



Estudiar la impresión 3D con biomateriales: Caracterización y diseño básico

Chicaiza Jami, Joselyn Maribel

Departamento de Ciencias de la Energía y Mecánica

Carrera de Ingeniería en Mecatrónica

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera en Mecatrónica

Ing. Lara Padilla, Hernán Vinicio, PhD.

25 de agosto de 2023



Plagiarism report

Chicaiza_Joselyn_Antiplagio.docx

Scan details

Scan time:
August 25th, 2023 at 16:55 UTC

Total Pages:
69

Total Words:
17162

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
● Identical	0.7%	117
● Minor Changes	0.4%	64
● Paraphrased	1.2%	206
● Omitted Words	0%	0

AI Content Detection



Text coverage

- AI text
- Human text

.....
Lara Padilla, Hernán Vinicio

C.C.: 0603247362



Departamento de Ciencias de la Energía y Mecánica

Carrera de Ingeniería en Mecatrónica

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Estudiar la impresión 3D con biomateriales: Caracterización y diseño básico”** fue realizado por la señorita **Chicaiza Jami, Joselyn Maribel**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 25 de agosto de 2023

.....
Lara Padilla, Hernán Vinicio

C.C.: 0603247362



Departamento de Ciencias de la Energía y Mecánica

Carrera de Ingeniería en Mecatrónica

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Chicaiza Jami, Joselyn Maribel**, con cédula de ciudadanía n° 1726626573, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Estudiar la impresión 3D con biomateriales: Caracterización y diseño básico** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 25 de agosto de 2023

Chicaiza Jami, Joselyn Maribel

C.C.: 1726626573



Departamento de Ciencias de la Energía y Mecánica

Carrera de Ingeniería en Mecatrónica

Autorización de Publicación

Yo **Chicaiza Jami, Joselyn Maribel**, con cédula de ciudadanía n° 1726626573, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Estudiar la impresión 3D con biomateriales: Caracterización y diseño básico** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 25 de agosto de 2023

Chicaiza Jami, Joselyn Maribel

C.C.: 1726626573

Dedicatoria

A mis padres, María y Marco.

A mis hermanos, Javier y Sebastián.

Agradecimientos

A mis padres, por ser mi fuente de apoyo incondicional, por confiar en mí, por brindarme siempre lo que necesito e inspirarme a nunca decaer a las adversidades. Por todo su amor infinito.

A mis hermanos, a pesar de las situaciones que hemos pasado, por brindarme su amor y compañía en mis momentos más tristes y alegres, por ser mis compañeros día tras día y sobre todo por brindarme alegrías y enseñanzas.

A toda mi familia, por preocuparse por mí y brindarme siempre aliento.

A mis amigos, con quienes iniciamos juntos esta travesía y conocí a lo largo de la carrera, por apoyarme siempre con su conocimiento y amistad, por todos los momentos alegres y tristes que compartimos, y sobre todo brindarme su cariño como hermanos. Les agradezco mucho.

A él, quién con su comprensión, paciencia, respeto y mucho cariño me motivó a seguir adelante en momentos difíciles, quien me incentiva y brinda nuevas perspectivas del mundo.

Al ingeniero Hernán Lara, por ser una guía fundamental para la culminación de este trabajo, compartirme sus vastos conocimientos y permitirme descubrir un gran campo aplicativo a partir de esto.

A la Doctora Marbel Torres e ingeniera Fernando Toscano, quienes me ayudaron y compartieron su conocimiento en el campo biotecnológico.

Por no desfallecer y culminar tus logros.

Por un nuevo inicio.

Tabla de Contenidos

Portada	1
Dedicatoria	4
Agradecimientos	7
Tabla de Contenidos.....	8
Índice de Tablas	13
Índice de Figuras	16
Resumen	20
Abstract	21
Capítulo I Introducción.....	22
Antecedentes	22
Justificación e importancia	24
Alcance del proyecto.....	26
Objetivos.....	27
Objetivo General.....	27
Objetivos Específicos	27
Capítulo II Revisión de Literatura.....	28
Manufactura Aditiva	28
Estereolitografía.....	29
Sistema De Coordinadas.....	30
Propiedades mecánicas en piezas impresas por estereolitografía	32
Ingeniería de tejidos.....	33
Andamios.....	34

Estructuras basadas en Superficies triplemente periódicas	37
Sistemas de coordenadas de estructuras TPMS	39
Biomateriales: introducción y clasificación	39
Biorreactor de perfusión.....	40
Estudio in sílico.....	42
Estudio in vitro	42
Diferenciación y proliferación celulares	43
Proliferación.....	43
Diferenciación.....	44
Células HaCaT.....	44
Caracterización de un biomaterial.....	45
Caracterización mecánica de andamios	46
Ensayo de tracción	46
Ensayo de Microperforado.....	47
Caracterización biológica – química de andamios	48
Capítulo III Metodología.....	49
Metodología para la caracterización de un biomaterial	49
Propiedades críticas para la caracterización.....	50
Diseño experimental de caracterización	50
Definición de la meta del ensayo	50
Factores y niveles.....	51
Método de diseño experimental.....	54

	10
Matriz de experimentos.....	55
Fabricación de probetas.....	57
Preprocesamiento.....	58
Impresión 3D mediante SLA	62
Posprocesamiento	65
Diseño y construcción del sistema de caracterización	66
Prueba de concepto para biorreactor de perfusión	67
Bomba peristáltica	67
Medición de presión diferencial	68
Medición de corriente	69
Medición de caudal.....	69
Procesamiento de datos: Microcontrolador.....	70
Caracterización de probetas	71
Ensayo a tracción: BioMed Amber.....	71
Ensayo a tracción: Tough 1500	73
Ensayo de microperforado.....	74
Prueba cero de ensayo de adherencia celular	76
Ensayo de adherencia celular.....	78
Ensayo de permeabilidad	82
Capítulo IV Análisis y discusión de resultados.....	84
Resultados de control dimensional de las probetas	84
Dimensiones de probetas: BioMed Amber.....	84

	11
Dimensiones de probetas: Tough 1500	87
Dimensiones de probetas: Tamaño de poro	94
Discusión	96
Resultados de ensayo de micro tracción	98
Esfuerzo de tracción último: BioMed Amber	98
Porcentaje de elongación: BioMed Amber	101
Esfuerzo de tracción último: Tough 1500.....	103
Porcentaje de elongación: Tough 1500	106
Discusión	108
Resultados de ensayo de microperforado.....	109
Fuerza máxima obtenida	110
Desplazamiento	111
Discusión	112
Resultados del ensayo de adhesión celular	113
Cantidad de células vs Tiempo de ensayo.....	114
Relación Área / volumen.....	117
Discusión	119
Resultados del ensayo de permeabilidad	121
Discusión	122
Discusión final	123
Capítulo V.....	128
Conclusiones, recomendaciones y trabajo futuro	128

Conclusiones	128
Recomendaciones	130
Trabajo futuro	131
Bibliografía.....	132

Índice de Tablas

Tabla 1	Tipos de tecnologías de impresión 3D.....	29
Tabla 2	Propiedades ideales de andamios utilizados en ingeniería de tejidos	35
Tabla 3	Clasificación de biomateriales con sus aplicaciones	40
Tabla 4	Factores y niveles para el diseño experimental: Ensayo de tracción.....	54
Tabla 5	Factores y niveles para el diseño experimental: Ensayo de microperforado	54
Tabla 6	Factores y niveles para el diseño experimental: Ensayo de adherencia celular	55
Tabla 7	Factores y niveles para el diseño experimental: Ensayo de permeabilidad.....	55
Tabla 8	Diseño de experimento seleccionado para el ensayo de tracción	55
Tabla 9	Diseño de experimento seleccionado para el ensayo de microperforado.....	56
Tabla 10	Diseño de experimento seleccionado para el ensayo de adherencia celular.....	56
Tabla 11	Diseño de experimento seleccionado para el ensayo de permeabilidad	56
Tabla 12	Parámetros de diseño de andamios	59
Tabla 13	Materiales y equipos utilizados para la impresión de probetas.....	63
Tabla 14	Características de la bomba peristáltica	68
Tabla 15	Análisis de varianza obtenida para el espesor de probetas PMT según el espesor de capa.....	85
Tabla 16	Análisis de varianza obtenida para el espesor de probetas PMT según la orientación	86
Tabla 17	Análisis de varianza obtenida para el ancho de probetas PMT según el espesor de capa.....	87
Tabla 18	Análisis de varianza obtenida para el ancho de probetas PMT según la orientación ..	87
Tabla 19	Análisis de varianza obtenida para el espesor de probetas PMT según el espesor de capa.....	88
Tabla 20	Análisis de varianza obtenida para el espesor de probetas PMT según la orientación	89

Tabla 21 Análisis de varianza obtenida para el ancho de probetas PMT según el espesor de capa.....	90
Tabla 22 Análisis de varianza obtenida para el ancho de probetas PMT según la orientación .	90
Tabla 23 Análisis de varianza obtenida para el diámetro de probetas PMP según el espesor de capa.....	91
Tabla 24 Análisis de varianza obtenida para el diámetro de probetas PMP según la orientación	92
Tabla 25 Análisis de varianza obtenida para el espesor de probetas PMP según el espesor de capa.....	93
Tabla 26 Análisis de varianza obtenida para el espesor de probetas PMP según la orientación	94
Tabla 27 Configuración para obtener mayor control dimensional.....	98
Tabla 28 Análisis de varianza del esfuerzo último de tracción conforme el espesor de capa: BioMed	99
Tabla 29 Análisis de varianza del esfuerzo último de tracción conforme la orientación: BioMed Amber.....	100
Tabla 30 Análisis de varianza del porcentaje de elongación conforme el espesor de capa: BioMed Amber.....	101
Tabla 31 Análisis de varianza del porcentaje de elongación conforme la orientación: BioMed Amber.....	102
Tabla 32 Análisis de varianza del esfuerzo último de tracción conforme el espesor de capa: Tough 1500	104
Tabla 33 Análisis de varianza del esfuerzo último de tracción conforme la orientación: Tough 1500	105
Tabla 34 Análisis de varianza del porcentaje de elongación conforme el espesor de capa: BioMed Amber.....	107

Tabla 35 Análisis de varianza del porcentaje de elongación conforme la orientación: Tough 1500	108
Tabla 36 Porcentaje de crecimiento celular.....	115
Tabla 37 Análisis de Varianza para el conteo de células según los diferentes niveles de estructura.....	116
Tabla 38 Análisis de Varianza para el conteo de células según los diferentes niveles de porosidad.....	117
Tabla 39 Datos obtenidos de área y volumen de las probetas PA	117

Índice de Figuras

Figura 1	Andamios porosos utilizando TPMS.	23
Figura 2	Diagrama del sistema para el desarrollo del proyecto.....	26
Figura 3	Pasos secuenciales del proceso de impresión 3D	28
Figura 4	Representación esquemática de máquinas estereolitografía	30
Figura 5	Máquina de manufactura aditiva genérica (Construcción ascendente)	31
Figura 6	Regla de la mano derecha para rotaciones positivas con referencia al origen del volumen de construcción	31
Figura 7	Tríada de ingeniería de tejidos.....	34
Figura 8	Descripción gráfica para el desarrollo de andamios a partir de estereolitografía	36
Figura 9	Celdas unitarias de estructuras TPMS.....	38
Figura 10	Estructura TPMS Diamante en diferentes sistemas de coordenadas	39
Figura 11	Diagrama esquemático del biorreactor de perfusión.....	41
Figura 12	Perfusión directa e indirecta.....	42
Figura 13	Estrategia de ingeniería de tejidos funcionales in vitro.....	43
Figura 14	Ciclo de la célula.....	44
Figura 15	Células HaCaT de primera fase cultivadas	45
Figura 16	Esquema de caracterización para biomateriales.....	46
Figura 17	Representación esquemática del ensayo de microperforado SP	47
Figura 18	Esquema de la metodología a seguir para el desarrollo de implantes sintéticos	49
Figura 19	Diagrama de Ishikawa para el proceso de caracterización de biomateriales	51
Figura 20	Orientaciones de impresión seleccionadas	52
Figura 21	Diagrama de flujo para la manufactura de probetas	57
Figura 22	Parámetros dimensionales para probetas de caracterización mecánica: especímenes	58
Figura 23	Soportes de probetas PMP y PMT.....	59

Figura 24 Pruebas de andamios realizados	60
Figura 25 Probetas para caracterización biológica: PA y PP	61
Figura 26 Soportes de probetas PA y PP	62
Figura 27 Probetas impresas	64
Figura 28 Probetas PA impresas con BioMed Amber	64
Figura 29 Probetas PA-PP impresas con Tough 1500	65
Figura 30 Probetas finales a caracterizar	66
Figura 31 Probetas PA y PP finales a caracterizar	66
Figura 32 Biorreactor para ensayos de perfusión	67
Figura 33 Diagrama de comunicación para el sistema	71
Figura 34 Ensayo de tracción de probetas PMT: BioMed Amber	72
Figura 35 Probetas PMT ensayadas: BioMed Amber	72
Figura 36 Ensayo de tracción de probetas PMT: Tough 1500	73
Figura 37 Probetas PMT ensayadas: Tough 1500	74
Figura 38 Cajas Petri en un entorno ambiente y biológico	75
Figura 39 Ensayo de microperforado	75
Figura 40 Arreglo de andamios para el ensayo de adherencia: Prueba cero	76
Figura 41 Microfotografía del ensayo inicial y final: Prueba cero	77
Figura 42 Cultivo celular con tinción: Prueba cero	77
Figura 43 Soporte para andamios	78
Figura 44 Arreglo de andamios para el ensayo de adherencia	79
Figura 45 Diagrama de flujo para el cultivo y la siembra de células HaCaT	80
Figura 46 Cultivo celular: Ensayo de adhesión celular	81
Figura 47 Diagrama de flujo para el procesamiento de imágenes	82
Figura 48 Diagrama de flujo para el ensayo de permeabilidad	83
Figura 49 Análisis ANOVA de un solo factor: Prueba de hipótesis	84

Figura 50 Gráfica de intervalos obtenida para el espesor de probetas PMT: BioMed Amber ...	85
Figura 51 Gráfica de intervalos obtenida para el ancho de probetas PMT: BioMed Amber	86
Figura 52 Gráfica de intervalos obtenida para el espesor de probetas PMT: Tough 1500	88
Figura 53 Gráfica de intervalos obtenida para el ancho de probetas PMT: Tough 1500	89
Figura 54 Gráfica de intervalos obtenida para el diámetro de probetas PMP: Tough 1500	91
Figura 55 Gráfica de efectos principales para Media de diámetro de probetas: Tough 1500	92
Figura 56 Gráfica de intervalos obtenida para el espesor de probetas PMP: Tough 1500	93
Figura 57 Tamaño de poro de los andamios	95
Figura 58 Gráficas de barras del área entre el diseño CAD y la impresión del andamio	96
Figura 59 Probetas de 50 - 100 μm en resina BioMed Amber	97
Figura 60 Gráfica de intervalos obtenida para el esfuerzo último de tracción conforme el espesor de capa: BioMed Amber	99
Figura 61 Gráfica de intervalos obtenida para el esfuerzo último de tracción conforme la orientación: BioMed Amber	100
Figura 62 Gráfica de intervalos obtenida para el porcentaje de elongación conforme el espesor de capa: BioMed Amber	101
Figura 63 Gráfica de intervalos obtenida para el porcentaje de elongación conforme la orientación: BioMed Amber	102
Figura 64 Gráfica de efectos principales para Media de porcentaje de elongación: Tough 1500	103
Figura 65 Gráfica de intervalos obtenida para el esfuerzo último de tracción conforme el espesor de capa: Tough 1500	104
Figura 66 Gráfica de intervalos obtenida para el esfuerzo último de tracción conforme la orientación: Tough 1500	105
Figura 67 Gráfica de intervalos obtenida para el porcentaje de elongación conforme el espesor de capa: Tough 1500	106

Figura 68 Gráfica de intervalos obtenida para el porcentaje de elongación conforme la orientación: Tough	107
Figura 69 Probetas PMP ensayadas.....	110
Figura 70 Gráfica de intervalos para la fuerza máxima obtenida en probetas PMP	111
Figura 71 Gráfico de intervalos para el desplazamiento registrado.....	112
Figura 72 Microfotografías obtenidas del ensayo de adherencia celular.....	113
Figura 73 Microfotografías obtenidas del ensayo de adherencia celular.....	114
Figura 74 Gráfica de barras del ensayo de adherencia celular	115
Figura 75 Gráfica de intervalos para el conteo de células en probetas PA	116
Figura 76 Relación área / volumen de los andamios	118
Figura 77 Estructuras TPMS de andamios	119
Figura 78 Gráfica de barras de área del poro del andamio PA	120
Figura 79 Gráfica de efectos principales para el coeficiente de Darcy	122
Figura 81 Bioplotter.....	123
Figura 82 Cirugía robótica Da Vinci	124
Figura 80 Ilustración esquemática de la pérdida de peso molecular y masa de un andamio en función del tiempo	125
Figura 83 Tendencia de las ventas mundiales de tecnología médica	126

Resumen

La impresión 3D se ha convertido en una técnica de manufactura para fabricar infinidad de elementos con diversos materiales, enfocándose en varios aspectos ingenieriles y de ciencias médicas. Gran parte de ello se ha enfocado en el desarrollo de dispositivos tecnológicos, tejidos y órganos, un campo poco explorado en el país.

El presente trabajo evidencia la investigación y caracterización de biomateriales impresos utilizando estereolitografía con el objetivo de predecir sus propiedades mecánicas y biológicas, obteniendo así los factores significativos para optimizar la fabricación de scaffolds considerando parámetros de diseño e impresión. Se desarrollan ensayos mecánicos como el de micro tracción bajo la norma ASTM D1708 y microperforado bajo la norma ASTM F2977 utilizando micro especímenes debido al volumen del material disponible. Además, se realizan ensayos de adherencia celular con la línea celular HaCaT y de permeabilidad de los andamios construidos bajo la norma ASTM F2952 utilizando un medio fisiológico, para lo cual, se fabrica un sistema mecatrónico denominado biorreactor de perfusión que permite obtener datos de presión, corriente y caudal en el tiempo.

Los resultados manifiestan que el factor significativo de impresión es la orientación en las piezas constatando la anisotropía existente, además, en el caso de la resina BioMed el espesor de capa influyó en gran medida a las propiedades mecánicas. A su vez, se analiza la degradación del material pues en ellas se obtuvo la rotura de la probeta. Por otra parte, se evidenció que la relación área volumen es directamente proporcional a la cantidad de células adheridas al andamio.

Palabras clave: Estereolitografía, andamios, micro especímenes, cultivo celular, perfusión.

Abstract

3D printing has become a manufacturing technique to manufacture an infinite number of elements with different materials, focusing on various engineering and medical science aspects. Much of it has focused on the development of technological devices, tissues and organs, a field little explored in the country.

The present work evidences the investigation and characterization of printed biomaterials using stereolithography with the objective of predicting their mechanical and biological properties, thus obtaining the significant factors to optimize the fabrication of scaffolds considering design and printing parameters. Mechanical tests such as micro tensile test under ASTM D1708 and micro perforation test under ASTM F2977 are developed using micro specimens due to the volume of available material. In addition, cell adhesion tests are performed with the HaCaT cell line and permeability of the scaffolds constructed under ASTM F2952 using a physiological medium, for which a mechatronic system called perfusion bioreactor is manufactured to obtain pressure, current and flow data over time.

The results show that the significant factor of impression is the orientation in the pieces, confirming the existing anisotropy, in addition, in the case of the BioMed resin, the layer thickness had a great influence on the mechanical properties. At the same time, the degradation of the material is analyzed, since the breakage of the specimen was obtained in them. On the other hand, it was shown that the area-volume ratio is directly proportional to the number of cells adhered to the scaffold.

Keywords: Stereolithography, scaffolds, micro specimens, cell culture, perfusion.

Capítulo I

Introducción

Antecedentes

La ingeniería mecatrónica es la sinergia de diversos campos ingenieriles, abarcando a varios ámbitos desde la automatización, control, mecánica, materiales hasta el trabajo en conjunto con otras ramas de la ciencia. Uno de ellos, permite la contribución de la investigación desde una perspectiva mecatrónica y médica consiguiendo el desarrollo de diversos dispositivos útiles en la medicina que poco a poco se van generando alrededor del mundo.

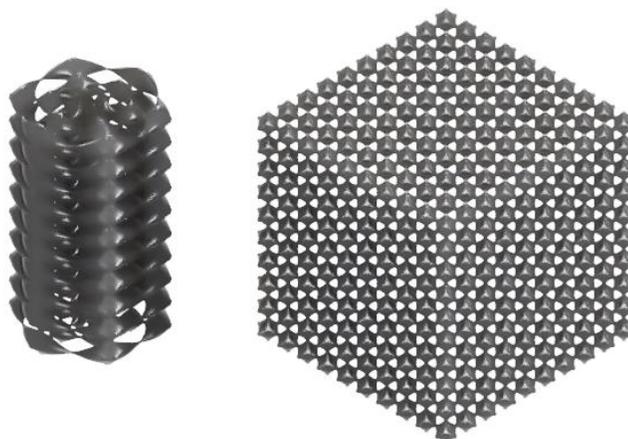
Los biomateriales son materiales diseñados para que puedan interactuar con sistemas biológicos, estos son utilizados para reparar o reemplazar tejidos mejorando la función biológica. La impresión 3D se ha convertido en una técnica de manufactura aditiva para fabricar andamios y dispositivos para aplicaciones de ingeniería tisular (Guvendiren et al., 2016). La utilización de biomateriales tiene un papel fundamental, ya que los andamios generados proporcionan soporte para el crecimiento celular y la regeneración de tejidos.

Caracterizar los biomateriales mediante manufactura aditiva permite conocer la composición y arquitectura interna de los andamios, lo que influye en la regeneración y crecimiento celular, permitiendo ajustar las propiedades de los biomateriales para optimizar su desempeño en aplicaciones específicas (Bandyopadhyay & Bose, 2013).

Para el desarrollo de andamios porosos, las denominadas TPMS superficies mínimas triplemente periódicas han sido poco a poco utilizadas debido a la distribución uniforme de los poros y una superficie de contacto mayor con las células promoviendo su regeneración y crecimiento celular (Ramírez Rodríguez et al., 2022). Las TPMS son superficies continuas con una topología determinada, estructuras infinitas y periódicas en el espacio euclidiano 3D y se encuentran con frecuencia en el medio desempeñando un papel importante en la guía de procesos químicos, bioquímicos y celulares (Blanquer & Grijpma, 2021) como se observa en la Figura 1.

Figura 1

Andamios porosos utilizando TPMS.



Nota. Se observan andamios con sistemas de coordenadas cilíndricas y rectangulares.

Varios estudios se han realizado utilizando impresión 3D con biomateriales y sus diversas aplicaciones en el campo de la salud como el *Uso de la estereolitografía para fabricar andamios biodegradables 3D de tamaño crítico para el crecimiento óseo* (Cooke et al., 2003) el cual genera piezas 3D con resina biodegradable y biocompatible para reparar un defecto óseo utilizando andamios.

Uno de ellos que caracteriza estructuras impresas en 3D con porosidades es el *Diseño y caracterización mecánica de andamios sólidos y altamente porosos de fumarato de polipropileno impresos en 3D* (Walker et al., 2017) en el que se realizan pruebas de compresión no confinadas en piezas impresas. Un estudio realizado en el que utiliza la periodicidad de las estructuras TPMS para construir andamios mediante estereolitografía usando resinas fotosensibles es *Superficies mínimas triplemente periódicas (TPMS) para la generación de arquitecturas porosas mediante estereolitografía* (Blanquer & Grijpma, 2021).

Estudios que han trabajado con cultivos celulares son *Diseño de scaffolds auxéticos fabricados mediante impresión 3D para estimulación mecánica de células* (Fuentealba Sierra, 2021) donde se diseña scaffolds auxéticos fabricados mediante estereolitografía y

posteriormente son sometidos a cultivos celulares sobre láminas lisas. Otro estudio es el *Diseño de scaffolds para facilitar la comunicación de células madre en frascos de cultivo celular* (Arce, s/f) el cual fabrica andamios controlando la porosidad y el tamaño de fibra para integrarse en frascos de cultivo con células madre.

En Ecuador en el año 2022, se desarrolló la *Caracterización de las foto resinas que serán usadas como matrices de fabricación para los intercambiadores de calor compactos* (Vallejo Bustamante, 2022) en el que se realizó la caracterización de diversas resinas para predecir las propiedades mecánicas del material. Además, se realizó un estudio sobre pruebas de impresión con andamios porosos en el *Monitoreo del proceso y propiedades mecánicas de andamios porosos durante la impresión 3D por DLM* (Serpa Andrade, 2020).

El presente trabajo propone el estudio de impresión 3D para desarrollar protocolos de diseño y un sistema de caracterización enfocado en un biomaterial utilizando estereolitografía con el objetivo de predecir sus propiedades mecánicas y a la vez, analizar algunas de sus propiedades biológicas con ensayos in vitro.

Justificación e importancia

El desarrollo inicial de dispositivos médicos permitirá salvar muchas vidas, siempre que se logre obtener un proceso biológico idóneo al momento de implantar un andamio construido con biomaterial en un tejido, un implante o en un órgano. La ingeniería de tejidos es un campo que aún no tiene bases fuertes en Ecuador, por lo cual los estudios en este ámbito son mínimos, debido a que la tecnología no abastece a las necesidades para empezar en esta área, por lo que, la trayectoria es completamente nueva y se tiene ya una línea de estudio definida por los países del primer mundo.

Al iniciar con el desarrollo de prótesis e implantes se podría colaborar poco a poco con la generación de órganos y/o tejidos artificiales capaces de ser implantados en personas, aunque llevará mucho tiempo todavía, el hecho de poder apoyar a la causa médica y tecnológica permitirá a nuestro país mayores avances en este campo.

El propósito del proyecto radica en la caracterización de la resina impresa mediante estereolitografía, lo que permite conocer si el andamio obtenido después del proceso de impresión, lavado y curado mantiene las características biológicas de la resina utilizada. Además, el hecho de caracterizar un biomaterial bajo Normas ASTM e ISO valida el protocolo realizado, lo cual ayuda a obtener las propiedades mecánicas de la pieza para conocer si realmente se puede o no utilizar como dispositivo médico.

Los estudios realizados alrededor de la caracterización de biomateriales van en apogeo, lo cual permite formar una línea de investigación dentro del país con referencia a los biomateriales y enfocarlo al ámbito de ingeniería tisular y así, se puedan generar andamios cuyas características favorecen al comportamiento en procesos biológicos.

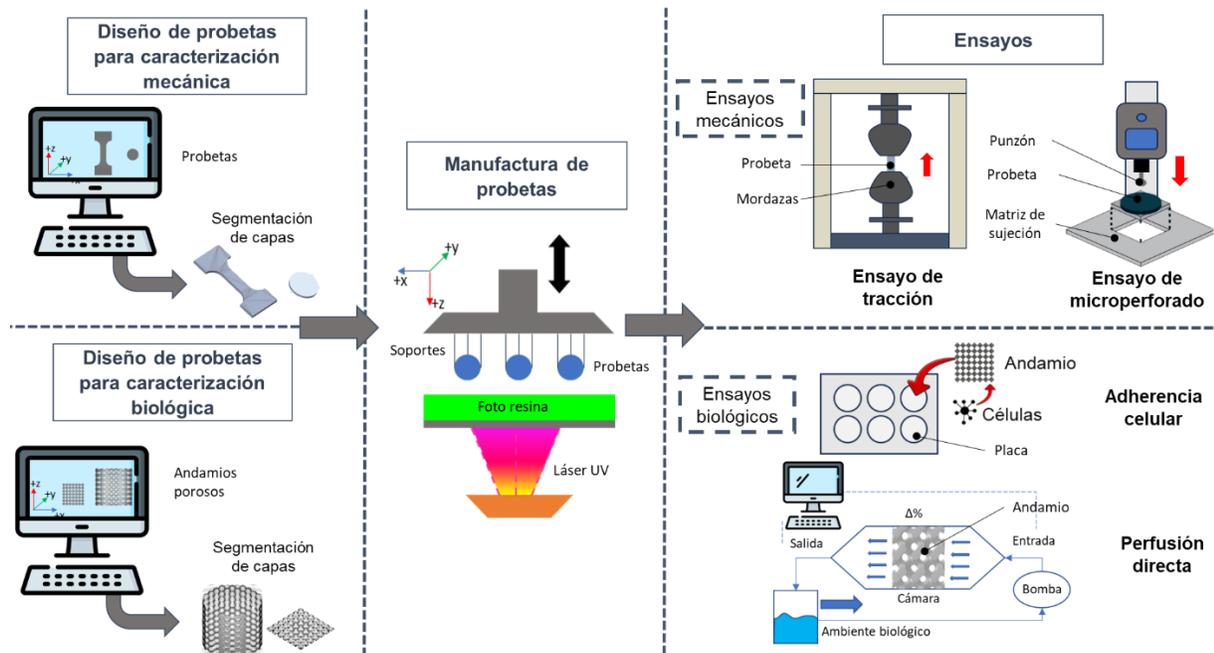
Es esencial generar un protocolo que permita caracterizar y predecir las propiedades mecánicas de los biomateriales, en este caso, es un fotopolímero impreso mediante estereolitografía para desarrollar andamios porosos con estructuras TPMS aplicando ensayos in vitro en un ambiente biológico, ya que hasta la fecha no se evidencian estos ensayos con foto resinas y, todavía no se conocen las ventajas y desventajas del uso de este tipo de estudio.

Alcance del proyecto

El trabajo propuesto está compuesto de las fases mostradas en la Figura 2:

Figura 2

Diagrama del sistema para el desarrollo del proyecto



Esta investigación empieza con la determinación de las propiedades mecánicas del biomaterial, para ello se plantea un diseño experimental que permita caracterizarlo al variar factores iniciales para lo cual se obtendrán las piezas necesarias mediante manufactura aditiva con estereolitografía y a continuación, se realizará el ensayo de microperforado para biomateriales poliméricos bajo la norma ASTM F2977-13 y el ensayo de micro tracción de plásticos bajo la norma ASTM D1708-18.

Posterior a esto, se desarrolla otro diseño experimental que permita obtener la mejor permeabilidad al variar el tipo de estructura TPMS para ello se fabrica un biorreactor que permite realizar ensayos de perfusión directa bajo la norma ASTM F2952-14 para identificar el coeficiente medio de permeabilidad de Darcy. A continuación, se procede a realizar los ensayos de adherencia y crecimiento celular bajo la norma ISO 10993 con un diseño

experimental previamente realizado que permita obtener el impacto al variar el tipo de estructura TPMS y su porosidad.

Al obtener los datos de los diversos ensayos, se procede a obtener los factores influyentes en las propiedades mecánicas (esfuerzo de tracción último, elongación última) y biológicas (permeabilidad, viabilidad) mediante un análisis tipo ANOVA.

Objetivos

Objetivo General

Estudiar la impresión 3D con biomateriales: diseño y caracterización básica.

Objetivos Específicos

- Diseñar y realizar pruebas de imprimibilidad para evaluar la capacidad de impresión de biomateriales.
- Diseñar y construir un biorreactor para el desarrollo de estudios de perfusión directa.
- Fabricar andamios impresos para el estudio de perfusión mediante el desarrollo de un protocolo de impresión.
- Realizar pruebas de validación in sílico o in vitro.

Capítulo II

Revisión de Literatura

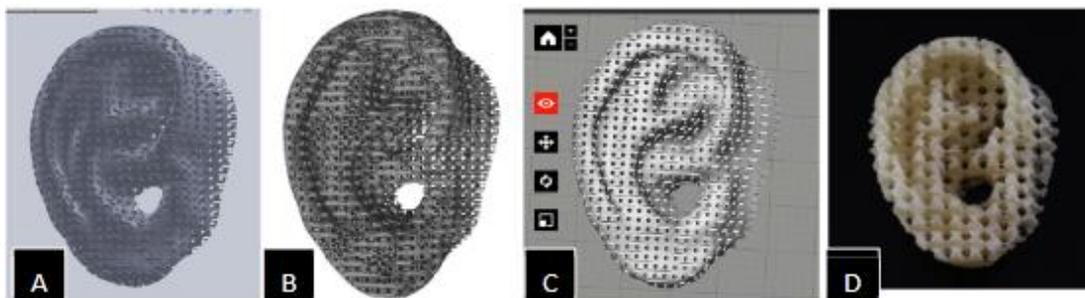
Manufactura Aditiva

La manufactura aditiva (MA) es un proceso de construcción de objetos 3D a partir de un archivo digital. En esto, se diseña un objeto en 3D mediante software de diseño asistido por computador (CAD) como SolidWorks, AutoCAD, ZBrush, Blender, Meshmixer, Sketchup, entre otros. Estos objetos se guardan en un formato legible y a continuación, se fabrica para ello el material se desplaza según los datos de la sección transversal capa por capa del diseño CAD con una impresora 3D (Tappa & Jammalamadaka, 2018).

Este tipo de manufactura digital es una técnica de prototipado rápido que brinda gran variedad de aplicaciones para desarrollar piezas con estructura compleja. Para obtener un elemento fabricado con este tipo de manufactura se realiza el modelo CAD, posterior a esto se selecciona la tecnología de impresión como se muestra en la Tabla 1 para dividirlo por capas y finalmente se imprime y se realiza un post proceso en caso de requerirse como se observa en la Figura 3 (Raeisdasteh Hokmabad et al., 2017).

Figura 3

Pasos secuenciales del proceso de impresión 3D



Nota. Se muestra el proceso de impresión 3D: A) Modelo CAD, B) Archivo de estereolitografía (.stl) del modelo, C) Corte por capas del modelo, D) Objeto impreso. Tomado de “Novel Biomaterial Used in medical 3D printing techniques” (p. 2), por K. Tappa & U. Jammalamadaka, 2018, *Journal of Functional Biomaterials*, 9 (1).

Tabla 1*Tipos de tecnologías de impresión 3D*

Categoría	Proceso
Impresión por extrusión	Modelo de deposición fundida FDM Bioimpresión
Sinterización de material	Sinterización de laser selectivo (SLS) Fabricación con haz de electrones (EBM) Estereolitografía (SLA) Producción de interfaz líquida continua (CLIP)
Material de enlace	Inkjet Polyjet
Laminación	Fabricación de objetos laminados LOM

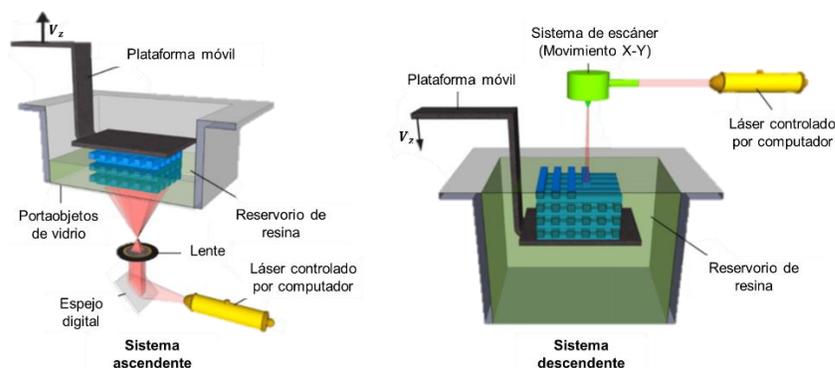
Nota. Adaptado de “Novel Biomaterial Used in medical 3D printing techniques” (p. 2), por K. Tappa & U. Jammalamadaka, 2018, *Journal of Functional Biomaterials*, 9 (1).

Estereolitografía

La estereolitografía se considera como el primer proceso de prototipado rápido. Es una tecnología de impresión de seguimiento de haz láser para la polimerización controlada espacialmente de resinas foto curables en patrones bidimensionales. Después de que cada capa haya curado, la estructura unida a la base se baja de arriba a abajo y encima se aplica otra capa de resina líquida sin curar. En el trayecto descendente, la luz se proyecta sobre una placa transparente colocada con dispersión del rayo láser y afecta a las placas formando una capa curable (Chia & Wu, 2015) como se observa en la Figura 4.

Figura 4

Representación esquemática de máquinas estereolitografía



Nota. Adaptado de “Design and fabrication of porous biodegradable scaffolds: a strategy for tissue engineering” (p. 48), por V. Raeisdasteh, et al., 2017, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 28 (16).

A partir del estudio bibliográfico de varios autores como (García et al., 2020a) existen diferentes procesos de AM y de los cuales existe mayor información base, sin embargo, de estereolitografía hay poca información acerca de los efectos de los parámetros de impresión sobre las propiedades mecánicas de las piezas obtenidas; cuya ventaja principal es la alta resolución de impresión.

La capacidad de manufacturar estructura complejas con alta resolución ha permitido el uso de la bioimpresión SLA en diversas aplicaciones desde la fabricación de andamios implantables hasta modelos complejos de tejido en un chip (Kumar & Kim, 2020).

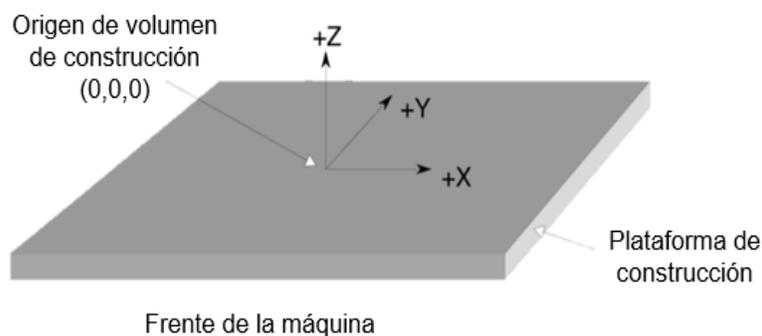
Sistema De Coordenadas

Para estandarizar la orientación de las piezas a fabricar mediante manufactura aditiva, la norma ASTM 52921 generaliza el sistema de coordenadas sobre la plataforma de impresión como se observa en la Figura 5. Esta orientación es especificada mediante la rotación alrededor del centro geométrico siguiendo la secuencia A, B y C lo cual requiere que se

especifique los valores del ángulo de giro siguiendo la regla de la mano derecha alrededor de cada eje coordenado como se observa en la Figura 6 (ASTM, 2013a).

Figura 5

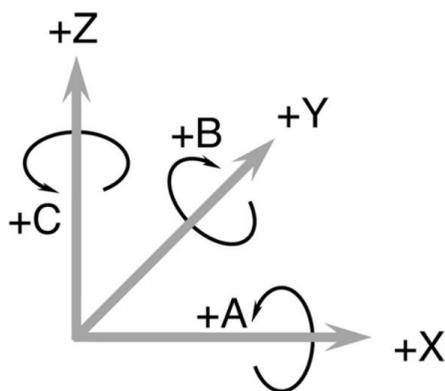
Máquina de manufactura aditiva genérica (Construcción ascendente)



Nota. Adaptado de *Standard terminology for additive manufacturing-Coordinate Systems and Test Methodologies*, por ISO/ASTM 52921, 2013, <https://www.astm.org/f2921-13r19.html>.

Figura 6

Regla de la mano derecha para rotaciones positivas con referencia al origen del volumen de construcción



Nota. Tomado de *Standard terminology for additive manufacturing-Coordinate Systems and Test Methodologies*, por ISO/ASTM 52921, 2013, <https://www.astm.org/f2921-13r19.html>

Propiedades mecánicas en piezas impresas por estereolitografía

Anisotropía. Es la propiedad de un material que muestra propiedades diferentes según la dirección en la que se observe, es decir, las características de un elemento no son uniformes en todas las direcciones.

Según García et al, 2020 al revisar varios estudios alrededor sobre las tecnologías FDM y SLA se muestra la elevada anisotropía de las piezas; la orientación de la impresión mantiene una gran relación con respecto a las dimensiones, acabado y comportamiento mecánico (Jiménez Carrión, 2023).

Porosidad. La porosidad es la propiedad de un sólido que contiene una red inherente de espacios abiertos es expresada en la Ecuación 1 la cual se encuentra en términos del volumen del sólido V_s , donde el total de volumen V_T constituye la suma del sólido y el volumen de los poros:

Ecuación 1

Ecuación de porosidad a partir del volumen de un sólido

$$n = \left(1 - \frac{V_s}{V_T}\right)$$

Nota. Tomada de “Design and mechanical characterization of solid and highly porous 3D printed poly (propylene fumarate) scaffolds” (p. 103) por J. Walker, et al., 2017, *Progress in Additive Manufacturing*, 2(1).

Permeabilidad. Es una medida de la facilidad de flujo de un fluido a través de un andamio poroso. Uno de los métodos para cuantificar este valor es mediante el caudal volumétrico a través del andamio bajo la norma ASTM F2952 la ley de Darcy. La medida de permeabilidad permite evaluar la homogeneidad y la anisotropía de los andamios de tejido (ASTM, 2022).

Ecuación 2

Ley de Darcy

$$Q = \frac{-k \cdot A \cdot \Delta P}{\mu \cdot L}$$

Q: Caudal

k: Coeficiente de Darcy

A: Área de la superficie expuesta

ΔP : Variación de presión, entrada y salida

μ : Viscosidad del fluido

L: Longitud donde se produce la pérdida de presión

Nota: Adaptado de *Standard Guide for Determining the Mean Darcy Permeability Coefficient for a Porous Tissue Scaffold* (p. 58), por ASTM, 2023, <https://www.astm.org/f2952-22.html>

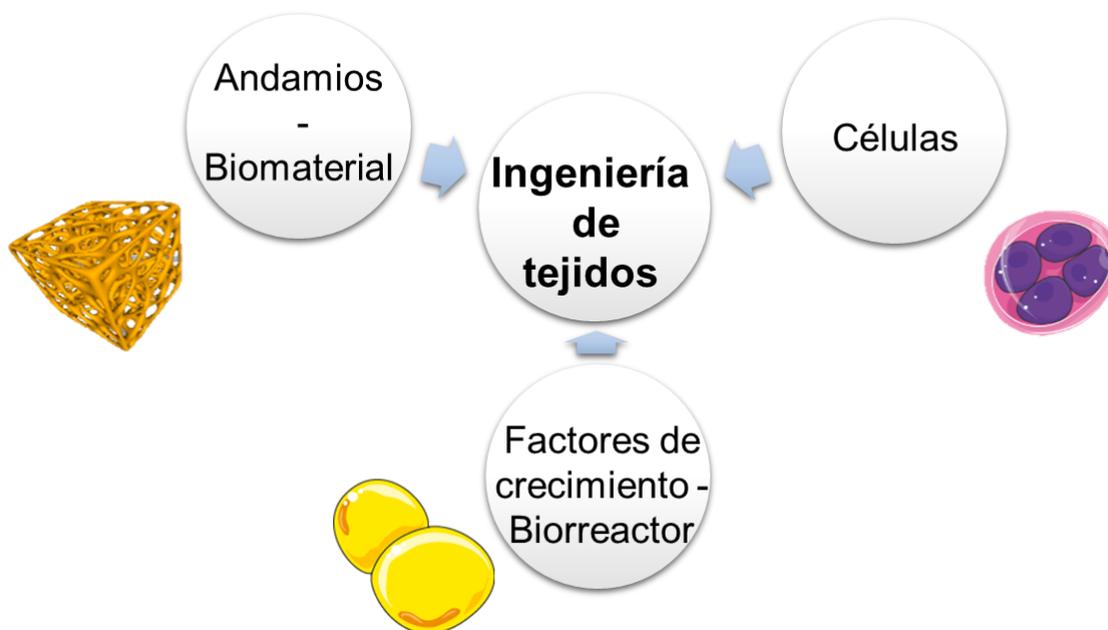
Ingeniería de tejidos

El término “Ingeniería tisular” o ingeniería de tejidos fue oficial en un taller de National Sciences Foundation en el año de 1988, la cual fue asignada para referirse al estudio de los principios y metodologías de ciencias de la vida e ingeniería para el entendimiento de las relaciones entre estructura y tejido en mamíferos y además, a la fabricación de sustitutos biológicos que permiten recuperar, mantener y/o mejorar la función del tejido (O'Brien, 2011).

La ingeniería de tejidos es definida como una ciencia multidisciplinaria que combina la biología, ciencia e ingeniería de los materiales, medicina regenerativa (Langer & Vacanti, 1993) y parte de una combinación de células, señales y andamios denominada tríada de la ingeniería tisular, como se observa en la Figura 7.

Figura 7

Tríada de ingeniería de tejidos



Nota. Se observa que la tríada de ingeniería de tejidos está formada por células, señales y el andamio que permite la formación de tejido por la adherencia de células. Adaptado de “Biomaterials & scaffolds for tissue engineering” (p. 89), por F. O'Brien, 2011, *Materials Today*, 14 (8).

Andamios

El término andamio se refiere al elemento fabricado de biomaterial en 3D antes de que se haya sometido a ensayos relacionado con células como los ensayos *in vitro* o *in vivo* (O'Brien, 2011). La capacidad del tejido óseo para auto repararse es limitada cuando el segmento de la lesión es de un tamaño crítico de 10 [mm], por lo que, en este caso se requiere una intervención externa para ayudar a la auto reparación mediante un injerto óseo. El injerto óseo sugiere una forma personalizada impidiendo el desgaste excesivo del tejido óseo en las zonas del defecto, pero también, deben tener una estructura porosa e interconectada que permitan crear un microentorno idóneo para la reproducción de células lo cual es denominado andamio poroso (Yang et al., 2018).

Los andamios funcionan como matrices celulares ECM que permiten la formación del tejido, estos como se menciona en Yang et al., Akter y otros autores, permiten la proliferación, diferenciación y síntesis de células facilitando la absorción de nutrientes proporcionando un entorno adecuado para ello debe cumplir con las propiedades mostradas en la Tabla 2.

Tabla 2

Propiedades ideales de andamios utilizados en ingeniería de tejidos

Propiedades	Descripción
Biocompatibilidad	Permite la adherencia de las células a las superficies del andamio provocando una reacción inmunitaria mínima.
Biodegradabilidad	Permite que se descomponen por degradación macromolecular con dispersión in vivo, pero sin que se demuestre su eliminación del organismo.
Biorreabsorbibles	Presentan una degradación masiva y se reabsorben in vivo; es decir, se eliminan por vías naturales como degradación o metabolización.
Bioabsorbibles	Pueden disolverse en los fluidos corporales sin que se produzca una ruptura de la cadena polimérica o una disminución de la masa molecular.
Bioerodibles	Muestran una degradación superficial y, además, se reabsorben in vivo sin efectos secundarios residuales.
Propiedades mecánicas ideales	Debe tener las propiedades mecánicas compatibles con el lugar anatómico en el cual se va a implantar el andamio y debe permitir una fácil manipulación de este.
Arquitectura ideal	Deben ser porosos para asegurar una difusión adecuada de nutrientes y células dentro de la estructura.

Nota. Adaptado de “Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage”, 2000, D. Hutmacher, *Biomaterials*, 21(24) y “Biomaterials & scaffolds for tissue engineering”, 2011, F. O’ Brien, *Materials Today*, 14(3).

La MA puede producir un andamio poroso con estructuras externas e interna porosa; para ello, se diseña un andamio tridimensional con la estructura deseada utilizando software CAD y se procede con los pasos mostrados en la Figura 8.

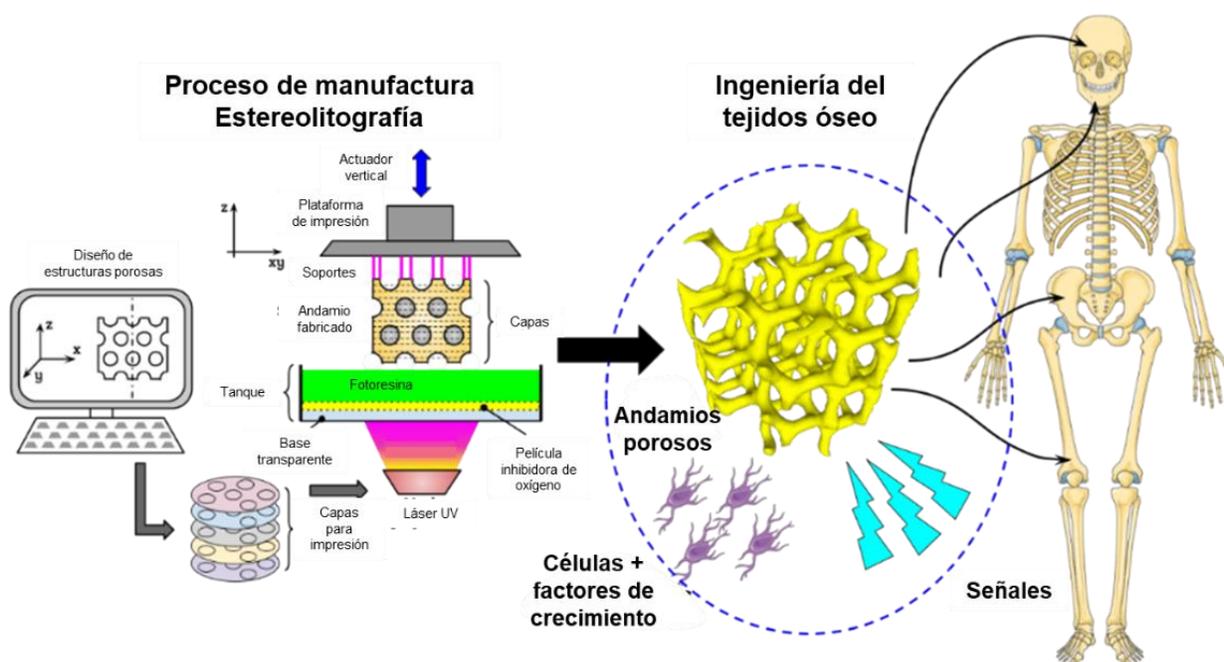
Las características que definen una estructura porosa son:

- Porosidad
- Tamaño de poros
- Interconectividad de poros

En el caso de ensayos, la porosidad y el tamaño de los poros influyen en la diferenciación in vitro de la población de células sembradas, sin embargo estos efectos pueden ser menos considerables en crecimientos óseo in vivo (Kim et al., 2010).

Figura 8

Descripción gráfica para el desarrollo de andamios a partir de estereolitografía



La permeabilidad puede ser definida como el potencial de fluido dentro de un sistema poroso, las actividades biológicas y celulares se ven muy influidas por la permeabilidad que viene determinada por la porosidad del andamio, esto afecta de forma significativa el flujo de nutrientes, adhesión celular, deposición de ECM; debido a ello, una mayor permeabilidad es un requisito necesario para obtener una mejor reparación tisular (Ebrahimi, 2021).

Estructuras basadas en Superficies triplemente periódicas

Las TPMS o Superficies Mínimas triplemente periódicas son superficies que tienen una curvatura media igual a cero y, además, tienen periodicidad en tres dimensiones. A partir de sus ecuaciones definidas por los parámetros estructurales como el tamaño de las celdas, el espesor de la pared y la densidad relativa. Las ventajas de este tipo de estructuras, son que presentan una mejor manufactura que otras estructuras (vigas) y conjuntamente, no muestran concentradores de esfuerzos en las juntas ya que está formada por líneas continuas (Arjona Rodríguez, 2021).

Existen diversas estructuras TPMS las cuales son representadas con ecuaciones en el espacio, de las cuales las que usualmente han sido objeto de estudio (Arjona Rodríguez, 2021; Blanquer & Grijpma, 2021; Gawronska & Dyja, 2021; Walker et al., 2017) son las siguientes:

Ecuación 3

Ecuación de la estructura TPMS Schwarz Primitiva

$$\cos(x) + \cos(y) + \cos(z) - C = 0$$

Nota. Tomada de Caracterización de estructuras celulares TPMS manufacturadas aditivamente para aplicaciones de absorción de energía (p. 14), por J. Arjona, 2021, Universidad de los Andes.

Ecuación 4

Ecuación de la estructura TPMS Giroide

$$\sin(x) \cos(y) + \sin(y) \cos(z) + \sin(z) \cos(x) - C = 0$$

Nota. Tomada de *Caracterización de estructuras celulares TPMS manufacturadas aditivamente para aplicaciones de absorción de energía* (p. 14), por J. Arjona, 2021, Universidad de los Andes.

Ecuación 5

Ecuación de la estructura TPMS Diamante

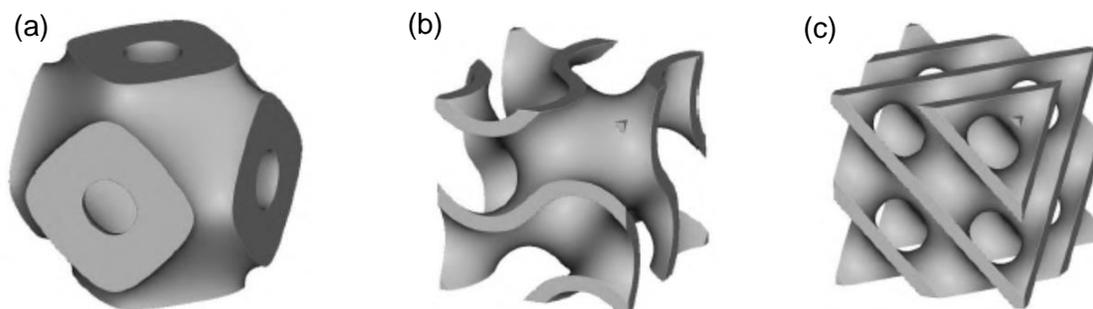
$$\sin(z) \cos(x - y) + \cos(z) \sin(x + y) - C = 0$$

Nota. Tomada de “A Numerical Study of Geometry’s Impact on the Thermal and Mechanical Properties of Periodic Surface Structures” (p. 4), por E. Gawronska & R. Dyja, 2021, *Materials*

Las ecuaciones mencionadas (Ecuación 3, Ecuación 4, Ecuación 5) describen algunas de las estructuras TPMS más comunes a analizar y se observa la celda unitaria representativa en la Figura 9.

Figura 9

Celdas unitarias de estructuras TPMS



Nota. Se observa las celdas unitarias de las estructuras TPM: (a) Primitive, (b) Gyroid, (c) Diamond. Adaptado de *Caracterización de estructuras celulares TPMS manufacturadas aditivamente para aplicaciones de absorción de energía* (p. 14), por J. Arjona, 2021, Universidad de los Andes.

Este tipo de superficies se encuentran frecuentemente en la naturaleza y en roles principales dentro de la química, bioquímica y procesos celulares. El estudio de estructuras

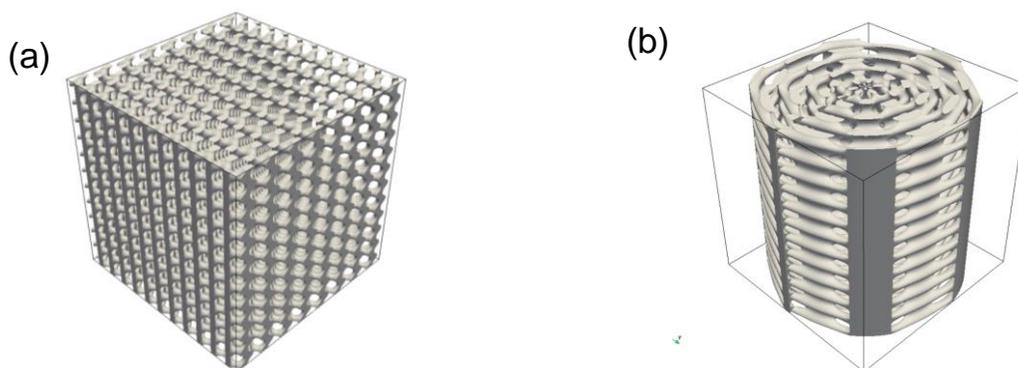
TPMS permiten dar un nuevo punto de vista del diseño de andamios en la ingeniería de tejidos (Blanquer & Grijpma, 2021)

Sistemas de coordenadas de estructuras TPMS

El sistema de coordenadas utilizado para la construcción de la estructura TPMS corresponde al enfoque matemático de la ecuación general en la que define la estructura en coordenadas cartesianas o cilíndricas dependiendo de la necesidad como se observa en la Figura 10 a partir de la transformación de variables del dominio rectangular al dominio cilíndrico (Trujillo Freire, 2023).

Figura 10

Estructura TPMS Diamante en diferentes sistemas de coordenadas



Nota. Se observa en la figura que el andamio producido a partir de una estructura Diamond se encuentra en (a) coordenadas cartesianas y en (b) coordenadas cilíndricas con los mismos parámetros de tamaño del sólido y de celda unitaria.

Biomateriales: introducción y clasificación

Un biomaterial es definido como un material destinado a interactuar con sistemas biológicos para evaluar, recuperar, mejorar o aumentar cualquier tejido, órganos y permite el desarrollo de dispositivos médicos. Los biomateriales han evolucionado hasta interactuar con el cuerpo e influir en ciertos procesos biológicos para la regeneración de tejidos (O'Brien, 2011).

Presentan una gran diversidad de propiedades químicas, mecánicas y biológicas, los biomateriales utilizados son los observados en la Tabla 3:

Tabla 3*Clasificación de biomateriales con sus aplicaciones*

Clasificación	Ejemplos	Aplicación
Metales y aleaciones de metal	Oro, platino, titanio, acero, cobalto	Implantes ortopédicos, tornillos, clavos y placas
Cerámicas y compuestos de carbón	Sales de fosfato de calcio, vidrio	Implantes ortopédicos bioactivos, implantes dentales, audífonos artificiales
Polímeros	PMMA, PCL, PLA, policarbonatos	Implantes dentales y ortopédicos, andamios de ingeniería de tejidos, sistemas de administración de fármacos.
Compuestos	Fibras de carbono reforzadas, compuestos de relleno dental	Implantes ortopédicos porosos, rellenos dentales, guantes, catéteres.

Nota. PMMA: Polimetilmetacrilato, PCL: Policaprolactona, PLA: ácido poli láctico. Adaptado de “Novel Biomaterials Used in Medical 3D Printing Techniques” (p. 3), por K. Tappa & U. Jammalamadaka, 2018, *Journal of Functional Biomaterials*, 9(1).

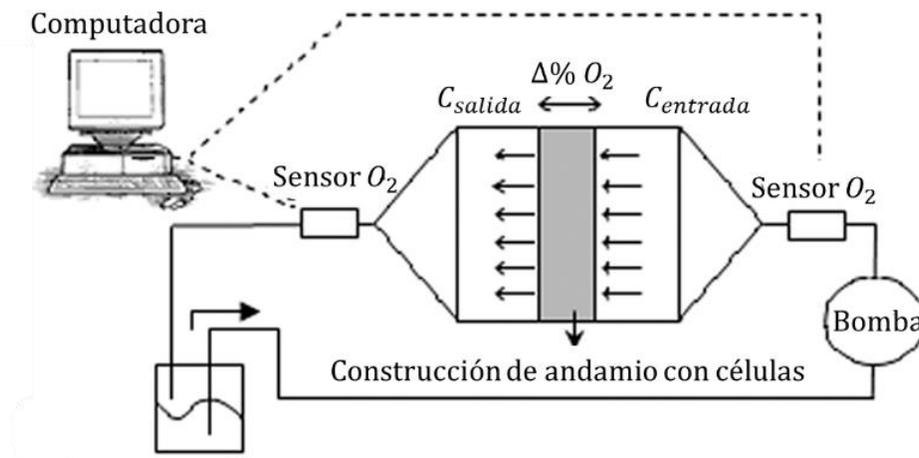
Biorreactor de perfusión

Los biorreactores son fundamentales en la ingeniería de tejidos, es un dispositivo de laboratorio que utiliza medios mecánicos para influir en los procesos biológicos en condiciones de funcionamiento normal las cuales están supervisadas. Son utilizadas para recapitular entornos fisiológicos en las células in vivo como expandir células, probar tratamientos y establecer nuevas terapias (Langer & Vacanti, 1993). Estos son utilizados para aumentar la eficiencia en cultivos celulares y saber si el componente a implantarse resiste las condiciones biológicas y si reacciona adecuadamente a los procesos y funciones que debe realizar (Akter, 2016). Las células se siembran inicialmente en andamios impresos en 3D con cierto porcentaje de porosidad con una distribución uniforme, posteriormente, las células sembradas deben

recibir nutrientes con la ayuda de un flujo (Santoro et al., s/f), un esquema básico de las partes de un biorreactor es el de la Figura 11..

Figura 11

Diagrama esquemático del biorreactor de perfusión



Nota. Adaptado de “Perfusion Culture of Cell-seeded 3D Scaffolds for Tissue Engineering,” por R. Santoro, et al., s.f., <https://www.presens.de/knowledge/publications/application-note/perfusion-culture-of-cell-seeded-3d-scaffolds-for-tissue-engineering-572>

Las funciones que debe cumplir un biorreactor son:

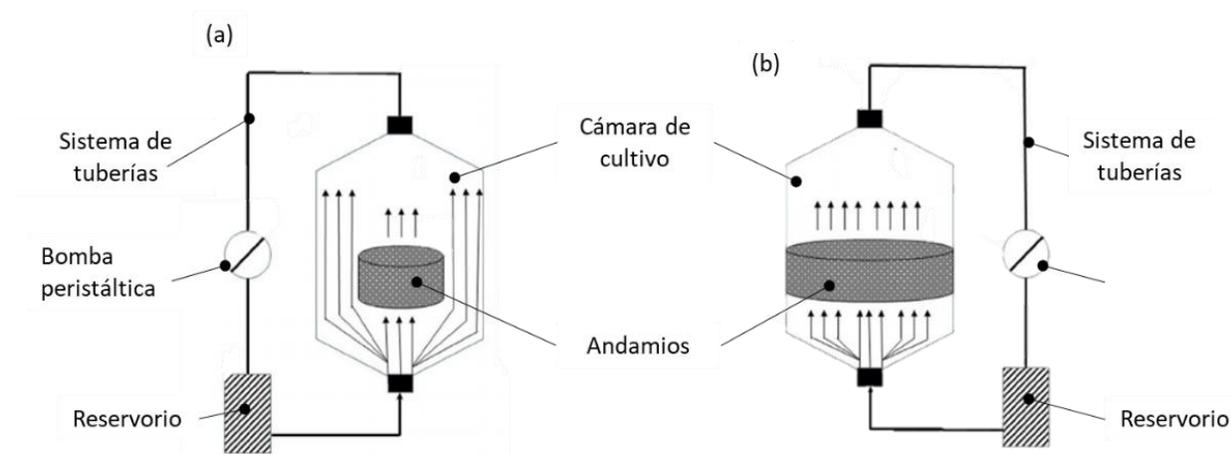
- Proporcionar control sobre la proliferación celular inicial en el andamio
- Proporcionar una transferencia de masa y factores de crecimiento durante un cultivo in vitro
- Permiten estudiar los efectos de estímulos biofísicos y terapéuticos sobre las células y los tejidos a desarrollar (Akter, 2016).

Se clasifica en perfusión directa e inversa. La perfusión directa implica que el fluido circule directamente a través del poro del andamio; se asegura que el fluido viaje por la estructura interna y externa del mismo lo que permite una suministración de constante de nutrientes y oxígeno evitando el almacenamiento de desechos; por otro lado, la perfusión indirecta implica que el fluido circule alrededor del andamio, no pasa directamente por los poros

de este permitiendo que el espacio circundante libere nutrientes y oxígeno hacia el interior del andamio como se observa en la Figura 12.

Figura 12

Perfusión directa e indirecta



Nota. (a) Perfusión directa y (b) perfusión indirecta. Adaptado de “Can Cultured Meat Be an Alternative to Farm Animal Production for a Sustainable and Healthier Lifestyle” (p. 7), por Munteanu et al. (2021), *Frontiers in Nutrition*.

Estudio in silico

Son modelos que se denominan “in silico” para indicar que la simulación se realiza en una computadora y para destacar su semejanza en función con los modelos in vivo o in vitro. Los modelos matemáticos y computacionales permiten comprender sistemas complejos y optimizar los procesos, uno de ellos, son los principios generales del crecimiento y el desarrollo de tejidos (Akter, 2016).

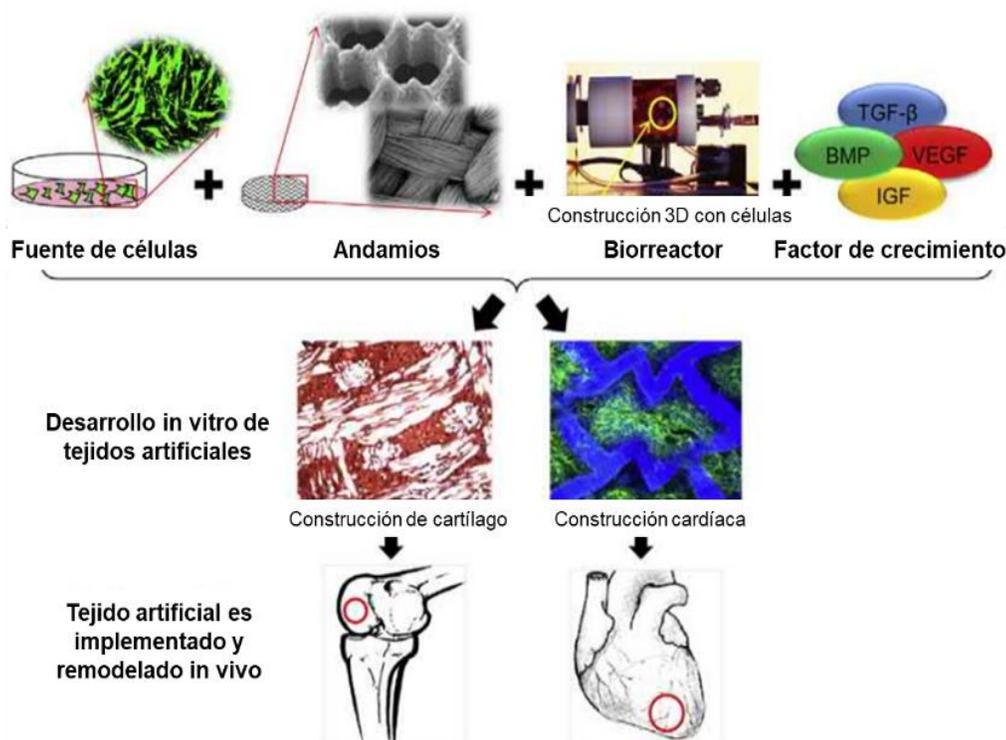
Estudio in vitro

Este estudio se refiere al desarrollo de experimentos y procesos generados en un entorno de laboratorio, es decir, fuera de un organismo vivo. Un estudio in vitro es utilizado para la creación de órganos que requieren de un suministro continuo de nutrientes y oxígenos,

con una eliminación continua de productos de desechos, donde se requiere tener el sistema controlado y aislado (Akter, 2016) como se observa en la Figura 13.

Figura 13

Estrategia de ingeniería de tejidos funcionales in vitro



Nota. Se utilizan células, andamiajes, biorreactores y factores de crecimiento para el desarrollo de tejidos funcionales. Adaptado de *Tissue Engineering Made Easy* (p. 157), por F. Akter, 2016, Academic Press.

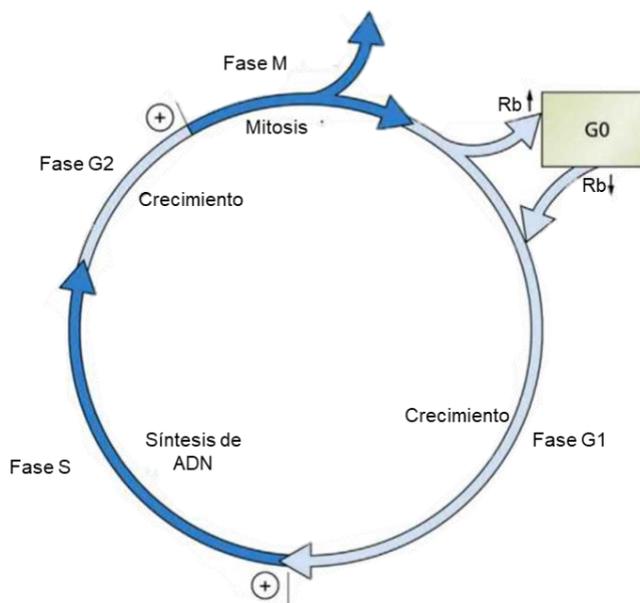
Diferenciación y proliferación celulares

Proliferación

Es el incremento de células idénticas por medio de mitosis, estas divisiones sucesivas permiten la regeneración o el mantenimiento del tejido. Las células pueden pasar por el ciclo celular, la cual consta de las fases de duplicación de ADN y de la división celular permitiendo generar dos células hijas idénticas (Lodish et al., 2000) como se observa en la Figura 14.

Figura 14

Ciclo de la célula



Nota. Se observa el ciclo de la célula con las diferentes fases: crecimiento, duplicación de ADN y la división. Adaptado de *Molecular cell biology* (p. 75), por H. Lodish et al, (2000), WH Freeman New York.

Diferenciación

Es la generación de células con características y funciones particulares, donde se puede perder también la capacidad de división. Le permite a la célula definirse morfológicamente, esto permite que las células se conviertan en diversos tipos de tejidos para cumplir funciones específicas (Lodish et al., 2000).

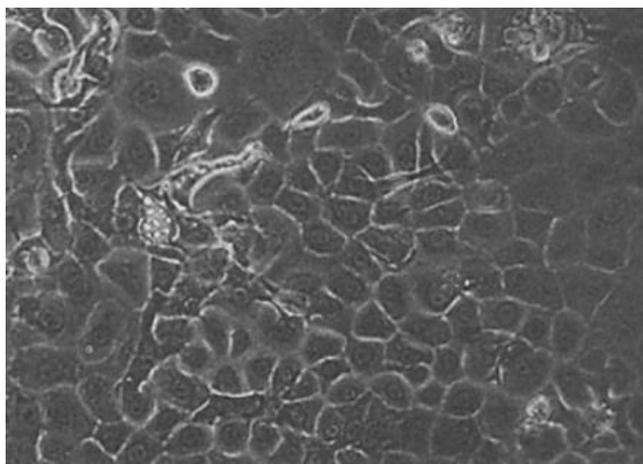
Células HaCaT

La línea celular HaCaT o conocida como Queratinocitos Humanos adultos con bajo calcio y alta temperatura, se generó a partir del cultivo primario a largo plazo de Queratinocitos de la piel humana de un adulto (Alves, 2020), son células inmortalizadas, lo que significa que tienen la capacidad de dividirse y crecer de forma indefinida dentro del cultivo (Boukamp et al., 1988).

Debido a la capacidad de crecer durante largos periodos de tiempo, las células HaCaT permiten hacer experimentos a largo plazo para evaluar condiciones que afectan la respuesta de los queratinocitos; utilizados ampliamente en investigaciones sobre biología celular, dermatología, toxicología, entre otros campos (Boukamp et al., 1988; Gabbott & Sun, 2018).

Figura 15

Células HaCaT de primera fase cultivadas



Nota. En la imagen se observa una micrografía de células HaCaT. Tomado de “Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line” (p. 764), por P. Boukamp et al, 1988, *The Journal of Cell Biology*,106(3).

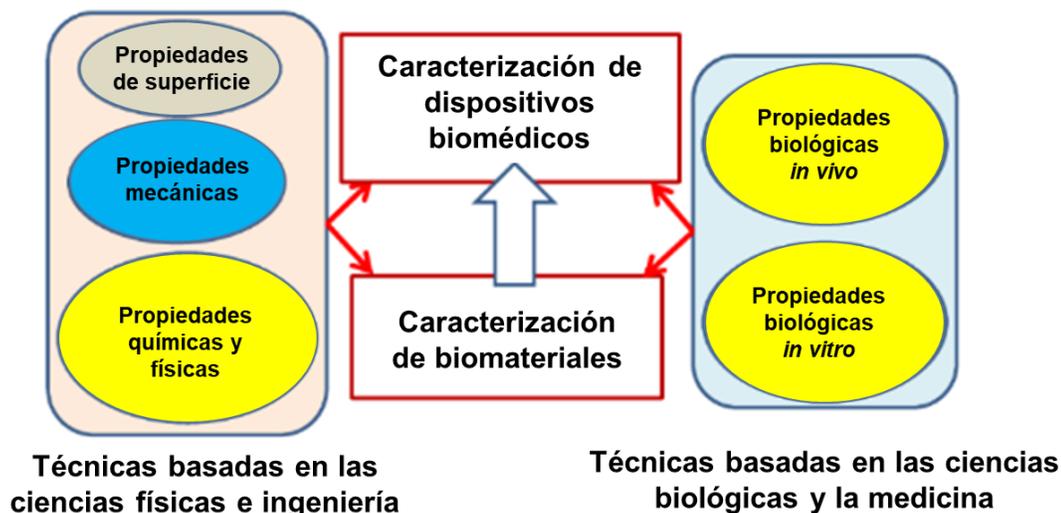
Caracterización de un biomaterial

La caracterización de un biomaterial permite obtener información sobre sus propiedades iniciales y como afectan a las propiedades mecánicas, físicas, biológicas, químicas de salida de aquellos materiales que serán utilizados en dispositivos médicos. Existen varios campos para caracterizar a los materiales enfocándose en sus propiedades, para la caracterización física – dimensional se han utilizado métodos como la medición con herramientas como calibrador, micrómetro o microscopia óptica y electrónica de barrido (Bandyopadhyay & Bose, 2013; Chua et al., 2017; Jiménez Carrión, 2023; Vallejo Bustamante, 2022). De igual forma la ASTM normaliza la caracterización de andamios de biomaterial en ingeniería tisular para dispositivos

médicos con la ASTM F2150-13 en la cual especifican algunas propiedades para ser caracterizadas (ASTM, 2019).

Figura 16

Esquema de caracterización para biomateriales



Nota. Adaptado de *Characterization of Biomaterials* (p. 9), por A. Bandyopadhyay y S. Bose, 2013, Newnes.

Caracterización mecánica de andamios

Para la caracterización mecánica de los andamios impresos mediante estereolitografía en algunos casos la cantidad de material para la fabricación de las probetas es mínima, por lo cual se requiere el desarrollo de ensayos miniatura, ya que permite conocer las características fundamentales utilizando volúmenes de material mínimas en comparación a ensayos convencionales; y además, estos ensayos permiten caracterizar mecánicamente zonas muy pequeñas que no son posibles caracterizar con otros ensayos (Venegas Vásquez, 2016).

Ensayo de tracción

El ensayo de tracción o ensayo de tensión es una prueba mecánica que determina la deformación y el comportamiento de una probeta cuando es sometida a fuerzas de tracción, debido a ello permite evaluar las propiedades mecánicas de un material como la resistencia,

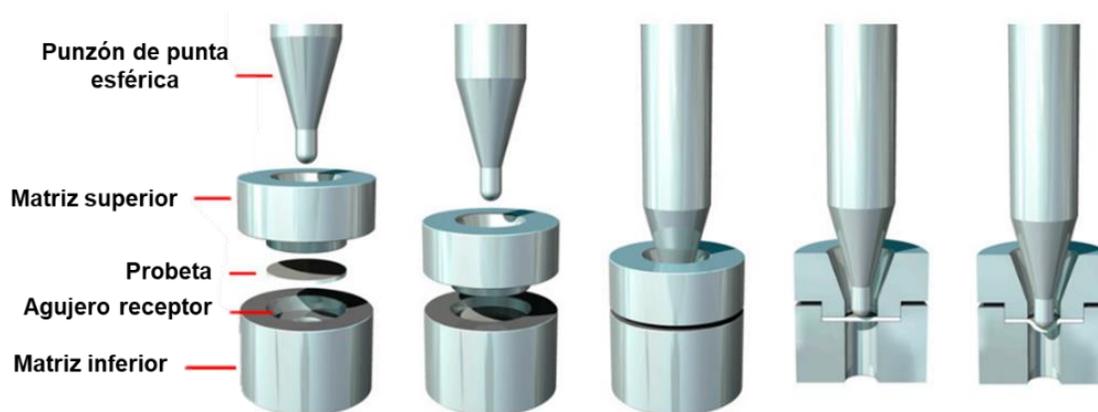
elasticidad, ductilidad y fragilidad. La ASTM propone algunas normas con referencia a este ensayo para estandarizarlo, como la ASTM D638 para plásticos y la ASTM D1708 para el uso de especímenes de micro tensión los cuales son probetas de menor tamaño en comparación a la norma principal (ASTM, 2014, 2018).

Ensayo de Microperforado

El ensayo de Microperforado o SPT (Small Punch Test) es utilizado actualmente para la determinación de las propiedades mecánicas a tracción, la temperatura de transición dúctil - frágil, comportamiento de fractura y el fenómeno de fragilización. Este ensayo consiste en aplicar una fuerza axial producida por un punzón esférico sobre una probeta circular con un espesor mínimo (Lucon et al., 2020) como se observa en la Figura 17.

Figura 17

Representación esquemática del ensayo de microperforado SP



Nota. Adaptado de “Small Punch Testing to Estimate Mechanical Properties of Additively Manufactured Ti-6Al-4V” (p. 12), por E. Lucon et al, 2020, NIST.

Para estandarizar el ensayo, la ASTM propone una norma para generalizar el ensayo específicamente para materiales poliméricos ASTM F2977 (ASTM, 2013b) en la cual se especifican dimensiones de la probeta y parámetros sugeridos.

Caracterización biológica – química de andamios

La caracterización biológica – química hace énfasis en un análisis detallado del material desde una perspectiva de las interacciones con diversos sistemas biológicos, como células, tejidos y organismos (Akter, 2016; Bandyopadhyay & Bose, 2013). Para ello se requiere, ensayos in sílico, in vitro o in vivo de tal forma se pueda tomar información de la interacción entre un elemento y el ambiente biológico en el que se encuentra, como en el caso de los dispositivos médicos (ASTM, 2019).

Uno de los ensayos para poder caracterizar este tipo de materiales, es el ensayo de adherencia celular, citotoxicidad, degradación y permeabilidad. Estos ensayos permiten escalar del ensayo in sílico o in vitro, a ensayos in vivo como el desarrollo de un biorreactor de perfusión para producir volúmenes relevantes de hueso que puede ser monitorizado durante el cultivo y la formación ósea en la implantación en ratones (Janssen et al., 2006).

De por sí, la caracterización estructural de los andamios es complejo por lo que la capacidad de medir la permeabilidad en función del tiempo de un andamio manufacturado con material biodegradable es idónea para estimar el comportamiento de este ante un fluido, ya que esto depende directamente del tipo de fluido de trabajo pues su viscosidad dinámica varía. Facilitando adquirir información de las propiedades de transporte de nutrientes y factores de crecimientos involucrados en el proceso (Wang et al., 2010).

Capítulo III

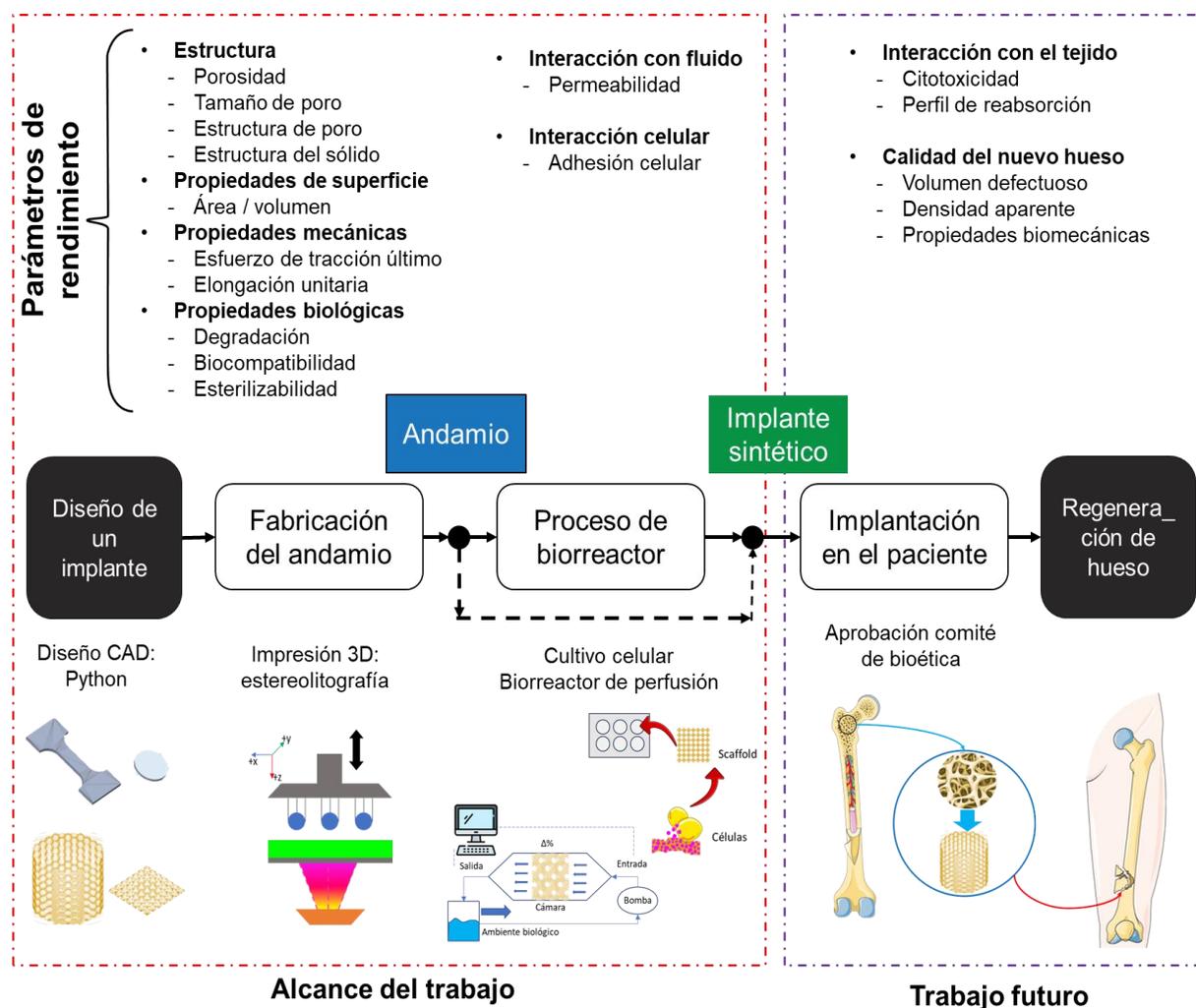
Metodología

Metodología para la caracterización de un biomaterial

Como se menciona en el Capítulo II, los biomateriales son materiales utilizados en el ámbito de la ingeniería tisular y en la fabricación de dispositivos médicos, para lo cual, se planteó la metodología de la Figura 18 enfocándose en la obtención de la caracterización de las propiedades mecánica y de las propiedades biológicas desde una perspectiva de parámetros de rendimiento para la obtención de un implante sintético como resultado final.

Figura 18

Esquema de la metodología a seguir para el desarrollo de implantes sintéticos



Propiedades críticas para la caracterización

Con base en el Capítulo II, las propiedades que se ha investigado en varios estudios para caracterizar un biomaterial son las mecánicas como el esfuerzo de tracción último, elongación unitaria; para conseguir datos con respecto a estas propiedades se emplea un ensayo de micro tracción para plásticos bajo la norma ASTM D1708. De igual forma, debido a la limitación de la cantidad de material se recomienda utilizar el ensayo de microperforado con referencia a la norma ASTM F2977 para analizar la degradación con respecto a un ambiente biológico.

En el caso de la caracterización de las propiedades biológicas de un biomaterial, se investiga acerca de la adherencia y viabilidad celular por ello se emplean ensayos in vitro; en cambio, para la permeabilidad se emplea un ensayo haciendo referencia a la norma ASTM F2952. Para lo cual se diseñó el sistema de caracterización “biorreactor de perfusión” para ejecutar este experimento con base a las recomendaciones de la normativa mencionada.

Finalmente, los ensayos realizados en ambos casos se encuentran acorde a la normativa ASTM F2150 encargada de la caracterización y la evaluación de andamios porosos usados en la ingeniería tisular.

Diseño experimental de caracterización

El objetivo de realizar un diseño experimental es brindar al investigador un método estadístico que permita determinar las variables iniciales que influyen en la salida, de tal forma se pueda maximizar, minimizar o tener una mayor precisión en un posible resultado, a partir de variaciones de las variables propuestas con respecto a las propiedades mecánicas y biológicas.

Definición de la meta del ensayo

El proceso de caracterización de un biomaterial para impresión 3D mediante estereolitografía tiene como objetivo determinar cuáles son los parámetros de impresión y estados de la probeta que tienen mayor significancia sobre el último esfuerzo de tracción y elongación unitaria antes de llegar a la rotura; además, cuáles son los parámetros de diseño

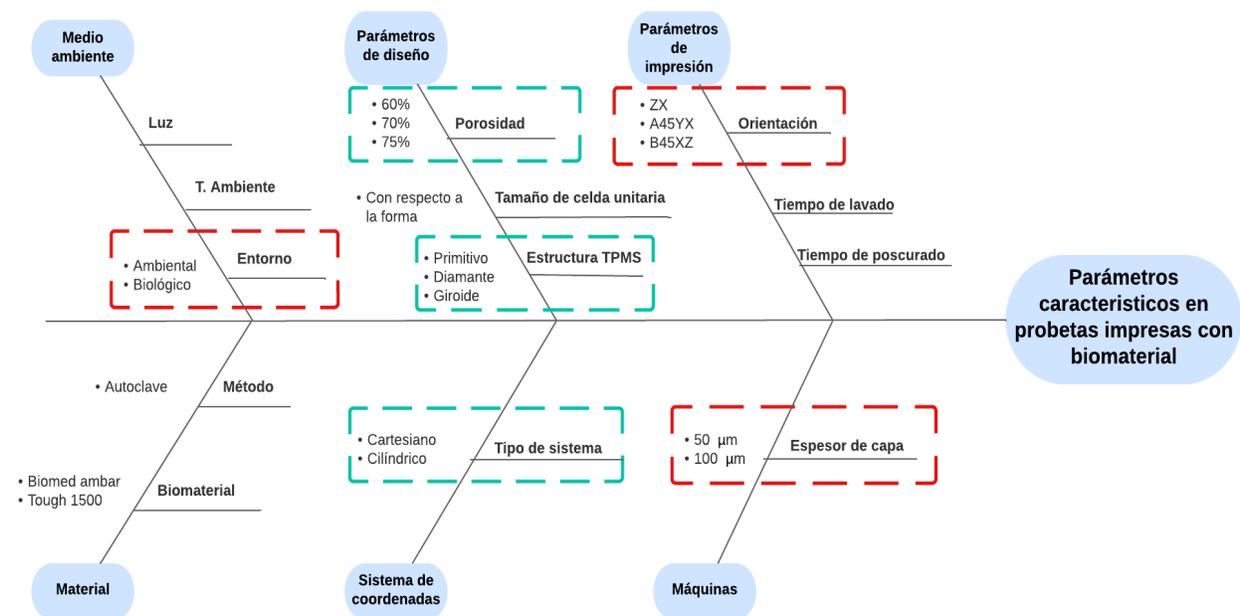
del andamio que tienen mayor significancia sobre la reproducción de células y su permeabilidad.

Factores y niveles

Para seleccionar los factores y niveles que pueden ser partícipes de este diseño experimental, se plantea el diagrama de Ishikawa mostrado en la Figura 19. En el cual se denotan los factores que se pueden editar o se puede tener un control sobre estos, dentro del proceso de diseño, impresión y posterior estado de la pieza.

Figura 19

Diagrama de Ishikawa para el proceso de caracterización de biomateriales



Nota. Se observan los parámetros seleccionados, donde las encerradas en recuadros rojos se van a enfocar en propiedades mecánicas y los recuadros turqueses en propiedades biológicas

Para la selección de las variables enfocadas en las propiedades mecánicas, se toma en cuenta la incidencia del parámetro dentro del proceso de impresión 3D mediante estereolitografía:

Espesor de capa. Altura del grosor de la capa de impresión [μm].

Orientación. Es la posición de la probeta sobre la placa de impresión.

Entorno. Es el conjunto de factores que rodea al espécimen, en este caso la probeta, que influyen en su comportamiento a posterior.

Otra variable que tomar en cuenta es el entorno, debido a que posterior a la manufactura de las piezas se requiere verificar si el entorno en el que se encuentra afecta a las propiedades mecánicas, este factor se lo tomará en cuenta solo en el ensayo de microperforado por condiciones limitadas comprobando la degradación del material bajo un medio biológico

A partir de los factores seleccionados, se seleccionan los siguientes niveles en la orientación:

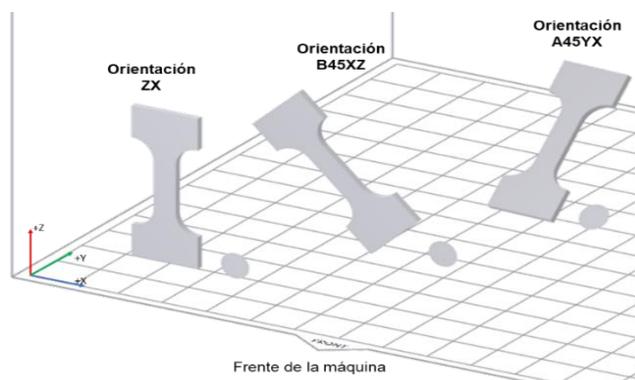
ZX. La pieza se encuentra alineada verticalmente, perpendicular a la plataforma de impresión. Durante el experimento se lo denominará SV.

B45XZ. La pieza se encuentra alineada verticalmente con respecto a la plataforma de impresión, pero con una inclinación de 45° desde el eje X. Durante el experimento se lo denominará S45B.

A45YX. La pieza se encuentra a un ángulo de 45° con respecto al eje y de la plataforma de impresión. Durante el experimento se lo denominará S45A.

Figura 20

Orientaciones de impresión seleccionadas



Los niveles para el espesor de la capa serán: 50 $[\mu\text{m}]$ y 100 $[\mu\text{m}]$. También definiendo los niveles del entorno:

Ambiente. Corresponde a condiciones normales de un laboratorio, donde la temperatura normal es 25 °C, una presión atmosférica de 1 atm, en un ambiente cerrado.

Biológico. Corresponde a condiciones normales de un laboratorio, temperatura de 25 °C, una presión atmosférica de 1 atm, ambiente cerrado contenido en un ambiente biológico.

Para la selección de las variables enfocadas en las propiedades biológicas, se toma en cuenta la incidencia del parámetro dentro del proceso de diseño.

Porosidad. es la propiedad de un sólido que contiene espacios abiertos en un cuerpo.

Estructura TPMS. Es la estructura interna de un andamio correspondiente a superficies mínimas periódicas.

Sistema de coordenadas: Es el marco de referencia utilizado para describir la forma del andamio.

A partir de los factores seleccionados, los niveles propuestos influyen dentro del proceso de diseño de los andamios. Para la porosidad se plantean los siguientes niveles, teniendo como referencia estudios previos (Ramírez Rodríguez et al., 2022) donde no se puede lograr una porosidad muy alta debido al mínimo tamaño de las interconexiones de poros causando su rotura inmediata, y en el caso de una porosidad muy baja no se obtendrán poros muy definidos por la impresión debido a ello se propone: 60%, 70% y 75%.

En el caso de las estructuras TPMS, se seleccionó la estructura Primitiva, Diamante y Giroide a partir de la revisión de otros estudios (Arjona Rodríguez, 2021; Gawronska & Dyja, 2021; Walker et al., 2017) pues son las más estudiadas.

Por último, se plantea la edición en el sistema de coordenadas para la generación de andamios con coordenadas rectangulares y cilíndricas como se observó en la Figura 10, para conocer si esto afecta en la fluidez del ambiente líquido a utilizar por la deformación de las celdas unitarias. A las probetas para el ensayo de adherencia se las denominará PA y para el ensayo de permeabilidad se las denominará de aquí en adelante como PP.

Método de diseño experimental

Dados los factores y los niveles se plantea un diseño experimental para el ensayo de tracción, para ello se realiza un diseño experimental tipo Factorial Completo General, debido a que no se mantiene un número fijo de niveles; 2 factores; 3 y 2 niveles; 3 réplicas; obteniendo un total de 6 corridas por factor, los cuales se observan en la Tabla 4.

Tabla 4

Factores y niveles para el diseño experimental: Ensayo de tracción

Factor	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
Espesor de capa [μm]	50	100	-
Orientación	SV	S45A	S45B

Consecuentemente, los factores y los niveles para el ensayo de microperforado se plantea un diseño experimental de tipo Factorial Completo; 3 factores; 2 niveles los cuales se observan en la Tabla 5; 3 réplicas; obteniendo un total de 8 corridas.

Tabla 5

Factores y niveles para el diseño experimental: Ensayo de microperforado

Factor	Nivel 1	Nivel 2
Espesor de capa [μm]	50	100
Orientación	SV	S45B
Entorno	Ambiente	Biológico

Se puede observar que, con respecto al factor de espesor de capa, no se tomó en cuenta la orientación A45YX debido a que se reiteraría la posición con respecto a la orientación ZX como se observa en la Figura 20.

Dados los factores y los niveles se plantea un diseño experimental para el ensayo de adherencia celular, para ello se realiza un diseño experimental tipo Taguchi L9 con 2 factores y 3 niveles; 1 réplica debido a la limitante del material obteniendo 9 corridas (Tabla 6).

Tabla 6

Factores y niveles para el diseño experimental: Ensayo de adherencia celular

Factor	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
Estructura	Diamante	Giroide	Primitivo
Porosidad	60%	70%	75%

Consecuentemente, los factores y los niveles para el ensayo de permeabilidad se plantea un diseño experimental de tipo Factorial Completo General; 3 factores; 2-3 niveles, 1 réplica obteniendo un total de 12 corridas los cuales se observan en la Tabla 7.

Tabla 7

Factores y niveles para el diseño experimental: Ensayo de permeabilidad

Factor	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
Estructura	Giroide	Diamante	Primitiva
Porosidad	60%	70%	75%
Sistema de coordenadas	Rectangular	Cilíndrico	

Matriz de experimentos

A partir de lo mencionado en los anteriores apartados, se obtienen las matrices de experimentos para los ensayos de tracción y microperforado como se visualiza en la Tabla 8 y en la Tabla 9 respectivamente, correspondiente a ensayos mecánicos.

Tabla 8

Diseño de experimento seleccionado para el ensayo de tracción

Diseño factorial de múltiples niveles		
Factor	Nombre	Número de niveles
1	Orientación	3
2	Espesor de capa	2
	Número de réplicas	3
Corridas base	6	
Total, de corridas	18	

Tabla 9

Diseño de experimento seleccionado para el ensayo de microperforado

Diseño factorial		
Factor	Nombre	Número de niveles
1	Espesor de capa	2
2	Orientación	2
3	Entorno	2
	Número de réplicas	3
Corridas base		8
Total, de corridas		24

A partir de lo mencionado en los anteriores apartados, se obtienen las matrices de experimentos para los ensayos de adherencia y permeabilidad como se visualiza en la Tabla 10 y en la Tabla 11 respectivamente, correspondiente a ensayos biológicos.

Tabla 10

Diseño de experimento seleccionado para el ensayo de adherencia celular

Diseño Taguchi L9		
Factor	Nombre	Número de niveles
1	Estructura	3
2	Porosidad	3
	Número de réplicas	1
Corridas base		9
Total, de corridas		9

Tabla 11

Diseño de experimento seleccionado para el ensayo de permeabilidad

Diseño factorial de múltiples niveles		
Factor	Nombre	Número de niveles
1	Estructura	3
2	Porosidad	3
3	Sistema de coordenadas	2
	Número de réplicas	1

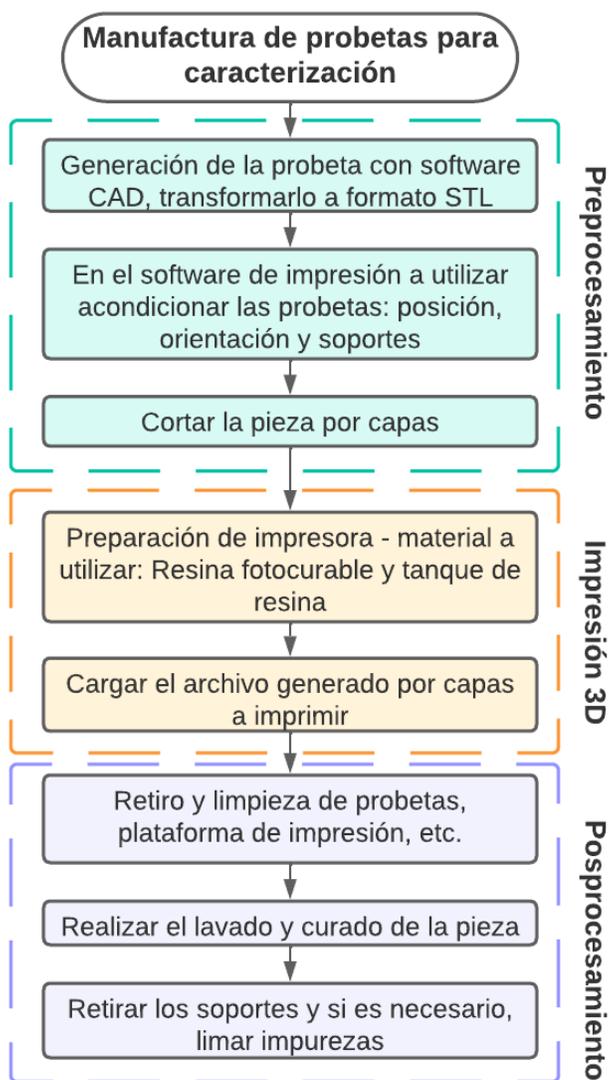
Corridas base	12
Total, de corridas	12

Fabricación de probetas

Para la manufactura de las probetas y andamios se desarrolla el diagrama de flujo que se muestra en la Figura 21. Posteriormente, se describe cada elemento:

Figura 21

Diagrama de flujo para la manufactura de probetas

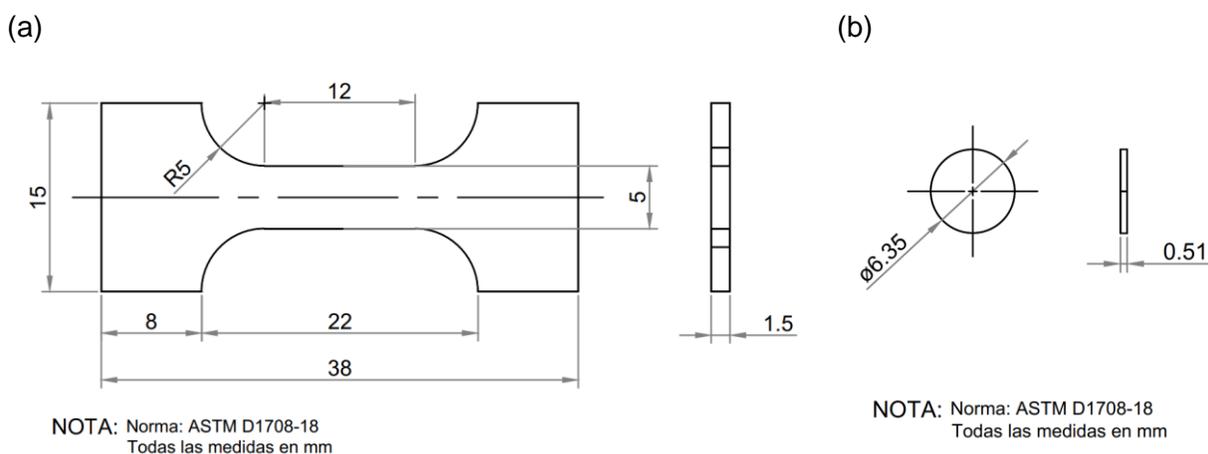


Preprocesamiento

Probetas: Especímenes. Se genera el diseño CAD en un software de diseño para ello, las dimensiones de las probetas se diseñan con referencia de la norma ASTM D1708 para el ensayo de micro tracción, las cuales van a ser denominadas PMT y, por otro lado, con referencia a la norma ASTM F2977 para el ensayo de microperforado, van a ser denominadas como PMP. En la Figura 22 se observan las dimensiones correspondientes.

Figura 22

Parámetros dimensionales para probetas de caracterización mecánica: especímenes

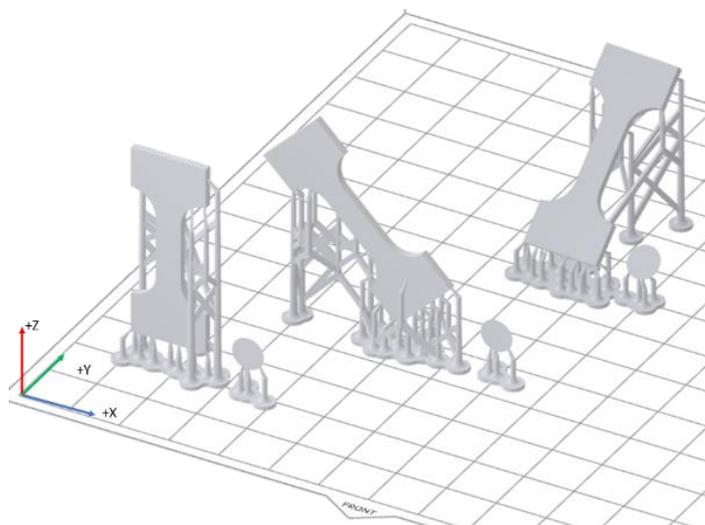


Nota. Se observan las probetas a utilizar para la caracterización mecánica: (a) Probeta PMT y (b) Probeta PMP.

Las probetas PMT y PMP son cargadas al software de impresión 3D PreForm (Formlabs, 2022) en el cual se colocó los soportes requeridos para las diferentes orientaciones y se coloca los parámetros de impresión requeridos para las diferentes corridas del diseño experimental (Tabla 4 - Tabla 5). Al tener ya los archivos listos se generan las capas automáticamente y se procede a subirlos a la impresora seleccionada para proceder a su impresión.

Figura 23

Soportes de probetas PMP y PMT



Probetas: Andamios. Se genera el diseño CAD en un programa Python diseñado para la creación de andamios porosos tras el ingreso de ciertos parámetros dimensionales como tipo de estructura, porosidad, volumen de la celda unitaria, volumen del andamio poroso, tipo de sistema de coordenadas, espesor de pared (Trujillo Freire, 2023). El procedimiento se especifica en el Protocolo de diseño (ver Apéndice A1). A partir de esto se seleccionan los parámetros de la Tabla 12.

Tabla 12

Parámetros de diseño de andamios

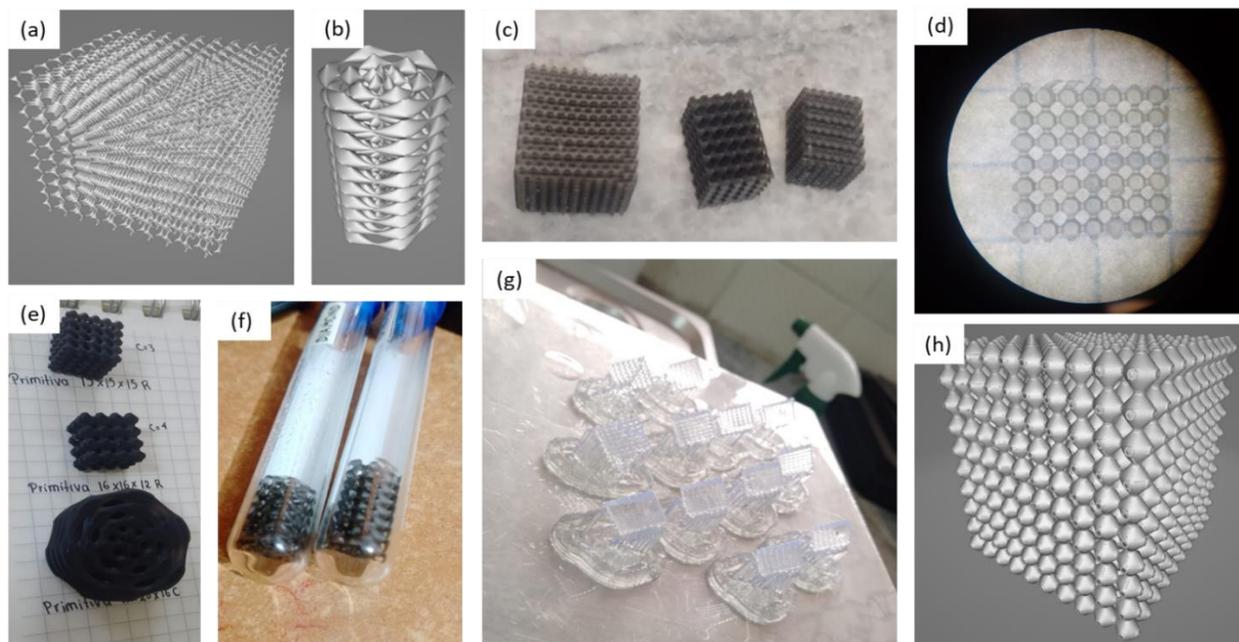
Parámetro por ensayo	Valor	
	Ensayo de adherencia PA	Ensayo de permeabilidad PP
Forma del andamio	Prisma rectangular	Cilindro
Volumen del andamio	10.5x10.5x1.5 [mm]	Ø20x20 [mm]
Volumen de celda unitaria	1.5x1.5x1.5 [mm]	2.5x2.5x2.5 [mm]
Espesor de pared	-	-
Sistema de coordenadas	Rectangular	Rectangular / Cilíndrico
Estructura	Primitiva, Diamante, Giroide	
Porosidad	60%-70%-75%	60%-75%

Para conseguir estos parámetros de diseño se fue realizando previamente varias impresiones mediante estereolitografía con otra resina disponible en el Laboratorio de Investigación y desarrollo de prototipos, con muchas variantes hasta obtener volúmenes de celda y de andamio idóneo para cada ensayo en particular, ya que no comparte las mismas características físicas, en la Figura 24 se puede observar las impresiones de prueba realizadas.

Las medidas del volumen del andamio que corresponden a las PA, se restringe el área rectangular al diámetro del pocillo de la placa en la que va a ser ensayada (12 mm) y para que exista cierta holgura en el área de acción de la placa. Sin embargo, en el caso de las PP el volumen del cilindro se limita al valor de la cámara del biorreactor diseñado, en la Figura 25 se observan las probetas finales a caracterizar.

Figura 24

Pruebas de andamios realizados

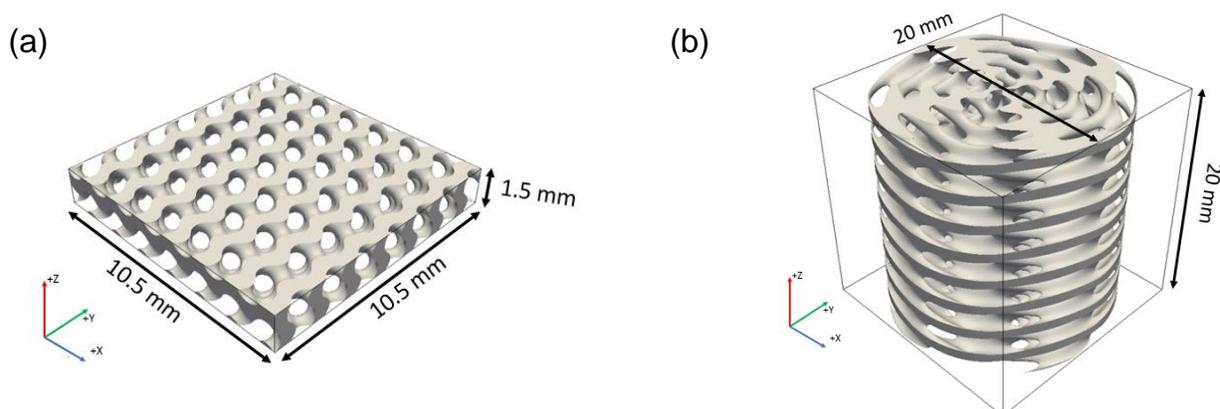


Nota. (a) Prueba de diseño de andamio con alta porosidad y estructura giroide, (b) Prueba de diseño de andamios con sistema de coordenadas cilíndrico, (c) Pruebas de impresión con diversos tamaños de celdas unitarias, (d) fotografía de andamio obtenido a nivel microscópico,

(e) Pruebas de impresión para comprobar resolución de estructura, (f) Pruebas de impresión a escala milimétrica, (g) Pruebas de imprimibilidad y (h) Andamio final para prueba de concepto.

Figura 25

Probetas para caracterización biológica: PA y PP



Nota. Se observan las probetas a utilizar para la caracterización biológica: (a) Probeta PA y (b) Probeta PP.

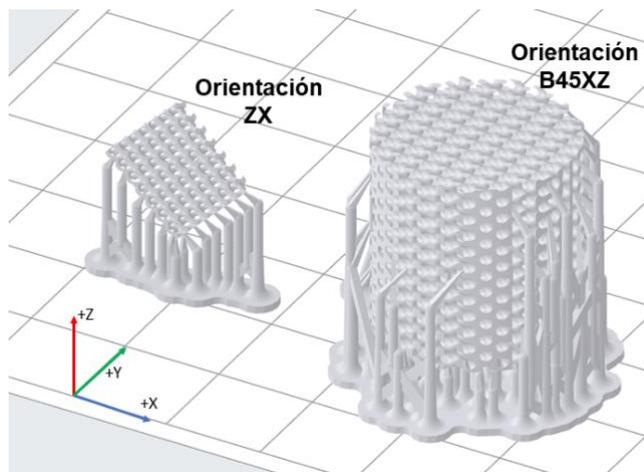
Las probetas PA y PP son cargadas al software de impresión 3D PreForm (Formlabs, 2022) a partir de la matriz de diseño previamente obtenida (Tabla 10 - Tabla 11) en el cual se colocó los soportes requeridos para cada probeta, la orientación recomendable para las probetas PA es S45B debido a que no se generan tantos soportes en las periferias como en las demás orientaciones y son más prácticos para limpiar la probeta como se muestra en la Figura 26, además, el espesor de capa sugerido es 50 [μm] causando mayor definición en la impresión.

De la misma forma, la orientación sugerida para las probetas PP es SV debido a que por su estructura interna porosa puede que se generen inconvenientes al momento de la impresión y existan mínimos detectados, esto facilita el retiro de los soportes ya que se encuentran solo en la zona externa como se observa en la Figura 26, el espesor de capa recomendable es 100 [μm] debido a que existan menos mínimos detectados provocando fallas en la impresión, aunque se corre el riesgo de que los poros se tapen.

Al tener ya los archivos listos se generan las capas automáticamente y se procede a subirlos a la impresora para proceder a su impresión.

Figura 26

Soportes de probetas PA y PP



Impresión 3D mediante SLA

Para la selección de la resina a utilizar en las impresiones, se tiene dos factores importantes: disponibilidad en el territorio ecuatoriano y certificación de biocompatibilidad. A partir de esta premisa en Guttridge et al (2022) se realiza una revisión de los materiales disponibles para impresión 3D enfocados en aplicaciones médicas y las cuales cumplen la certificación de las normas ISO 10993-1: Evaluación biológica de dispositivos médicos (ISO, 2018) y la norma ISO 13485: Dispositivos médicos- sistemas de gestión de calidad (ISO, 2021), de ellos, se seleccionó los materiales cuyo proveedor es FormLabs (Guttridge et al., 2022) debido a la continua interacción con esta tecnología dentro de la universidad.

Con ello, se buscó dentro del territorio ecuatoriano la disponibilidad de resinas que sean biocompatibles para el desarrollo del experimento de las cuales se seleccionaron las siguientes:

- BioMed Amber (Hoja técnica: Apéndice B1)
- Tough 1500 (Hoja técnica: Apéndice B2)

En la Tabla 13 se encuentra los materiales y equipos utilizados para la impresión de las probetas PMT y PMP. En este caso, como son materiales utilizados para dispositivos médicos se requiere cumplir con la característica de biocompatibilidad al contacto con la piel, para ello el proceso de lavado y poscurado debe ser el recomendado por FormLabs lo cual se encuentra en el protocolo de impresión de andamios (ver Apéndice A2).

Tabla 13

Materiales y equipos utilizados para la impresión de probetas

Materiales	Equipos
Resina BioMed Amber	Form 3B / Form 2 (ver Apéndice B3)
Resina Tough 1500	Tanque de resina
Alcohol isopropílico al 99%	Form Wash: (ver Apéndice B4)
Herramientas para remoción y corte de piezas	Form Cure: (ver Apéndice B5)

Para la impresión se utilizó dos resinas biocompatibles, a continuación, se especifica las características de cada impresión por material haciendo referencia a las probetas PMT y PMP:

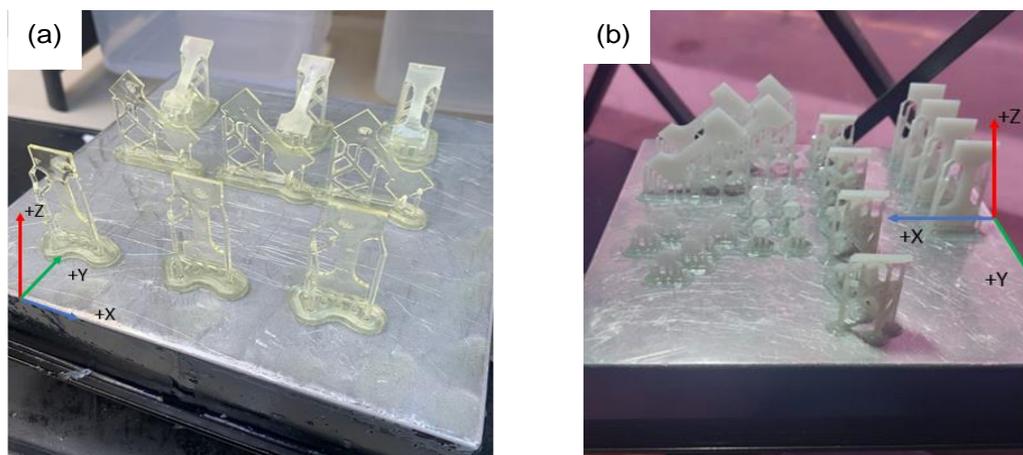
Resina BioMed Amber. La impresión se lleva a cabo con la impresora Form 2 de FormLabs, tanque de resina LT, bajo la matriz de experimentos de las probetas PMT de la Tabla 8.

Resina Tough 1500. La impresión se lleva a cabo con la impresora Form 3B de FormLabs, tanque de resina Form 3, bajo la matriz de experimentos de las probetas PMT de la Tabla 8 y PMP de la Tabla 9.

En la Figura 27 se observa las probetas impresas en las diferentes resinas para su posterior caracterización.

Figura 27

Probetas impresas



Nota. Se observa en (a) Probetas PMT en resina BioMed Amber y en (b) Probetas PMT – PMP en resina Tough 1500

Posterior eso, se realizó impresiones de probetas PA con la resina BioMed Amber de lo cual se obtuvo la Figura 28, se identifica que no logró imprimir correctamente los andamios debido a algún tipo de desconfiguración de la impresora o tanque. Debido a eso, los ensayos para la caracterización biológica solo se desarrollarán con el material Tough 1500, ya que este material si completó la impresión de ambas probetas de forma correcta como se observa en la Figura 29.

Figura 28

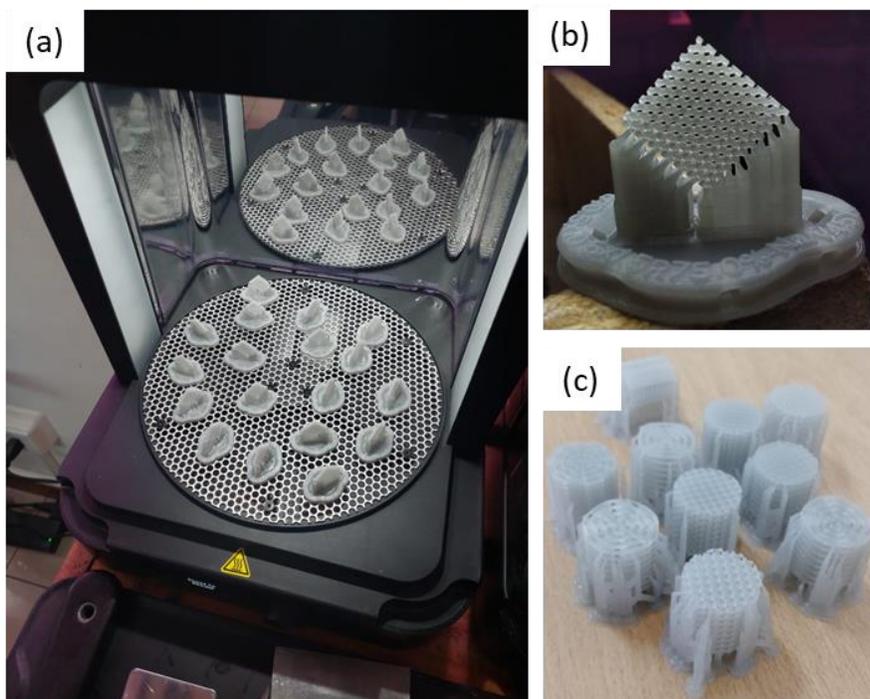
Probetas PA impresas con BioMed Amber



Nota. Se observa que solo se mantiene los soportes, los andamios no llegan a formarse.

Figura 29

Probetas PA-PP impresas con Tough 1500



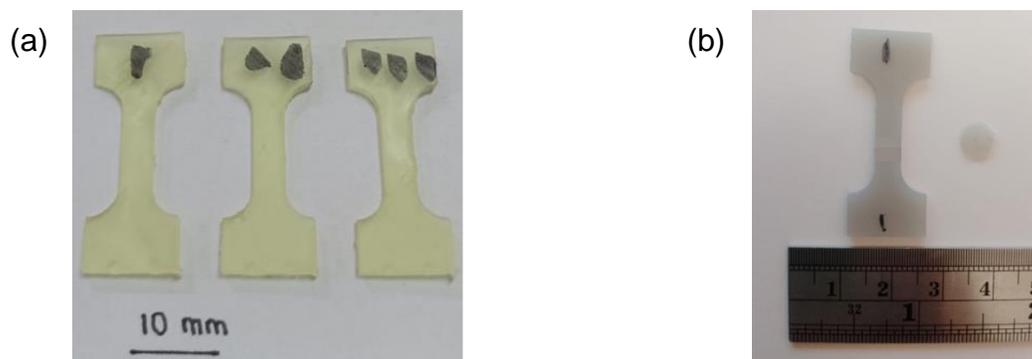
Nota. (a) Se observa que se obtuvo una impresión correcta sin defectos, (b) Probeta PA impresa satisfactoriamente y (c) Probeta PP obtenida.

Posprocesamiento

Ya impresas las probetas se procede a posprocesarlas bajo las recomendaciones de cada resina (ver Apéndice B2-B3), las cuales se observan en el protocolo de impresión (ver Apéndice A2). Al cumplir con el procedimiento, se procede a retirar los soportes utilizados en la impresión y a limar impurezas de algún residuo. Finalmente, se obtienen las probetas a caracterizar como se observa en la Figura 30 y Figura 31.

Figura 30

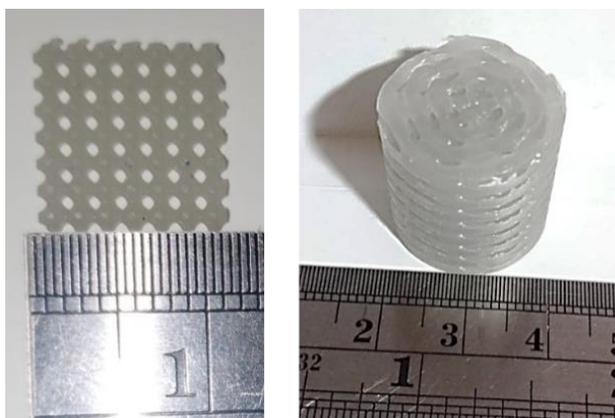
Probetas finales a caracterizar



Nota. (a) PMT en resina BioMed Amber y en (b) PMT – PMP en resina Tough 1500

Figura 31

Probetas PA y PP finales a caracterizar



Nota. Probetas PA y PP impresas en resina Tough 1500

Diseño y construcción del sistema de caracterización

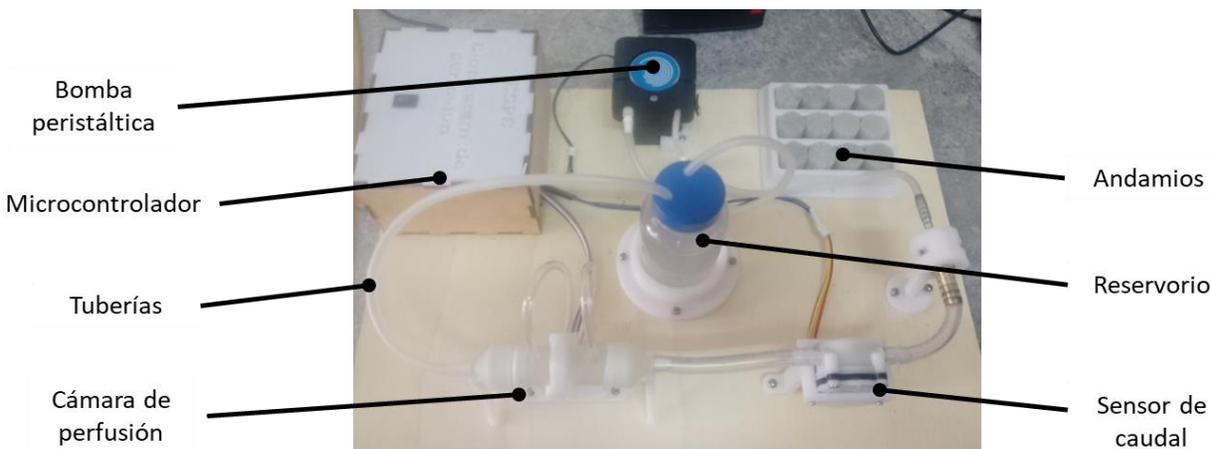
Se plantea un modelo de prueba de concepto para demostrar la viabilidad de ejecutar cultivo celular, diferenciación y proliferación de células, a través de, medios dinámicos mediante perfusión directa, el cual permite que el fluido atraviese por completo el andamio. Se aborda el enfoque de modelo conceptual debido a que el alcance del presente proyecto no incluye la adquisición de biomateriales para la construcción de un biorreactor de perfusión directa que pueda ser incorporado a una incubadora para cultivo celular.

Prueba de concepto para biorreactor de perfusión

El biorreactor de perfusión realizado se observa en la Figura 32, fue planteado tras la investigación de las funciones de un biorreactor del Capítulo II, se encarga de recolectar información de variables como: corriente eléctrica, caudal y presión diferencial entre la entrada y salida del andamio poroso.

Figura 32

Biorreactor para ensayos de perfusión



Los planos correspondientes a la cámara del biorreactor se encuentran en el Apéndice C1.

Bomba peristáltica

Para que exista un caudal que atraviese el andamio PP (perfusión directa) se requiere de una bomba sin que interactúe o contamine el fluido, una de las más utilizadas para experimentos biológicos es la bomba peristáltica (Fdit, USA) esta bomba es controlada por un motor a pasos NEMA 17 (GOSO, China). El controlador utilizado para el motor es el A4988 (HiLetgo, China) conectado al microcontrolador al cual se le da señales digitales que permiten el movimiento del motor provocando que transporte el fluido, la bomba dispone de rodillos para el transporte del fluido permitiendo dosificación con cada rotación, a mayor número de rodillos la intermitencia es menor. Las características del motor son las mostradas en la Tabla 14.

Tabla 14*Características de la bomba peristáltica*

Ángulo de paso [°]	Voltaje de alimentación [V]	Corriente nominal [A]	Resistencia de fase [Ω]	N° de Rodillos
1.8	6-12	1.3	2.5	6

Calibración del motor de la bomba. Para la calibración del motor haciendo uso de su controlador, se procede a limitar la corriente dependiente del motor y encontrar su valor de referencia acorde al paso que se requiere con la Ecuación 6, en este caso, se utilizará los pasos completos.

Ecuación 6*Corriente máxima del motor*

$$I_{max} = \frac{V_{ref}}{8 \cdot R_S}$$

Donde:

 R_S : Resistencia de sensibilidad [Ω] V_{ref} : Voltaje de entrada del pin de referencia [V] I_{max} : Corriente máxima del motor

El valor de resistencia de sensibilidad en este caso es $R_S = 0.1\Omega$, y se procede a calcular el V_{ref} para calibrarlo con el potenciómetro del controlador, Apéndice 8, con esto se encuentra que:

$$V_{ref} = 1.04 V$$

Medición de presión diferencial

Para obtener la diferencia de presión diferencial se requiere que el sensor a utilizar tenga dos conexiones para la entrada y salida, a partir de ello, se utiliza el sensor MPX10DP. El sensor tiene un rango de 0-10 [kPa] y una sensibilidad de 3.5 mV/kPa cuya salida digital ingresa al microcontrolador para ser procesado.

La salida analógica de este sensor está en el orden de los [0-35] mV, debido a ello se requiere amplificarla para que pueda ser detectado por el microcontrolador por ese motivo se va a utilizar un módulo de amplificación de precisión AD620 (Datos técnicos: Apéndice 8). Este nos va a permitir una amplificación de 100 para lograr una salida de máximo 3.5 V.

Medición de corriente

Para conocer la corriente que ocupa el motor de la bomba peristáltica se requiere el sensor de corriente ACS712ELECTR-05B-T (Allegro MicroSystems, Inc., Massachusetts, USA) el cual tiene un rango de medición de corriente entre [-5 a 5 A] y una sensibilidad de 185mV/A.

Calibración del sensor de corriente. Para hallar la corriente, se requiere la Ecuación 7 que relaciona el voltaje y la sensibilidad del sensor.

Ecuación 7

Corriente obtenida del sensor

$$I = \frac{V - 2.5}{Sensibilidad}$$

La sensibilidad es la pendiente de la relación Voltaje vs. Corriente, y la constante 2.5 V es el valor para una corriente 0A. Al obtener valores de corriente con el microcontrolador el error obtenido es considerable, con respecto a eso debemos calibrarlo midiendo la corriente obtenida con un amperímetro y el voltaje obtenido del sensor. Al tener estos puntos [V1, I1] y [V2, I2] se procede a calcular la sensibilidad para hallar el valor de corriente como se observa en la Ecuación 7.

Medición de caudal

La medición de caudal se lo realiza al inicio del ensayo para conocer con que valor está ingresando a la cámara, para lo cual, se utiliza el caudalímetro YF-S401 (Apéndice 8) con un rango de medición de 1-5 L/min con una sensibilidad de ± 2 L/min. El sensor internamente tiene un rotor con aletas que tienen un imán, dentro una cámara que dispone de un sensor de efecto hall para detectar los pulsos generados.

Para obtener el valor del caudal se parte de la Ecuación 8, cuyo factor de conversión es 98 según la hoja técnica del sensor (Apéndice 8).

Ecuación 8

Medición de caudal

$$Q = \frac{f}{Factor}$$

Donde

f: Frecuencia [Hz]

Factor: Factor de conversión

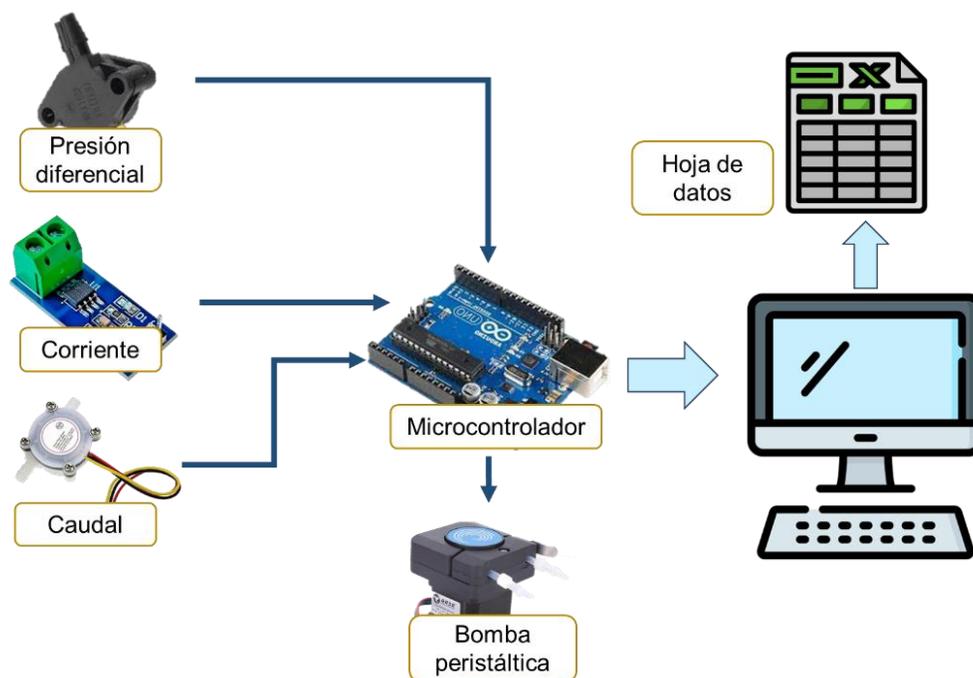
Q: Caudal obtenido [L/min]

Procesamiento de datos: Microcontrolador

Los valores de entrada son la presión diferencial, corriente del motor, caudal todos ellos ingresan al microcontrolador, debido a que se requiere algunas entradas analógicas se ha optado por utilizar el Arduino UNO, ya que cuenta con las entradas y salidas necesaria para la aplicación. Para obtener los datos en una hoja de Excel se requiere una comunicación Serial entre el Arduino y el computador, acorde a esto, en la Figura 33 se observa la comunicación de los dispositivos electrónicos.

Figura 33

Diagrama de comunicación para el sistema



Caracterización de probetas

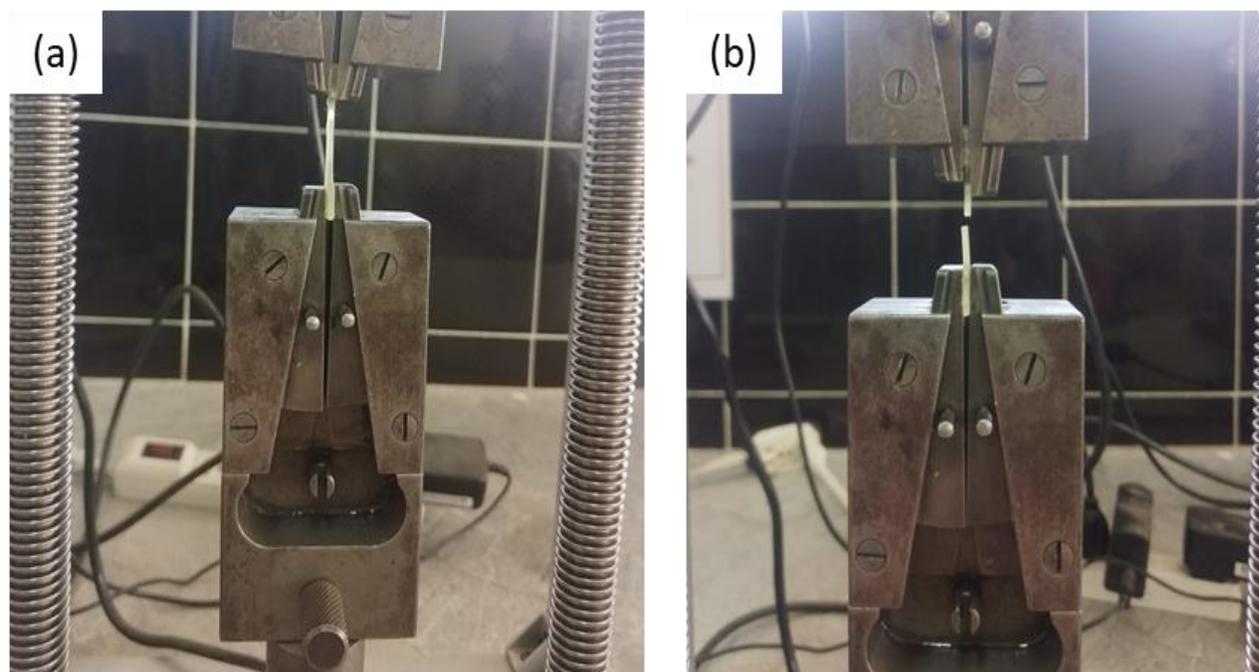
Se procede a describir la forma de caracterización con los ensayos ya mencionados utilizando las probetas finales.

Ensayo a tracción: BioMed Amber

El ensayo a tracción con las probetas de la resina BioMed Amber se realiza en la máquina para ensayos de tracción del Laboratorio de Mecánica de los Materiales perteneciente a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE utilizando mordazas de tipo pinzas, debido al tamaño de probetas reducido, esta máquina cuenta con una célula de carga de 100 [kgf], el ensayo se realiza a una velocidad de 3 [mm/min], ya que está predeterminada, en ella se realizaron las 18 corridas. El ensayo consiste en sujetar la probeta por el extremo superior e inferior, y someterla a una fuerza axial hasta lograr la rotura como se observa en la Figura 34. Se obtienen los datos de fuerza, desplazamiento, esfuerzo de tracción y elongación unitaria de cada ensayo, las probetas ya ensayadas se observan en la Figura 35.

Figura 34

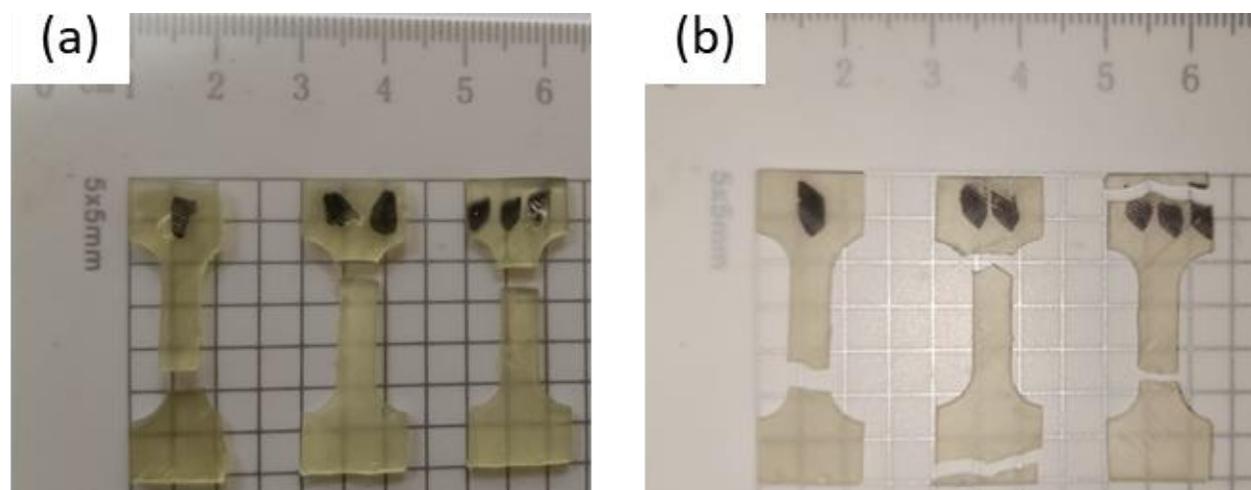
Ensayo de tracción de probetas PMT: BioMed Amber



Nota. (a) Inicio de ensayo y (b) Finalización de ensayo: rotura.

Figura 35

Probetas PMT ensayadas: BioMed Amber



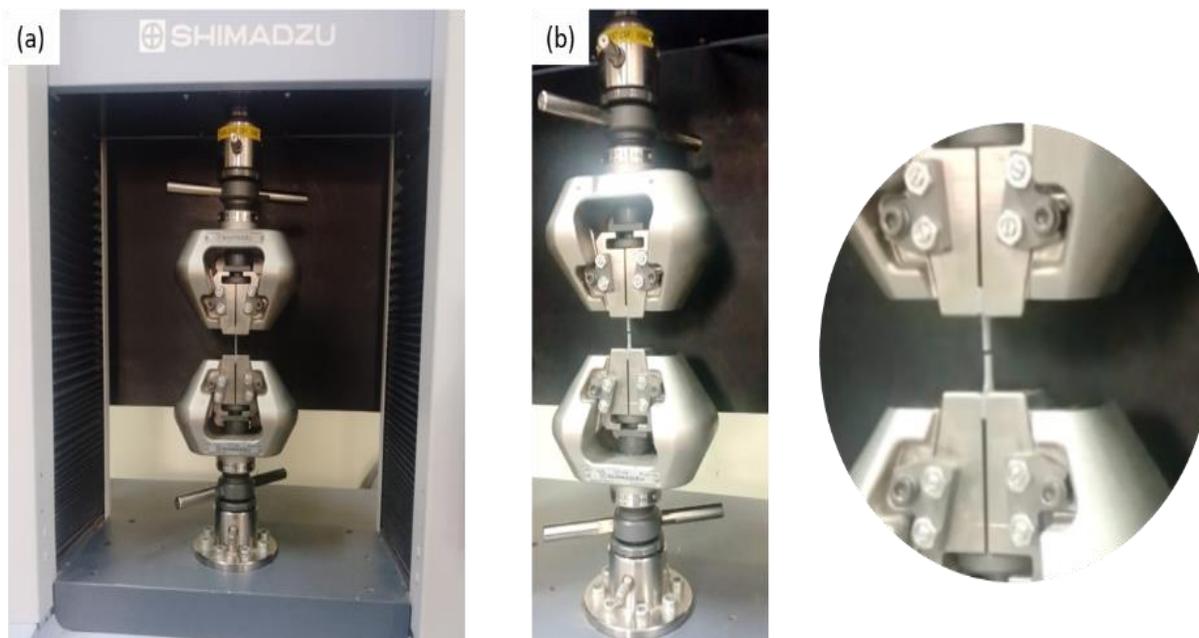
Nota. (a) Probetas PMT a 50 µm, (b) Probetas PMT a 100 µm

Ensayo a tracción: Tough 1500

El ensayo a tracción con las probetas de la resina Tough 1500 se realiza en la máquina de tracción universal de precisión AUTOGRAPH AGS-X 50kN (SHIMADZU, s/f) del Laboratorio de Ensayo de Materiales perteneciente a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE utilizando mordazas de tipo cuña sin desplazamiento (SHIMADZU, s/f). El ensayo se realiza a una velocidad de 10 [mm/min], cuyo valor se especifica en la norma ASTM D1708 tipo C, en ella se realizaron 24 corridas. Se puede observar el ensayo en la Figura 36 del cual se obtiene los valores de fuerza, desplazamiento, esfuerzo de tracción y elongación unitaria de cada ensayo, resultando las probetas de la Figura 37. Este ensayo se especifica en el protocolo del apéndice A3.

Figura 36

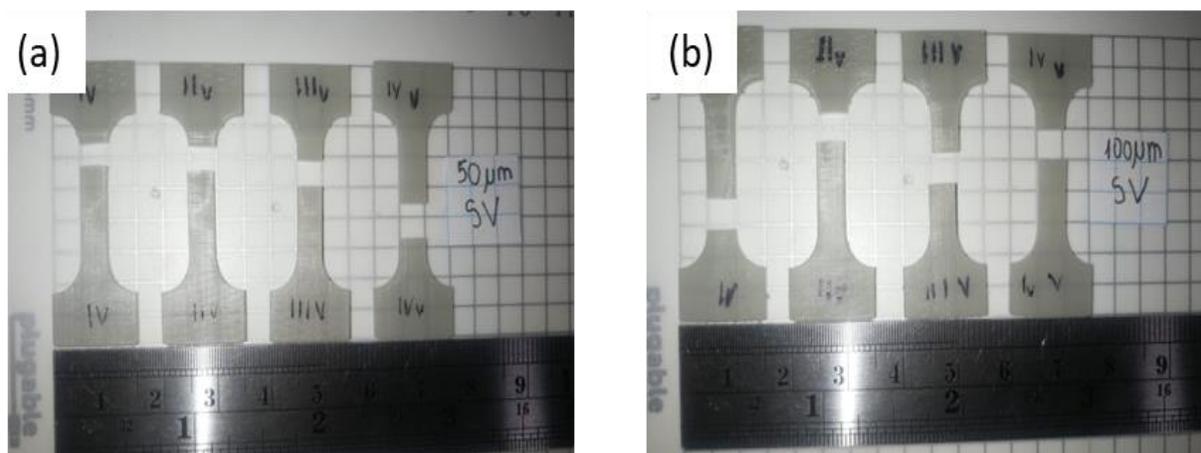
Ensayo de tracción de probetas PMT: Tough 1500



Nota. (a) Inicio de ensayo y (b) Finalización de ensayo: rotura.

Figura 37

Probetas PMT ensayadas: Tough 1500



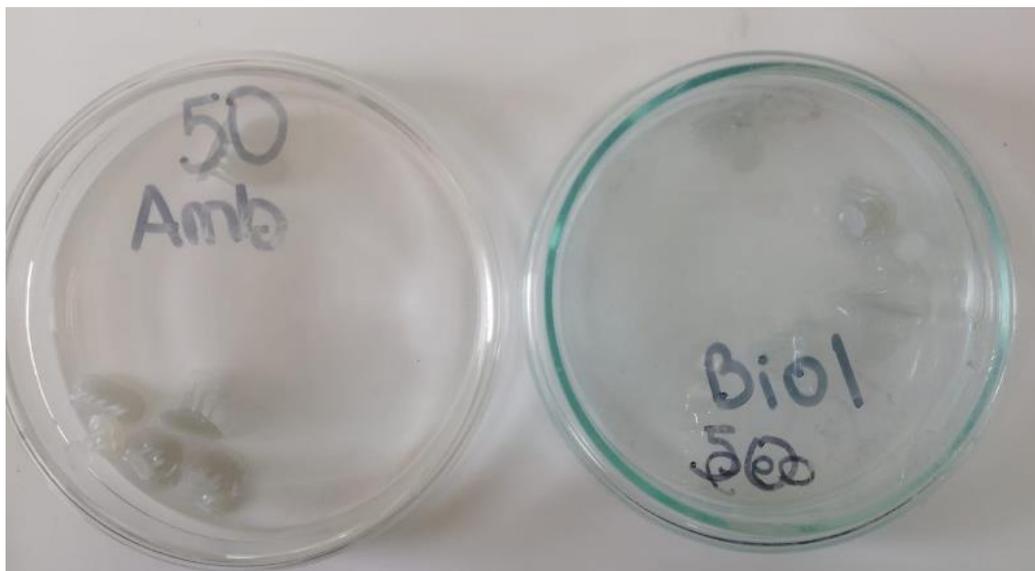
Nota. (a) Probetas PMT a 50 µm, (b) Probetas PMT a 100 µm

Ensayo de microperforado

Para el ensayo de microperforado se plantea un entorno ambiental normal y el otro, biológico (Tabla 9) para este ultima se plantea utilizar PBS, “Buffer Salino Fosfato”, el cual es una solución utilizada comúnmente en biología ya que permite crear un ambiente estable e idóneo para realizar experimentos biológicos similares al entorno fisiológico (Cold Spring Harbor Protocols, 2006). Para ello se va a colocar las probetas en cajas Petri, unas solo cerradas normalmente y las otras sumergidas en PBS con una concentración de 1 con un volumen de 25 mL como se observa en la Figura 38 alrededor de 15 días, las cuales fueron previamente esterilizadas mediante autoclave como se especifica en el Apéndice A5.

Figura 38

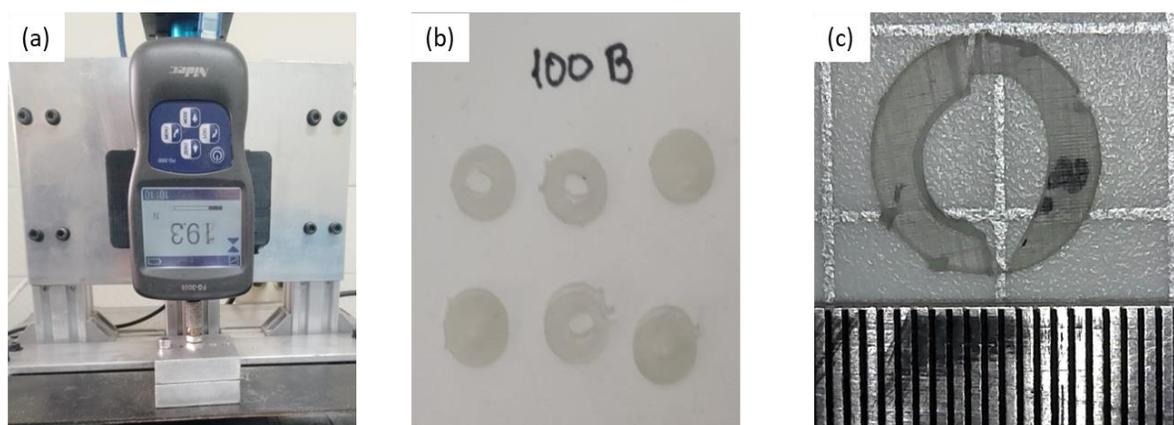
Cajas Petri en un entorno ambiente y biológico



El ensayo es realizado en la máquina de microperforado (Vallejo Bustamante, 2022) con una velocidad de 0.5 [mm/min] según la norma ASTM F2977. Fueron ensayadas un total de 24 corridas como se observa en la Figura 39, de este ensayo se obtiene datos de fuerza y desplazamiento. El protocolo que hace referencia a este ensayo es el Apéndice A4.

Figura 39

Ensayo de microperforado



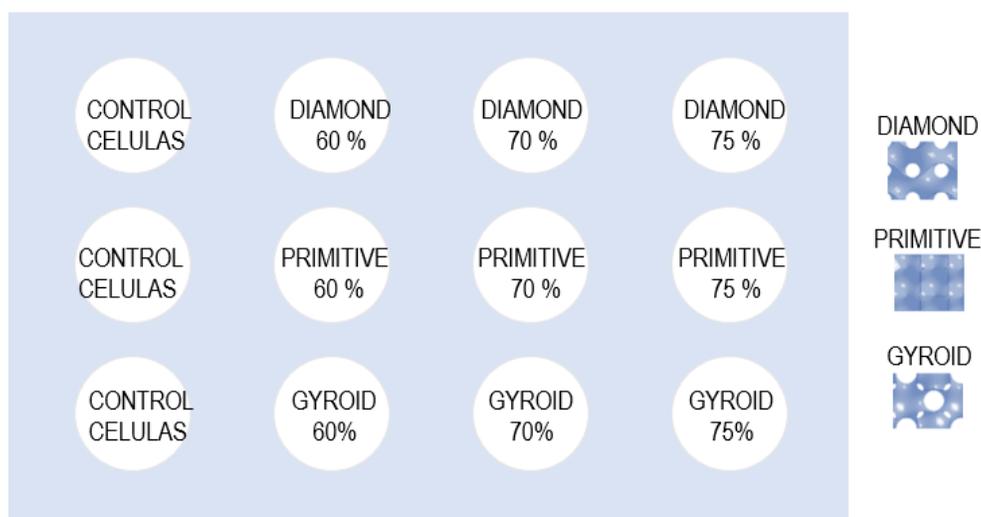
Nota. (a) Ensayo de microperforado efectuándose, (b) Probetas ensayadas PMP a 100 μ m y (c) Rotura del punzón sobre la probeta vista desde el microscopio.

Prueba cero de ensayo de adherencia celular

El ensayo de adherencia con las probetas PA se lo ejecuta en el Laboratorio de Biotecnología humana perteneciente a la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, como prueba cero se desarrolla el ensayo en un ambiente biológico con la línea celular HaCaT las cuales van a ser sembradas en los pocillos junto con cada andamio bajo el arreglo de la Figura 40 en una placa de cultivo P12 para ensayos biológicos.

Figura 40

Arreglo de andamios para el ensayo de adherencia: Prueba cero

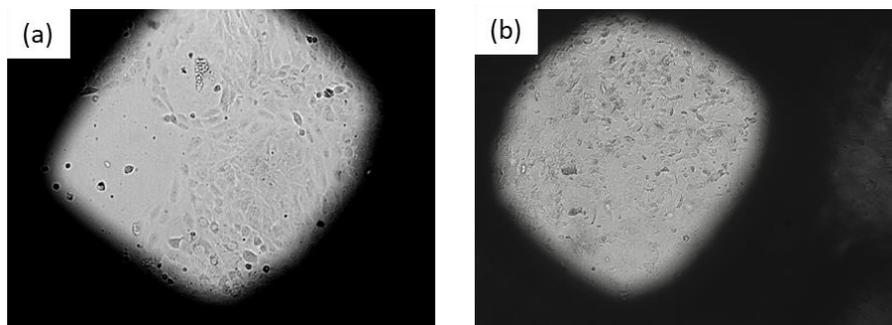


El procedimiento que se requiere para el cultivo y siembra de las células se esboza rápidamente en el diagrama de flujo de la Figura 45, para más especificaciones de este proceso ir al protocolo: Apéndice A6 donde se detalla.

Con respecto a la preparación de los andamios, estos deben ser esterilizados mediante la técnica de Autoclave, se especifica el proceso correspondiente en el protocolo del Apéndice A5. Se inicia la siembra de células con una densidad celular de 2.5×10^5 por pocillo, el tiempo de exposición es de 21 días obteniendo las microfotografías correspondientes después del tñido de células como se observa en la Figura 41.

Figura 41

Microfotografía del ensayo inicial y final: Prueba cero

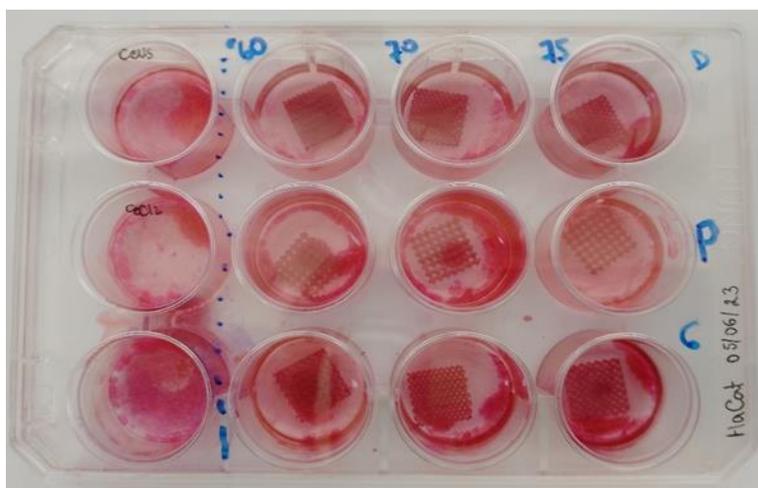


Nota. Se observa que, en (a) el día del inicio de ensayo para una estructura Primitiva 60% - 100X y en (b) el día final del ensayo para una estructura Primitiva 70%-100 X.

De forma general, se obtuvo la Figura 42, en ella se observa que las células se acumularon en la periferia del pocillo y en el área central no; por esto, se deduce que los andamios al no estar fijados en una posición tienden a raspar las células del pocillo permitiendo que no crezca en esa área, se propone cambiar la placa de ensayo y generar un soporte para evitar que el andamio se mueva en el pocillo.

Figura 42

Cultivo celular con tinción: Prueba cero

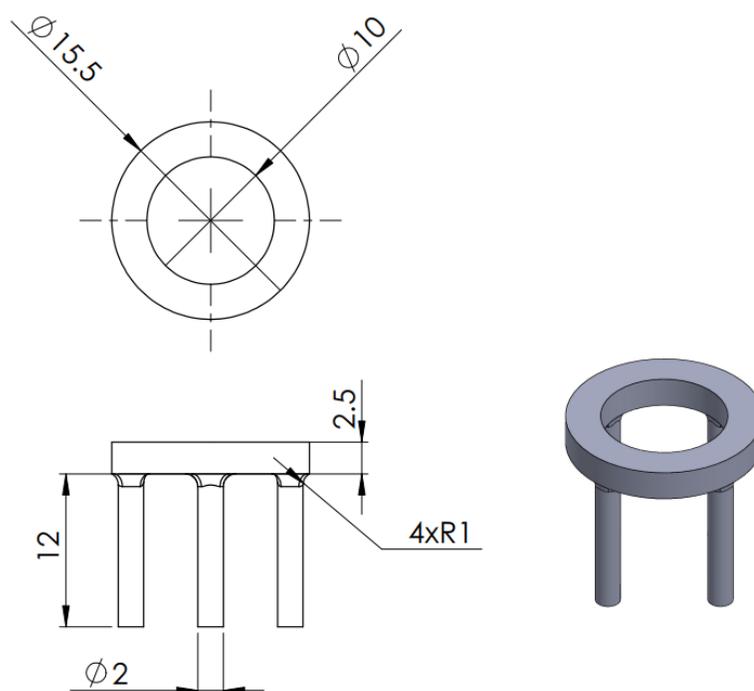


Nota. Se observa que existe mayor presencia de células en los alrededores del pocillo y que en el lugar del andamio se observa un área limpia, sin células.

El soporte que se requiere para mantener el andamio fijo se encuentra en la Figura 43, el cual entra perfectamente en el espacio de la futura placa P24 a utilizarse y permite sujetar sin afectar el área completa del andamio logrando que estos queden fijos en una posición y no raspen las células como en la prueba cero.

Figura 43

Soporte para andamios



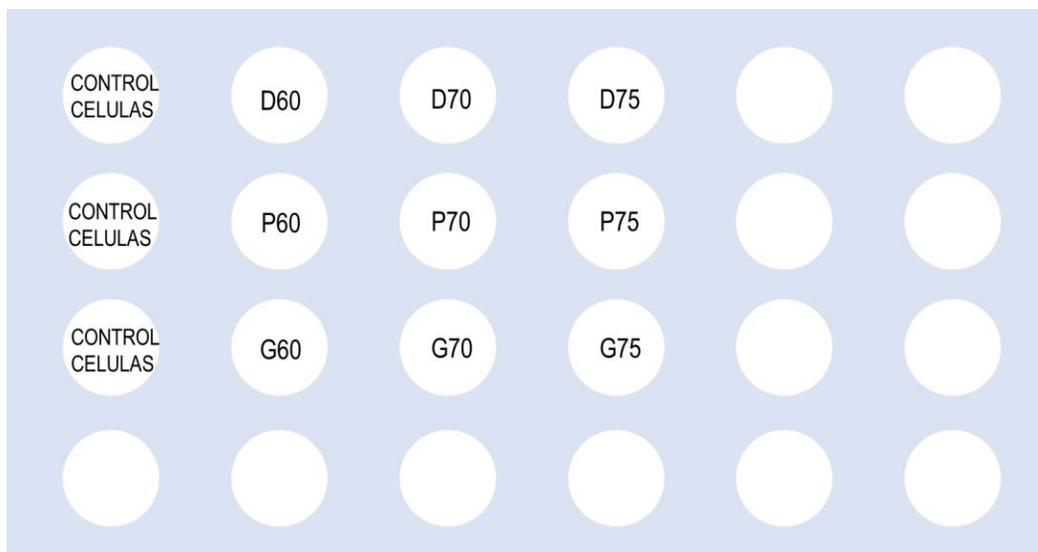
Nota. Medida en mm.

Ensayo de adherencia celular

El ensayo de adherencia con las probetas PA se lo ejecuta en el Laboratorio de Biotecnología humana perteneciente a la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, para ello, se realiza en un ambiente biológico lleno de células HaCaT las cuales van a ser sembradas en los pocillos junto con cada andamio siguiendo el arreglo de la Figura 44 en una placa de cultivo P24 para ensayos biológicos.

Figura 44

Arreglo de andamios para el ensayo de adherencia

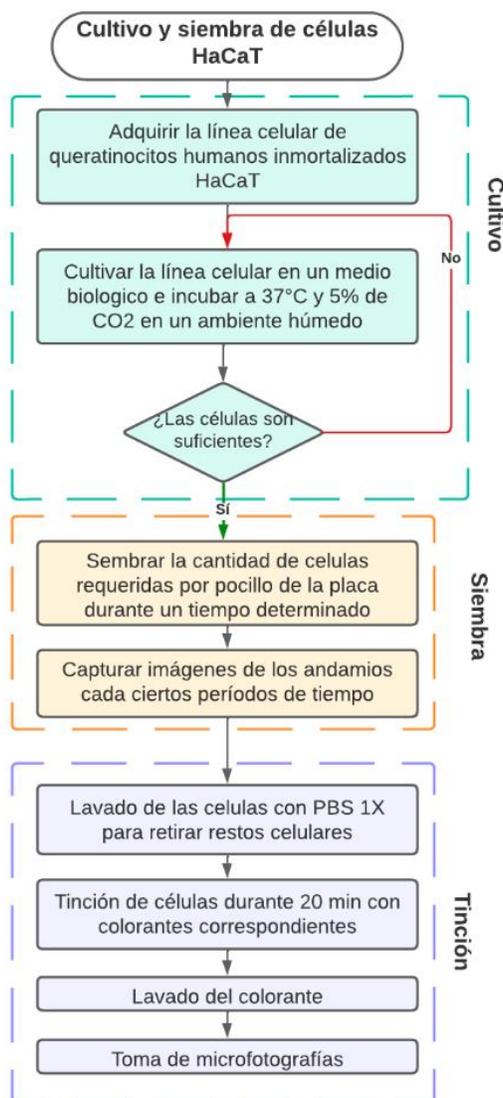


Nota. D: Diamante, P: Primitiva, G: Giroide; 60-70-75: corresponde al porcentaje de porosidad.

Con respecto a la preparación de los andamios, estos deben ser esterilizados mediante la técnica de Autoclave, se especifica el proceso correspondiente en el Apéndice A5. Cuando se tiene los andamios listos se procede a colocarlos bajo el arreglo de la Figura 44 y, por consiguiente, se inicia la siembra de células como se observa en la Figura 45; para que el ensayo sea rápido se coloca 3×10^5 células en cada posición, de este modo, se puede lograr rápido la saturación del pocillo permitiendo que las células inicien a reproducirse primero en monocapa y después sea tridimensional.

Figura 45

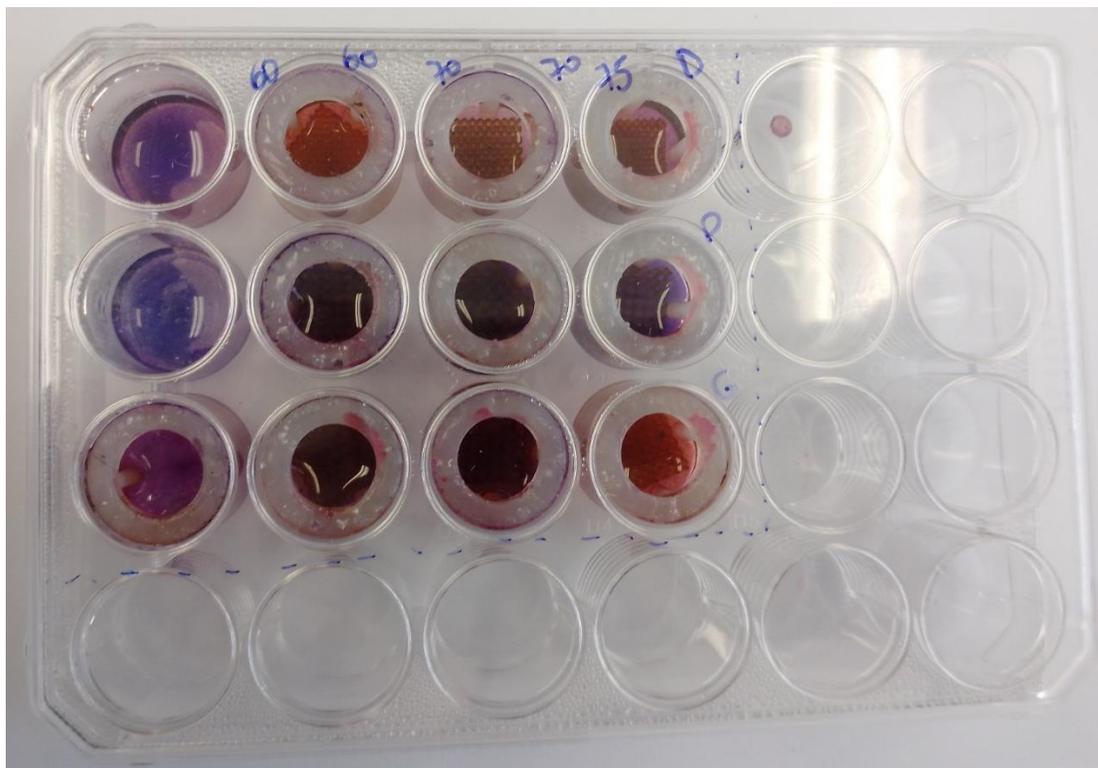
Diagrama de flujo para el cultivo y la siembra de células HaCaT



Al transcurrir alrededor de 17 días se procede a teñir las células para observar si existe o no crecimiento de células, lo que conlleva a comprobar la biocompatibilidad y viabilidad celular como se observa en la Figura 46, ya no hubo el movimiento del andamio dentro del pocillo permitiendo que las células no se despeguen. Para ello se procede a tomar microfotografías a una escala de 40X – 100X mediante un microscopio invertido MCXI600 (Micros AUSTRIA, s/f), proceso completo detallando los componentes del medio biológico se encuentra en el Apéndice A7.

Figura 46

Cultivo celular: Ensayo de adhesión celular

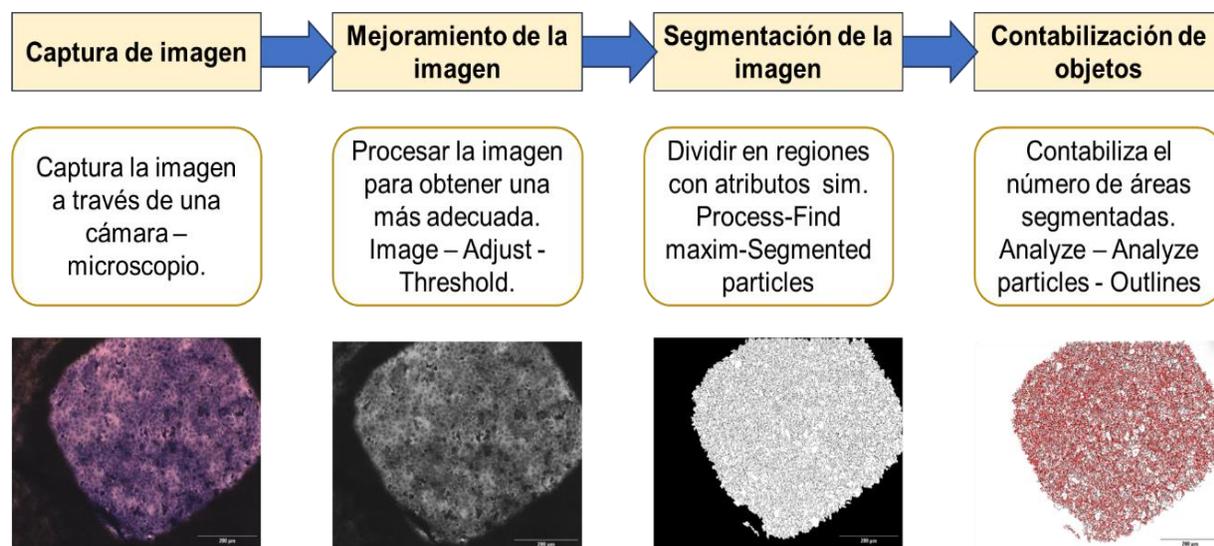


Nota. Se observa que la tinción se encuentra en toda el área del pocillo, ya no en la periferia.

Consecuentemente, se requiere contar las células y realizar una comparación entre los primeros días del ensayo y el último día cuando ya estén teñidas, a partir de las microfotografías se procede al procesamiento de imagen que permita detectar mediante mínimos locales (BioImage Informatics Index, s/f) los puntos ya sea regulares o irregulares con un software para el análisis y procesamiento de imágenes científicas y biomédicas (Dvanesh et al., 2018). Partiendo de esta premisa, se recomienda el uso de software libre para ello se va a utilizar ImageJ siguiendo el diagrama de flujo propuesto por Pandit y Rangole (2014) que se observa en la Figura 47, el cual es un método general para contabilizar objetos y generar un análisis cuantitativo que depende de la estimación de algunos elementos (Pandit & Rangole, 2014).

Figura 47

Diagrama de flujo para el procesamiento de imágenes



Nota. Adaptado de “Literature Review on Object Counting using Image Processing Techniques” (p.2), por A. Pandit y J. Rangole, 2014, *International Journal of Advanced Research in Electrical, Electronics and Instrumentation Engineering*, 3(14).

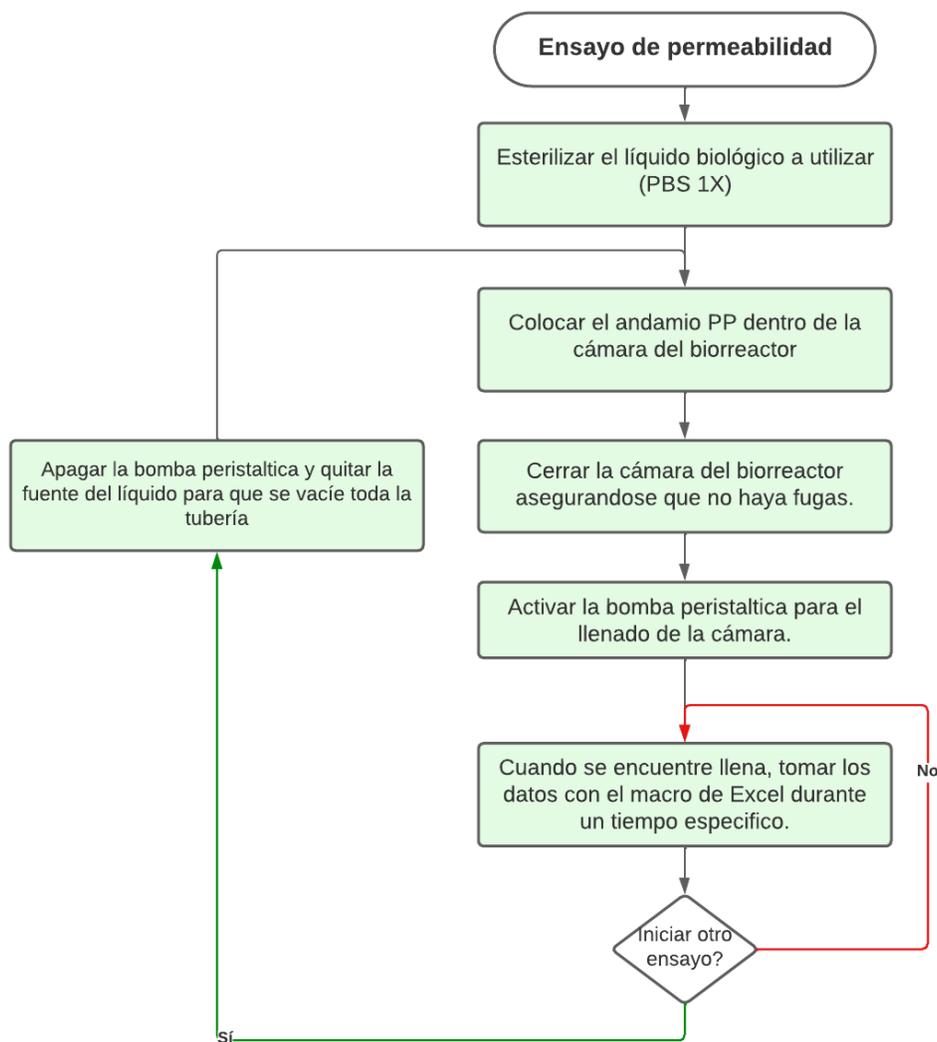
Ensayo de permeabilidad

Para el desarrollo del ensayo de permeabilidad se tiene un total de 12 probetas PP, para ello se requiere que el fluido sea de tipo fisiológico para lograr asemejarse a la interacción de células que se lleva a cabo en el biorreactor.

Acorde a ello, se plantea el uso de PBS 1X (Cold Spring Harbor Protocols, 2006) el cual es previamente esterilizado con los parámetros mencionados, posterior a esto se coloca el andamio PP y se inicia el ensayo, para ello se plantea en la Figura 48 el diagrama de flujo a seguir.

Figura 48

Diagrama de flujo para el ensayo de permeabilidad



Se desarrolla un protocolo para este ensayo en el Apéndice A7, donde se detalla todos los materiales y el proceso para ejecutarlo. Las probetas se las ensayó durante un tiempo de 60 [s] con un caudal constante de 0.1 L/min permitiendo asemejarse a las condiciones del ensayo de permeabilidad mencionado por Wang et al (2010).

Capítulo IV

Análisis y discusión de resultados

Resultados de control dimensional de las probetas

Las variables para controlar entre el diseño CAD y las probetas impresas son:

- Probetas PMT: Ancho del cuello, espesor
- Probetas PMP: diámetro, espesor
- Probetas PA: tamaño de poro

Dimensiones de probetas: BioMed Amber

Para verificar la resolución de impresión entre el diseño CAD y las piezas impresas con respecto a la resina BioMed Amber se realiza un análisis ANOVA de un solo factor siguiendo la prueba de hipótesis de la Figura 49.

Figura 49

Análisis ANOVA de un solo factor: Prueba de hipótesis

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$	

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Donde H_0 es la hipótesis nula, y H_1 es la hipótesis alterna, se plantea que:

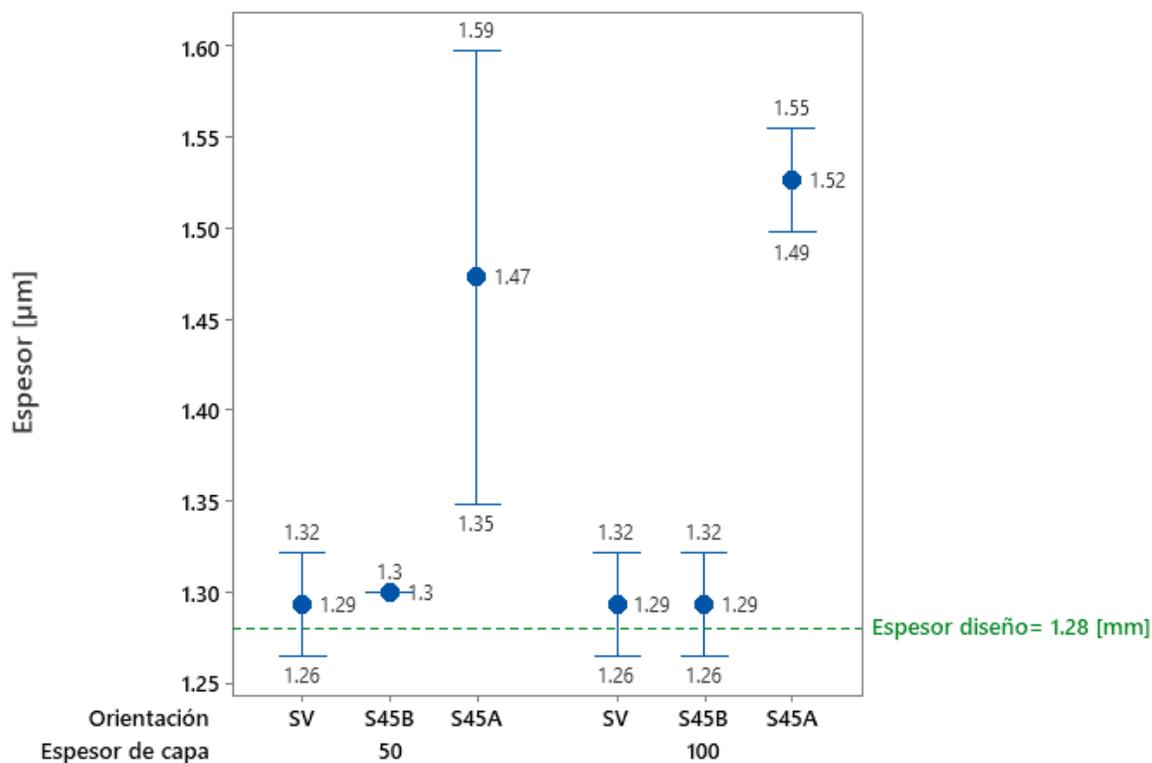
- Si el valor $p < \alpha$, se rechaza H_0 y se acepta H_1 .
- Si el valor $p > \alpha$, no se rechaza H_0 y se acepta.

Los gráficos de intervalos obtenidos en función de las diversas variables se encuentran en la Figura 50 y Figura 51; junto con las tablas del análisis de varianza:

Tabla 15, Tabla 16, Tabla 17 y Tabla 18.

Figura 50

Gráfica de intervalos obtenida para el espesor de probetas PMT: BioMed Amber

**Tabla 15**

Análisis de varianza obtenida para el espesor de probetas PMT según el espesor de capa

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Capa	1	0.001089	0.001089	0.10	0.758
Error	16	0.177511	0.011094		
Total	17	0.178600			

$$p: 0.758 > \alpha: 0.05$$

Todas las medias son iguales, por lo tanto, no existe una diferencia significativa en el tamaño del espesor de la probeta a partir del espesor de capa.

Tabla 16

Análisis de varianza obtenida para el espesor de probetas PMT según la orientación

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Orientación	2	0.16813	0.084067	120.48	0.000
Error	15	0.01047	0.000698		
Total	17	0.17860			

$$p: 0.00 < \alpha: 0.05$$

Aceptando H_1 , no todas las medias son iguales, lo que conlleva a una diferencia significativa para el espesor de la probeta considerando la orientación sobre la placa de impresión.

Figura 51

Gráfica de intervalos obtenida para el ancho de probetas PMT: BioMed Amber

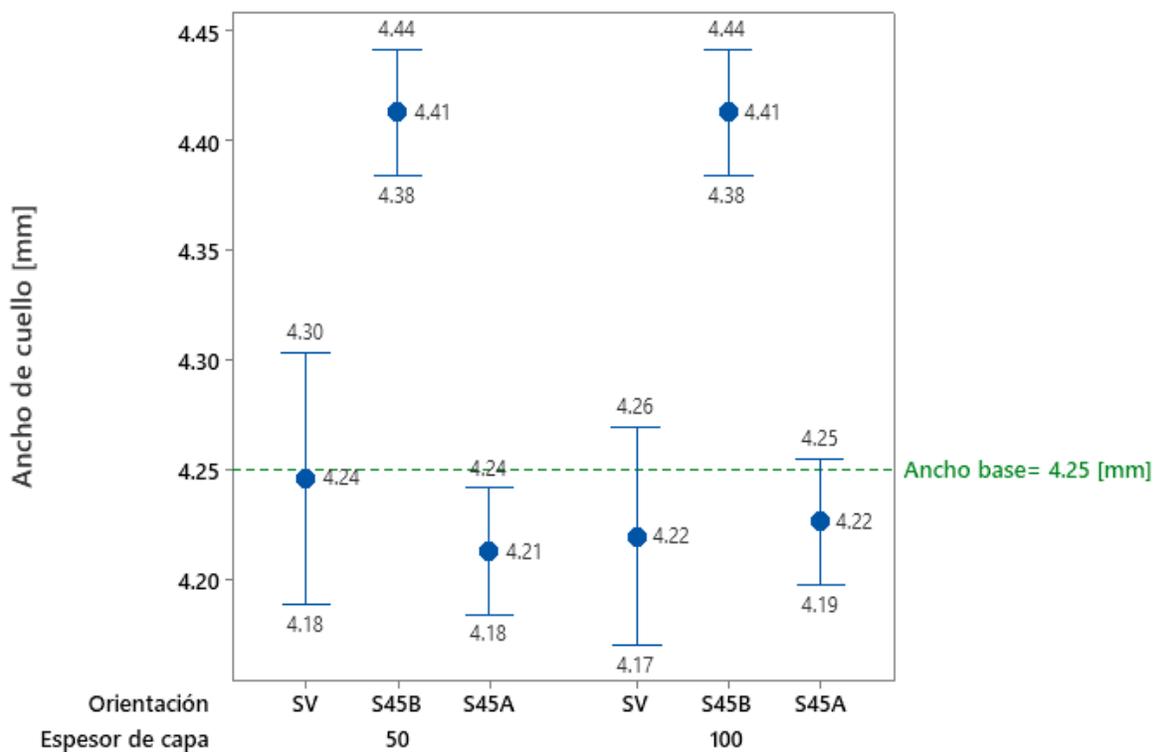


Tabla 17

Análisis de varianza obtenida para el ancho de probetas PMT según el espesor de capa

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Capa	1	0.000089	0.000089	0.01	0.922
Error	16	0.144089	0.009006		
Total	17	0.144178			

$$p: 0.922 > \alpha: 0.05$$

Todas las medias son iguales, por ello, no existe una diferencia significativa en el ancho de la probeta a partir del espesor de capa.

Tabla 18

Análisis de varianza obtenida para el ancho de probetas PMT según la orientación

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Orientación	2	0.139911	0.069956	245.94	0.000
Error	15	0.004267	0.000284		
Total	17	0.144178			

$$p: 0.00 < \alpha: 0.05$$

Rechazando H_0 y aceptando H_1 , dicho de otra manera, existe una diferencia significativa para el ancho de la probeta considerando la orientación sobre la placa de impresión. Se observa que las medidas de piezas impresas tienen una leve diferencia con el CAD, sin embargo, en ciertas combinaciones se puede obtener una mayor precisión dimensional.

Dimensiones de probetas: Tough 1500

Para verificar la resolución de impresión entre el diseño CAD y las piezas impresas con respecto a la resina Tough 1500 se realiza un análisis ANOVA de un factor siguiendo la prueba de hipótesis de la Figura 49. Los gráficos de intervalos obtenidos para esta resina se encuentran en la Figura 52, Figura 53, Figura 54 y Figura 56; junto con las tablas del análisis de varianza desde la Tabla 19 a la Tabla 26.

Figura 52

Gráfica de intervalos obtenida para el espesor de probetas PMT: Tough 1500

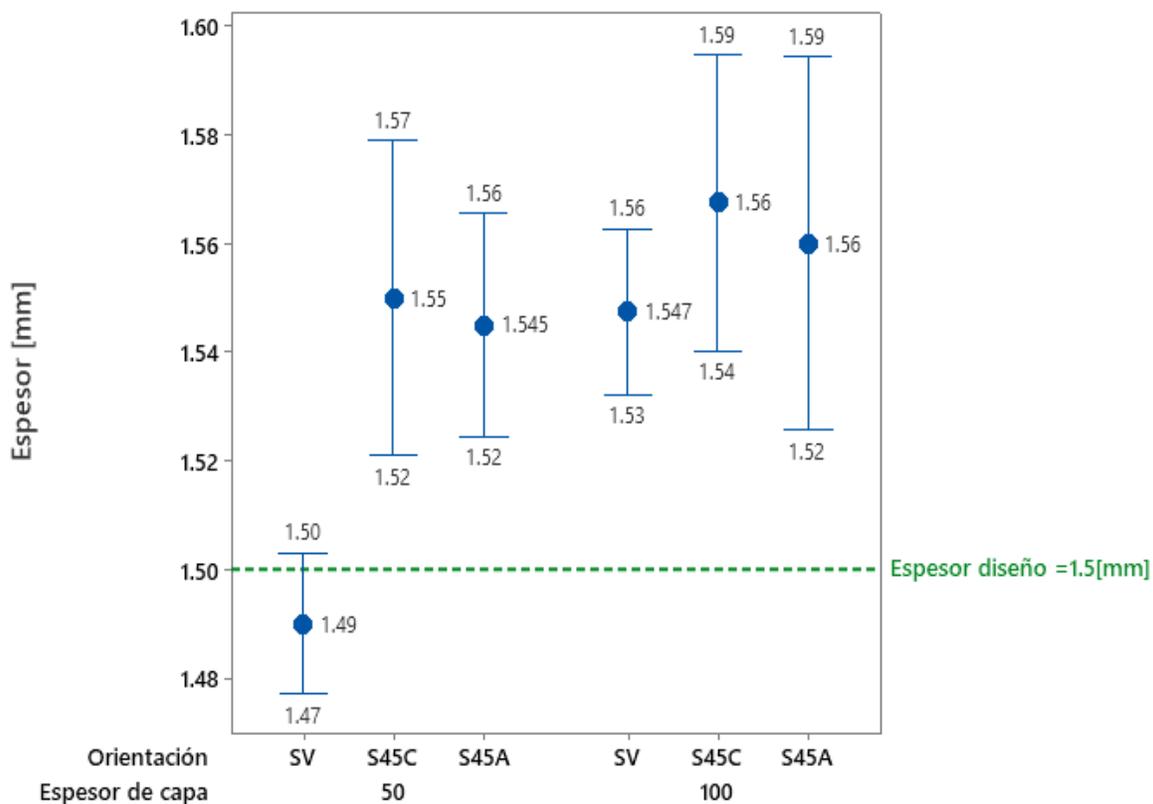


Tabla 19

Análisis de varianza obtenida para el espesor de probetas PMT según el espesor de capa

	Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
	Capa	1	0.005400	0.005400	8.53	0.008
	Error	22	0.013933	0.000633		
	Total	23	0.019333			

$$p: 0.008 < \alpha: 0.05$$

Aceptando H_1 , lo que conlleva a una diferencia significativa para el espesor de la probeta considerando el espesor de capa de la impresión.

Tabla 20

Análisis de varianza obtenida para el espesor de probetas PMT según la orientación

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Orientación	2	0.007408	0.003704	6.52	0.006
Error	21	0.011925	0.000568		
Total	23	0.019333			

$$p: 0.006 < \alpha: 0.05$$

Aceptando H_1 , por lo que existe una diferencia significativa para el espesor de la probeta considerando la orientación de impresión.

Figura 53

Gráfica de intervalos obtenida para el ancho de probetas PMT: Tough 1500

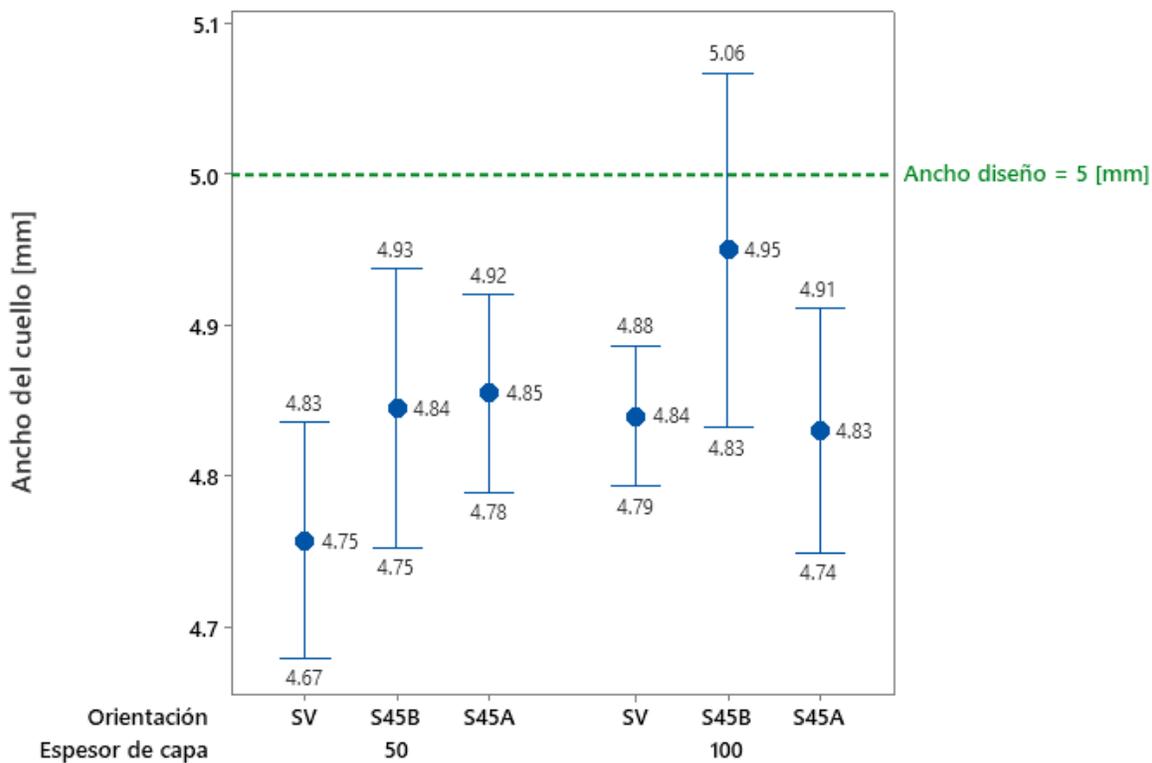


Tabla 21

Análisis de varianza obtenida para el ancho de probetas PMT según el espesor de capa

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Capa	1	0.01760	0.017604	3.59	0.071
Error	22	0.10776	0.004898		
Total	23	0.12536			

$$p: 0.071 > \alpha: 0.05$$

Todas las medias son iguales. Por ello, no existe una diferencia significativa en el ancho de la probeta a partir del espesor de capa.

Tabla 22

Análisis de varianza obtenida para el ancho de probetas PMT según la orientación

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Orientación	2	0.03917	0.019587	4.77	0.020
Error	21	0.08619	0.004104		
Total	23	0.12536			

$$p: 0.020 < \alpha: 0.05$$

Aceptando H_1 , no todas las medias son iguales, existe una diferencia significativa para el ancho de la probeta considerando la orientación sobre la placa de impresión.

Figura 54

Gráfica de intervalos obtenida para el diámetro de probetas PMP: Tough 1500

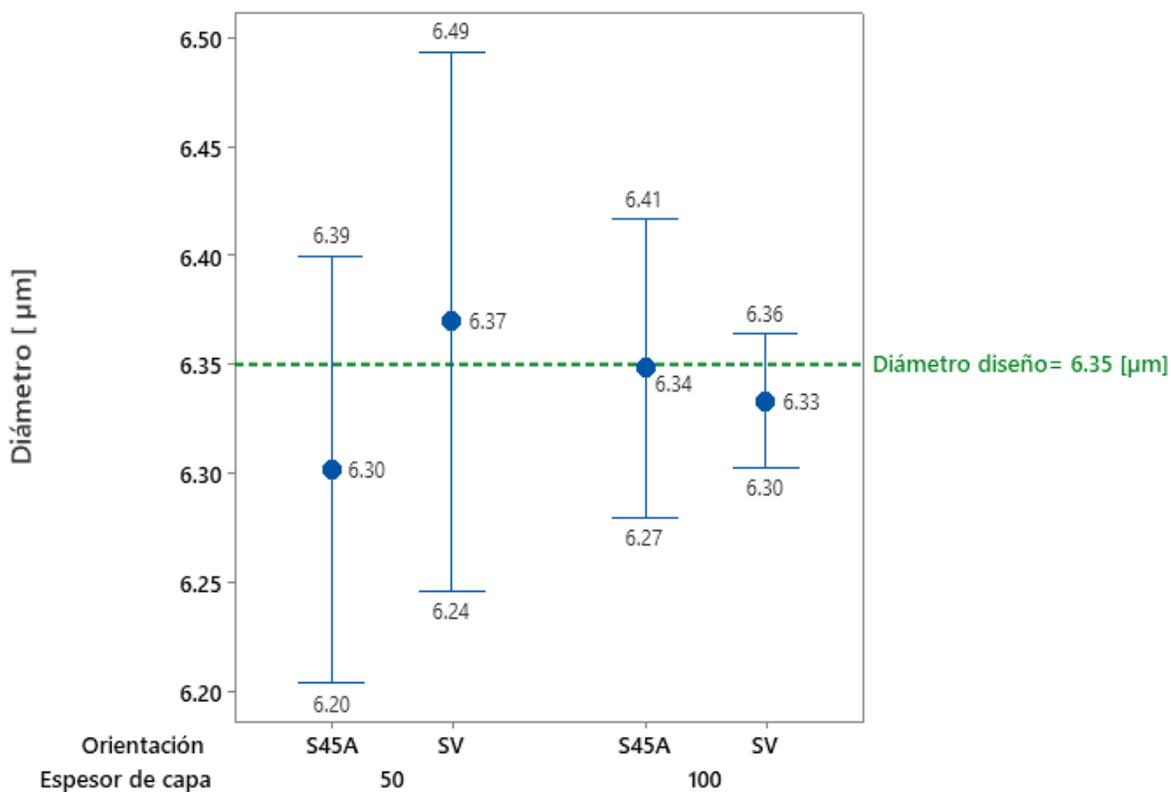


Tabla 23

Análisis de varianza obtenida para el diámetro de probetas PMP según el espesor de capa

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Espeor	1	0.000150	0.000150	0.02	0.885
Error	22	0.153583	0.006981		
Total	23	0.153733			

$$p: 0.885 > \alpha: 0.05$$

No rechazando la hipótesis nula H_0 , por ello, no existe una diferencia significativa en el diámetro de la probeta a partir del espesor de capa.

Tabla 24

Análisis de varianza obtenida para el diámetro de probetas PMP según la orientación

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Orientación	1	0.004267	0.004267	0.63	0.437
Error	22	0.149467	0.006794		
Total	23	0.153733			

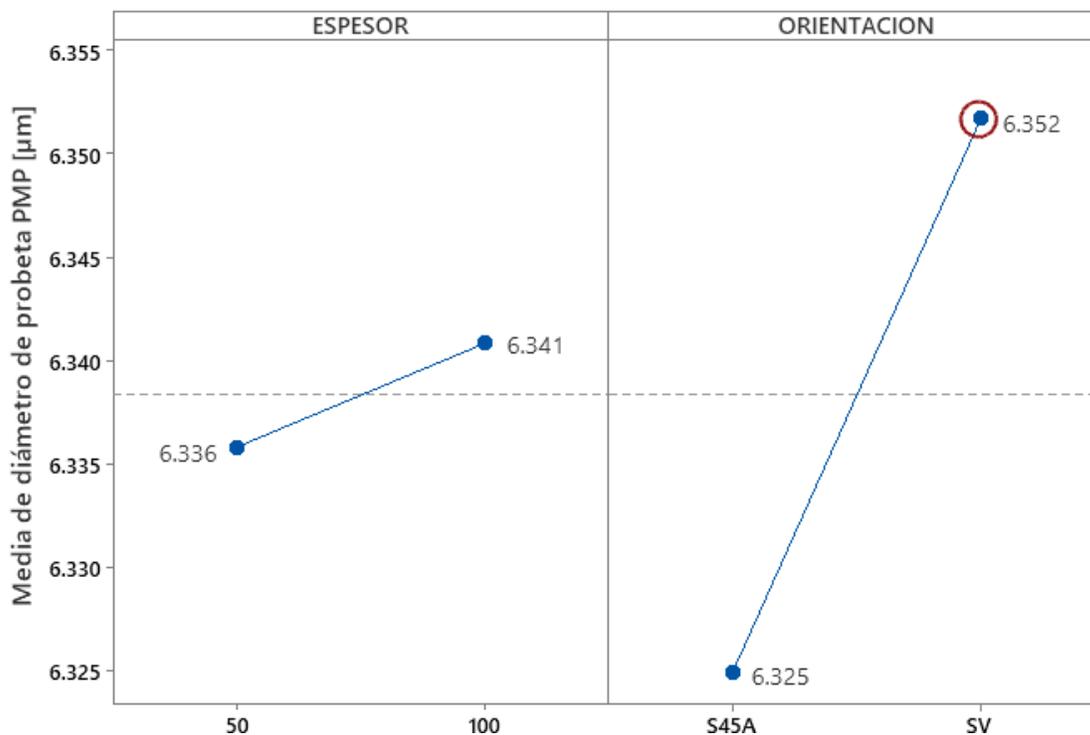
$$p: 0.437 > \alpha: 0.05$$

Todas las medias son iguales, por ello, no existe una diferencia significativa en el diámetro de la probeta a partir de la orientación.

Como ninguno de los factores incide como diferencia significativa, se requiere otro tipo de análisis para conocer los efectos de cada factor como una prueba de Tukey, gráfica de efectos principales o interacciones. Para esto, se aplica un análisis por sus efectos principales como se observa en la Figura 55:

Figura 55

Gráfica de efectos principales para Media de diámetro de probetas: Tough 1500



A partir de la gráfica se observa que el factor de mayor influencia es la orientación, pero considerando el análisis ANOVA ambos factores no tienen una diferencia significativa y todas sus medias son iguales, por lo que este tipo de análisis es conveniente en estos casos.

Figura 56

Gráfica de intervalos obtenida para el espesor de probetas PMP: Tough 1500

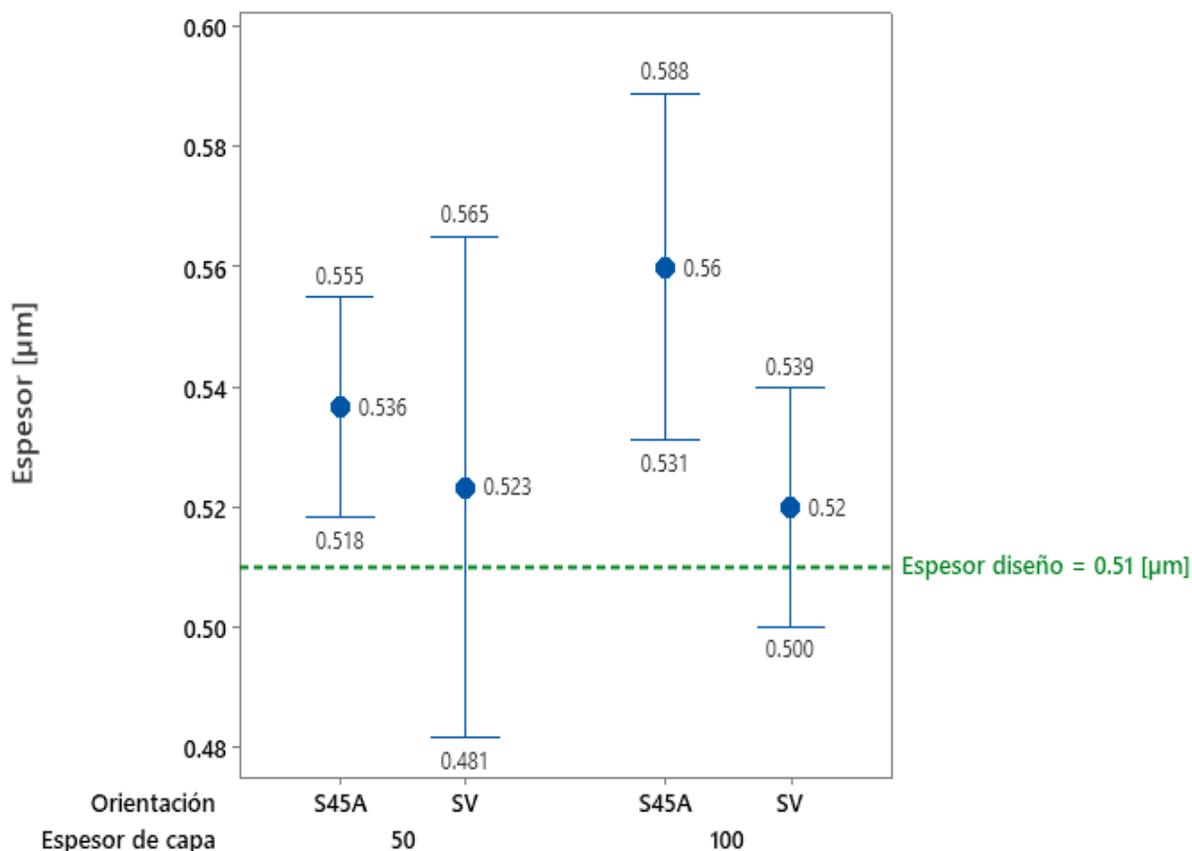


Tabla 25

Análisis de varianza obtenida para el espesor de probetas PMP según el espesor de capa

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Espesor	1	0.000600	0.000600	0.65	0.430
Error	22	0.020400	0.000927		
Total	23	0.021000			

$$p: 0.430 > \alpha: 0.05$$

Todas las medias son iguales, por lo tanto, no existe una diferencia significativa en el tamaño del espesor de la probeta PMP a partir del espesor de capa.

Tabla 26

Análisis de varianza obtenida para el espesor de probetas PMP según la orientación

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Orientación	1	0.004267	0.004267	5.61	0.027
Error	22	0.016733	0.000761		
Total	23	0.021000			

$$p: 0.027 < \alpha: 0.05$$

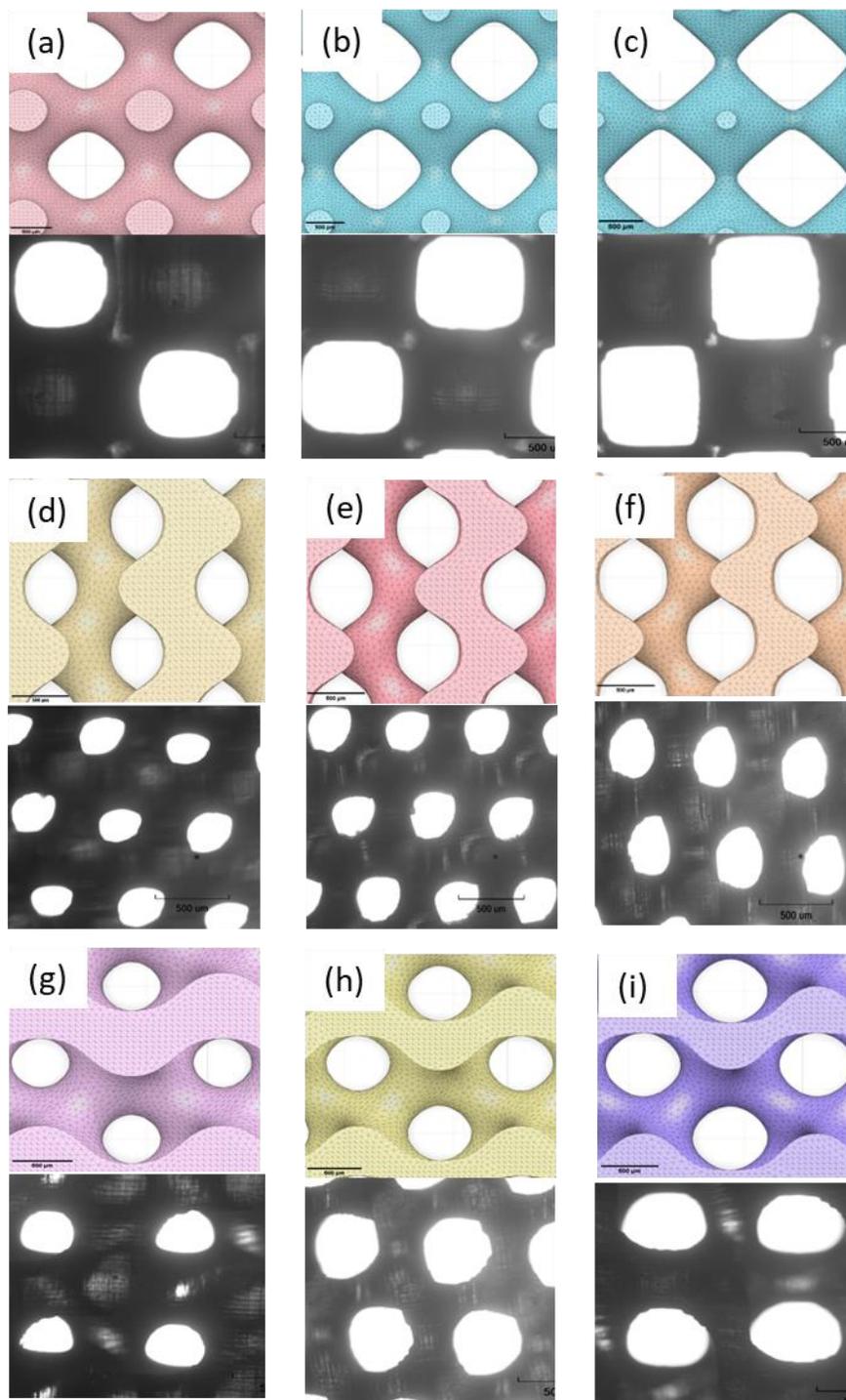
Rechazando H_0 y aceptando H_1 , se evidencia una diferencia significativa para el espesor de la probeta considerando la orientación sobre la placa de impresión.

Dimensiones de probetas: Tamaño de poro

Para analizar los valores del tamaño de poro, se analizará el área de este debido a que el poro en cada configuración es de diversa forma (Figura 57) y considerarlo como medida individual se vuelve extenso. Por ello, en la Figura 58 se observa una gráfica de barras comparando entre el valor de área obtenido del diseño CAD con el del andamio impreso.

Figura 57

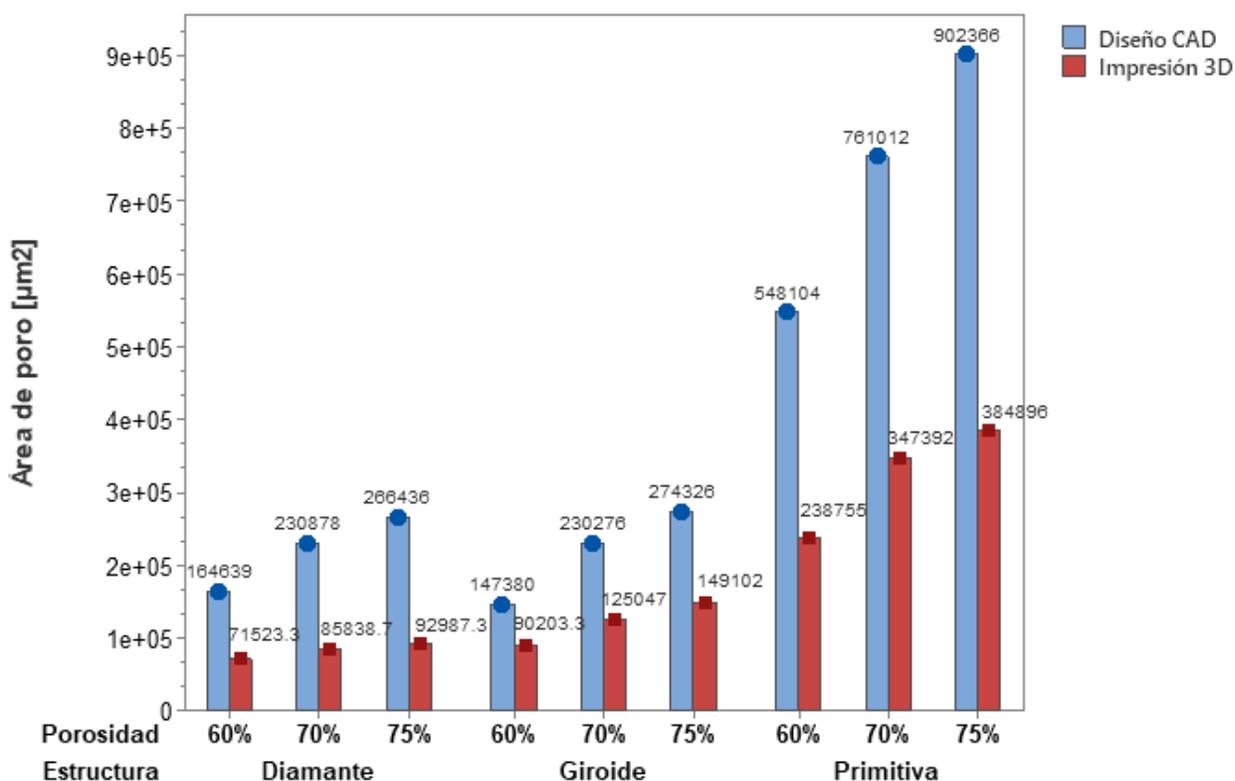
Tamaño de poro de los andamios



Nota. (a) Primitiva 60%, (b) Primitiva 70%, (c) Primitiva 75%, (d) Giroide 60%, (e) Giroide 70%, (f) Giroide 75%, (g) Diamante 60%, (h) Diamante 70% e (i) Diamante 75%.

Figura 58

Gráficas de barras del área entre el diseño CAD y la impresión del andamio



Discusión

A partir de las dimensiones tomadas y los análisis ANOVA en las diferentes probetas se tiene que:

Al imprimir probetas de tipo PMT con la resina BioMed Amber, se observó una peculiaridad en las probetas, estas tienen una diferencia de color al contrastar entre las impresiones de 50 y 100 [µm] como se observa en la Figura 59. El color de las probetas del fabricante son de color anaranjado, sin embargo, las probetas de 50 µm tienen un tono amarillento a pesar de que ya fueron poscuradas, pues en esta acción es en donde toma su color final como lo menciona el proveedor (*Formlabs Customer Support, s/f*).

Esto se justifica debido a que en la capa de 50 µm existe mayor proyección de luz UV por capa y al ser una capa fina, esta luz se proyecta con mayor intensidad abarcando no solo la

última capa, sino las anteriores. Provocando que a menor espesor la proyección de luz en el curado de las piezas ya no le afecte debido a su constancia durante la impresión y requiera mayor tiempo de poscurado para alcanzar su color final. Y en las probetas de 100 μm no afectaría la proyección de luz por capa, ya que el espesor es el doble del mencionado.

Figura 59

Probetas de 50 - 100 μm en resina BioMed Amber



Nota. Las probetas PMT de 100 μm son anaranjadas y las de 50 μm amarillentas.

Con referencia a las medidas, se tiene que en el caso de esta resina el factor más influyente en la determinación de la precisión dimensional es la orientación con respecto a la plataforma de fabricación. Los valores obtenidos de espesor son levemente mayores al del diseño CAD [1.28 μm], en cambio, el ancho del cuello es levemente menor al del diseño CAD [4.25 μm].

En el caso de las piezas fabricadas con resina Tough 1500, el factor influyente en el control dimensional es también la orientación con respecto a la plataforma de impresión. En cambio, los valores tanto de espesor, ancho de cuello y diámetro son levemente mayores al valor del diseño CAD.

Por ello, si se requiere obtener piezas con mucha precisión dimensional la combinación idónea se observa en la Tabla 27, siempre y cuando prevalezca la forma de la pieza a imprimir y su estructura interna.

Tabla 27

Configuración para obtener mayor control dimensional

Resina	Espesor de capa [μm]	Orientación
BioMed Amber	50	SV
Tough 1500	50	S45B

Con respecto al área del poro, se observa que existe una diferencia considerable con respecto al CAD pues alcanzan aproximadamente el 50% de diferencia entre valores. Esto se debe a la resolución de impresión y a la resolución de la impresora 3D. También se evidencia que la estructura que presenta mayor tamaño de poro es la primitiva junto a la porosidad del 75%.

Resultados de ensayo de micro tracción

Se muestran los resultados obtenidos al realizar el ensayo de micro tracción bajo la norma ASTM D638 aplicada en probetas con diferente resina biocompatible.

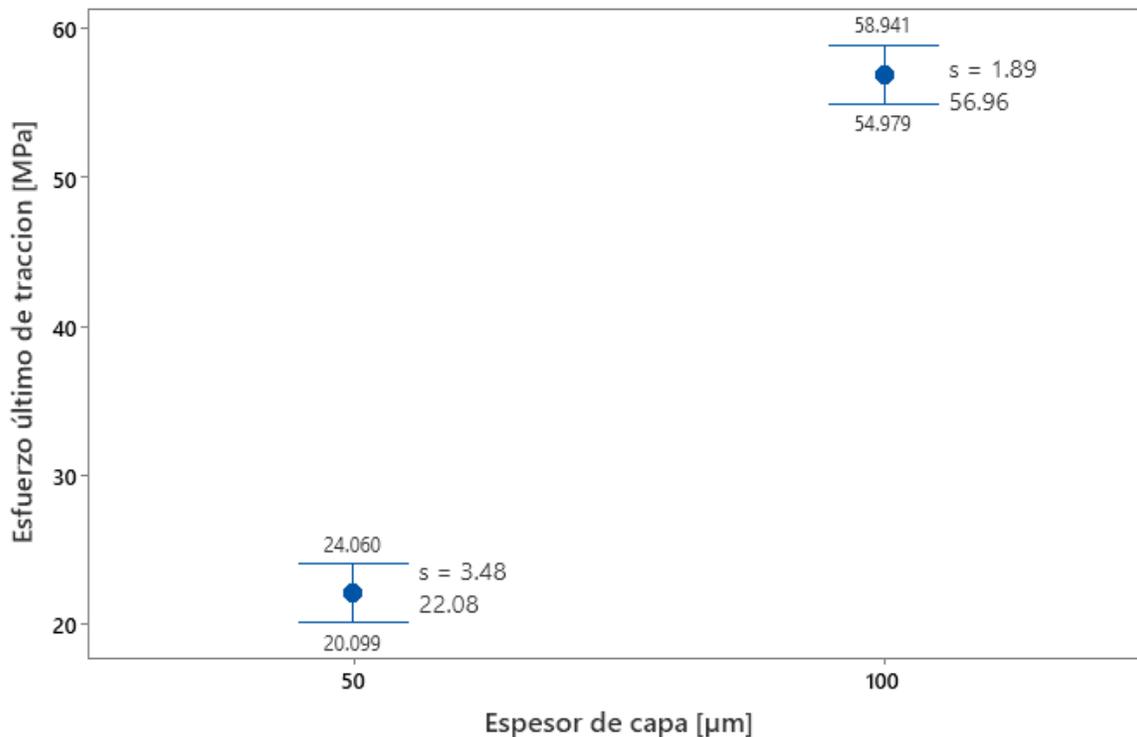
Esfuerzo de tracción último: BioMed Amber

Se muestra en la Figura 60 y Figura 61 los gráficos de intervalos para el esfuerzo último de tracción de cada variable del diseño experimental previamente obtenido junto a su análisis ANOVA, el cual sigue la prueba de hipótesis de la Figura 49

Figura 60

Gráfica de intervalos obtenida para el esfuerzo último de tracción conforme el espesor de capa:

BioMed Amber

**Tabla 28**

Análisis de varianza del esfuerzo último de tracción conforme el espesor de capa: BioMed

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Capa	1	5474.8	5474.83	696.75	0.000
Error	16	125.7	7.86		
Total	17	5600.6			

$$p: 0.000 < \alpha: 0.05$$

Rechazando H_0 y aceptando H_1 , no todas las medias son iguales. Lo que conlleva a una diferencia significativa para el esfuerzo último de tracción considerando el espesor de capa para la resina BioMed Amber. En la Figura 60 se observa los intervalos obtenidos según el espesor de capa. Se constata que el espesor 50 [µm] presenta el menor valor medio y el mayor el de 100 [µm], estos difieren por alrededor de 34.88 [MPa] y la desviación estándar que se

encuentra es baja en ambos casos; por lo que, si es un factor importante por considerar para optimizar el esfuerzo último de tracción.

Figura 61

Gráfica de intervalos obtenida para el esfuerzo último de tracción conforme la orientación:

BioMed Amber

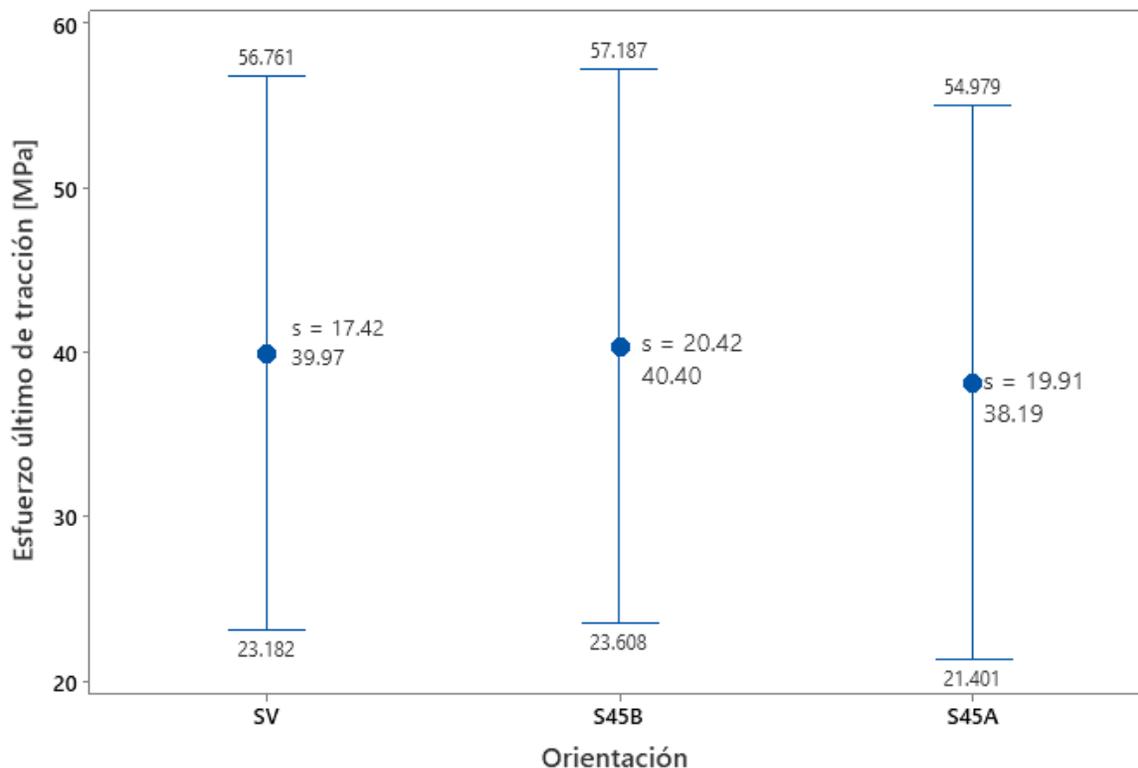


Tabla 29

Análisis de varianza del esfuerzo último de tracción conforme la orientación: BioMed Amber

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
ORIENTACION	2	16.46	8.230	0.02	0.978
Error	15	5584.10	372.273		
Total	17	5600.56			

$$p: 0.978 > \alpha: 0.05$$

Se acepta la hipótesis nula H_0 , por lo tanto, no existe una diferencia significativa en el esfuerzo último de tracción a partir de la orientación de impresión. En la Figura 61 se muestran los intervalos obtenidos según la orientación, se constata que las tres orientaciones mantienen

un valor medio similar, de las cuales el menor es en la orientación S45A con 38.19 [MPa] y el mayor de 40.40 [MPa] correspondiente a S45B, discrepando entre sí alrededor de 2.21 [MPa] y en todos los niveles se presenta un valor alto de desviación estándar.

Porcentaje de elongación: BioMed Amber

Se muestra en la Figura 62 y Figura 63 los gráficos de intervalos para el porcentaje de elongación junto a su análisis ANOVA.

Figura 62

Gráfica de intervalos obtenida para el porcentaje de elongación conforme el espesor de capa:

BioMed Amber

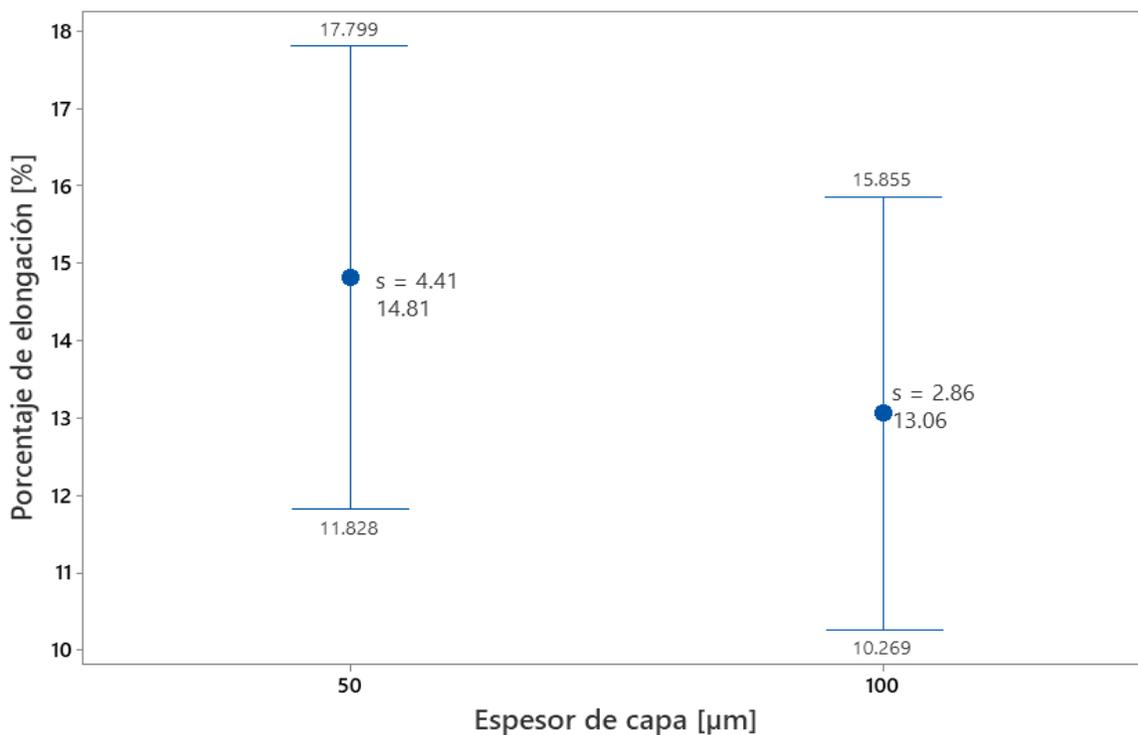


Tabla 30

Análisis de varianza del porcentaje de elongación conforme el espesor de capa: BioMed Amber

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
CAPA	1	11.46	11.46	0.86	0.371
Error	13	173.79	13.37		
Total	14	185.24			

$$p: 0.371 > \alpha: 0.05$$

Se acepta la hipótesis nula H_0 , todas las medias son iguales, por lo tanto, no existe una diferencia significativa en el porcentaje de elongación a partir del espesor.

Figura 63

Gráfica de intervalos obtenida para el porcentaje de elongación conforme la orientación:

BioMed Amber

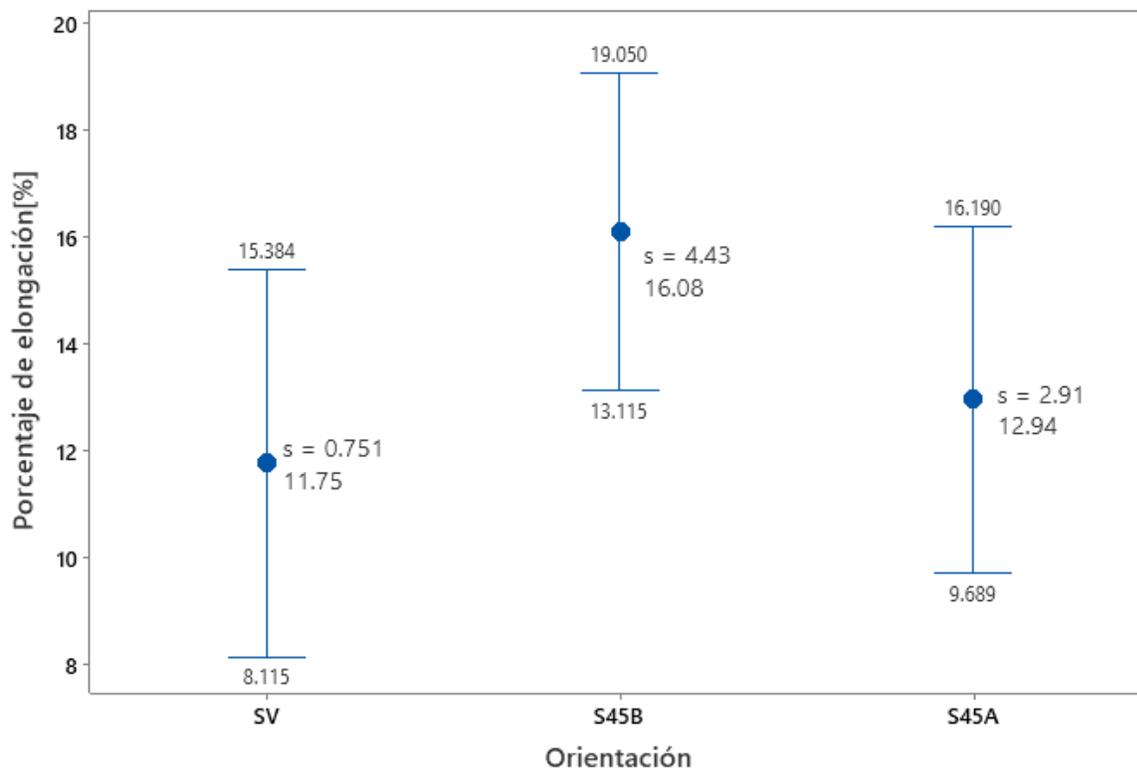


Tabla 31

Análisis de varianza del porcentaje de elongación conforme la orientación: BioMed Amber

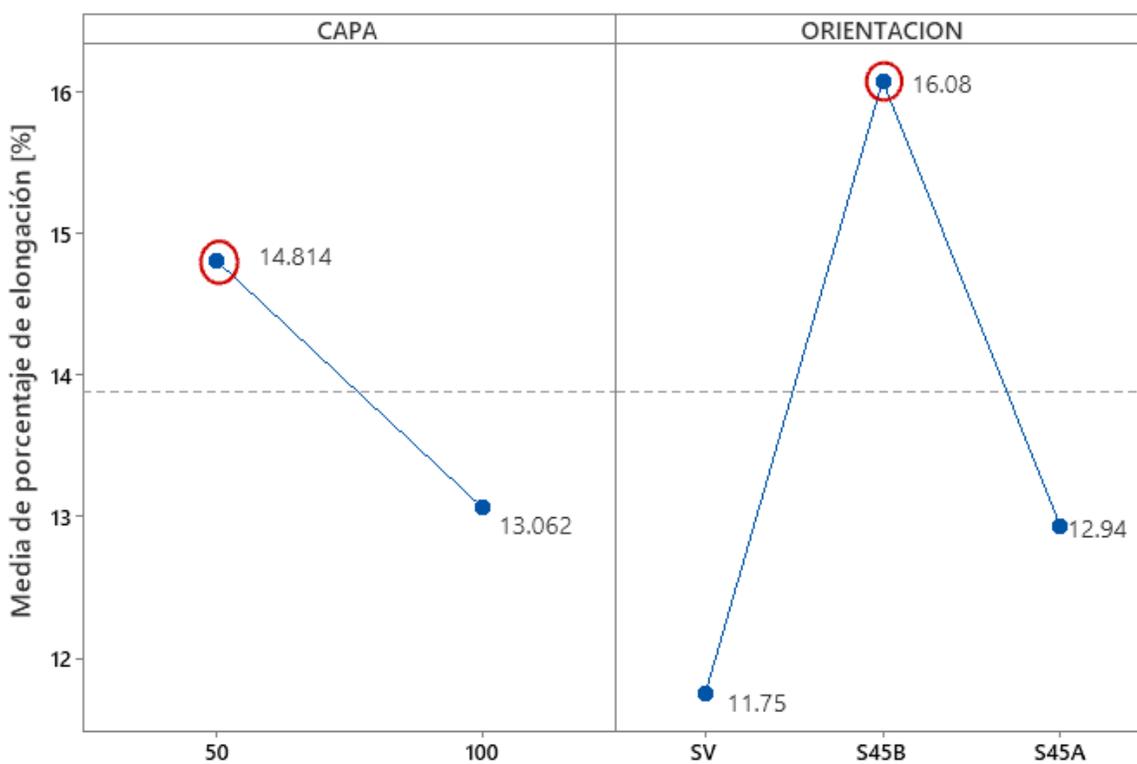
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Orientación	2	51.69	25.85	2.32	0.140
Error	12	133.55	11.13		
Total	14	185.24			

$$p: 0.140 > \alpha: 0.05$$

Se acepta la hipótesis nula H_0 , todas las medias son iguales, por lo tanto, no existe una diferencia significativa en el porcentaje de elongación a partir de la orientación. Como no existe, diferencia significativa entre los factores, se procede a realizar un análisis de interacción obteniendo la Figura 55, donde se observa que el factor influyente a partir de medias iguales es la orientación de la probeta.

Figura 64

Gráfica de efectos principales para Media de porcentaje de elongación: Tough 1500



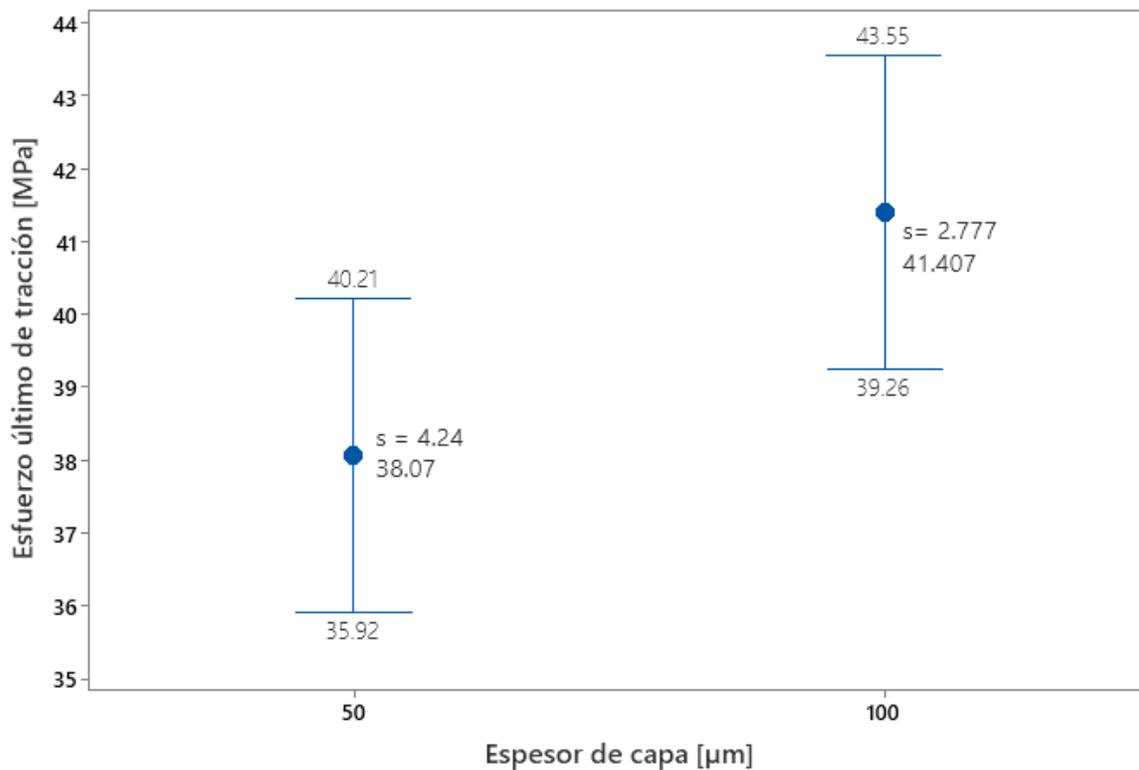
Esfuerzo de tracción último: Tough 1500

Se muestra en la Figura 65 y Figura 66 los gráficos de intervalos para el esfuerzo último de tracción de cada variable del diseño experimental previamente obtenido junto a su análisis ANOVA, el cual sigue la prueba de hipótesis de la Figura 49.

Figura 65

Gráfica de intervalos obtenida para el esfuerzo último de tracción conforme el espesor de capa:

Tough 1500

**Tabla 32**

Análisis de varianza del esfuerzo último de tracción conforme el espesor de capa: Tough 1500

	Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
	Capa	1	66.74	66.74	5.20	0.033
	Error	22	282.24	12.83		
	Total	23	348.99			

$$p: 0.033 < \alpha: 0.05$$

Rechazando H_0 y aceptando H_1 , no todas las medias son iguales. Lo que conlleva a una diferencia significativa para el esfuerzo último de tracción considerando el espesor de capa para la resina Tough 1500. El mayor valor medio de esfuerzo obtenido es con el espesor de

100 [μm], teniendo una diferencia entre el espesor de 50 [μm] de 3.4 [MPa]; presentan una desviación estándar baja.

Figura 66

Gráfica de intervalos obtenida para el esfuerzo último de tracción conforme la orientación:

Tough 1500

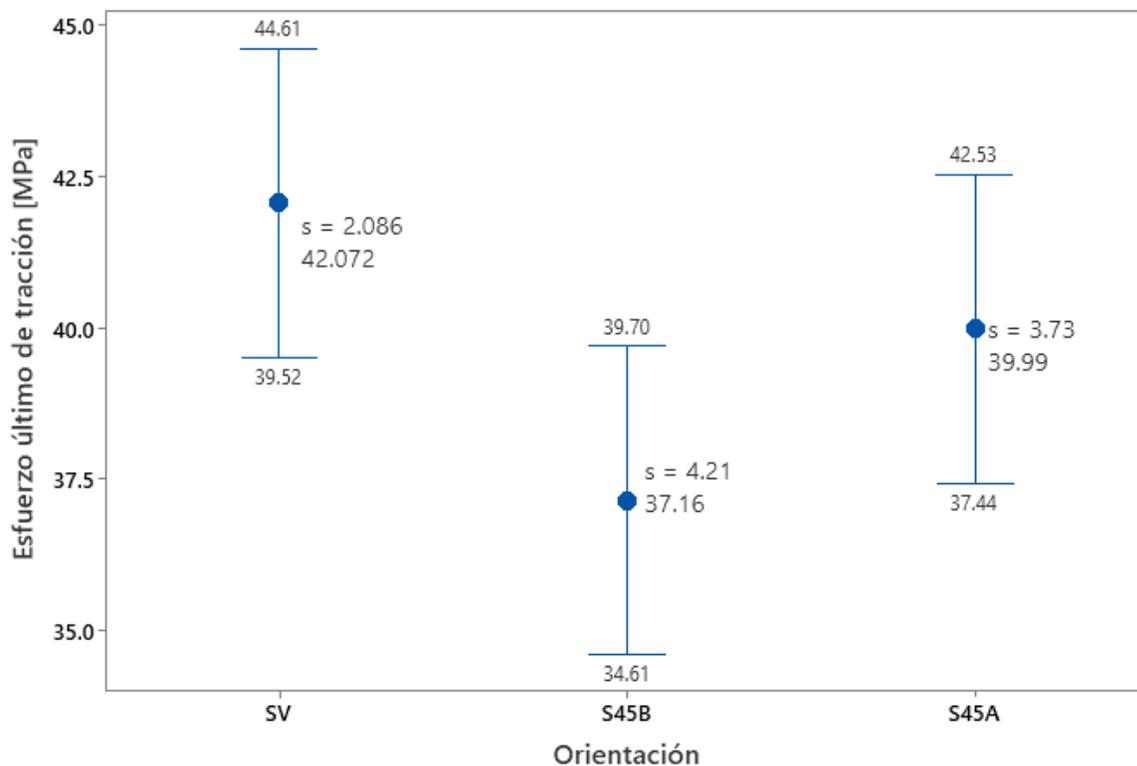


Tabla 33

Análisis de varianza del esfuerzo último de tracción conforme la orientación: Tough 1500

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
ORIENTACION	2	97.33	48.67	4.06	0.032
Error	21	251.66	11.98		
Total	23	348.99			

$$p: 0.032 < \alpha: 0.05$$

Aceptando H_1 , no todas las medias son iguales, existe una diferencia significativa para el esfuerzo último considerando la orientación en esta resina. El mayor valor medio de esfuerzo obtenido es con la orientación SV de 42.072 [MPa], teniendo una diferencia con el menor valor de S45A con 4.91 [MPa] y es el que menor desviación estándar tiene.

Porcentaje de elongación: Tough 1500

Se muestra en la Figura 67 y Figura 68, los gráficos de intervalos para el porcentaje de elongación junto a su análisis ANOVA.

Figura 67

Gráfica de intervalos obtenida para el porcentaje de elongación conforme el espesor de capa:

Tough 1500

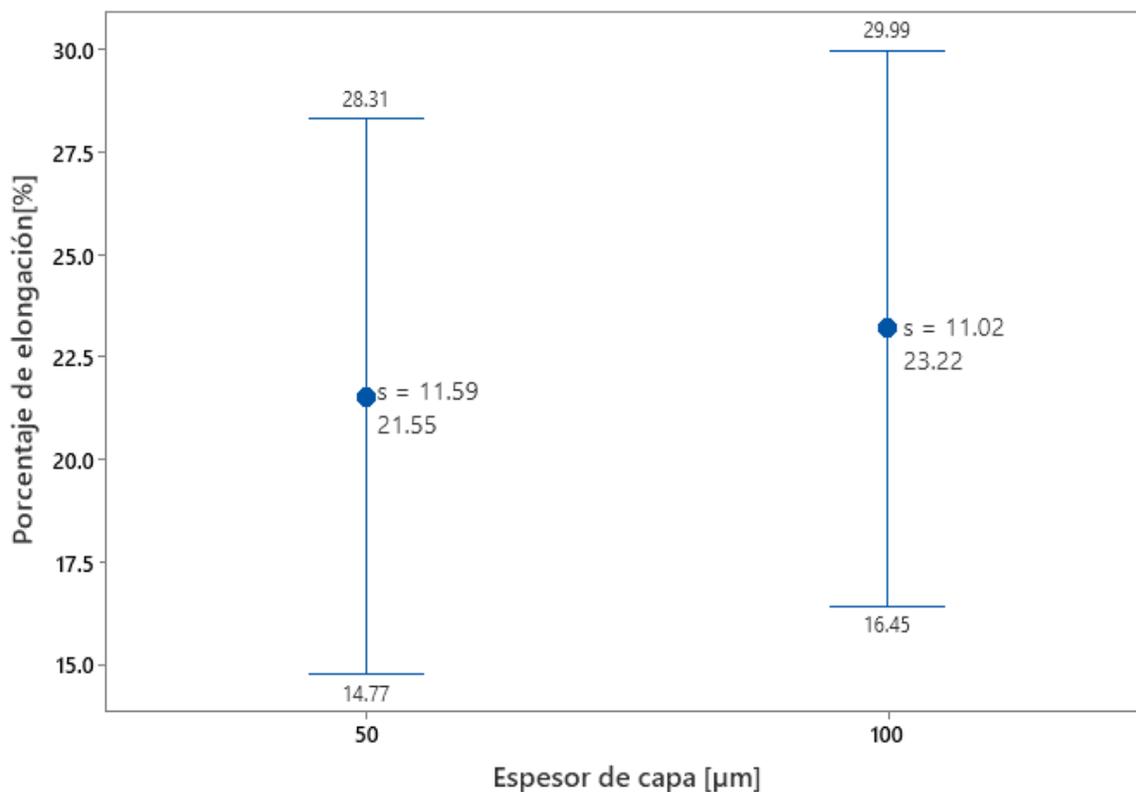


Tabla 34

Análisis de varianza del porcentaje de elongación conforme el espesor de capa: BioMed Amber

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
CAPA	1	16.88	16.88	0.13	0.720
Error	22	2813.00	127.86		
Total	23	2829.88			

$$p: 0.720 > \alpha: 0.05$$

Se acepta la hipótesis nula H_0 , todas las medias son iguales, por lo tanto, no existe una diferencia significativa en el porcentaje de elongación a partir del espesor de capa.

Figura 68

Gráfica de intervalos obtenida para el porcentaje de elongación conforme la orientación: Tough

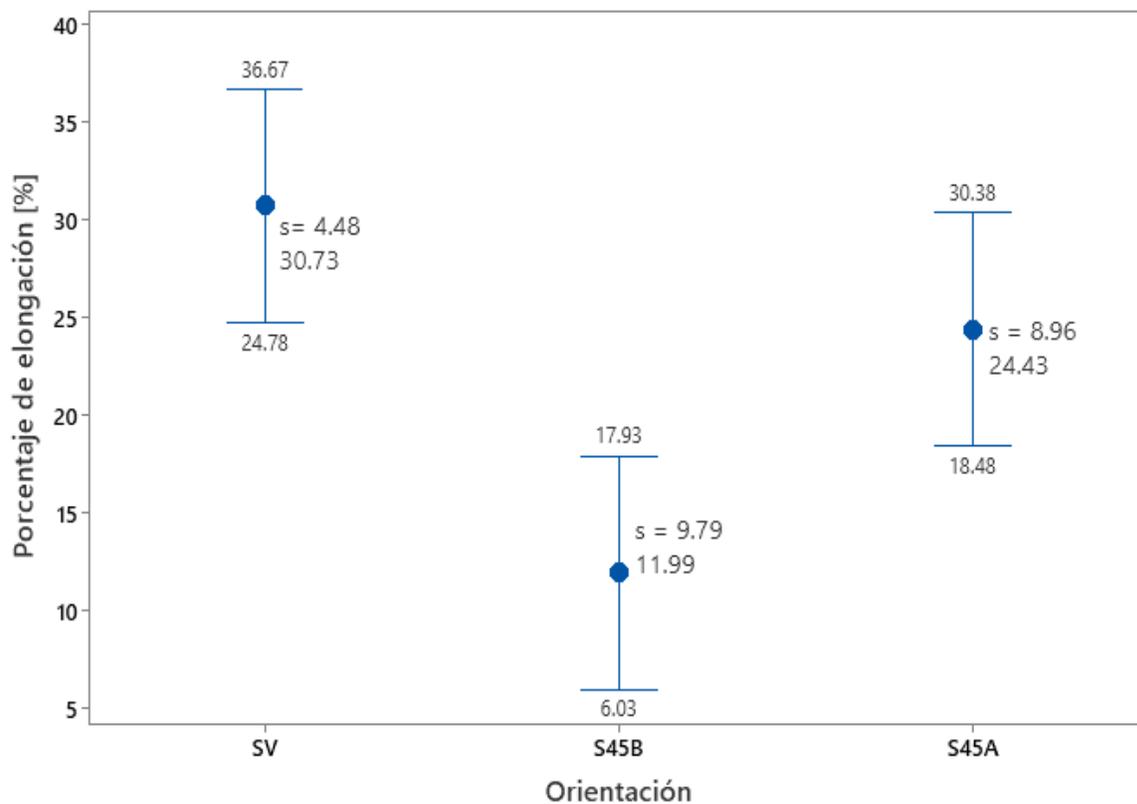


Tabla 35

Análisis de varianza del porcentaje de elongación conforme la orientación: Tough 1500

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
ORIENTACION	2	1456	728.04	11.13	0.001
Error	21	1374	65.42		
Total	23	2830			

$$p: 0.001 < \alpha: 0.05$$

Rechazando H_0 y aceptando H_1 , no todas las medias son iguales, por lo tanto, si existe una diferencia significativa en el porcentaje de elongación a partir de la orientación donde el valor medio máximo obtenido es en la orientación SV con 30.73%, presenta la desviación más baja. En cambio, el valor medio obtenido es de 11.99 % para la orientación S45B con una desviación máxima considerable.

Discusión

Los resultados muestran que para la resina BioMed Amber, el factor más influyente es el espesor de capa, esto se explica como en el control dimensional, las probetas de 50 [μm] sufrieron mayor cantidad de luz por cada capa de impresión provocando que al momento de poscurarlas no se llegue a completar el proceso, ya que el tiempo de poscurado debe ser mayor para permitir que la probeta obtenga todas sus propiedades mecánicas. Por eso se observa que, a 100 [μm] se obtiene un esfuerzo último de 56.96 [MPa] y a 50 [μm] de 22.08 [MPa], por la falta de curado se redujo considerable el esfuerzo que soporta; sin embargo, en el caso de que se supere el tiempo de poscurado podría afectar la biocompatibilidad de la misma, ya que no se estaría manteniendo las recomendaciones para ello. Otro punto que cabe denotar es que, a pesar de tener un esfuerzo último considerablemente alto, es inferior en medida al dato de la hoja técnica cuyo valor es de 73 [MPa].

Con respecto al porcentaje de elongación, el factor influyente es en cambio la orientación, pero mantienen una media similar alrededor del [38-40 %] comparándolo con el

valor teórico de [12.3 %], esto es provocado debido al tipo de sujeción en el ensayo (tipo pinza) lo que permite mayor desplazamiento a lo largo del ensayo.

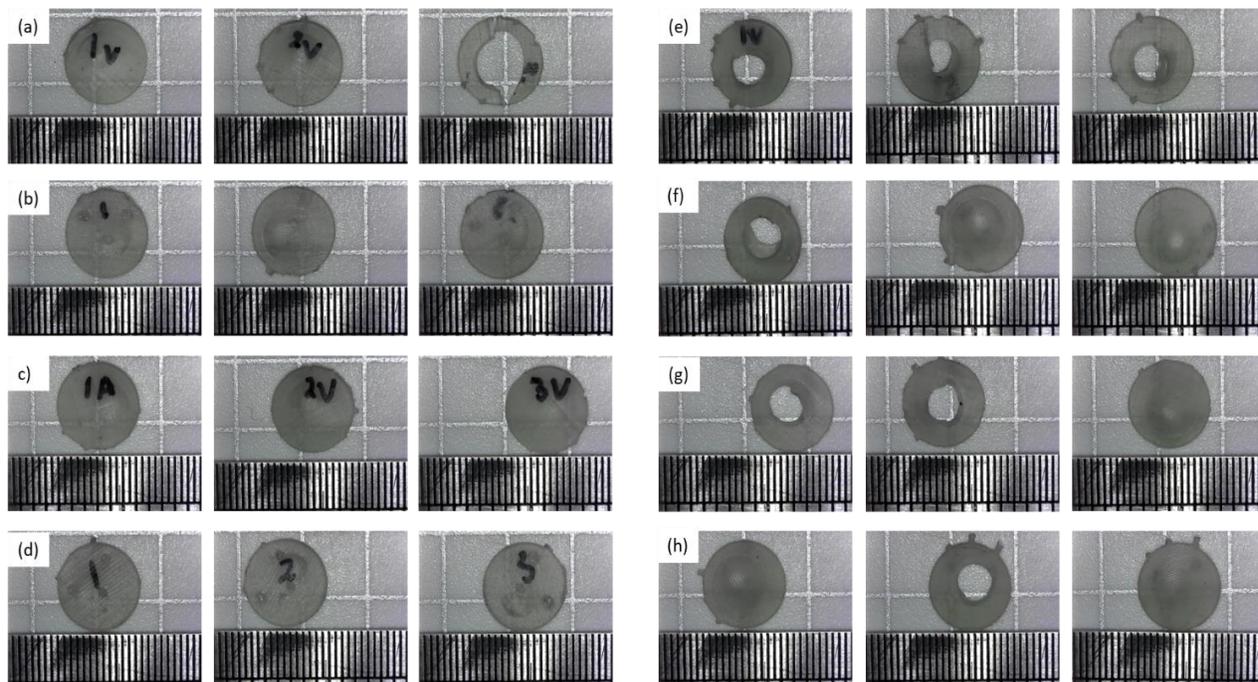
Los resultados muestran que en el caso de la resina Tough 1500, el factor más influyente es el espesor de capa y la orientación correspondiente al esfuerzo de tracción, pero la orientación que soporta mayor esfuerzo es SV [42.07 MPa], es decir, la orientación ZX, y según García et al. (2020), el motivo es que la unión entre la superficie de la capa anterior y actual que es expuesta sea más dúctil que la unión dentro de la misma capa de exposición, lo que genera el retraso de la rotura evitando el fallo anticipado. El valor medio de esfuerzo obtenido es superior al proporcionado por el fabricante 33 [MPa], esto podría verse afectado debido a que no se utilizó el mismo ensayo que el fabricante, si no que se varió el tamaño de probeta bajo la norma para micro especímenes.

Resultados de ensayo de microperforado

Los resultados obtenidos en el ensayo son de fuerza máxima y desplazamiento producido ya que la máquina de microperforado no dispone de un sensor de fuerza mayor a 110 N, sin embargo, se analiza visualmente en la Figura 69 que no todas las probetas llegaron a la rotura, a pesar de eso, si se puede denotar una deformación del punzón, aunque mínima.

Figura 69

Probetas PMP ensayadas



Nota. Probetas en entorno normal (a) 50 μ m-SV, (b) 50 μ m-S45A, (c) 100 μ m-SV, (d) 100 μ m-S45A y en un entorno biológico (e) 50 μ m-SV, (f) 50 μ m-S45A, (g) 100 μ m-SV, (h) 100 μ m-S45A.

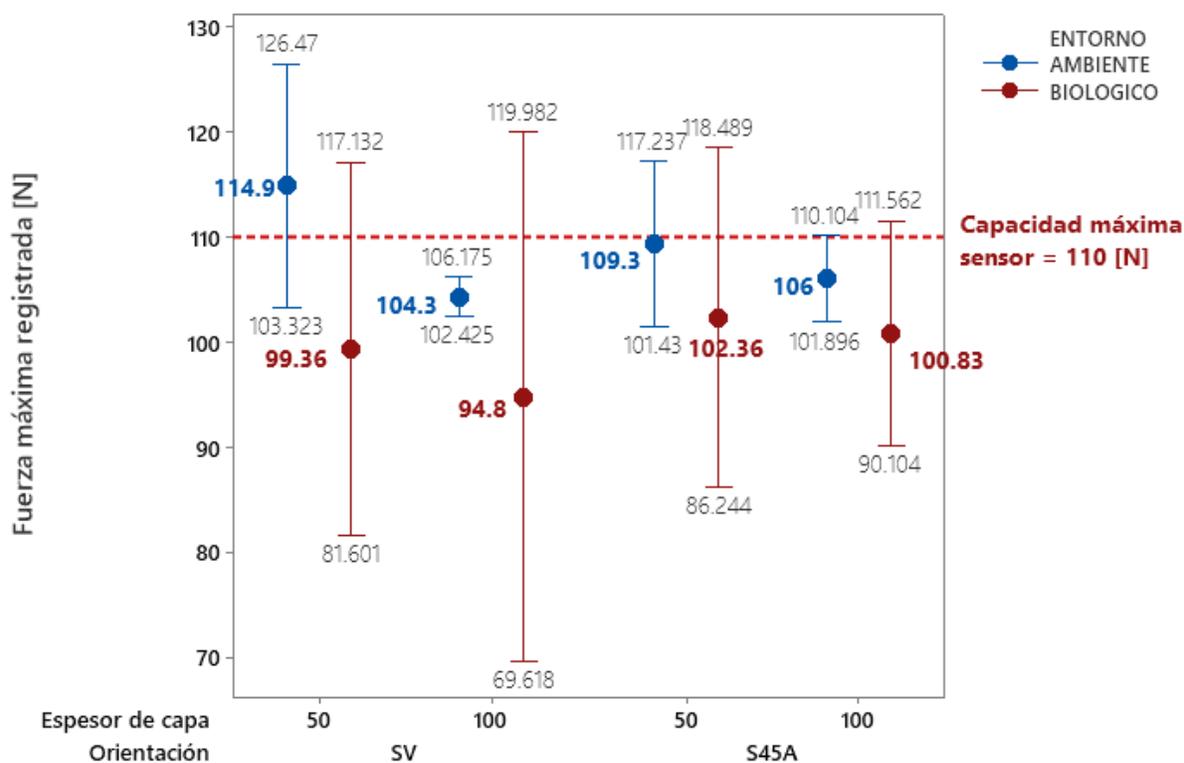
Como se observa, existe la presencia de marcas del punzón principalmente en las probetas que se encuentran en un ambiente normal, en cambio, en las probetas sumergidas en un ambiente biológico se observa que hay rotura en la mayoría de ellas. Por ello, se analiza la fuerza máxima (Figura 70) y el desplazamiento obtenido (Figura 71) con una gráfica de intervalos para conocer los valores que soportó antes de perforarse.

Fuerza máxima obtenida

Se observa en la Figura 70 que los valores de fuerza obtenidos tienen una diferencia notable entre el tipo de entorno en el que se encontraban, se reportan fuerzas menores a la capacidad máxima para aquellos del entorno biológico comprobando su rotura. Por otro lado, las probetas en un ambiente normal todas superan los 100 N, pues no se logró la rotura en ellos y solo se marcó la forma del punzón.

Figura 70

Gráfica de intervalos para la fuerza máxima obtenida en probetas PMP



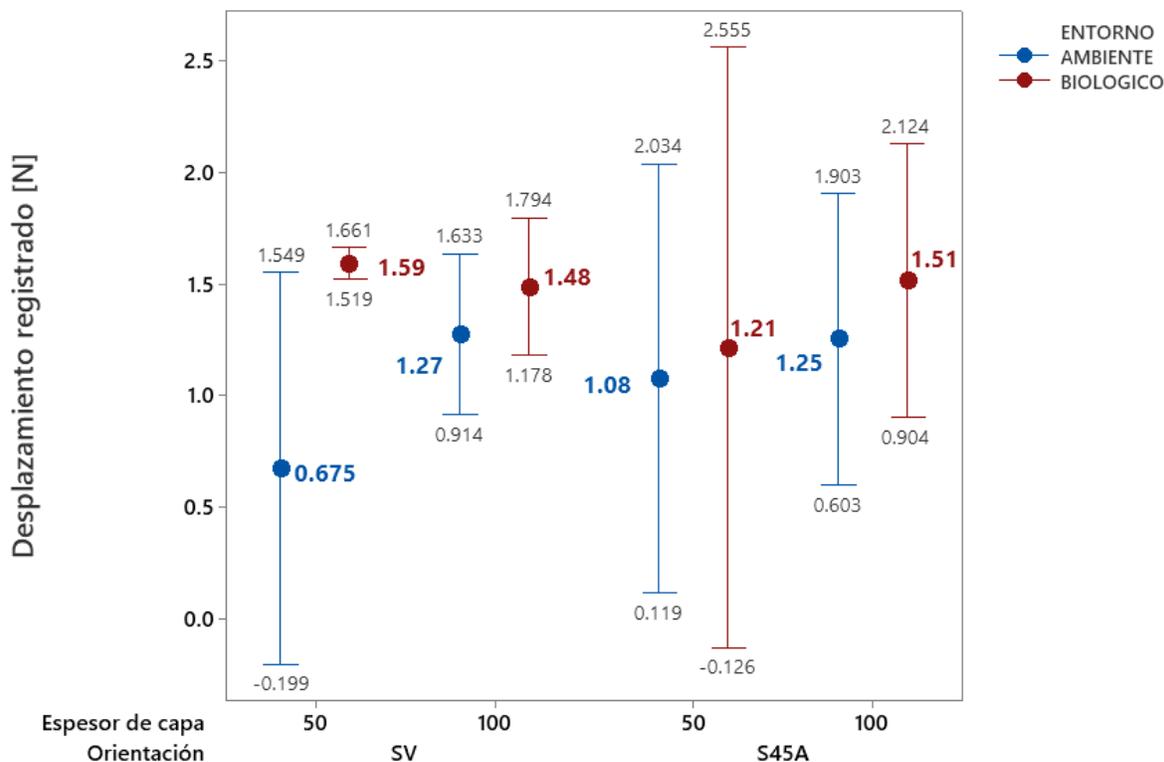
Debido a la notoria diferencia de fuerza, uno de los factores más considerables es el entorno en el que se encuentra la probeta, permitiendo comprobar la degradación con el PBS como entorno fisiológico. Se observa también, que las probetas de 50 [µm] soportaron mayor fuerza en comparación a su similar en 100 [µm].

Desplazamiento

Se observa en la Figura 71 que los valores de desplazamiento registrado están en el rango [0.6-1.6 mm], por lo que se considera que el ensayo fue satisfactorio, aunque se evidencia en varias combinaciones una desviación estándar alta sin depender del tipo de entorno.

Figura 71

Gráfico de intervalos para el desplazamiento registrado



Discusión

El ensayo de microperforado permite conocer la fuerza y el desplazamiento obtenido, pero en este caso, también se lo enfocó para conocer la consecuencia al colocar las probetas en entornos diferentes, haciendo una correlación con la degradación que sufren ante el ambiente biológico de los andamios en la ingeniería tisular. A partir de ello, se comprueba que el entorno si es un factor significativo pues como se observa en la Figura 70, la fuerza media obtenida de las probetas sumergida en PBS es menor del límite del sensor, es decir, menor a los 110 N; y esto se evidencia en la Figura 69, donde varias probetas se encuentran perforadas por el punzón.

En el caso del desplazamiento, se obtienen valores semejantes entre las combinaciones previstas por lo que se consideran valores confiables, aunque se puede probar con más

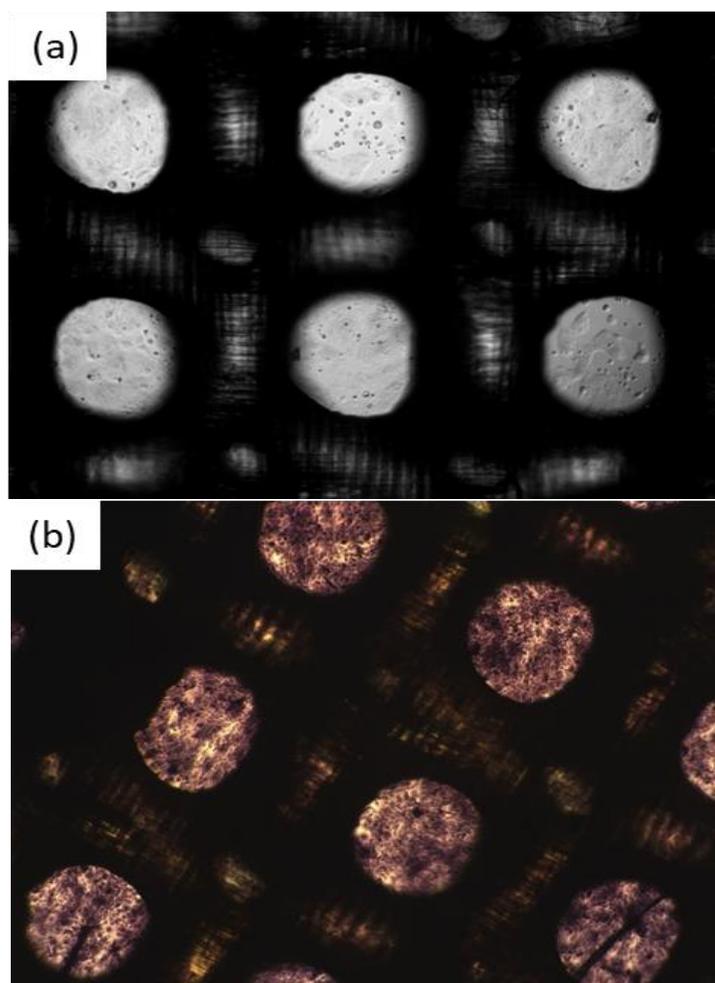
probetas para verificar el valor de desplazamiento y analizar si existe una relación considerable al entorno en el que se encuentra.

Resultados del ensayo de adhesión celular

A partir de los ensayos realizados en los andamios PA, se obtuvieron datos de la cantidad de células en los poros mediante el procesamiento de las microfotografías como se observa en la Figura 72 y Figura 73.

Figura 72

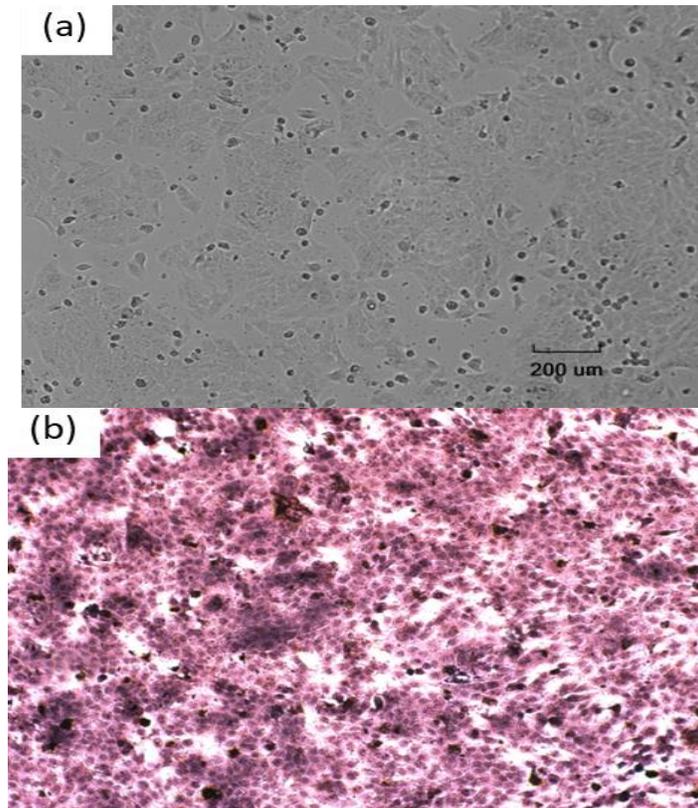
Microfotografías obtenidas del ensayo de adherencia celular



Nota. (a) Microfotografía de la estructura G70 al inicio del ensayo con un aumento 40x y (b) Microfotografía de la estructura G70 al final del ensayo (17 días después) 40x.

Figura 73

Microfotografías obtenidas del ensayo de adherencia celular



Nota. (a) Microfotografía del control celular al inicio del ensayo -100x y (b) Microfotografía del control celular al final del ensayo (17 días después) -100x.

Cantidad de células vs Tiempo de ensayo

Al analizar los datos obtenidos del conteo de células se realiza una comparación por estructura en función del tiempo de inicio y finalización del ensayo para conocer el incremento de estas en el mismo espacio como se observa en la gráfica de barras de la Figura 74. Por consiguiente, existe un aumento porcentual de crecimiento en la Tabla 36.

Figura 74

Gráfica de barras del ensayo de adherencia celular

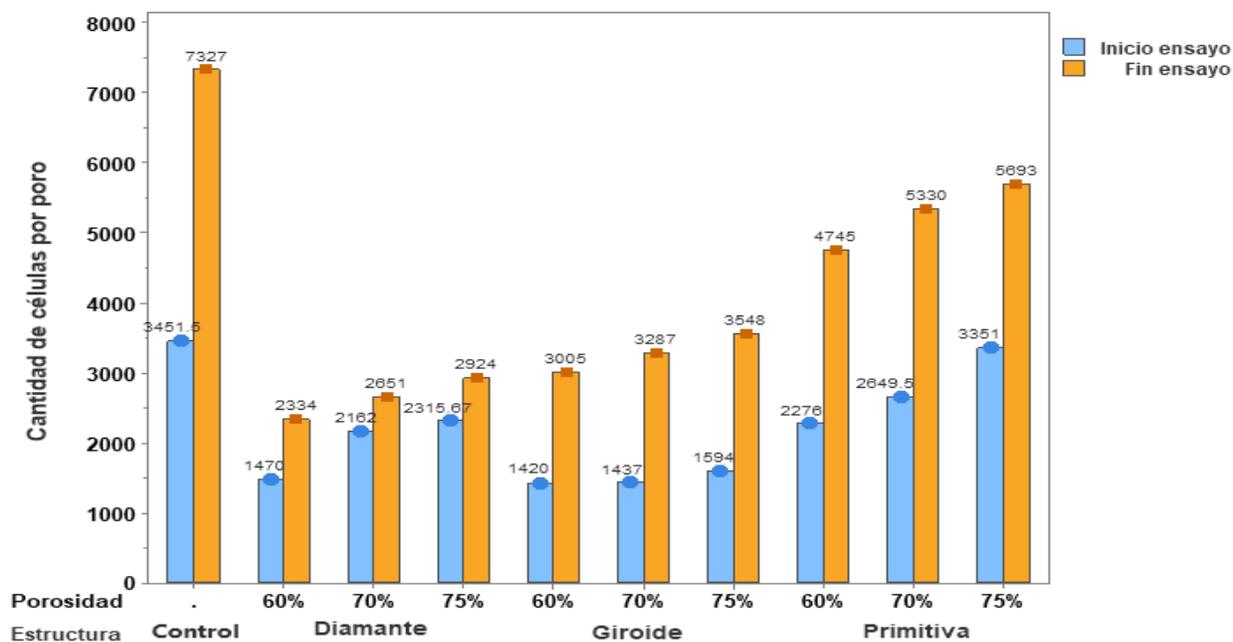


Tabla 36

Porcentaje de crecimiento celular

Porcentaje de crecimiento celular [%]			
Estructura / Porosidad	60%	70%	75%
Diamante	58.77	22.61	26.27
Giroide	111.62	128.74	122.56
Primitiva	108.48	101.17	69.89

Además, se realizó un análisis estadístico ANOVA de un factor, para determinar los factores influyentes en el aumento celular siguiendo la prueba de hipótesis de la Figura 49. Se obtiene la gráfica de intervalos (Figura 75) para el conteo de células al final del ensayo y la tabla del análisis de varianza con respecto a la estructura (Tabla 37) y porosidad (Tabla 38).

Figura 75

Gráfica de intervalos para el conteo de células en probetas PA

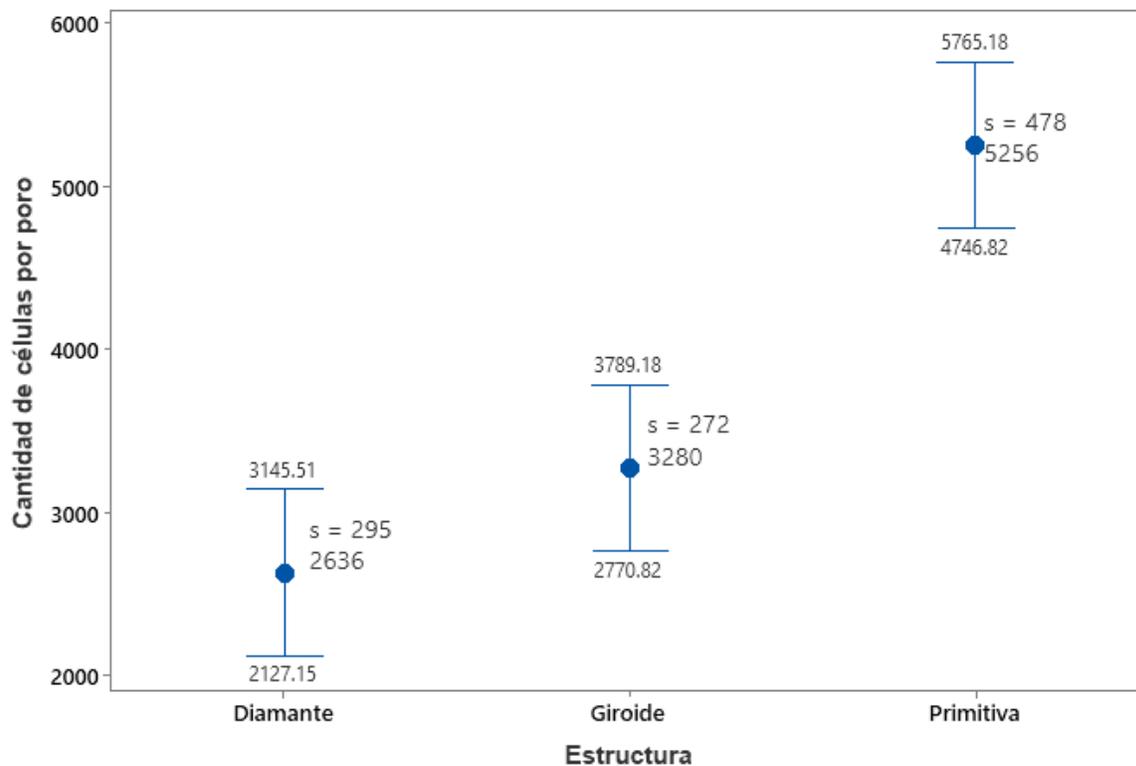


Tabla 37

Análisis de Varianza para el conteo de células según los diferentes niveles de estructura

Fuente	GL	SC	Ajust. MC	Ajust. Valor F	Valor p
Estructura	2	11181536	5590768	43.04	0.000
Error	6	779437	129906		
Total	8	11960973			

Valor p (0.00) < α (0,05)

Rechazando H_0 y aceptando H_1 , no todas las medias son iguales. Existe una diferencia significativa para el conteo de células por poro según las diferentes estructuras.

Tabla 38

Análisis de Varianza para el conteo de células según los diferentes niveles de porosidad

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Porosidad	2	726336	363168	0.19	0.829
Error	6	11234637	1872439		
Total	8	11960973			

Valor p (0.829) > α (0,05)

No se rechaza H_0 y se acepta, todas las medias son iguales. Por tanto, no existe una diferencia significativa para el conteo de células por poro según las diferentes porosidades.

Relación Área / volumen

Una propiedad importante de la superficie es la relación área volumen que relaciona parámetros geométricos de un andamio para determinar la relación de interacción entre la probeta y su entorno (Chew et al., 2016), los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla 39 y en la Figura 76 donde se especifica el valor de la relación según su estructura interna y la porosidad respectiva.

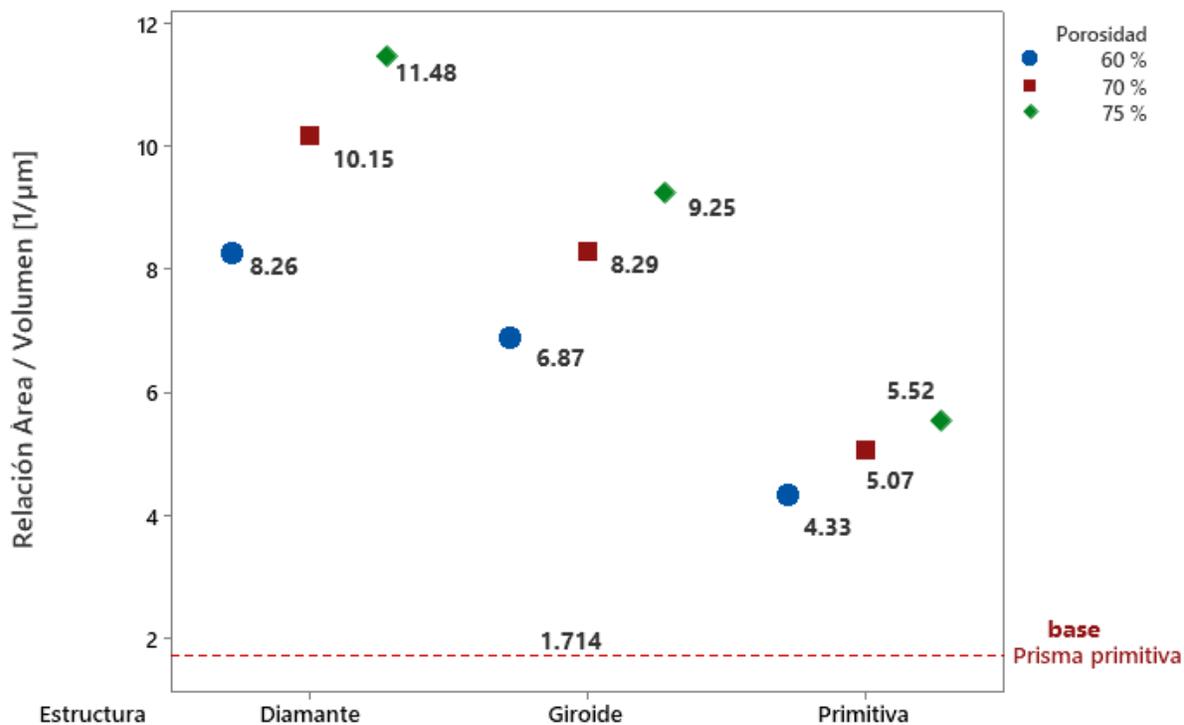
Tabla 39

Datos obtenidos de área y volumen de las probetas PA

Estructura	Porosidad	Área [μm^2]	Volumen [μm^3]	Relación [$1/\mu\text{m}$]
Primitiva	60	286.13	66.05	4.3320
	70	250.73	49.41	5.0745
	75	226.95	41.09	5.5232
Giroide	60	453.78	66.01	6.8744
	70	409.06	49.33	8.2923
	75	379.14	40.98	9.2518
Diamante	60	542.57	65.66	8.2633
	70	493.97	48.64	10.1556
	75	460.63	40.13	11.4784

Figura 76

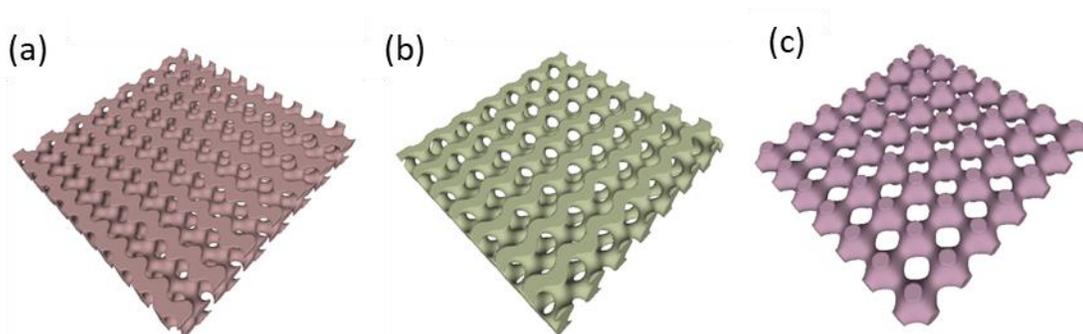
Relación área / volumen de los andamios



En la figura se observa que, el valor de la relación de la figura base (10.5x10.5x1.5 mm) es 1.714 [1/μm] por lo que la relación área volumen es hasta 7 veces mayor en el caso de las estructuras pues todas ellas mantienen un área diferente debido a sus configuraciones internas, por ello, la estructura que tiene mayor área de poro (Primitiva) es la que menor relación área volumen tiene, pues es la estructura interna más simple. La estructura que mantiene una relación alta es el diamante, pues su estructura está conformada por sumas de senos y cosenos obteniendo una forma compleja y mayor superficie. En la Figura 77 se observa la diferencia entre las estructuras analizadas, además, visualmente se denota la diferencia de superficie de cada andamio.

Figura 77

Estructuras TPMS de andamios



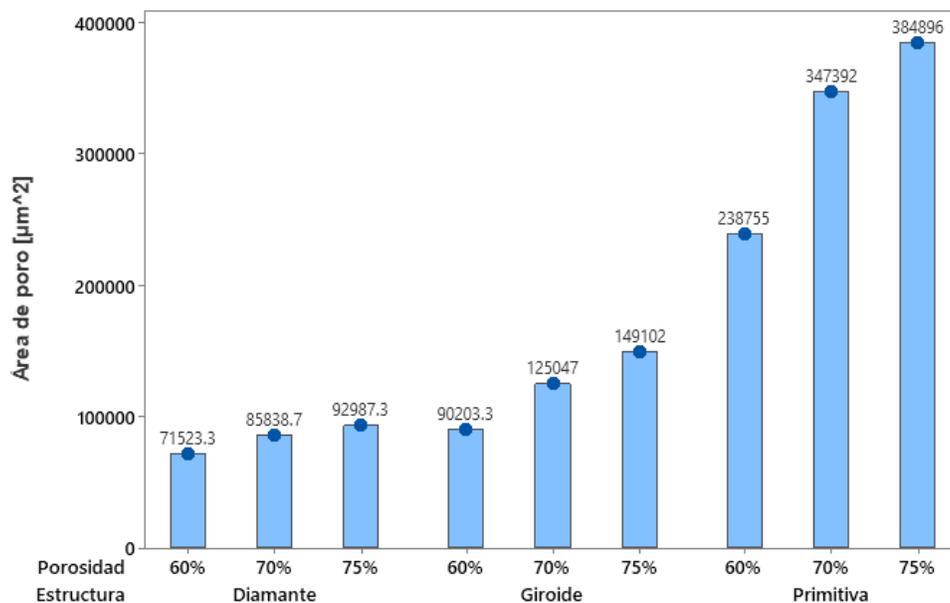
Nota. (a) TPMS Diamante, (b) TPMS Giroide y (c) TPMS Diamante.

Discusión

En función del crecimiento celular por poro, se denota que la estructura que contienen mayor cantidad de células por poro es la Primitiva, siguiendo de la Giroide y finalmente, la estructura Diamante. Con respecto a la porosidad, se evidencia que en cada estructura se mantiene el incremento porcentual lineal de menor a mayor porosidad esto se justifica debido al área entre ellas como se observa en la Figura 78, la estructura que tiene mayor área es la Primitiva con un 75% de porosidad.

Figura 78

Gráfica de barras de área del poro del andamio PA



Haciendo una comparación entre el inicio del ensayo, se debe tener en cuenta que existía cierto porcentaje de confluencia en cada pocillo alrededor del [40% - 60%], lo que con el pasar del tiempo fue aumentando ese valor saturándolo a más del 100%; en consecuencia, el crecimiento pasó de ser monocapa a uno tridimensional.

A partir del análisis ANOVA, se tiene que como factor influyente es la estructura del andamio, se observa que el valor medio según la estructura es para la primitiva de 5256 células, Giroide 3280 células, Diamante 2636 células. En este caso, se confirma que el número de células es proporcional al área del poro concluyendo que el factor más influyente para el aumento de células es la estructura.

En la relación área volumen SVR la estructura TPMS cuyo valor es mayor, es el diamante por su estructura interna, pues al tener mayor campo de acción con respecto al volumen se pueden adherir más células a la interconexión de poros. Este valor de SVR permite determinar las características de degradación de los materiales ya que se es proporcionalmente directo al crecimiento de células.

Resultados del ensayo de permeabilidad

De acuerdo con la norma ASTM F2952 descrito en el Capítulo 2, se procede a calcular el coeficiente de Darcy. Los datos obtenidos del ensayo son presión diferencial, caudal y corriente, a partir de esto se encuentra el coeficiente bajo la Ecuación 2 obteniendo datos durante 60 s por cada probeta como se observa en la Tabla 40.

Tabla 40

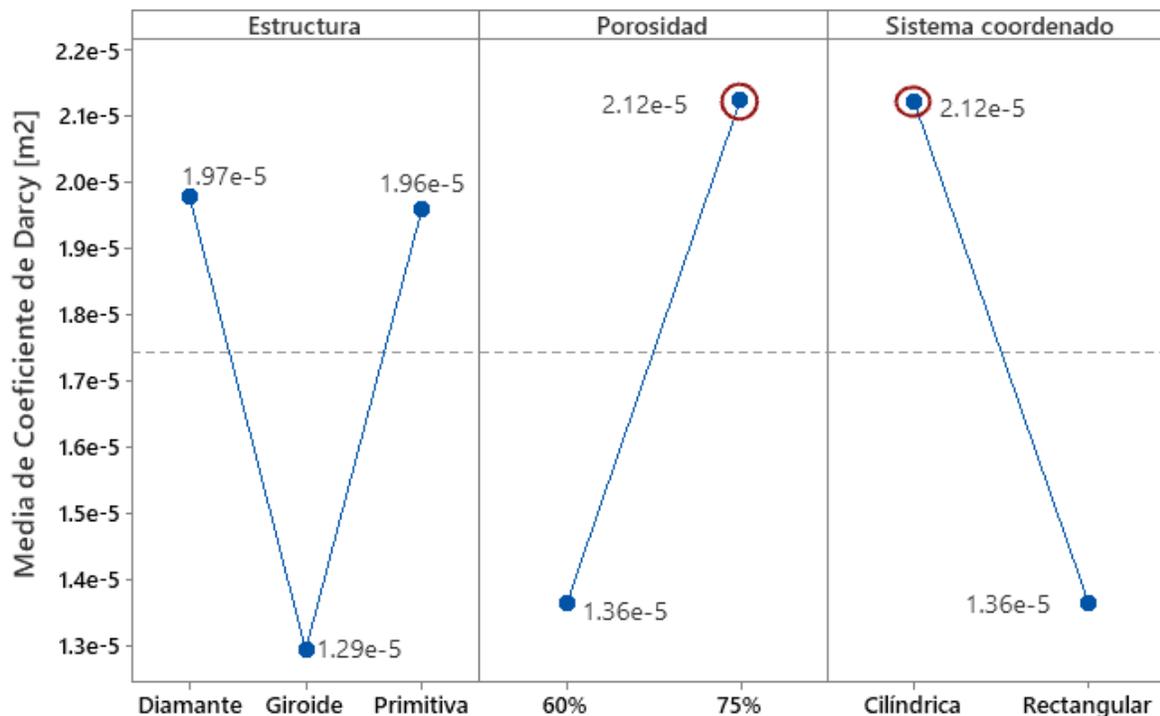
Coefficientes de Darcy obtenidos

Estructura	Porosidad [%]	Sistema coordinado	Coefficiente Darcy [m²]
Diamante	60	Cilíndrico	1.37e-5
		Rectangular	1.35e-5
	75	Cilíndrico	3.17e-5
		Rectangular	2.02e-5
Giroide	60	Cilíndrico	1.44e-5
		Rectangular	1.19e-5
	75	Cilíndrico	1.39e-5
		Rectangular	1.16e-5
Primitiva	60	Cilíndrico	1.64e-5
		Rectangular	1.20e-5
	75	Cilíndrico	3.72e-5
		Rectangular	1.28e-5

A partir de esto, se realiza una gráfica de efectos principales para determinar los factores influyentes para obtener un coeficiente de Darcy aproximado. De los cuales, el menor coeficiente obtenido es 1.16 e-5 [m²] para la estructura Giroide con 75% de porosidad con un sistema coordinado rectangular, y el valor más alto corresponde a 3.72e-5 [m²] de la estructura primitiva al 75% de porosidad con un sistema coordinado cilíndrico.

Figura 79

Gráfica de efectos principales para el coeficiente de Darcy



Discusión

Dados los resultados se encuentra que los factores que influyen directamente son el sistema de coordenadas y la porosidad, a valor número de coeficiente de Darcy el fluido será más rápido y atraviesa el andamio con mayor facilidad; pero si es un valor bajo, el fluido será más lento debido a los obstáculos que presenta el andamio.

En un sistema coordinado cilíndrico las celdas unitarias se expanden radialmente permitiendo que haya un poro de mayor área lo que permitiría que el flujo atravesase el andamio de forma continua, en cambio, en un sistema rectangular las celdas unitarias son de acuerdo con el tamaño de diseño por ello el área del poro es menor.

Por otro lado, la porosidad es directamente proporcional a la cantidad de fluido que atraviesa el andamio debido al área de su poro en mayor medida. En cuanto a estructura, se observa que les corresponde un valor alto de coeficiente de permeabilidad a la estructura

diamante, pues estas mantienen una relación área/volumen mayor, y la estructura primitiva, esta tiene un tamaño de poro mayor en comparación de las demás estructuras; demostrando el motivo por el cual estas estructuras tienen mayor permeabilidad.

Discusión final

La ingeniería mecatrónica juega un papel muy importante dentro de la biomedicina debido a la capacidad de combinar conceptos de mecánica, electrónica, control e informática para el desarrollo de soluciones innovadoras para el campo de la medicina y biotecnología.

Juega un papel crucial en el desarrollo de dispositivos médicos avanzados como el bioplotter (EnvisionTEC 3D-Bioplotter, New York, EE. UU.) que es una herramienta fundamental para la biofabricación e ingeniería tisular debido a la precisión de sus movimientos en la construcción de tejidos y órganos 3D, se visualiza en la Figura 80); por otro lado, el robot Da Vinci (Intuitive Surgical Sunnyvale, CA, EE. UU.) es un robot que permite asistir cirugías permitiendo procedimientos con mayor precisión y destreza, se lo observa en la Figura 81. Estos dispositivos representan tecnología innovadora que combina la mecatrónica para controlar la precisión, el movimiento y parámetros de impresión con la investigación biomédica para el desarrollo de nuevos dispositivos.

Figura 80

Bioplotter



Nota. Bioplotter permite la fabricación de células en patrones específicos para la construcción de tejidos y órganos. Tomado de *Impresora 3D de materiales plásticos 3D-Bioplotter®* [Figura],

por EnvisionTEC, s.f., DirectIndustry (<https://www.directindustry.es/prod/envisiontec/product-85667-1820666.html>).

Figura 81

Cirugía robótica Da Vinci

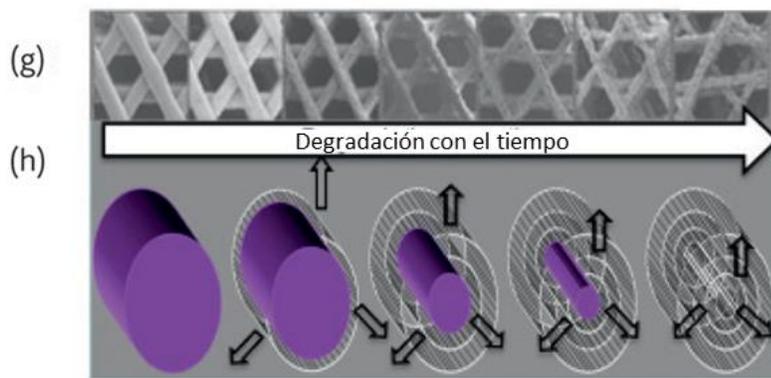
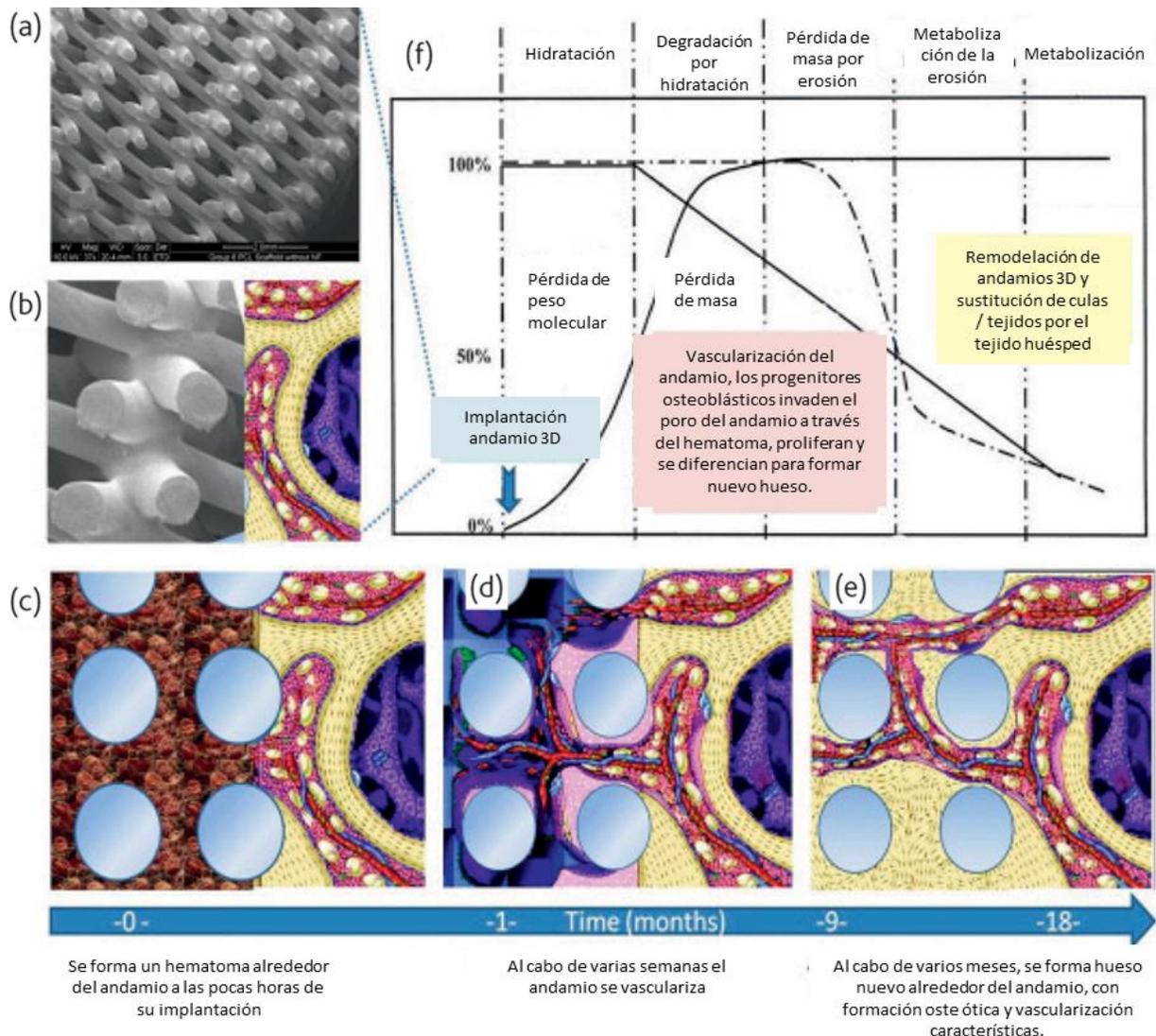


Nota. El robot Da Vinci utilizado en cirugías asistidas por robot que permite a los cirujanos realizar movimientos con mayor precisión. Tomado de *Estructura y funcionamiento de la cirugía robótica Da Vinci* [Figura], por Clínica CEMTRO, s.f., (<http://www.icirugiarobotica.com/cirugia-robotica-da-vinci/>).

Por otro lado, la sinergia de mecatrónica, biotecnología y medicina enfocada en el desarrollo de andamio para su posterior implantación en paciente es un gran campo en auge. Los andamios, posteriormente, de la obtención del implante sintético y de la implantación dentro de un defecto óseo, la regeneración celular y tisular continua permite obtener condiciones biomecánicas y una vascularización estable dentro del paciente, formas geométricas externas e internas óptimas y una rigidez necesaria. Por ello, el andamio debe asegurar una resistencia mecánica y rigidez suficiente para sustituir la pérdida del tejido ausente y a la vez, degradarse a un ritmo compatible con el crecimiento del tejido (Woodruff et al., 2012). En la Figura 82 se observa la interacción del andamio para la formación del tejido y su degradación.

Figura 82

Ilustración esquemática de la pérdida de peso molecular y masa de un andamio en función del tiempo

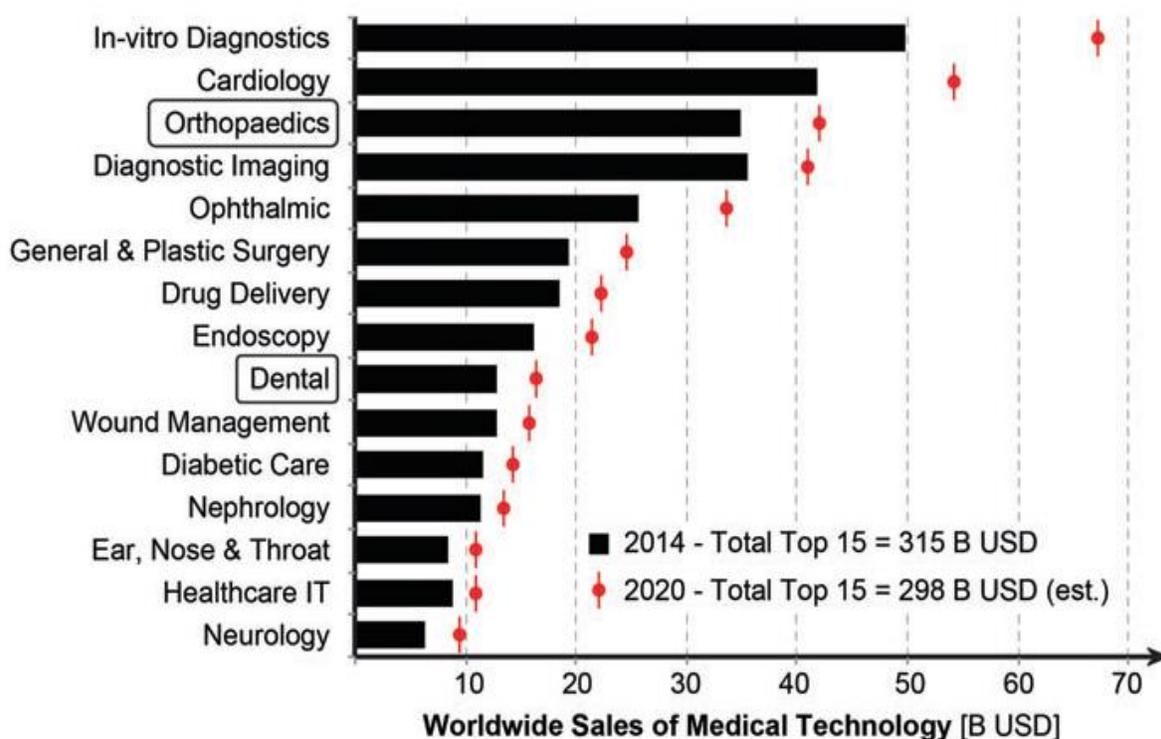


Nota. (a) Estructura interna del andamio, (b) implantación del andamio, (c) Se rellena con un hematoma en la implantación, (d) Vascularización, (e) Formación de nuevo hueso, (f) Gráfica de degradación del andamio en el tiempo, (g) Degradación del andamio y (h) Proceso de bioerosión. Tomado de “Bone tissue engineering: from bench to bedside” (p.2), por Woodruff et al, 2012, *Materials Today*.

Hoy en día la industria farmacéutica-médica ha enfocado gran parte de sus recursos económicos e intelectuales en el desarrollo de prótesis, bioimpresión 3d, tejidos, órganos, dispositivos médicos avanzados para mejorar en medida la atención médica.

Figura 83

Tendencia de las ventas mundiales de tecnología médica



Nota. Muchos de estos campos contribuyen a la reparación y regeneración del esqueleto, donde el uso de la bioimpresión es importante. Tomado de “Bio ceramics for Musculoskeletal Regenerative Medicine: Materials and Manufacturing Process Compatibility for Synthetic Bone Grafts and Medical Devices” (p. 5), por Rodriguez et al, 2018, *3D Printing and Bio fabrication*

Recapitulando, la ingeniería mecatrónica juega un papel fundamental en el desarrollo de dispositivos médicos como los mencionados anteriormente debido a la necesidad de integrar conocimientos multidisciplinarios en la búsqueda de soluciones innovadoras en el campo médico y biotecnológico. Esta versatilidad permite la inclusión de la electrónica y mecánica en el desarrollo de pruebas de concepto para medir y controlar parámetros, desde la adquisición de datos hasta la implementación mecánica para el desarrollo de estructuras biocompatibles a ser utilizadas en nuevos procedimientos médicos que logren resultados superiores. Se enfoca tanto en el desarrollo de mejoras continuas de los dispositivos médicos como el control, medición de parámetros, disminución de errores, precisión, adaptación a la anatomía humana y también, en la configuración de parámetros de diseño e impresión.

En resumen, la ingeniería mecatrónica abre una gama de oportunidades para la investigación y desarrollo de nuevas tecnologías innovadoras que mejoren la atención médica y contribuyen al progreso en este campo médico y biotecnológico.

Capítulo V

Conclusiones, recomendaciones y trabajo futuro

Conclusiones

En el presente trabajo se utiliza manufactura aditiva mediante estereolitografía empleando resinas biocompatibles BioMed Amber y Tough 1500, las cuales fueron fabricadas siguiendo la normativa ISO 10993 para aplicaciones médicas. El software utilizado para el diseño de los andamios fue desarrollado por Trujillo (2023), el cual se encuentra desarrollado en Python utilizando funciones de MeshLab para el tratado de mallas.

Las diversas pruebas de impresión han permitido identificar la metodología requerida para obtener los andamios sin defectos considerables, por ello se ha trabajado como fase preliminar impresiones dentro del laboratorio de ingeniería inversa y prototipado, para llegar a la fase de impresión en biomaterial obteniendo los andamios que permiten realizar los diferentes ensayos mecánicos y biológicos. Se ha determinado la utilización de tres estructuras TPMS principales: Primitiva, Giroide y Diamante con las porosidades de 60, 70 y 75%. Con estos andamios se evaluó la orientación y espesor de capa adecuada para lograr la impresión de las estructuras, sin que los poros acumulen resina internamente, por ello, la orientación adecuada es B45XZ para andamios de espesor delgado y la orientación ZX para andamios de mayor espesor. El Posprocesamiento es el recomendado por el fabricante para conseguir la biocompatibilidad de la resina.

Los resultados obtenidos por la caracterización de las resinas bajo diversos parámetros de impresión y diseño fueron los siguientes: el valor medio máximo de esfuerzo último obtenido para la resina BioMed Amber es de 56.96 [MPa] con un porcentaje de elongación de 16.08 % correspondiente, donde los factores significantes son el espesor de capa y en menor proporción, la orientación para el porcentaje de elongación. En esta resina, se observó que el espesor de capa fue tan influyente que se obtuvo diferente coloración entre probetas

(anaranjadas y amarillentas) y propiedades mecánicas totalmente diferentes entre sí con una diferencia de 34.88 [MPa].

Por otra parte, los resultados obtenidos para la resina Tough 1500 demuestran que el factor influyente es la orientación de impresión de las probetas que evidencia un mayor valor medio de esfuerzo último en la orientación SV: ZX con 42.072 [MPa] con 30.73% de elongación, comprobando que existe anisotropía en las piezas, esto se explica debido a la unión entre la capa anterior y actual que es más dúctil que la unión dentro de la misma al curar cada capa durante la impresión; en el ensayo de tracción se concluye que el espesor de capa no fue muy influyente dentro de los resultados.

En cambio, durante el ensayo de microperforado se analizó la degradación del material ante un medio fisiológico: PBS, se obtuvo que la fuerza mínima necesaria para llegar a la rotura fue de 94.8 [MPa] donde la mayor parte de probetas que fueron sumergidas en este medio fallaron. Por otro lado, las probetas que se encontraban a condiciones normales solo presentaron la deformación del punzón debido al limitante de la fuerza del sensor.

Para el ensayo de adhesión celular, se utilizó cultivos de la línea celular HaCaT en un medio completo Dulbecco's Modified Eagle's con otros componentes los cuales fueron colocados en cada pocillo con un andamio, al transcurrir el tiempo, se observa cómo fueron las células multiplicándose del día 1 al día 17, analizando el crecimiento de estas se obtiene que la estructura en la que hubo mayor cantidad de células por poro es la primitiva 75% de porosidad con 5256 células debido a que tiene un mayor área de poro. En cambio, con la relación área volumen se obtiene que esta es directamente proporcional a la adherencia de células al andamio cuyo valor máximo es de 11.48 perteneciente a la estructura diamante.

En el ensayo de permeabilidad, a través, de las pruebas de concepto se obtuvo que los factores predominantes son la porosidad y el sistema de coordenadas, debido a que al transformar de rectangular a cilíndrico la celda unitaria tiende a expandirse para adoptar la forma cilíndrica permitiendo tener un poro de mayor tamaño; y por el mismo motivo, la

porosidad determina el tamaño de los poros por los cuales va a transportarse el fluido, a menor tamaño de poro menor coeficiente de permeabilidad.

Recomendaciones

Adquirir nuevos materiales para el laboratorio de ingeniería inversa y prototipado, para realizar las pruebas de imprimibilidad correspondientes dentro de la universidad. O a su vez, optar por una nueva impresora que permita trabajar con materiales biocompatibles como los mencionados en el trabajo, sin la necesidad de buscar lugares externos de impresión; evitando complicaciones en la manufactura y trabajar de cerca con el material.

Calibrar las máquinas utilizadas para los ensayos de tracción, y si es posible obtener una certificación que permita la toma de datos confiables acorde a las diversas probetas ensayadas. De igual forma, dar a conocer a los estudiantes cuales son las máquinas disponibles dentro de la universidad para realizar los ensayos, ya que existe divulgación mínima en este ámbito.

Para validar el biorreactor de perfusión, puede compararse con la medición de una cámara Biodinámica de Bose-Enduratec (Wang et al., 2010) que permite medir caudales menores a 1 L/min y variaciones pequeñas de presión.

Interactuar con otras ciencias como por ejemplo biotecnología y medicina donde la mecatrónica juega un papel importante para el desarrollo de dispositivos, pues se pueden generar varios trabajos alrededor de la sinergia de aquellas ingenierías enfocándose en el tratamiento celular en andamios impresos y regeneración de hueso, pero con otro tipo de resinas o estructuras.

Realizar ensayos de tracción y compresión con probetas que se encuentren en un ambiente biológico, como el PBS; además, simularlo a condiciones de temperatura del cuerpo humano (36 – 37 °C) para conocer su comportamiento ya implantado.

Mejorar las condiciones del biorreactor, para ello es recomendable conseguir un sensor de caudal con un rango más pequeño debido a que se trabaja en el orden de los 0.01-1 mL/min

y de igual forma, el sensor de presión optar por uno que ya tenga una salida alrededor de los Voltios, para evitar ruido por el amplificador operacional.

Trabajo futuro

El sistema fabricado “Biorreactor de perfusión” permite la toma de datos para conocer la permeabilidad del andamio en sus diversas combinaciones de diseño, se propone como trabajo futuro que, en vez de trabajar con PBS se pueda trabajar con un medio lleno de células para conocer el comportamiento de estas en un ambiente dinámico, y a la vez, lograr la interacción, diferenciación y proliferación de otro tipo de células como primera instancia.

Las afirmaciones anteriores proponen mejorar el ensayo in vitro, por lo que, se puede proyectar a generarse ensayos in vivo con la normativa vigente de bioética correspondiente como segunda instancia; para obtener un implante sintético lleno de células y lograr implementarlo dentro de una persona cumpliendo así el motivo principal de este trabajo, el cual es generar scaffolds que ayuden a regenerar tejidos o huesos de pacientes que lo requieran.

Por otra parte, este trabajo se enfocó en la utilización de biomateriales rígidos para el desarrollo de los ensayos, sin embargo, se puede proyectar los mismos ensayos, pero realizarlos con estructuras estocásticas, es decir, puntos aleatorios y a su vez, con un biomaterial flexible para conocer cómo reacciona la probeta ante un medio biológico.

Bibliografía

- Akter, F. (2016). Chapter 2—Principles of Tissue Engineering. En F. Akter (Ed.), *Tissue Engineering Made Easy* (pp. 3–16). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805361-4.00002-3>
- Alves, B. / O. / O.-M. (2020). *Células HaCaT*. DeCS/MeSH. https://decs.bvsalud.org/es/ths/resource/?id=59414&filter=ths_exact_term&q=C%C3%A9lulas%20HaCaT
- Arce, M. P. (s/f). *Diseño de scaffolds para facilitar la comunicación de células madre en frascos de cultivo celular*.
- Arjona Rodríguez, J. E. (2021). *Caracterización de estructuras celulares TPMS manufacturadas aditivamente para aplicaciones de absorción de energía* [Universidad de los Andes]. <https://repositorio.uniandes.edu.co/handle/1992/55465>
- ASTM. (2013a). *Standard Terminology for Additive Manufacturing—Coordinate Systems and Test Methodologies*. <https://www.astm.org/f2921-13r19.html>
- ASTM. (2013b). *Standard Test Method for Small Punch Testing of Polymeric Biomaterials Used in Surgical Implants*. <https://www.astm.org/f2977-20.html>
- ASTM. (2014). *Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics*. <https://www.astm.org/d0638-14.html>
- ASTM. (2018). *Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics by Use of Microtensile Specimens*. <https://www.astm.org/d1708-18.html>
- ASTM. (2019). *Standard Guide for Characterization and Testing of Biomaterial Scaffolds Used in Regenerative Medicine and Tissue-Engineered Medical Products*. <https://www.astm.org/f2150-19.html>
- ASTM. (2022). *Standard Guide for Determining the Mean Darcy Permeability Coefficient for a Porous Tissue Scaffold*. <https://www.astm.org/f2952-22.html>
- Bandyopadhyay, A., & Bose, S. (2013). *Characterization of Biomaterials*. Newnes.

- Biolmage Informatics Index. (s/f). *Find Maxima | BIII*. Recuperado el 15 de agosto de 2023, de <https://biii.eu/taxonomy/term/4718>
- Blanquer, S. B. G., & Grijpma, D. W. (2021). Triply Periodic Minimal Surfaces (TPMS) for the Generation of Porous Architectures Using Stereolithography. En A. Rainer & L. Moroni (Eds.), *Computer-Aided Tissue Engineering: Methods and Protocols* (pp. 19–30). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0611-7_2
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., & Fusenig, N. E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology*, *106*(3), 761–771. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.3.761>
- Chew, S. A., Arriaga, M. A., & Hinojosa, V. A. (2016). Effects of surface area to volume ratio of PLGA scaffolds with different architectures on scaffold degradation characteristics and drug release kinetics. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *104*(5), 1202–1211. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35657>
- Chia, H. N., & Wu, B. M. (2015). Recent advances in 3D printing of biomaterials. *Journal of Biological Engineering*, *9*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s13036-015-0001-4>
- Chua, C. K., Wong, C. H., & Yeong, W. Y. (2017). Benchmarking for Additive Manufacturing. En C. K. Chua, C. H. Wong, & W. Y. Yeong (Eds.), *Standards, Quality Control, and Measurement Sciences in 3D Printing and Additive Manufacturing* (pp. 181–212). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813489-4.00008-8>
- Cold Spring Harbor Protocols. (2006). Phosphate-buffered saline (PBS). *Cold Spring Harbor Protocols*, *2006*(1), pdb.rec8247. <https://doi.org/10.1101/pdb.rec8247>
- Cooke, M. N., Fisher, J. P., Dean, D., Rimnac, C., & Mikos, A. G. (2003). Use of stereolithography to manufacture critical-sized 3D biodegradable scaffolds for bone ingrowth. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, *64B*(2), 65–69. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.10485>

- Dvanesh, V. D., Lakshmi, P. S., Reddy, K., & Vasavi, A. S. (2018). Blood Cell Count using Digital Image Processing. *2018 International Conference on Current Trends towards Converging Technologies (ICCTCT)*, 1–7.
<https://doi.org/10.1109/ICCTCT.2018.8550999>
- Ebrahimi, M. (2021). Porosity parameters in biomaterial science: Definition, impact, and challenges in tissue engineering. *Frontiers of Materials Science*, *15*(3), 352–373.
<https://doi.org/10.1007/s11706-021-0558-4>
- Formlabs. (2022). *PreForm* (3.24.2) [Software]. <https://formlabs.com/latam/software/>
Formlabs Customer Support. (s/f). Formlabs Customer Support. Recuperado el 12 de enero de 2023, de <http://support.formlabs.com/>
- Fuentealba Sierra, C. M. (2021). *Diseño de scaffolds auxéticos fabricados mediante impresión 3D para estimulación mecánica de células*. Universidad de Chile.
- Gabbott, C. M., & Sun, T. (2018). Comparison of Human Dermal Fibroblasts and HaCat Cells Cultured in Medium with or without Serum via a Generic Tissue Engineering Research Platform. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(2), 388.
<https://doi.org/10.3390/ijms19020388>
- Garcia, E. A., Ayranci, C., & Qureshi, A. J. (2020). Material Property-Manufacturing Process Optimization for Form 2 Vat-Photo Polymerization 3D Printers. *Journal of Manufacturing and Materials Processing*, *4*(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/jmmp4010012>
- Gawronska, E., & Dyja, R. (2021). A Numerical Study of Geometry's Impact on the Thermal and Mechanical Properties of Periodic Surface Structures. *Materials*, *14*(2), 427.
<https://doi.org/10.3390/ma14020427>
- Guttridge, C., Shannon, A., O'Sullivan, A., O'Sullivan, K. J., & O'Sullivan, L. W. (2022). Biocompatible 3D printing resins for medical applications: A review of marketed intended use, biocompatibility certification, and post-processing guidance. *Annals of 3D Printed Medicine*, *5*, 100044. <https://doi.org/10.1016/j.stlm.2021.100044>

- Guvendiren, M., Molde, J., Soares, R. M. D., & Kohn, J. (2016). Designing Biomaterials for 3D Printing. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2(10), 1679–1693.
<https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00121>
- ISO. (2018). *Biological evaluation of medical devices—Part 1: Evaluation and testing within a risk management process ISO 10993*. ISO. <https://www.iso.org/standard/68936.html>
- ISO. (2021, junio 2). *Medical devices—Quality management systems—Requirements for regulatory purposes ISO 13485*. ISO. <https://www.iso.org/standard/59752.html>
- Janssen, F. W., Oostra, J., Oorschot, A. van, & van Blitterswijk, C. A. (2006). A perfusion bioreactor system capable of producing clinically relevant volumes of tissue-engineered bone: In vivo bone formation showing proof of concept. *Biomaterials*, 27(3), 315–323.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.07.044>
- Jiménez Carrión, C. P. (2023). *Estudio de las aplicaciones de manufactura aditiva en materiales poliméricos estructurales con porosidad aleatoria* [Bachelor Thesis, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Carrera de Ingeniería Mecatrónica.].
<http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/36128>
- Kim, K., Yeatts, A., Dean, D., & Fisher, J. P. (2010). Stereolithographic Bone Scaffold Design Parameters: Osteogenic Differentiation and Signal Expression. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 16(5), 523–539. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2010.0171>
- Kumar, H., & Kim, K. (2020). Stereolithography 3D Bioprinting. En J. M. Crook (Ed.), *3D Bioprinting: Principles and Protocols* (pp. 93–108). Springer US.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0520-2_6
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5110), 920–926. <https://doi.org/10.1126/science.8493529>
- Lodish, H. F., Berk, A., Kaiser, C., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H. L., Martin, K. C., Yaffe, M. B., & Amon, A. (2000). *Molecular cell biology* (8th ed.). WH Freeman New York.

- Lucon, E., Benzing, J. T., & Hrabe, N. W. (2020). Small Punch Testing to Estimate Mechanical Properties of Additively Manufactured Ti-6Al-4V. *NIST*.
<https://www.nist.gov/publications/small-punch-testing-estimate-mechanical-properties-additively-manufactured-ti-6al-4v>
- Micros AUSTRIA. (s/f). *Sundew MCXI600—MICROS Produktions-u.HandelsgmbH*. - PDF Catalogs | Technical Documentation. Recuperado el 15 de agosto de 2023, de <https://pdf.medicaexpo.com/pdf/micros-produktions-uhandelsgmbH/sundew-mcxi600/74760-137303.html>
- O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14(3), 88–95. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X)
- Pandit, A., & Rangole, J. (2014). Literature Review on Object Counting using Image Processing Techniques. *International Journal of Advanced Research in Electrical, Electronics and Instrumentation Engineering*, 3(4), 8509–8512.
- Raeisdasteh Hokmabad, V., Davaran, S., Ramazani, A., & Salehi, R. (2017). Design and fabrication of porous biodegradable scaffolds: A strategy for tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 28(16), 1797–1825.
<https://doi.org/10.1080/09205063.2017.1354674>
- Ramírez Rodríguez, C. A., Narváez Tovar, C. A., Sánchez León, L. E., Peña Ortiz, I. S., & Garzón Alvarado, D. A. (2022). *Efecto del espesor de pared, tamaño y tipo de celda unitaria TPMS en la porosidad y tamaño de poro del modelo CAD de estructuras tipo lattice aplicables a la fabricación aditiva por fotopolimerización de scaffolds*.
<https://doi.org/10.5944/bicim2022.155>
- Santoro, R., Pippenger, B., Martin, I., & Wendt, D. (s/f). *Perfusion Culture of Cell-seeded 3D Scaffolds for Tissue Engineering*. Recuperado el 14 de noviembre de 2022, de <https://www.presens.de/knowledge/publications/application-note/perfusion-culture-of-cell-seeded-3d-scaffolds-for-tissue-engineering-572>

- Serpa Andrade, K. E. (2020). *Monitoreo del proceso y propiedades mecánicas de andamios porosos durante la impresión 3D por DLM*. Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE.
- SHIMADZU. (s/f). *Autograph AGS-X Series*. Recuperado el 15 de agosto de 2023, de <https://www.shimadzu.com/an/products/materials-testing/uni-ttm/autograph-ags-x-series/index.html>
- Tappa, K., & Jammalamadaka, U. (2018). Novel Biomaterials Used in Medical 3D Printing Techniques. *Journal of Functional Biomaterials*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/jfb9010017>
- Trujillo Freire, I. A. (2023). *Establecimiento de los dominios físicos a partir de estructuras TPMS matemáticamente definidas para obtener intercambiadores de calor compactos reconfigurables* [BachelorThesis, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Carrera de Ingeniería Mecatrónica.]. <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/36130>
- Vallejo Bustamante, M. J. (2022). *Caracterización de las fotoresinas que serán usadas como matrices de fabricación para los intercambiadores de calor compactos* [BachelorThesis, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Carrera de Ingeniería en Mecatrónica]. <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/32461>
- Venegas Vásconez, D. (2016). *Utilidad del small punch Test en la determinación de propiedades mecánicas de materiales*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.10161.99685>
- Walker, J. M., Bodamer, E., Kleinfehn, A., Luo, Y., Becker, M., & Dean, D. (2017). Design and mechanical characterization of solid and highly porous 3D printed poly(propylene fumarate) scaffolds. *Progress in Additive Manufacturing*, 2(1), 99–108. <https://doi.org/10.1007/s40964-017-0021-3>
- Wang, Y., Tomlins, P. E., Coombes, A. G. A., & Rides, M. (2010). On the Determination of Darcy Permeability Coefficients for a Microporous Tissue Scaffold. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 16(2), 281–289. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2009.0116>

- Woodruff, M. A., Lange, C., Reichert, J., Berner, A., Chen, F., Fratzl, P., Schantz, J.-T., & Hutmacher, D. W. (2012). Bone tissue engineering: From bench to bedside. *Materials Today*, 15(10), 430–435. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(12\)70194-3](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(12)70194-3)
- Yang, Y., Wang, G., Liang, H., Gao, C., Peng, S., Shen, L., & Shuai, C. (2018). Additive manufacturing of bone scaffolds. *International Journal of Bioprinting*, 5(1), 148. <https://doi.org/10.18063/IJB.v5i1.148>