta de la cantidad de células vivas presentes (144). Mientras mayor sea el valor de absorbancia, más cantidad de células vivas hay en la muestra analizada.

Se observa un crecimiento celular tanto en los andamios impregnados con propóleos (50CaP+P), como en los que no tienen propóleos (50CaP), lo que indica que la geometría de los scaffolds cerámicos impresos y la estructura química de las fases hidroxiapatita y los fosfatos tricálcicos β, que los conforman, proporcionan una superficie que promueve la adhesión celular, facilitando la proliferación de las células L929. La geometría TPMS Giroide empleada promueve el crecimiento celular, debido a su porosidad interconectada garantizada por medio de las funciones matemáticas propias de la estructura y a la porosidad impartida por el comportamiento del cerámico, una vez terminó el proceso de sinterizado. Estos resultados son consistentes con estudios previamente reportados, donde andamios hechos con fosfatos de calcio o vidrio bioactivo, mejoran el proceso de proliferación (145,146). La geometría TPMS giroide facilita el transporte de nutrientes y la eliminación de desechos, haciendo una imitación adecuada de la microestructura del hueso natural (147). También se ha demostrado que esta geometría promueve la vascularización, lo que acelera el proceso de regeneración (103) y a su vez, facilita la adhesión celular ofreciendo un área superficial suficiente para que se dé la interacción célula-material y estimular la formación del tejido óseo (103,148).

Los valores de absorbancia para 50CaP+P, en los tres días de medición de la prueba, son superiores que los de 50CaP, lo que indica que el extracto etanólico de propóleo favoreció el crecimiento celular, mostrando ser seguro a la concentración utilizada, es decir, sin efectos citotóxicos radicales. Los propóleos contienen diferentes compuestos orgánicos e inorgánicos entre los cuales se incluyen polifenoles, terpenoides, esteroides, aminoácidos, flavonoides, ácidos fenólicos como acido gálico, cafeico, entre otros (137,149,150). Muchos estudios han demostrado el impacto que algunos de estos compuestos tienen, confiriéndole propiedades a los propóleos como antioxidantes, antinflamatorios, antialérgicos, antibacterianos, e incluso restauradores y favorecedores de proliferación celular (137). Se ha revelado la eficacia en la regeneración ósea y de cartílagos, gracias a uno de los componentes activos del propóleo como lo es el ácido cafeico (150) e incluso se han visto resultados positivos del uso de propóleos frente a células conectivas como son los fibroblastos evitando la apoptosis (150). También se ha visto que pueden ser eficaces para aumentar la producción de colágeno de las L929 durante la fase de proliferación (135,151). Por todo lo anterior, se puede dilucidar que el uso del propóleo es beneficioso para la regeneración de tejidos (136).

Figura 3-13: Proliferación celular de la línea celular L929 en scaffolds del 50% p/V de fosfatos de calcio con (50CaP+P) y sin impregnación (50CaP) de extracto etanólico de propóleo proveniente de Arauca, Colombia a las 24h, 96h y 6 días.



Nombre de la fuente: Carolina Duque Uribe.

3.4 Conclusiones

En el presente trabajo se desarrollaron scaffolds con geometría TPMS giroide a través de la técnica de procesamiento digital de luz (DLP) con una suspensión a base de una resina comercial de naturaleza acrílica y carga cerámica de 35, 40 y 50 vol% de fosfatos de calcio. La resina utilizada, presentó un comportamiento típico de una resina acrílica en el ensayo de TGA, las partículas fueron obtenidas por la técnica de autocombustión dando como resultado polvos de fosfatos de calcio con mayoría de fases en Hidroxiapatita y fosfatos tricálcicos β, de tamaño nanométrico. Las viscosidades de los tres tipos de suspensiones son adecuadas para el proceso de impresión. Se resalta el hecho de que se utilizó un porcentaje correcto de dispersante BYK (10 w% respecto a la masa de las partículas) y que se obtuvieron valores de viscosidades bajas utilizando tamaños de partículas nanométricas, lo cual contribuye al conocimiento de suspensiones de nanopartículas de fosfato de calcio en resinas acrílicas. Los scaffolds obtenidos se sometieron a un tratamiento térmico que resultó exitoso tanto en el proceso de desaglomerado de la resina que sirvió como aglutinante de las partículas, como para la sinterización del cuerpo verde, obteniendo cuerpos cerámicos densos, con una geometría compleja, conservando la forma establecida desde el diseño CAD. Las fotografías digitales muestran las contracciones

volumétricas que se presentaron entre los scaffolds antes y después de la sinterización. Estas fueron típicas del proceso, no afectaron las geometrías y, como era de esperarse, mientras menor porcentaje de carga cerámica tenían las muestras, mayores fueron las contracciones volumétricas. En las imágenes FESEM que se presentaron se logró evidenciar que se obtuvieron scaffolds de material compuesto con excelentes acabados y alta precisión. El proceso de desaglomerado y sinterizado generó algunas grietas en los scaffolds. Sin embargo, fue un sinterizado exitoso y los cuellos generados entre partículas son evidentes. Los scaffolds fabricados con la combinación de polímero-cerámico antes del sinterizado presentaron mayor resistencia mecánica a la compresión y mayores módulos de Young, resultados que también pueden ser tenidos en cuenta para aplicaciones en reparaciones óseas. Después del proceso de sinterizado, los scaffolds totalmente cerámicos presentaron menores resistencia a la compresión debido a las fisuras formadas en el proceso de contracción que se presenta por la eliminación de la resina, al poco volumen de material que se tiene en el caso de este tipo de geometría TPMS y a la fragilidad característica del material cerámico. Los scaffolds de 50CaP se sometieron a una prueba de degradación durante 23 días, en donde se pudo evidenciar que a los 8 días de prueba se da la disolución de sales que se adhirieron a la superficie en los días iniciales debido a las interacciones del material con el medio, y a partir del día 12 se observó una ganancia de masa debido a que se depositaron fases apatítica sobre la superficie de los scaffolds por la alta bioactividad de los fosfatos de calcio. Las scaffolds de 50CaP También fueron impregnados exitosamente con extracto de propóleos proveniente de Tame, Arauca, Colombia sin mostrar cambios evidentes en su geometría e integridad. Dichos scaffolds se sometieron a evaluación de la citotoxicidad y proliferación celular, demostrando que el material con y sin propóleo no presenta efectos tóxicos sobre las células y que existe una mejor respuesta de crecimiento celular en aquellos que están impregnados.

Este trabajo abre la posibilidad de obtener cuerpos cerámicos a partir de la técnica de estereolitografía cerámica, con geometrías complejas, utilizando partículas cerámicas de orden nanométrico, lo que es imposible por métodos de procesamiento tradicional. Además, se confirma la posibilidad de utilizar los fosfatos de calcio como material para aplicaciones biomédicas en donde se pueda modificar la matriz cerámica con elementos naturales como los propóleos, que beneficien la regeneración de tejidos.

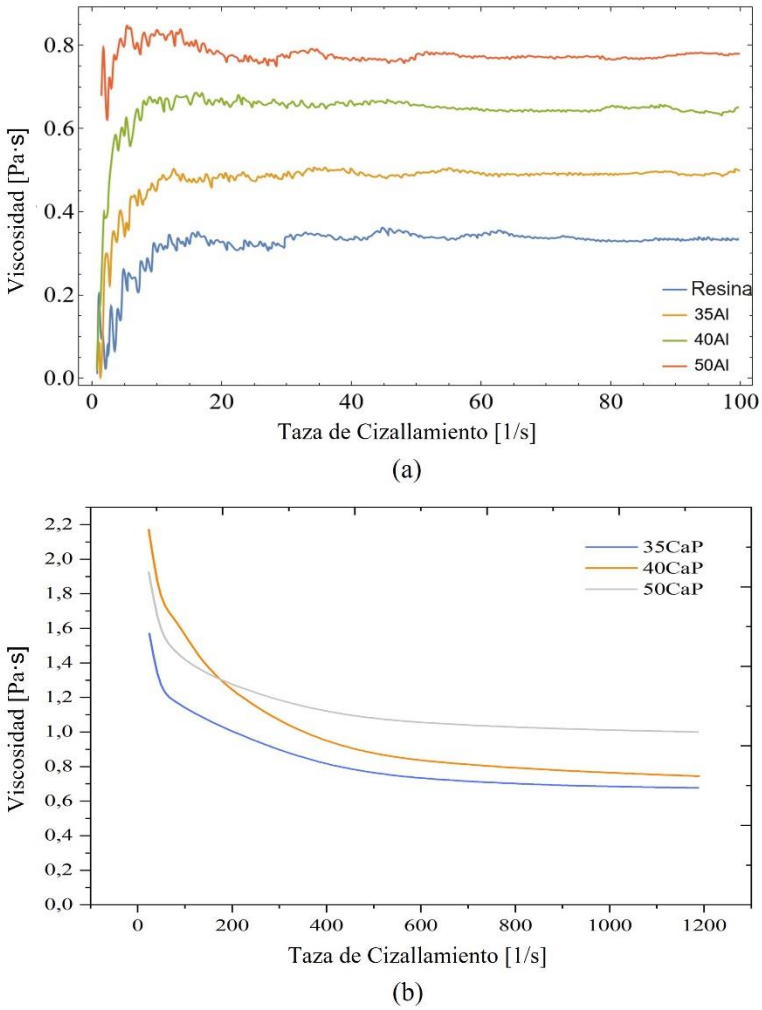
4. Comparaciones generales

En el presente capítulo se plantean algunas comparaciones generales entre el trabajo realizado con alúmina y con fosfatos de calcio. Se analizan los comportamientos reológicos de las tres suspensiones con los dos tipos de partículas, así como las contracciones volumétricas y el comportamiento mecánico de los scaffolds híbridos y totalmente cerámicos de ambos casos. Es de resaltar, que el trabajo de alúmina comprendía dos tipos de geometrías tipo TPMS (giroide y Schwartz P.) y en el de fosfatos de calcio solamente se trabajó con la geometría giroide, por lo que las comparaciones en función del tipo de partícula serán con dicha geometría. Las comparaciones en función de la geometría se presentaron en el capítulo 2 de forma detallada.

Las viscosidades de las suspensiones realizadas con fosfatos de calcio (capítulo 3, sección 3.3.2) presentan valores que no superan los 1.2 Pa·s después de velocidades de cizalla superiores a los 400 s^{-1}, siendo la de mayor viscosidad la mezcla de 50CaP. Para el caso de las suspensiones realizadas con alúmina (capítulo 2, sección 2.3.2) se obtuvieron viscosidades promedio de 0.48 Pa·s, 0.64 Pa·s y de 0.78 Pa·s, para 35Al, 40Al y 50Al respectivamente. Como se puede observar en la *figura 4-1(b)*, la viscosidad de 35CaP se encuentra alrededor de 0.8 Pa·s, valor que es superior a la viscosidad de la suspensión de alúmina con mayor carga cerámica (*figura 4-1(a)*). Como se mencionó en ambos capítulos, estos valores de viscosidades son adecuados para la impresión 3D por el método de estereolitografía cerámica ya que están por debajo de los valores reportados para suspensiones resina-cerámica para esta técnica (26,31). Para el caso de las suspensiones con alúmina, se utilizaron partículas de tamaño micrométrico, mientras que las partículas de fosfatos de calcio eran nanométricas, por lo que se hacía necesario el uso de un dispersante para evitar agregados y disminuir la viscosidad de las mezclas. Al ser partículas del orden de los nanómetros el área superficial que está en contacto con la resina es mayor, haciendo que la suspensión con menor carga cerámica de fosfatos de

calcio (35CaP) tenga una viscosidad superior a la de mayor carga cerámica de alúmina (50CaP). Sin embargo, para ambos tipos de partículas se conservan las proporciones de viscosidades entre los tres tipos de concentraciones, haciendo que sean las de mayor viscosidad aquellas que tienen porcentajes de partículas del 50 vol%.

Figura 4-1: Comparaciones comportamiento reológico entre las suspensiones de (a) Alúmina y (b) Fosfatos de calcio.



Nombre de la fuente: Carolina Duque Uribe

Para el caso de las contracciones volumétricas que sufren los scaffolds (*Tabla 4-1*), como se comentó en los capítulos 2 y 3, las mayores contracciones las sufren aquellos que tienen menor carga cerámica (35Al y 35CaP), lo cual era esperado pues presentan menores

cantidades de partículas cerámicas y mayor porcentaje de resina. En los scaffolds híbridos, cuando se someten al tratamiento térmico, la resina desaparece y las partículas tienden a juntarse propiciando la formación de cuellos del sinterizado.

En las muestras con partículas de alúmina, se evidenció que los scaffolds con mayores contracciones eran los de geometría Giroide, ya que involucran un volumen menor de material (o una porosidad mayor de 80.5%) comparado con la geometría Schwartz P (con porosidad de 25%). Sin embargo, eran los que menor cantidad de grietas presentaban después del tratamiento térmico ya que al no tener tanto volumen de material, como se mencionó, en la extracción de la resina no se generan tantos puntos de tensión. Por dicho motivo, se seleccionó la geometría Giroide para el trabajo con partículas de fosfatos de calcio y lograr así los objetivos general y específicos planteados en esta tesis.

Entre los scaffolds Giroide con partículas de alúmina y los de fosfatos de calcio, las contracciones volumétricas son mayores en los segundos, debido al tamaño de partícula utilizado, pues los fosfatos de calcio eran de tamaño nanométrico lo que hacía que la contracción para la formación de cuellos en el sinterizado fuera mayor. Dicho fenómeno también se ve en los grosores de paredes de los scaffolds, en donde los de fosfatos de calcio son menores después del proceso del sinterizado. Además, debe considerarse el hecho de que el sinterizado en los fosfatos de calcio se dio mejor que en la alúmina, ya que se evidencian más cuellos, propios del proceso térmico, en las imágenes SEM (*Figuras 2.9 y 3.10*).

En los ensayos mecánicos (*Tabla 4-1*) se observan dos comportamientos. Inicialmente para scaffolds giroide híbridos, es decir, aquellos que no han sufrido ningún tratamiento térmico para la eliminación de la resina y sinterizado del cuerpo verde, en el caso de la alúmina se presentan mejores resistencias mecánicas a la compresión comparado con los de fosfatos de calcio. Dicho comportamiento se debe a la naturaleza de la alúmina, pues al ser un material mucho más resistente y con mayor dureza (61), le confirió estas propiedades al scaffold del material compuesto. En el caso del módulo de Young vemos que los valores para el caso de los scaffolds híbridos de alúmina también son más altos ya que la alúmina les confiere mayor rigidez a las muestras.

Por otro lado, para los scaffolds completamente cerámicos, es decir, después del tratamiento térmico, se observa que la resistencia mecánica a la compresión y el módulo

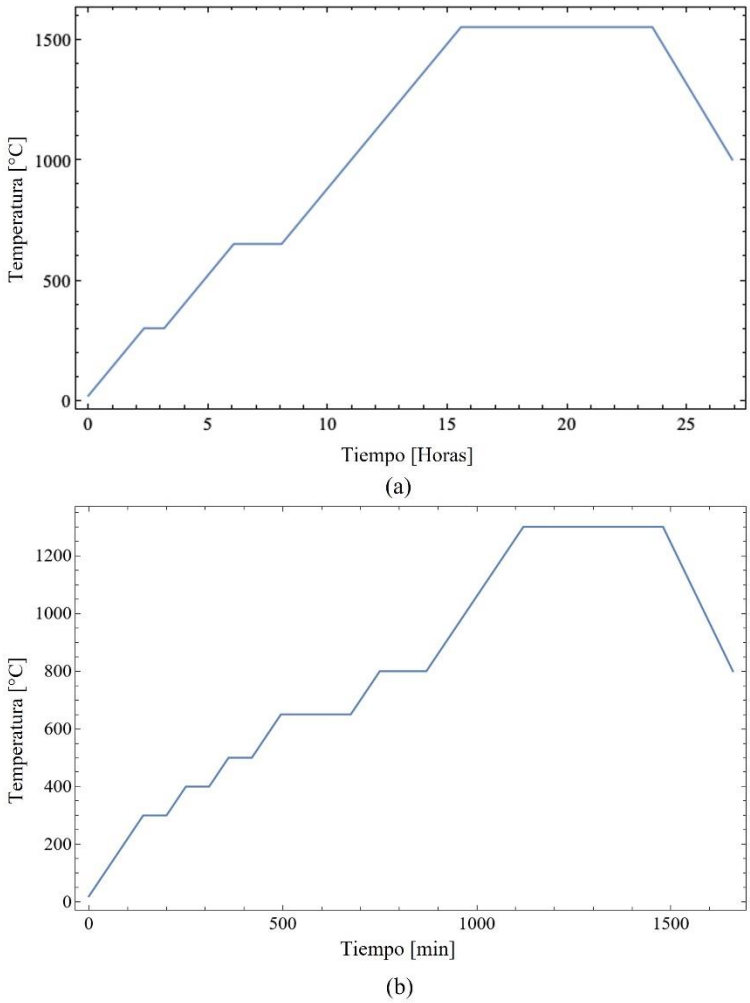
de Young es mejor para aquellos de partículas de fosfatos de calcio. Esto se atribuye al tratamiento térmico y al tamaño de partícula del material. Hay mejores resultados en el sinterizado para las muestras de fosfatos de calcio comparados con los de alúmina y éstos últimos presentan mayor cantidad de grietas generadas en el proceso de desaglomerado del polímero. Las partículas de fosfatos de calcio son de tamaño nanométrico, lo cual propicia mayor cantidad de puntos de unión entre las partículas, obteniendo un mejor sinterizado y por ende menos cantidad de poros y mejor comportamiento mecánico.

Si se comparan las curvas de los tratamientos térmicos de las muestras de alúmina (*Figura 4-2(a)*) y de fosfatos de calcio (*figura 4-2(b)*), se puede observar que para el caso de la alúmina, entre los 300 °C y 650 °C, temperaturas donde la resina se elimina completamente, no hay pausas y la rampa de calentamiento es continua, a diferencia de la curva de los fosfatos de calcio donde, entre dichas temperaturas, se observan pausas de 1 hora cada 100 °C. Dichas pausas, facilitan la salida lenta y controlada de la resina, sin generar tensiones abruptas en el cuerpo verde. Además, la temperatura de sinterizado de los fosfatos de calcio se logra alcanzar fácilmente en el horno utilizado (SA-1700X, Sentro tech corp, USA) y sin poner en riesgo el equipo, a diferencia de la alúmina en donde la temperaturas óptimas de sinterizado pueden llegar a ser de hasta 1700 °C la cual es la temperatura límite del horno utilizado, lo cual genera riesgos para el equipo. Después de los resultados obtenidos con la alúmina fue que se decidió mejorar la curva de tratamiento térmico para tener mejores resultados con los scaffolds de fosfatos de calcio.

Tabla 4-1: Valores de contracción volumétrica, resistencia máxima a la compresión y módulo de Young para los scaffolds con geometría giroide antes y después del sinterizado en las diferentes concentraciones de carga cerámica de Alúmina y Fosfatos de calcio.

Material	**Tipo**	**Contracción volumétrica**	**Resistencia mecánica**		**Módulo de Young**	
			Antes sinterizado	**Después sinterizado**	**Antes sinterizado**	**Después sinterizado**
Alúmina	35Al	58,4%	13,8 ± 0,9	0,4 ± 0,2	248 ± 28	1.2 ± 0.5
	40Al	51,4%	15 ± 1	0,26 ± 0,05	213 ± 17	2.0 ± 1.4
	50Al	43,5%	17 ± 2	0,46 ± 0,06	223 ± 28	5.7 ± 2.9
Fosfatos de calcio	35CaP	79,40%	4 ±1	0,83 ± 0,06	75 ± 21	34 ± 17
	40CaP	72,10%	3,2 ±0,5	0,9 ± 0,2	50 ± 12	32 ± 16
	50CaP	68,80%	3,4 ± 0,6	0,9 ± 1	57 ± 6	40 ± 13

Figura 4-2: Comparaciones en las curvas de tratamiento térmico para los scaffolds de (a) Alúmina y (b) Fosfatos de calcio.



Nombre de la fuente: Carolina Duque Uribe.

Finalmente, al ser la alúmina un cerámico inerte y no tener propiedades de bioactividad, con el fin de potenciar los scaffolds de dicho material, se les hizo impregnación con extractos etanólico de propóleo de la región de Arauca, Colombia, para conferirle propriedades antibacterianas a los scaffolds haciendo que sean potencialmente útiles para aplicaciones biomédicas en la regeneración de tejido óseo, teniendo geometrías que favorecen la proliferación como lo son las TPMS. En el caso de los fosfatos de calcio, se conocen sus grandes propiedades de biocompatibilidad y bioactividad, haciéndolo un material adecuado y muy prometedor para la regeneración ósea. La impregnación con los

mismos extractos de propóleo potencia el material no solo por la actividad bactericida que genera sino también por la mejora en la proliferación celular, como se pudo observar en los resultados presentados en el capítulo 3. Se destaca el hecho de que el extracto de propóleo utilizado tuvo efectos sobre la cepa S. Aureus, la cual es una cepa multirresistente y es una de las que causa mayores cantidades de infecciones en pacientes y tratamientos asociados a las reparaciones o injertos óseos debido a su facilidad de mutar y su alta resistencia a los tratamientos. Po lo anterior, el uso del propóleo en conjunto con los scaffolds de materiales aptos para aplicaciones biomédicas como la alúmina o los fosfatos de calcio es bastante prometedor para proporcionar efectos antimicrobianos y a su vez generar efectos antiinflamatorios y antioxidantes, los cuales son necesarios para los procesos de sanación disminuyendo los tiempos de recuperación.

Los scaffolds cerámicos con geometrías tipo TPMS giroide, impresos por estereolitografía cerámica, de ambos tipos de cerámicos son potenciales para aplicaciones en la regeneración ósea por sus propiedades mecánicas y biológicas.

5. Conclusiones generales y recomendaciones

5.1 Conclusiones

En el desarrollo de esta tesis fue posible la implementación y profundización del conocimiento en la técnica de estereolitografía, DLP y estereolitografía cerámica incrementando así las fortalezas del Grupo de Investigación en Materiales Cerámicos y Vítreos en el área de procesamiento de materiales. Así mismo, se afianzaron las colaboraciones con personal de las empresas New Stetic y Sumicol (Corona) y el grupo GIOM de la Universidad Cooperativa de Colombia.

Se emplearon partículas de Alúmina de carácter comercial y tamaño micrométrico para desarrollar scaffolds con geometrías complejas tipos TPMS giroide y Schwartz P a través de la técnica de estereolitografía cerámica, utilizando una resina comercial de naturaleza acrílica con altas cargas cerámicas de 35, 40 y 50 vol%. Las mayores resistencias mecánicas las presentaron los scaffolds híbridos (resina/alúmina) con geometría giroide, lo cual potencia la técnica para aplicaciones que requieran piezas con resistencias mecánicas significativas. Los scaffolds sinterizados con 50Al presentaron resistencias a la compresión de 0.46 ± 0.06 MPa, cuyos valores son comparables con los reportados para el hueso trabecular. Estos scaffolds fueron impregnados con extractos de propóleo de Arauca, Colombia que les confirieron propiedades antibacterianas. De esta forma los scaffolds de alúmina obtenidos se potencian para la creación de piezas para aplicaciones biológicas enfocadas a la regeneración de tejido óseo.

Se desarrollaron andamios cerámicos, utilizando partículas de fosfatos de calcio, sintetizadas por el método de autocombustión, con una geometría tipo TPMS giroide a través de la técnica de DLP utilizando una suspensión de resina comercial de naturaleza acrílica con altas cargas cerámicas de 35, 40 y 50 vol%. Se produjeron cuerpos híbridos y cerámicos con geometrías complejas tipo TPMS giroide las cuales garantizan la interconectividad, el control del porcentaje y tamaño de poros para ser implementados en aplicaciones biológicas de regeneración ósea. Los scaffolds presentaron porosidades del 80.5%, después del proceso de sinterizado.

Los scaffolds híbridos presentaron mayores valores de resistencia mecánica a la compresión y módulos de Young. Los valores reportados son comparables con los del hueso esponjoso, por lo que estos scaffolds híbridos son prometedores para aplicaciones de reparaciones óseas en donde se requiera soportar cargas similares con un material que no sufre degradación en el medio fisiológico en el tiempo. Los scaffolds totalmente cerámicos presentaron valores menores de resistencia a la compresión debido a las fisuras formadas en el proceso de contracción que se presenta por la eliminación de la resina. Sin embargo, estos valores, pese a ser más bajos, coinciden con los reportados para el hueso esponjoso y cortical, por lo que también son altamente prometedores para aplicaciones en reparaciones del tejido óseo donde se requiera un material bioactivo.

Los scaffolds completamente cerámicos de 50CaP fueron impregnados exitosamente con extractos etanólicos de propóleo provenientes de Arauca, Colombia, demostrando que el material con y sin propóleo no presenta efectos tóxicos sobre las células L929 y que existe una mejor respuesta de crecimiento celular en aquellos que están impregnados.

Este trabajo viabiliza la posibilidad de utilizar la técnica de estereolitografía cerámica para obtener cuerpos completamente cerámicos, con geometrías complejas que son imposibles de obtener por métodos de procesamiento tradicional.

1.1 Recomendaciones

Los resultados encontrados en este trabajo representan un punto de partida para seguir ampliando el conocimiento en el campo de la regeneración ósea y la impresión por estereolitografía. Sin embargo, existen algunas recomendaciones que requieren ser abordadas en el futuro:

Se recomienda realizar estudios que aborden otras metodologías de impresión 3D para lograr una estandarización frente al proceso de fabricación de andamios cerámicos e híbridos, ya que, aunque la técnica de estereolitografía mostró un rendimiento bastante satisfactorio, resulta ser un proceso en ocasiones problemático y complejo para obtener las muestras.

Se recomienda mejorar la curva del tratamiento térmico para la producción de los scaffolds de alúmina, ya sea incluyendo más pausas durante las temperaturas de desaglomerado del polímero, aumentando la temperatura final para el sinterizado del cuerpo cerámico o abordando otra metodología para evitar la presencia de tantas grietas y fisuras en los cuerpos cerámicos completamente.

Es importante evaluar diferentes parámetros en la creación de los modelos CAD de las geometrías tipo TPMS como el tamaño de poros o el porcentaje de porosidad, estudiar los efectos de otros modelos interconectados, así como diferentes parámetros de impresión. Esto puede traer efectos positivos para los acabados superficiales de las muestras y las respuestas mecánicas y biológicas de los andamios.

Se recomienda realizar más estudios en los cuales se evalúe la acción antibacteriana de los extractos etanólico de los propóleos en los scaffolds cerámicos frente a cultivos multiespecie más elaborados, pues el control de esto presenta retos sanitarios grandes en la actualidad. Aunque a la fecha existen algunos estudios que han mostrado cierto efecto de los extractos etanólicos de propóleos frente a cepas multirresistentes de *S. aureus*¸ es importante corroborar que este efecto se mantiene al modificar andamios para inserción ósea con estos agentes.

Adicionalmente, es importante evaluar el efecto de los andamios con y sin los extractos de propóleos en cultivos celulares expuestos durante más tiempo para comprender completamente la interacción del material y de la estructura del scaffold en el tiempo, en donde se garantice las características de resistencia mecánica y que estas sigan siendo adecuadas mientras el hueso se regenera. Posteriormente, es necesario realizar estudios *in vivo* que permitan evaluar el comportamiento de los andamios en un organismo vivo y demostrar su potencial aplicación.

Se recomienda también explorar la técnica de estereolitografía cerámica como una alternativa viable para para obtener piezas de geometrías complejas en aplicaciones diferentes a las biológicas.

A. Anexo: Caracterización de la resina

En este anexo se presenta la metodología detallada y los resultados obtenidos de la caracterización que se le realizó a la resina proporcionada por la empresa New Stetic la cual se usó para las suspensiones tanto con alúmina como con fosfatos de calcio para el proceso de impresión por estereolitografía cerámica. En el capítulo 2 y el capítulo 3 se mencionan los resultados de dicha caracterización, la cual fue crucial como paso previo para el desarrollo de esta tesis, pues era necesario conocer la naturaleza de la resina sin ninguna carga cerámica.

Adicional, en este anexo se presenta un artículo de investigación publicado en el año 2023 (67) llamado "*Obtaining biocompatible polymeric scaffolds loaded with calcium phosphates through the digital light processing technique*", el cual también fue producto de esta tesis. Dicha investigación se desarrolló con el fin de adquirir habilidades con la técnica de impresión 3D por estereolitografía y adiciones de cantidades bajas (0.5 y 1 vol%) de partículas cerámica, específicamente fosfatos de calcio. Es en este trabajo donde se publicaron los resultados de la caracterización de la resina que se enunciarán a continuación.

Metodología para la caracterización de la resina

Para la realización de las suspensiones de alúmina (Capitulo 2) y de fosfatos de calcio (Capitulo 3) se utilizó una resina comercial Portux Print 3D Model sin pigmentar proporcionada por la empresa New Stetic (Guarne, Antioquia, Colombia), la cual se sometió a diferentes caracterizaciones: se realizó termogravimetría (TGA) a una probeta de resina curada en un equipo TA Instruments Discovery 550 con atmósfera de aire y una rampa de calentamiento de 10 °C/ min hasta 1000 °C. Se realizó espectroscopía infrarroja

por transformada de Fourier (FTIR), en un equipo Shimadzu IRTracer-100 con un accesorio para medir la transmitancia, antes y después de curar. Los espectros se adquirieron en un rango espectral de 500-4000 cm^{-1}. Se midió la viscosidad de la resina líquida, con un viscosímetro de rotación (LCD digital NDJ-8S) con una velocidad de 60 rpm con un rotor #3.

En el trabajo, aparte de la caracterización de la resina sin carga cerámica, se le hicieron pruebas a scaffolds de sólo resina. Se les realizó un ensayo de bioactividad in vitro, pruebas de citotoxicidad y adhesión celular.

Para probar la bioactividad *in vitro* se utilizó fluido fisiológico simulado (SBF). Las pastillas del material se suspendieron independientemente en recipientes de polietileno sellados conteniendo 20 mL de SBF a pH entre 7.25 y 7.35 y se almacenaron a 37 °C. las muestras estuvieron sumergías en un periodo de hasta 18 días. Después de los distintos tiempos de inmersión, las muestras se retiraron del recipiente, se lavaron con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente. El análisis de la superficie y la presencia de la fase apatítica se evaluó por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM) en el microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM 6490 LV, JEOL, Alemania) en alto vacío.

La prueba de citotoxicidad se hizo con MTT siguiendo la norma ISO 10993-5-2009, con la línea celular L929 (*NCTC clone 929 [L cell, L-929, derivative of Strain L]) ATCC Nr. CCL-1*. En pozos de un plato de 96 pozos se sembraron 10.000 células utilizando como medio DMEM: F12 (Lonza, suiza) al 10% v/v de suero bovino fetal (Gibco, USA). Se hicieron extractos de las muestras previamente esterilizados siguiendo la relación de 1 mL de medio por cada mg de peso. El segundo día se eliminó el medio de cada pozo con cultivo y se depositaron los extractos en concentraciones del 100%, 75%, 50% y 25% v/v. Cada uno de éstos al igual que los controles y blanco se hicieron por triplicado. En el tercer y último día se eliminaron los extractos, se agregó el MTT (Alfa Aesar, USA) y pasado un tiempo se midió la absorbancia de cada pozo comparando con respecto a los blancos. Adicional a las mediciones de absorbancia con el MTT, se hizo una prueba de contacto para corroborar la citotoxicidad, basada en la misma norma, verificando la aparición de halos alrededor de las muestras.

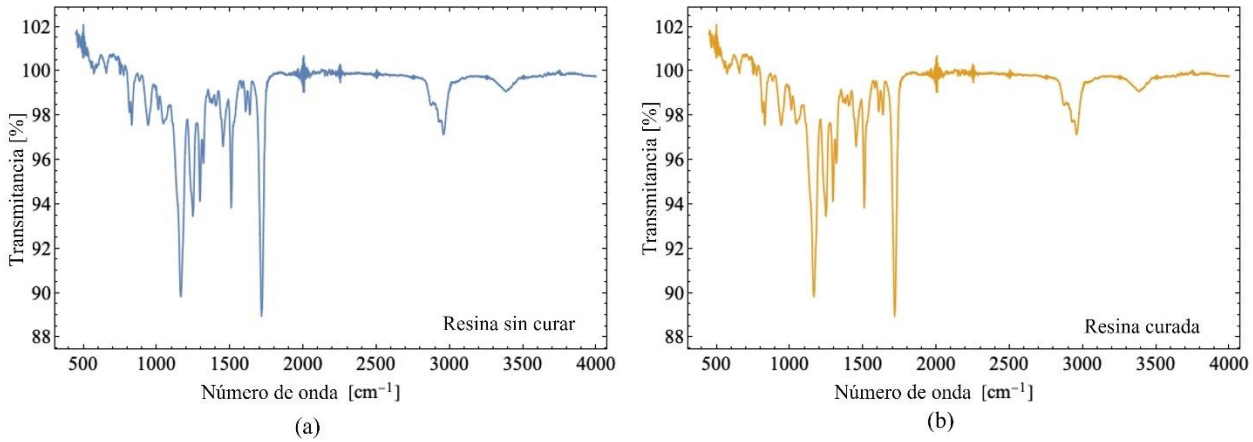
Para comprobar la adhesión de la línea celular L929 en los scaffolds se depositaron 1.000.000 de células y se dejaron incubando. El experimento estuvo bajo observación durante 8 días y se observaron los cultivos tanto al tercer día a través de fluorescencia con tinción con solución de calceína como al octavo día fijando las células y observándolas con un microscopio electrónico de barrido (SEM) (JEOL JSM 6490 LV, JEOL, Alemania) en alto vacío.

Resultados de la caracterización

En la *figura 4-1* se presentan los resultados del FTIR que se le realizó a la resina antes y después de ser curadas por la luz UV de la máquina de estereolitografía, con un rango entre 500 y 4000 cm^{-1}. Se observó que entre ambos espectros hay bastantes similitudes, y no permite evidenciar formaciones de grupos funcionales durante el proceso de curado. En los espectros se evidencian bandas a 1717 cm-1, a 1638 cm-1 y a 832 cm-1, los cuales se les atribuyen a las vibraciones de los enlaces C=0, C=C y C-H, respectivamente. Estas bandas son propias de los grupos acrílicos, lo que indicó que la resina es de naturaleza acrílica pues posee principalmente oligómeros acrílicos y no hay otros grupos funcionales que se destaquen.

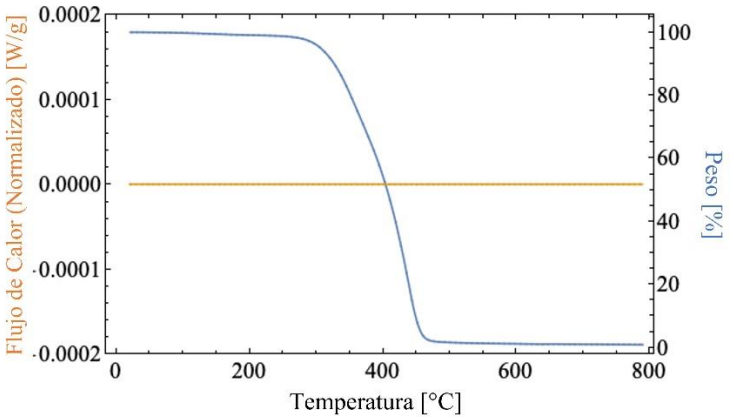
En la *figura 4-2* se presenta el análisis termogravimétrico (TGA) de muestras en forma de pastillas realizadas por la una máquina de estereolitografía que funciona bajo la metodología DLP marca WanHao con referencia WanHao Duplicator 7. La descomposición térmica del polímero se dio entre los 260 °C y los 470 °C. Las pérdidas de masa son más significativas entre los 300 °C y los 470 °C. Como se mencionó en el capítulo 2 para el caso de la suspensión 50Al y en el capítulo 3 para la suspensión de 50CaP, el comportamiento térmico de las suspensiones es igual, no presenta variaciones en la descomposición de la resina, indicando que la carga cerámica, independiente del tipo que sea, no afecta el desaglomerado del polímero.

Figura 5-1: FTIR resina comercial. (a) Resina sin curar (b) Resina curada.



Nombre de la fuente: Carolina Duque Uribe. Resultado presentado en (67).

Figura 5-2: Análisis termogravimétrico de resina comercial.



Nombre de la fuente: Carolina Duque Uribe. Resultado presentado en (67).

En la prueba de bioactividad in vitro, la muestra que no tenía carga cerámica (sólo resina) no formó ninguna capa de apatita en la superficie indicando que la resina no tiene propiedades bioactivas. Sin embargo, en los experimentos de citotoxicidad realizados con la línea celular L929 se observó que la viabilidad celular no se ve afectada, por lo que no se genera toxicidad para los organismos biológicos y provee un entorno favorable para el crecimiento y la proliferación celular. Así mismo, en el ensayo de adhesión se comprobó la biocompatibilidad de la resina, mostrando que la proliferación celular se da cuando hay mayor presencia de partículas cerámicas de fosfatos de calcio.

Para mirar el estudio completo remitirse a (67).

Journal of MATERIALS RESEARCH

Article
DOI:10.1557/s43578-023-01144-0

3D PRINTING FOR MEDICAL APPLICATIONS

FOCUS ISSUE

Obtaining biocompatible polymeric scaffolds loaded with calcium phosphates through the digital light processing technique

Carolina Duque[1], Carlos Andrés Gómez-Tirado[1], Sebastián Ocampo[1], Liliana María Arroyave-Muñoz[2], Luz Marina Restrepo-Munera[2], Andrés Felipe Vásquez[3], Alex Ossa[4], Claudia García[1,a)]

[1] Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia
[2] Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
[3] Newstetic, Guarne, Colombia
[4] School of Applied Sciences and Engineering, Universidad Eafit, Medellín, Colombia
[a)] Address all correspondence to this author. e-mail: cpgarcia@unal.edu.co

Received: 12 May 2023; accepted: 8 August 2023

In the present work, scaffolds with gyroid TPMS geometry were obtained from a commercial resin of acrylic nature loaded with 0.5% and 1% w/V of calcium phosphate nanoparticles through DLP. The scaffolds obtained presented Young's Modulus between 300 and 400 MPa, which makes them suitable for bone applications. The surface treatment by oxygen plasma carried out on the scaffolds resulted in a notable improvement in the wettability of the surfaces, which favours cell adhesion on the surface of the materials. The in vitro bioactivity assay conducted on the resin/calcium phosphate particles composite material showed that an apatitic layer forms on the surface of the samples from the third day of exposure to simulated body fluid (SBF), indicating that the composite material has in vitro bioactive behaviour. Biological tests demonstrated that the material is not cytotoxic and favours cell adhesion and that the gyroid geometry promotes cell proliferation.

Introduction

The incidence of fractures in the population is considered to present one peak in young people and another in older adults. In the young population, fractures are generally associated with significant trauma, which typically occur in long bones and being more frequently in men than in women. In the case of older adults, one in two women and one in five men will experience a fracture that will have a lasting impact on their lives due to diseases such as osteoporosis [1]. In the year 2000, there were an estimated 9 million new fractures caused by osteoporosis, of which 1.6 million were in the hip, 1.7 million in the forearm, and 1.4 million were clinically diagnosed vertebral fractures. [1–3]. Currently, bone fractures, degenerative diseases, and various neoplastic diseases are the most common clinical problems associated with the bone and skeletal system [4]. Most of these cases need to be treated with surgery, requiring the use of implantable devices with custom sizes and shapes, with a latent risk for bacterial infections, the main cause of bone implant failure [5, 6]. In response to the need for substitute manufacturing methods for bone grafts, additive manufacturing technologies have been used to create structures that can be used as replacements that mimic the characteristics of the extracellular matrix of the affected organs or tissues [7, 8]. Tissue engineering enables strategies to be used for the deposition of cells in natural or artificial structures, known as scaffolds and their subsequent implantation [9].

Scaffolds must have high porosity and well-distributed and interconnected pores to facilitate cell penetration, nutrient diffusion, vascular growth, and other processes. Triply Periodic Minimal Surfaces (TPMS) are well suited for use in scaffold manufacture since they have the optimal relationship between stiffness and porosity levels to facilitate cell growth [10]. Geometric characteristics of scaffolds such as surface curvature, pore size, and shape have been shown to have a major influence

© The Author(s), 2023

B. Anexo: Síntesis de nanoestructuras de fosfatos de calcio por autocombustión en solución

En este anexo se presenta información y la metodología detallada del proceso de autocombustión o combustión en solución para la formación de las nanopartículas de fosfatos de calcio las cuales fueron utilizadas y caracterizadas en el trabajo presentado en el *capítulo 3* de esta tesis. Esta metodología se ha utilizado continuamente en el laboratorio y grupo de investigación de cerámicos y vítreos de la Universidad nacional de Colombia, y ha sido enunciada en el trabajo "*Synthesis of calcium phosphate nanostructures by combustion in solution as a potential encapsulant system of drugs with photodynamic properties for treatment of cutaneous leishmaniasis*" (138).

Como fue enunciado en el capítulo 3, sección 2, subsección 2.1 *"Resina y partículas de fosfatos de calcio",* las nanoestructuras de fosfatos de calcio fueron sintetizadas por la vía de autocombustión. Para eso se utilizó Nitrato de calcio tetrahidratado $Ca(NO_3)24H_2O$ (Merck) e Hidrógeno Fosfato di amónico $(NH_4)_2HPO_4$ (Alfa Aesar) como precursores de calcio y fosforo, respectivamente. Como combustible se utilizó Glicina $C_2H_5NO_2$ (Merck) y como catalizador se utilizó ácido nítrico HNO_3. Inicialmente se mezcla el nitrato de calcio tetrahidratado y el Hidrógeno fosfato di amónico en 20 mL de agua destilada bajo agitación constante manteniendo una relación de Ca/P de 1,5. Para disolver el precipitado que se formó, se añade HNO_3 (alrededor de 10 mL).

En las rutas de combustión, los nitratos son por lo general los principales precursores escogidos debido a su buena solubilidad. Los grupos NO_3 de éstos actúan como agentes oxidantes. En el caso en que se requieran agentes oxidantes extras, se utiliza el nitrato de

amonio (NH_4NO_3), el cual aumenta el gas en la combustión por lo que se incrementa el área superficial de los polvos producidos (152). Para el caso del combustible, se debe cumplir que éste sea soluble en agua, que tenga bajas temperaturas de ignición, que libere gran cantidad y gases y no deje compuestos residuales durante la combustión (153).

El combustible que se seleccione para el proceso posee la propiedad de intervenir sobre los enlaces CH, aceptando electrones mientras que un oxidante es la sustancia que ayuda a la combustión proveyendo el oxígeno (como donante de electrones). Cuando la mezcla de combustible y oxidante es la adecuada, se da lugar a una reacción exotérmica a la temperatura de ignición. Para adicionar la cantidad adecuada de combustible (En este caso Glicina) y obtener la temperatura máxima de combustión, se utilizó el parámetro φ definido en la *ecuación B-1*, y ajustado a la relación de coeficientes estequiométricos (Ecuación B-2) oxido-combustible siendo φ=1, lo que corresponde a una relación estequiométrica con especies reductoras y oxidantes equilibradas.

$$\varphi = \frac{oxidante}{combustible}$$ Ecuación 5-1

$$\varphi = \frac{\sum coeficiente\ elementos\ reductores\ x\ valencia}{(-1) * \sum coeficiente\ elementos\ oxidantes\ x\ valencia}$$ Ecuación 5-2

Cuando la glicina fue añadida, la solución se agitó a una temperatura de 60 °C hasta la evaporación casi total del solvente para que se diera la formación del gel. Posteriormente se aumentó la temperatura a 140 °C hasta la combustión. A diferencia del procedimiento presentado en (138), en esta tesis las cenizas no fueron tratadas térmicamente, sino que fueron utilizadas directamente para las mezclas e impresión. A éstas se les hizo un macerado manual durante 5 minutos y un proceso de desaglomerado en un molino de bolas (Retsch PM 100) tratándolas durante 15 minutos a 250 rpm con intervalos de 5 minutos e inversión de giro.

C. Anexo: Articulo 1.

Materials Today Communications 40 (2024) 109535

Contents lists available at ScienceDirect

Materials Today Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mtcomm

Production of ceramic alumina scaffolds via ceramic stereolithography with potential application in bone tissue regeneration

Carolina Duque-Uribe [a], Valentina López-Vargas [a], Ana Isabel Moreno-Florez [a], Alejandro Pelaez-Vargas [b], Alex Ossa [c], Carolina Cárdenas-Ramírez [d], Sebastián Restrepo-Vélez [d], Andrés Felipe Vásquez [e], Claudia Garcia [a,*]

[a] Universidad Nacional de Colombia, Carrera 65 No. 59A-100, Medellín 050034, Colombia
[b] Universidad Cooperativa de Colombia, Carrera 47 No 37 Sur – 18 Envigado, Antioquia, 055428, Colombia
[c] School of Applied Sciences and Engineering, Universidad Eafit, Carrera 49 No 7Sur –50, Medellín 050022, Colombia
[d] Grupo de Investigación Industrial en Diseño de Materiales a partir de Minerales y Procesos (IDIMAP), Sumicol S.A.S, Carrera 48 #72 sur-01, Medellín 050022, Colombia
[e] Newstetic, Carrera 53 No 50-09 Guarne, Antioquia 054050, Colombia

ARTICLE INFO

Keywords:
Alumina
Scaffolds
Ceramic stereolithography
TPMS
Gyroid geometry

ABSTRACT

Scaffolds are devices that mimic the characteristics of the extracellular matrix; they are highly porous, with well-distributed and interconnected pores. Tissue engineering proposes scaffolds as an alternative treatment for different diseases and injuries affecting bone tissue. Triply periodic minimal surfaces (TPMS) are geometric structures whose characteristics fit well with the scaffold's requirements. Ceramic stereolithography enables the production of these complex geometries with high precision using ceramic materials. Alumina (Al_2O_3) is a well-known ceramic material appreciated for its chemical and mechanical stability properties. The biomedical use of alumina as an alternative to replace metallic parts in bone components has been increasing. In this work, a suspension of alumina particles in a photopolymerizable resin is developed in order to be implemented in the printing of ceramic scaffolds with TPMS-type geometries by ceramic stereolithography for potential biomedical applications. The resin used was characterized in a different work by TGA and FTIR (Duque et al., 2023) and is acrylic in nature, also the alumina particles were characterized by DTP and XRD, these are micrometer sized and a showed an α-alumina phase with a high degree of crystallinity. The rheological behavior of the suspension was studied with ceramic load percentages of 35, 40, and 50 vol% in order to choose the most favorable conditions for piece printing. The three suspensions presented low viscosities, being the 50 vol% sample the one that presented the highest viscosity, with an average value of 0.77 Pa s. These viscosities were suitable for the ceramic stereolithography printing process. The 50 vol% suspension was characterized by TGA and DSC and did not show any difference compared to the resin without particles. Scaffolds with TPMS Gyroid and Schwartz P geometry were obtained by ceramic stereolithography and characterized morphologically and mechanically before and after sintering. The thermal treatment was successful. The polymer-ceramic scaffolds before sintering exhibited better compression resistance than the sintered ones. Fully ceramic scaffolds with gyroid geometry showed compressive strength values of 0.4 MPa, which is comparable to human trabecular bone. The best compression resistance was for the samples with the gyroid geometry. Since the 50 vol% sintered scaffolds with gyroid geometry showed better mechanical results, they were impregnated with propolis extracts from the Arauca region of Colombia in order to evaluate their antimicrobial activity against the standard strains Staphylococcus aureus (ATCC 29212) and Escherichia coli (ATCC 25922). The evaluated scaffolds exhibited better antibacterial activity against the S. aureus strain. After sintering, the 50Al scaffolds were submitted to a degradation test in phosphate-buffered saline (PBS) to assess the chemical stability of the alumina. The results indicated that the samples maintained their initial weight throughout the testing period, with measurements taken on days 1, 5, 8, and 12 showing no significant changes in weight loss percentage. This stability suggests that the alumina scaffolds possess robust chemical resistance under the tested conditions.

* Corresponding author.
E-mail address: cpgarcia@unal.edu.co (C. Garcia).

https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2024.109535
Received 11 March 2024; Received in revised form 21 May 2024; Accepted 9 June 2024
Available online 10 June 2024
2352-4928/© 2024 Published by Elsevier Ltd.

D. Anexo: Articulo 2.

Open Ceramics

Obtaining Biocompatible Ceramic Scaffolds of Calcium Phosphates through Ceramic Stereolithography.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Obtaining Biocompatible Ceramic Scaffolds of Calcium Phosphates through Ceramic Stereolithography.
Short Title:	
Article Type:	Full Length Article
Keywords:	Calcium Phosphate; Scaffolds; Ceramic Stereolithography
Corresponding Author:	Claudia Garcia Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín COLOMBIA
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Carolina Duque-Uribe
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Carolina Duque-Uribe
	Valentina López Vargas
	Felipe Benavides
	Ana Isabel Moreno Florez
	Alejandro Pelaez-Vargas
	Alex Ossa
	Carolina Cárdenas-Ramírez
	Sebastián Restrepo-Vélez
	Andrés Felipe Vásquez
	Claudia Garcia
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	Scaffolds for bone tissue regeneration were fabricated using ceramic stereolithography with TPMS-based designs, incorporating an acrylic-based resin with calcium phosphate nanoparticles. Nanoparticles of hydroxyapatite and β-TCP were synthesized via self-combustion and used in suspensions of 35, 40, and 50 vol%, stabilized with a dispersant. Rheological characterization confirmed suitable viscosities for 3D printing, with the 50CaP suspension exhibiting the highest viscosity. Green bodies were evaluated morphologically and mechanically pre- and post-sintering, revealing significant volumetric shrinkage and structural changes assessed via digital and FE-SEM imaging, as well as compressive strength testing. Hybrid scaffolds demonstrated superior strength prior to sintering, achieving compressive strengths up to 0.9 MPa, comparable to natural bone. Optimal scaffolds (50CaP) underwent degradation studies in PBS and were impregnated with ethanolic propolis extract from Arauca, Colombia, for biological analysis using L929 cells. This study highlights ceramic stereolithography as an effective method for producing scaffolds tailored for bone tissue engineering applications
Suggested Reviewers:	Miguel A. Rodriguez Barbero

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

Bibliografía

1. González LA, Vásquez GM, Molina JF. Epidemiología de la osteoporosis. 2009;16(1):15.

2. Asociación Colombiana de Osteoporosis y Metabolismo Mineral con el apoyo de la Fundación de Apoyo al Reumático, FUNDARE, 2017.

3. Felice B, Sánchez MA, Socci MC, Sappia LD, Gómez MI, Cruz MK, et al. Controlled degradability of PCL-ZnO nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering and their antibacterial activity. Materials Science and Engineering: C. diciembre de 2018;93:724-38.

4. Ribeiro M, Ferraz MP, Monteiro FJ, Fernandes MH, Beppu MM, Mantione D, et al. Antibacterial silk fibroin/nanohydroxyapatite hydrogels with silver and gold nanoparticles for bone regeneration. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. enero de 2017;13(1):231-9.

5. Ramírez JA, Ospina V, Rozo AA, Viana MI, Ocampo S, Restrepo S, et al. Influence of geometry on cell proliferation of PLA and alumina scaffolds constructed by additive manufacturing. J Mater Res. 28 de noviembre de 2019;34(22):3757-65.

6. Okada T, Uto K, Aoyagi T, Ebara M. 3D Printing Porous Ceramic Scaffold for Bone Tissue Engineering: A Review. Biomater Sci. 2016;4(1):96-103.

7. Tortolini P, Rubio S. Diferentes alternativas de rellenos óseos. Avances en Periodoncia. diciembre de 2012;24(3):133-8.

8. Schmidleithner C, Malferrari S, Palgrave R, Bomze D, Schwentenwein M, Kalaskar DM. Application of high resolution DLP stereolithography for fabrication of tricalcium phosphate scaffolds for bone regeneration. Biomed Mater. 1 de julio de 2019;14(4):045018.

9. Zhang H, Jiao C, Liu Z, He Z, Mengxing Ge, Zongjun Tian, et al. 3D-printed composite, calcium silicate ceramic doped with $CaSO_4 \cdot 2H_2O$: Degradation performance and biocompatibility. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials. septiembre de 2021;121:104642.

10. Feng C, Zhang K, He R, Ding G, Xia M, Jin X, et al. Additive manufacturing of hydroxyapatite bioceramic scaffolds: Dispersion, digital light processing, sintering, mechanical properties, and biocompatibility. J Adv Ceram. junio de 2020;9(3):360-73.

11. Zhu H, Li M, Huang X, Qi D, Nogueira LP, Yuan X, et al. 3D printed tricalcium phosphate-bioglass scaffold with gyroid structure enhance bone ingrowth in challenging bone defect treatment. Applied Materials Today. diciembre de 2021;25:101166.

12. Ge Z, Jin Z, Cao T. Manufacture of degradable polymeric scaffolds for bone regeneration. Biomed Mater. junio de 2008;3(2):022001.

13. Özcan M, Hotza D, Fredel MC, Cruz A, Volpato CAM. Materials and Manufacturing Techniques for Polymeric and Ceramic Scaffolds Used in Implant Dentistry. J Compos Sci. 11 de marzo de 2021;5(3):78.

14. Szymczyk-Ziółkowska P, Łabowska MB, Detyna J, Michalak I, Gruber P. A review of fabrication polymer scaffolds for biomedical applications using additive manufacturing techniques. Biocybernetics and Biomedical Engineering. abril de 2020;40(2):624-38.

15. Ly M, Spinelli S, Hays S, Zhu D. 3D Printing of Ceramic Biomaterials. Engineered Regeneration. marzo de 2022;3(1):41-52.

16. Esteves AVM, Martins MI, Soares P, Rodrigues MA, Lopes MA, Santos JD. Additive manufacturing of ceramic alumina/calcium phosphate structures by DLP 3D printing. Materials Chemistry and Physics. enero de 2022;276:125417.

17. Liu S, Mo L, Bi G, Chen S, Yan D, Yang J, et al. DLP 3D printing porous β-tricalcium phosphate scaffold by the use of acrylate/ceramic composite slurry. Ceramics International. agosto de 2021;47(15):21108-16.

18. Bi G, Mo L, Liu S, Zhong X, Yang J, Yuan Z, et al. DLP printed β-tricalcium phosphate functionalized ceramic scaffolds promoted angiogenesis and osteogenesis in long bone defects. Ceramics International. 15 de septiembre de 2022;48(18):26274-86.

19. Ríos-Díaz J, Linares Hevilla FJ, Martínez-Payá JJ, Palomino Cortés MÁ, Del Baño Aledo ME. Arquitectura y organización interna del hueso ante la aplicación de diferentes estímulos mecánicos. Fisioterapia. julio de 2008;30(4):194-203.

20. D. S, C. R. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. European Spine Journal. 1 de octubre de 2001;10(0):S86-95.

21. Caeiro JR, González P, Guede D. Biomecánica y hueso (y II): ensayos en los distintos niveles jerárquicos del hueso y técnicas alternativas para la determinación de la resistencia ósea. Rev Osteoporos Metab Miner. junio de 2013;5(2):99-108.

22. Henkel J, Woodruff MA, Epari DR, Steck R, Glatt V, Dickinson IC, et al. Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions — A 21st Century Perspective. Bone Res. 25 de septiembre de 2013;1(3):216-48.

23. Megías, M. Molist, P. Pombal, MA. Tejidos animales. Tejido óseo. Atlas de Histología Vegetal y Animal [Internet]. [citado 14 de agosto de 2024]. Disponible en: https://mmegias.webs.uvigo.es/guiada_a_oseo.php

24. Gong H, Zhu D, Gao J, Lv L, Zhang X. An adaptation model for trabecular bone at different mechanical levels. 2010;

25. Fallahiarezoudar E, Ahmadipourroudposht M, Idris A, Mohd Yusof N. A review of: Application of synthetic scaffold in tissue engineering heart valves. Materials Science and Engineering: C. marzo de 2015;48:556-65.

26. Melchels FPW, Feijen J, Grijpma DW. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. Biomaterials. agosto de 2010;31(24):6121-30.

27. Mallick M, Are RP, Babu AR. An overview of collagen/bioceramic and synthetic collagen for bone tissue engineering. Materialia. 1 de mayo de 2022;22:101391.

28. Melek LN. Tissue engineering in oral and maxillofacial reconstruction. Tanta Dental Journal. septiembre de 2015;12(3):211-23.

29. Gibson I, Rosen D, Stucker B. Additive Manufacturing Technologies [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2015 [citado 14 de septiembre de 2022]. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2113-3

30. Yang L, Miyanaji H. CERAMIC ADDITIVE MANUFACTURING: A REVIEW OF CURRENT STATUS AND CHALLENGES. :28.

31. Zakeri S, Vippola M, Levänen E. A comprehensive review of the photopolymerization of ceramic resins used in stereolithography. Additive Manufacturing. octubre de 2020;35:101177.

32. Halloran JW. Ceramic Stereolithography: Additive Manufacturing for Ceramics by Photopolymerization. Annu Rev Mater Res. 1 de julio de 2016;46(1):19-40.

33. J. Deckers. Additive Manufacturing of Ceramics: A Review. J Ceram Sci Tech [Internet]. 2014 [citado 14 de septiembre de 2022];(04). Disponible en: https://doi.org/10.4416/JCST2014-00032

34. Bove A, Calignano F, Galati M, Iuliano L. Photopolymerization of Ceramic Resins by Stereolithography Process: A Review. Applied Sciences. 1 de abril de 2022;12(7):3591.

35. Halloran JW, Tomeckova V, Gentry S, Das S, Cilino P, Yuan D, et al. Photopolymerization of powder suspensions for shaping ceramics. Journal of the European Ceramic Society. 1 de noviembre de 2011;31(14):2613-9.

36. Bandyopadhyay A, Mitra I, Bose S. 3D Printing for Bone Regeneration. Curr Osteoporos Rep. octubre de 2020;18(5):505-14.

37. Cooper K. Rapid Prototyping Technology: Selection and Application. Boca Raton: CRC Press; 2001. 248 p.

38. Kruth JP. Material Incress Manufacturing by Rapid Prototyping Techniques. CIRP Annals. 1 de enero de 1991;40(2):603-14.

39. Castro e Costa E, Duarte JP, Bártolo P. A review of additive manufacturing for ceramic production. RPJ. 22 de agosto de 2017;23(5):954-63.

40. Wang Z, Huang C, Wang J, Zou B. Development of a novel aqueous hydroxyapatite suspension for stereolithography applied to bone tissue engineering. Ceramics International. febrero de 2019;45(3):3902-9.

41. Wei Y, Zhao D, Cao Q, Wang J, Wu Y, Yuan B, et al. Stereolithography-Based Additive Manufacturing of High-Performance Osteoinductive Calcium Phosphate Ceramics by a Digital Light-Processing System. ACS Biomater Sci Eng. 9 de marzo de 2020;6(3):1787-97.

42. Wu H, Cheng Y, Liu W, He R, Zhou M, Wu S, et al. Effect of the particle size and the debinding process on the density of alumina ceramics fabricated by 3D printing based on stereolithography. Ceramics International. noviembre de 2016;42(15):17290-4.

43. Amjad Z. Calcium Phosphates in Biological and Industrial Systems. Springer Science & Business Media; 2013. 509 p.

44. Canillas M, Pena P, de Aza AH, Rodríguez MA. Calcium phosphates for biomedical applications. Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio. mayo de 2017;56(3):91-112.

45. LeGeros RZ. Calcium Phosphate-Based Osteoinductive Materials. Chem Rev. 12 de noviembre de 2008;108(11):4742-53.

46. Marques A, Miranda G, Silva F, Pinto P, Carvalho Ó. Review on current limits and potentialities of technologies for biomedical ceramic scaffolds production. J Biomed Mater Res. marzo de 2021;109(3):377-93.

47. Webler GD, Zapata MJM, Agra LC, Barreto E, Silva AOS, Hickmann JM, et al. Characterization and evaluation of cytotoxicity of biphasic calcium phosphate synthesized by a solid state reaction route. Current Applied Physics. 1 de junio de 2014;14(6):876-80.

48. Nasiri-Tabrizi B, Honarmandi P, Ebrahimi-Kahrizsangi R, Honarmandi P. Synthesis of nanosize single-crystal hydroxyapatite via mechanochemical method. Materials Letters. 28 de febrero de 2009;63(5):543-6.

49. Loca D, Sokolova M, Locs J, Smirnova A, Irbe Z. Calcium phosphate bone cements for local vancomycin delivery. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. abril de 2015;49:106-13.

50. Wu YS, Lee YH, Chang HC. Preparation and characteristics of nanosized carbonated apatite by urea addition with coprecipitation method. Materials Science and Engineering: C. 1 de enero de 2009;29(1):237-41.

51. Lin K, Wu C, Chang J. Advances in synthesis of calcium phosphate crystals with controlled size and shape. Acta Biomaterialia. 1 de octubre de 2014;10(10):4071-102.

52. Zhang W, Chai Y, Xu X, Wang Y, Cao N. Rod-shaped hydroxyapatite with mesoporous structure as drug carriers for proteins. Applied Surface Science. 15 de diciembre de 2014;322.

53. Guo YP, Yao YB, Guo YJ, Ning C. Hydrothermal fabrication of mesoporous carbonated hydroxyapatite microspheres for a drug delivery system. Microporous and Mesoporous Materials. 1 de junio de 2012;155:245-51.

54. Chen L, Zhu H, Yang S, Zhou B, You F, Yan X. Nanostructured calcium phosphate carriers for deliver of poor water-soluble drug silybin. Materials Letters. 1 de marzo de 2015;143.

55. Baradari H, Damia C, Colas M, Laborde E, Pecout N, Champion E, et al. Calcium phosphate porous pellets as drug delivery systems : effect of drug carrier composition on drug loading and in vitro release. Journal of the European Ceramic Society. 2012;32:2679-90.

56. Zhao J, Dong X, Bian M, Zhao J, Zhang Y, Sun Y, et al. Solution combustion method for synthesis of nanostructured hydroxyapatite, fluorapatite and chlorapatite. Applied Surface Science. 1 de septiembre de 2014;314:1026-33.

57. Ghosh S, Roy S, Kundu B, Datta S, Basu D. Synthesis of nano-sized hydroxyapatite powders through solution combustion route under different reaction conditions. Materials Science and Engineering: B. 15 de enero de 2011;176:14-21.

58. Zhao J, Zhao J, Chen J, Wang X, Han Z, Li Y. Rietveld refinement of hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic materials prepared by solution combustion method. Ceramics International. 1 de marzo de 2014;40(2):3379-88.

59. Deganello F, Tyagi AK. Solution combustion synthesis, energy and environment: Best parameters for better materials. Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials. junio de 2018;64(2):23-61.

60. Pérez Rodríguez GA, Guitián Rivera F, De Aza Pendás S. Obtención industrial de materiales cerámicos a partir de lodos rojos del proceso Bayer. Bol Soc Esp Ceram Vidr. 30 de junio de 1999;38(3):220-6.

61. Rahmati M, Mozafari M. Biocompatibility of alumina-based biomaterials–A review. Journal Cellular Physiology. abril de 2019;234(4):3321-35.

62. Ma PX. Scaffolds for tissue fabrication. Materials Today. mayo de 2004;7(5):30-40.

63. Palucci Rosa R, Rosace G. Nanomaterials for 3D Printing of Polymers via Stereolithography: Concept, Technologies, and Applications. Macromol Mater Eng. octubre de 2021;306(10):2100345.

64. Bian W, Li D, Lian Q, Li X, Zhang W, Wang K, et al. Fabrication of a bio-inspired beta-Tricalcium phosphate/collagen scaffold based on ceramic stereolithography and gel casting for osteochondral tissue engineering. Rapid Prototyping Journal. 13 de enero de 2012;18(1):68-80.

65. Lee JW, Ahn G, Kim DS, Cho DW. Development of nano- and microscale composite 3D scaffolds using PPF/DEF-HA and micro-stereolithography. Microelectronic Engineering. abril de 2009;86(4-6):1465-7.

66. Guillaume O, Geven MA, Grijpma DW, Tang TT, Qin L, Lai YX, et al. Poly(trimethylene carbonate) and nano-hydroxyapatite porous scaffolds manufactured by stereolithography: Composite PTMC/HA Scaffold Using Stereolithography. Polym Adv Technol. octubre de 2017;28(10):1219-25.

67. Duque C, Gómez-Tirado CA, Ocampo S, Arroyave-Muñoz LM, Restrepo-Munera LM, Vásquez AF, et al. Obtaining biocompatible polymeric scaffolds loaded with calcium phosphates through the digital light processing technique. Journal of Materials Research [Internet]. 11 de septiembre de 2023 [citado 25 de octubre de 2023]; Disponible en: https://link.springer.com/10.1557/s43578-023-01144-0

68. An D, Li H, Xie Z, Zhu T, Luo X, Shen Z, et al. Additive manufacturing and characterization of complex Al_2O_3 parts based on a novel stereolithography method. Int J Appl Ceram Technol. septiembre de 2017;14(5):836-44.

69. Ferrage L, Bertrand G, Lenormand P, Grossin D, Ben-Nissan B. A review of the additive manufacturing (3DP) of bioceramics: alumina, zirconia (PSZ) and hydroxyapatite. J Aust Ceram Soc. abril de 2017;53(1):11-20.

70. Li X, Zhong H, Zhang J, Duan Y, Bai H, Li J, et al. Dispersion and properties of zirconia suspensions for stereolithography. Int J Appl Ceram Technol. enero de 2020;17(1):239-47.

71. CHU TMG. Hydroxyapatite implants with designed internal architecture. :8.

72. Ding G, He R, Zhang K, Xia M, Feng C, Fang D. Dispersion and stability of SiC ceramic slurry for stereolithography. Ceramics International. marzo de 2020;46(4):4720-9.

73. Zhou W, Li D, Wang H. A novel aqueous ceramic suspension for ceramic stereolithography. Rapid Prototyping Journal. 19 de enero de 2010;16(1):29-35.

74. Liu Z, Liang H, Shi T, Xie D, Chen R, Han X, et al. Additive manufacturing of hydroxyapatite bone scaffolds via digital light processing and in vitro compatibility. Ceramics International. junio de 2019;45(8):11079-86.

75. Ullah I, Cao L, Cui W, Xu Q, Yang R, Tang K lai, et al. Stereolithography printing of bone scaffolds using biofunctional calcium phosphate nanoparticles. Journal of Materials Science & Technology. octubre de 2021;88:99-108.

76. Kim JH, Maeng WY, Koh YH, Kim HE. Digital light processing of zirconia prostheses with high strength and translucency for dental applications. Ceramics International. diciembre de 2020;46(18):28211-8.

77. Su CY, Wang JC, Chen DS, Chuang CC, Lin CK. Additive manufacturing of dental prosthesis using pristine and recycled zirconia solvent-based slurry stereolithography. Ceramics International. diciembre de 2020;46(18):28701-9.

78. Skorulska A, Piszko P, Rybak Z, Szymonowicz M, Dobrzyński M. Review on Polymer, Ceramic and Composite Materials for CAD/CAM Indirect Restorations in Dentistry—Application, Mechanical Characteristics and Comparison. Materials. 24 de marzo de 2021;14(7):1592.

79. Xiang D, Xu Y, Bai W, Lin H. Dental zirconia fabricated by stereolithography: Accuracy, translucency and mechanical properties in different build orientations. Ceramics International. octubre de 2021;47(20):28837-47.

80. Wang Z, Huang C, Wang J, Zou B, Abbas CA, Wang X. Design and Characterization of Hydroxyapatite Scaffolds Fabricated by Stereolithography for Bone Tissue Engineering Application. Procedia CIRP. 2020;89:170-5.

81. Li X, Yuan Y, Liu L, Leung YS, Chen Y, Guo Y, et al. 3D printing of hydroxyapatite/tricalcium phosphate scaffold with hierarchical porous structure for bone regeneration. Bio-des Manuf. marzo de 2020;3(1):15-29.

82. Le Guéhennec L, Van hede D, Plougonven E, Nolens G, Verlée B, De Pauw M, et al. *In vitro* and *in vivo* biocompatibility of calcium-phosphate scaffolds three-dimensional printed by stereolithography for bone regeneration. J Biomed Mater Res. marzo de 2020;108(3):412-25.

83. Chu TMG, Orton DG, Hollister SJ, Feinberg SE, Halloran JW. Mechanical and in vivo performance of hydroxyapatite implants with controlled architectures. Biomaterials. marzo de 2002;23(5):1283-93.

84. Kim JY, Lee JW, Lee SJ, Park EK, Kim SY, Cho DW. Development of a bone scaffold using HA nanopowder and micro-stereolithography technology. Microelectronic Engineering. mayo de 2007;84(5-8):1762-5.

85. Jiao C, Xie D, He Z, Liang H, Shen L, Yang Y, et al. Additive manufacturing of Bio-inspired ceramic bone Scaffolds: Structural Design, mechanical properties and biocompatibility. Materials & Design. mayo de 2022;217:110610.

86. Kang JH, Sakthiabirami K, Jang KJ, Jang JG, Oh GJ, Park C, et al. Mechanical and biological evaluation of lattice structured hydroxyapatite scaffolds produced via stereolithography additive manufacturing. Materials & Design. febrero de 2022;214:110372.

87. Liang H, Wang Y, Chen S, Liu Y, Liu Z, Bai J. Nano-Hydroxyapatite Bone Scaffolds with Different Porous Structures Processed by Digital Light Processing 3D Printing. Int J Bioprint. 17 de enero de 2022;8(1):502.

88. Filippov YaY, Murashko AM, Evdokimov PV, Safronova TV, Putlayev VI. Stereolithography 3D printed calcium pyrophosphate macroporous ceramics for bone grafting. Open Ceramics. diciembre de 2021;8:100185.

89. Li X, Zhang H, Shen Y, Xiong Y, Dong L, Zheng J, et al. Fabrication of porous β-TCP/58S bioglass scaffolds via top-down DLP printing with high solid loading ceramic-resin slurry. Materials Chemistry and Physics. julio de 2021;267:124587.

90. Huang X, Dai H, Hu Y, Zhuang P, Shi Z, Ma Y. Development of a high solid loading β-TCP suspension with a low refractive index contrast for DLP -based ceramic stereolithography. Journal of the European Ceramic Society. junio de 2021;41(6):3743-54.

91. Wang Y, Chen S, Liang H, Liu Y, Bai J, Wang M. Digital light processing (DLP) of nano biphasic calcium phosphate bioceramic for making bone tissue engineering scaffolds. Ceramics International. octubre de 2022;48(19):27681-92.

92. Ananth KP, Jayram ND, Muthusamy K. 3D-printed Biphasic Calcium Phosphate Scaffold to augment cytocompatibility evaluation for load-bearing implant applications. Annals of 3D Printed Medicine. mayo de 2024;14:100148.

93. Chen H, Lo WL, Lee SY, Lin YM. Controlling sintering temperature for biphasic calcium phosphate scaffolds using submicron hydroxyapatite slurries for LCD 3D printing. Ceramics International. enero de 2024;S0272884224000075.

94. Evdokimov PV, Tikhonova SA, Putlyaev VI. Mechanical Properties of Graded Macroporous Calcium Phosphate Ceramics of Tailored Architecture. Inorg Mater. septiembre de 2023;59(9):1012-8.

95. Zhang L, Yang G, Johnson BN, Jia X. Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair. Acta Biomaterialia. enero de 2019;84:16-33.

96. Farre Guasch E, Wolff J, Helder M, Schulten E, Forouzanfar T, Klein-Nulend J. Application of Additive Manufacturing in Oral and Maxillofacial Surgery. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 25 de abril de 2015;

97. Bhumiratana S, Vunjak-Novakovic G. Concise Review: Personalized Human Bone Grafts for Reconstructing Head and Face. Stem Cells Translational Medicine. 1 de enero de 2012;1(1):64-9.

98. Jazayeri HE, Tahriri M, Razavi M, Khoshroo K, Fahimipour F, Dashtimoghadam E, et al. A current overview of materials and strategies for potential use in maxillofacial tissue regeneration. Materials Science and Engineering: C. enero de 2017;70:913-29.

99. Restrepo S, Ocampo S, Ramírez JA, Paucar C, García C. Mechanical properties of ceramic structures based on Triply Periodic Minimal Surface (TPMS) processed by 3D printing. J Phys: Conf Ser. diciembre de 2017;935:012036.

100. Ambu R, Morabito A. Porous Scaffold Design Based on Minimal Surfaces: Development and Assessment of Variable Architectures. Symmetry. 25 de agosto de 2018;10(9):361.

101. Montazerian H, Davoodi E, Asadi-Eydivand M, Kadkhodapour J, Solati-Hashjin M. Porous scaffold internal architecture design based on minimal surfaces: A compromise between permeability and elastic properties. Materials & Design. julio de 2017;126:98-114.

102. Lu J, Dong P, Zhao Y, Zhao Y, Zeng Y. 3D printing of TPMS structural ZnO ceramics with good mechanical properties. Ceramics International. mayo de 2021;47(9):12897-905.

103. Feng J, Fu J, Yao X, He Y. Triply periodic minimal surface (TPMS) porous structures: from multi-scale design, precise additive manufacturing to multidisciplinary applications. Int J Extrem Manuf. 1 de junio de 2022;4(2):022001.

104. Liu W, Li M, Nie J, Wang C, Li W, Xing Z. Synergy of solid loading and printability of ceramic paste for optimized properties of alumina via stereolithography-based 3D printing. Journal of Materials Research and Technology. septiembre de 2020;9(5):11476-83.

105. Xu H, Li S, Liu R, Bao C, Mu M, Wang K. Fabrication of alumina ceramics with high flexural strength using stereolithography. Int J Adv Manuf Technol. octubre de 2023;128(7-8):2983-94.

106. Schwentenwein M, Homa J. Additive Manufacturing of Dense Alumina Ceramics. Int J Applied Ceramic Tech. enero de 2015;12(1):1-7.

107. Chen S, Wang CS, Zheng W, Wu JM, Yan CZ, Shi YS. Effects of particle size distribution and sintering temperature on properties of alumina mold material prepared by stereolithography. Ceramics International. marzo de 2022;48(5):6069-77.

108. Li H, Liu Y, Liu Y, Hu K, Lu Z, Liang J. Influence of Sintering Temperature on Microstructure and Mechanical Properties of Al2O3 Ceramic via 3D Stereolithography. Acta Metall Sin (Engl Lett). febrero de 2020;33(2):204-14.

109. Azarmi F, Amiri A. Microstructural evolution during fabrication of alumina via laser stereolithography technique. Ceramics International. enero de 2019;45(1):271-8.

110. Xin M, Liu Z, Wang B, Song Q. Microstructures and mechanical properties of additively manufactured alumina ceramics with digital light processing. ArchivCivMechEng. 29 de diciembre de 2022;23(1):52.

111. Brady GA, Chu TM, Halloran JW. Curing Behavior of Ceramic Resin for Stereolithography.

112. Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. CLIN INFECT DIS. junio de 2008;46(S5):S350-9.

113. Simone-Finstrom M, Borba R, Wilson M, Spivak M. Propolis Counteracts Some Threats to Honey Bee Health. Insects. 29 de abril de 2017;8(2):46.

114. Becerra TB, Calla-Poma RD, Requena-Mendizabal MF, Millones-Gómez PA. Antibacterial Effect of Peruvian Propolis Collected During Different Seasons on the Growth of Streptococcus Mutans. TODENTJ. 30 de septiembre de 2019;13(1):327-31.

115. Oryan A, Alemzadeh E, Moshiri A. Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. Biomedicine & Pharmacotherapy. febrero de 2018;98:469-83.

116. Moreno AI, Orozco Y, Ocampo S, Malagón S, Ossa A, Peláez-Vargas A, et al. Effects of Propolis Impregnation on Polylactic Acid (PLA) Scaffolds Loaded with Wollastonite Particles against Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, and Their Coculture for Potential Medical Devices. Polymers. 9 de junio de 2023;15(12):2629.

117. Przybyłek I, Karpiński TM. Antibacterial Properties of Propolis. Molecules. 29 de mayo de 2019;24(11):2047.

118. Hayakawa T, Takahashi K, Kikutake K, Yokota I, Nemoto K. analysis of polymerization behavior of dental dimethacrylate monomers ny diferential scanning calorimetry.pdf. 1999;41(1):9-13.

119. Alarcon RT, Gaglieri C, Dos Santos GC, Roldao JC, Magdalena AG, Da Silva-Filho LC, et al. A deep investigation into the thermal degradation of urethane dimethacrylate polymer. J Therm Anal Calorim. febrero de 2022;147(4):3083-97.

120. Pitzanti G, Mohylyuk V, Corduas F, Byrne NM, Coulter JA, Lamprou DA. Urethane dimethacrylate-based photopolymerizable resins for stereolithography 3D printing: A physicochemical characterisation and biocompatibility evaluation. Drug Deliv and Transl Res. enero de 2024;14(1):177-90.

121. Nurmi N. Debinding of Stereolithographically Printed Ceramic Parts: Supercritical Carbon Dioxide as Solvent. Tampere University; 2022.

122. Baklouti S, Bouaziz J, Chartier T, Baumard JF. Binder burnout and evolution of the mechanical strength of dry-pressed ceramics containing poly(vinyl alcohol). Journal of the European Ceramic Society. agosto de 2001;21(8):1087-92.

123. Jones AC, Arns CH, Hutmacher DW, Milthorpe BK, Sheppard AP, Knackstedt MA. The correlation of pore morphology, interconnectivity and physical properties of 3D ceramic scaffolds with bone ingrowth. Biomaterials. marzo de 2009;30(7):1440-51.

124. Yu S, Sun J, Bai J. Investigation of functionally graded TPMS structures fabricated by additive manufacturing. Materials & Design. noviembre de 2019;182:108021.

125. Seidel V, Peyfoon E, Watson DG, Fearnley J. Comparative study of the antibacterial activity of propolis from different geographical and climatic zones. Phytotherapy Research. septiembre de 2008;22(9):1256-63.

126. Gonsales GZ, Orsi RO, Fernandes Júnior A, Rodrigues P, Funari SRC. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis [Internet]. abril de 2006 [citado 19 de diciembre de 2023];12(2). Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992006000200009&lng=en&nrm=iso&tlng=en

127. Teimouri A, Ebrahimi R, Chermahini AN, Emadi R. Fabrication and characterization of silk fibroin/chitosan/Nano γ-alumina composite scaffolds for tissue engineering applications. RSC Adv. 2015;5(35):27558-70.

128. Zhang F, Vanmeensel K, Inokoshi M, Batuk M, Hadermann J, Van Meerbeek B, et al. Critical influence of alumina content on the low temperature degradation of 2–3mol% yttria-stabilized TZP for dental restorations. Journal of the European Ceramic Society. febrero de 2015;35(2):741-50.

129. Negishi J, Nam K, Kimura T, Fujisato T, Kishida A. High-hydrostatic pressure technique is an effective method for the preparation of PVA–heparin hybrid gel. European Journal of Pharmaceutical Sciences. diciembre de 2010;41(5):617-22.

130. Hoexter DL. Bone regeneration graft materials. J Oral Implantol. 2002;28(6):290-4.

131. Dong Z, Zhao X. Application of TPMS structure in bone regeneration. Engineered Regeneration. 2021;2:154-62.

132. Saleh Alghamdi S, John S, Roy Choudhury N, Dutta NK. Additive Manufacturing of Polymer Materials: Progress, Promise and Challenges. Polymers. enero de 2021;13(5):753.

133. Sim JH, Koo BK, Jung M, Kim DS. Study on Debinding and Sintering Processes for Ceramics Fabricated Using Digital Light Processing (DLP) 3D Printing. Processes. 21 de noviembre de 2022;10(11):2467.

134. Qu H, Fu H, Han Z, Sun Y. Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review. RSC Adv. 19 de agosto de 2019;9(45):26252-62.

135. Du P, Chen X, Chen Y, Li J, Lu Y, Li X, et al. In vivo and in vitro studies of a propolis-enriched silk fibroin-gelatin composite nanofiber wound dressing. Heliyon. marzo de 2023;9(3):e13506.

136. Fung C, Mohamad H, Hashim S, Htun A, Ahmad A. Proliferative Effect of Malaysian Propolis on Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth: An In vitro Study. BJPR. 10 de enero de 2015;8(1):1-8.

137. Buitrago DM, Perdomo SJ, Silva FA, Cely-Veloza W, Lafaurie GI. Physicochemical Characterization, Antioxidant, and Proliferative Activity of Colombian Propolis Extracts: A Comparative Study. Molecules. 6 de abril de 2024;29(7):1643.

138. Lopera AA, Montoya A, Vélez ID, Robledo SM, Garcia CP. Synthesis of calcium phosphate nanostructures by combustion in solution as a potential encapsulant system of drugs with photodynamic properties for the treatment of cutaneous leishmaniasis. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. marzo de 2018;21:138-46.

139. Zeng Y, Yan Y, Yan H, Liu C, Li P, Dong P, et al. 3D printing of hydroxyapatite scaffolds withgood mechanical and biocompatible properties by digital light processing. J Mater Sci. mayo de 2018;53(9):6291-301.

140. Sun J, Binner J, Bai J. Effect of surface treatment on the dispersion of nano zirconia particles in non-aqueous suspensions for stereolithography. Journal of the European Ceramic Society. abril de 2019;39(4):1660-7.

141. Scalera F, Esposito Corcione C, Montagna F, Sannino A, Maffezzoli A. Development and characterization of UV curable epoxy/hydroxyapatite suspensions for stereolithography applied to bone tissue engineering. Ceramics International. diciembre de 2014;40(10):15455-62.

142. Song SY, Park MS, Lee D, Lee JW, Yun JS. Optimization and characterization of high-viscosity ZrO2 ceramic nanocomposite resins for supportless stereolithography. Materials & Design. octubre de 2019;180:107960.

143. Schumacher M, Deisinger U, Detsch R, Ziegler G. Indirect rapid prototyping of biphasic calcium phosphate scaffolds as bone substitutes: influence of phase composition, macroporosity and pore geometry on mechanical properties. J Mater Sci: Mater Med. diciembre de 2010;21(12):3119-27.

144. Grela E, Kozłowska J, Grabowiecka A. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. Acta Histochemica. mayo de 2018;120(4):303-11.

145. Su J, Hua S, Chen A, Chen P, Yang L, Yuan X, et al. Three-dimensional printing of gyroid-structured composite bioceramic scaffolds with tuneable degradability. Biomater Adv. febrero de 2022;133:112595.

146. Battulga B, Shiizaki K, Miura Y, Osanai Y, Yamazaki R, Shinohara Y, et al. Correlative light and electron microscopic observation of calcium phosphate particles in a mouse kidney formed under a high-phosphate diet. Sci Rep. 16 de enero de 2023;13(1):852.

147. Kanwar S, Vijayavenkataraman S. 3D printable bone-mimicking functionally gradient stochastic scaffolds for tissue engineering and bone implant applications. Materials & Design. 1 de noviembre de 2022;223:111199.

148. Vijayavenkataraman S, Zhang L, Zhang S, Hsi Fuh JY, Lu WF. Triply Periodic Minimal Surfaces Sheet Scaffolds for Tissue Engineering Applications: An

Optimization Approach toward Biomimetic Scaffold Design. ACS Appl Bio Mater. 20 de agosto de 2018;1(2):259-69.

149. Ebadi P, Fazeli M. Evaluation of the potential in vitro effects of propolis and honey on wound healing in human dermal fibroblast cells. South African Journal of Botany. marzo de 2021;137:414-22.

150. Elkhenany H, El-Badri N, Dhar M. Green propolis extract promotes in vitro proliferation, differentiation, and migration of bone marrow stromal cells. Biomedicine & Pharmacotherapy. julio de 2019;115:108861.

151. ÇINAR İ, SEVİM Ç. Effect of Various Extracts Obtained From Bee Pollen on L929 Fibroblast Cell Proliferation. 4 de marzo de 2024 [citado 22 de abril de 2024]; Disponible en: https://zenodo.org/doi/10.5281/zenodo.10779249

152. Patil K, Aruna ST, Mimani T. Combustion Synthesis: An Update. Current Opinion in Solid State and Materials Science. 1 de diciembre de 2002;6:507-12.

153. Aruna ST, Mukasyan A. Combustion Synthesis and Nanomaterials. Current Opinion in Solid State and Materials Science. 1 de junio de 2008;12:44-50.